LIMBURGS UNIVERSITAIR CENTRUM
Faculteit Geneeskunde

STRUCTUURONDERZOEK VAN PROTEINEN DOOR MIDDEL VAN ^{19}F NUCLEAIRE MAGNETISCHE RESONANTIE SPECTROSCOPIE : STUDIE VAN HET LYSOZYME VAN KIPPE-EIWIT.

Marie Elise BOX

851041

Proefschrift ingediend tot het verkrijgen
van de graad van
Doctor in de Wetenschappen
1985

opgedragen aan

mijn ouders.

Dankwoord

mijn dank gaat eerst en vooral naar mijn promotor Prof. J. Gelan voor zijn waardevolle wetenschappelijke leiding en zijn constante aanmoedigingen;

tevens dank aan Prof. H. Martens voor zijn kritische discussies en raadgevingen;

dank aan Prof. E. Onkelinx voor zijn hulpvaardigheid;

dank aan Prof. G. Préaux en aan Dr. C. Gielen van het Laboratorium voor Biochemie, K.U. Leuven voor de opname van de circulair dichroïsme spectra;

dank aan de heer T. Plüss en aan Dr. W. Ammann van Varian Zwitserland voor de opname van de 400 MHz ^1H NMR spectra;

dank aan Hilde Zurings voor het typewerk, aan Conny Wijnants voor de tekeningen en aan Marc Withofs voor de fotografie;

dank aan Christel Rappoort, Jos Kaelen, André Jodogne, Wilma Hermans en Jacqueline Gaethofs voor de praktische hulp.

Marlies Box
juli 1985.

INHOUD

SYMBOLEN EN AFKORTINGEN VI.

Hoofdstuk I. INLEIDING 1.

§ 1. Structuuronderzoek van proteïnen 1.

§ 2. Lysozyme van kippe-eiwit 3.

2.1. Samenstelling, sequentie en aktiviteit 3.

2.2. Conformatie van lysozyme 6.

a. X-stralen diffractie studie van lysozyme 6.

b. Vergelijking van de lysozyme structuur in oplossing en in de kristalvorm 6.

2.3. Binding van sacchariden en enzymatische aktiviteit 8.

a. Kristalstudie van lysozyme-inhibitor complexen 8.

b. Binding van sacchariden in oplossing 10.

c. Enzymatische aktiviteit 12.

2.4. Fysische eigenschappen 14.

a. Associatie met protonen 14.

b. Associatie met metaalionen 16.

c. Zelf-associatie 16.

d. Denaturatie 17.

§ 3. Probleemstelling 18.

Hoofstuk II. MATERIAAL EN METHODEN 19.

§ 1. Derivatisering 19.

1.1. Reactie met S-ethyltrifluorothioacetaat 19.

1.2. Reactie met azijnzuuranhydride 20.

§ 2. Enzymatische afbraak 21.

2.1. Carboxypeptidase A 21.

2.2. Aminopeptidasen 21.

§ 3. Kolomchromatografie 23.

3.1. Ionenwisselaarchromatografie 23.

3.2. Gelfiltratie 24.

§ 4. Optische technieken 26.
4.1. Absorptiespectra 26.
4.2. Absorptieverschilspectra 26.
4.3. Circulair dichroïsme 27.
§ 5. Polyacrylamidegelelektroforese 29.
§ 6. Aktiviteitsbepaling 31.
§ 7. Aminogroepdosage d.m.v. de TNBS-methode 32.
§ 8. Edman degradatie 33.
§ 9. Nucleaire magnetische resonantie spectroscopie 36.
9.1. Het 'nucleaire magnetische resonantie' fenomeen 36.
9.2. Karakteristieken van het NMR signaal 39.
a. Chemische verschuiving 39.
b. Spin-spin koppeling 41.
c. Relaxatie 41.
d. Nucleair Overhauser effect 47.
9.3. Pulssequenties 48.
a. Basispulssequentie 48.
b. CPMG-sequentie 51.
9.4. Procedure 53.
§ 10. Berekeningen 56.
10.1. Analyse van meetresultaten 56.
a. Bepaling van de vergelijking van een rechte 56.
b. Bepaling van pK_a-waarden 56.
10.2. Berekening van de coördinaten van de fluoratomen in trifluoroacetyllysozyme 57.
a. Berekening van de bindingsafstanden in de lysine zijketens 57.
b. Berekening van de torsie- en valentiehoeken in de lysine zijketens 57.
c. Berekening van de coördinaten van de fluoratomen 57.
§ 11. Producten 59.

Hoofdstuk III. SYNTHESE EN ZUIVERING VAN DE LYSOZYME DERIVATEN 60.

§ 1. Trifluoroacetylering van lysozyme 60.
1.1. Invloed van de pH, de reactietijd en de concentratie van lysozyme en S-ethyltrifluorothioacetaat op het reactieverloop 60.

1.2. Chromatografische scheiding van de trifluoroacetylderivaten 64.
a. Optimale scheidingsvoorwaarden 64.
b. Vergelijking van het elutiepatroon van lysozyme derivaten gesynthetiseerd bij verschillende pH 66.
c. Zuivering van trifluoroacetyllysozyme derivaten 66.
§ 2. Acetylderivaten van lysozyme 69.
2.1. Zuivering van acetyllysozyme derivaten 69.
2.2. Bereiding en zuivering van lysozyme derivaten met zowel acetyl- als trifluoroacetylgroepen gebonden 73.
§ 3. Enzymatische afbraak 75.
3.1. Verwijdering van het C-eindstandige Leu-129 van LF1 door middel van carboxypeptidase A 75.
3.2. Behandeling van LF1 met aminopeptidasen 75.
§ 4. Samenvatting 76.

Hoofdstuk IV. VERGELIJKING VAN DE STRUCTUUR EN EIGENSCHAPPEN VAN DE LYSOZYME DERIVATEN MET DEZE VAN NATIEF LYSOZYME 77.
§ 1. Inleiding 77.
§ 2. Onderzoek naar de vrije aminogroepen in LF1 en LH1 78.
2.1. Bepaling van het aantal vrije aminogroepen 78.
a. Gebruik van de TNBS-methode voor de bepaling van het aantal vrije aminogroepen in LF1 78.
b. Hydrolyseerbaarheid van de trifluoroacetamide-binding 80.
c. Bepaling van het aantal vrije aminogroepen in LH1 d.m.v. de TNBS-methode 80.
2.2. Onderzoek naar de aard van de vrije aminogroep in LF1 en LH1 82.
§ 3. Onderzoek naar de invloed van de trifluoroacetylering en van de acetylering van de lysine aminogroepen op de structuur van lysozyme 85.
3.1. Gelfiltratie op Sephadex G-100 in 8 M ureum 85.
3.2. Vergelijking van de conformatie van LF1 en LH1 met deze van natief lysozyme 85.
a. Circulair dichroïsme studie 85.
b. ^{1}H NMR studie 87.
c. Bespreking 92.

§ 4. Vergelijking van de aktiviteit en de temperatuurstabiliteit van LF1 en LH1 met deze van natief lysozyme 95.
4.1. Aktiviteit t.o.v. *Micrococcus lysodeikticus* 95.
4.2. Temperatuurstabiliteit 99.
§ 5. Samenvatting 102.

Hoofdstuk V. ^{19}F NMR STUDIE VAN TRIFLUOROACETYLLYSOZYME 103.
§ 1. Inleiding 103.
§ 2. ^{19}F NMR spectra van trifluoroacetylderivaten 104.
2.1. Opname van de ^{19}F NMR spectra 104.
2.2. ^{19}F NMR spectra van de trifluoroacetylderivaten 104.
a. ^{19}F NMR spectra van lysine derivaten 104.
b. ^{19}F NMR spectra van trifluoroacetyllysozyme derivaten 105.
c. ^{19}F NMR spectra van acetyl-trifluoroacetyllysozyme derivaten 107.
§ 3. Invloed van pH en ionensterkte op het ^{19}F NMR spectrum van LF1 108.
3.1. pH-studie 108.
a. LF1 108.
b. Des-Leu-129-LF1 108.
c. Analyse van de pH-curven 112.
3.2. μ-studie 114.
3.3. Bespreking 117.
§ 4. Binding van inhibitoren aan LF1 120.
4.1. Invloed van NAG en van $(NAG)_3$ op het ^{19}F NMR spectrum van LF1 120.
4.2. Bespreking 120.
§ 5. Zelf-associatie van LF1 123.
5.1. Invloed van de LF1 concentratie op het ^{19}F NMR spectrum 123.
5.2. Bespreking 123.
§ 6. Relaxatiestudie 125.
6.1. Bepaling van de spin-spin en spin-rooster relaxatie-tijd van de F-signalen in LF1 125.
6.2. Bespreking 128.

§ 7. Binding van lanthanide-ionen 129.
7.1. Binding van lanthanide-ionen aan lysozyme 129.
7.2. Berekening van de coördinaten van de fluoratomen in LF1 130.
7.3. Lanthanide-ionen als 'shift probes' 134.
a. Principe 134.
b. Metingen 135.
c. Analyse 138.
7.4. Relaxatiestudie met Gd^{3+} 140.
a. Principe 140.
b. Metingen 141.
c. Analyse 142.
7.5. Bespreking 144.
§ 8. Toewijzing van de F-signalen aan de lysines in LF1 148.
8.1. Rechtstreekse toewijzingsinformatie 148.
8.2. Voorstel tot toewijzing van de F-signalen aan de lysines in LF1 150.
8.3. Besluit 155.
§ 9. Onderzoek van het $^{19}F\{^{1}H\}$ nucleair Overhauser effect in LF1 157.
9.1. Het nucleair Overhauser effect 157.
9.2. $^{19}F\{^{1}H\}$ NOE metingen 157.
9.3. Bespreking 159.
§ 10. Samenvatting 161.

EINDBESPREKING EN SAMENVATTING 163.

REFERENTIES 167.

SYMBOLEN EN AFKORTINGEN

β	: Bohr magneton
γ_N	: gyromagnetische verhouding van de kern N
δ	: chemische verschuiving (ppm)
$\Delta\delta$	: verandering in chemische verschuiving (ppm)
$\Delta c, \Delta d, \Delta p$	: verandering in chemische verschuiving t.g.v. resp. contact, diamagnetische en pseudo-contact verschuiving bij binding van een paramagnetisch ion
θ	: ellipticiteit
$[\theta]_\lambda^{MRW}$	: 'mean residue' ellipticiteit
μ	: ionensterkte
$\boldsymbol{\mu}$	: magnetisch moment
ν	: frequentie (Hz)
σ	: afschermingsconstante
τ_c	: correlatietijd voor moleculaire beweging
ω	: frequentie (rad s^{-1})
ω_L	: Larmor frequentie (rad s^{-1})
AF	: 'apodization function' (s)
APM	: aminopeptidase M
APS	: ammoniumperoxodisulfaat
AT	: acquisitietijd
$B_{1/2}$	: bandbreedte op halve hoogte
BT	: wachttijd in de CPMG sequentie
CD	: circulair dichroïsme
CI	: chemische ionisatie
CM	: carboxymethyl-
CPA	: carboxypeptidase A
CPMG	: Carr-Purcell-Meiboom-Gill
csa	: chemische verschuiving anisotropie
D1, D2	: wachttijd (s)
dd	: dipool-dipool interactie
DIP	: 'direct insertion probe'
DNP	: 2,4-dinitrofenyl-

DOCYCL : 'Decoupler offset cycling for improved NOE difference experiments or multiple peak saturation'

DSS : 4,4-dimethyl-4-silapentaansulfonaat

FDNB : fluoro-2,4-dinitrobenzeen

FID : 'free induction decay'

FT : Fourier transformatie

GuHCl : guanidinium hydrochloride

H_o : uitwendig magneetveld

H_1, H_2 : secundair magneetveld, loodrecht op H_o

H_{eff} : effectief magneetveld

I : spinquantumgetal

J : koppelingsconstante (Hz)

$J(\omega)$: spectrale dichtheid bij de frequentie ω

L : lysozyme

LAP : leucine aminopeptidase

Ln^{3+} : lanthanide-ion

M_o : evenwichtsmagnetisatie van een spinsysteem in een uitwendig magneetveld H_o

$M_{y'}$: magnetisatie langs de y'-as in het roterend assenstelsel x'y'z

M_z : magnetisatie langs de z-as

NAG : N-acetyl-glucosamine

$(NAG)_n$: N-meer van NAG

NAM : N-acetyl-muraminezuur

NMR : nucleaire magnetische resonantie

NOE : nucleair Overhauser effect

NT : het aantal keer dat de pulssequentie herhaald wordt

PAGE : polyacrylamidegelelektroforese

PITC : fenylisothiocyanaat

PMS : fenylmethylsulfonylfluoride

PMS-CPA : CPA behandeld met PMS

Pn : puls

PTC : fenylthiocarbamyl-

PTH : fenylthiohydantoïne

PW : 90°-puls

R_{ij} : verhouding van Δp voor twee atomen i en j

RE : 'resolution enhancement' (s)

S : elektron spin quantumgetal

SE : 'sensitivity enhancement' (s)

SW : frequentiegebied (Hz) van een NMR spectrum waarin de signalen geobserveerd worden

T_1 : spin-rooster of longitudinale relaxatietijd

T_2 : spin-spin of transversale relaxatietijd

$T_{1,p}$: paramagnetische bijdrage in T_1

T_m : transitietemperatuur (°C)

TEMED : N,N,N',N'-tetramethyldiaminoethaan

ε-TFA-Lys : ε-N-trifluoroacetyllysine

α,ε-$(TFA)_2$-Lys : α,ε-N,N-ditrifluoroacetyllysine

TFP : 1,1,1-trifluoropropanon

TNBS : 2,4,6-trinitrobenzeensulfonzuur

TNP : 2,4,6-trinitrofenyl-

Tris : tris-(hydroxymethyl)-aminomethaan

Hoofdstuk I. INLEIDING

§ 1. Structuuronderzoek van proteïnen

Het structuuronderzoek van proteïnen levert een belangrijke bijdrage in het begrijpen van de functie en aktiviteit van proteïnen. Voor dit structuuronderzoek kunnen diverse technieken aangewend worden.

Door middel van X-stralen diffractie wordt de structuur van het kristallijne proteïne onderzocht. Deze kristalstructuur, welke de conformatie geeft van het molecule uitgekristalliseerd bij hoge zoutconcentratie, is echter moeilijk te bepalen voor grote proteïnen.

Met behulp van spectroscopische technieken, o.a. circulair dichroïsme, worden de functionele groepen van een opgelost proteïne bestudeerd. Dit levert informatie over het geheel van deze groepen.

Nucleaire magnetische resonantie (NMR) spectroscopie daartegenover geeft de mogelijkheid om individuele atomen van een proteïne in oplossing te bestuderen en kan kwantitatieve informatie verschaffen over de ruimtelijke positie en de conformationele beweeglijkheid van deze atomen.

Waterstof (^{1}H) en koolstof (^{13}C), de meest bestudeerde NMR kernen, komen veelvuldig voor in proteïnen, zodat ^{1}H en ^{13}C NMR spectra van proteïnen een grote verscheidenheid aan signalen bevatten, welke daarenboven gedeeltelijk samenvallen. Het opnemen van ^{13}C NMR spectra wordt bemoeilijkt door de geringe gevoeligheid van deze kern.

Deze problemen worden verminderd door het merken van het proteïne met een NMR-gevoelig atoom, zoals bijvoorbeeld fluor. Het gebruik van ^{19}F NMR voor de studie van proteïnen heeft als voordeel dat fluor een grote gevoeligheid heeft voor NMR meting (vergelijkbaar met deze van het waterstofatoom) en dat het ^{19}F NMR spectrum van een F-gemerkt proteïne slechts een relatief klein aantal signalen bevat, welke kunnen verspreid liggen over een groot frequentiegebied.

Voor de ^{19}F NMR studie van macromoleculen kunnen fluoratomen via verschillende methoden geïntroduceerd worden :

- door het fluoreren van kleine moleculen welke een zekere affiniteit voor het proteïne vertonen; bijvoorbeeld voor de studie van de interactie tussen myeloma antilichamen en trifluoromethyl-nitrofenyl-haptenen (Hardy en Richards, 1978);
- door het covalent binden van fluor-merkers aan reactieve groepen van de aminozuurzijketens van het proteïne met behulp van gefluoreerde reagentia; bijvoorbeeld de studie van p-trifluoromethylbenzeensulfonyl-α-chymotrypsine (Gerig et al., 1979a);
- door het biosynthetisch inbouwen van gefluoreerde aminozuren, bijvoorbeeld van m-fluoro-tyrosine in alkalisch fosfatase van *Escherichia coli* (Sykes et al.,1974).

Het invoeren van vreemde atomen of groepen in een proteïne kan de structuur en aktiviteit van het proteïne beïnvloeden. De eigenschappen van het gefluoreerde systeem moeten dus vergeleken worden met deze van het natieve proteïne.

Onze studie van het gebruik van ^{19}F NMR spectroscopie in het structuuronderzoek van proteïnen werd uitgevoerd op het lysozyme van kippe-eiwit. Hierna volgt een beschrijving van de structuur en eigenschappen van dit enzym.

§ 2. Lysozyme van kippe-eiwit

2.1. Samenstelling, sequentie en aktiviteit

Het lysozyme van kippe-eiwit (mucopeptide N-acetyl-muramoyl-hydrolase, EC 3.2.1.17), verder aangeduid als lysozyme, is een relatief klein proteïne bestaande uit één polypeptideketen. Lysozyme heeft een molecuulgewicht van 14500 en bevat 129 aminozuren. De aminozuursamenstelling, bepaald door Jollès et al. (1960) en door Canfield (1963a), staat aangegeven in Tabel I-1. Hieruit blijkt dat lysozyme een grote hoeveelheid aan basische aminozuren en aan tryptofaan bevat.

De primaire structuur van lysozyme werd opgehelderd door Canfield (1963b) en door Jollès et al. (1963) en staat aangegeven in Fig. I-1.

Lysozyme heeft lytische aktiviteit ten opzichte van bacteriën. *Micrococcus lysodeikticus* is bijzonder gevoelig aan lysozyme en wordt gebruikt als substraat in de meeste methodes voor dosage van de lysozyme aktiviteit. Deze aktiviteit is gericht t.o.v. de bacteriële celwand, namelijk t.o.v. het polysaccharide gedeelte bestaande uit alternerende N-acetylglucosamine (NAG) en N-acetyl-muraminezuur (NAM) eenheden verbonden door β-(1,4)-glycosidische bindingen (Fig. I-2) (Imoto et al., 1972).

Lysozyme bezit eveneens affiniteit voor NAG oligomeren. De hogere oligomeren worden gehydrolyseerd; NAG, $(NAG)_2$ en $(NAG)_3$ werken inhiberend (Imoto et al., 1972).

aminozuur	aantal eenheden per molecule	aminozuur	aantal eenheden per molecule
Ala	12	Leu	8
Arg	11	Lys	6
Asp	7	Met	2
Asn	14	Phe	3
Cys	8	Pro	2
Glu	2	Ser	10
Gln	3	Thr	7
Gly	12	Trp	6
His	1	Tyr	3
Ile	6	Val	6

Tabel I-1 : Aminozuursamenstelling van het lysozyme van kippe-eiwit.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Lys	Val	Phe	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Met	Lys
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Arg	His	Gly	Leu	Asp	Asn	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Ser	Leu	Gly
27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Asn	Trp	Val	Cys	Ala	Ala	Lys	Phe	Glu	Ser	Asn	Phe	Asn
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Thr	Gln	Ala	Thr	Asn	Arg	Asn	Thr	Asp	Gly	Ser	Thr	Asp
53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
Tyr	Gly	Ile	Leu	Gln	Ile	Asn	Ser	Arg	Trp	Trp	Cys	Asn
66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
Asp	Gly	Arg	Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Cys	Asn	Ile
79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
Pro	Cys	Ser	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Ser
92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
Val	Asn	Cys	Ala	Lys	Lys	Ile	Val	Ser	Asp	Gly	Asn	Gly
105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117
Met	Asn	Ala	Trp	Val	Ala	Trp	Arg	Asn	Arg	Cys	Lys	Gly
118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	
Thr	Asp	Val	Gln	Ala	Trp	Ile	Arg	Gly	Cys	Arg	Leu	

Fig. I-1 : Aminozuursequentie van het lysozyme van kippe-eiwit.

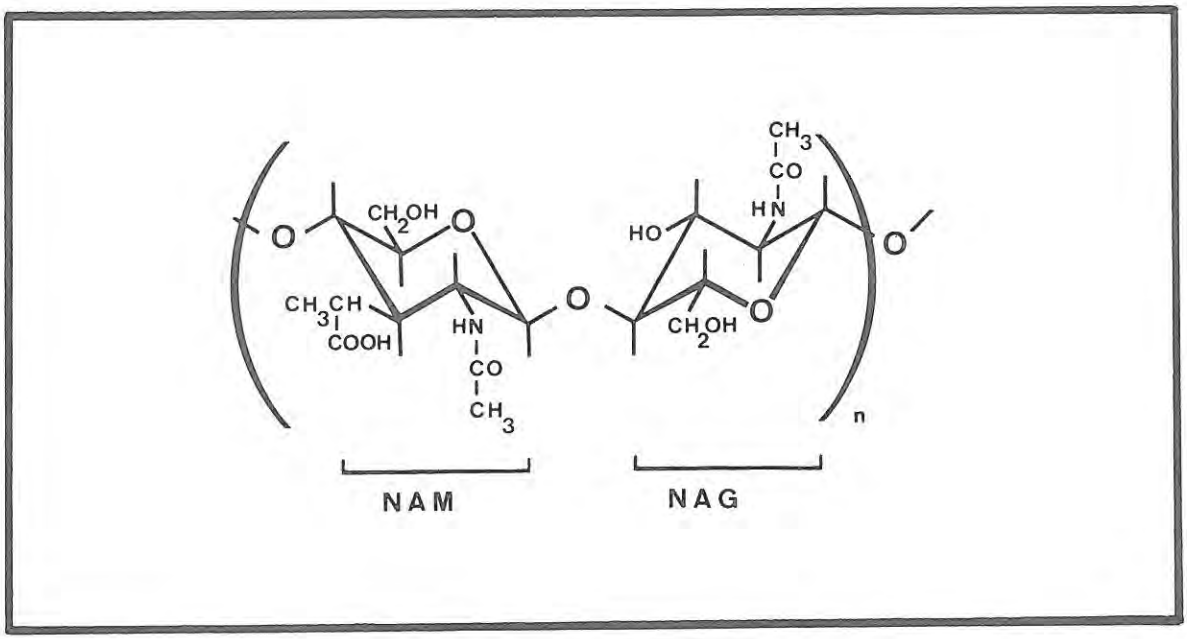


Fig. I-2 : Voorstelling van het polysaccharide gedeelte van de bacteriële celwand, bestaande uit een polymeer van alternerende N-acetyl-glucosamine (NAG) en N-acetyl-muraminezuur (NAM) eenheden verbonden door β-(1,4)-glycosidische bindingen.

2.2. Conformatie van lysozyme

a. X-stralen diffractie studie van lysozyme

De drie-dimensionele structuur van lysozyme werd bepaald door Blake et al. (1965, 1967a) op tetragonale kristallen gegroeid bij pH 4,7 in 1 M NaCl. De structuur van andere kristalvormen van lysozyme, zoals de trikliene, de monokliene en de orthorombische, werd eveneens bepaald. Deze vormen ontstaan in een kristallisatiemedium met andere pH en/of ionensamenstelling. Een vergelijking van de verschillende structuren toont aan dat lysozyme nagenoeg dezelfde conformatie aanneemt in deze kristalvormen. De hierna vermelde structuurgegevens zijn deze voor de tetragonale vorm welke het uitvoerigst onderzocht is.

Het lysozyme molecule heeft de vorm van een uitgerekte ellipsoïde met afmetingen 4,5 × 3,0 × 3,0 nm en heeft een diepe kloof waarin zich de aktieve plaats van het enzym bevindt (Fig. I-3). Deze kloof verdeelt het molecule ruwweg in twee delen : het ene deel bevat de twee ketenuiteinden en is gevouwen rond een kern van hydrofobe groepen, het andere deel bevat het centrale gedeelte van de keten (aminozuren 40-85) en bevat voornamelijk hydrofiele groepen welke aan de oppervlakte of langs de kloof gelocaliseerd zijn.

Het lysozyme molecule bevat drie korte stukken helixstructuur (aminozuren 5-15, 24-34 en 88-96) en een gedeelte van de polypeptideketen (aminozuren 42-54) is in β-conformatie.

In het kristal is er een zoutbrug tussen Lys-13 en de α-carboxylgroep (Blake et al., 1967a) en tussen Glu-7 en de ε-aminogroep van Lys-1 (Browne et al., 1969).

Lysozyme bevat geen vrije thiolgroepen; de acht cysteïnes zijn twee aan twee gebonden in disulfide bruggen.

b. Vergelijking van de lysozyme structuur in oplossing en in de kristalvorm

Een vergelijking van de structuurgegevens in beide toestanden toont aan dat de algemene structuur van het lysozyme molecule in oplossing zeer analoog is aan deze in de kristalvorm (Blake et al., 1978; Perkins en Dwek, 1980). In tegenstelling met de kristalvorm bezit het lysozyme in oplossing een grotere thermische beweeglijkheid; vooral de groepen aan het oppervlak van het molecule bezitten een hoge mobiliteit (Blake et al., 1978).

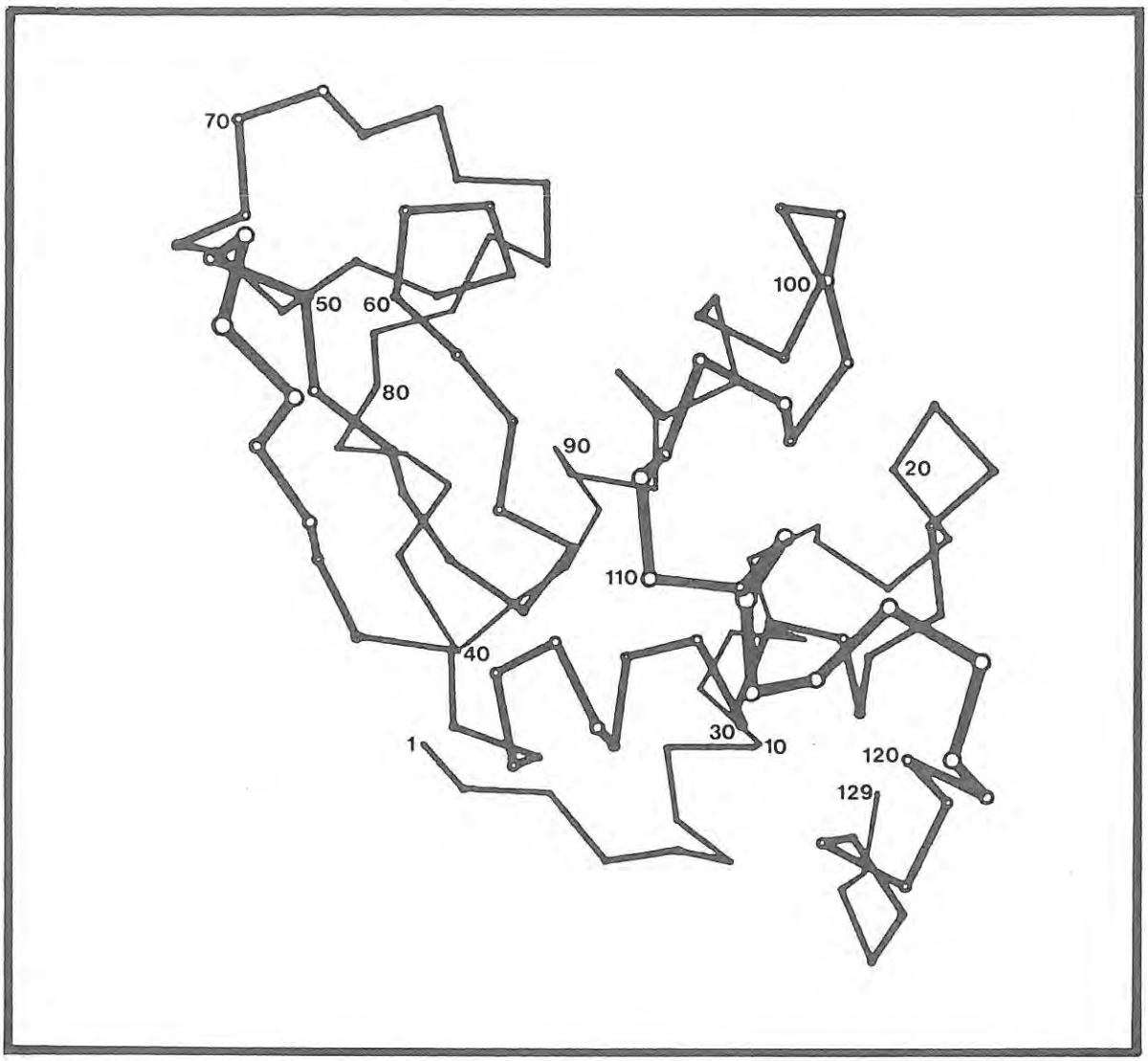


Fig. I-3 : Voorstelling van de conformatie van de lysozyme hoofdketen (de aangegeven posities zijn deze van de α-koolstofatomen) (naar Imoto et al. (1972)).

2.3. Binding van sacchariden en enzymatische aktiviteit

a. Kristalstudie van lysozyme-inhibitor complexen

Lysozyme heeft zes bindingsplaatsen (A-F) voor de binding van een hexasaccharide. De binding in plaatsen A, B en C werd aangetoond door kristalstudie van het complex tussen lysozyme en $(NAG)_3$ (Blake et al., 1967b). Binding in plaats D werd geobserveerd voor de lactongroep van een lactonderivaat van $(NAG)_4$ (Ford et al., 1974). In de plaatsen E en F werd geen saccharidebinding waargenomen : deze plaatsen zijn geblokkeerd door een naburig lysozyme molecule in het kristalrooster. De mogelijkheid voor binding van saccharide eenheden in deze plaatsen werd aangetoond door middel van modelbouw en theoretische berekeningen (Blake et al., 1967b; Pincus en Scheraga, 1981).

Uit deze modelbouw blijkt dat de vierde NAG eenheid vanaf het niet-reducerend uiteinde niet in stoelconformatie kan binden in plaats D, omwille van sterische interacties met naburige aminozuurzijketens. Deze interacties worden vermeden door vervorming van de conformatie naar een half-stoel (Blake et al., 1967b).

Door kristalstudies met NAM en door onderzoek van de interacties van de sacchariden met groepen in de aktieve plaats werd afgeleid dat de NAM eenheden van de bacteriële celwand alleen kunnen binden in plaatsen B, D en F (Blake et al., 1967b) (Fig. I-4). Vermits bij hydrolyse de glycosidische binding tussen een NAM en een NAG eenheid wordt gesplitst, moet deze doorbraak gebeuren tussen de eenheden in plaatsen D en E. Hydrolyse van de binding tussen de suiker eenheden in plaatsen B en C is uitgesloten omdat $(NAG)_3$, dat bindt in plaatsen A,B en C, niet afgebroken wordt (Blake et al., 1967b).

Deze lokalisatie van de catalytische plaats leverde een eerste identificatie van de functionele groepen in de aktieve plaats van lysozyme. Uit het kristalmodel van lysozyme blijkt namelijk dat de glycosidische zuurstof welke de suiker eenheden in plaatsen D en E verbindt zich op ongeveer 0,3 nm van de carboxylgroepen van Glu-35 en Asp-52 bevindt. Uit verdere studies blijkt dat de carboxylgroepen van Asp-52 en Glu-35 inderdaad de functionele groepen voor de lysozyme aktiviteit zijn.

verbinding	bindingsplaats					
	A	B	C	D	E	F
substraat	NAG	NAM	NAG	NAM	NAG	NAM
$(NAG)_3$	NAG	NAG	NAG			
$(NAG)_2$		NAG	NAG			
NAG			NAG $\begin{matrix}\alpha \\ \beta\end{matrix}$			

Fig. I-4 : Binding van het substraat en van N-acetyl-glucosamine oligomeren in de bindingsplaatsen A-F van lysozyme.

De binding van enkele sacchariden aan lysozyme staat aangegeven in Fig. I-4. Het hexasaccharide bindt met het reducerend uiteinde in plaats F. Het dimeer $(NAG)_2$ bindt in plaatsen B en C; NAG bindt in plaats C met een licht verschillende bindingswijze voor het α- en het β-anomeer (Blake et al., 1967b).

Bij binding van sacchariden in de aktieve plaats worden er verscheidene H-bruggen gevormd met het enzym. De binding veroorzaakt een lichte conformatieverandering in het proteïne. Het duidelijkst is deze in de beweging van Trp-62 en van de keten tussen aminozuren 70 en 75, hetgeen een versmalling van de aktieve plaats tot gevolg heeft (Blake et al., 1978).

b. Binding van sacchariden in oplossing

De binding van mono-, di- en trisacchariden aan lysozyme in oplossing veroorzaakt nagenoeg dezelfde conformatieveranderingen van het proteïne als bij vorming van de kristallijne complexen (Blake et al., 1978).

Tabel I-2 geeft de associatieconstante voor binding van diverse oligosacchariden aan lysozyme. Voor de NAG oligomeren is er een toename van de bindingsconstante van monomeer naar dimeer en naar trimeer. De hogere oligomeren hebben nagenoeg dezelfde affiniteit voor lysozyme als het trimeer. De associatieconstante voor $(NAG\text{-}NAM)_2$ is ongeveer een factor 100 lager dan deze voor NAG-NAM-NAG. Het toevoegen van een vierde suiker eenheid aan een trisaccharide bemoeilijkt de binding; dit is een aanwijzing voor de afwijkende conformatie van het suiker in plaats D (Imoto et al., 1972).

Bij binding van NAG aan lysozyme is er competitie tussen het α- en het β-anomeer. Uit een ^1H NMR studie van de methyl-protonen van de acetamidogroep blijkt dat de anomeren met een licht verschillende oriëntatie binden. De α- en β-methyl-glycosides van NAG binden op dezelfde manier als β-NAG (Dahlquist en Raftery, 1968). De α- en β-anomere vormen van $(NAG)_2$ en van $(NAG)_3$ binden op identieke manier (Dahlquist en Raftery, 1969).

Naast zijn hydrolytische werking catalyseert lysozyme eveneens een glycosyltransfer naar andere acceptoren dan water. Studies van deze glycosyltransfer :

- leveren een aanwijzing voor de specificiteit van de bindingsplaatsen E en F (Imoto et al., 1972);

saccharide	K_{ass} (M^{-1})	μ
NAG	40	0,1
$(NAG)_2$	$5,25.10^3$	0,1
$(NAG)_3$	$1,1 .10^5$	0,1
$(NAG)_4$	$1,06.10^5$	0,1
$(NAG)_5$	$1,07.10^5$	0,1
$(NAG)_6$	$1,62.10^5$	0,1
NAG-NAM	20	0,2
NAM-NAG	$1,1 .10^4$	0,2
NAG-NAM-NAG	$2,8 .10^5$	0,2
$(NAG-NAM)_2$	$2,1 .10^3$	0,2
β-methyl-NAG	33	0,2

Tabel I-2 : Associatieconstante voor de binding van sacchariden aan lysozyme bij 25°C, pH 5-5,5 en de aangegeven ionensterkte μ (Imoto et al., 1972).

bindings-plaats	interagerende groepen		interactie
	suiker	enzym	
A	NH	Asp-101 Oδ1	H-brug
		Trp-62	niet-polair contact
B	O_6H	Asp-101 Oδ2	H-brug
		Trp-62	niet-polair contact
C	O_6	Trp-62 NεH	H-brug
	O_3	Trp-63 NεH	H-brug
	$-NHCOCH_3$	acetamido pocket	2 H-bruggen en niet-polair contact
E	$-NHCOCH_3$	acetamido pocket	2 H-bruggen
	C_6	Val-109 Cδ1, Cδ2	niet-polair contact
	O_3	Gln-57 NOδ	H-brug

Tabel I-3 : Interacties tussen saccharide en aminozuurzijketens in de aktieve plaats bij vorming van het enzym-saccharide complex in oplossing (Imoto et al., 1972).

- tonen aan dat de hydrolyse van de glycosidische binding gebeurt met behoud van conformatie : het suiker in plaats D behoudt de β-configuratie (Raftery en Rand-Meir, 1968).

Het enzym-saccharide complex in oplossing wordt gestabiliseerd door waterstofbrugvorming en niet-polaire interacties. In Tabel I-3 worden de voornaamste interacties aangegeven (Imoto et al., 1972).

De pH-afhankelijkheid van de saccharide binding aan lysozyme kan beschreven worden op basis van de ionisatie van Glu-35, Asp-48, Asp-52, Asp-66 en Asp-101 (Nakae et al., 1975b).

c. Enzymatische aktiviteit

Er is een aanzienlijk verschil tussen de aktiviteit van lysozyme ten opzichte van kleine substraten, zoals $(NAG)_6$, en de lytische aktiviteit ten opzichte van bacteriële cellen en celwanden :

- het pH-optimum voor de hydrolyse van kleine substraten ligt rond pH 5 (Davies et al., 1969);
- de lytische aktiviteit vertoont een ingewikkelde afhankelijkheid van de pH en de ionensterkte : voor ionensterkte lager dan 1 ligt het pH-optimum rond pH 9, bij hogere ionensterkten verschuift het pH-optimum naar pH 5 (Davies et al., 1969; Saint-Blancard et al., 1981);
- acetylering van de aminogroepen van lysozyme beïnvloedt de lytische aktiviteit maar niet de aktiviteit ten opzichte van kleine substraten (Davies en Neuberger, 1969);
- de gevoeligheid van de celwand voor hydrolyse verhoogt met de negatieve lading op de celwand (Perkins, 1967).

Lysozyme hydrolyseert de β-(1,4)-glycosidische binding tussen C_1 van het suiker in bindingsplaats D en O_4 van het suiker in plaats E, met behoud van β-configuratie. Fig. I-5 geeft het mechanisme van de enzymatische reactie. De functionele groepen welke rechtstreeks betrokken zijn bij de lysozyme aktiviteit zijn Glu-35, een proton donor, en Asp-52, een negatief geladen groep die de positieve lading in het substraat stabiliseert.

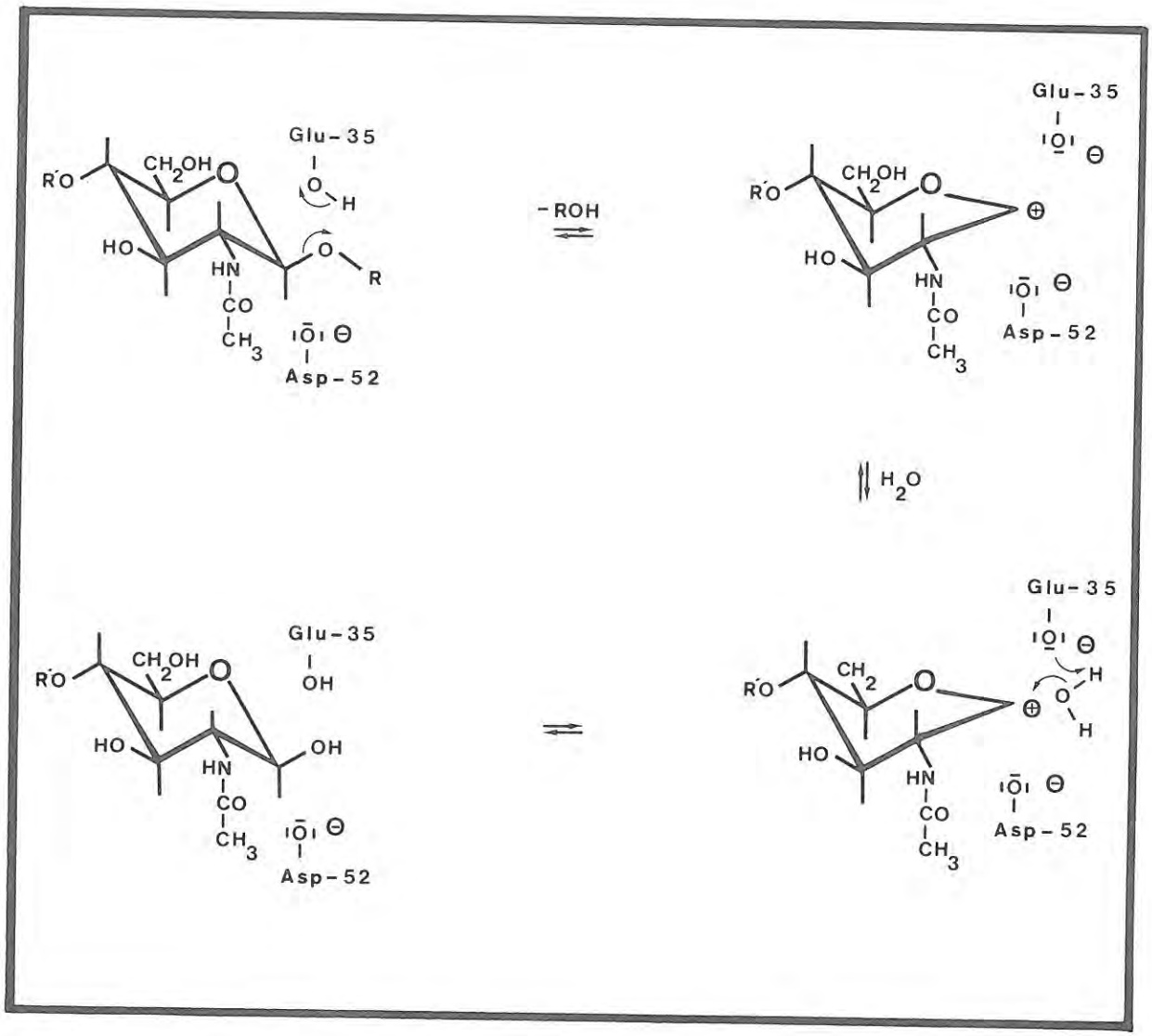


Fig. I-5 : Reactiemechanisme voor de hydrolyse van de β-(1,4)-glycosidische binding tussen de suiker eenheden in bindingsplaatsen D en E in de aktieve plaats van lysozyme.

2.4. Fysische eigenschappen

a. Associatie met protonen

De iso-elektrische pH van lysozyme is 11,0-11,35 bij ionensterkte 0,01-0,1 (Imoto et al., 1972).

Lysozyme heeft 32 ioniseerbare groepen; voor 11 van deze groepen werd de ionisatieconstante bepaald. Tabel I-4 geeft de pK_a-waarde en de relatieve solventtoegankelijkheid van deze groepen.
De solventtoegankelijkheid van een atoom wordt bepaald als dat gedeelte van het oppervlak van een bol rond het atoom dat niet inbegrepen is in gelijkaardige bollen rond andere atomen. De straal van deze bol is de som van de van der Waals straal van het atoom en de straal van het solventmolecule.
De solventtoegankelijkheid van een groep is de som van de solventtoegankelijkheden van de samenstellende atomen. De relatieve solventtoegankelijkheid is de verhouding tussen de solventtoegankelijkheid van een atoom of groep in een proteïne en deze in een modelpeptide.

Een vergelijking van de pK_a-waarden van enkele carboxylgroepen (Tabel I-4) met de omgeving van deze groepen in het proteïne toont aan dat :

- Glu-35 een abnormaal hoge pK_a heeft, als gevolg van een geringe solventtoegankelijkheid en een sterk hydrofobe omgeving;
- Asp-66 volledig afgeschermd is van het solvent en een abnormaal lage pK_a heeft. Asp-66 vormt waterstofbruggen met Tyr-53 en Thr-69 en deze aminozuren vormen waterstofbruggen met andere groepen. Dit betekent dat een waterstofbrugnetwerk een lading kan stabiliseren in afwezigheid van solvent (Imoto et al. 1972).

In oplossing werd een zoutbrug aangetoond tussen Glu-7 en de ε-aminogroep van Lys-1 (Shindo et al., 1978) en tussen Lys-13 en de α-carboxylgroep (Gerken et al., 1982).

ioniseerbare groep	pK_a [1]	relatieve solvent-toegankelijkheid [2]
carboxyl		
α	3,1	0,7
Asp-18	-	0,3 (0,39)
Asp-48	4,3	0,3 (0,50)
Asp-52	3,4	0,3 (0,21)
Asp-66	1,6	0 (0,02)
Asp-87	-	0,7 (0,75)
Asp-101	4,5	0,8 (0,49)
Asp-119	-	0,5 (0,66)
Glu-7	2,6	0,4 (0,50)
Glu-35	6,1	0,2 (0,14)
amino		
α	-	0,1
Lys-1	-	0,6
Lys-13	-	0,4
Lys-33	-	0,9
Lys-96	-	0,5
Lys-97	-	1
Lys-116	-	0,5
andere		
His-15	5,8	0,2
Tyr-20	10,3	0,6
Tyr-23	9,8	0,4
Tyr-53	12,1	0,2

Tabel I-4 : Ionisatieconstanten en relatieve solventtoegankelijkheid van ioniseerbare groepen in lysozyme.

[1] pK_a-waarden bij 25°C μ 0,1 volgens Kuramitsu en Hamaguchi (1980).

[2] volgens Imoto et al. (1972), waarden tussen haakjes volgens Blake et al. (1978).

b. Associatie met metaalionen

Lysozyme heeft affiniteit voor metaalionen zoals Mn^{2+}, Co^{2+} en de lanthanide-ionen. Uit de kristalstudie van lysozyme-Gd^{3+} complexen (Perkins et al., 1979) blijkt dat het Gd^{3+}-ion bindt in de aktieve plaats, meer bepaald tussen de carboxylgroepen van Asp-52 en Glu-35. De binding van Gd^{3+} aan deze carboxylgroepen is monodentaat. Er is geen aanwijzing voor binding van Gd^{3+} aan de overige carboxylgroepen van het kristallijne lysozyme.

In oplossing vormen de lanthanide-ionen en enkele overgangsmetaalionen zoals Mn^{2+}, Cu^{2+} en Co^{2+} 1:1 complexen met lysozyme (McDonald en Phillips, 1969; Gallo et al., 1971). Lanthanide-ionen binden met hoge affiniteit ($K_{ass} > 1000\ M^{-1}$) tussen Asp-52 en Glu-35 (Ostroy et al., 1978; Perkins et al., 1981). De affiniteit van de carboxylgroepen van Glu-7, Asp-87 en Asp-101 voor lanthanide-ionen is beduidend lager ($K_{ass} \approx 10\ M^{-1}$) (Campbell et al., 1975).

NMR studies tonen aan dat het binden van lanthanide-ionen lichte conformatieveranderingen veroorzaakt in het enzym. Het voornaamste effect is het verbreken van de interactie tussen Glu-35 en Trp-108 en de invloed hiervan op naburige groepen (Blake et al., 1978).

c. Zelf-associatie

Lysozyme vertoont een reversibele zelf-associatie bij pH-waarden hoger dan 5 en deze associatie neemt toe met stijgende pH. Tussen pH 5 en 9 worden voornamelijk dimeren gevormd met $K_{dim} \approx 500\ M^{-1}$ bij 20°C en 0,15 M NaCl (Sophianopoulos en Van Holde, 1964).

Deze dimerisatie is een 'head-to-tail' associatie : in het intermoleculair contact zijn verschillende gebieden van twee lysozyme moleculen betrokken (Banerjee et al., 1975). De associatie gebeurt tussen het gebied rond Glu-35, Trp-108, Trp-62 en Trp-63 (Banerjee et al., 1975; Norton en Allerhand, 1977; Shindo et al., 1977) en het gebied rond His-15 (Venkatappa en Steinrauf, 1969; Shindo et al., 1977; Wooten en Cohen, 1979; Perkins en Dwek, 1980).

De zelf-associatie van lysozyme wordt geïnhibeerd door de aanwezigheid van sacchariden (Sophianopoulos, 1969).

d. Denaturatie

Lysozyme is een ongewoon stabiel proteïne : er zijn geen significante conformatieveranderingen over het pH-gebied 1,2-11,3 bij lage ionensterkte en bij gematigde temperaturen (Imoto et al., 1972).

Lysozyme heeft een hoge thermische stabiliteit, met een transitietemperatuur T_m van 77°C bij pH 7,0 en lage ionensterkte. Bij overgang van pH 3 naar pH 1 is er een daling van T_m van 75°C tot 45°C (Sophianopoulos en Weiss, 1964; Ogasahara en Hamaguchi, 1967).
Lysozyme gedenatureerd bij hoge temperatuur bevat nog gedeelten van geordende structuur welke verder worden afgebroken door toevoegen van guanidinium hydrochloride (Aune et al., 1967).

De denaturatie van lysozyme met denaturerende verbindingen vereist relatief hoge concentraties : het punt halverwege de denaturatie-overgang wordt bereikt bij 4,1 M guanidinium hydrochloride en bij 9 à 10 M ureum (Imoto et al., 1972).

§ 3. Probleemstelling

Uit wat voorafgaat blijkt dat de structuur en aktiviteit van het lysozyme van kippe-eiwit uitvoerig onderzocht werden. NMR studies van lysozyme tonen aan dat de conformatie van het enzym in oplossing nagenoeg dezelfde is als deze in de kristalvorm (Blake et al., 1978; Perkins en Dwek, 1980). Deze NMR studies zijn vooral gericht op de aromatische- en de methylgroepen: in het ^{1}H NMR spectrum zijn alle aromatische signalen en een aantal van de signalen in het alifatisch gebied toegewezen aan de overeenkomstige atomen in het lysozyme molecule (Redfield et al., 1982; Perkins en Dwek, 1980). De meeste signalen in het alifatisch gebied, zoals deze voor de methyleengroepen van leucine, valine en lysine kunnen echter niet afzonderlijk geobserveerd worden.

Om meer structuurinformatie te bekomen betreffende het lysozyme in oplossing kan men de omgeving van de lysines onderzoeken via een merker gebonden aan de aminogroepen. Bradbury en Brown (1973) en Gerken et al. (1982) bestudeerden de gemethyleerde aminogroepen van lysozyme d.m.v. ^{1}H en ^{13}C NMR, respectievelijk.

In deze studie beoogden we na te gaan of de ^{19}F NMR studie van een gefluoreerd lysozyme, met als fluor merker een trifluoroacetylgroep gebonden aan de lysine zijketens, bijkomende informatie kan opleveren over de structuur en eigenschappen van dit enzym.

Het invoeren van merkers in een proteïne kan echter de conformatie en de eigenschappen van het proteïne beïnvloeden. Daarom werd in deze studie eveneens onderzocht in welke mate de structuur en eigenschappen van het trifluoroacetyllysozyme en van het waterstof-analoog acetyllysozyme zich onderscheiden van deze van natief lysozyme.

Hoofdstuk II. MATERIAAL EN METHODEN

§ 1. Derivatisering

Vrije aminogroepen kunnen met S-ethyltrifluorothioacetaat en met azijnzuuranhydride reageren in licht basisch midden, via een nucleofiele substitutie aan een onverzadigd koolstofatoom, tot N-trifluoroacetyl- en N-acetylderivaten.

$$R - NH_2 + CX_3 - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - L \xrightarrow{OH^-\ verd.} R - NH - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - CX_3 + H^+ + L^- \quad (X = F \text{ of } H)$$

1.1. Reactie met S-ethyltrifluorothioacetaat

Lysozyme werd opgelost (0,4 of 1%) in 0,3 M fosfaatbuffer pH 8,0. De pH van de oplossing werd tijdens de reactie op pH 7, pH 8 of pH 10 gehouden door manuele toevoeging van 1 M NaOH. Na toevoeging van S-ethyltrifluorothioacetaat (56,5, 113 of 226 mol reagens per mol lysozyme) werd de reactie gevolgd gedurende 2 uur bij kamertemperatuur. Na deze tijd bleef de pH van de oplossing ongeveer constant (methode van Fanger en Harbury (1965) lichtjes gewijzigd). Het reactiemengsel werd aangezuurd met HCl tot pH 3 en gedialyseerd, met regelmatige verversing, tegenover H_2O pH 3 en tenslotte tegenover de startbuffer van de ionenwisselaarchromatografie. De dialysemembranen (Spectra Por 3) hebben een doorlaatbaarheid voor verbindingen tot molecuulgewicht 3500.

Lysine (0,91 g, 5 mmol) werd opgelost in 5 ml 1 M NaOH. Na toevoegen van S-ethyltrifluorothioacetaat (1 ml, 7,8 mmol) werd het heterogene mengsel gedurende 6 uur geroerd op kamertemperatuur. Het neerslag werd afgefiltreerd en geherkristalliseerd uit een mengsel water/ethanol (2/3) (Schallenberg en Calvin, 1955). Bij dunnelaagchromatografie op Silica Gel G in een mengsel butanol/azijnzuur/water (12/3/5) geeft het gevormde product één ninhydrinegevoelige vlek met een R_f-waarde van 0,626; lysine heeft in dit systeem een R_f-waarde van 0,088.

Het ^{19}F NMR spectrum van het gevormde ε-N-trifluoroacetyllysine (ε-TFA-Lys) (zie Hoofstuk V, § 2.2a) komt overeen met de gegevens van Huestis en Raftery (1971).

Lysine werd eveneens behandeld met een 5-voudige overmaat S-ethyltrifluorothioacetaat en reactie gedurende 48 h; de overige reactie-omstandigheden waren dezelfde als hierboven. Na aanzuren werd het reactiemengsel geëxtraheerd met diëthylether. Het geëxtraheerde lysine derivaat is niet ninhydrine-gevoelig.
Het ^{19}F NMR spectrum van het gevormde α,ε-N,N-ditrifluoroacetyllysine (α,ε-$(TFA)_2$-Lys) (zie Hoofdstuk V, §2.2a) komt overeen met de gegevens van Huestis en Raftery (1971).

1.2. Reactie met azijnzuuranhydride

Aan een oplossing van lysozyme (0,4%, 1% of 2%) in half-verzadigd natriumacetaat werd, onder afkoelen in een ijsbad en met roeren, een overmaat azijnzuuranhydride (6 tot 460 mol reagens per mol lysozyme) in twee of drie gelijke delen over een periode van 1 uur toegevoegd (Riordan en Vallee, 1967). Het reactiemengsel werd gedialyseerd, zoals beschreven voor de trifluoroacetyleringsreactie.

Enkele van de, op ionenwisselaar gezuiverde, acetylderivaten werden verder behandeld met S-ethyltrifluorothioacetaat (226 mol reagens per mol proteïne). De procedure was dezelfde als beschreven hierboven voor natief lysozyme.

§ 2. Enzymatische afbraak

2.1. Carboxypeptidase A

Carboxypeptidase A (CPA, EC 3.4.12.2) is een exopeptidase, afkomstig van de pancreas, dat peptidebindingen hydrolyseert vanaf het carboxyluiteinde van een polypeptideketen.

$$R - CONH - CHR' - COOH - H_2O \xrightarrow{CPA} R - COOH + H_2N - CHR' - COOH$$

C-eindstandige aminozuren met een aromatische of lange alifatische zijketen worden het snelst gehydrolyseerd, glycine en zure aminozuren worden traag afgesplitst en met arginine en proline als C-uiteinde stopt de hydrolyse.

CPA-bereidingen bezitten meestal ook endopeptidase aktiviteit door aanwezigheid van trypsine of chymotrypsine. Deze storende aktiviteit kan verwijderd worden door de endopeptidasen te inhiberen, bijvoorbeeld met diisopropylfosfofluoridaat of met fenylmethylsulfonylfluoride (PMS), hetgeen de CPA aktiviteit niet beïnvloedt.

Procedure

Aan een 2% lysozyme oplossing in 0,1 M Tris-HCl buffer pH 8,0, 0,1 M NaCl bij 25°C werd PMS-behandeld CPA (1/100 van het lysozymegewicht) toegevoegd (Morgan en Riehm, 1968). De reactie gebeurde bij 25°C onder roeren. Het afsplitsen van het C-eindstandige leucine werd gevolgd d.m.v. dunnelaagchromatografie op Silica Gel G in butanol/azijnzuur/water (12/3/5) en detectie met ninhydrine als kleurreagens. Na 52 uur reactie werd het mengsel aangezuurd, gedialyseerd tegenover water en 1% azijnzuur, en op een Sephadex G-100 kolom (16 × 265 mm) in 1% azijnzuur gebracht om het CPA te scheiden van het lysozyme. De lysozyme fracties werden verzameld en gelyofiliseerd.

2.2. Aminopeptidasen

Leucine aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11.1) en aminopeptidase M (APM, EC 3.4.11.2) van de varkensnier zijn enzymen met hydrolytische aktiviteit voor het amino-eindstandige aminozuur van peptiden en polypeptiden.

$$H_2N - CHR - CONH - R' + H_2O \longrightarrow H_2N - CHR - COOH + H_2N - R'$$

LAP en APM hebben een aantal eigenschappen gemeenschappelijk maar verschillen in hun kationen-behoeften (Tabel II-1) (Light, 1972) en in hun specificiteit. De enzymen vertonen een brede specificiteit en alle L-aminozuren met vrije α-aminogroep worden gehydrolyseerd. Aminozuren met een hydrofobe zijketen worden het snelst afgesplitst, en leucine en alanine zijn de beste substraten voor LAP en APM, respectievelijk.

Procedure

a. Leucine aminopeptidase

Aan een 1% lysozyme oplossing in 0,1 M Tris-HCl pH 8,6, 2,5 mM $MgCl_2$ bij 37°C werd een LAP suspensie toegevoegd (LAP/lysozyme = 0,055 in gewicht) (Light, 1972).

b. Aminopeptidase M

Aan een 2% lysozyme oplossing, met triëthylamine op pH 7,6 gebracht, werd een APM suspensie toegevoegd (APM/lysozyme = 0,01 in gewicht) (Jollès en Jollès, 1966).

De reacties gebeurden, onder roeren bij 37°C, gedurende 48 h. Voor beide reacties werd het afsplitsen van het N-eindstandige lysine nagegaan d.m.v. dunnelaagchromatografie (zoals beschreven voor CPA).

eigenschap	LAP (EC 3.4.11.1)	APM (EC 3.4.11.2)
	cytosol fractie	microsomale fractie
pH-stabiliteit	8,0 - 8,5	3,5 - 11,0
aktivator	Mn^{2+}, Mg^{2+}	-
pH-optimum	9,2	7,0
inhibitoren	EDTA, Hg^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{+}, Pb^{2+}	-

Tabel II-1 : Eigenschappen van aminopeptidasen (Light, 1972).

§ 3. Kolomchromatografie

3.1. Ionenwisselaarchromatografie

Bij ionen uitwisseling worden opgeloste moleculen gescheiden op basis van hun netto lading. Een ionenwisselaar is een onoplosbare matrix waaraan geladen groepen covalent gebonden zijn. De geladen groepen zijn geassocieerd met tegenionen welke kunnen uitgewisseld worden met andere ionen van dezelfde lading, zonder dat dit de matrix beïnvloedt. Negatief geladen uitwisselaars hebben positief geladen tegenionen en worden kationenwisselaars genoemd.

CM-Sepharose CL-6B (Pharmacia) bevat carboxymethylgroepen via stabiele etherbindingen gebonden aan Sepharose CL-6B (6% agarose met covalente 'cross-links'). CM-Sepharose CL-6B kan hoge debieten verdragen en het gelvolume is weinig gevoelig aan veranderingen in ionensterkte en pH.

Het verloop van een chromatografie op ionenwisselaar kan in enkele stappen onderscheiden worden :

1. de ionenwisselaar is in evenwicht met de startbuffer; de pH en ionensterkte van deze startbuffer moeten zodanig gekozen worden dat de te scheiden verbindingen aan de kolom adsorberen;
2. het staal, in een oplossing met dezelfde ionische samenstelling als de startbuffer, wordt aangebracht op de kolom;
3. de elutie, en scheiding, van verbindingen op een kationenwisselaar gebeurt door een verhoging van de pH of de ionensterkte (of eventueel beide) van de buffer d.m.v. een gradiënt;
4. de regeneratie waardoor de gel terug onder startvoorwaarden gebracht wordt.

Procedure

a. Equilibratie van de gel

CM-Sepharose CL-6B wordt geleverd als een volledig gezwollen gel in 0,5 M NaCl. Na bezinken van de gel en verwijderen van de bovenstaande vloeistof werd de gel geresuspendeerd in drie maal zijn volume aan startbuffer. Deze bewerking (bezinken, afgieten en resuspenderen) werd herhaaldelijk uitgevoerd en uiteindelijk werd de gel geresuspendeerd in een volume startbuffer gelijk aan het volume van de gel.

b. Stapelen van de kolom

Voor het gieten van de kolom werd de gel op 4°C (koude kamer) gebracht; bij deze temperatuur werden alle chromatografiën op ionenwisselaar uitgevoerd.
De gel werd in de kolom (LKB 2137, 16 mm diameter en 35 cm lang) gegoten en gestapeld onder een constant debiet van 35 ml/h (LKB 2132 Micro Perpex pomp).

c. Aanbrengen van het staal, elutie en collectie van het eluaat

Het staal, gedialyseerd tegenover startbuffer, werd gecentrifugeerd vooraleer het op kolom te brengen. De elutie gebeurde met een lineaire NaCl gradiënt in de startbuffer. De lineaire gradiënt werd geproduceerd d.m.v. twee communicerende vaten met gelijke diameter; het mengvat bevatte de buffer met lage ionensterkte, het reservoir bevatte de buffer met hoge ionensterkte.

De elutie gebeurde aan een debiet van maximaal 33 ml/h (dit om verder stapelen van de gel gedurende de elutie te vermijden). Het eluaat werd door een spectrofotometer (LKB 2138 Uvicord S, met een filter voor absorptiemeting bij 280 nm), verbonden met een recorder (LKB 2210), gestuurd en gecollecteerd (LKB 2112 RediRac Fraction collector) op tijdsbasis.
De gewenste fracties werden verzameld op basis van het chromatogram.

d. Regeneratie van de gel

De gel werd, in de kolom, geregenereerd door wassen met 0,1 M NaOH en vervolgens met meerdere volumes startbuffer.

De details van iedere chromatografie (gelvolume, samenstelling van het staal, gradiënt ...) worden aangegeven bij de bespreking ervan.

3.2. Gelfiltratie

De scheiding van moleculen door gelfiltratie is gebaseerd op een verschil in verdeling van de moleculen tussen de stationaire fase, de vloeistof in de poriën van de gel, en de mobiele fase. Kleine moleculen die in de poriën kunnen dringen bewegen trager door de kolom omdat ze een groter gedeelte van de tijd in de stationaire fase doorbrengen. Dit heeft tot gevolg dat moleculen volgens afnemende grootte geëlueerd worden.

Het elutiegedrag van een bepaalde verbinding kan weergegeven worden in zijn K_{av}-waarde :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

waarin V_e : elutievolume (ml) van de verbinding, gemeten vanaf het aanbrengen van het staal tot het maximum van de piek,

V_o : 'void' volume (ml), d.i. het elutievolume van verbindingen die geen toegang hebben tot de stationaire fase,

V_t : totaal volume (ml) van de gel in de gestapelde kolom.

K_{av} is de fractie van het stationair gelvolume dat toegankelijk is voor een bepaalde verbinding.

Sephadex is een dextran gel in korrelvorm. Het fractioneerbereik van ieder type gel is afhankelijk van de graad van cross-linking. Sephadex G-100 bestaat uit korrels met 40-120 µm diameter in droge toestand en heeft een scheidend vermogen voor verbindingen met molecuulgewicht tussen 4.10^3 en $1,5.10^5$.

Procedure

a. Equilibratie van de gel

Sephadex wordt geleverd als een droog poeder en moet voor gebruik in volledig gezwollen toestand gebracht worden door de korrels geruime tijd in een overmaat solvent te laten staan. Dit proces kan versneld worden door het gebruik van een warmwaterbad (90°C). Sephadex G-100 geeft 15-20 ml gelvolume per gram droog poeder.

Drie gram Sephadex G-100 werd gezwollen in 400 ml buffer. Daarna werd de gel geëquilibreerd met het eluens (0,05 M Tris-HCl pH 8,0, 8 M ureum of 1% azijnzuur) door herhaaldelijk laten bezinken van de gel, afgieten van de bovenstaande vloeistof en resuspenderen in eluens. Uiteindelijk werd de gel geresuspendeerd in een volume eluens gelijk aan het volume van de gel.

b. Stapelen van de kolom, elutie en collectie van het eluaat

Deze bewerkingen gebeurden op analoge manier als beschreven voor de chromatografiën op ionenwisselaar.

De gelfiltraties gebeurden bij 4°C, behalve deze in ureum welke op kamertemperatuur werden uitgevoerd. Het staal werd geëlueerd met de oplossing waarin de gel geëquilibreerd werd.

§ 4. Optische technieken

4.1. Absorptiespectra

Absorptiespectra en optische dichtheden werden geregistreerd m.b.v. een Beckman UV 5260 dubbelstraalspectrofotometer.

De concentratie van lysozyme oplossingen werd bepaald d.m.v. ε_{280} = 39000 M^{-1} cm^{-1} (Hamaguchi en Kurono, 1963). Deze extinctiecoëfficiënt werd eveneens gebruikt voor de lysozyme derivaten (Yamasaki et al., 1968a).

4.2. Absorptieverschilspectra

In het gebied tussen 250 en 300 nm wordt de lichtabsorptie van proteïnen voornamelijk veroorzaakt door de zijketens van de aromatische aminozuren tryptofaan, tyrosine en, in mindere mate, fenylalanine. Een wijziging in de proteïne conformatie, welke een invloed heeft op de omgeving van deze chromofore groepen, leidt tot veranderingen in het absorptiespectrum. Daar deze spectrale veranderingen meestal klein zijn, kunnen zij duidelijker aangetoond worden door het opnemen van absorptieverschilspectra.

In een absorptieverschilspectrum wordt het absorptieverschil gemeten tussen twee proteïne oplossingen van gelijke concentratie, waarbij het proteïne in de ene cuvet zich in referentie-omstandigheden bevindt en het proteïne in de tweede cuvet een perturbatie ondergaat. Deze perturbatie kan bijvoorbeeld een pH-, solvent- of temperatuurverandering zijn.

De verschilspectra van tryptofaan en van proteïnen waarin de absorptie voornamelijk door tryptofaan bepaald wordt (zoals o.a. lysozyme) vertonen maxima rond 280 nm en 290 nm en een minimum rond 287 nm (Foss, 1961). Het extinctieverschil $\Delta\varepsilon_{287-290}$ (= $\Delta\varepsilon_{287}$ - $\Delta\varepsilon_{290}$) is een maat voor de verandering in de tryptofaanomgeving (Imoto en Rupley, 1973).

Uit temperatuurverschilspectra kan d.m.v. een grafiek van $\Delta\varepsilon_{287-290}$ in functie van de temperatuur de transitietemperatuur T_m van het proteïne bepaald worden.

Procedure

De verschilspectra werden opgenomen m.b.v. 'matched' cuvetten. In beide cuvetten werd dezelfde proteïne oplossing, in buffer μ 0,1, gebracht. De referentiecel werd gethermostatiseerd op 25°C, de temperatuur van de meetcel werd geleidelijk verhoogd vanaf 25°C. De meetcuvet werd bij iedere temperatuur 15 min gethermostatiseerd in de meetcel, waarna het verschilspectrum werd opgenomen. Tussen de metingen werd de meetcuvet op kamertemperatuur gehouden.

De pH van de oplossingen werd gekontroleerd door glycine-HCl buffer voor pH 2-3, $HCOOH/HCOO^-$ buffer voor pH 3,2-3,6 en door azijnzuur-natriumacetaat buffer voor pH 3,8-5,7.

De pH van deze, en alle hierna vermelde, buffers werd gemeten bij 25°C met een Radiometer pH-meter en gecombineerde elektrode.

4.3. Circulair dichroïsme

Circulair dichroïsme (CD) meet, in functie van de golflengte, het verschil in absorptie door een molecule van links- en rechtshandig circulair gepolariseerd licht.

Circulair gepolariseerd licht bestaat uit twee componenten met vlak gepolariseerd licht, met de polarisatievlakken loodrecht op elkaar, waarbij één van beide componenten selectief een-vierde golflengte eenheid vertraagd is. Indien, gekeken langs de propagatierichting van het licht (+z-as), de resulterende elektrische vector een beweging in tegenwijzerzin rond de z-as beschrijft spreekt men van linkshandig circulair gepolariseerd licht (Wagner et al., 1975).

Wanneer de linkshandige en rechtshandige componenten van het invallende circulair gepolariseerd licht verschillend geabsorbeerd worden door een bepaald product, zullen de uittredende componenten een verschillende amplitude hebben. De resulterende vector beschrijft dan een ellips bij voortbeweging van de lichtstraal langs de z-as. Dit elliptisch gepolariseerd licht heeft een ellipticiteit θ gedefinieerd als :

$$\theta = \text{bg tan } \frac{E_r - E_l}{E_r + E_l}$$

met E_r en E_l de absorptie voor rechtshandig en linkshandig circulair gepolariseerd licht resp..

De gemeten ellipticiteit wordt meestal uitgedrukt als 'mean residue' ellipticiteit $[\theta]_\lambda^{MRW}$:

$$[\theta]_\lambda^{MRW} = \frac{\theta \cdot MRW}{100.l.c}$$

met λ : golflengte (nm)
θ : gemeten ellipticiteit
MRW : gemiddeld aminozuurgewicht
l : lengte van de cel (dm)
c : concentratie (g ml^{-1})

De eenheden van $[\theta]$ zijn graden cm^2 $decimol^{-1}$ ($^\circ cm^2$ $dmol^{-1}$) (Adler et al., 1973).

CD is een gevoelige spectrale techniek en kan gebruikt worden bij de studie van reacties die een verandering in optische aktiviteit van proteïnen of polypeptides kunnen veroorzaken. De voornaamste proteïne chromoforen zijn de amidebindingen welke CD banden geven bij golflengten lager dan 250 nm. De aromatische en disulfide groepen geven CD banden in het 240-300 nm gebied, maar ook in het peptidegebied (Adler et al., 1973).

Procedure

De metingen werden uitgevoerd op een Cary 61 CD spectropolarimeter. De proteïnen werden opgelost in fosfaatbuffer pH 5,70 μ 0,05; de concentratie werd, na centrifugatie, bepaald door middel van de absorptie bij 280 nm.

In het gebied tussen 300 nm en 250 nm werd een cel met een weglengte van 0,05 dm gebruikt; in het gebied van 250 nm tot 200 nm een cel met een lengte van 0,01 dm. De spectra werden opgenomen bij 24°C, met een scansnelheid van 0,2 nm s^{-1}.

§ 5. Polyacrylamidegelelektroforese (PAGE)

Polyacrylamidegel is een medium met een hoge chemische en mechanische stabiliteit, is transparant en heeft een hoge analytische zuiverheid. Elektroëndosmose- en adsorptie-effecten zijn meestal geëlimineerd. Bij elektroforese in polyacrylamidegel, gebufferd bij een bepaalde pH, bewegen de geladen moleculen naar de tegengesteld geladen elektrode en gebeurt er een scheiding van de moleculen op basis van hun netto lading.

Procedure

a. Bereiding van de gel (Fehrnström en Moberg, 1977)

De gel werd bereid op basis van volgende oplossingen :

- buffer : 30,04 g glycine en 1 g Na-azide werden opgelost in H_2O, Tris werd toegevoegd tot pH 8,90 en de oplossing werd aangelengd tot 1 l. De elektrodebuffer werd bereid door deze stock-buffer vier maal te verdunnen.
- 22% acryloplossing : 21,48 g acrylamide en 0,52 g N,N'-methyleen-bis-acrylamide opgelost in H_2O en aangelengd tot 100 ml.
- 1,5% (g/v) APS (ammoniumperoxodisulfaat) in H_2O.
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethyldiaminoethaan).

De gel werd samengesteld zoals aangegeven in onderstaand schema :

oplossing	volume (ml)
stock-buffer	16,5
water	17,0
acryl oplossing	29,7
APS	2,5
TEMED	0,06

De gel werd gegoten tussen twee platen, gescheiden door een 'spacer', hetgeen resulteerde in een 2 mm dikke gel, met 20 'slots' voor het aanbrengen van 5 µl staal.

b. Elektroforese

Na het vullen van de bufferreservoirs met elektrodebuffer en het monteren van de gel in het elektroforesetoestel (LKB 2117 Multiphor) werd het staal aangebracht. De elektroforese liep gedurende 15 min bij 20 mA en gedurende 6h bij 25 mA (LKB 2002 Power Supply) onder voortdurend koelen van de gel d.m.v. leidingwater.

c. Kleuren en ontkleuren (Axelsen et al., 1973)

Na elektroforese werd de gel onmiddellijk ondergedompeld in de kleuroplossing : 5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 1000 ml zure ethanol (450 ml 96% ethanol, 100 ml ijsazijn en 450 ml water). De overtollige kleurstof werd verwijderd door ontkleuren in de zure ethanol-oplossing. De gel werd bewaard in 7,5% azijnzuur tot de fotografische opname.

§ 6. Aktiviteitsbepaling

Lysozyme aktiviteit wordt meestal bepaald met *Micrococcus lysodeikticus* als substraat. De bacterie-celwand bestaat uit polymeerketens van alternerende NAG en NAM eenheden; deze ketens zijn onderling verbonden door polypeptide bruggen. Lysozyme breekt de β-(1,4)-glycosidische binding tussen NAM en NAG waardoor de cellen ontbinden en de bacteriesuspensie opklaart. Dit proces kan spectrofotometrisch gevolgd worden.

Procedure

De aktiviteit van lysozyme en van zijn acetyl- en trifluoroacetylderivaten t.o.v. *M. lysodeikticus* (gedroogde cellen) werd gemeten in functie van pH voor ionensterkte 0,01, 0,05 en 0,1. De pH werd gekontroleerd door azijnzuur-natriumacetaat buffer voor pH 4-5, fosfaatbuffer voor pH 6-8 en glycine-NaOH buffer voor pH 9-10.

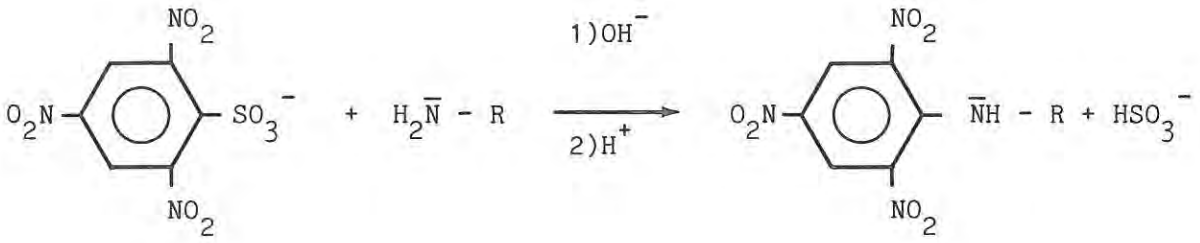
M. lysodeikticus cellen werden gesuspendeerd in buffer en na homogeniseren werd de suspensie verdund met buffer tot een absorptie van 0,600 ± 0,008 bij 450 nm t.o.v. buffer (Shugar, 1952). Een enzymoplossing van 1 mg/ml in H_2O werd bereid en, na spectrofotometrische kontrole van de concentratie, verdund tot 30 µg/ml.
De metingen werden uitgevoerd met een Beckman UV 5260 dubbelstraalspectrofotometer. De bacteriesuspensie en de meet- en referentiecuvet werden gethermostatiseerd op 25°C; de enzymoplossing werd bewaard bij 4°C en voor de meting op 25°C gebracht.

De enzymatische aktiviteit voor een enzymconcentratie van 1 µg/ml werd gemeten door aan 2,9 ml bacteriesuspensie, in de meetcuvet, 100 µl enzymoplossing (30 µg/ml) toe te voegen en de absorptiedaling bij 450 nm te volgen in functie van de tijd, tegenover buffer als blanco.

De initiële snelheid van de enzymatische reactie, ΔA_{450}/min, werd berekend uit het eerste lineaire gedeelte van het absorptieverloop in functie van de tijd.

§ 7. Aminogroepdosage d.m.v. de TNBS-methode

Vrije aminogroepen reageren in basisch midden met 2,4,6-trinitrobenzeensulfonzuur (TNBS) tot een trinitrofenyl (TNP) derivaat. Het vrijgestelde sulfiet associeert met de TNP-aminogroepen hetgeen het absorptiespectrum beïnvloedt; deze complexen dissociëren door aanzuren.



De TNP-aminogroepen in zuur midden hebben een maximale absorptie bij 340 nm en deze absorptie is lineair in functie van de concentratie (Habeeb, 1966).

Procedure

Het aantal vrije aminogroepen in de lysozyme derivaten werd bepaald uit de helling van de rechte die de absorptie bij 340 nm in functie van de proteïne concentratie weergeeft, vergeleken met deze voor natief lysozyme. De proteïne concentratie werd spectrofotometrisch gekontroleerd.

Aan 200 µl proteïne oplossing in water werden achtereenvolgens toegevoegd :

200 µl 0,05 M boraatbuffer pH 9,20,

200 µl 0,1% TNBS in H_2O.

De reactie gebeurde gedurende 2h bij 40°C in een schudwaterbad. Daarna werden toegevoegd :

200 µl 10% natrium dodecylsulfaat in H_2O,

100 µl 1 M HCl,

3 ml water.

De blanco oplossing bevatte alle componenten met uitzondering van de proteïne oplossing : deze werd vervangen door water.

De absorptie bij 340 nm werd gemeten in cuvetten met een lichtweg van 1 cm in een Vitatron MPS enkelstraalfilterfotometer met doorstroomcuvet en digitale printer.

§ 8. Edman degradatie

Door middel van de Edman degradatie kunnen opeenvolgende N-eindstandige aminozuren in een polypeptideketen bepaald worden. De reactie van fenylisothiocyanaat (PITC) met de vrije α-aminogroep resulteert uiteindelijk in de vorming van een cyclisch derivaat (fenylthiohydantoïne) (Fig. II-1). De vrije ε-aminogroepen van het proteïne reageren tot fenylthiocarbamyl (PTC) derivaten.

De identificatie van het thiohydantoïne kan o.a. gebeuren door middel van vloeistof- en gaschromatografie en massaspectrometrie.

In een massaspectrometer worden moleculen in de gasfase geïoniseerd tot positieve ionen, die eventueel nog kunnen fragmenteren. Deze ionen worden gescheiden op basis van hun massa/lading verhouding, waardoor de relatieve intensiteit van ionen met verschillende massa's kan bepaald worden.

De ionisatie van de moleculen kan gebeuren door middel van de chemische ionisatie (CI) techniek. Hierbij gebeurt de ionisatie onrechtstreeks, met een reagensgas ionenplasma dat in de bron geproduceerd wordt door beschieting met een hoog energetische elektronenbundel. Bij de 'direct insertion probe' (DIP) methode wordt het te onderzoeken product, in vaste toestand, rechtstreeks in de bron gebracht.

Procedure

a. Edman degradatie

De methode beschreven door Richards en Lovins (1972) werd gevolgd, behalve dat PITC werd gebruikt als reagens in plaats van methylisothiocyanaat. De reagentia werden gedestilleerd en bewaard onder stikstof; alle bewerkingen werden uitgevoerd onder stikstof.

Een hoeveelheid proteïne of aminozuur (0,5-5 µmol) werd gesuspendeerd in 50% dioxaan-H_2O met 10% pyridine. Een 10-voudige overmaat PITC ten opzichte van het aantal aminogroepen werd toegevoegd en het reactiemengsel werd gedurende 2h, in het donker en bij 60°C geroerd. Na afkoelen werd de overmaat reagens afgedampt onder verminderde druk. Het droge product werd behandeld met 1 ml trifluoroazijnzuur gedurende 1h in het donker bij 60°C. Het trifluoroazijnzuur werd afgedampt onder verminderde druk en het mengsel werd geëxtraheerd met tetrahydrofuraan (3 × 1,5 ml). Na concentreren werd een gedeelte van het extract overgebracht in een DIP en gedroogd.

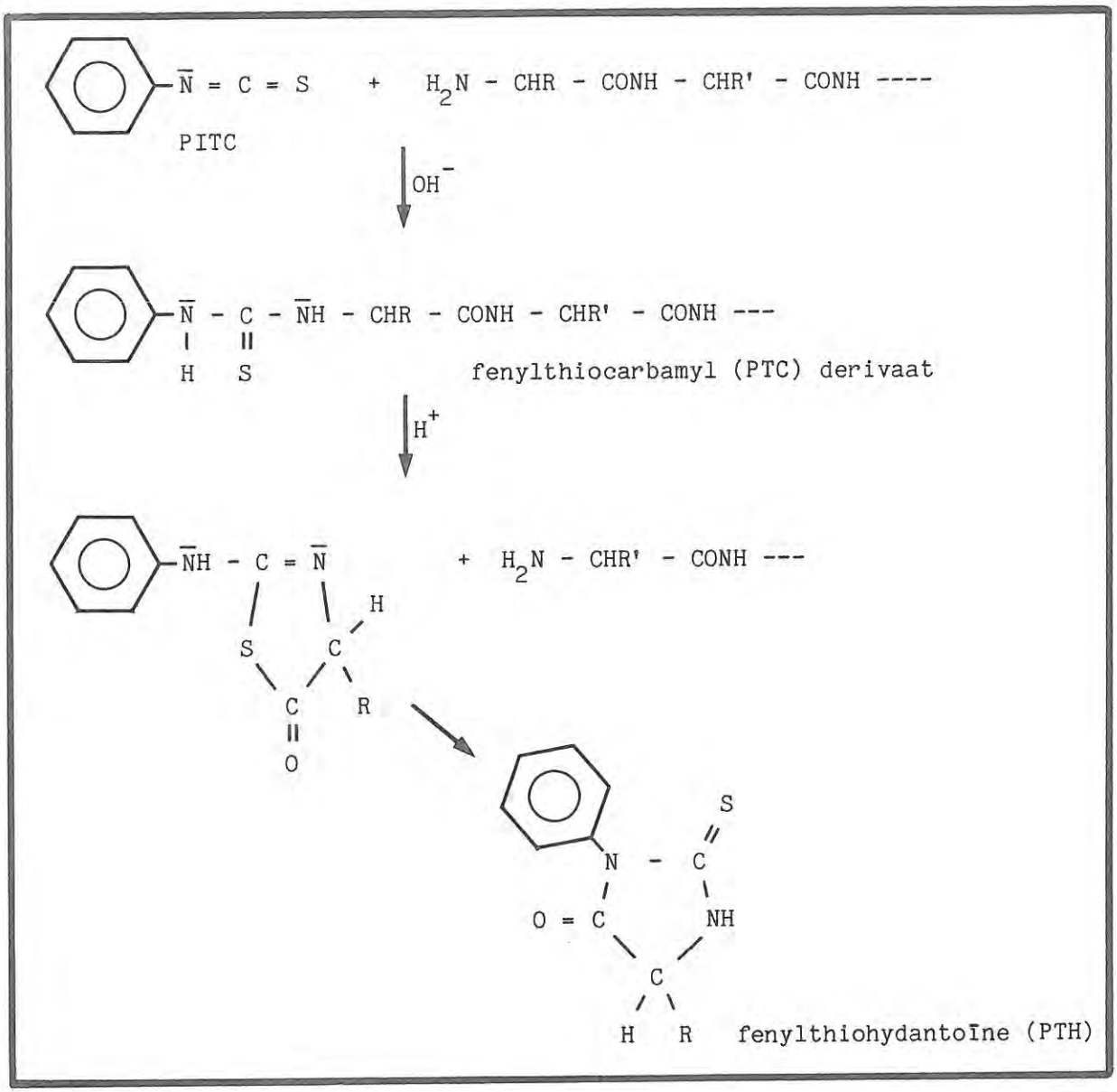


Fig. II-1 : Edman degradatie : reactie van fenylisothiocyanaat (PITC) met de α-aminogroep van een proteïne. Door analyse van het gevormde fenylthiohydantoïne kan het N-eindstandige aminozuur van het proteïne geïdentificeerd worden.

b. Massaspectrometrie

Massaspectra volgens de CI methode werden opgenomen met een Finnigan 1020 massaspectrometer, met isobutaan als reagensgas. Het staal werd aangebracht d.m.v. de DIP methode, de brontemperatuur werd gevarieerd van 30 tot 250°C en de massa's tussen 130 en 500 a.m.u. werden geregistreerd.

§ 9. Nucleaire magnetische resonantie spectroscopie

9.1. Het 'nucleaire magnetische resonantie' fenomeen

Kernen met een spinquantumgetal I dat verschillend is van nul bezitten een kern magnetisch moment μ verschillend van nul. De μ-vectoren interageren met een uitwendig magneetveld H_0 en kunnen welbepaalde energiewaarden aannemen bepaald door het quantumgetal m; m kan 2I + 1 waarden hebben :

$$m = I, I-1, \ldots, -I.$$

Voor kernen met I = 1/2 zijn er twee energietoestanden mogelijk, één parallel (m = + 1/2) en één anti-parallel (m = - 1/2) met het hoofdmagneetveld H_0. De verdeling van de μ-vectoren over deze energieniveau's volgt een Boltzmann relatie met een kleine overmaat voor het niveau met m = + 1/2, zodat er een netto magnetisatie M_0 in de richting van H_0 (d.i. de z-as) is. De μ-vectoren beschrijven een gyroscopische beweging rond de z-as waarbij ze zich uniform verdelen over een kegeloppervlak (Fig. II-2). De hoeksnelheid of Larmor-frequentie ω_L (rad s^{-1}) van deze precessiebeweging wordt gegeven door :

$$\omega_L = \gamma_N . H_0 \qquad \text{(II-1)}$$

waarbij γ_N de karakteristieke gyromagnetische verhouding van de kern is. Voor de beschrijving van NMR-processen wordt meestal een coördinatenstelsel (x',y',z) dat draait om de z-as met de frequentie ω_L, gebruikt.

De evenwichtstoestand van de μ-vectoren kan verstoord worden door gedurende korte tijd een magneetveld H_1 langs de x'-as aan te leggen. Als gevolg van deze H_1-puls, gerealiseerd door een FM zender, beschrijft de M_0-vector een cirkelvormige beweging in het y'z-vlak. De tijdsduur van de H_1-puls bepaalt de afgelegde hoek; een 90°-puls brengt de magnetisatie langs de y'-as (Fig. II-3).

De detectie van het NMR signaal gebeurt onmiddellijk na het afsluiten van de H_1-puls. De detectie gebeurt in het x'y'-vlak waarbij de intensiteitsverandering van de M-component langs de y'-as ($M_{y'}$) wordt geregistreerd. Dit levert het 'Free Induction Decay' (FID) op. Het FID wordt door een Fourier transformatie (FT) omgezet naar signalen in functie van de frequentie (Fig. II-4).

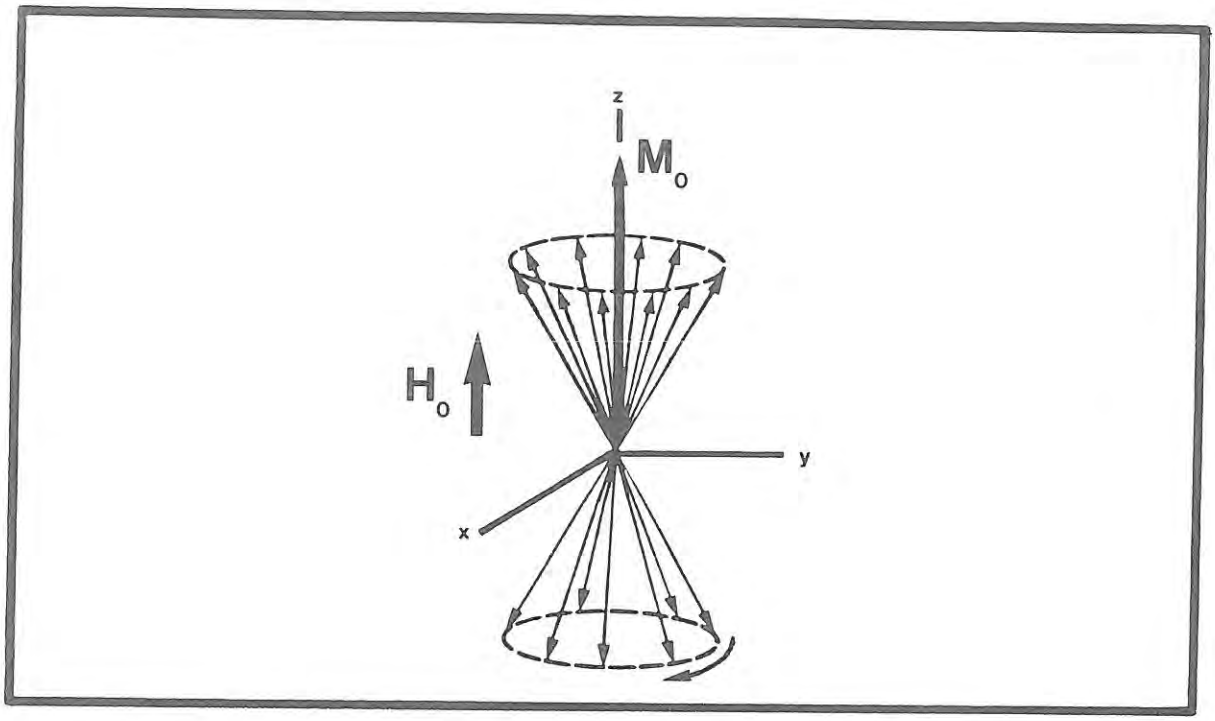


Fig. II-2 : Oriëntatie en precessie van nucleaire magnetische momenten voor kernen met spin I = 1/2 bij thermisch evenwicht in een uitwendig magneetveld H_0, en de resulterende netto magnetisatie M_0.

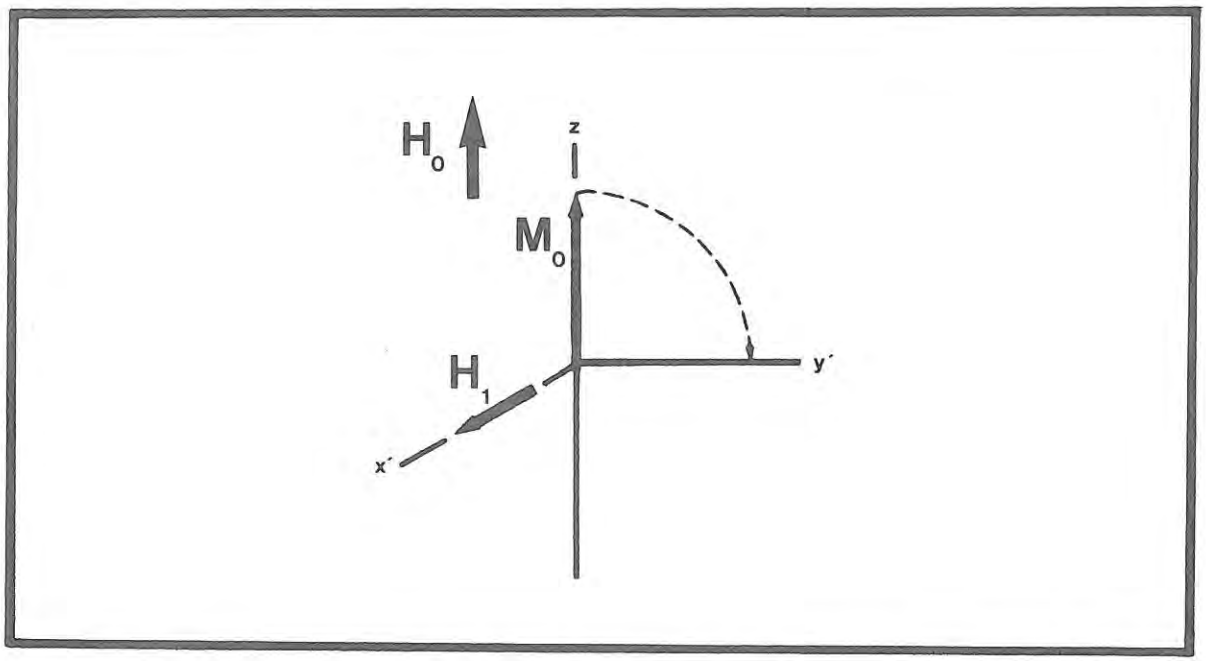


Fig. II-3 : Precessie van de M_0-vector rond H_1 door een 90°-puls, in het draaiend assenstelsel (x',y',z).

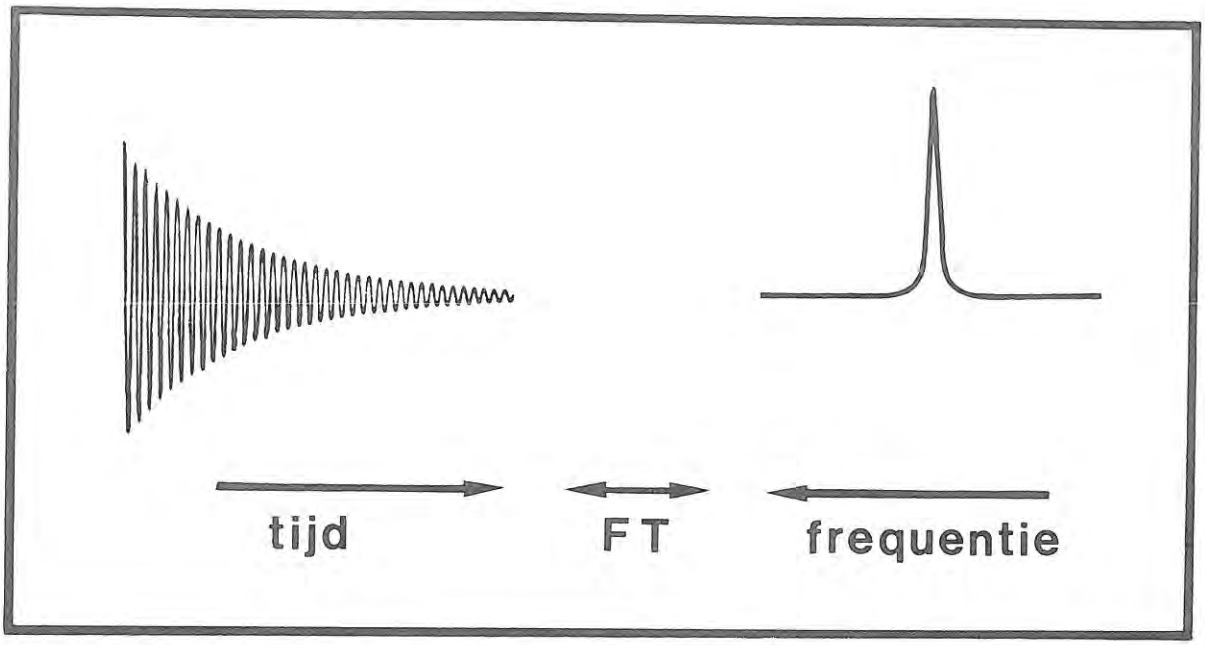


Fig. II-4 : Het FID-signaal, in functie van de tijd, wordt door een Fourier transformatie omgezet in een spectrum in functie van de frequentie.

kern	frequentiegebied (ppm)	natuurlijk voorkomen (%)	relatieve gevoeligheid voor een gelijk aantal kernen
^{1}H	15	99,98	1
^{13}C	350	1,1	0,016
^{15}N	1000	0,36	0,001
^{19}F	500	100	0,834
^{31}P	700	100	0,066

Tabel II-2 : Eigenschappen van enkele magnetische kernen met spin I = 1/2.

9.2. Karakteristieken van het NMR-signaal

a. Chemische verschuiving

De chemische verschuiving δ geeft de positie van het signaal t.o.v. een referentiesignaal; deze positie wordt meestal uitgedrukt in ppm :

$$\delta \text{ (ppm)} = 10^6 . \frac{\nu_{ref} - \nu_I}{\nu_0} , \qquad \text{(II-2)}$$

met ν_{ref} : resonantiefrequentie (Hz) voor de referentie,
ν_I : resonantiefrequentie (Hz) voor de beschouwde kern,
ν_0 : frequentie (Hz) van de NMR spectrometer.

Het frequentiegebied (in ppm) waarin signalen kunnen voorkomen is afhankelijk van de beschouwde atoomsoort. In Tabel II-2 staan deze frequentiegebieden, het natuurlijk voorkomen en de gevoeligheid voor NMR meting van enkele kernen aangegeven.

De spreiding van de NMR signalen voor een bepaald atoom weerspiegelt de gevoeligheid van de kern voor elektronische effecten, welke het aangelegde magneetveld moduleren. Het effectieve magneetveld (H_{eff}) gevoeld door de kern wordt gegeven door :

$$H_{eff} = H_0 . (1 - \sigma) \qquad \text{(II-3)}$$

waarin σ de afschermingsconstante is. σ is een dimensieloos getal en wordt bepaald door de elektronendichtheid rond de beschouwde kern en de mate waarin deze beïnvloed wordt door naburige groepen. Een verandering in de elektronendichtheid rond de kern, of een verandering in afscherming, kan o.a. veroorzaakt worden door :

- ringstroom effecten, vanwege aromatische groepen, of anisotropie effecten, vanwege dubbele of drievoudige bindingen; deze effecten zijn onafhankelijk van de aard van de beschouwde kern maar wel afhankelijk van de aard van de anisotrope groep en van de afstand en de positie van de kern t.o.v. deze groep;
- elektrostatische effecten te wijten aan polaire groepen welke een elektrisch veld veroorzaken waardoor de elektronendichtheid rond naburige kernen beïnvloed wordt;
- paramagnetische effecten, bijvoorbeeld in aanwezigheid van paramagnetische overgangsmetalen. Deze metaalionen beïnvloeden zowel de chemische verschuiving als het relaxatiegedrag (zie § 9.2.c.) van een atoom door interactie van het ongepaarde elektron met de kernspin.

De verandering in chemische verschuiving kan gebeuren via contact of scalaire interactie (Δc), dit is langs de chemische bindingen, of via pseudo-contact of dipolaire interactie (Δp), hetgeen een ruimtelijk effect is.
Bij binding van paramagnetische lanthanide-ionen (Ln^{3+}) aan een macromolecule kan de verandering in chemische verschuiving van een atoom (Δ) geschreven worden als de som van de bijdragen van de contact en pseudo-contact verschuiving en van de diamagnetische verschuiving, Δd, veroorzaakt door conformationele of elektrostatische effecten :

$$\Delta = \Delta c + \Delta p + \Delta d. \qquad \text{(II-4)}$$

De bijdrage van Δd kan bepaald worden d.m.v. de verschuiving veroorzaakt door de diamagnetische lanthanide-ionen La^{3+} en Lu^{3+}. De contact verschuiving is alleen belangrijk voor atomen in de onmiddellijke omgeving van de Ln^{3+}-bindingsplaats.
De pseudo-contact verschuiving Δp voor een bepaald atoom wordt gegeven door (Perkins et al., 1981) :

$$\Delta p = D' \left(\frac{3\cos^2\theta - 1}{r^3} \right) - D'' \left(\frac{\sin^2\theta . \cos 2\phi}{r^3} \right) \qquad \text{(II-5)}$$

waarin D', D'' : 'ligand field' parameters,
r, θ, ϕ : sferische coördinaten van het atoom t.o.v. het lanthanide-ion.

In het geval van axiale symmetrie valt de tweede term in vergelijking II-5 weg en de verhouding van de pseudo-contact verschuiving voor twee atomen i en j in het molecule wordt dan gegeven door :

$$R_{ij} = \frac{\Delta p_i}{\Delta p_j} = \frac{(3\cos^2\theta_i - 1).r_j^3}{(3\cos^2\theta_j - 1).r_i^3} \qquad \text{(II-6)}$$

Een analyse van de pseudo-contact verschuiving van verschillende atomen in een molecule o.i.v. gebonden paramagnetische ionen kan informatie verschaffen over de structuur van het molecule.

Het effectieve veld aan de kern varieert dus afhankelijk van de chemische omgeving, zodat het resonantiesignaal van chemisch niet-equivalente kernen bij verschillende frequenties zal voorkomen.

b. Spin-spin koppeling

NMR signalen kunnen een multiplet struktuur vertonen; deze ontstaat door interactie tussen naburige kernen met een magnetisch moment en wordt spin-spin of scalaire interactie genoemd. De grootte van deze interactie, uitgedrukt door de koppelingsconstante J (Hz), is afhankelijk van de aard van de chemische bindingen tussen de kernen en van hun relatieve geometrie.

Het koppelingspatroon van een bepaalde kern kan geëlimineerd worden door het resonantiesignaal van de gekoppelde kern te bestralen. Dit kan een selectieve bestraling zijn, bijvoorbeeld van één soort H-atomen in het ^1H spectrum, om na te gaan welk ^1H signaal met de bestraalde atomen gekoppeld is. Door een niet-selectieve bestraling van een volledig spectrum, bijvoorbeeld van alle protonen, kan men de signalen in het ^{13}C spectrum tot singletten herleiden.

Deze bestraling wordt gerealiseerd d.m.v. een hulpzender H_2, de zogenaamde 'decoupler'.

c. Relaxatie

Na de H_1-puls, waardoor de magnetisatie M_0 een oriëntatieverandering ondergaat, zullen de μ-vectoren trachten hun oorspronkelijke evenwichtstoestand te herstellen. Dit proces noemt men relaxatie. Deze relaxatie gebeurt door magnetische interacties van de aangeslagen kern met zijn omgeving.

Voor kernen met I = 1/2, in vloeistoffen, gebeurt de relaxatie voornamelijk via het dipool-dipool mechanisme. Men onderscheidt twee relaxatietijden :

- spin-rooster of longitudinale relaxatietijd T_1 : bepaalt het proces waarbij de magnetisatie langs de z-as tracht zijn oorspronkelijke waarde M_0 te bereiken (Fig. II-5). Dit gebeurt door interactie van de μ-vectoren met de wisselende dipolen in hun omgeving, waardoor de energie in het rooster verspreid wordt.
- spin-spin of transversale relaxatietijd T_2 : bepaalt het proces waarbij de $M_{y'}$-component tracht nul te worden. Hierbij gebeurt er een overdracht van magnetisatie van de aangeslagen kern naar naburige kernen. Vermits de μ-richtingen van de nieuw aangeslagen kernen statistisch verdeeld zijn rond de z-as, worden de transversale componenten van de μ-vectoren terug gelijkmatig verdeeld in het x'y'-vlak (Fig. II-6).

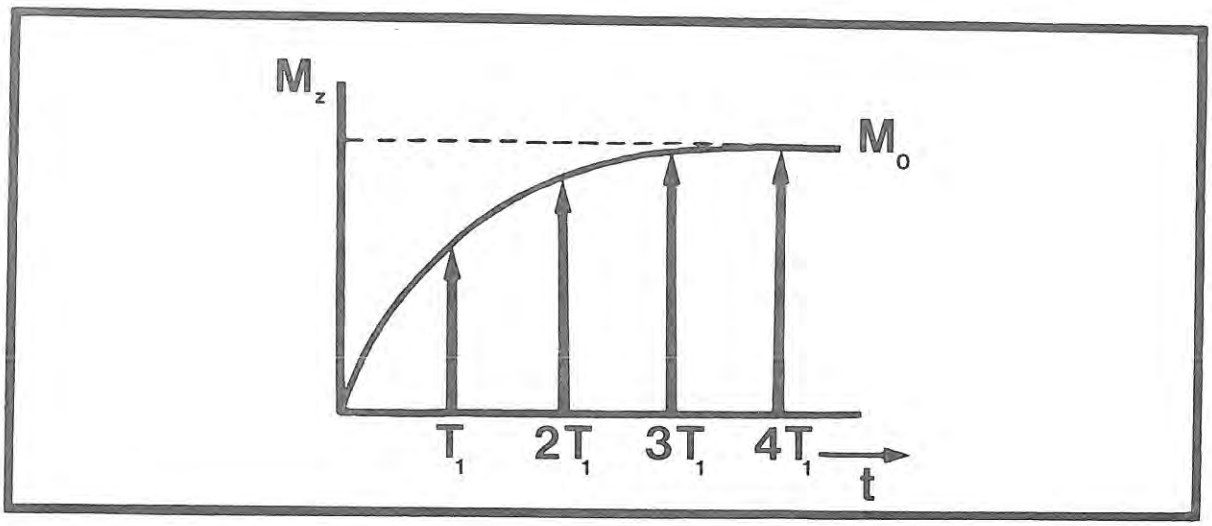


Fig. II-5 : Het herstel van de magnetisatie langs de z-as na een 90°-puls wordt bepaald door de spin-rooster relaxatietijd T_1.

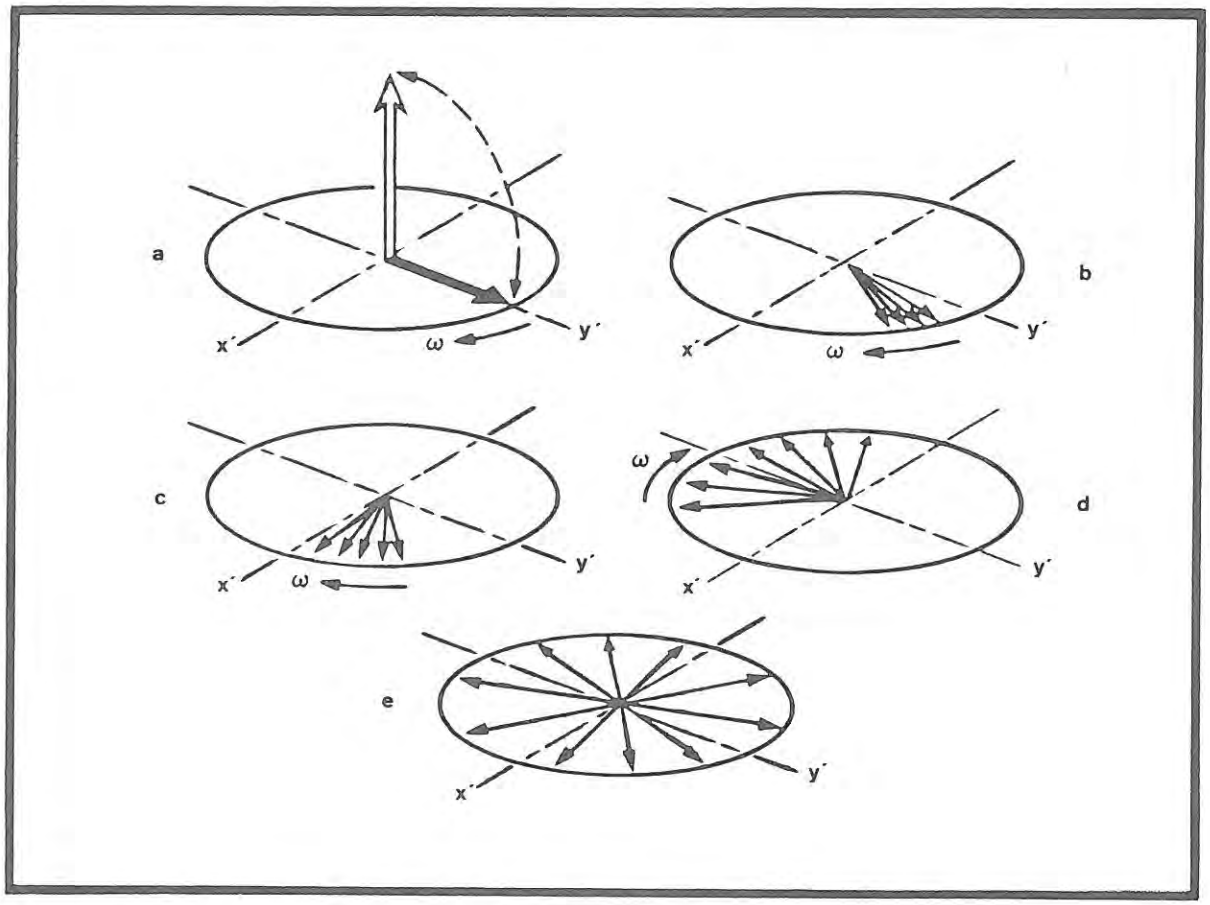


Fig. II-6 : 90°-puls (a) en toenemende defasering van de transversale magnetisatie (b-e) ten gevolge van de spin-spin relaxatie, bepaald door de spin-spin relaxatietijd T_2.

T_2 bepaalt de natuurlijke bandbreedte van de signalen : de bandbreedte op halve hoogte , $B_{1/2}$, wordt gegeven door :

$$B_{1/2} = \frac{1}{\pi\, T_2} \cdot \qquad \text{(II-7)}$$

In werkelijkheid zijn de signalen echter breder. De bijkomende term $(1/\pi\, T_2')$ is een gevolg van de inhomogeniteit van het magneetveld en de werkelijke bandbreedte is :

$$B_{1/2} = \frac{1}{\pi}\left(\frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'}\right) \cdot \qquad \text{(II-8)}$$

De relaxatietijden zijn eveneens afhankelijk van de mate waarin de dipool-dipool interactie door de moleculaire bewegingen, gekarakteriseerd door een correlatietijd τ_c, gevarieerd wordt.
De dipolaire relaxatie van twee gelijke kernen, bijvoorbeeld twee protonen, op een afstand r en met een isotrope rotatiebeweging met correlatietijd τ_c wordt gegeven door :

$$\frac{1}{T_{1,dd}} = \frac{3}{10}\,\frac{\gamma_H^4\,\hbar^2}{r^6}\,\left[J(\omega_0) + 4J(2\omega_0)\right] \qquad \text{(II-9a)}$$

$$\frac{1}{T_{2,dd}} = \frac{3}{20}\,\frac{\gamma_H^4\,\hbar^2}{r^6}\,\left[3J(o) + 5J(\omega_0) + 2J(2\omega_0)\right] \qquad \text{(II-9b)}$$

Hierin is $\hbar$ de constante van Planck gedeeld door 2π; $J(\omega)$ is de spectrale dichtheid bij de frequentie ω en voor een isotrope beweging is :

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \cdot \qquad \text{(II-10)}$$

Bij dipolaire interactie tussen twee ongelijke spins I en S (bijvoorbeeld I = ^{1}H en S = ^{13}C of ^{19}F) bevatten de uitdrukkingen voor $T_{1,dd}^{-1}$ en $T_{2,dd}^{-1}$ bijkomende $J(\omega)$ termen (Harris, 1983).

Uit vergelijkingen II-9 blijkt dat voor τ_c-waarden waarbij $\omega^2\tau_c^2 << 1$, de zogenaamde 'extreme narrowing range', T_1 en T_2 aan elkaar gelijk zijn en lineair verlopen in functie van τ_c; voor $\omega^2\tau_c^2 >> 1$ is T_2 kleiner dan T_1 (Fig. II-7).

Voor anisotroop bewegende moleculen of voor moleculen met interne beweging worden vergelijkingen II-9 verder uitgebreid door de aanwezigheid van meerdere correlatietijden (Harris, 1983).

Naast dipool-dipool relaxatie kunnen ook andere mechanismen bijdragen tot het herstel van de evenwichtstoestand. Deze mechanismen zijn o.a. : - paramagnetische relaxatie.

Het grote magnetisch moment van een ongepaard elektron levert een intens fluctuerend veld dat meestal de andere wisselende velden domineert. De paramagnetische bijdrage in de relaxatietijden T_1 en T_2, in aanwezigheid van een paramagnetisch ion, wordt gegeven door :

$$\frac{1}{T_{1,p}} = \frac{2}{15} \frac{S(S+1)\,\gamma_I^2\,g^2\,\beta^2}{r^6} \left[\frac{3\tau_c}{1+\omega_I^2\tau_c^2} + \frac{7\tau_c}{1+\omega_S^2\tau_c^2} \right] + \frac{2}{3} \frac{S(S+1)A^2}{\hbar^2} \left[\frac{\tau_e}{1+\omega_S^2\tau_e^2} \right] \qquad \text{(II-11a)}$$

$$\frac{1}{T_{2,p}} = \frac{1}{15} \frac{S(S+1)\,\gamma_I^2\,g^2\,\beta^2}{r^6} \left[4\,\tau_c + \frac{3\tau_c}{1+\omega_I^2\tau_c^2} + \frac{13\tau_c}{1+\omega_S^2\tau_c^2} \right] + \frac{1}{3} \frac{S(S+1)A^2}{\hbar^2} \left[\tau_e + \frac{\tau_e}{1+\omega_S^2\tau_e^2} \right] \qquad \text{(II-11b)}$$

De eerste term in deze vergelijkingen is afkomstig van de dipool-dipool interactie tussen de elektronspin S en de kernspin I; de tweede term bevat de scalaire bijdrage.

In deze uitdrukkingen is verder :

S : elektron spin quantumgetal

g : elektronische g-faktor

β : Bohr magneton

ω_I, ω_S : Larmor frequentie van de kern en elektron spin, resp.

r : afstand tussen de kern en het metaalion

A : hyperfijne koppelingsconstante

τ_c, τ_e : correlatietijden voor de dipolaire en scalaire interacties, resp..

Voor kernen op enige afstand van het metaalion is de tweede term in vergelijkingen II-11 te verwaarlozen en zijn $T_{1,p}^{-1}$ en $T_{2,p}^{-1}$ evenredig met r^{-6} hetgeen toelaat de relatieve afstand van verschillende kernen tot het metaalion te evalueren.

- chemische verschuiving anisotropie (csa).
  Indien de afscherming van een kern varieert met de oriëntatie van een naburige groep, in een magneetveld H_0, zal er door moleculaire beweging een modulatie van het lokale magneetveld ontstaan. Dit veroorzaakt relaxatie. De relaxatiesnelheden voor dit mechanisme, $T_{1,csa}^{-1}$ en $T_{2,csa}^{-1}$, zijn evenredig met H_0^2 zodat dit mechanisme belangrijker wordt bij hogere veldsterkte.

- quadrupool interactie.
  Kernen met I > 1/2 bezitten een elektrisch quadrupool moment als gevolg van de niet-sferische ladingsverdeling. De fluctuaties van de elektrische-veld gradiënt door moleculaire beweging veroorzaken relaxatie.

De totale relaxatiesnelheid wordt gegeven door de som van de verschillende bijdragen :

$$\frac{1}{T_i} = \frac{1}{T_{i,dd}} + \frac{1}{T_{i,p}} + \frac{1}{T_{i,csa}} + \ldots \quad (i = 1 \text{ of } 2) \qquad \text{(II-12)}$$

De relaxatiesnelheid van een bepaalde kern wordt dus voornamelijk bepaald door het proces met de kortste relaxatietijd.

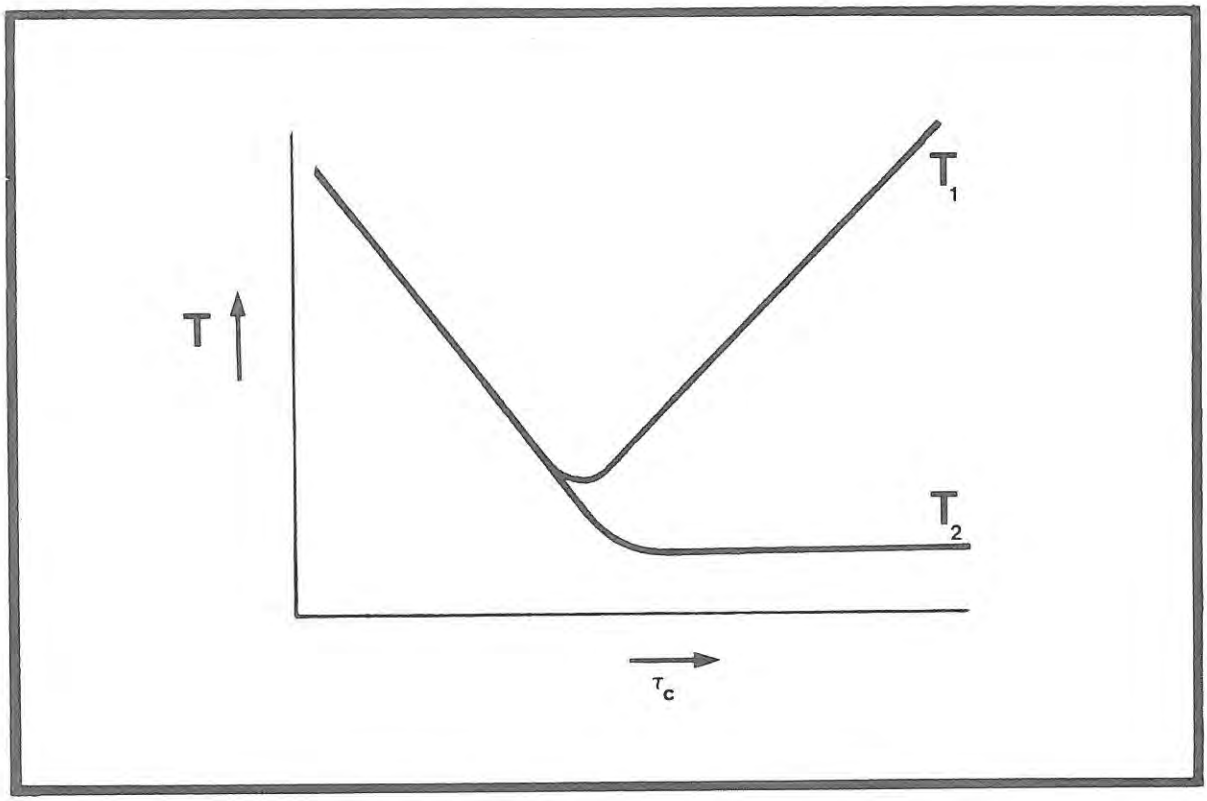


Fig. II-7 : Het verloop van de spin-rooster relaxatietijd T_1 en de spin-spin relaxatietijd T_2 in functie van de correlatietijd voor moleculaire bewegingen τ_c.

d. Nucleair Overhauser effect

Indien het resonantiesignaal van een bepaalde kern bestraald wordt is er op het signaal van de gekoppelde kernen, naast het effect op de multipletstructuur (zie § 9.2.b), eveneens een effect op de gesommeerde intensiteit. Deze intensiteitsverandering noemt men het nucleair Overhauser effect (NOE).

In een I{S}-systeem waarbij kern S (bijvoorbeeld ^{1}H) bestraald wordt en kern I (bijvoorbeeld ^{13}C of ^{19}F) geobserveerd wordt, bedraagt het maximale NOE voor spin I :

$$NOE_I = 1 + \frac{\gamma_S}{2\,\gamma_I} \qquad \text{(II-13)}$$

Dit maximale NOE is van toepassing indien spin I uitsluitend via dipool-dipool interactie met spin S relaxeert en indien het molecule zich in de 'extreme narrowing range' bevindt.

Wanneer ook andere relaxatiemechanismen van belang zijn, wordt het NOE gegeven door :

$$NOE_I = 1 + \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \cdot \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS} + \rho_I^*} \qquad \text{(II-14)}$$

waarbij σ_{IS} : de cross-relaxatie tussen spins I en S,
ρ_{IS} : de directe dipool-dipool relaxatie tussen spins I en S,
ρ_I^* : de directe relaxatie van spin I via andere mechanismen.

Het belang van NOE metingen vloeit voort uit het feit dat zij informatie kunnen verschaffen over de ruimtelijke nabijheid van atomen in een moleculaire structuur.

9.3. Pulssequenties

a. Basispulssequentie

In moderne NMR toestellen worden spectra gerealiseerd door het gebruik van pulssequenties. Hierin zijn drie perioden te onderscheiden :

1. preparatie : gedurende de wachttijd D1(s) kunnen de μ-vectoren door relaxatie hun evenwichtsverdeling aannemen;
2. evolutie : tijdens deze periode worden één of meerdere pulsen van bepaalde duur, gescheiden door welbepaalde wachttijden, uitgevoerd;
3. detectie : het FID wordt opgenomen gedurende de acquisitietijd (AT).

Gedurende ieder van deze perioden kan daarenboven de 'decoupler' aan of af staan, met een instelbaar vermogen.

De basispulssequentie is afgebeeld in Fig. II-8. Naargelang de pulsduur en de lengte van de wachttijden zijn verschillende experimenten mogelijk.

In het meest eenvoudige experiment, zoals de opname van een ^1H spectrum, zet men D1, P1 en D2 gelijk aan nul.

Voor de bepaling van de spin-rooster relaxatietijd T_1 met de 'inversion recovery' methode (Fig. II-9a) moet D1 minimaal ongeveer vijf maal de langste T_1 waarde hebben. De P1-puls is een 180°-puls langs de x'-as ($180°_{x'}$) waardoor de magnetisatie langs de -z-as gebracht wordt. Tijdens de evolutie wordt een variabele tijd D2 gewacht, waarna een $90°_{x'}$-puls de magnetisatie in het x'y'-vlak brengt. Onmiddellijk daarna wordt het FID opgenomen.
Naargelang de lengte van de wachttijd D2 (variërend van 0,1 tot 3 maal T_1) wordt een negatief of positief signaal gedetecteerd (Fig. II-9).
De spin-rooster relaxatietijd T_1 wordt bepaald door een niet-lineaire 'least-squares fit' van de intensiteit van het signaal bij verschillende wachttijden D2 aan de vergelijking

$$M_z = M_0.(1 - e^{-t/T_1}). \qquad \text{(II-15)}$$

Voor de bepaling van het NOE moet D1 minstens tien maal de langste T_1 waarde hebben; P1 en D2 worden niet gebruikt. Het NOE wordt bepaald door het verschil te maken tussen twee spectra waarvan het ene werd opgenomen met ontkoppeling en het andere zonder ontkoppeling. Het intensiteitsverschil tussen beide spectra geeft het NOE.

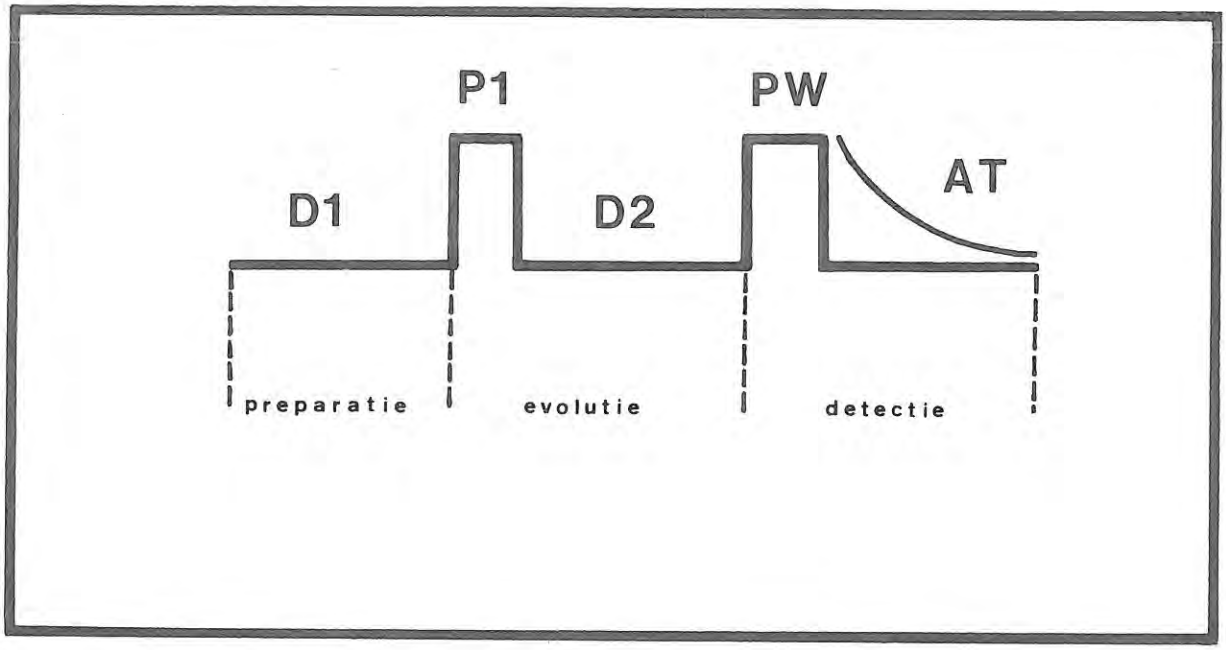


Fig. II-8 : Basispulssequentie voor NMR-metingen,
met D1, D2 : wachttijden,
P1, PW : pulsen; PW (90°-puls) brengt de magnetisatie in het x'y'-vlak,
AT : acquisitietijd, d.i. de tijd waarin het FID wordt opgenomen.

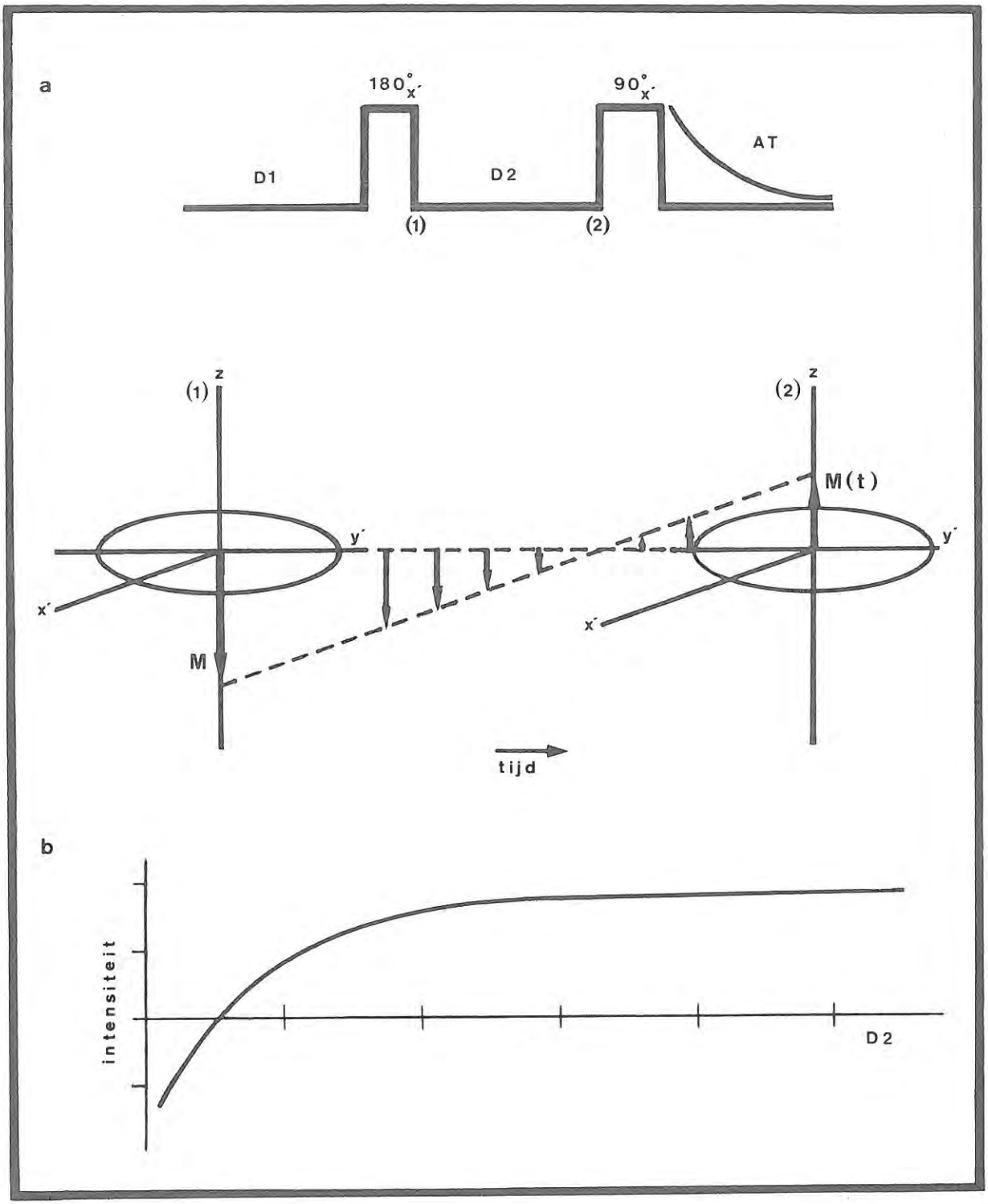


Fig. II-9 : Bepaling van de spin-rooster relaxatietijd T_1.

a. Pulssequentie en verandering van de magnetisatie langs de z-as in functie van de wachttijd D2.

b. Toename van de intensiteit van het waargenomen signaal in functie van D2.

b. CPMG-sequentie

De Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CMPG) sequentie (Fig. II-10a) wordt gebruikt om de spin-spin relaxatietijd T_2 te bepalen.

Een $90°_{x'}$-puls brengt de magnetisatie in het x'y'-vlak. Door na deze puls een variabele wachttijd (BT) in te voeren kan men nagaan hoe snel de transversale magnetisatie verdwijnt.
Gedurende deze wachttijd gebeurt er echter eveneens een defasering van de μ-vectoren ten gevolge van de magneetinhomogeniteit, en de gemeten T_2 bevat in dat geval een inhomogeniteitsbijdrage. Om dit effect tegen te gaan worden er gedurende de wachttijd BT verschillende $180°_{y'}$-pulsen, 'spin-echo's', uitgevoerd.
Een 'spin-echo' (Fig. II-10b) is een 180°-puls in het midden van een wachttijd waardoor divergerende μ-vectoren terug tot convergentie gebracht worden. Deze spin-echo's volgen elkaar zeer snel op, zodanig dat n × 2 × D2= BT.
Op het ogenblik dat de detectie start is er een convergent signaal langs de y'-as. De intensiteit van het waargenomen signaal daalt bij toename van de wachttijd BT (Fig. II-10c).
De spin-spin relaxatietijd T_2 wordt bepaald door een niet-lineaire 'least squares fit' van de intensiteit bij verschillende wachttijden BT aan de vergelijking :

$$M_{y'} = M_0 . e^{-t/T_2} . \qquad \text{(II-16)}$$

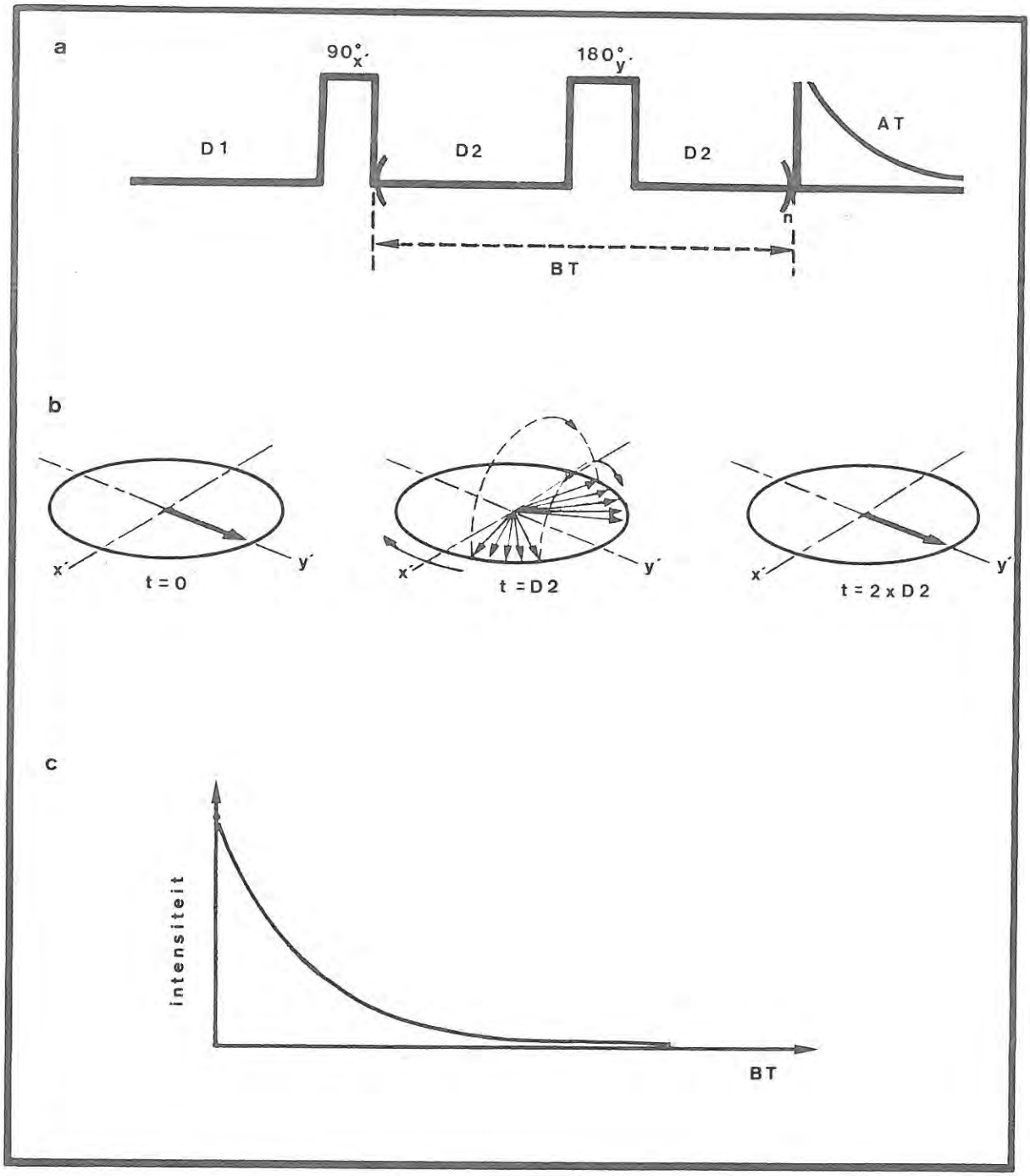


Fig. II-10 : Bepaling van de spin-spin relaxatietijd T_2.

a. Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequentie.

b. Het spin-echo effect : door na een tijd D2 een $180°_{y'}$-puls uit te voeren convergeren de μ-vectoren op het tijdstip 2 × D2.

c. Verandering van de intensiteit van het waargenomen signaal in functie van de wachttijd BT.

9.4. Procedure

De ^{19}F NMR spectra werden opgenomen met een Varian XL-200 NMR spectrometer bij 188,22 MHz. De metingen werden uitgevoerd op ongeveer 500 µl oplossing in NMR buisjes met 5 mm diameter, bij 29,9 ± 0,1°C.

De parameters welke werden gebruikt voor het opnemen van de spectra, voor de T_1 en T_2 bepalingen en voor de $^{19}F\{^1H\}$ NOE metingen staan aangegeven in Tabel II-3. Het aantal transients (NT), d.i. het aantal keer dat de pulssequentie herhaald wordt, is afhankelijk van de proteïne concentratie. De spectrale breedte (SW) bepaalt de grootte van het frequentiegebied (Hz) waarin signalen geobserveerd worden.

Voor de bepaling van T_1 werden twaalf D2-waarden, van 0,01 tot 4 s gebruikt; T_2 werd bepaald m.b.v. twaalf BT-waarden, van 0,024-0,504 s.

Bij de berekening van de spin-rooster relaxatietijd werd op de FID's een 'sensitivity enhancement' (SE = 0,318 s) toegepast. Dit betekent dat het FID wordt vermenigvuldigd met een exponentiële factor, waardoor er een lijnverbreding plaatsvindt.

De overige ^{19}F NMR spectra werden bekomen zonder gebruik te maken van mathematische functies ter verbetering van de resolutie.

De oplossingen van getrifluoroacetyleerd lysozyme voor de ^{19}F NMR metingen werden bereid in buffer :

glycine-HCl buffer voor pH 1,8 tot pH 3,2;

$HCOOH/HCOO^-$ buffer voor pH 2,8 tot pH 4,0;

azijnzuur-natriumacetaat buffer voor pH 3,7 tot pH 5,7.

De ionensterkte van deze buffers was 0,1, tenzij anders vermeld. De proteïne concentratie werd spectrofotometrisch gekontroleerd.

Aan de proteïne oplossingen in buffer werden D_2O (tot maximaal 10%) als locksignaal en 1,1,1-trifluoropropanon (TFP), tot een concentratie ongeveer gelijk aan de proteïne concentratie, als inwendige referentie toegevoegd.

De titraties van het getrifluoroacetyleerd lysozyme met inhibitoren (NAG en $(NAG)_3$), met NaCl en met lanthanide-ionen werden uitgevoerd door het toevoegen van geconcentreerde oplossingen van deze verbindingen, in dezelfde buffer als het lysozyme derivaat, aan de proteïne oplossing (500 µl) in een NMR buisje. De oplossingen van de lanthanide-ionen werden bereid uitgaande van de overeenkomstige nitraten.

parameter	^{19}F spectrum	T_1 bepaling	T_2 bepaling	$^{19}F\{^1H\}$ NOE
SW (Hz)	5000	5000	5000	5000
AT (s)	0,4	0,4	0,4	3,0
PW (µs)	7,0	7,0	7,0	26,0
P1 (µs)	0	14,0	14,0	0
D1 (s)	2,0	8,0	0,86	8,0
D2 (s)	0	0,01 - 4,0	0,002	0,01
BT (s)	-	-	0,024 - 0,504	-
DO (Hz)	-	-	-	*
NT				
0,2 mM		2000		
0,4 mM		500		
0,7 mM		200		
1,2 mM		100		
1,4 mM		100		3000 - 6000

Tabel II-3 : NMR parameters gebruikt voor de opname van de ^{19}F NMR spectra, voor de T_1 en T_2 bepalingen, en voor de $^{19}F\{^1H\}$ NOE metingen.
SW : frequentiegebied waarin de signalen geobserveerd worden.
NT : het aantal keer dat de pulssequentie herhaald wordt; NT is afhankelijk van de concentratie aan getrifluoroacetyleerd lysozyme.
*DO : 'decoupler offset', deze komt overeen met de positie van het bestraalde ^1H signaal in het ^1H NMR spectrum.

De chemische verschuiving δ_F van de F-signalen wordt uitgedrukt in ppm t.o.v. de inwendige referentie. De details i.v.m. pH, concentratie,... voor ieder experiment worden bij de bespreking ervan aangegeven.

De ^1H NMR spectra werden opgenomen bij 200 MHz of 400 MHz. De proteïne oplossingen met een concentratie van 1 mM werden bereid in H_2O pH 3,6 met 10% D_2O. De metingen gebeurden bij 37°C.

De H_2O-piek werd onderdrukt door middel van de 'jump and return' sequentie ($90°_{x'} - \tau - 90°_{-x'}$) (Foxall, 1984) voor de 200 MHz spectra en door middel van de $1\text{-}\bar{3}\text{-}3\text{-}\bar{1}$ sequentie ($\alpha_{x'} - \tau - 3\alpha_{-x'} - \tau - 3\alpha_{x'} - \tau - \alpha_{-x'}$) (Hore, 1983) voor de 400 MHz spectra.

Ter verbetering van de resolutie werd het FID vermenigvuldigd met een exponentiële tijdsconstante ('resolution enhancement' : RE = 0,04 s) en met een gausvormige functie ('apodization function' : AF = 0,12 s).

De positie van de signalen in de ^1H NMR spectra wordt gegeven in ppm t.o.v. de positie van het DSS (4,4-dimethyl-4-silapentaansulfonaat) signaal.

Voor de opname van de $^{19}F\{^1H\}$ NOE spectra werd gebruik gemaakt van de DOCYCL ('Decoupler offset cycling for improved NOE difference experiments or multiple peak saturation') sequentie (Gray, 1984). Gedurende de wachttijd D1 worden verschillende signalen in het ^1H NMR spectrum, bijvoorbeeld de signalen van een multiplet, bestraald met laag vermogen.

De DOCYCL sequentie werd verder uitgebreid op het labo zodanig dat verschilspectra worden gegenereerd op het niveau van het FID. Voor de oneven pulsnummers staat de decoupler aan tijdens de wachttijd D1, en na de 90°-puls volgt de detectie (zonder ^1H ontkoppeling). Voor de even pulsnummers staat de decoupler af. Op deze manier wordt alleen de verschilmagnetisatie geregistreerd en de signalen in het resulterende verschilspectrum zijn deze welke een NOE ondervinden.

De $^{19}F\{^1H\}$ NOE metingen werden uitgevoerd op een proteïne oplossing 1,4 mM in D_2O bij 37°C. Voor de weergave van de verschilspectra werd op het FID een 'sensitivity enhancement' (SE = 0,318 s) toegepast.

§ 10. Berekeningen

10.1. Analyse van meetresultaten

Voor de analyse van diverse meetresultaten werd gebruik gemaakt van een programma 'curve fitting voor een willekeurige niet-lineaire functie' in BASIC (Gelan, persoonlijke mededeling) uitgevoerd op een Tektronix 4051 tafelcomputer. Met behulp van dit programma worden in een willekeurige functie de onbekende parameters en de fout voor een 95% betrouwbaarheidsinterval berekend.

Dit programma werd gebruikt voor de bepaling van de vergelijking van een rechte door meetpunten en voor de bepaling van pK_a waarden.

a. Bepaling van de vergelijking van een rechte

Door middel van bovenstaand programma werden meetresultaten 'gefit' aan de vergelijking van een rechte en werden de helling en het afgesneden stuk op de y-as berekend.

Deze methode werd gebruikt bij de bepaling van het aantal vrije aminogroepen d.m.v. de TNBS-methode (Hoofdstuk IV, § 2) en bij de analyse van de resultaten van de ^{19}F NMR studie van trifluoroacetyllysozyme in aanwezigheid van lanthanide-ionen (Hoofdstuk V, § 7).

b. Bepaling van pK_a waarden

De verschuiving van een ^{19}F NMR signaal onder invloed van pH-veranderingen werd geanalyseerd op basis van de ionisatie van één naburige groep AH met ionisatieconstante K_a.

De chemische verschuiving δ van een fluoratoom in de omgeving van deze ioniserende groep kan geschreven worden als :

$$\delta = \delta_{AH} \cdot \frac{[AH]}{[A]_o} + \delta_A \cdot \frac{[A]}{[A]_o} \qquad \text{(II-17)}$$

of

$$\delta = \frac{\delta_{AH} \cdot [H^+] + \delta_A \cdot K_a}{[H^+] + K_a} \qquad \text{(II-18)}$$

met [AH],[A] : de concentraties van de ioniserende groep in de geprotoneerde en niet-geprotoneerde vorm, resp.,

$[A]_o = [AH] + [A]$,

δ_{AH} : chemische verschuiving van het F-signaal overeenkomend met de geprotoneerde vorm van de naburige ioniserende groep,

δ_A : chemische verschuiving van het F-signaal overeenkomend met de niet-geprotoneerde vorm van de naburige ioniserende groep.

Door analyse van de geobserveerde chemische verschuiving bij verschillende pH waarden volgens vergelijking II-18 kunnen de drie parameters K_a, δ_{AH} en δ_A bepaald worden.

10.2. Berekening van de coördinaten van de fluoratomen in trifluoroacetyllysozyme

Door middel van de coördinaten van de atomen in het lysozyme kristal (Imoto et al., 1972) kunnen de coördinaten van de atomen in de trifluoroacetylgroepen bepaald worden.

a. Berekening van de bindingsafstanden in de lysine zijketens

Op basis van de coördinaten van de atomen in het kristalmodel van lysozyme (Imoto et al., 1972) werd de afstand d tussen twee atomen 1 en 2 berekend volgens :

$$d = [(x_1-x_2)^2 + (y_1-y_2)^2 + (z_1-z_2)^2]^{1/2} \qquad \text{(II-19)}$$

De berekening werd uitgevoerd in BASIC op de Tektronix 4150 tafelcomputer.

b. Berekening van de torsie- en valentiehoeken in de lysine zijketens

De torsie- en valentiehoeken in de lysine zijketens werden berekend op basis van de coördinaten van vier opeenvolgende atomen in de zijketen. De berekening werd uitgevoerd in BASIC op de Tektronix 4150 tafelcomputer.

c. Berekening van de coördinaten van de fluoratomen

De geometrie van de atomen in de trifluoroacetyllysine zijketen werd berekend op basis van de kristalcoördinaten van de eerste drie atomen

in de keten (namelijk het α-, β- en γ-koolstofatoom) en van de inwendige coördinaten (afstand, valentie- en torsiehoek) in de zijketen. De inwendige coördinaten werden bepaald :

- zoals hierboven aangegeven voor de lysine zijketen,
- volgens de coördinaten voor atomen in een amidebinding (Dickerson en Geis, 1969),
- aan de hand van de valentiehoek en de C-F bindingsafstand in CHF_3 (Wagnière, 1973) voor de atomen in de trifluoromethylgroep.

De berekening werd uitgevoerd d.m.v. een programma in PASCAL op een Apple IIe computer (Gelan, persoonlijke mededeling). De resultaten van deze berekening worden besproken in Hoofdstuk V, § 7.2.

§ 11. Producten

Lysozyme van kippe-eiwit werd aangekocht bij Serva. Carboxypeptidase A kwam van Worthington. Boehringer leverde aminopeptidase M. Leucine aminopeptidase, *Micrococcus lysodeikticus* cellen en $(NAG)_3$ werden aangekocht bij Sigma. NAG werd aangeschaft bij Janssen Chimica. De lanthanide-nitraten werden geleverd door Ventron GMBH, Karlsruhe.
Alle oplossingen werden bereid in bigedestilleerd water.

Hoofdstuk III. SYNTHESE EN ZUIVERING VAN DE LYSOZYME DERIVATEN

§ 1. Trifluoroacetylering van lysozyme

Voor het invoeren van covalent gebonden fluoratomen op de aminogroepen van lysozyme werd gekozen voor trifluoroacetylering : trifluoroacetylgroepen zijn relatief klein en gemakkelijk te introduceren. Uit analoge studies op cytochroom c (Staudenmayer et al., 1976) en neurotoxine II van *Naja naja oxiana* (Tsetlin et al., 1979) blijkt dat trifluoroacetylering geen belangrijke conformatieveranderingen veroorzaakt in deze proteïnen.

De trifluoroacetylgroepen werden geïntroduceerd door reactie van lysozyme met S-ethyltrifluorothioacetaat, een reagens specifiek voor de ε-aminogroep van lysines in proteïnen (Huestis en Raftery, 1971).

1.1. Invloed van de pH, de reactietijd en de concentratie van lysozyme en S-ethyltrifluorothioacetaat op het reactieverloop

De trifluoroacetylering van lysozyme werd gestart met een onderzoek naar de invloed van de reactie-omstandigheden op het reactieverloop. De trifluoroacetylering werd uitgevoerd bij pH 7, pH 8 en pH 10 en voor verschillende concentraties aan lysozyme en aan S-ethyltrifluorothioacetaat (Tabel III-1).
De pH van het reactiemengsel werd gekontroleerd door het toevoegen van 1 M NaOH. Na 1,5 à 2 uur reactie bleef de pH nagenoeg constant. Voor de reactie L8-2 (Tabel III-1) werden op regelmatige tijdstippen stalen genomen.
De reactie werd gestopt door aanzuren; het reactiemengsel werd gedialyseerd t.o.v. water pH 3 en t.o.v. de startbuffer voor de ionenwisselaarchromatografie.

De samenstelling van de reactiemengsels, na ongeveer twee uur reactie (6 h reactie voor L7 en verschillende reactietijden voor L8-2), werd vergeleken door middel van polyacrylamidegelelektroforese bij pH 8,90 (Fig. III-1). Hieruit blijkt dat, bij ieder experiment, de trifluoroacetylering een mengsel van lysozyme derivaten met verschillende substitutiegraad oplevert. Deze derivaten bewegen naar de negatieve elektrode, maar met een lagere mobiliteit

dan natief lysozyme (L) omwille van het verlies van de lading op de ε-amino-groepen. Het lysozyme derivaat met de kleinste mobiliteit heeft dus het grootst aantal trifluoroacetylgroepen gebonden.

De samenstelling van het reactiemengsel (Fig. III-1) wordt, bij eenzelfde pH, bepaald door de overmaat van S-ethyltrifluorothioacetaat t.o.v. lysozyme en is nagenoeg niet afhankelijk van de lysozyme concentratie.

Naarmate de reactietijd vordert (reactie L8-2, Fig. III-1) worden derivaten met een hogere substitutiegraad gevormd. Na ongeveer 1h30 reactie gebeurt er geen verandering meer in de samenstelling van het reactiemengsel. Dit komt overeen met het stoppen van het base-verbruik tijdens de reactie.

De reactie is duidelijk pH-afhankelijk : bij verhoging van de pH neemt, voor dezelfde concentratie aan lysozyme en aan S-ethyltrifluorothioacetaat, de substitutiegraad van de lysozyme derivaten toe.

Producten met de hoogste substitutiegraad werden verkregen door trifluoroacetylering bij pH 10, met een 226-voudige overmaat van S-ethyltrifluorothioacetaat tegenover lysozyme.

Hierbij dient wel opgemerkt dat er tijdens de reactie bij pH 10 een hoeveelheid neerslag ontstaat (ongeveer 10% van de totale hoeveelheid proteïne). Deze neerslagvorming gebeurt eveneens bij pH 8, maar in mindere mate. Dit neerslag lost niet op door aanzuren.

Een verklaring hiervoor kan gezocht worden in het feit dat tijdens de reactie ethaanthiolaat ionen vrijkomen. Dit ethaanthiolaat ion kan in basisch midden aanleiding geven tot een doorbraak en herorganisatie van de disulfidebruggen van lysozyme. Om deze nevenreactie tegen te gaan werd de trifluoroacetylering door enkele auteurs (Levy en Paselk, 1973; Tsetlin et al., 1979) uitgevoerd in N,N-dimethylformamide. Dit solvent veroorzaakt echter structuurveranderingen in lysozyme, namelijk een ontplooiing van het hydrofobe gebied (Hamaguchi, 1964), en verlaagt de transitietemperatuur (Hamaguchi en Sakai, 1965).

Wanneer de trifluoroacetylering onder deze denaturerende omstandigheden wordt uitgevoerd, is het mogelijk dat de conformatie van het gevormde trifluoroacetylderivaat een grotere afwijking vertoont van de conformatie van natief lysozyme, dan wanneer de reactie gebeurt in waterige oplossing.

De trifluoroacetylering werd daarom uitgevoerd in waterig midden. Voor de verdere studie werd uitsluitend de oplosbare fractie van het reactiemengsel gebruikt. De samenstelling van het neerslag wordt nader onderzocht in Hoofdstuk IV, § 3.1.

pH	reactie	concentratie		CF_3COSEt/L [1]	reactietijd
		CF_3COSEt (M)	L (%)		
7	L7	$3,12 .10^{-2}$	0,4	113	6 h
8	L8-1	$1,56 .10^{-2}$	0,4	56,5	2 h
	L8-2	$3,12 .10^{-2}$	0,4	113	2 h 20 [2]
	L8-3	$7,79 .10^{-2}$	1	113	1 h 50
	L8-4	$1,56 .10^{-1}$	1	226	1 h 50
10	L10-1	$1,56 .10^{-2}$	0,4	56,5	2 h
	L10-2	$3,12 .10^{-2}$	0,4	113	2 h
	L10-3	$6,23 .10^{-2}$	0,4	226	2 h
	L10-4	$7,79 .10^{-2}$	1	113	2 h
	L10-5	$1,56 .10^{-1}$	1	226	2 h

Tabel III-1 : Experimentele gegevens voor de trifluoroacetyleringsreacties : pH, concentratie van S-ethyltrifluorothioacetaat en van lysozyme en reactietijd.

[1] molaire overmaat van S-ethyltrifluorothioacetaat t.o.v. lysozyme.

[2] gedurende de reactie werden op regelmatige tijdstippen stalen genomen, nl. na 10, 20, 30, 50 min, 1h10, 1h30 en 1h50.

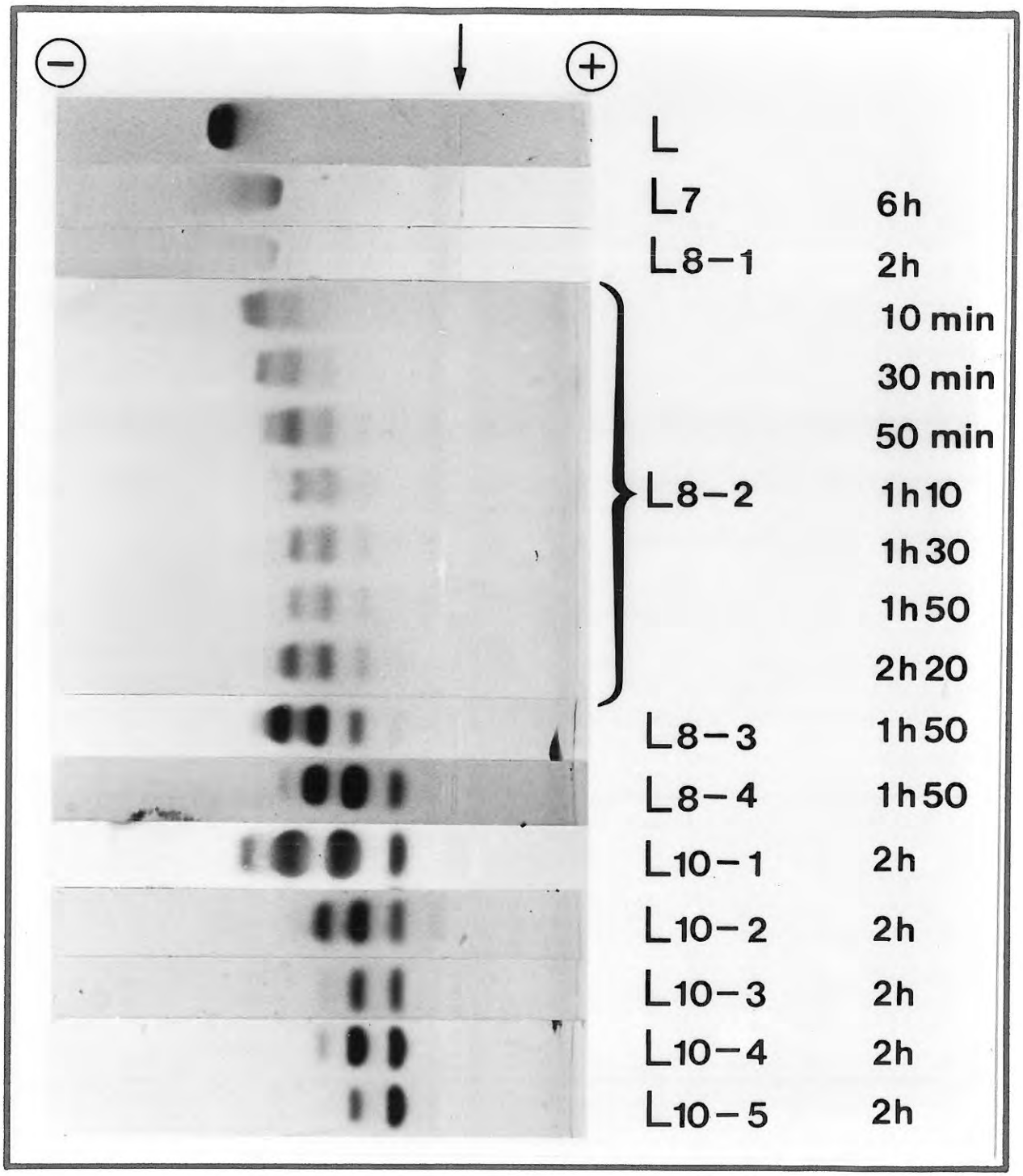


Fig. III-1 : PAGE van natief lysozyme (L) en van de reactiemengsels bereid door trifluoroacetylering van lysozyme bij verschillende pH en concentraties aan lysozyme en aan S-ethyltrifluorothioacetaat (Tabel III-1), voor de aangegeven reactietijd.

benaming kolom		P1	P2	P3	T1	T2	T3
gel	hoogte (cm)[1]	23					
	volume (ml)	46,2					
staal	proteïne (mg)	36,5	35,0	30,6	32,5	32,0	32,5
elutie	debiet (ml/h)	32,4					
	fractie (ml)	3,78					
	buffer	0,05 M fosfaat pH 6,0		0,05 M fosfaat pH 8,0	0,05 M Tris-HCl pH 8,0		0,05 M Tris-HCl pH 9,0
	gradiënt (M NaCl)	0 - 1	0 - 0,5		0 - 0,5	0 - 0,25	
	volume (ml)[2]	200					

Tabel III-2 : Scheiding van het reactiemengsel L10-1 (Fig. III-1) op CM-Sepharose CL-6B door middel van verschillende gradiëntsystemen : zie Fig. III-2.

[1] kolom : LKB 2137,16 mm diameter

[2] volume, d.i. het totale gradiëntvolume nl. 100 ml startbuffer (zonder NaCl) en 100 ml eindbuffer.

Fig. III-2 : Scheiding van het reactiemengsel L10-1 (Fig. III-1) op CM-Sepharose CL-6B door middel van verschillende gradiëntsystemen.
De experimentele gegevens betreffende deze figuur werden samengevat in Tabel III-2.

1.2. Chromatografische scheiding van de trifluoroacetylderivaten

a. Optimale scheidingsvoorwaarden

De scheiding van de trifluoroacetylderivaten werd uitgevoerd op de kationenwisselaar CM-Sepharose CL-6B. Vermits door de trifluoroacetylering de aminogroepen niet meer protoneerbaar zijn, zal de totale positieve lading van de lysozyme derivaten lager zijn dan deze van natief lysozyme. De derivaten zullen, bij constante pH, elueren bij een lagere ionensterkte dan lysozyme. In een mengsel van trifluoroacetylderivaten zal het derivaat met de hoogste substitutiegraad elueren bij de laagste ionensterkte.

De scheiding van de lysozyme derivaten werd uitgetest op het reactiemengsel L10-1 (Tabel III-1, Fig. III-1). Voor de elutie werd een lineaire NaCl gradiënt gebruikt, in fosfaatbuffer pH 6,0 en pH 8,0 en in Tris-HCl buffer pH 8,0 en pH 9,0. Tabel III-2 bevat de experimentele gegevens voor de scheidingen in Fig. III-2.

Een vergelijking van de chromatogrammen (Fig. III-2) leert dat :

- een minder steile NaCl gradiënt een betere scheiding geeft;
- de chromatografie in 0,05 M fosfaatbuffer pH 8,0 (P3) een betere scheiding geeft dan deze in 0,05 M fosfaatbuffer pH 6,0 (P2); 0,05 M fosfaatbuffer pH 8,0 heeft echter een relatief hoge ionensterkte (μ 0,14) waardoor de lysozyme derivaten minder goed aan de kolom binden in deze startbuffer en erg snel geëlueerd worden;
- in 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 de elutie later gebeurt (deze buffer heeft een lagere ionensterkte) en dat het gebruik van een 0-0,25 M NaCl gradiënt een goede scheiding geeft (T2);
- de scheiding in 0,05 M Tris-HCl pH 9,0 (T3) minder goed is : pieken welke in 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 (T2) duidelijk gescheiden zijn vallen in dit chromatogram samen.

Hieruit blijkt dat 0,05 M Tris-HCl buffer pH 8,0 geschikt is voor de scheiding van de lysozyme derivaten. De steilheid van de NaCl gradiënt wordt voor de verschillende scheidingen aangepast aan de substitutiegraad van de lysozyme derivaten : een gradiënt van 0-0,5 M NaCl voor elutie van derivaten met een gering aantal trifluoroacetylgroepen en een gradiënt van 0-0,15 M of 0-0,25 M NaCl voor de hoogst gesubstitueerde derivaten.

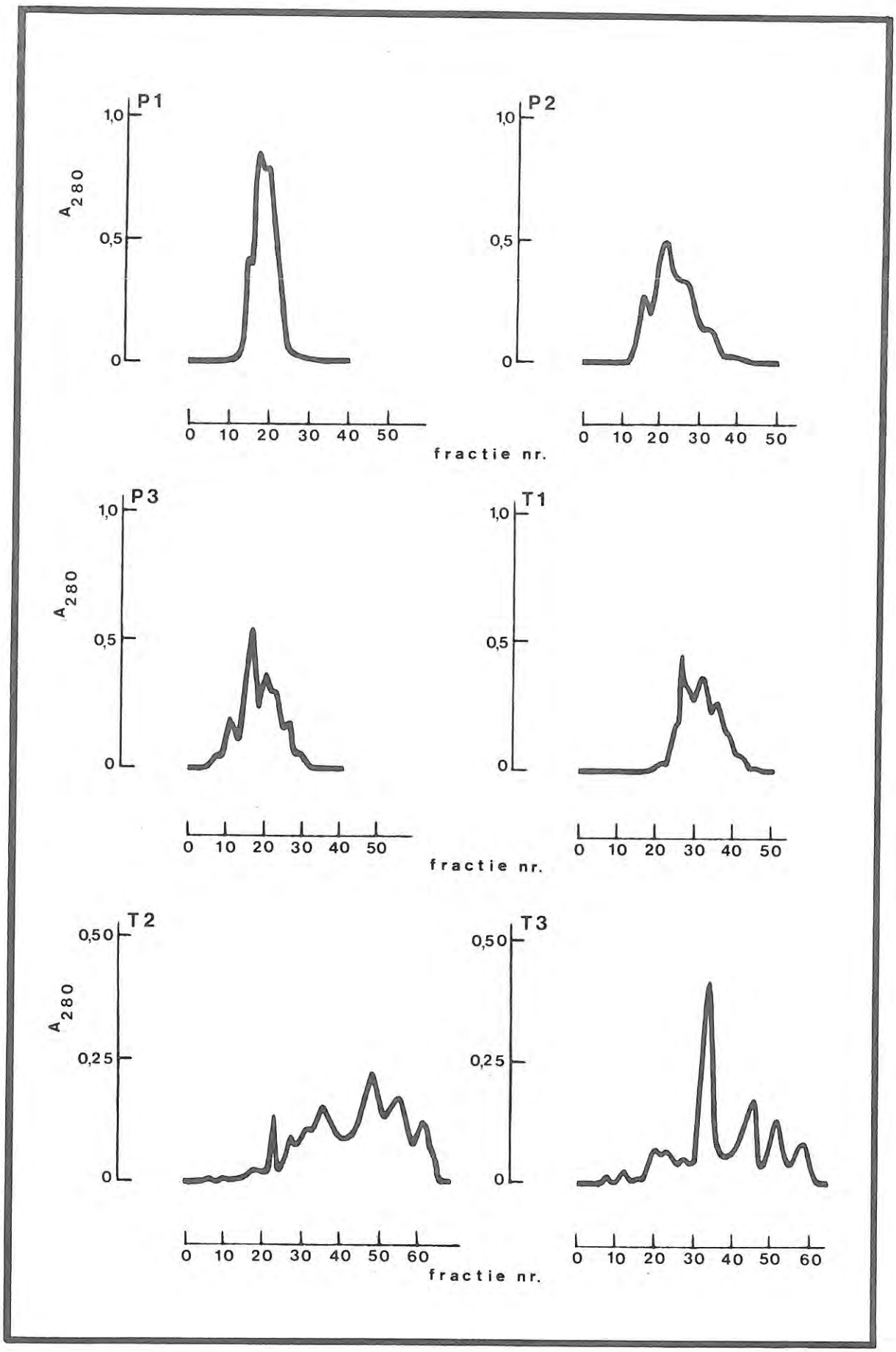

P1
P2
P3
T1
T2
T3
A280
1,0
0,5
0
0,50
0,25
0 10 20 30 40 50
0 10 20 30 40 50 60
fractie nr.

Fig. III-2.

b. Vergelijking van het elutiepatroon van lysozyme derivaten gesynthetiseerd bij verschillende pH

De reactiemengsels L7, L8-2 en L10-2 (Tabel III-1, Fig. III-1) werden gescheiden op CM-Sepharose CL-6B in 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 met een 0 - 0,5 M NaCl gradiënt (Fig. III-3, Tabel III-3). De reacties L7, L8-2 en L10-2 werden uitgevoerd bij gelijke concentratie aan lysozyme (0,4%) en aan S-ethyltrifluorothioacetaat (113 mol per mol lysozyme) (Tabel III-1).

Bij hogere pH worden lysozyme derivaten met een grotere substitutiegraad gevormd (Fig. III-1), en deze derivaten worden geëlueerd bij lagere NaCl concentratie (Fig. III-3). Bij pH 7 gebeurt er nagenoeg geen trifluoroacetylering : de voornaamste piek in chromatogram T6 (topfractie 37) valt samen met de elutiepositie van natief lysozyme.

c. Zuivering van trifluoroacetyllysozyme derivaten

Uitgaande van het reactiemengsel L10-2 (Tabel III-1, Fig. III-1) werden lysozyme derivaten met een verschillend aantal trifluoroacetylgroepen gezuiverd op CM-Sepharose CL-6B (Fig. III-4, Tabel III-4).

Het reactiemengsel werd gescheiden d.m.v. een lineaire gradiënt 0 - 0,25 M NaCl (kolom T7) en de aangeduide fracties a, b en c werden verzameld. Na dialyse t.o.v. water en t.o.v. 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 werden deze fracties nogmaals gechromatografeerd. De elutie gebeurde met een minder steile NaCl gradiënt (kolommen T7a, T7b en T7c, resp.). De fracties LF1, LF2 en LF3 werden gedialyseerd t.o.v. water en gelyofiliseerd.

Uit de PAGE van deze gezuiverde trifluoroacetyllysozyme derivaten (Fig. III-4c) blijkt dat LF1 het grootste aantal trifluoroacetylgroepen draagt; LF2 en LF3 zijn derivaten met een groter aantal vrije aminogroepen dan LF1.

De verdere studie is voornamelijk gericht op LF1. Om LF1 op grotere schaal te bereiden werd het reactiemengsel L10-5 gescheiden op CM-Sepharose CL-6B (chromatogram niet getoond). Het gezuiverde derivaat geeft hetzelfde PAGE beeld als LF1 in Fig. III-4c.

benaming kolom		T4	T5	T6
gel	hoogte (cm)	15		
	volume (ml)	30,1		
staal	reactie	L10-2	L8-2	L7
	proteïne (mg)	20,3	51,4	36,5
elutie	debiet (ml/h)	28,8		
	fractie (ml)	4,8		
	buffer	0,05 M Tris-HCl pH 8,0		
	gradiënt (M NaCl)	0 - 0,5		
	volume (ml)	200		

Tabel III-3 : Vergelijking van het elutiepatroon op CM-Sepharose CL-6B van de lysozyme derivaten L10-2 (T4), L8-2 (T5) en L7 (T6) : zie Fig. III-3.

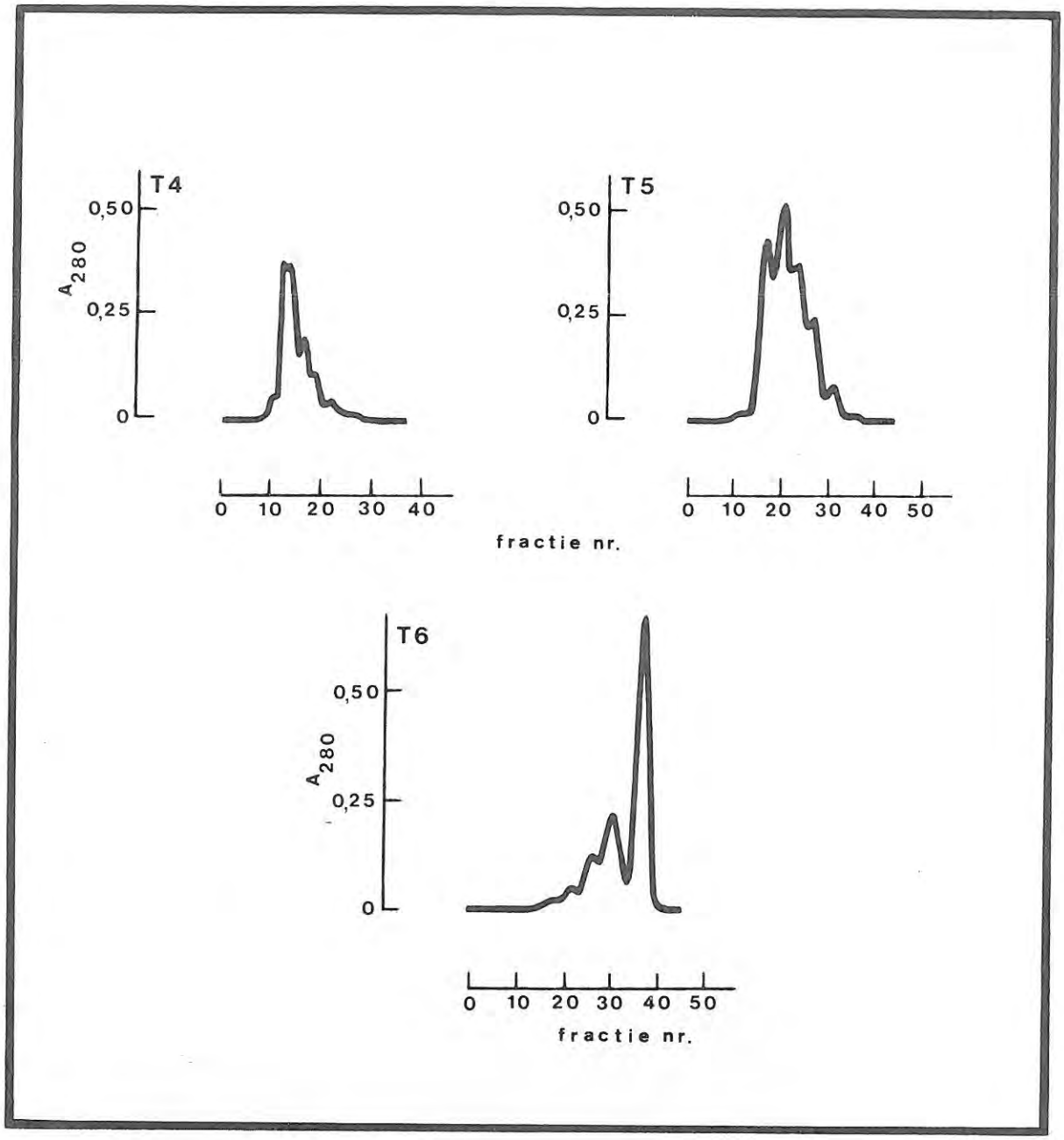


Fig. III-3 : Vergelijking van het elutiepatroon op CM-Sepharose CL-6B van de lysozyme derivaten L10-2 (T4), L8-2 (T5) en L7 (T6). De experimentele gegevens betreffende deze kolom werden samengevat in Tabel III-3.

benaming kolom		T7	T7a	T7b	T7c
gel	hoogte (cm)	25			
	volume (ml)	50,3			
staal	reactie	L10-2	a°	b°	c°
	proteïne (mg)	200	-	-	-
elutie	debiet (ml/h)	28,8			
	fractie (ml)	4,8			
	buffer	0,05 M Tris-HCl pH 8,0			
	gradiënt (M NaCl)	0 - 0,25	0 - 0,15	0 - 0,15	0 - 0,20
	volume (ml)	400	200	200	200

Tabel III-4 : Zuivering van trifluoroacetyllysozyme derivaten uit het reactiemengsel L10-2 : zie Fig. III-4.

° de fracties a, b en c in kolom T7 werden gedialyseerd t.o.v. water en t.o.v. 0,05 M Tris-HCl pH 8,0.

Fig. III-4 : Zuivering van trifluoroacetylderivaten uit het reactiemengsel L10-2.

a. Chromatografie van L10-2; de fracties a, b en c werden verzameld, gedialyseerd t.o.v. water en tenslotte t.o.v. 0,05 M Tris-HCl pH 8,0.

b. Herchromatografie van de fracties a, b en c in de kolommen T7a, T7b en T7c, resp.. De fracties LF1, LF2 en LF3 werden gedialyseerd t.o.v. water en gelyofiliseerd.

De experimentele gegevens betreffende deze kolommen werden samengevat in Tabel III-4.

c. PAGE van de gezuiverde trifluoroacetylderivaten LF1, LF2 en LF3, van het reactiemengsel L10-2 en van lysozyme.

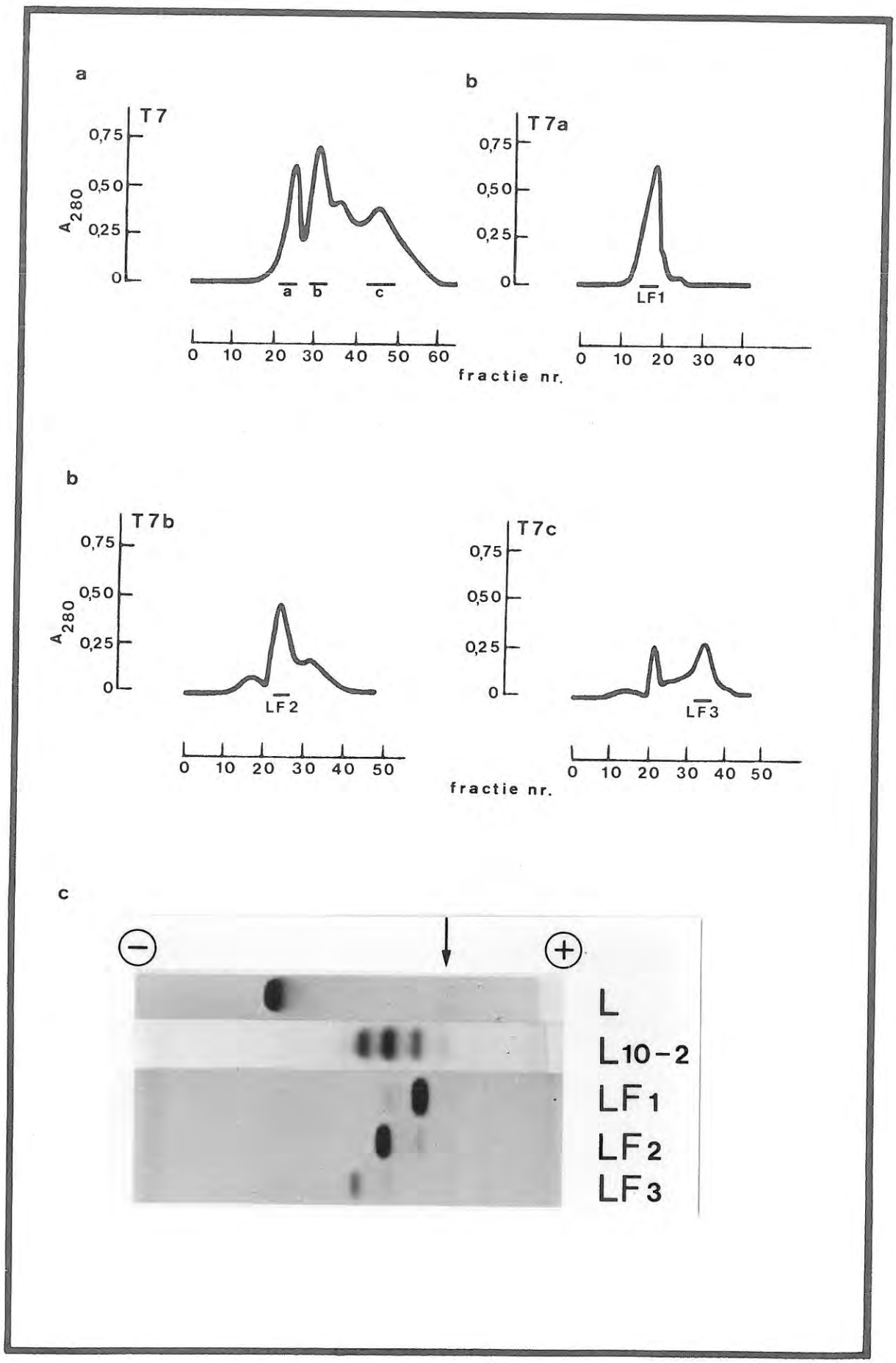

a
T7
0,75
0,50
0,25
0
A280
a
b
c
0 10 20 30 40 50 60
b
T7a
0,75
0,50
0,25
0
LF1
0 10 20 30 40
fractie nr.
b
T7b
0,75
0,50
0,25
0
A280
LF2
0 10 20 30 40 50
T7c
0,75
0,50
0,25
0
LF3
0 10 20 30 40 50
fractie nr.
c
L
L10-2
LF1
LF2
LF3

Fig. III-4.

§ 2. Acetylderivaten van lysozyme

De acetylering van lysozyme werd uitgevoerd om het acetylanaloog van LF1 te bereiden. Dit acetylanaloog geeft de mogelijkheid om de invloed van het merken van de aminogroepen op de eigenschappen van het enzym nader te onderzoeken en te vergelijken met literatuurgegevens betreffende acetyllysozyme derivaten.

Daarnaast werd geprobeerd om lysozyme derivaten met een klein aantal acetylgroepen te bereiden. De resterende vrije aminogroepen werden nadien getrifluoroacetyleerd, dit om het ^{19}F NMR spectrum te vereenvoudigen.

De acetylering werd uitgevoerd door reactie met azijnzuuranhydride, zoals beschreven door Riordan en Vallee (1967).

2.1. Zuivering van acetyllysozyme derivaten

Acetylderivaten van lysozyme werden bereid voor diverse concentraties van lysozyme en van azijnzuuranhydride (Tabel III-5). De scheiding van deze derivaten werd op dezelfde manier uitgevoerd als voor de trifluoroacetylderivaten, nl. op de kationenwisselaar CM-Sepharose CL-6B met een lineaire NaCl gradiënt in 0,05 M Tris-HCl buffer pH 8,0.

Fig. III-5 toont de scheiding van de reactiemengsels LA-1 en LA-2; de experimentele gegevens betreffende de kolommen staan samengevat in Tabel III-6. Naarmate de overmaat aan azijnzuuranhydride t.o.v. lysozyme stijgt worden lysozyme derivaten met een groter aantal acetylgroepen gevormd. In LA-1, noch in LA-2, is een derivaat aanwezig met een analoge elutiepositie als het trifluoroacetylderivaat LF1 (vergelijk met kolom T4, Fig. III-3). In het reactiemengsel LA-3, met 24,54 mol azijnzuuranhydride per mol lysozyme, is het acetylanaloog van LF1 voor een kleine fractie aanwezig (kolom A4, Fig. III-7a).

Voor de bereiding van het acetylanaloog van LF1 werd een grote overmaat aan azijnzuuranhydride gebruikt (460 mol per mol lysozyme). Het reactiemengsel (LA-4) werd gescheiden m.b.v. een 0-0,25 M NaCl gradiënt (kolom A3, Fig. III-6); de aangeduide fracties a werden verzameld en gedialyseerd t.o.v. water en t.o.v. 0,05 M Tris-HCl pH 8,0. Na herchromatografie van a door elutie met een 0-0,10 M NaCl gradiënt (kolom A3a, Fig. III-6), werd de aangeduide fractie LH1 gedialyseerd tegenover water en gelyofiliseerd.

reactie	concentratie		$(CH_3CO)_2O/L$ [1]	reactietijd (h)
	$(CH_3CO)_2O$ (M)	L (%)		
LA-1	$1,69 .10^{-3}$	0,4	6,14 (2)	1
LA-2	$3,81 .10^{-3}$	0,4	13,80 (2)	1
LA-3	$1,69 .10^{-2}$	1	24,54 (2)	1
LA-4	$6,35 .10^{-1}$	2	460,17 (3)	1

Tabel III-5 : Experimentele gegevens voor de acetylering van lysozyme: concentratie van azijnzuuranhydride en van lysozyme en de totale reactietijd.

[1] molaire overmaat van azijnzuuranhydride t.o.v. lysozyme; het cijfer tussen haakjes geeft het aantal delen waarin het azijnzuuranhydride, met een tussenpauze van 20 of 30 min, werd toegevoegd.

Fig. III-5 : Vergelijking van het elutiepatroon van de acetyl-lysozyme derivaten LA-1 en LA-2.
De experimentele gegevens betreffende deze figuur werden samengevat in Tabel III-6.

Fig. III-6 : Zuivering van het acetyllysozyme derivaat LH1 uit het reactiemengsel LA-4.

a. Chromatografie van LA-4 op CM-Sepharose CL-6B; de aangeduide fracties a werden verzameld en gedialyseerd t.o.v. water en t.o.v. 0,05 M Tris-HCl pH 8,0.
b. Herchromatografie van de verzamelde fracties a. De aangeduide fracties LH1 werden gedialyseerd t.o.v. water en gelyofiliseerd.

De experimentele gegevens betreffende deze kolommen werden samengevat in Tabel III-6.

c. PAGE van lysozyme en van de gezuiverde lysozyme derivaten LH1 en LF1.

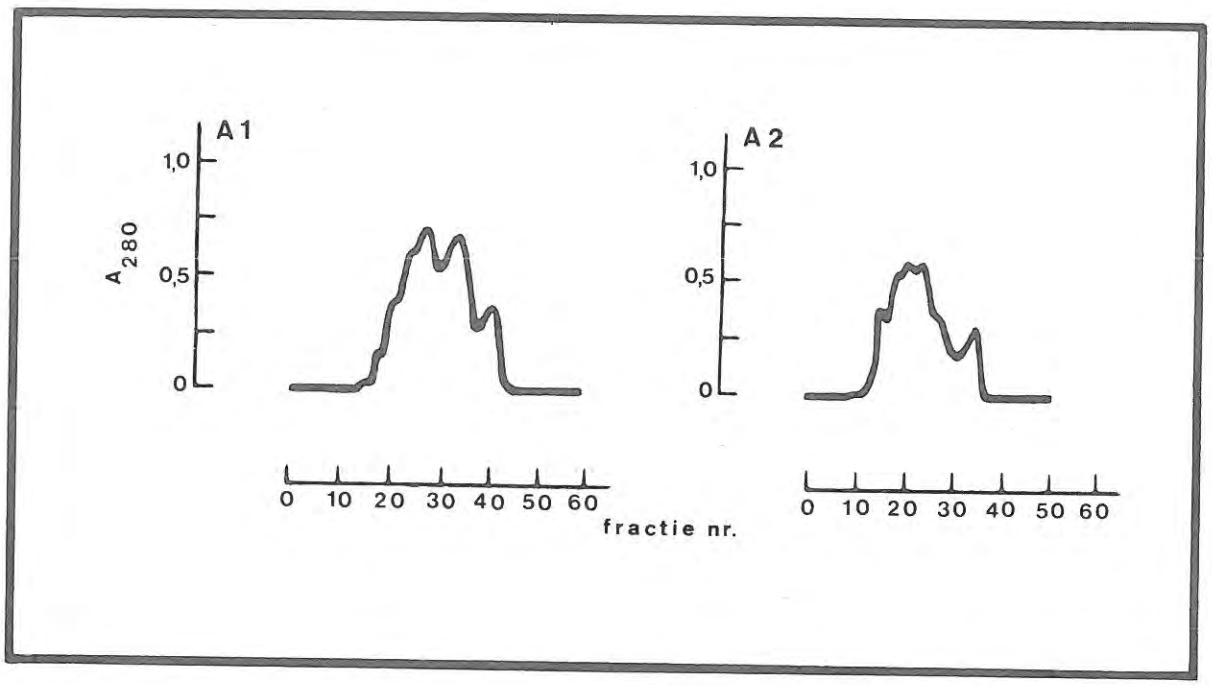


Fig. III-5.

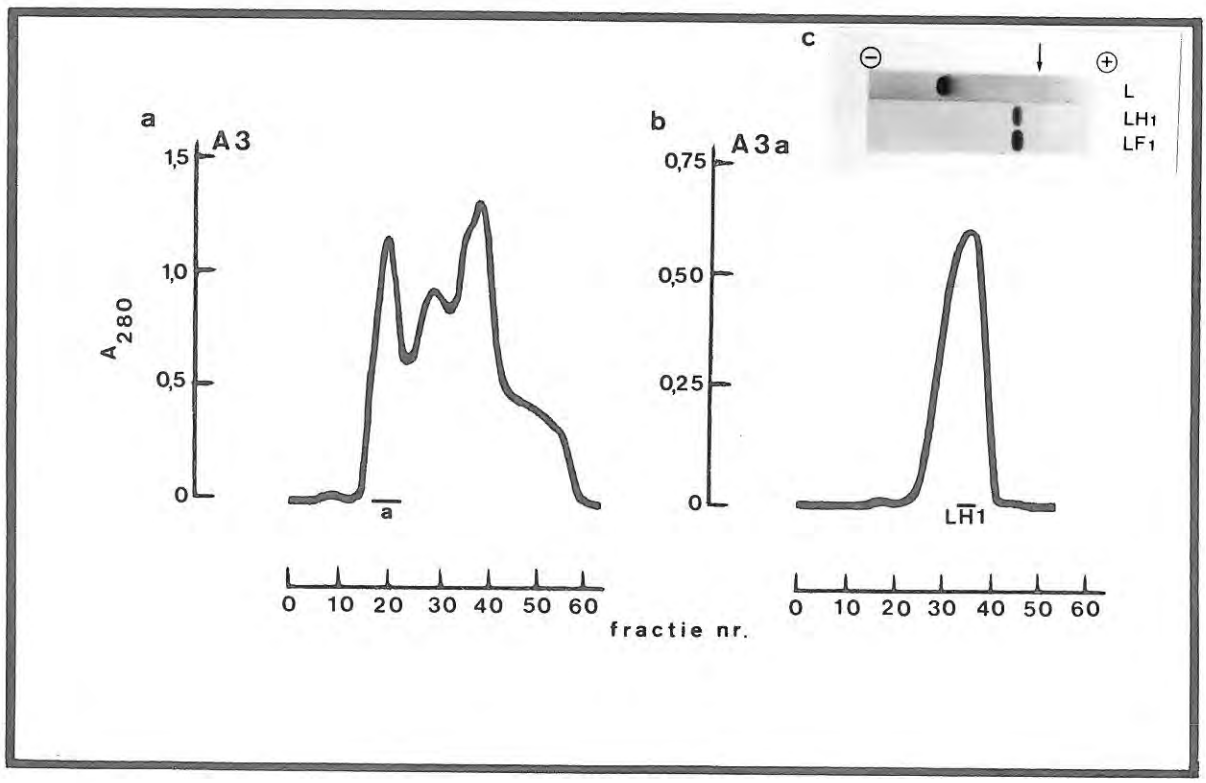


Fig. III-6.

benaming kolom		A1[1]	A2[1]	A3[2]	A3a[2]	A4[4]	A4a[4]	A5[6]	A5a[6]	A5b[6]	A5c[6]
gel	hoogte (cm)	15,3		25,5		24,7					
	volume (ml)	30,7		51,3		49,6					
staal	reactie	LA-1	LA-2	LA-4	a[3]	LA-3	d[5]	LHF	a[7]	b[7]	c[7]
	proteïne (mg)	124	84,5	320	-	274,3	-	59,3	-	-	-
elutie	debiet (ml/h)	28,8		20		28,8					
	fractie (ml)	4,8		3,3		4,8					
	buffer	0,05 M Tris-HCl pH 8,0									
	gradiënt (M NaCl)	0-0,5		0-0,25	0-0,10	0-0,4	0-0,3	0-0,25	0-0,25	0-0,25	0-0,25
	volume (ml)	200		200	200	400	400	200	200	200	200

Tabel III-6 : Experimentele gegevens voor de scheiding van acetyllysozyme derivaten op CM-Sepharose CL-6B.

[1] zie Fig. III-5

[2] zie Fig. III-6

[3] fractie a in kolom A3

[4] zie Fig. III-7a

[5] fractie d in kolom A4

[6] zie Fig. III-7b

[7] fracties a, b en c in kolom A5.

Fig. III-6c toont de PAGE van LH1 en van LF1. Hieruit blijkt dat deze derivaten dezelfde mobiliteit bezitten en dat ze dus een gelijk aantal vrije aminogroepen moeten hebben.

2.2. Bereiding en zuivering van lysozyme derivaten met zowel acetyl- als trifluoroacetylgroepen gebonden

Lysozyme derivaten met een gering aantal acetylgroepen werden bereid uitgaande van het reactiemengsel LA-3 (Tabel III-5). Fig. III-7a toont de chromatografie van LA-3 op CM-Sepharose CL-6B (kolom A4). De verzamelde fracties d werden, na dialyse, opnieuw op kolom gebracht (kolom A4a) en de aangeduide fracties LH4 werden gedialyseerd t.o.v. water en gelyofiliseerd.

De PAGE (Fig. III-7c) toont dat LH4 een grotere mobiliteit heeft dan LF1, en dus ook een groter aantal vrije aminogroepen. LH4 is een mengsel van twee acetylderivaten met verschillende substitutiegraad.

LH4 werd getrifluoroacetyleerd bij pH 10, 0,4% proteïne, 226 mol S-ethyltrifluorothioacetaat per mol LH4 en reactie gedurende twee uur. Het reactiemengsel (LHF) werd, na dialyse, gescheiden op CM-Sepharose CL-6B (kolom A5, Fig. III-7b). De fracties a, b en c werden verzameld, gedialyseerd en geherchromatografeerd (kolommen A5a, A5b en A5c, Fig. III-7b). De fracties LHF1, LHF2 en LHF3 werden gedialyseerd t.o.v. water en gelyofiliseerd.

Uit de PAGE (Fig. III-7c) blijkt dat LHF1, LHF2 en LHF3 een kleinere mobiliteit hebben dan LH4. Dit betekent dat de vrije aminogroepen in LH4, geheel of gedeeltelijk, getrifluoroacetyleerd werden. LHF1 en LHF2 hebben dezelfde mobiliteit als LF1 en LF2, resp.. LHF3 is een mengsel van twee lysozyme derivaten met verschillende substitutiegraad.

Fig. III-7 : Zuivering van lysozyme derivaten met zowel acetyl- als trifluoroacetylgroepen gebonden.

a. Chromatografie van het reactiemengsel LA-3 (kolom A4); de fracties werden verzameld en na dialyse opnieuw op kolom gebracht (kolom A4a). De fracties LH4 werden gedialyseerd t.o.v. water en gelyofiliseerd.

b. Chromatografie van het reactiemengsel LHF (kolom A5); de aangeduide fracties a, b en c werden gedialyseerd. De herchromatografie van deze fracties a, b en c wordt weergegeven in kolommen A5a, A5b en A5c, resp.. De fracties LHF1, LHF2 en LHF3 werden gedialyseerd t.o.v. water en gelyofiliseerd.

De experimentele gegevens betreffende deze kolommen werden samengevat in Tabel III-6.

c. Vergelijking van de PAGE van LH4, LHF1, LHF2 en LHF3 met deze van L, LF1, LF2 en LF3.

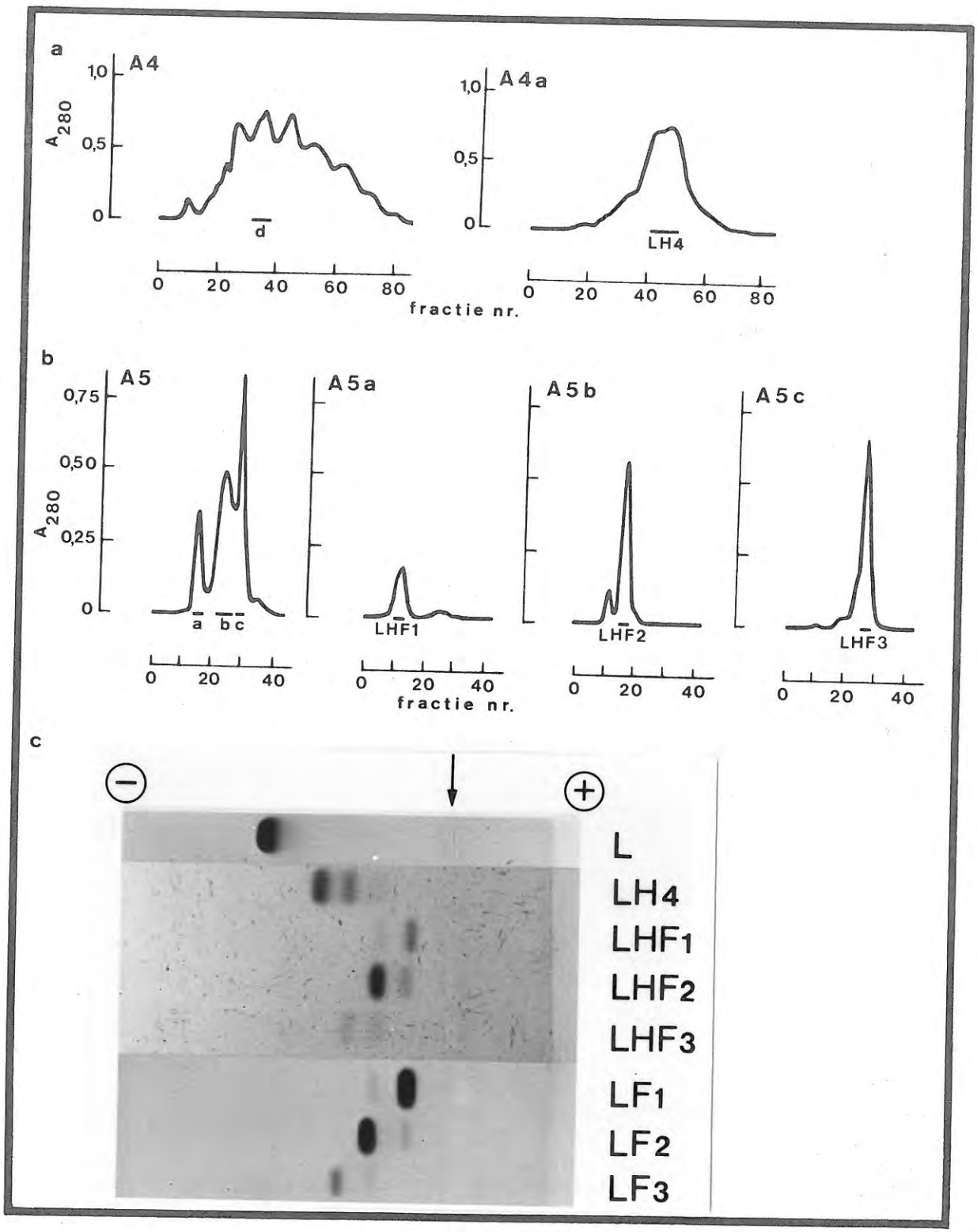

a
A4
1,0
0,5
0
A280
d
0 20 40 60 80
A4a
1,0
0,5
0
LH4
0 20 40 60 80
fractie nr.
b
A5
0,75
0,50
0,25
0
A280
a b c
0 20 40
A5a
LHF1
0 20 40
A5b
LHF2
0 20 40
A5c
LHF3
0 20 40
fractie nr.
c
L
LH4
LHF1
LHF2
LHF3
LF1
LF2
LF3

Fig. III-7.

§ 3. Enzymatische afbraak

De eindstandige aminozuren in een proteïne kunnen afgesplitst worden door middel van exopeptidasen. Voor LF1 kan het afsplitsen van de C- en N-eindstandige aminozuren belangrijke veranderingen in het ^{19}F NMR spectrum veroorzaken omdat :

- het C-eindstandige aminozuur Leu-129 in natief lysozyme een zoutbrug vormt met Lys-13;
- het N-eindstandige aminozuur lysine is.

Daarom werd LF1 behandeld met carboxypeptidase A (CPA) en met de aminopeptidasen leucineaminopeptidase (LAP) en aminopeptidase M (APM).

3.1. Verwijdering van het C-eindstandige Leu-129 van LF1 door middel van carboxypeptidase A

De reactie van LF1 met PMS-behandeld CPA werd uitgevoerd zoals beschreven door Morgan en Riehm (1968). Het afsplitsen van het C-eindstandige aminozuur werd gevolgd door dunnelaagchromatografie en detectie van de aminozuren met ninhydrine. Na ongeveer 16 uur reactie gaf het reactiemengsel een positieve vlek voor leucine (R_f = 0,398). Na 52 uur werd de reactie gestopt door aanzuren en PMS-CPA werd gescheiden van LF1 door chromatografie op Sephadex G-100 in 1% azijnzuur. De LF1-fracties werden verzameld en gelyofiliseerd.
Het gevormde product wordt verder aangeduid als des-Leu-129-LF1.

3.2. Behandeling van LF1 met aminopeptidasen

N-eindstandige aminozuren van proteïnen kunnen afgesplitst worden door LAP en APM, uit de cytosol- en de microsomale fractie resp., van de varkensnier.

Lysozyme is echter resistent tegenover de werking van deze aminopeptidasen (Jollès en Jollès, 1966) : zelfs na 52 uur incubatie van lysozyme met LAP of met APM is in de dunnelaagchromatografie geen vlek voor afgesplitst lysine merkbaar.

De behandeling van LF1 met deze aminopeptidasen heeft hetzelfde resultaat : er gebeurt geen afsplitsing van het N-eindstandige lysine.

§ 4. Samenvatting

Voor de ^{19}F NMR studie van gefluoreerd lysozyme en om de invloed van het merken van de aminogroepen op de eigenschappen van het enzym na te gaan werden volgende lysozyme derivaten bereid :

1. De trifluoroacetylderivaten LF1, LF2 en LF3 (Fig. III-4) : LF1 bevat het grootste aantal trifluoroacetylgroepen, LF2 en LF3 hebben een lagere substitutiegraad dan LF1.

2. Het acetylderivaat LH1 (Fig. III-6) dat eenzelfde aantal vrije aminogroepen bevat als LF1.

3. De derivaten LHF1 en LHF2 (Fig. III-7) welke zowel acetyl- als trifluoroacetylgroepen bevatten. LHF1 en LHF2 bevatten eenzelfde aantal vrije aminogroepen als LF1 en LF2, resp..

4. Het des-Leu-129-LF1, door afsplitsing van het C-eindstandige Leu-129 van LF1 door middel van CPA.

Hoofdstuk IV. VERGELIJKING VAN DE STRUCTUUR EN EIGENSCHAPPEN VAN DE LYSOZYME DERIVATEN MET DEZE VAN NATIEF LYSOZYME

§ 1. Inleiding

Vooraleer de ^{19}F NMR studie van LF1 aan te vatten is het van belang om na te gaan in hoeverre de trifluoroacetylering van de lysines van lysozyme de structuur en eigenschappen van het enzym beïnvloeden.

Om de lysozyme derivaten te karakteriseren werd nagegaan of LF1 en LH1 vrije aminogroepen bevatten en werd een vergelijkende studie uitgevoerd van de structuur, aktiviteit en stabiliteit van LF1, LH1 en natief lysozyme.

§ 2. Onderzoek naar de vrije aminogroepen in LF1 en LH1

2.1. Bepaling van het aantal vrije aminogroepen

a. Gebruik van de TNBS-methode voor de bepaling van het aantal vrije aminogroepen in LF1

Het aantal vrije aminogroepen in een proteïne kan bepaald worden door middel van de TNBS-methode. Hierbij laat men het proteïne in basisch midden reageren met een overmaat 2,4,6-trinitrobenzeensulfonzuur en de TNP-aminogroepen worden spectrofotometrisch bepaald bij 340 nm.
Een vergelijking van het aantal aminogroepen in verschillende lysozyme derivaten kan gemaakt worden door de absorptie bij 340 nm te meten voor verschillende concentraties aan proteïne. Een grafiek van de absorptie in functie van de proteïne concentratie geeft een rechte; de helling van deze rechte is evenredig met het aantal vrije aminogroepen.

De resultaten van de TNBS-analyse van lysozyme en van trifluoroacetyllysozyme derivaten staan aangegeven in Tabel IV-1. Door de helling van de rechte voor L gelijk te stellen aan zeven (het theoretisch aantal aminogroepen in lysozyme) kan het aantal vrije aminogroepen in de lysozyme derivaten bepaald worden. Uit Tabel IV-1 blijkt dat :

- LF1, LF2 en LF3 resp. 2, 3 en 5 vrije aminogroepen bevatten,
- LHF1 ongeveer 3 vrije aminogroepen bevat.

Uit de PAGE van de trifluoroacetylderivaten (Fig. III-4, Fig. III-7) blijkt echter dat :

- LF1 en LHF1 dezelfde mobiliteit bezitten en dus eenzelfde aantal vrije aminogroepen moeten bevatten;
- LF2 en LF3 een groter aantal vrije aminogroepen bevatten dan LF1 en LHF1.

De resultaten van deze aminogroepdosage zijn dus niet in overeenstemming met de PAGE.
De verklaring voor deze afwijkingen moet waarschijnlijk gezocht worden in de geringe stabiliteit van de trifluoroacetamidebinding.

product	helling [1]	n_{NH_2} [2]
L	3,28 ± 0,15 (13)	(7)
LF1	0,92 ± 0,19 (4)	1,96
LF2	1,46 ± 0,30 (3)	3,11
LF3	2,25	4,80
LHF1	1,46	3,11
L10-1	2,0	4,27

Tabel IV-1 : Resultaten van de TNBS-dosage van de vrije aminogroepen in L en in trifluoroacetyllysozyme derivaten.

[1] helling van de rechte bekomen door de absorptie bij 340 nm uit te zetten in functie van de proteïne concentratie; het cijfer tussen haakjes geeft het aantal experimenten waarvan het gemiddelde en de standaardafwijking bepaald werd.

[2] het aantal vrije aminogroepen in de lysozyme derivaten werd bepaald aan de hand van de aangegeven helling en door het aantal vrije aminogroepen in L gelijk te stellen aan zeven.

b. Hydrolyseerbaarheid van de trifluoroacetamidebinding

De trifluoroacetylering van de ε-aminogroepen van proteïnen is een omkeerbare reactie : volgens Schallenberg en Calvin (1955) wordt de trifluoroacetamidebinding hydrolytisch gesplitst boven pH 10. Goldberger en Anfinsen (1962) verwijderden de trifluoroacetylgroepen van getrifluoroacetyleerd ribonuclease door incubatie in 1 M piperidine bij 0°C gedurende 1 uur.

Uit recentere studies blijkt echter dat de trifluoroacetamidebinding eveneens bij lagere pH kan gehydrolyseerd worden, bijvoorbeeld tijdens de trypsine afbraak van een getrifluoroacetyleerd proteïne bij pH 8,0 en 37°C (Paselk en Levy, 1974; Staudenmayer et al., 1976). Levy en Paselk (1973) wijzen op de gedeeltelijke hydrolyse van trifluoroacetylfenylalanine in getrifluoroacetyleerd insuline onder de omstandigheden gebruikt voor het vormen van dinitrofenylderivaten.

Vermits de omstandigheden gebruikt voor de aminogroepdosage d.m.v. de TNBS-methode (boraatbuffer pH 9,2, 40°C, 2h) analoog zijn aan deze welke in de vermelde studies werden gebruikt, is het erg waarschijnlijk dat de afwijkende resultaten van de aminogroepdosage te wijten zijn aan een, gedeeltelijke, hydrolyse van de trifluoroacetamidebindingen in de trifluoroacetyllysozyme derivaten.

c. Bepaling van het aantal vrije aminogroepen in LH1 d.m.v. de TNBS-methode

Vermits de acetamidebindingen in het acetylderivaat niet hydrolyseerbaar zijn, tenzij onder zeer drastische omstandigheden (Riordan en Vallee, 1967), kan het aantal vrije aminogroepen in LH1 bepaald worden d.m.v. de TNBS-methode. Vermits daarenboven LF1 en LH1 dezelfde mobiliteit bezitten in de PAGE, bevat LF1 eenzelfde aantal vrije aminogroepen als LH1.

De resultaten van de TNBS-analyse van L en van LH1 staan aangegeven in Fig. IV-1. De absorptie bij 340 nm is weergegeven in functie van de proteïne concentratie. De helling van de rechte bedraagt 3,291 voor L en 0,464 voor LH1. Hieruit kan afgeleid worden dat LH1 gemiddeld 0,987 vrije aminogroepen per molecule bevat.
Dit betekent dat LF1 ongeveer 1 vrije aminogroep per molecule bezit.

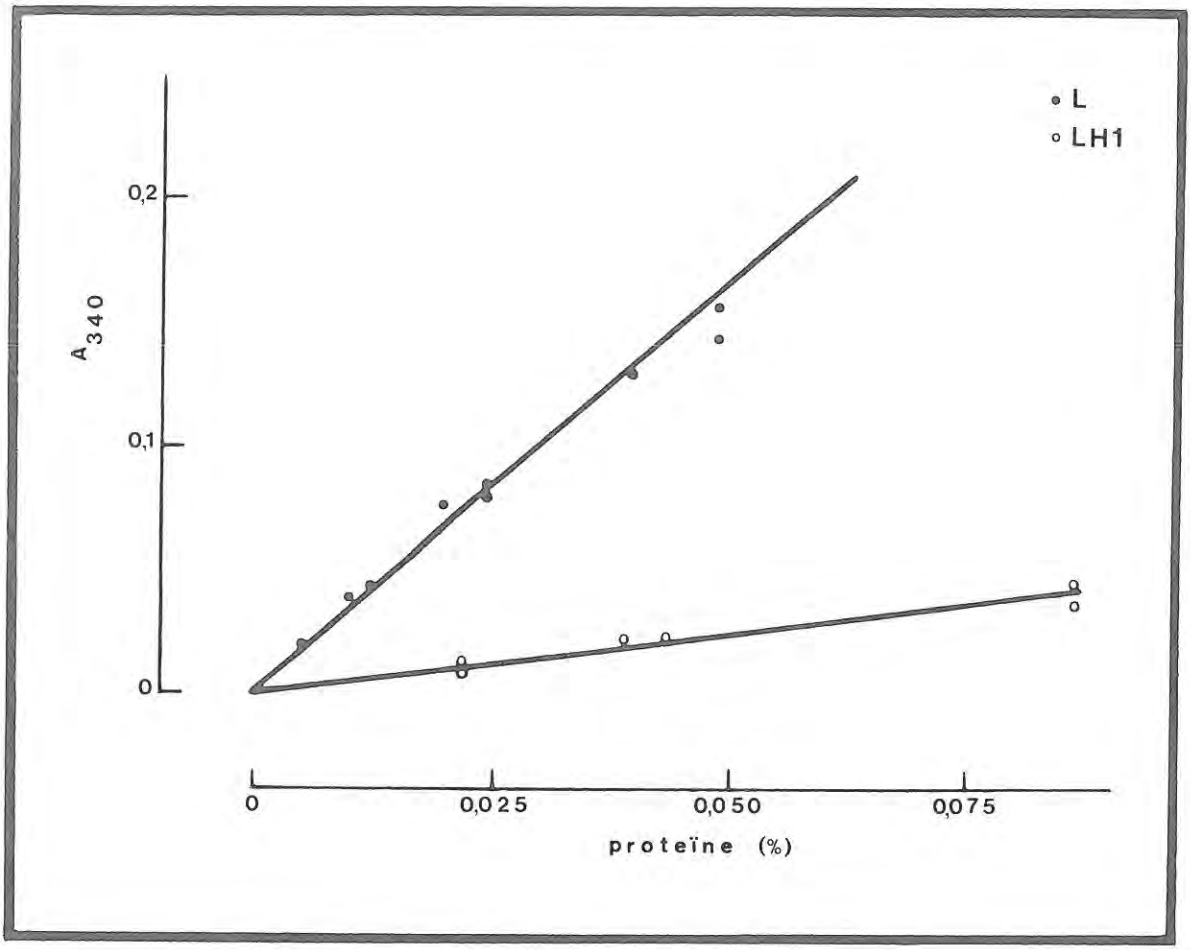


Fig. IV-1 : Bepaling van het aantal vrije aminogroepen in LH1 d.m.v. de TNBS-methode.
De grafiek geeft de A_{340}-waarden voor verschillende concentraties aan L en aan LH1. De helling van de rechte bedraagt 3,291 en 0,464 voor L en LH1, resp.; hieruit kan afgeleid worden dat LH1 0,987 vrije aminogroepen per molecule bevat.

2.2. Onderzoek naar de aard van de vrije aminogroep in LF1 en LH1

Vermits S-ethyltrifluorothioacetaat een reagens is dat specifiek reageert op de ε-aminogroepen van proteïnen, kan men veronderstellen dat de vrije aminogroep in LF1 de α-aminogroep is. Om deze veronderstelling te kontroleren werd een Edman degradatie van L, LF1 en LH1 uitgevoerd.

In de Edman degradatie wordt door reactie van fenylisothiocyanaat (PITC) met de vrije α-aminogroep van een proteïne of peptide het fenylthiohydantoïne (PTH) van het N-eindstandige aminozuur afgesplitst (Fig. II-1, p. 34). De vrije ε-aminogroepen van het proteïne reageren tot fenylthiocarbamyl (PTC) derivaten.

Het N-eindstandige aminozuur van lysozyme is lysine. Als referentie werd de Edman degradatie eveneens uitgevoerd op lysine en op het ε-trifluoroacetyllysine (ε-TFA-Lys). De thiohydantoïnes werden geanalyseerd d.m.v. massaspectrometrie.

Fig. IV-2 toont de CI massaspectra van de producten gevormd door Edman degradatie van Lys, ε-TFA-Lys, L en LF1. Hieruit blijkt het volgende :

1. In het massaspectrum van ε-PTC-PTH-Lys (Fig. IV-2a) komt het moleculair ion (MH^+) met massa 399 niet voor : het ε-PTC-PTH-Lys is onstabiel (Fales et al., 1971) en door afsplitsing van PITC ontstaat het ion met massa 264 als voornaamste productpiek. Daarnaast is er een kleine piek met massa 306, door afsplitsing van aniline van MH^+. Het ion met massa 136 is afkomstig van het reagens.
2. Het massaspectrum van ε-TFA-PTH-Lys (Fig. IV-2b) bevat als voornaamste piek het moleculair ion met massa 360.
3. De Edman degradatie van L (Fig. IV-2c) geeft een product met analoge samenstelling als dit voor Lys (Fig. IV-2a) : de voornaamste pieken in het CI spectrum zijn deze met massa 264 en 306.
4. Het massaspectrum van het Edman degradatie product van LF1 (Fig. IV-2d) bevat als voornaamste piek het ion met massa 360; het ion met massa 264 is slechts voor een zeer kleine fractie (minder dan 5%) aanwezig.

De Edman degradatie werd eveneens uitgevoerd op LH1. Het massaspectrum van het gevormde product bevat slechts een spoor van ionen met massa 306 (het moleculair ion van ε-acetyl-PTH-Lys) en massa 264.

Fig. IV-2 : Chemische ionisatie massaspectra van de PTH-derivaten gevormd door Edman degradatie van (a) lysine, (b) ε-TFA-Lys, (c) L en (d) LF1.

De spectra werden opgenomen met isobutaan als reagensgas. De PTH-derivaten werden in de bron gebracht d.m.v. de 'direct insertion probe' techniek; de temperatuur werd gevarieerd van 30 tot 250°C en de massa's tussen 130 en 500 a.m.u. werden geregistreerd.
Voor de spectra b, c en d werd een 'zuivering' van het spectrum toegepast om de reagenspieken te elimineren en de productpieken te intensifiëren.

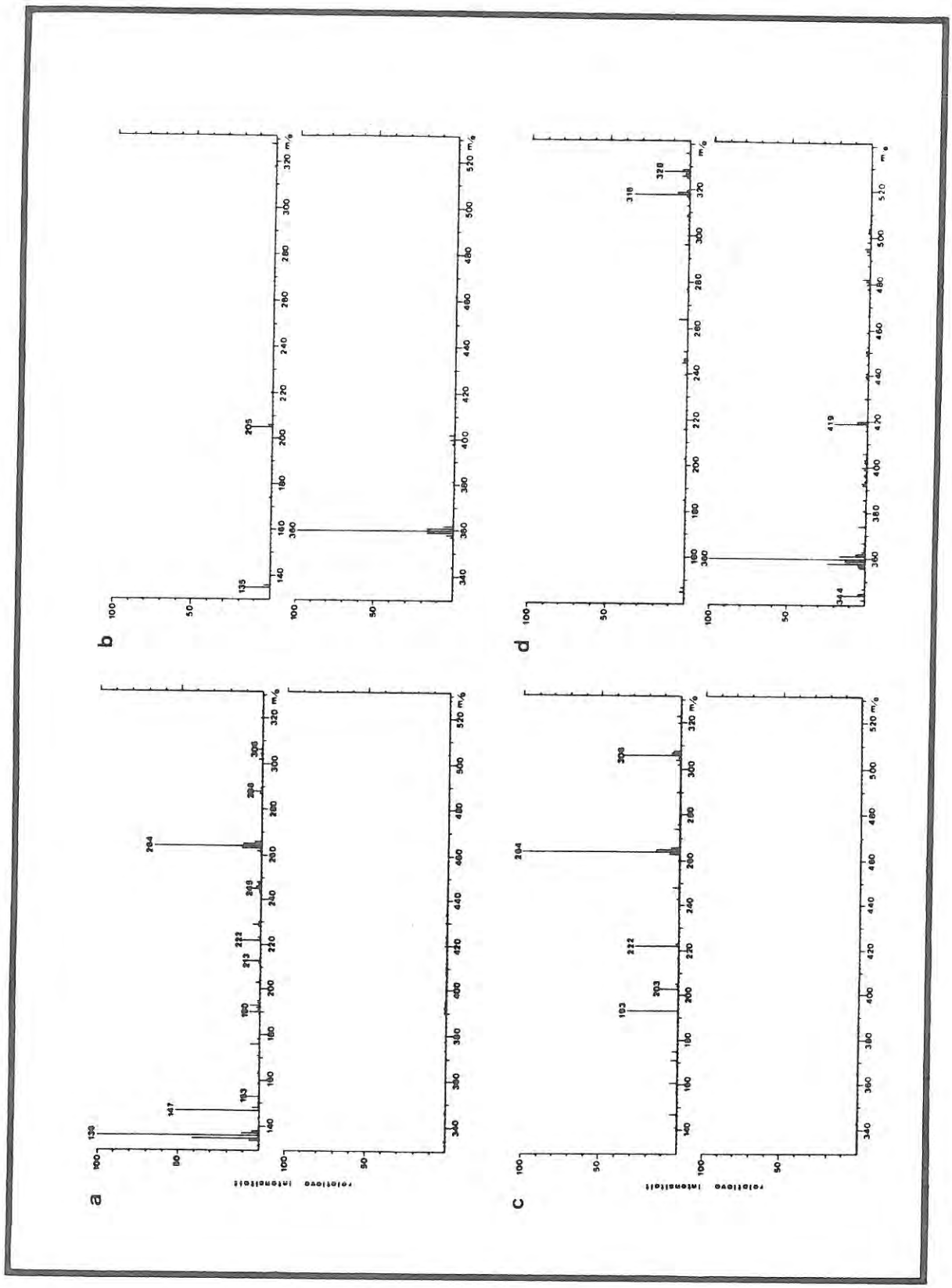


Fig. IV-2.

Betreffende het N-eindstandige aminozuur van L, LF1 en LH1 kunnen we besluiten dat :

- door middel van Edman degradatie en massaspectrometrie eveneens kan aangetoond worden dat het N-eindstandige aminozuur van lysozyme lysine is;
- LF1, alleszins voor een gedeelte, bestaat uit moleculen waarin de α-aminogroep vrij is en de ε-aminogroep van Lys-1 getrifluoroacetyleerd is;
- LF1 moleculen waarin zowel de α- als de ε-aminogroep van Lys-1 vrij zijn slechts een zeer kleine fractie van het totaal uitmaken;
- in LH1 de α-aminogroep mogelijk gedeeltelijk geacetyleerd is, gezien de lage opbrengst van het moleculair ion.

Hierbij dient natuurlijk wel opgemerkt dat door deze methode LF1 moleculen waarin de α-aminogroep getrifluoroacetyleerd zou zijn niet gedetecteerd worden : de Edman degradatie gebeurt alleen indien de α-aminogroep vrij is. Dit betekent dat LF1 wel moleculen kan bevatten waarin de α-aminogroep getrifluoroacetyleerd is en een van de ε-aminogroepen vrij is.
Dit is echter minder waarschijnlijk omwille van volgende redenen :

1. S-ethyltrifluorothioacetaat reageert in proteïnen voornamelijk met de ε-aminogroepen. In ribonuclease S-peptide werd de α-aminogroep gedeeltelijk (voor ongeveer 30%) getrifluoroacetyleerd door gebruik te maken van een zeer grote overmaat reagens, nl. 355 mol S-ethyltrifluorothioacetaat per aminogroep (Huestis en Raftery, 1971).
   Voor de synthese van LF1 werd een overmaat van 226 mol S-ethyltrifluorothioacetaat per mol lysozyme (d.i. 32 mol per aminogroep) gebruikt, hetgeen beduidend minder is dan bij het ribonuclease S-peptide.
2. De Edman degradatie toont aan dat LF1, alleszins gedeeltelijk, bestaat uit een derivaat waarin de α-aminogroep vrij is en de ε-aminogroep van Lys-1 getrifluoroacetyleerd.
3. Het ^{19}F NMR spectrum van LF1 (zie Hoofdstuk V) bevat zes signalen welke ieder een verschillende pH-curve vertonen. Indien de α-aminogroep gedeeltelijk getrifluoroacetyleerd zou zijn, moet de α-trifluoroacetylgroep een F-signaal geven met een pH-curve verschillend van deze van de ε-trifluoroacetylgroepen (de omgeving voor ieder van de aminogroepen in het lysozyme molecule is verschillend). Dit is echter niet het geval.

We kunnen hieruit besluiten dat, alhoewel het niet uitgesloten is dat de α-aminogroep in lichte mate getrifluoroacetyleerd is, de vrije aminogroep in LF1 voornamelijk de α-aminogroep moet zijn.

§ 3. Onderzoek naar de invloed van de trifluoroacetylering en van de acetylering van de lysine aminogroepen op de structuur van lysozyme

3.1. Gelfiltratie op Sephadex G-100 in 8 M ureum

Om na te gaan of er tijdens de trifluoroacetylering geen intermoleculaire disulfidebruggen gevormd worden, waardoor trifluoroacetyllysozyme oligomeren zouden ontstaan, werden het reactiemengsel L10-1 (Fig. III-1) en LFn (het neerslag dat tijdens de reactie ontstaat) onderzocht d.m.v. gelfiltratie op Sephadex G-100 in 8 M ureum (Fig. IV-3).

Uit Fig. IV-3 blijkt dat L10-1 elueert in een piek met hetzelfde elutievolume als L. LFn bevat verschillende componenten welke sneller geëlueerd worden.

Dit betekent dat er tijdens de trifluoroacetylering intermoleculaire reactie gebeurt met vorming van componenten met hoger molecuulgewicht. De oplosbare fractie van het reactiemengsel, welke in deze studie gebruikt wordt, bevat uitsluitend monomere lysozyme derivaten.

3.2. Vergelijking van de conformatie van LF1 en LH1 met deze van natief lysozyme

a. Circulair dichroïsme studie

De invloed van het invoeren van acetyl- en trifluoroacetylgroepen op de conformatie van lysozyme werd onderzocht door een vergelijking van de circulair dichroïsme (CD) spectra van L, LF1 en LH1.

Het CD spectrum van natief lysozyme bevat maxima bij 295, 290 en 284 nm, een brede negatieve band rond 260 nm en minima bij 222 en 208 nm (Nakae et al., 1972). De banden bij 295, 290 en 284 nm zijn te wijten aan de aromatische groepen en bevatten een belangrijke bijdrage van Trp-108 (Teichberg et al., 1970; Ikeda en Hamaguchi, 1972).

Fig. IV-4 toont de CD spectra van L, LF1 en LH1. Uit een vergelijking van deze spectra kunnen we het volgende afleiden :

- Het spectrum van L vertoont de maxima welke hierboven werden aangegeven voor natief lysozyme.
- In het gebied 200-250 nm vertonen de LF1 en LH1 spectra minima bij 208 en 222 nm; er is een klein intensiteitsverschil met het

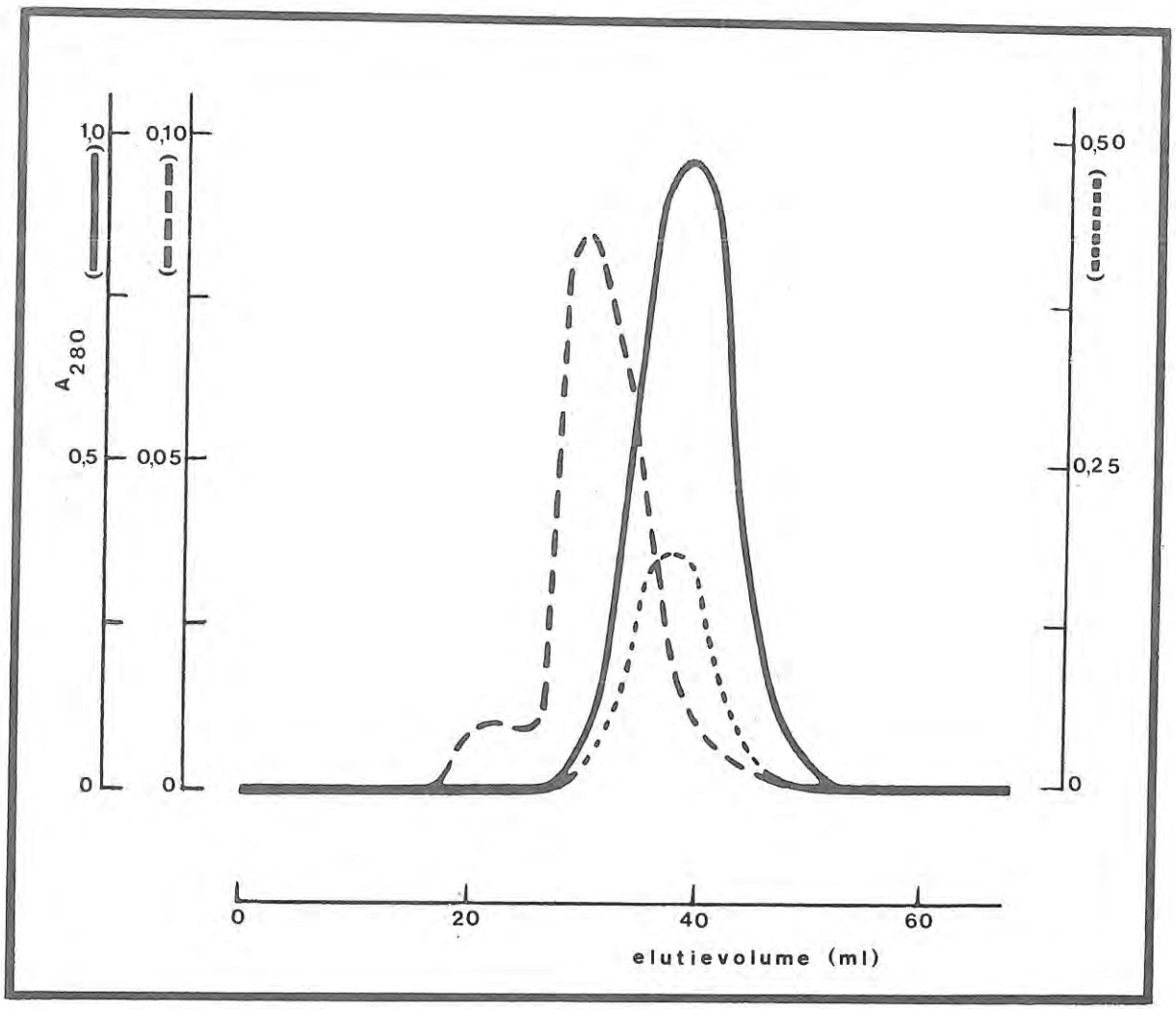


Fig. IV-3 : Gelfiltratie op Sephadex G-100 in 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 8 M ureum van L (——), L10-1 (----) en LFn[1] (— — —).

L (4 mg), LFn (0,4 mg) en L10-1 (1 mg), opgelost in 0,05 M Tris-HCl pH 8,0, werden op de kolom (16 × 180 mm) gebracht en geëlueerd met een debiet van 25,5 ml/h.
Deze gelfiltratie werd uitgevoerd bij kamertemperatuur.

[1] LFn is het neerslag dat tijdens de trifluoroacetyleringsreactie gevormd wordt.

L spectrum : $[\theta]_{208}$ bedraagt -7280, -7640 en -6640 $°cm^2\ dmol^{-1}$ voor L, LF1 en LH1 resp..

- In het gebied van 250 tot 300 nm is de ellipticiteit voor LF1 en LH1 lager dan deze voor L. De spectra vertonen minder fijnstruktuur : de piek bij 284 nm voor L is een schouder in de LF1 en LH1 spectra.
- De brede negatieve band rond 260 nm is in LH1 eveneens aanwezig; in LF1 is deze band licht vervormd.

b. ^1H NMR studie

Om na te gaan welke de invloed is van de trifluoroacetylering en de acetylering op de omgeving van individuele atomen in het lysozyme molecule werden de ^1H NMR spectra van LF1 en LH1 vergeleken met dat van L.

Fig. IV-5 toont de ^1H NMR spectra van L en van LF1 opgenomen met een 400 MHz toestel; Fig. IV-6 toont de spectra van L en LH1 opgenomen bij 200 MHz. De metingen gebeurden met 1 mM proteïne in H_2O pH 3,6 met 10% D_2O, bij 37°C.

In het spectrum van natief lysozyme zijn een aantal van de ^1H signalen toegewezen aan individuele atomen in het enzym. Tabel IV-2 geeft de chemische verschuiving van enkele van deze signalen in L en hun positie in LF1 en in LH1. Ter vergelijking wordt eveneens de positie van deze signalen bij pH 5 en 55°C (Perkins en Dwek, 1980) gegeven. De spectra van L, LF1 en LH1 werden opgenomen bij 37°C omdat de lysozyme derivaten irreversibel denatureren bij 55°C en hogere pH (deze temperatuurinstabiliteit wordt verder behandeld in § 4.2.).

Fig. IV-5, Fig. IV-6 en Tabel IV-2 leren ons het volgende :

1. In het alifatische gebied zijn de spectra van LF1 en LH1 analoog aan dit van L. Er zijn lichte verschuivingen van bepaalde signalen, o.a. van enkele methylsignalen bij hoog veld (Tabel IV-2), maar er zijn geen drastische verschillen t.o.v. het L spectrum.
2. In het aromatische gebied zijn er verschuivingen van de signalen in de LF1 en LH1 spectra t.o.v. de positie in het L spectrum. Het meest opvallend is het effect op de Trp NH signalen : het Trp-108 signaal in LF1 en LH1 ondergaat een verschuiving naar lager veld t.o.v. de positie voor L (-0,062 ppm en -0,091 ppm in LF1 en LH1 resp.).
3. De spectra van LF1 en LH1 zijn ongeveer aan elkaar gelijk.

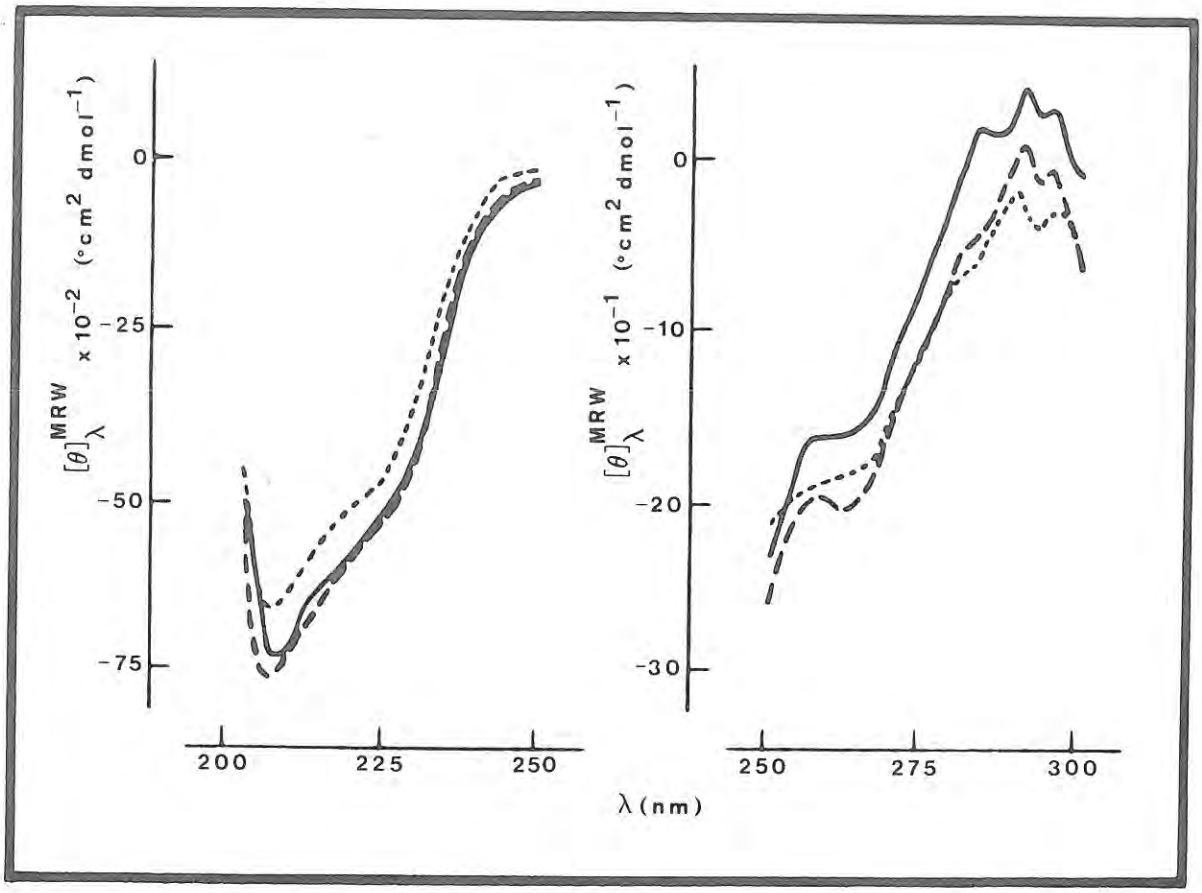


Fig. IV-4 : Circulair dichroïsme spectra van L (——), LF1 (— — —) en LH1 (----).
De spectra werden opgenomen in fosfaatbuffer pH 5,70, ionensterkte 0,05 bij 24°C.
Concentratie van de oplossingen : L : 0,052%, LF1 : 0,029% en LH1 : 0,030%. In het gebied 200-250 nm en 250-300 nm werden cellen met een lichtweg van resp. 0,01 dm en 0,05 dm gebruikt.
De gemeten ellipticiteit werd omgerekend naar $[\theta]^{MRW}_{\lambda}$ met behulp van een gemiddeld aminozuurgewicht van 112,4.

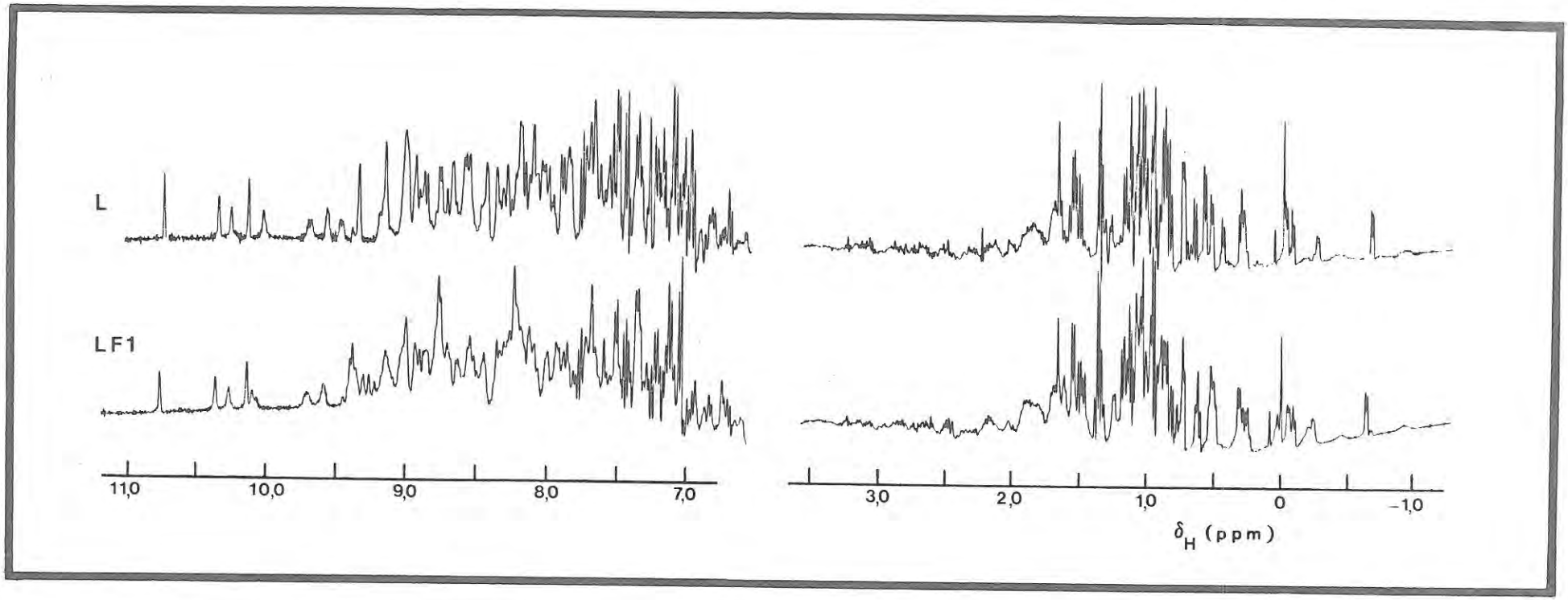


Fig. IV-5 : ^{1}H NMR spectra van L en LF1 bij 400 MHz.

De oplossingen met een concentratie van 1 mM werden bereid in H_2O pH 3,6 met 10% D_2O; de metingen gebeurden bij 37°C.

Ter verbetering van de resolutie werd het FID vermenigvuldigd met een exponentiële tijdsconstante ('resolution enhancement': RE = 0,04 s) en met een gausvormige functie ('apodization function' : AF = 0,12 s).

De positie van de signalen wordt gegeven in ppm t.o.v. de DSS-positie. Als referentie werd het Met-12 methyl signaal bij 1,66 ppm gebruikt; de positie van dit signaal is nagenoeg onafhankelijk van pH en temperatuur (Schmidt en Kuntz, 1984).

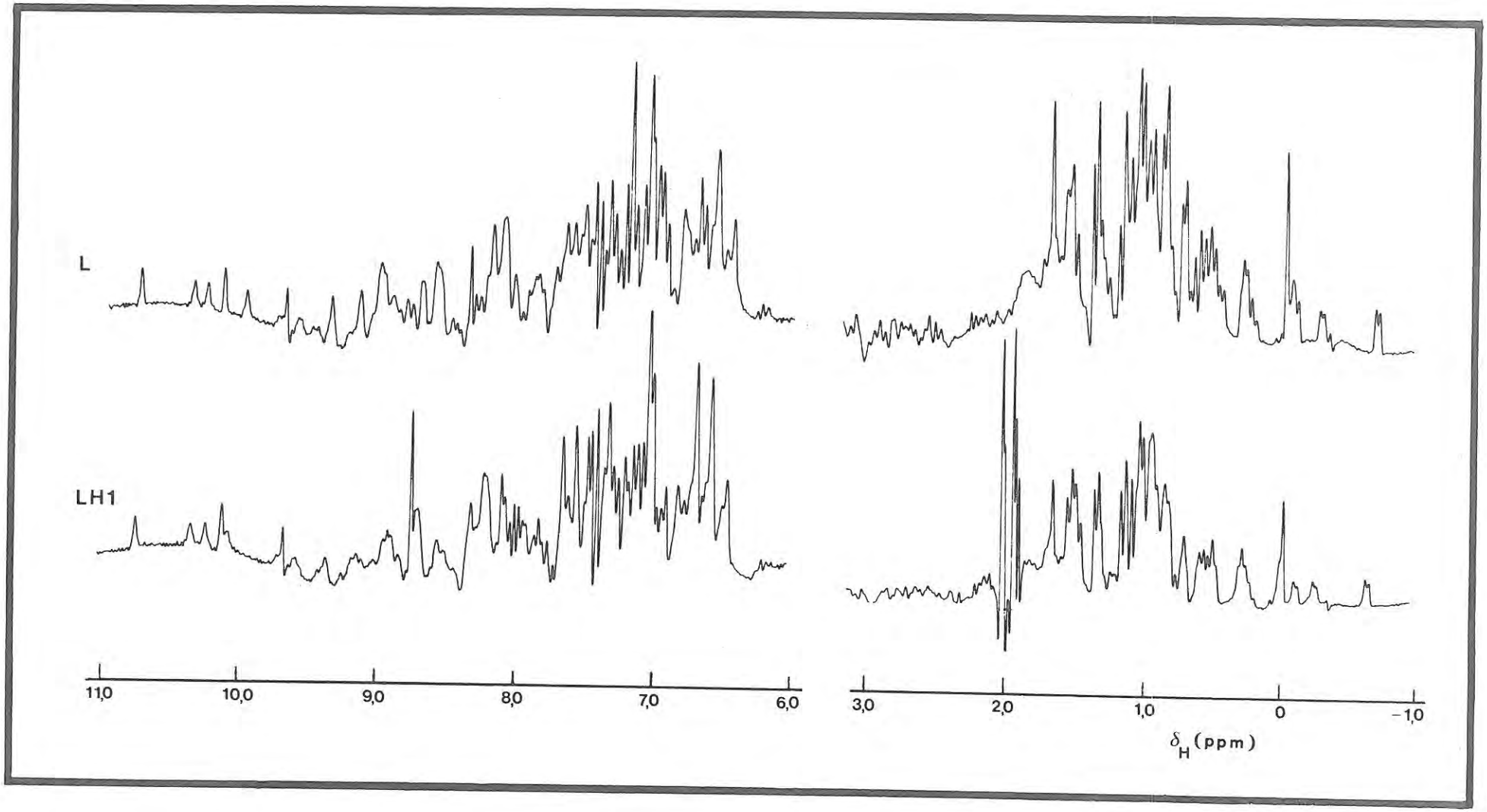


Fig. IV-6 : ^1H NMR spectra van L en LH1 bij 200 MHz.

De practische gegevens zijn dezelfde als vermeld bij Fig. IV-5.

signaal	δ_H (ppm)[1]	δ_H (ppm)		$\Delta\delta_H$ (ppm)[2]	δ_H (ppm)		$\Delta\delta_H$ (ppm)[3]
		L	LF1		L	LH1	
Leu-17 δCH_3	-0,63	-0,673	-0,635	-0,038	-0,671	-0,639	-0,032
δCH_3	-0,10	-0,075	-0,088	+0,013	-	-	-
Ile-98 γCH_3	-0,25	-0,263	-0,240	-0,023	-0,268	-0,234	-0,034
Met-105 εCH_3	0,00	-0,015	-0,003	-0,008	-0,005	-0,010	+0,005
βCH	-0,91	-0,94	-0,93	+0,010	-	-	-
Trp-28 NH	9,36	9,579	9,587	-0,008	9,595	9,580	+0,015
Trp-62 NH	10,00	10,143	10,134	+0,009	10,143	10,111	+0,032
Trp-63 NH	10,21	10,267	10,260	+0,007	10,263	10,235	+0,028
Trp-108 NH	9,98	10,038	10,100	-0,062	9,980	10,071	-0,091
Trp-111 NH	10,35	10,357	10,363	-0,006	10,362	10,349	+0,013
Trp-123 NH	10,68	10,749	10,767	-0,018	10,759	10,755	+0,004

Tabel IV-2 : Chemische verschuiving van signalen in de ^1H NMR spectra van L, LF1 en LH1 weergegeven in Fig. IV-5 en Fig. IV-6.

[1] chemische verschuiving van deze signalen bij pH 5 en 55°C (volgens Perkins en Dwek, 1980).

[2] verschil in chemische verschuiving van de signalen in LF1 t.o.v. deze in L; een negatief teken betekent een verschuiving naar lager veld.

[3] zoals [2], voor LH1 en L.

c. Bespreking

De invloed van acetylering of trifluoroacetylering van aminogroepen op de conformatie van een proteïne werd door verschillende groepen via diverse methoden onderzocht.

Nakae et al. (1972) vergeleken het CD spectrum van natief lysozyme met dit van een lysozyme derivaat waarin gemiddeld vier aminogroepen geacetyleerd zijn. Zij stelden vast dat de ellipticiteit van de aromatische banden tussen 280 en 300 nm lager is dan deze in natief lysozyme : $[\theta]_{290}$ bedraagt 100 en 70 $°cm^2\ dmol^{-1}$ voor lysozyme en het acetylderivaat resp., bij pH 7,3 en 25°C.

Imoto et al. (1976b) onderzochten de fluorescentiespectra van natief lysozyme en van een derivaat waarin 95% van de aminogroepen geacetyleerd zijn. Zij stelden vast dat in 6 M GuHCl de fluorescentiespectra samenvallen, maar dat in buffer (pH 5,5) de intensiteit voor acetyllysozyme iets lager is dan deze voor natief lysozyme. Zij besloten dat dit verschil mogelijk te wijten is aan een kleine verandering in de micro-omgeving van een of meerder tryptofaan zijketens.

In een studie van Tsetlin et al. (1979) werden de aminogroepen van neurotoxine II van *Naja naja oxiana* getrifluoroacetyleerd en werden de veranderingen in de CD en ^1H NMR spectra onderzocht.
Het CD spectrum behoudt dezelfde allure als deze voor het natieve neurotoxine alhoewel er drastische veranderingen zijn in de waarde van de ellipticiteit. Het natieve neurotoxine vertoont een maximum bij 227 nm en een minimum bij 211 nm. Door trifluoroacetylering van de zes aminogroepen daalt de ellipticiteit van +6400 naar +2130 $°cm^2\ dmol^{-1}$ en van -4260 naar -3060 $°cm^2\ dmol^{-1}$ bij 227 en 211 nm resp.. In het aromatische gebied ontstaat een negatieve band rond 240 nm en er is een afname van de intensiteit van de 250-300 nm band.
Een vergelijking van de ^1H NMR spectra (in D_2O) van natief en getrifluoroacetyleerd neurotoxine II toont dat er slechts kleine veranderingen optreden. Deze veranderingen zijn gesitueerd in het gebied rond 3 ppm, d.i. het gebied van de lysine methyleen protonen; er zijn enkele kleine verschuivingen in het methylgebied. Er zijn geen veranderingen in het aromatische gebied.
Op basis van de CD en de ^1H NMR spectra besluiten Tsetlin et al. (1979) dat de trifluoroacetylering van de aminogroepen nagenoeg geen verandering

veroorzaakt in de structuur van het proteïne en dat de resultaten van de ^{19}F NMR studie, i.v.m. de ruimtelijke structuur van het trifluoroacetylderivaat, eveneens gelden voor het natieve neurotoxine.

Door vergelijking van de CD en de ^{1}H NMR spectra van L, LF1 en LH1 kunnen we het volgende afleiden betreffende de conformatie van de lysozyme derivaten :

1. De geringe verschillen in de ^{1}H NMR spectra en in de CD spectra tussen 200 en 250 nm wijzen erop dat de conformatie van de hoofdketen van lysozyme weinig beïnvloed wordt door de acetyl- en de trifluoroacetylgroepen.
2. Enkele van de methylsignalen bij hoog veld ondergaan een lichte verschuiving in LF1 en LH1 t.o.v. de positie in de L-spectra (Tabel IV-2). De positie van deze signalen is een gevolg van naburige aromatische groepen (Perkins en Dwek, 1980). Vermits de chemische verschuiving van een atoom door ringstroomeffecten erg gevoelig is aan de ruimtelijke positie van dit atoom t.o.v. de aromatische groep, betekent dit dat er in de omgeving van bepaalde methylgroepen (b.v. Leu-17 δCH_3 en Ile-98 γCH_3) lichte veranderingen optreden welke echter zeer lokaal zijn.
3. De aromatische banden in het CD spectrum van LF1 en LH1 hebben een lagere ellipticiteit dan deze in L. Dit komt overeen met de resultaten van Nakae et al. (1972). De intensiteitsdaling is echter meer uitgesproken in LF1 en LH1, hetgeen mogelijk te wijten is aan het groter aantal gesubstitueerde aminogroepen.
   Dit betekent dat reactie op de aminogroepen van lysozyme een verandering veroorzaakt in de omgeving van een of meerdere tryptofaan zijketens.
   Uit de ^{1}H NMR spectra kunnen we afleiden dat het Trp-108 NH signaal in LF1 en LH1 verschoven is naar lager veld t.o.v. zijn positie in L. Trp-108 bevindt zich in de aktieve plaats van het enzym en interageert met Glu-35. De positie van het Trp-108 NH signaal is afhankelijk van de ionisatietoestand van Glu-35 (Cassels et al., 1978). De ionisatie van Glu-35 wordt nagenoeg niet beïnvloed door de acetylering van de aminogroepen van lysozyme (Nakae et al., 1973). Hieruit volgt dat de verschuiving van het Trp-108 NH signaal in LF1 en LH1 niet te wijten is aan een grotere ionisatie van Glu-35, maar dat deze verschuiving kan veroorzaakt worden door een lichte wijziging in de positie van de Trp-108 zijketen of van een van de naburige aminozuren.

4. De methyl en Trp NH signalen, waarvan de chemische verschuiving in L, LF1 en LH1 wordt aangegeven in Tabel IV-2, zijn afkomstig uit verschillende delen van het lysozyme molecule. Vermits slechts enkele signalen beïnvloed worden door de reactie op de aminogroepen kunnen we besluiten dat de globale conformatie van L, LF1 en LH1 dezelfde is, dat het invoeren van de acetyl- en trifluoroacetylgroepen effecten veroorzaakt ter hoogte van bepaalde zijketens, maar dat deze effecten erg lokaal zijn.
5. Alhoewel de CD spectra van LF1 en LH1 enige verschillen vertonen, zijn de ^{1}H NMR spectra van deze lysozyme derivaten erg gelijkend. Hieruit kunnen we afleiden dat de conformaties van LF1 en LH1 nagenoeg gelijk zijn.
   Dit betekent eveneens dat LF1 geen structuurveranderingen heeft ondergaan onder invloed van het ethaanthiolaat ion dat tijdens de trifluoroacetyleringsreactie gevormd wordt : een doorbraak of foutieve paring van een of meerdere disulfidebruggen leidt tot conformatieveranderingen welke duidelijk tot uiting zouden komen in deze spectra.

We kunnen dus besluiten dat het invoeren van trifluoroacetylgroepen op de zes ε-aminogroepen en van acetylgroepen op zes aminogroepen van lysozyme weinig invloed heeft op de conformatie van de hoofdketen van het enzym maar dat er in de buurt van bepaalde zijketens lichte lokale conformatieveranderingen optreden. Hieruit volgt dat de resultaten van de ^{19}F NMR studie van LF1 ook van toepassing zijn voor natief lysozyme maar dat we, bij de interpretatie van de resultaten, rekening moeten houden met lichte conformationele effecten, o.a. in de omgeving van de lysine zijketens (dit in tegenstelling tot de besluiten van Tsetlin et al. (1979)).

§ 4. Vergelijking van de aktiviteit en de temperatuurstabiliteit van LF1 en LH1 met deze van natief lysozyme

4.1. Aktiviteit t.o.v. *Micrococcus lysodeikticus*

De aktiviteit van L en van zijn derivaten LF1 en LH1 werd bepaald met *M. lysodeikticus* cellen als substraat. Het enzym breekt de β-(1,4)-glycosidische binding tussen de NAM en NAG eenheden van de bacteriële celwand, hetgeen leidt tot opklaring van de bacteriesuspensie. Dit proces kan spectrofotometrisch gevolgd worden.

De enzymatische aktiviteit van L, LF1 en LH1 werd bepaald over het pH-gebied 4-10, bij ionensterkte 0,01, 0,05 en 0,1 bij 25°C en met een enzymconcentratie van 1 µg/ml. De aktiviteit wordt uitgedrukt als de initiële snelheid van absorptiedaling bij 450 nm. Deze initiële snelheid is het gemiddelde van minstens vijf metingen voor iedere pH- en µ-waarde (Fig. IV-7).

Uit Fig. IV-7 blijkt het volgende :

- De lysozyme aktiviteit is sterk afhankelijk van de pH en de ionensterkte. Het pH-optimim ligt rond pH 8 voor µ 0,1 en µ 0,05 en rond pH 8,5 voor µ 0,01. Bij lage pH neemt de aktiviteit licht toe met stijgende ionensterkte, bij hoge pH vinden we een sterke afname van de aktiviteit naarmate de ionensterkte stijgt.
- Voor de lysozyme derivaten LF1 en LH1 stellen we een daling van de aktiviteit over het ganse pH-gebied en een verschuiving van het pH-optimum naar lagere pH vast. De aktiviteit is eveneens afhankelijk van zowel pH als µ.
- Voor LF1 ligt het pH-optimum bij pH 4,8 voor µ 0,1 en µ 0,05 en bij pH 6,2 voor µ 0,01. Boven pH 6 wordt de aktiviteit sterk geïnhibeerd door verhoging van de ionensterkte, zodat bij pH 8 en µ 0,1 of µ 0,05 er nagenoeg geen hydrolyse gebeurt.
- LH1 heeft nagenoeg geen aktiviteit bij µ 0,1. Het pH-optimum ligt bij pH 4,8 voor µ 0,05 en rond pH 6 voor µ 0,01.

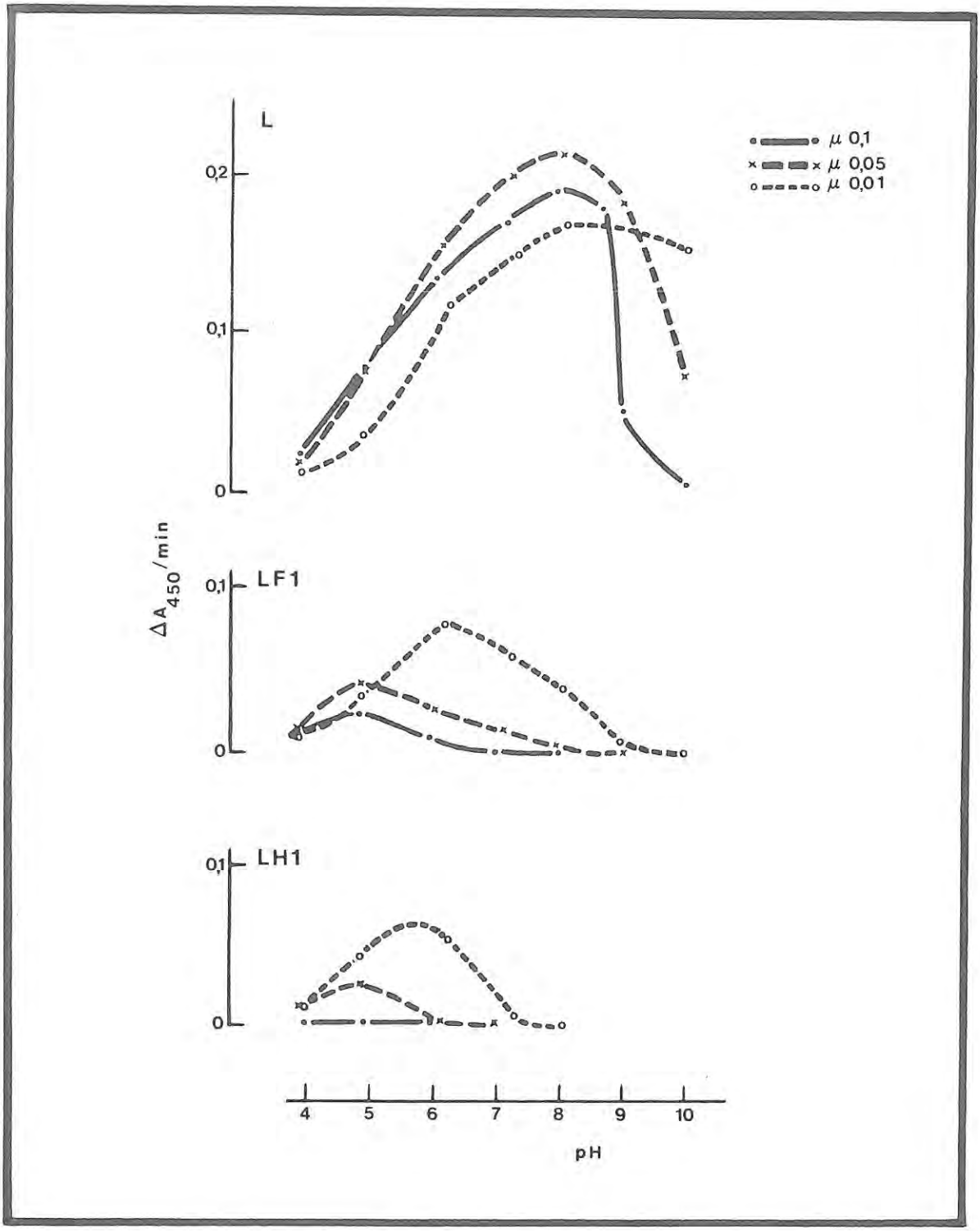


Fig. IV-7 : Initiële snelheid van de hydrolyse van *M. lysodeikticus* cellen door L, LF1 en LH1 gemeten in functie van de pH en voor ionensterkten 0,01, 0,05 en 0,1.
De enzymatische aktiviteit, voor een enzymconcentratie van 1 µg/ml, werd gemeten bij 25°C door de absorptiedaling bij 450 nm te volgen in functie van de tijd. De initiële snelheid, ΔA_{340}/min, werd bepaald uit het eerste lineaire gedeelte van dit absorptieverloop in functie van de tijd.

De invloed van de pH en de ionensterkte op de lysozyme aktiviteit werd door verschillende groepen onderzocht.

Uit een studie bij verschillende ionensterkten over het pH-gebied 3-10 besluiten Saint-Blancard et al. (1981) dat de aktiviteit van natief lysozyme t.o.v. *M. lysodeikticus* cellen bij 20°C het hoogst is bij pH 8,6 en μ 0,025. Voor μ 0,1, μ 0,05 en μ 0,01 ligt het pH-optimum bij pH 7, pH 7-8 en pH 8, resp..

In een analoge studie vinden Davies et al. (1969) pH-optima bij pH 6 en pH 8,5 voor μ 0,1 en μ 0,05 resp.. Ook zij stellen vast dat de hydrolysesnelheid sterk μ-afhankelijk is : zo leidt een verhoging van de ionensterkte van 0,04 naar 0,1 bij pH 9,2 tot een duidelijke afname van de aktiviteit, terwijl eenzelfde μ-stijging bij pH 6,2 geen significante verandering in de hydrolysesnelheid veroorzaakt.

Davies en Neuberger (1969) onderzochten de aktiviteit van een acetyllysozyme derivaat waarin alle aminogroepen en 1,4 tyrosines geacetyleerd zijn. De aktiviteit daalt t.o.v. deze van natief lysozyme en het pH-optimum ligt bij pH 4,5 en pH 5,5 voor μ 0,05 en μ 0,01 resp.. Bij μ 0,1 gebeurt er nagenoeg geen hydrolyse.

Indien de aktiviteit van lysozyme en van acetyllysozyme derivaten gemeten wordt t.o.v. $(NAG)_4$ (Davies en Neuberger, 1969) of t.o.v. glycolchitine (Yamasaki et al., 1968a) stelt men vast dat de acetylering van de aminogroepen deze aktiviteit niet beïnvloedt. Het pH-optimum voor hydrolyse van deze NAG polymeren ligt rond pH 5 en de aktiviteit is weinig gevoelig aan μ-veranderingen (Davies et al., 1969).

In de enzymatische reactie van lysozyme met *M. lysodeikticus* cellen is de eerste stap het binden van lysozyme aan het celoppervlak, hetgeen gebeurt op basis van elektrostatische interactie : lysozyme is in het beschouwde pH-gebied positief geladen en de bacteriële celwand is negatief geladen (Davies et al., 1969; Yamasaki et al., 1968b). Dit betekent dat bij hoge pH, waar lysozyme minder positief geladen is, een verhoging van de ionensterkte deze elektrostatische interactie sterk zal inhiberen. Bij lage pH is de aktiviteit veel minder gevoelig aan de ionensterkte. Vermits door acetylering de netto lading van het lysozyme molecule daalt zal, voor een bepaalde pH, de elektrostatische interactie bemoeilijkt worden en het acetyllysozyme zal een lagere aktiviteit vertonen dan natief lysozyme. De maximale aktiviteit verschuift door acetylering naar lagere μ- waarden bij constante pH en naar lagere pH bij constante μ (Davies en Neuberger, 1969).

Het aktiviteitsverloop van natief lysozyme bij μ 0,1, μ 0,05 en μ 0,01 (Fig. IV-7) is analoog aan dit beschreven door Davies et al. (1969) en door Saint-Blancard et al. (1981). Alhoewel de resultaten analoog zijn, zijn er lichte verschillen in de ligging van de pH-optima. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het gebruik van *M. lysodeikticus* cellen van verschillende oorsprong of bereidingswijze (Gorin et al., 1971).

Voor de lysozyme derivaten LF1 en LH1 vinden we een verschuiving van de pH-optima naar lagere pH en een toename van de aktiviteit met dalende ionensterkte, overeenkomstig de hierboven vermelde resultaten van Davies en Neuberger (1969).

Uit een vergelijking van de curven voor LF1 en LH1 (Fig. IV-7) blijkt dat deze, alhoewel zeer analoog, niet identisch zijn : de initiële hydrolysesnelheid is voor LF1 lichtjes hoger dan voor LH1. Bij μ 0,1 heeft LH1 nagenoeg geen aktiviteit; dit komt overeen met de bevindingen van Davies en Neuberger (1969).

Een mogelijke verklaring voor deze lichte verschillen tussen LF1 en LH1 is een verschillende beïnvloeding van de aktiviteit door een verschil in vrije aminogroep : daar waar in LF1 voornamelijk de zes ε-aminogroepen getrifluoroacetyleerd zijn, is het mogelijk dat in LH1 de α-aminogroep gedeeltelijk geacetyleerd is en dat dit verschil de enzymatische aktiviteit kan beïnvloeden. Er zijn echter geen gegevens voorhanden over een vergelijking van de lytische aktiviteit van lysozyme derivaten waarin de lysine zijketens afzonderlijk gemerkt zijn.

4.2. Temperatuurstabiliteit

Bij het opnemen van de ^1H NMR spectra van LF1 en LH1 stelden we vast dat deze derivaten een lagere temperatuurstabiliteit bezitten dan natief lysozyme. Om dit effect nader te onderzoeken werd de temperatuurdenaturatie van L, LF1 en LH1 bestudeerd d.m.v. absorptieverschilspectra.

Door het opnemen van een verschilspectrum tussen twee proteïne oplossingen van gelijke concentratie, waarbij de referentiecuvet op 25°C en de meetcuvet op hogere temperatuur wordt gethermostatiseerd, ontstaat een temperatuurverschilspectrum. De pieken in dit verschilspectrum duiden op de verandering in de omgeving van de chromofore groepen van het proteïne door de temperatuurstijging.

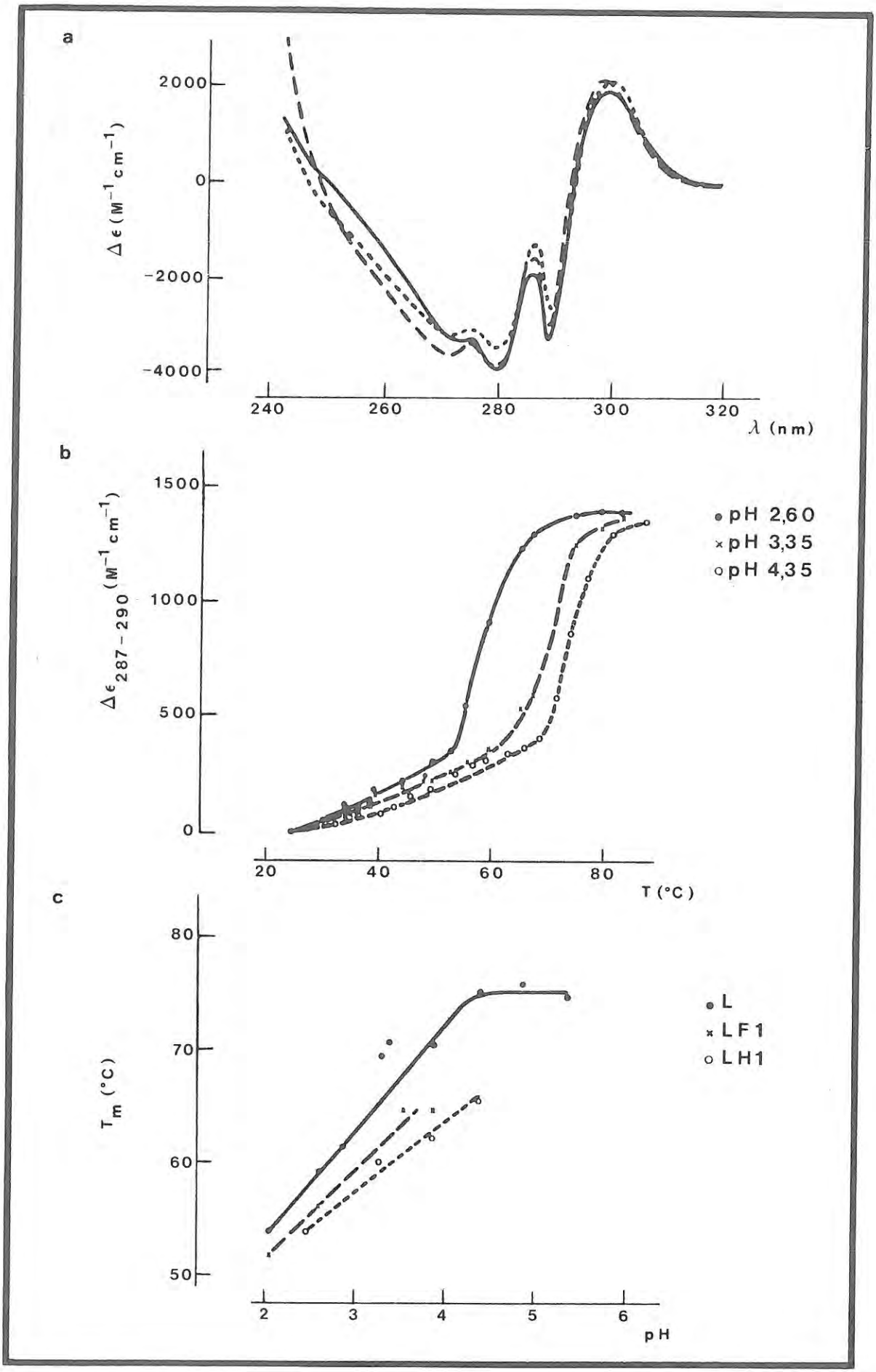
Fig. IV-8a toont temperatuurverschilspectra voor L, LF1 en LH1 bij pH 3,85 μ 0,1. De spectra geven het extinctie-verschil tussen de oplossing in de referentiecel, bij 25°C, en de oplossing in de meetcel, bij 89,2°C, 80,1°C en 81,5°C voor L, LF1 en LH1 resp.. Bij deze temperatuur zijn de proteïnen volledig temperatuur-gedenatureerd.
Deze spectra vertonen minima bij 280 nm en 290 nm en een maximum bij 300 nm. Deze banden zijn karakteristiek voor lysozyme gedenatureerd via verschillende methoden, o.a. door temperatuurverhoging (Foss, 1961), door guanidinium hydrochloride (GuHCl) en ureum (Hamaguchi en Kurono, 1967) en door pH daling (Ogasahara en Hamaguchi, 1967). De pieken bij 290 nm en 280 nm zijn te wijten aan de verandering van de omgeving van de tryptofaan zijketens door het ontvouwen van het proteïne (Hamaguchi en Kurono, 1963). De piek bij 300 nm wordt door Ananthanarayanan en Bigelow (1969) toegeschreven aan een verandering in de elektrostatische omgeving van de tryptofaan zijketens door denaturatie.

Door temperatuurverschilspectra op te nemen bij verschillende temperaturen en het extinctieverschil $\Delta\varepsilon_{287-290}$ $(=\Delta\varepsilon_{287}-\Delta\varepsilon_{290})$ uit te zetten in functie van de temperatuur, bekomt men een curve die de verandering van de tryptofaanomgeving (Imoto en Rupley, 1973), en dus het ontvouwen van het proteïne molecule, tijdens de temperatuurdenaturatie weergeeft.
Fig. IV-8b toont deze curven voor L bij pH 2,60, pH 3,35 en pH 4,35 in buffer μ 0,1. Analoge curven werden eveneens opgesteld voor LF1 en LH1, bij verschillende pH-waarden.
Het middelpunt van de overgang in deze curven (Fig. IV-8b) kan grafisch bepaald worden en de overeenkomstige temperatuur geeft de transitietempera-

Fig. IV-8 : a. Temperatuurverschilspectra voor L (—), LF1 (– –) en LH1 (---). De spectra werden opgenomen in acetaatbuffer pH 3,85 μ 0,1. De temperatuur van de referentiecel was 25°C; de temperatuur van de meetcel bedroeg 89,2°C, 80,1°C en 81,5°C voor L, LF1 en LH1, resp..
Concentratie : $4{,}2.10^{-5}$ M, $2{,}1.10^{-5}$ M en $3{,}5.10^{-5}$ M voor L, LF1 en LH1 resp..

b. Grafiek van $\Delta\varepsilon_{287-290}$ in functie van de temperatuur voor L bij pH 2,60, pH 3,35 en pH 4,35 in buffer μ 0,1.
De $\Delta\varepsilon_{287-290}$ waarden werden bepaald uit temperatuurverschilspectra welke werden opgenomen met de referentiecel bij 25°C en de meetcel bij de aangeduide temperatuur.
Het middelpunt van de overgang werd grafisch bepaald en geeft de transitietemperatuur T_m bij de beschouwde pH.
Concentratie : $4{,}8.10^{-5}$ M, $4{,}6.10^{-5}$ M en $4{,}6.10^{-5}$ M bij pH 2,58, pH 3,35 en pH 4,37 resp..

c. Transitietemperatuur T_m voor L, LF1 en LH1 in functie van de pH bij μ 0,1.
De T_m-waarden werden grafisch bepaald zoals aangegeven bij Fig. IV-8b.
LF1 en LH1 ondergaan irreversibele denaturatie bij hogere pH : LF1 slaat neer tussen 65 en 68°C en tussen 56 en 60°C bij pH 4,35 en pH 5,60 resp.; LH1 slaat neer tussen 64 en 67°C en tussen 60 en 64°C bij pH 4,85 en pH 5,60 resp..
De concentratie van de oplossingen lag tussen 2.10^{-5} M en 5.10^{-5} M.


a
2000
0
-2000
-4000
Δε (M⁻¹cm⁻¹)
240
260
280
300
320
λ (nm)
b
1500
1000
500
0
Δε 287-290 (M⁻¹cm⁻¹)
20
40
60
80
T (°C)
• pH 2,60
× pH 3,35
○ pH 4,35
c
80
70
60
50
Tm (°C)
2
3
4
5
6
pH
• L
× LF1
○ LH1

tuur T_m bij de beschouwde pH. In Fig. IV-8c worden de T_m-waarden voor L, LF1 en LH1 bij verschillende pH aangegeven. Hieruit kunnen we het volgende afleiden :

- De T_m van L is pH-afhankelijk : boven pH 4,5 bedraagt T_m 75°C, beneden pH 4,5 daalt T_m met dalende pH en bedraagt 54°C bij pH 2,0. Dit komt overeen met resultaten bekomen d.m.v. optische rotatie en viscositeitsmetingen (Sophianopoulos en Weiss, 1964) en d.m.v. optische rotatie dispersie metingen (Ogasahara en Hamaguchi, 1967).
- De T_m van LF1 en LH1 is eveneens pH-afhankelijk. Deze lysozyme derivaten ondergaan irreversibele denaturatie bij hogere pH : LF1 slaat neer tussen 65 en 68°C en tussen 56 en 60°C bij pH 4,35 en pH 5,60 resp.; LH1 slaat neer tussen 64 en 67°C en tussen 60 en 64°C bij pH 4,85 en pH 5,60 resp..

Volgens Imoto et al (1976a) wordt acetyllysozyme (met 95% van de aminogroepen geacetyleerd) beduidend sneller afgebroken door proteasen dan natief lysozyme. Guanidinering van de aminogroepen (73%) van lysozyme heeft echter geen invloed op de snelheid van deze enzymatische afbraak. De T_m-waarden voor natief, acetyl- en guanidine-lysozyme bedragen 48,0°C, 30,7°C en 47,8°C resp. bij pH 5,5 in 3 M GuHCl (Imoto et al., 1976b). Deze auteurs besluiten dat de verandering in de ladingsbalans van het enzym verantwoordelijk is voor de destabilisatie door acetylering (Imoto et al.,1976b; Imoto, 1983).

Volgens Yamasaki et al. (1968a) daarentegen is de temperatuurstabiliteit van geacetyleerd lysozyme (met 0,3-0,5 vrije aminogroepen per molecule) dezelfde als deze van natief lysozyme, bij pH 5,6.

Onze resultaten zijn duidelijk in tegenstelling met deze van Yamasaki et al. (1968a) : bij pH 5,6 (en in het pH-gebied 2-5,6) is de temperatuurstabiliteit van LF1 en LH1 beduidend lager dan deze van L. Hieruit kunnen we besluiten dat de ladingsbalans een belangrijke rol speelt bij de stabiliteit van een proteïne, en dat het verlies van de positieve lading van de aminogroepen een destabilisatie van het lysozyme molecule veroorzaakt.

§ 5. Samenvatting

Het onderzoek naar de structuur en eigenschappen van de lysozyme derivaten leidt tot volgende besluiten :

1. LF1 en LH1 bevatten één vrije aminogroep per molecule.

2. In LF1 is de vrije aminogroep voornamelijk de α-aminogroep.

3. In LH1 is de α-aminogroep mogelijk, gedeeltelijk, geacetyleerd.

4. LF1 bevat uitsluitend lysozyme monomeren : het bevat geen componenten met hoger molecuulgewicht.

5. Het invoeren van acetyl- en trifluoroacetylgroepen heeft weinig invloed op de conformatie van de hoofdketen van het enzym; in de buurt van bepaalde zijketens treden slechts lichte lokale conformatieveranderingen op.

6. De conformaties van LF1 en LH1 zijn nagenoeg gelijk.

7. De aktiviteitscurve, voor hydrolyse van *M. lysodeikticus*, van LF1 en LH1 is verschoven naar lagere pH t.o.v. deze voor natief lysozyme en de aktiviteit van de lysozyme derivaten neemt toe met dalende ionensterkte.

8. LF1 en LH1 bezitten een lagere temperatuurstabiliteit dan het natieve lysozyme over het pH-gebied 2-5,6.

9. Het verschil in aktiviteit en temperatuurstabiliteit van LF1 en LH1 t.o.v. deze van natief lysozyme kan worden toegeschreven aan het verlies van de positieve lading op de aminogroepen van het enzym.

Hoofdstuk V. ^{19}F NMR STUDIE VAN TRIFLUOROACETYLLYSOZYME

§ 1. Inleiding

De ^{19}F NMR studie werd uitgevoerd om na te gaan of fluor merkers in een proteïne, in deze studie de trifluoroacetylgroepen gebonden aan de ε-aminogroepen van lysozyme, informatie kunnen verschaffen betreffende de structuur en eigenschappen van het molecule.

Het ^{19}F NMR spectrum van LF1 en de veranderingen hierin onder invloed van pH, ionensterkte, binding van inhibitoren en concentratie werden onderzocht.

Om de resultaten van een NMR studie te kunnen interpreteren in functie van de structuur van het molecule, moeten de signalen in het NMR spectrum toegewezen worden aan de overeenkomstige atomen in het molecule.

Voor de F-signalen in LF1 werd bovendien getracht toewijzingsinformatie te bekomen door middel van een relaxatiestudie met Gd^{3+}.

§ 2. ^{19}F NMR spectra van de trifluoroacetylderivaten

2.1. Opname van de ^{19}F NMR spectra

De ^{19}F NMR spectra werden opgenomen met een 'sweep width' (SW) van 5000 Hz (Tabel II-3); een onderzoek van het ^{19}F NMR spectrum over een breder gebied toonde aan dat er geen F-signalen voorkomen buiten het beschouwde spectrale gebied.

De metingen werden uitgevoerd in buffer met ionensterkte 0,1 (tenzij anders vermeld) om de pH van de oplossingen te kontroleren : het ^{19}F NMR spectrum van LF1 is erg gevoelig aan pH-veranderingen.
De chemische verschuiving van de trifluoroacetylsignalen δ_F wordt gegeven in ppm t.o.v. de inwendige referentie 1,1,1-trifluoropropanon (TFP). TFP werd als referentie gekozen omdat het ^{19}F NMR signaal voldoende verwijderd is van de trifluoroacetyllysine signalen en dus de F-signalen in LF1 niet kan overlappen.
De metingen werden uitgevoerd bij 29,9 $\pm$ 0,1°C.

2.2. ^{19}F NMR spectra van de trifluoroacetylderivaten

Het gebruik van trifluoroacetylgroepen als merkers heeft enkele voordelen welke tot uiting komen in het ^{19}F NMR spectrum van de derivaten (Sykes en Hull, 1978) :

- de aanwezigheid van drie identieke fluoratomen geeft signalen met een grotere intensiteit;
- de fluoratomen koppelen niet met waterstofatomen.

Dit resulteert in relatief scherpe signalen in het ^{19}F NMR spectrum van trifluoroacetyl-gemerkte proteïnen.

a. ^{19}F NMR spectra van lysine derivaten

Het ^{19}F NMR spectrum van de modelverbindingen ε-TFA-Lys en α,ε-$(TFA)_2$-Lys werd onderzocht.
Het F-signaal voor ε-TFA-Lys bevindt zich bij 10,740 ppm t.o.v. TFP.
Het ^{19}F NMR spectrum van α,ε-$(TFA)_2$-Lys bevat twee signalen met gelijke in-

tensiteit : de α- en ε-trifluoroacetylgroepen resoneren resp. bij 11,037 ppm en 10,699 ppm t.o.v. TFP.
Deze waarden komen overeen met de bevindingen van Huestis en Raftery (1971).

b. ^{19}F NMR spectra van trifluoroacetyllysozyme derivaten

Het ^{19}F NMR spectrum van LF1 bij pH 2,15 wordt weergegeven in Fig. V-1. Het spectrum vertoont zes signalen van nagenoeg gelijke intensiteit, welke genummerd worden van laag naar hoog veld. Het signaal aangeduid met een asterisk is te wijten aan niet-gedialyseerd trifluoroacetaat ion : lysozyme heeft een zekere affiniteit voor acetaat ionen welke echter te verwijderen zijn door langdurig dialyseren bij pH 3 (Dahlquist en Raftery, 1968).

De F-signalen in LF1 bevinden zich bij lager veld t.o.v. ε-TFA-Lys. De signalen zijn bij pH 2,15 gespreid over een gebied van 0,35 ppm en de zes signalen voor de trifluoroacetylgroepen zijn afzonderlijk geresolveerd. Dit betekent dat, alhoewel de ε-aminogroepen van de lysine zijketens zich aan de oppervlakte van het lysozyme molecule bevinden, de trifluoracetylgroepen ieder een verschillende omgeving hebben, hetgeen weerspiegeld wordt in het verschil in resonantiepositie van deze signalen.

Het ^{19}F NMR spectrum van LF2 (Fig. V-1) vertoont signalen bij dezelfde positie als in LF1. Opvallend is dat de intensiteit van signaal **1'** hoger is dan deze van signaal **1**. Alhoewel LF2 een lagere subsitutiegraad heeft dan LF1 komen in het ^{19}F NMR spectrum van LF2 en LF1 dezelfde signalen voor. Dit betekent dat LF2 bestaat uit een mengsel van lysozyme moleculen waarin telkens de ε-aminogroep van een verschillend lysine niet getrifluoroacetyleerd is.

In het ^{19}F NMR spectrum van LF3 (Fig. V-1) is signaal **6** nagenoeg afwezig, de intensiteit van signaal **3** is lager dan deze van de overige signalen en de intensiteit van signaal **1'** is verder toegenomen t.o.v. deze voor signaal **1**.

Fig. V-1 : ^{19}F NMR spectra van LF1, LF2, LF3, LHF1 en LHF2 bij pH 2,15 μ 0,1 29,9 ± 0,1°C.
De chemische verschuiving wordt aangegeven in ppm t.o.v. de inwendige referentie TFP.
Concentratie van de oplossingen : 0,1-0,2 mM.

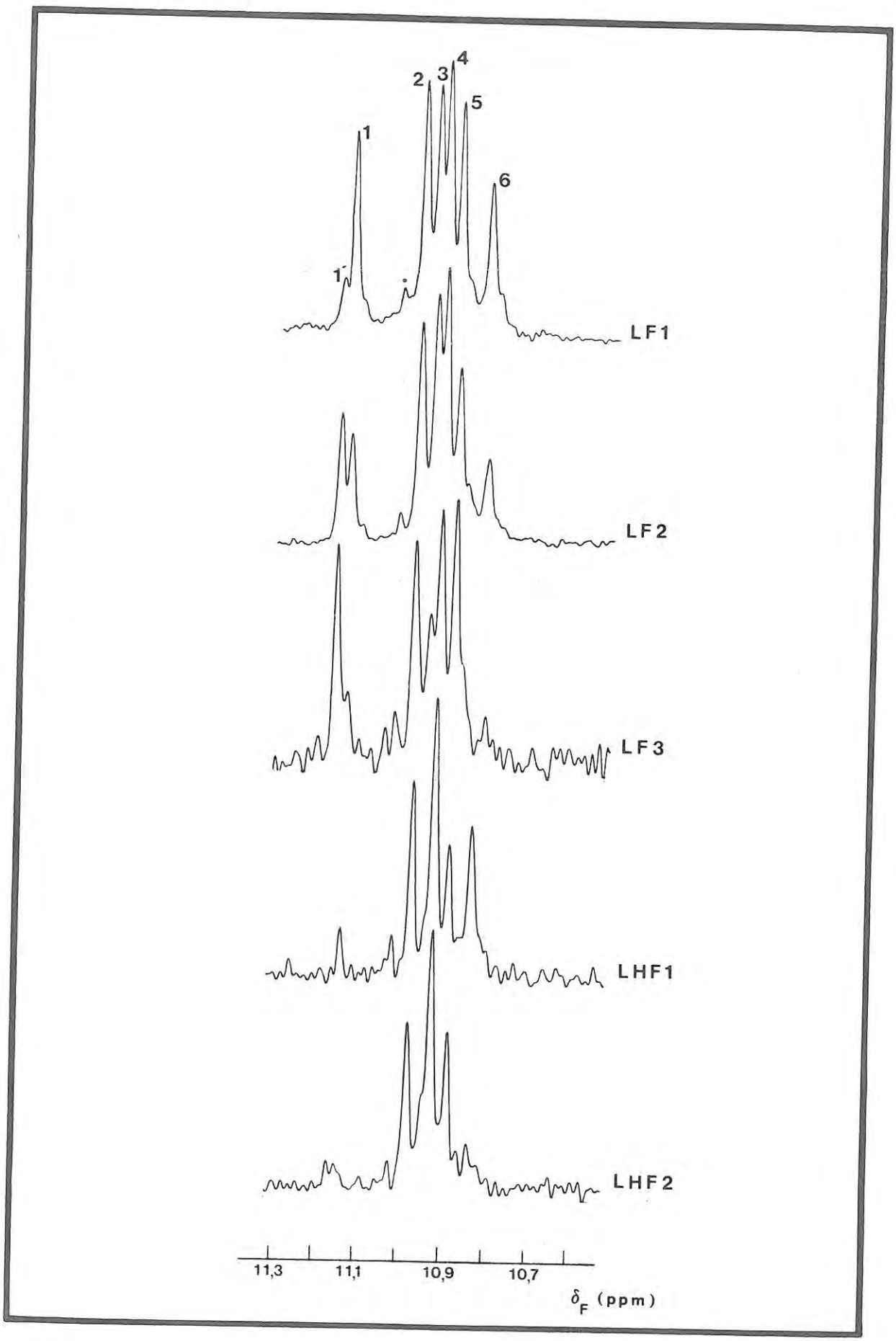


Fig. V-1.

c. ^{19}F NMR spectra van acetyl-trifluoroacetyllysozyme derivaten

De lysozyme derivaten LHF1 en LHF2 werden bereid door eerst een gedeelte van de aminogroepen te acetyleren en daarna een trifluoroacetylering uit te voeren (Hoofdstuk III, § 2.2.)

In het ^{19}F NMR spectrum van LHF1 (Fig. V-1) komen de signalen 1' en 3 niet voor; de signalen 2, 4, 5 en 6 hebben een verschilende intensiteit. Het ^{19}F NMR spectrum van LHF2 (Fig. V-1) bevat alleen signalen 2, 4 en 5.

Uit een vergelijking van de spectra in Fig. V-1 kunnen we het volgende afleiden :

- De derivaten LF2 en LF3, welke in de PAGE (Fig. III-4) een enkele vlek geven, zijn een mengsel van lysozyme moleculen waarin telkens de ε-aminogroep van een verschillend lysine niet getrifluoroacetyleerd is;
- In LF3 zijn signalen 6 en 3 minder intens, hetgeen een aanduiding is dat de betreffende aminogroepen minder reactief zijn;
- Voor de LHF derivaten zou men verwachten dat de meest reactieve lysines geacetyleerd worden en dat het ^{19}F NMR spectrum van LHF1 en LHF2 voornamelijk signalen 6 en 3 bevat. Dit is echter niet het geval : LHF1 bevat nagenoeg dezelfde signalen als LF1, met uitzondering van signaal 3.

We moeten hier echter opmerken dat de relatieve intensiteit van de signalen in het ^{19}F NMR spectrum niet noodzakelijk een verschil in reactiviteit van de aminogroepen weerspiegelt. Bij de zuivering op ionenwisselaar elueren de derivaten met lage substitutiegraad in een brede piek, waarvan de topfractie werd verzameld (Fig. III-4, Fig. III-7).
Uit de ^{19}F NMR spectra in Fig. V-1 kunnen we afleiden dat LF2 en LF3 een mengsel zijn van lysozyme moleculen waarin de vrije aminogroepen in verschillende combinaties voorkomen.
De verdere ^{19}F NMR studie werd uitgevoerd op LF1.

§ 3. Invloed van pH en ionensterkte op het ^{19}F NMR spectrum van LF1

3.1. pH-studie

a. LF1

De invloed van de pH over het pH-gebied 2-5,6 op het ^{19}F NMR spectrum werd nagegaan voor LF1 opgelost in buffer μ 0,1. Er werden geen metingen uitgevoerd boven pH 5,6 omdat lysozyme bij hogere pH zelf-associatie ondergaat (Sophianopoulos en Van Holde, 1964).

Fig. V-2 toont het spectrum voor LF1 bij pH 2,15 en bij pH 5,60. In Fig. V-3 wordt de chemische verschuiving van de F-signalen in functie van de pH weergegeven. Hieruit blijkt dat bij overgang van pH 2 naar pH 5,6:

- signaal 2 een uitgesproken verschuiving (0,26 ppm) naar lager veld ondergaat;
- signalen 1', 1 en 3 resp. 0,040 ppm, 0,041 ppm en 0,045 ppm naar lager veld verschuiven;
- het effect op signalen 1' en 1 parallel verloopt;
- signalen 4 en 5 een lichte verschuiving naar hoger veld ondergaan;
- signaal 6 bij hogere pH een verschuiving naar lager veld ondervindt.

b. Des-Leu-129-LF1

Het ^{19}F NMR spectrum van des-Leu-129-LF1 bij pH 5,60 wordt weergegeven in Fig. V-2. In Fig. V-4 wordt de chemische verschuiving van de F-signalen in des-Leu-129-LF1 in functie van de pH weergegeven.

Door een vergelijking van de spectra en de pH-curven van LF1 en van des-Leu-129-LF1 (Fig. V-2, Fig. V-3, Fig. V-4) kunnen we het volgende afleiden :

- in het des-Leu-129-LF1 spectrum is de intensiteit van signaal 2 lager en is er een nieuw signaal, aangeduid als 2', aanwezig;
- de pH-curven van de gemeenschappelijke signalen in beide lysozyme derivaten verlopen zeer analoog;
- de pH-curve van signaal 2' is duidelijk afwijkend van deze van signaal 2.

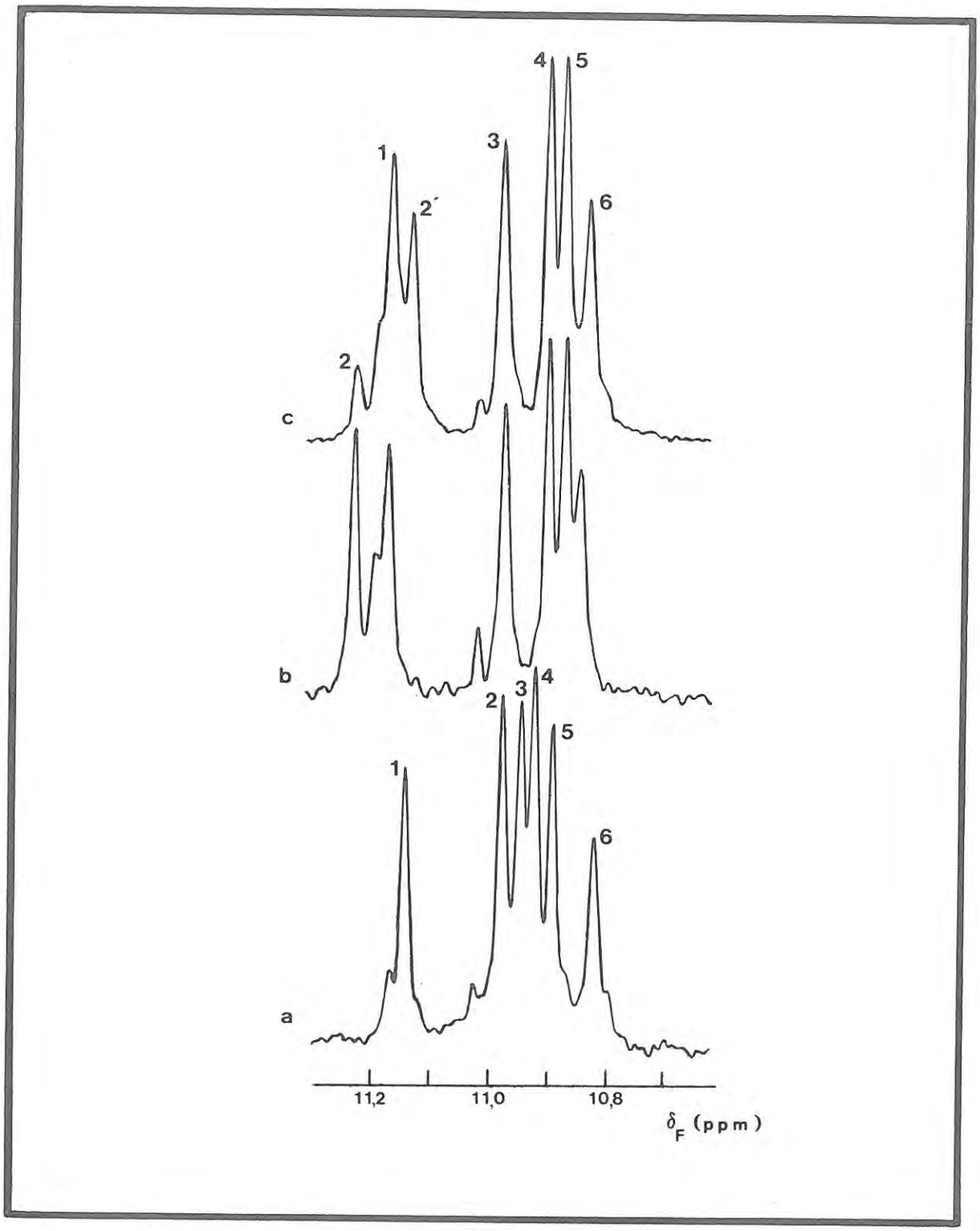


Fig. V-2 : ^{19}F NMR spectra van LF1 bij pH 2,15 (a) en pH 5,60 (b) en van des-Leu-129-LF1 bij pH 5,60 (c), μ 0,1, 29,9 $\pm$ 0,1°C. Concentratie van de oplossingen : 0,1-0,2 mM.

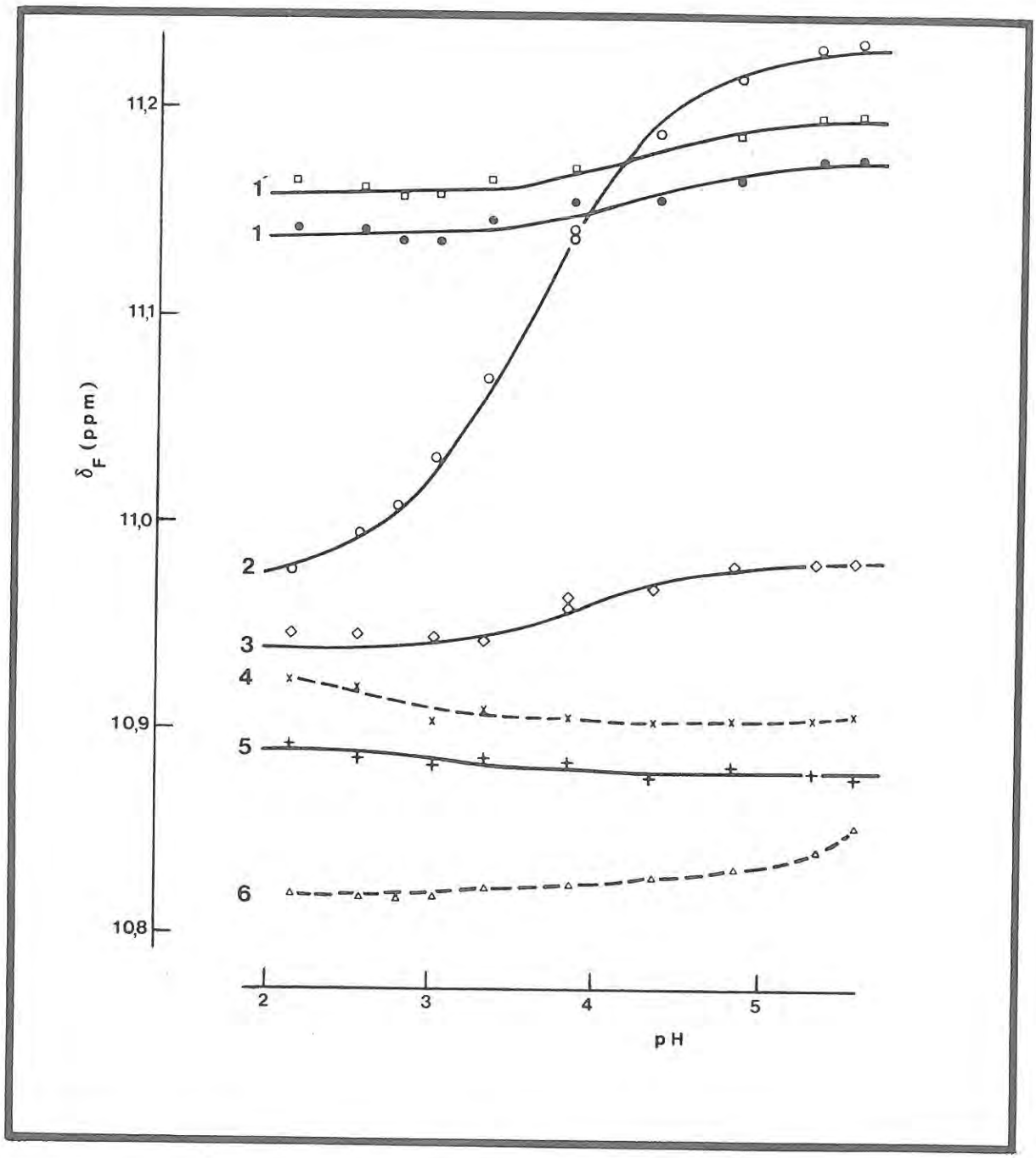


Fig. V-3 : Verschuiving van de F-signalen in LF1 in functie van de pH, μ 0,1 29,9 ± 0,1°C.
De curven in volle lijn geven het verloop van δ_F, voor het beschouwde signaal, berekend op basis van de pK_a, δ_{AH} en δ_A waarden in Tabel V-1.
De curven in onderbroken lijn verbinden de experimentele punten.
De concentratie van de oplossingen varieerde van 0,157 mM tot 0,222 mM.

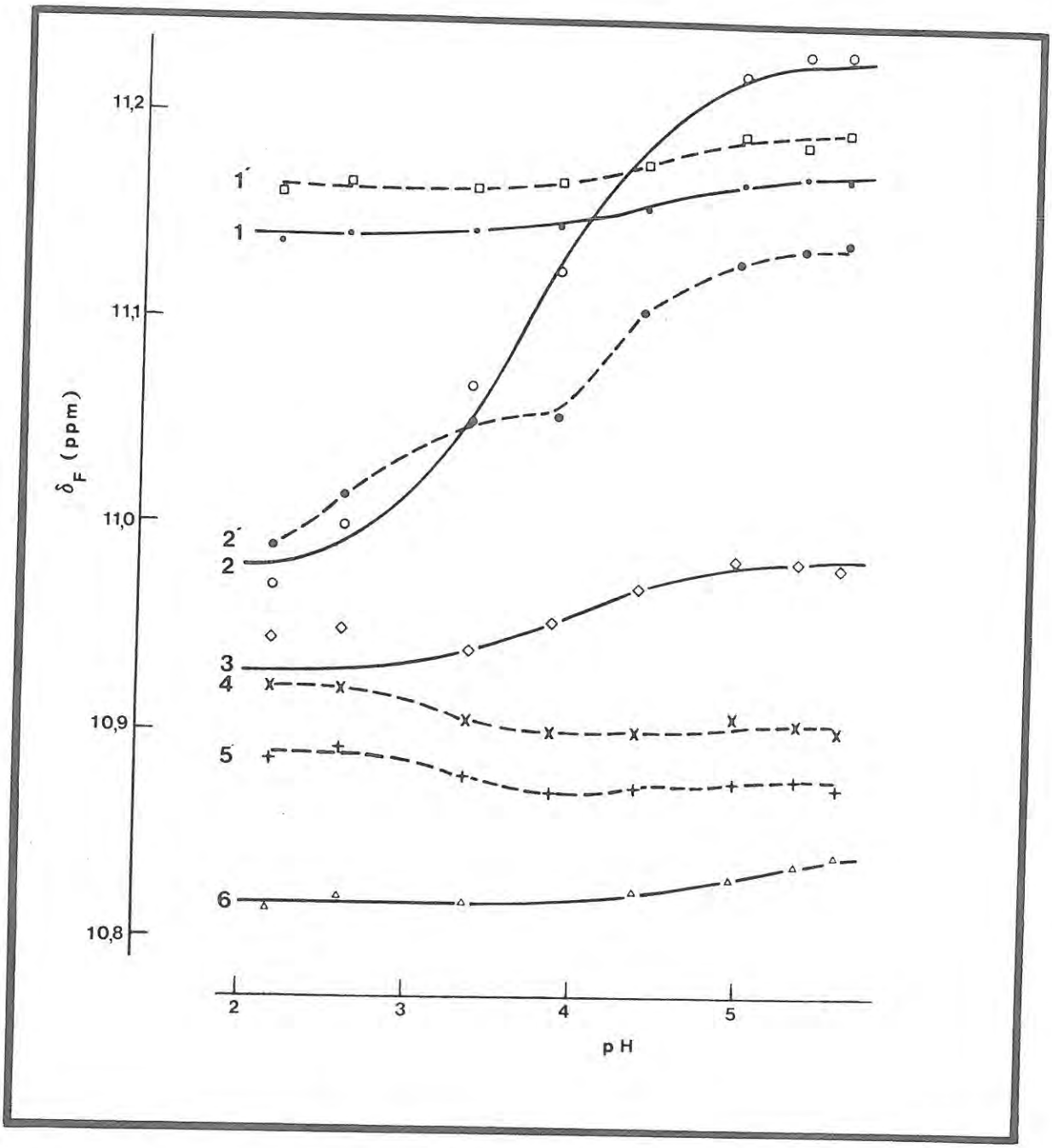


Fig. V-4 : Verschuiving van de F-signalen in des-Leu-129-LF1 in functie van de pH, μ 0,1 29,9 ± 0,1°C.

De curven in volle lijn geven het verloop van δ_F, voor het beschouwde signaal, berekend op basis van de pK_a, δ_{AH} en δ_A waarden in Tabel V-1.

De curven in onderbroken lijn verbinden de experimentele punten.

De concentratie van de oplossingen varieerde van 0,10 mM tot 0,18 mM.

c. Analyse van de pH-curven

De pH-afhankelijkheid van de ^{19}F chemische verschuiving werd geanalyseerd d.m.v. 'curve fitting' aan een niet-lineaire functie (Hoofdstuk II, § 10.1.b). De analyse gebeurde op basis van de ionisatie van één naburige groep. Deze analyse bepaalt drie parameters namelijk :

K_a : ionisatieconstante;

δ_{AH} : de chemische verschuiving van het F-signaal overeenkomend met de geprotoneerde vorm van de naburige ioniserende groep;

δ_A : de chemische verschuiving van het F-signaal overeenkomend met de niet-geprotoneerde vorm van de naburige ioniserende groep.

In Tabel V-1 worden deze parameters en $\Delta\delta$, d.i. $\delta_{AH}-\delta_A$, weergegeven voor een aantal signalen in LF1 en des-Leu-129-LF1. Deze parameters werden gebruikt voor de berekening van de pH-curven welke in Fig. V-3 en Fig. V-4 in volle lijn zijn weergegeven. Voor signalen **4** en **6** in LF1 en signalen **1'**, **2'**, **4** en **5** in des-Leu-129-LF1 gaf deze analyse geen significante oplossing.

signaal	pK_a [1]	δ_{AH} (ppm) [2]	δ_A (ppm) [3]	$\Delta\delta$ (ppm) [4]
LF1				
1'	4,25 ± 0,7	11,158 ± 0,003	11,198 ± 0,004	- 0,040
1	4,30 ± 0,7	11,137 ± 0,004	11,178 ± 0,007	- 0,041
2	3,61 ± 0,04	10,969 ± 0,005	11,233 ± 0,004	- 0,264
3	3,97 ± 0,3	10,937 ± 0,006	10,982 ± 0,006	- 0,045
5	3,04 ± 0,6	10,891 ± 0,003	10,878 ± 0,001	+ 0,013
des-Leu-129-LF1				
1	4,41 ± 0,3	11,141 ± 0,003	11,175 ± 0,003	- 0,034
2	3,69 ± 0,12	10,974 ± 0,013	11,231 ± 0,010	- 0,257
3	3,95 ± 0,3	10,929 ± 0,009	10,987 ± 0,003	- 0,058
6	5,0 ± 0,7	10,818 ± 0,003	10,847 ± 0,006	- 0,029

Tabel V-1 : Parameters bepaald door analyse van de pH-afhankelijkheid van de ^{19}F chemische verschuivingen d.m.v. 'curve fitting' aan een niet-lineaire functie.

[1] pK_a : negatief logaritme van de ionisatieconstante.

[2] δ_{AH} : chemische verschuiving van het F-signaal overeenkomend met de geprotoneerde vorm van de naburige ioniserende groep.

[3] δ_A : chemische verschuiving van het F-signaal overeenkomend met de niet-geprotoneerde vorm van de naburige ioniserende groep.

[4] $\Delta\delta = \delta_{AH} - \delta_A$: een negatief teken betekent dat het signaal naar lager veld verschuift bij pH-stijging.

3.2. μ-studie

De invloed van de ionensterkte op het LF1 spectrum werd nagegaan door LF1, in buffer μ 0,05, te titreren met 3,97 M NaCl oplossing in dezelfde buffer. Het verloop van de chemische verschuiving van de F-signalen in functie van de ionensterkte bij pH 2,15, pH 3,55 en pH 5,60 wordt gegeven in Fig. V-5. In Tabel V-2 wordt voor signaal 2 de chemische verschuiving bij bepaalde pH- en μ-waarden aangegeven en de Δδ-waarden voor μ-verhoging bij pH 2,15, pH 3,55 en pH 5,60 en voor pH-stijging bij μ 0,05, μ 0,1 en μ 0,55.

Bij hogere ionensterkte wordt LF1 minder oplosbaar; dit effect is het sterkst bij lage pH : bij pH 2,15 is nagenoeg alle proteïne neergeslagen bij μ 0,7.

Fig. V-5 en Tabel V-2 leren ons het volgende :

1. Bij pH 2,15 ondergaan de F-signalen lichte verschuivingen; het meest uitgesproken zijn deze voor signalen **1** en **5** welke resp. 0,020 ppm naar hoger veld en 0,023 ppm naar lager veld verschuiven bij overgang van μ 0,05 naar μ 0,7.
2. Bij pH 3,55 ondergaat signaal **2** een verschuiving van 0,054 ppm naar hoger veld bij overgang van μ 0,05 naar μ 0,55. De overige signalen ondergaan verschuivingen variërend van 0,005 ppm tot 0,028 ppm. Boven μ 0,55 wordt LF1 minder oplosbaar, hetgeen gepaard gaat met een verschuiving van de F-signalen naar hoger veld.
3. Bij pH 5,60 is het grootste effect merkbaar op signalen **1** en **2**, namelijk een verschuiving van 0,039 ppm naar hoger veld bij overgang van μ 0,05 naar μ 1,0.
4. Bij verhoging van de ionensterkte ondergaan signalen **1'**, **1** en **2** een verschuiving naar hoger veld; signalen **3**, **4** en **5** verschuiven naar lager veld; signaal **6** ondergaat slechts een licht effect bij pH 2,15 en pH 3,55 en verschuift naar hoger veld bij pH 5,60.

Fig. V-5 : Verschuiving van de F-signalen in LF1 bij pH 2,15 (a), pH 3,55 (b) en pH 5,60 (c) in functie van de ionensterkte, door toevoeging van 3,97 M NaCl oplossing in dezelfde buffer.

Concentratie van de LF1 oplossingen (voor de NaCl-toevoegingen) : 0,178 mM, 0,176 mM en 0,176 mM bij pH 2,15, pH 3,55 en pH 5,60 resp..

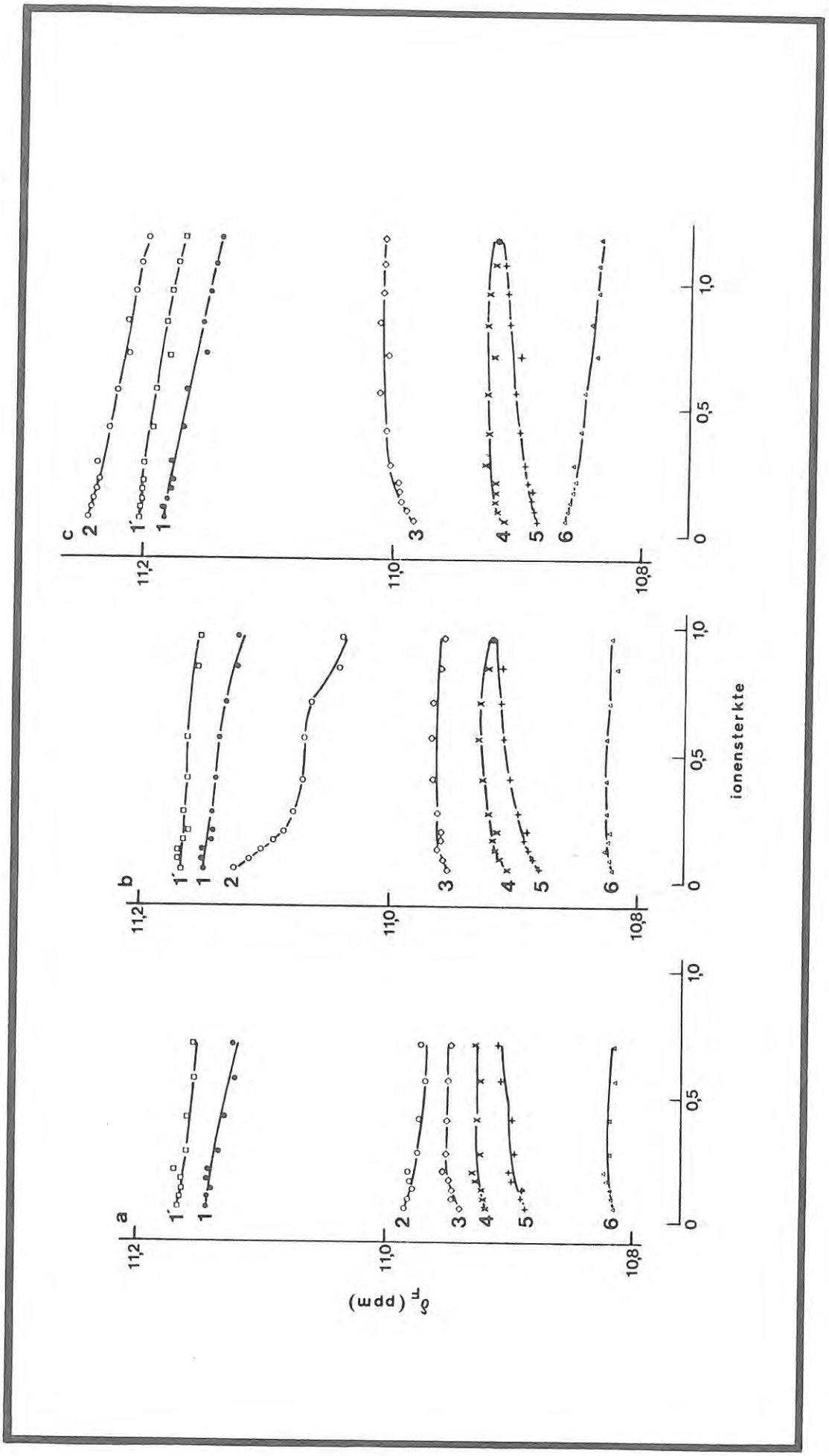


Fig. V-5.

pH	δ_F (ppm)			$\Delta\delta_F$ (ppm) [2]
	μ 0,05	μ 0,1	μ 0,55	
2,15	10,983	10,979 (10,969)[1]	10,967	+ 0,016
3,55	11,123	11,009 (10,992)[1]	11,069	+ 0,054
5,60	11,241	11,239 (11,233)[1]	11,221	+ 0,020
$\Delta\delta_F$ (ppm) [3]	- 0,258	- 0,260 (- 0,264)[1]	- 0,254	

Tabel V-2 : Chemische verschuiving van signaal **2** voor verschillende pH- en μ-waarden. De δ_F-waarden werden afgeleid uit de μ-titratie bij de aangegeven pH (Fig. V-5).

[1] δ_F uit de berekende pH-curve bij μ 0,1 (Fig. V-3).

[2] verschil in chemische verschuiving tussen μ 0,55 en μ 0,05; een positief teken betekent een verschuiving naar hoger veld bij de hogere μ-waarde.

[3] verschil in chemische verschuiving tussen pH 2,15 en pH 5,60; een negatief teken betekent een verschuiving naar lager veld bij hogere pH.

3.3. Bespreking

In het pH-gebied 2-5,6 zal de positie van de F-signalen voornamelijk beïnvloed worden door de ionisatie van naburige carboxylgroepen :

- alleen deze groepen ioniseren in het beschouwde pH-gebied;
- lysozyme ondergaat geen significante conformatieveranderingen tussen pH 2 en 11, in verdunde zoutoplossing en bij gematigde temperaturen (Imoto et al., 1972).

Uit het verschil in pH-afhankelijkheid van de F-signalen kunnen we afleiden dat de omgeving van de trifluoroacetyllysine groepen verschillend is.

De analogie van de pH-curven voor LF1 en des-Leu-129-LF1 betekent dat het afsplitsen van het C-eindstandige Leu-129 weinig invloed heeft op de conformatie van het enzym. Dit werd eveneens vastgesteld door Gerken et al. (1982) op basis van ^{13}C NMR metingen van gemethyleerde lysines in lysozyme.

Het ^{19}F NMR spectrum van des-Leu-129-LF1 vertoont enkele verschillen met dit van LF1 (Fig. V-2) op basis waarvan we het volgende kunnen afleiden:

1. Des-Leu-129-LF1 bestaat uit LF1 moleculen die een gedeeltelijke enzymatische afbraak door CPA ondergaan hebben : signaal **2** in het des-Leu-129-LF1 spectrum is afkomstig van LF1 moleculen waarin Leu-129 niet werd afgesplitst; signaal **2'** is te wijten aan de moleculen waarin het C-eindstandige aminozuur wel werd afgesplitst.
2. Alleen signaal **2** in LF1 wordt beïnvloed door het afsplitsen van Leu-129; het afsplitsen van het C-eindstandige aminozuur heeft weinig invloed op de omgeving van de overige trifluoroacetylgroepen.
3. Uit de kristalstudie van lysozyme (Blake et al., 1967a) blijkt dat er in natief lysozyme een zoutbrug gevormd wordt tussen de α-carboxylgroep en de ε-aminogroep van Lys-13. De overige ε-aminogroepen zijn minstens 1,6 nm van de α-carboxylgroep verwijderd (Imoto et al., 1972). Hieruit volgt dat de trifluoroacetylgroep gebonden aan de ε-aminogroep van Lys-13 zich in de nabije omgeving van de α-carboxylgroep moet bevinden en dat de chemische verschuiving van de Lys-13 trifluoroacetylgroep zal beïnvloed worden door de afsplitsing van Leu-129.

Hieruit kunnen we besluiten dat we signaal **2** in het ^{19}F NMR spectrum van LF1 kunnen toewijzen aan de Lys-13 trifluoroacetylgroep.

Het kristalmodel van natief lysozyme toont dat de ε-aminogroep van Lys-13 omgeven wordt door twee carboxylgroepen, namelijk deze van Leu-129 en van Asp-18, en zich dichter bij de α-carboxylgroep bevindt. Betreffende de verschuiving van signaal 2 onder invloed van pH-veranderingen (Fig. V-3) kunnen we het volgende afleiden :

1. Bij pH-verhoging zullen de carboxylgroepen van Leu-129 en Asp-18 ioniseren en zal de chemische verschuiving van de Lys-13 fluoratomen beïnvloed worden door de naburige negatieve ladingen.
2. De verandering in chemische verschuiving wordt voornamelijk veroorzaakt door de ionisatie van één van beide carboxylgroepen : de chemische verschuiving in functie van de pH kan 'gefit' worden aan een titratiecurve met pK_a 3,6 (Fig. V-3, Tabel V-1).
3. Signaal 2' in des-Leu-129-LF1 (Fig. V-4) vertoont een andere pH-curve dan signaal 2 in LF1 : de chemische verschuiving van signaal 2' kan niet 'gefit' worden aan een titratiecurve voor één ionisatie, maar weerspiegelt de nabijheid van meerdere ioniseerbare groepen met een pK_a verschillend van deze voor signaal 2.
   Door het afsplitsen van het C-eindstandige Leu-129 wordt een nieuwe α-carboxylgroep, namelijk deze van Arg-128, gevormd en wordt de Lys-13 trifluoroacetylgroep omgeven door de carboxylgroepen van Arg-128 en Asp-18.

   Dit betekent dat de verschuiving van signaal 2 in LF1 veroorzaakt wordt door de ionisatie van de Leu-129 α-carboxylgroep met pK_a 3,6.

4. In een ^{13}C NMR studie van de carboxylgroepen in natief lysozyme bepaalden Shindo et al. (1978) een pK_a 3,1 voor de α-carboxylgroep. Zij stelden eveneens vast dat het omvormen van 4,7 lysines in homoarginyl groepen geen invloed heeft op de pK_a van de α-carboxylgroep en besloten dat er in oplossing geen zoutbrug gevormd wordt tussen Lys-13 en Leu-129.
   Op basis van ^{13}C NMR metingen van gemethyleerde lysines bepaalden Gerken et al. (1982) een pK_a 9,8 voor Lys-13, welke daalde tot pK_a 9,3 na afsplitsen van Leu-129. Deze auteurs besluiten dat er een interactie bestaat tussen Leu-129 en Lys-13 welke resulteert in de verhoging van de pK_a van Lys-13.

   Onze metingen tonen aan dat de pK_a van Leu-129 beïnvloed wordt door de interactie met Lys-13 : de pK_a 3,1 voor Leu-129 in natief lysozyme

(Shindo et al. 1978) stijgt tot pK_a 3,6 door trifluoroacetylering van de ε-aminogroep van Lys-13.
Dit betekent dat er ook in oplossing een interactie bestaat tussen Leu-129 en Lys-13 waardoor de pK_a van de α-carboxylgroep lager en de pK_a van de aminogroep hoger is dan in afwezigheid van de interactie.

Het ^{19}F NMR spectrum van LF1 wordt eveneens beïnvloed door verandering van de ionensterkte :

1. Het μ-effect is het grootst voor signaal **2** bij pH 3,55; deze pH is nagenoeg gelijk aan de pK_a van de ioniserende groep, zodat een hogere zoutconcentratie het ionisatie-evenwicht kan beïnvloeden door competitie tussen protonen en natriumionen.
2. Het verschil in chemische verschuiving tussen pH 2,15 en pH 5,60 is voor signaal **2** niet afhankelijk van de ionensterkte (Tabel V-2) : alhoewel de ionensterkte de positie van het F-signaal licht beïnvloedt, veroorzaakt de ionisatie van Leu-129 eenzelfde chemische verschuiving voor signaal **2** bij μ 0,05, μ 0,1 en μ 0,55.
3. Bij hogere ionensterkte verschuift signaal **2** naar hoger veld; dit is een verschuiving in dezelfde richting als bij pH-daling.
Een verhoging van de ionensterkte veroorzaakt lichte verschuivingen voor de overige signalen; deze effecten verlopen eveneens in dezelfde richting van deze veroorzaakt door pH-daling (Fig. V-3, Fig. V-5).
Een uitzondering hierbij is signaal **3** dat zowel door pH-stijging als door μ-stijging naar lager veld verschuift.

Alhoewel er enige analogie is tussen de pH- en de μ-effecten op de F-signalen is een vergelijking van beide fenomenen niet mogelijk. Bij pH-veranderingen wordt de verschuiving van de F-signalen voornamelijk bepaald door de ionisatietoestand van de naburige carboxylgroepen. Een verhoging van de ionensterkte beïnvloedt de omgeving van de fluoratomen door een zouteffect op de ioniseerbare groepen van het proteïne. Dit effect is moeilijk op te splitsen in bijdragen van individuele groepen. Bij hogere ionensterkte wordt LF1 minder oplosbaar; de invloed van de neerslagvorming op de omgeving van de fluoratomen is niet gekend.

§ 4. Binding van inhibitoren aan LF1

4.1. Invloed van NAG en van $(NAG)_3$ op het ^{19}F NMR spectrum van LF1

De binding van NAG en van $(NAG)_3$ aan LF1 werd bestudeerd bij pH 5,60 omdat de associatie van deze NAG oligomeren aan lysozyme het sterkst is tussen pH 5 en pH 6 (Banerjee en Rupley, 1973).

LF1 in acetaatbuffer pH 5,60 μ 0,1 werd getitreerd met oplossingen van NAG en van $(NAG)_3$ in dezelfde buffer. Na iedere toevoeging van de inhibitoroplossing werd het ^{19}F NMR spectrum opgenomen. In Fig. V-6 worden de chemische verschuiving van de F-signalen in functie van de molaire verhouding van inhibitor t.o.v. LF1, en spectra bij enkele molaire verhoudingen weergegeven.

Fig V-6 leert ons het volgende :

1. NAG heeft weinig invloed op het ^{19}F NMR spectrum van LF1 (Fig. V-6a): er gebeurt nagenoeg geen verschuiving van de signalen, behalve een lichte verschuiving van signaal **6** (+ 0,023 ppm) en van signaal **3** (+ 0,010 ppm).
2. De binding van $(NAG)_3$ aan LF1 (Fig. V-6b) veroorzaakt een afname van de intensiteit van signaal **1** en een toename van de intensiteit bij 11,238 ppm; signaal **6** ondervindt een verschuiving naar hoger veld (0,040 ppm); signaal **3** ondergaat een analoge verschuiving (+ 0,013 ppm) als bij toevoeging van NAG (Fig. V-6a).

4.2. Bespreking

De binding van $(NAG)_3$ aan LF1 beïnvloedt signaal **1** : de intensiteit van het signaal bij 11,181 ppm neemt af, en er is een toename van de intensiteit bij 11,238 ppm d.i. de positie van signaal **2**. We zien dus de afzonderlijke positie van signaal **1** in LF1 moleculen welke geen $(NAG)_3$ gebonden hebben (d.i. bij 11,181 ppm) en in LF1 moleculen welke wel $(NAG)_3$ gebonden hebben (d.i. bij 11,238 ppm). Dit betekent dat deze trifluoroacetylgroep een trage uitwisseling (op NMR-schaal) ondergaat tussen de gebonden en de niet-gebonden situatie.

De binding van $(NAG)_3$ aan LF1 beïnvloedt eveneens signaal **6**. Dit signaal ondervindt een geleidelijke verschuiving van de positie in het vrije LF1 (10,857 ppm) naar de positie in het LF1-$(NAG)_3$ complex (10,819 ppm).

Fig. V-6 : Invloed van NAG (a) en $(NAG)_3$ (b) op het ^{19}F NMR spectrum van LF1 bij pH 5,60 μ 0,1 29,9 $\pm$ 0,1°C.

De grafieken geven de chemische verschuiving van de F-signalen in functie van de molaire verhouding van inhibitor t.o.v. LF1.
De cijfers bij de spectra duiden de molaire inhibitor / LF1 verhouding aan.
De titraties werden uitgevoerd door toevoegen van 0,867 M NAG oplossing aan 500 µl 0,156 mM LF1 en van 2,549 mM $(NAG)_3$ oplossing aan 500 µl 0,134 mM LF1.

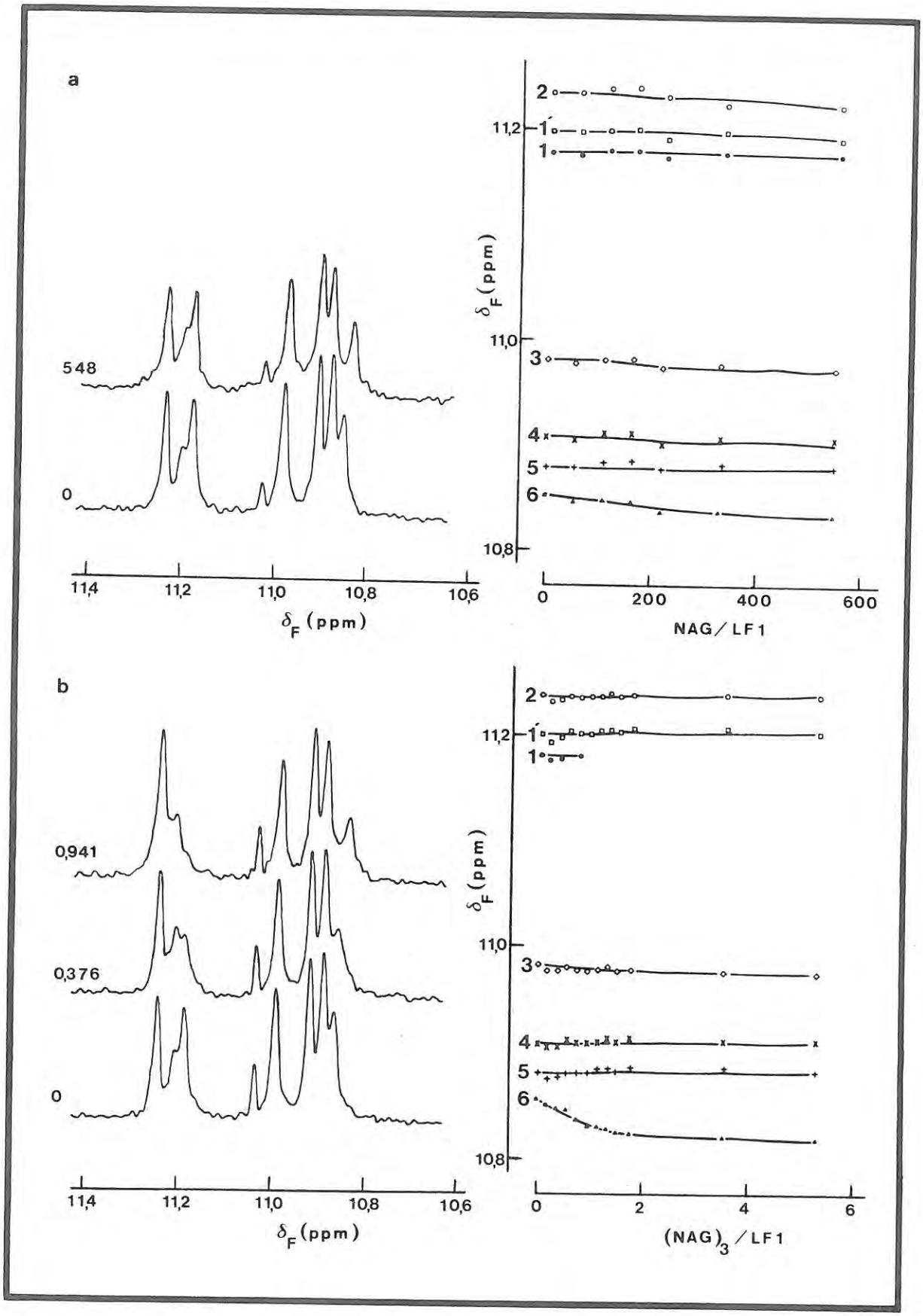

a
548
0
11,4
11,2
11,0
10,8
10,6
δ_F (ppm)
2
1'
1
11,2
11,0
10,8
δ_F (ppm)
3
4
5
6
0
200
400
600
NAG / LF1
b
0,941
0,376
0
11,4
11,2
11,0
10,8
10,6
δ_F (ppm)
2
1'
1
11,2
11,0
10,8
δ_F (ppm)
3
4
5
6
0
2
4
6
$(NAG)_3$ / LF1

Fig. V-6.

Voor signaal 6 zien we een gemiddeld signaal, waarbij de positie afhankelijk is van de relatieve verhouding van vrij t.o.v. gecomplexeerd LF1.

De inhibitor $(NAG)_3$ wordt gebonden in bindingsplaatsen A, B en C, met het reducerende uiteinde in plaats C; NAG bindt in bindingsplaats C (Imoto et al., 1972).

De associatieconstanten voor binding van NAG en $(NAG)_3$ aan lysozyme bedragen resp. 40 M^{-1} en $1,1.10^{+5}$ M^{-1} bij pH 5-5,5, μ 0,1 en 25°C (Imoto et al., 1972).

Uit een studie van de acetamido-methylgroepen van $(NAG)_3$ en NAG via ^1H NMR stelden Dahlquist en Raftery (1969) vast dat, bij pH 5,5 en 31°C, het lysozyme-$(NAG)_3$ complex te traag dissocieert om een gemiddeld signaal van het vrije en het gebonden suiker te kunnen waarnemen; NAG wisselt snel uit tussen bindingsplaats C en de oplossing.

Uit een vergelijking van de aktiviteit van natief lysozyme en van een acetyllysozyme derivaat t.o.v. $(NAG)_4$ besloten Davies en Neuberger (1969) dat de positief geladen lysine restgroepen geen rol spelen in de binding van $(NAG)_4$ of in de hydrolyse en dat de lysines zich niet in de aktieve plaats bevinden, overeenkomend met de kristallografische gegevens.

Op basis van de invloed van NAG en $(NAG)_3$ op het ^{19}F NMR spectrum van LF1 kunnen we het volgende afleiden :

1. Alhoewel de lysines zich niet in de aktieve plaats bevinden ondervinden twee trifluoroacetylgroepen, namelijk deze overeenkomend met signalen **1** en **6**, een verandering in hun omgeving door binding van $(NAG)_3$.
2. De verschillende chemische verschuiving van signaal **1** in vrij LF1 en in het LF1-$(NAG)_3$ complex en het feit dat er geen gemiddeld signaal wordt waargenomen, weerspiegelt de trage uitwisseling van $(NAG)_3$, zoals ook waargenomen door Dahlquist en Raftery (1969).
   Dit betekent dat deze trifluoroacetylgroep (signaal **1**) zich in de omgeving van de $(NAG)_3$ bindingsplaats moet bevinden en een licht verschil in omgeving ondervindt in het LF1-$(NAG)_3$ complex t.o.v. de omgeving in LF1.
3. Signaal **6** verschuift naar hoger veld door binding van $(NAG)_3$ en van NAG aan LF1. In beide gevallen zien we een gemiddeld signaal.
   Dit betekent dat het effect op signaal **6** voornamelijk te wijten is aan binding in plaats C, de enige bindingsplaats welke door beide inhibitoren bezet wordt. Dit effect is groter voor $(NAG)_3$ dan voor NAG vanwege de sterkere binding en het groter aantal contacten van $(NAG)_3$ met het enzym.

§ 5. Zelf-associatie van LF1

5.1. Invloed van de LF1 concentratie op het ^{19}F NMR spectrum

Het ^{19}F NMR spectrum van LF1 bij pH 5,60 μ 0,1 ondergaat veranderingen door verhoging van de LF1 concentratie, zoals weergegeven in Fig. V-7. Het meest opvallend hierbij is de verschuiving van signaal 5 van 10,880 ppm voor 0,132 mM LF1 naar 10,913 ppm voor 1,203 mM LF1, dit is een verschuiving van 0,033 ppm naar lager veld.
De overige signalen ondergaan geen of slechts een zeer kleine verschuiving bij concentratie-verhoging. De signalen in het spectrum bij 1,203 mM zijn daarenboven enigszins verbreed t.o.v. deze bij 0,213 mM (Fig. V-7a).

5.2. Bespreking

Het natieve lysozyme vertoont een reversibele zelf-associatie boven pH 5 (Sophianopoulos en Van Holde, 1964), waarbij de aktieve plaats en het gebied rond His-15 betrokken zijn (Banerjee et al., 1975; Norton en Allerhand, 1977; Shindo et al., 1977; Venkatappa en Steinrauf, 1969).

Het ^{19}F NMR spectrum van LF1 wordt beïnvloed door concentratie-veranderingen (Fig. V-7); hieruit kunnen we afleiden dat :

- de reactie op de ε-aminogroepen van de lysines deze zelf-associatie niet inhibeert;
- slechts één van de lysines, namelijk deze overeenkomend met signaal 5, betrokken is in het intermoleculair contact : de overige signalen in het ^{19}F NMR spectrum ondergaan geen veranderingen in het beschouwde concentratiegebied;
- de F-signalen lichtjes verbreden door de associatie (Fig. V-7a) : door het hogere molecuulgewicht is de beweeglijkheid van het dimeer lager dan deze van het monomeer, waardoor de bandbreedte van de F-signalen toeneemt;
- de metingen betreffende de invloed van pH, ionensterkte en inhibitoren, met een LF1 concentratie van ongeveer 0,2 mM, werden uitgevoerd op het monomeer; uit Fig. V-7b blijkt dat rond deze concentratie (0,2 mM) het ^{19}F NMR spectrum weinig beïnvloed wordt door lichte concentratie-veranderingen.

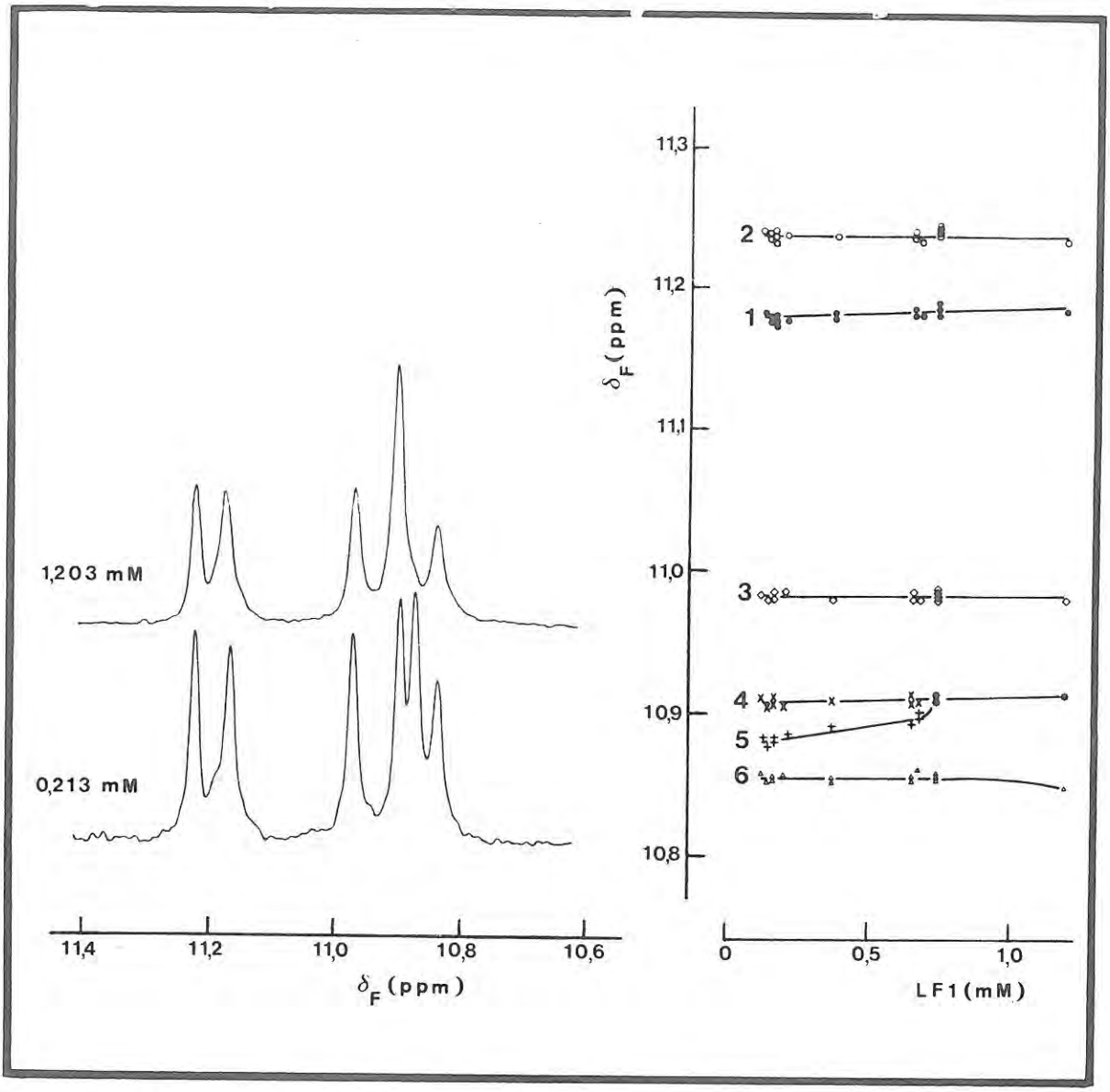


Fig. V-7 : Invloed van de concentratie op het ^{19}F NMR spectrum van LF1 bij pH 5,60 μ 0,1, 29,9 ± 0,1°C.

a. ^{19}F NMR spectrum voor 0,213 mM en 1,203 mM LF1.

b. Verloop van de F-signalen in functie van de LF1 concentratie.

§ 6. Relaxatiestudie

6.1. Bepaling van de spin-spin en de spin-rooster relaxatietijd van de F-signalen in LF1

De relaxatiemetingen werden uitgevoerd op LF1 in acetaatbuffer pH 5,60 μ 0,1 bij 29,9 ± 0,1°C. De spin-rooster relaxatietijd T_1 en de spin-spin relaxatietijd T_2 werden bepaald d.m.v. de 'inversion recovery' en de Carr-Purcell-Meiboom-Gill methode resp., zoals beschreven (Hoofdstuk II, § 9.3.).

Fig. V-8a geeft het ^{19}F NMR spectrum van 0,213 mM LF1 voor verschillende wachttijden D2 in de 'inversion recovery' sequentie voor T_1 bepaling. De toename van de intensiteit van signalen 5 en 6 in functie van D2 wordt getoond in Fig. V-8b.

Tabel V-3 geeft de T_1 en T_2 waarden voor de F-signalen bij verschillende LF1 concentraties. Bij hogere concentratie vallen signalen 4 en 5 samen en kan de relaxatietijd van deze signalen niet individueel bepaald worden.

De relaxatietijden van de zes F-signalen vertonen verschillen bij een bepaalde concentratie en variëren in functie van de LF1 concentratie (Tabel V-3) :

- de T_1 van signaal 6 is hoger dan deze van de overige signalen voor 0,664 mM en 0,378 mM LF1; bij 0,213 mM LF1 zijn de T_1 waarden van signalen 5 en 6 nagenoeg gelijk;
- de T_2 van signaal 6 is lager dan deze van de overige signalen;
- bij verhoging van de LF1 concentratie daalt T_2 voor signalen 3 en 6, het concentratie-effect op de relaxatietijd van signalen 4 en 5 is moeilijk na te gaan door het samenvallen van deze signalen bij hogere concentratie.

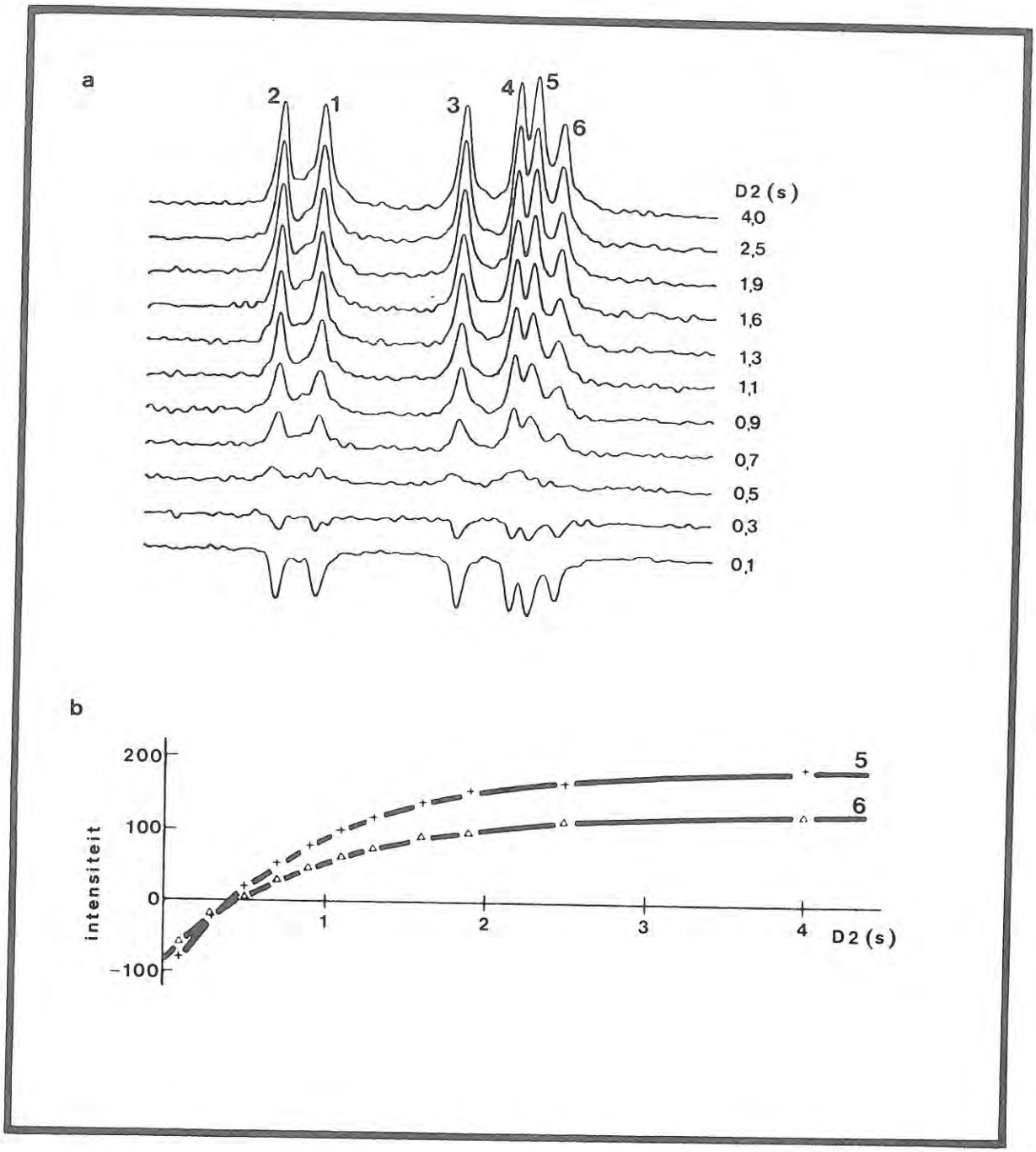


Fig. V-8 : Bepaling van de spin-rooster relaxatietijd T_1 voor 0,213 mM LF1 pH 5,60 μ 0,1 29,9 ± 0,1°C.

a. ^{19}F NMR spectrum van LF1 bij de aangeduide wachttijd D2.

b. Toename van de intensiteit van signalen **5** en **6** in functie van de wachttijd D2.

signaal	[LF1] (mM)			
	1,203	0,664	0,378	0,213
	T_1 (s)			
1		0,829 ± 0,013	0,838 ± 0,015	0,847 ± 0,027
2		0,827 ± 0,010	0,802 ± 0,009	0,796 ± 0,010
3		0,851 ± 0,016	0,852 ± 0,015	0,820 ± 0,028
4		0,837 ± 0,008	0,830 ± 0,011	0,821 ± 0,024
5			0,881 ± 0,011	0,910 ± 0,022
6		0,971 ± 0,014	0,966 ± 0,012	0,956 ± 0,030
	T_2 (s)			
1	0,306 ± 0,054	0,262 ± 0,047	0,392 ± 0,072	
2	0,200 ± 0,042	0,218 ± 0,016	0,249 ± 0,036	
3	0,135 ± 0,016	0,174 ± 0,017	0,205 ± 0,014	
4	0,145 ± 0,008	0,171 ± 0,010	0,196 ± 0,011	
5			0,231 ± 0,030	
6	0,083 ± 0,008	0,087 ± 0,008	0,124 ± 0,012	

Tabel V-3 : Spin-rooster relaxatietijd T_1 en spin-spin relaxatietijd T_2 voor verschillende LF1 concentraties.
De relaxatietijden werden gemeten voor LF1 bij pH 5,60 μ 0,1 29,9 ± 0,1°C en worden gegeven met de standaardafwijking.

6.2. Bespreking

Het verschil in relaxatietijd van de zes F-signalen bij een bepaalde LF1 concentratie duidt op de verschillende beweeglijkheid van de omgeving van de fluoratomen.

De grootte van T_1 en T_2 wordt bepaald door de correlatietijd τ_c voor beweging van het proteïne en door de inwendige correlatietijden voor rotatie rond de $CO-CF_3$ binding en voor beweging van de lysine zijketen.

Uit een vergelijking van T_1 en T_2 van de F-signalen kunnen we afleiden dat de correlatietijd τ_c voor LF1 buiten het zogenaamde 'extreme narrowing' gebied (Fig. II-7) valt : het signaal met de grootste spin-rooster relaxatietijd (signaal **6**) heeft eveneens de kleinste spin-spin relaxatietijd.

De fluoratomen met de kortste T_2, d.i. deze overeenkomend met signaal **6**, bezitten de laagste beweeglijkheid. Signalen **1** en **2** hebben de grootste T_2 van de zes F-signalen. Dit betekent dat de Lys-13 trifluoroacetylgroep een relatief grote beweeglijkheid bezit, in vergelijking met de overige signalen.

Een analoog besluit is af te leiden uit ^{13}C relaxatiemetingen van methylgroepen gebonden aan de ε-aminogroepen van lysozyme (Gerken et al., 1982) : de spin-rooster relaxatietijd voor het signaal toegewezen aan de Lys-13 methylgroep toont aan dat deze methylgroep een hoge beweeglijkheid heeft in vergelijking met de overige lysine methylgroepen.

De concentratie-afhankelijkheid van T_2 voor signalen **6** en **3** wijst erop dat de beweeglijkheid van deze trifluoroacetylgroepen vermindert bij associatie van het molecule.

§ 7. Binding van lanthanide-ionen

7.1. Binding van lanthanide-ionen aan lysozyme

Natief lysozyme bezit een bindingsplaats met hoge affiniteit voor metaalionen, namelijk tussen de catalytische groepen Glu-35 en Asp-52. Deze bindingsplaats werd aangetoond door de kristalstudies van Kurachi et al. (1975) en van Perkins et al. (1979) op lysozyme-Gd^{3+} complexen. In oplossing binden lanthanide-ionen (Ln^{3+}) eveneens in deze plaats (Morallee et al., 1970; Agresti et al., 1977) met een associatie-constante $7{,}0.10^{+3}$ M^{-1} voor Gd^{3+} (Ostroy et al., 1978). De affiniteit van de carboxylaat groepen van Asp-101, Asp-87 en Glu-7 voor Ln^{3+} is ongeveer een factor 100 lager dan de affiniteit van de voornaamste bindingsplaats (Campbell et al., 1975).

De binding van Ln^{3+} tussen Glu-35 en Asp-52 werd gebruikt voor de toewijzing van signalen in de ^{1}H (o.a. Campbell et al., 1973; Lenkinski et al., 1979) en in de ^{13}C (Allerhand et al., 1977) NMR spectra van lysozyme en bij een studie van de binding van NAG inhibitoren aan lysozyme d.m.v. ^{1}H en ^{13}C NMR spectroscopie (Perkins et al., 1981).

Er zijn geen gegevens bekend over de binding van Ln^{3+} aan acetyllysozyme, maar we mogen aannemen dat acetylering van de aminogroepen van lysozyme nagenoeg geen invloed heeft op de affiniteit van de voornaamste Ln^{3+}-bindingsplaats omwille van volgende redenen :

1. De binding van Ln^{3+} aan lysozyme wordt sterk beïnvloed door de ioniseerbaarheid van Glu-35 : door vorming van een ester tussen Glu-35 en Trp-108 daalt de affiniteit voor Gd^{3+} met een factor 20 (Dill en Allerhand, 1977).
2. De pK_a van Glu-35 wordt niet beïnvloed door acetylering van de aminogroepen (Nakae et al., 1973).
3. De hydrolyse van NAG oligomeren, waarvoor beide catalytische groepen Glu-35 en Asp-52 vereist zijn, vertoont hetzelfde pH-profiel in acetyllysozyme als in natief lysozyme (Davies en Neuberger, 1969).

Vermits zowel het relaxatie-effect door Gd^{3+} als de dipolaire verschuiving door de overige paramagnetische lanthanide-ionen afhankelijk is van de ruimtelijke positie van het metaalion t.o.v. de geobserveerde kern

(vergelijkingen II-5, II-11) zullen de F-signalen in het ^{19}F NMR spectrum van LF1 een verschillend relaxatie- of verschuivingseffect ondervinden, afhankelijk van hun positie t.o.v. de Ln^{3+}-bindingsplaats.

De coördinaten van de fluoratomen in LF1 kunnen berekend worden op basis van het kristalmodel van lysozyme.

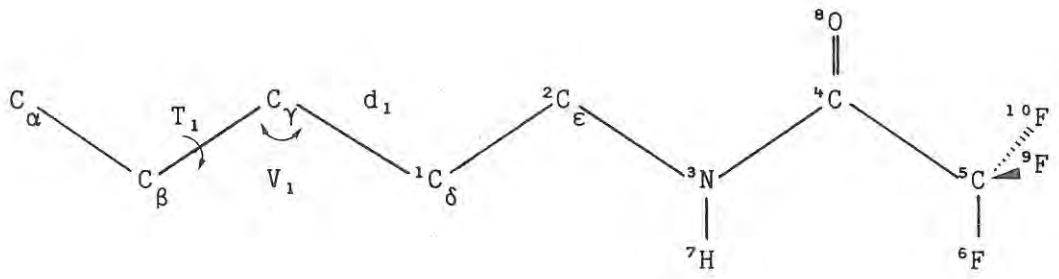
7.2. Berekening van de coördinaten van de fluoratomen in LF1

Door middel van de coördinaten van de atomen in het lysozyme kristal (Imoto et al., 1972) kunnen de coördinaten van de atomen in de trifluoroacetylgroepen bepaald worden.

De geometrie van de atomen in de trifluoroacetyllysine zijketen werd berekend (cfr. Hoofdstuk II, § 10.2.) op basis van de kristalcoördinaten van de eerste drie atomen (nl. het α-, β- en γ-koolstofatoom) en van de inwendige coördinaten (afstand, valentie- en torsiehoek) in de zijketen. Deze inwendige coördinaten werden bepaald :

- aan de hand van de kristalcoördinaten van de atomen in de lysine zijketen (Imoto et al., 1972);
- volgens de coördinaten voor atomen in een amidebinding (Dickerson en Geis, 1969);
- aan de hand van de valentiehoek en de C-F bindingsafstand in CHF_3 (Wagnière, 1973) voor de atomen in de trifluoromethylgroep.

De nummering van de atomen in de trifluoroacetyllysine zijketen en de aanduiding van de overeenkomstige bindingsafstand (d), valentiehoek (V) en torsiehoek (T) gebeurt als volgt :



In Tabel V-4 worden de inwendige coördinaten voor de zes trifluoroacetyllysine zijketens gegeven.

Op basis van de gegevens in Tabel V-4 werden de coördinaten van de atomen in de trifluoroacetyllysine zijketens en de afstand tussen deze atomen en atomen in naburige aminozuren berekend. Hieruit blijkt dat de berekende conformaties niet mogelijk zijn voor bepaalde zijketens omwille van afstanden kleiner dan de minimale van der Waals afstand voor niet-gebonden atomen (Dickerson en Geis, 1969), namelijk tussen Lys-1 en Glu-7, Lys-13 en Leu-129, Lys-96 en His-15, Lys-116 en Asn-106. De trifluoroacetyllysine zijketens van Lys-33 en Lys-97 ondervinden geen ongunstige interacties met naburige aminozuren.

Door rotatie rond de C_ε-N binding voor Lys-1 en Lys-96 en rond de C_δ-C_ε binding voor Lys-13 en Lys-116 worden conformaties verkregen waarbij er geen ongunstige interacties zijn met naburige atomen. De coördinaten van de fluor- en ε-stikstofatomen in deze conformaties worden gegeven in Tabel V-5. Tabel V-5 bevat eveneens de afstand van deze atomen tot de Gd^{3+}-bindingsplaats (x = 0,99 nm; y = 2,37 nm; z = 2,08 nm) in tetragonale lysozyme kristallen (Imoto et al., 1972).

Hierbij dient te worden opgemerkt dat de coördinaten, zoals weergegeven in Tabel V-5, overeen komen met één van de mogelijke conformaties. In oplossing bezitten de trifluoroacetyllysine zijketens een zekere mate van beweeglijkheid, zodat de tijdsgemiddelde positie van de fluoratomen niet noodzakelijk overeen komt met de coördinaten bepaald volgens kristallografische gegevens. De grootste afwijking tussen berekende en werkelijke positie van de fluoratomen doet zich waarschijnlijk voor bij Lys-97 : deze zijketen staat volledig open aan het solvent (relatieve solventtoegankelijkheid = 1, Tabel I-4). Dit betekent dat de Lys-97 zijketen een grote beweeglijkheid bezit en verschillende conformaties kan aannemen. Deze beweeglijkheid blijkt eveneens uit de kristalstudie door de moeilijkheid om de elektronendichtheid van bepaalde atomen in de Lys-97 zijketen te interpreteren, hetgeen wordt toegeschreven aan de mogelijkheid voor deze zijketen om alternatieve conformaties aan te nemen in verschillende kristalmoleculen (Imoto et al., 1972).

Niettegenstaande deze bemerkingen geeft de berekening van de coördinaten van de fluoratomen toch een idee over de relatieve afstand van de fluoratomen t.o.v. de Gd^{3+}-bindingsplaats (Tabel V-5) :

- de kleinste Gd-F afstand (ongeveer 1,9 nm) vinden we voor de Lys-33 en Lys-116 fluoratomen;
- de grootste Gd-F afstand (ongeveer 3 nm) vinden we voor Lys-13.

atoom	Lys-1			Lys-13			Lys-33		
	d (nm)	V (°)	T (°)	d (nm)	V (°)	T (°)	d (nm)	V (°)	T (°)
1	0,153	111,660	-164,711	0,149	111,732	-174,148	0,149	113,580	89,392
2	0,153	114,276	-155,191	0,161	108,478	151,131	0,156	110,674	-153,581
3	0,148	110,533	179,300	0,148	107,344	-176,145	0,149	108,361	-167,970

atoom	Lys-96			Lys-97			Lys-116		
	d (nm)	V (°)	T (°)	d (nm)	V (°)	T (°)	d (nm)	V (°)	T (°)
1	0,163	105,810	-147,114	0,158	109,227	-157,022	0,151	107,736	149,273
2	0,160	111,176	-178,719	0,149	107,713	138,653	0,159	109,456	157,610
3	0,147	106,267	112,883	0,148	110,799	178,295	0,146	107,064	-170,180

atoom	d (nm)	V (°)	T (°)
4	0,132	122	180
5	0,151	116	180
6	0,133	108,8	0
7	0,102	119	0
8	0,124	123,5	0
9	0,133	108,8	-120
10	0,133	108,8	+120

Tabel V-4 : Inwendige coördinaten van de trifluoroacetyllysine zijketens : bindingsafstand d (nm), valentiehoek V en torsiehoek T.
De nummering van de atomen in de zijketen is beschreven in de tekst.
De inwendige coördinaten van atomen ^{1}, ^{2} en ^{3} werden berekend op basis van de kristalcoördinaten voor de lysine zijketens. De inwendige coördinaten voor de atomen in de trifluoroacetylgroep werden bepaald zoals aangegeven in de tekst.

		coördinaten (nm)			R (nm) [1]
		x	y	z	
Lys-1	F	-0,59	0,98	0,80	2,46
	F	-0,58	0,77	0,80	2,58
	F	-0,63	0,87	0,62	2,65
	N	-0,35	0,99	0,73	2,35 (2,35)
Lys-13	F	-1,83	1,74	1,43	2,96
	F	-2,03	1,78	1,35	3,16
	F	-1,96	1,88	1,53	3,04
	N	-1,75	1,93	1,29	2,88 (2,94)
Lys-33	F	0,27	2,35	0,30	1,92
	F	0,49	2,34	0,28	1,86
	F	0,38	2,52	0,22	1,96
	N	0,30	2,45	0,53	1,70 (1,70)
Lys-96	F	-1,21	1,40	2,36	2,42
	F	-1,01	1,33	2,42	2,28
	F	-1,08	1,32	2,21	2,32
	N	-1,12	1,63	2,32	2,24 (2,24)
Lys-97	F	-0,52	1,42	3,49	2,28
	F	-0,71	1,31	3,50	2,46
	F	-0,68	1,48	3,63	2,45
	N	-0,61	1,56	3,31	2,18 (2,18)
Lys-116	F	-0,02	3,98	2,00	1,90
	F	0	4,06	2,20	1,96
	F	-0,16	4,13	2,08	2,10
	N	-0,16	3,80	2,10	1,84 (1,75)

Tabel V-5 : Berekende coördinaten van de fluor- en stifstofatomen, in een conformatie van de trifluoroacetyllysine zijketens waarin er geen ongunstige interacties zijn met naburige zijketens, en de afstand van deze atomen tot de Gd^{3+}-bindingsplaats (x = 0,99 nm; y = 2,37 nm; z = 2,08 nm (Imoto et al., 1972)).

[1] de cijfers tussen haakjes geven de afstand tussen de ε-stikstofatomen in de lysine zijketens en de Gd^{3+}-bindingsplaats voor natief kristallijn lysozyme.

7.3. Lanthanide-ionen als 'shift probes'

a. Principe

Paramagnetische ionen kunnen een verschuiving veroorzaken van signalen in een NMR spectrum. De verandering in chemische verschuiving Δ door binding van lanthanide-ionen aan een molecule wordt gegeven door :

$$\Delta = \Delta p + \Delta c + \Delta d, \qquad (V\text{-}1)$$

waarin Δd : de diamagnetische verschuiving,

Δc : de contact verschuiving, welke alleen belangrijk is voor atomen in de onmiddellijke omgeving van de Ln^{3+}-bindingsplaats,

Δp : de pseudo-contact verschuiving, welke afhankelijk is van de ruimtelijke positie van het atoom t.o.v. het metaalion.

In het geval van axiale symmetrie is de verhouding van de pseudo-contact verschuiving voor twee atomen i en j

$$R_{ij} = \frac{\Delta p_i}{\Delta p_j} = \frac{(3\cos^2\theta_i - 1).r_j^3}{(3\cos^2\theta_j - 1).r_i^3} \qquad (V\text{-}2)$$

alleen afhankelijk van de sferische coördinaten r en θ van de beschouwde atomen t.o.v. het paramagnetisch ion.

Bij titratie van het molecule met een lanthanide-ion wordt Δp bepaald voor de signalen in het spectrum door correctie van de geobserveerde verschuiving Δ met de diamagnetische verschuiving Δd, gemeten door titratie met La^{3+}. De verhouding R_{ij} (Vgl. V-2) van de signalen t.o.v. een bepaald signaal j wordt berekend. Een grafiek van R_{ij} in functie van de lanthanide-concentratie geeft een rechte en wordt geëxtrapoleerd naar lanthanide-concentratie nul waardoor de verhouding R^o_{ij} bepaald wordt.

De R^o_{ij}-waarde van twee atomen i en j moet gelijk zijn voor de verschillende lanthanide-ionen indien :

- er geen bijdrage is door contact verschuiving,
- het complex effectief axiaal symmetrisch is,
- alle lanthanide-ionen op dezelfde manier binden.

(Barry et al., 1974).

b. Metingen

De invloed van lanthanide 'shift' ionen op de F-signalen in LF1 werd nagegaan door LF1 te titreren met oplossingen van Ln^{3+}. Als lanthanide-ionen werden gekozen :

- La^{3+} als diamagnetische referentie;
- Dy^{3+}, Ho^{3+} en Yb^{3+} omdat de hogere lanthanide-ionen een grotere dipolaire shift veroorzaken (Shelling et al., 1984). Dy^{3+} en Ho^{3+} bezitten een groot magnetisch moment (Moeller, 1973) en veroorzaken een relatief grote verschuiving maar ook verbreding van de signalen (Horrocks en Sipe, 1971). Yb^{3+} veroorzaakt een kleinere verschuiving, en verbreding, dan Dy^{3+} en Ho^{3+} (Dwek, 1973).

De metingen werden uitgevoerd met LF1, ongeveer 0,2 mM, in acetaatbuffer pH 3,85 en pH 5,60 μ 0,1; de lanthanide-ionen werden opgelost in dezelfde buffer. Bij pH 5,60 werd de titratie met de vier lanthanide-ionen eveneens uitgevoerd in aanwezigheid van 80 mM NAG.

In Fig. V-9 wordt de chemische verschuiving van de F-signalen bij pH 5,60 (zonder NAG) weergegeven in functie van de molaire verhouding van de Ln^{3+} en LF1 concentratie. Tabel V-6 geeft het verschil in chemische verschuiving $\Delta\delta_F$ door toevoegen van Ln^{3+} tot een verhouding van 50 Ln^{3+}/LF1, gecorrigeerd voor het diamagnetisch effect van La^{3+}, bij pH 3,85 en pH 5,60.

Uit Fig. V-9 en Tabel V-6 kunnen we het volgende afleiden :

1. Zowel bij pH 5,60 als bij pH 3,85 (grafiek niet getoond) heeft La^{3+} nagenoeg geen invloed op de F-signalen.
2. Dy^{3+} en Ho^{3+} veroorzaken bij pH 3,85 een verschuiving van signaal 2 naar hoger veld, maar hebben weinig effect op de overige signalen; Yb^{3+} veroorzaakt nagenoeg geen verschuiving.
3. Bij pH 5,60 zien we de grootste verschuiving voor signalen **5**, **4** en **2** met Dy^{3+}, voor signalen **5** en **2** met Ho^{3+} en voor signalen **5** en **4** met Yb^{3+}.
4. De aanwezigheid van 80 mM NAG heeft nagenoeg geen invloed op de chemische verschuiving door deze lanthanide-ionen bij pH 5,60.

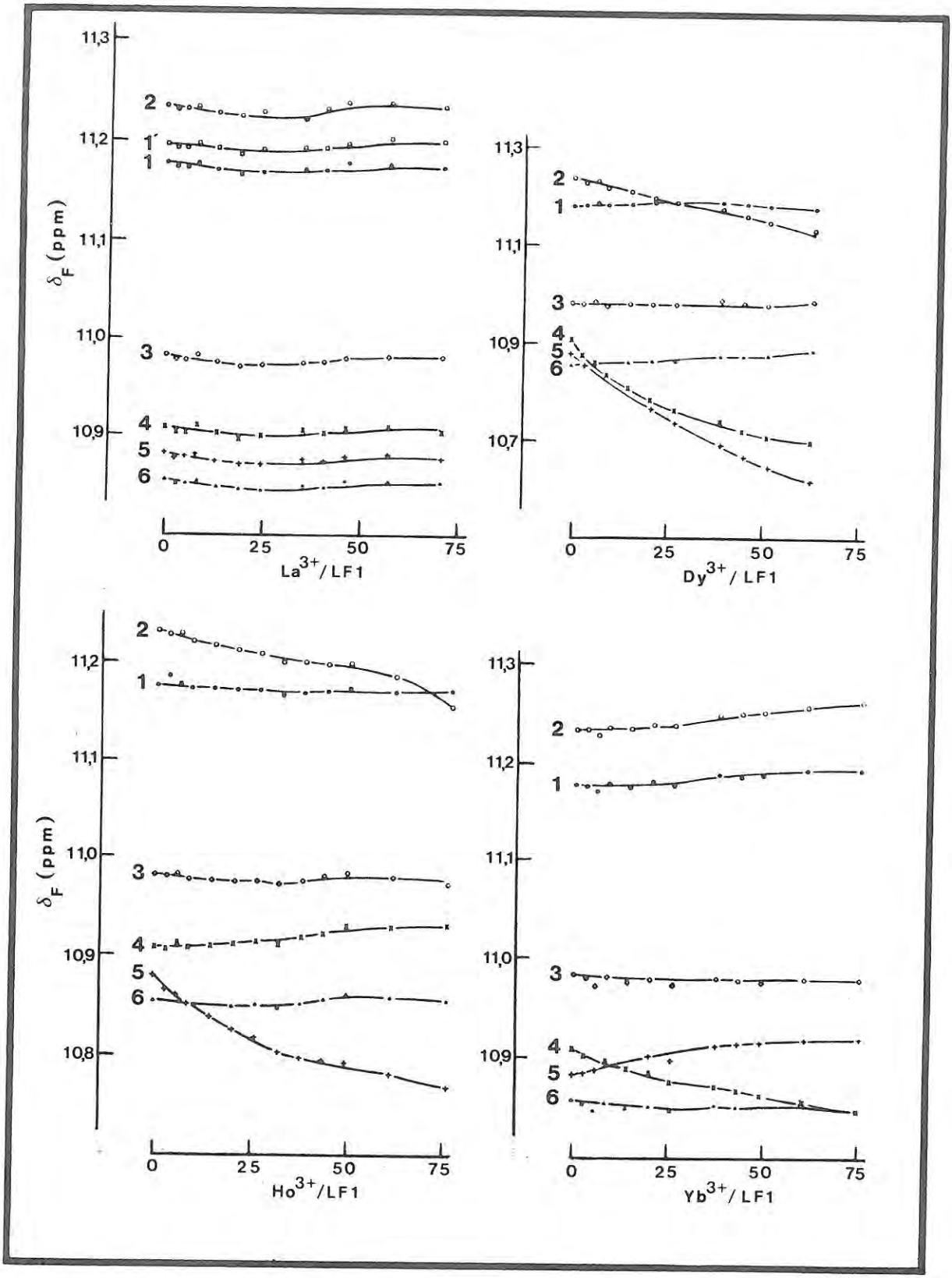


Fig. V-9 : Chemische verschuiving van de F-signalen in LF1, bij pH 5,6, 29,9 ± 0,1°C, door toevoeging van de lanthanide-ionen La^{3+}, Dy^{3+}, Ho^{3+} en Yb^{3+}, in functie van de molaire verhouding van de lanthanide en LF1 concentraties.
De titraties werden uitgevoerd door toevoegen van 50 mM Ln^{3+} oplossing aan 500 µl 0,172 mM LF1.

signaal	$\Delta\delta_F$ (ppm)								
	pH 3,85			pH 5,60					
				-NAG			+NAG		
	Dy^{3+}	Ho^{3+}	Yb^{3+}	Dy^{3+}	Ho^{3+}	Yb^{3+}	Dy^{3+}	Ho^{3+}	Yb^{3+}
1	+0,004	+0,005	+0,008	-0,010	+0,001	-0,024	-0,015	-0,003	-0,025
2	+0,036	+0,037	0	+0,084	+0,037	-0,019	+0,072	+0,044	-0,047
3	-0,006	+0,004	+0,009	-0,005	-0,007	-0,002	-0,009	+0,002	-0,018
4	0	-0,007	+0,013	+0,189	-0,030	+0,042	+0,150	-0,010	+0,063
5	+0,001	+0,002	+0,010	+0,222	+0,083	-0,040	+0,226	+0,078	-0,051
6	-0,007	+0,003	+0,010	-0,028	-0,012	+0,002	-0,055	-0,019	+0,009

Tabel V-6 : Verschil in chemische verschuiving van de F-signalen door toevoeging van Dy^{3+}, Ho^{3+} en Yb^{3+} aan LF1, pH 5,60 μ 0,1, gecorrigeerd voor het effect van La^{3+}.

De $\Delta\delta_F$-waarden zijn gegeven voor een molaire verhouding van 50 Ln^{3+}/LF1 (Fig. V-8).

Een positief teken betekent een verschuiving naar hoger veld bij toevoeging van het lanthanide-ion.

c. Analyse

De chemische verschuiving o.i.v. de lanthanide-ionen werd geanalyseerd zoals hierboven aangegeven :

- voor ieder punt in de titraties werd het verschil in chemische verschuiving ($\Delta\delta$) bepaald door toevoeging van het paramagnetisch ion en gecorrigeerd voor de chemische verschuiving door La^{3+};
- de verhouding van de bekomen $\Delta\delta$-waarden voor de vijf signalen t.o.v. deze voor signaal 2 ($R_{i2} : \Delta\delta_i/\Delta\delta_2$) werd uitgezet in functie van de molaire verhouding van de Ln^{3+} en LF1 concentraties.

Uit de grafieken van R_{i2} in functie van Ln^{3+}/LF1, voor de drie lanthanide-ionen, bij pH 3,85 en pH 5,60 blijkt dat :

- de punten in deze grafieken alleszins niet op een rechte liggen : de correlatie voor de vergelijking van een rechte varieert van 0,08 tot 0,53;
- de R^o_{i2}-waarden, bekomen door extrapoleren van deze 'rechten' naar lanthanide-concentratie nul, vertonen grote afwijkingen voor een bepaald F-signaal met de drie lanthanide-ionen. Tabel V-7 toont de R^o_{i2}-waarden van de F-signalen verkregen bij pH 5,60 (in afwezigheid van NAG).

Dit betekent dat de chemische verschuiving van de F-signalen in LF1 onder invloed van Dy^{3+}, Ho^{3+} en Yb^{3+} niet kan geanalyseerd worden aan de hand van de aangegeven methode.
Een mogelijke verklaring voor deze afwijking wordt, samen met de resultaten van de relaxatie-studie met Gd^{3+}, besproken in § 7.5.

Ln^{3+}	R^{o}_{i2}					
	1	2	3	4	5	6
Dy^{3+}	-2,13	1	-1,07	11,35	4,96	-1,49
Ho^{3+}	1,37	1	1,88	1,95	-1,52	2,79
Yb^{3+}	0,91	1	1,08	0,20	1,46	1,15

Tabel V-7 : R^{o}_{i2}-waarden voor de F-signalen met de lanthanide-ionen Dy^{3+}, Ho^{3+} en Yb^{3+}.
De R^{o}_{i2}-waarden werden bepaald uit een grafiek van R_{i2} (d.i. de verhouding van $\Delta\delta$ voor een bepaald signaal t.o.v. $\Delta\delta$ voor signaal 2) voor ieder punt in Fig. V-8 in functie van Ln^{3+}/LF1 en extrapolatie van de bekomen 'rechten' naar lanthanide-concentratie nul.

7.4. Relaxatiestudie met Gd^{3+}

a. Principe

Paramagnetische ionen beïnvloeden het relaxatiegedrag van naburige atomen; in de lanthanide-reeks is Gd^{3+} het meest effectieve relaxatiereagens (Reuben, 1975).

De paramagnetische bijdrage in de spin-spin en spin-rooster relaxatietijd, aangeduid in vergelijking II-11, bevat twee termen namelijk een dipolaire en een scalaire. De scalaire term is alleen belangrijk voor atomen in de onmiddellijke omgeving van Gd^{3+} en is te verwaarlozen voor de meeste atomen in macromoleculen. De dipolaire term is afhankelijk van de afstand tussen het metaalion en het beschouwde atoom hetgeen, dank zij de afwezigheid van de anisotropie factor, een eenvoudiger verband is dan voor de chemische verschuiving veroorzaakt door 'shift' reagentia (vgl. II-5).

Vermits lysozyme een bindingsplaats met hoge affiniteit voor lanthanide-ionen bezit, zou het relaxatie-effect van Gd^{3+} op de F-signalen te correleren moeten zijn met de afstand tussen de fluoratomen en de Gd^{3+}-bindingsplaats tussen Asp-52 en Glu-35.

De geobserveerde spin-rooster relaxatiesnelheid T_1^{-1} van de F-signalen van LF1 bij vorming van een 1:1 complex met Gd^{3+} wordt gegeven door :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1b}} . f_b + \frac{1}{T_{1f}} . f_f \qquad \text{(V-3)}$$

waarin f_b, f_f : de fractie van LF1 welke wel of niet Gd^{3+} gebonden heeft resp.,

T_{1f}^{-1} : de relaxatiesnelheid in afwezigheid van Gd^{3+},

T_{1b}^{-1} : de relaxatiesnelheid van de F-signalen voor LF1 dat Gd^{3+} gebonden heeft.

Vergelijking V-3 kan herschikt worden tot :

$$\frac{1}{T_1} = \left(\frac{1}{T_{1b}} - \frac{1}{T_{1f}}\right)\frac{[GdE]}{[E_o]} + \frac{1}{T_{1f}} \qquad (V\text{-}4)$$

of

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_{1p}} \cdot \frac{[GdE]}{[E_o]} + \frac{1}{T_{1f}} \qquad (V\text{-}5)$$

met $[E_o]$ de totale enzymconcentratie, [GdE] de concentratie aan Gd^{3+}-enzym complex en T_{1p}^{-1} de paramagnetische bijdrage in de spin-rooster relaxatiesnelheid van de F-signalen.
Dit betekent dat uit een grafiek van

$$\frac{1}{T_1'} = \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_{1f}}$$

in functie van $[GdE]/[E_o]$ (welke bij benadering kan gelijkgesteld worden aan de molaire verhouding van de totale Gd^{3+} en LF1 concentraties) voor de verschillende F-signalen de paramagnetische bijdrage T_{1p}^{-1} kan bepaald worden.

De invloed van Gd^{3+} op het relaxatiegedrag van de fluoratomen werd onderzocht via T_1 metingen omdat de fout op deze metingen kleiner is dan voor T_2 metingen (vergelijk bijvoorbeeld de T_1 en T_2 waarden in Tabel V-3).

b. Metingen

De relaxatiemetingen met Gd^{3+} werden uitgevoerd door een LF1 oplossing in buffer pH 5,60 μ 0,1 te titreren met Gd^{3+}-oplossing in dezelfde buffer, en na iedere toevoeging de spin-rooster relaxatietijd van de F-signalen te bepalen.

De Gd^{3+} titraties gebeurden voor verschillende LF1 concentraties variërend van 0,213 mM tot 1,203 mM (d.i. vóór toevoeging van Gd^{3+}).

In Fig. V-10 worden de $1/T_1'$ waarden, voor titratie van 0,378 mM LF1, uitgezet in functie van de molaire verhouding van de Gd^{3+} en LF1 concentraties. De T_{1p}^{-1} waarden bepaald uit Fig. V-10 en uit analoge grafieken bij de overige LF1 concentraties worden samengevat in Tabel V-8.

Uit deze relaxatiemetingen kunnen we afleiden dat :

- de verandering in $1/T_1'$ lineair verloopt in functie van het toegevoegde Gd^{3+};
- er een verschil is in de grootte van het effect voor de verschillende F-signalen;
- het paramagnetisch effect het grootst is voor signaal 2 en afneemt van signaal 1 naar signaal 3; tussen het effect op signalen 4, 5 en 6 is er geen significant verschil. Deze volgorde is dezelfde bij de verschillende LF1-concentraties.

c. Analyse

Een vergelijking van de T_{1p}^{-1} waarden in Tabel V-9 met de afstand tussen de fluoratomen en de Gd^{3+}-bindingsplaats (Tabel V-5) leert ons dat deze niet te correleren zijn :

- het grootste paramagnetisch effect wordt waargenomen op signaal 2, d.i. de fluoratomen gebonden aan Lys-13;
- T_{1p}^{-1} is omgekeerd evenredig met r^6 en daalt naarmate de afstand tussen het Gd^{3+} ion en het beschouwde ion toeneemt;
- de fluoratomen van Lys-13 hebben de grootste afstand (ongeveer 3 nm) t.o.v. de Gd^{3+}-bindingsplaats tussen Asp-52 en Glu-35.

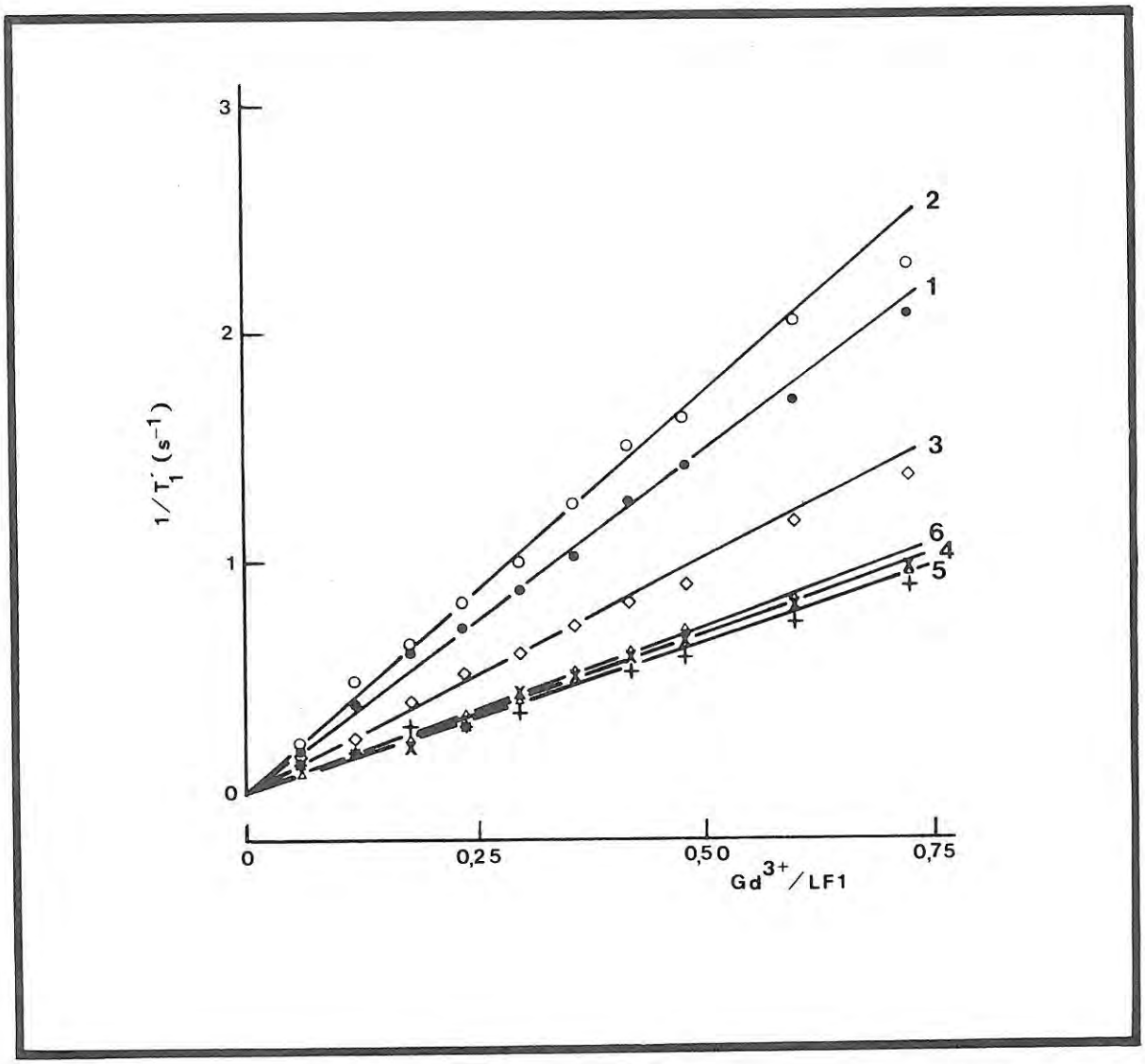


Fig. V-10 : $1/T_1'$ in functie van de molaire verhouding van de Gd^{3+} en LF1 concentraties, voor titratie van 500 µl 0,378 mM LF1 met 2,307 mM Gd^{3+} bij pH 5,60.
De helling van deze rechten geeft de paramagnetische bijdrage T_{1p}^{-1} in de spin-rooster relaxatiesnelheid (cfr. vergelijking V-5).

signaal	T_{1p}^{-1} (s^{-1})				
	0,213 mM	0,378 mM	0,683 mM	0,744 mM	1,203 mM
1	1,578 ± 0,157	2,840 ± 0,101	5,527 ± 0,277	6,714 ± 0,208	9,907 ± 0,927
2	2,027 ± 0,099	3,281 ± 0,134	6,407 ± 0,410	7,947 ± 0,322	12,256 ± 0,857
3	1,184 ± 0,104	1,880 ± 0,069	3,705 ± 0,327	4,536 ± 0,275	6,628 ± 0,634
4	0,601 ± 0,091	1,333 ± 0,045	2,573 ± 0,160	3,074 ± 0,119	4,167 ± 0,208
5	0,767 ± 0,074	1,236 ± 0,045			
6	0,747 ± 0,082	1,343 ± 0,081	2,621 ± 0,252	3,173 ± 0,137	5,067 ± 0,430

Tabel V-8 : Paramagnetische bijdrage T_{1p}^{-1} in de spin-rooster relaxatiesnelheid bepaald door titratie van LF1, bij verschillende concentraties, met Gd^{3+}, bij pH 5,60.
T_{1p}^{-1} werd bepaald zoals aangegeven in Fig. V-10.

7.5. Bespreking

De invloed van lanthanide-ionen op de chemische verschuiving en de relaxatie van de F-signalen beantwoordt niet aan de vooropgestelde modellen. Uit de analyse van de relaxatiemetingen kunnen we besluiten dat de paramagnetische bijdrage in de relaxatie niet te wijten is aan Gd^{3+} gebonden tussen Asp-52 en Glu-35 in het LF1 monomeer.

Een mogelijke verklaring voor dit afwijkend gedrag zou kunnen gezocht worden in de associatie van lysozyme. Zoals besproken in § 5.2. ondergaat natief lysozyme een reversibele zelf-associatie welke 'head-to-tail' gebeurt en waarbij de aktieve plaats en het gebied rond His-15 betrokken zijn. LF1 ondergaat eveneens zelf-associatie, zoals blijkt uit de verschuiving van signaal 5 in functie van de LF1 concentratie (Fig. V-7).

Hierbij kunnen we veronderstellen dat deze associatie zodanig gebeurt dat de Lys-13 trifluoracetylgroep in het dimeer dicht bij de Gd^{3+}-bindingsplaats komt en daardoor een groter relaxatie-effect ondervindt dan de overige fluoratomen. Indien we alleen monomere en dimere vormen beschouwen, kunnen we T_{1p}^{-1} schrijven als :

$$\frac{1}{T_{1p}} = \frac{1}{T_{1p,M}} \cdot f_M + \frac{1}{T_{1p,D}} \cdot f_D$$

of

$$\frac{1}{T_{1p}} = \frac{1}{T_{1p,D}} + \left(\frac{1}{T_{1p,M}} - \frac{1}{T_{1p,D}} \right) \cdot f_M \qquad \text{(V-6)}$$

waarin f_M en f_D de fractie van LF1 moleculen in monomeer en dimeer resp.,

$T_{1p,M}^{-1}$ en $T_{1,D}^{-1}$ de paramagnetische bijdrage in de spin-rooster relaxatiesnelheid voor Gd^{3+} gebonden aan monomeer en dimeer, resp..

Uit vergelijking V-6 kunnen we afleiden dat, indien het relaxatie-effect beantwoordt aan dit monomeer-dimeer model, T_{1p}^{-1} lineair moet verlopen in functie van f_M.

In Fig. V-11 wordt T_{1p}^{-1} voor de zes F-signalen weergegeven in functie van f_M, berekend op basis van een associatie-constante voor dimeervorming

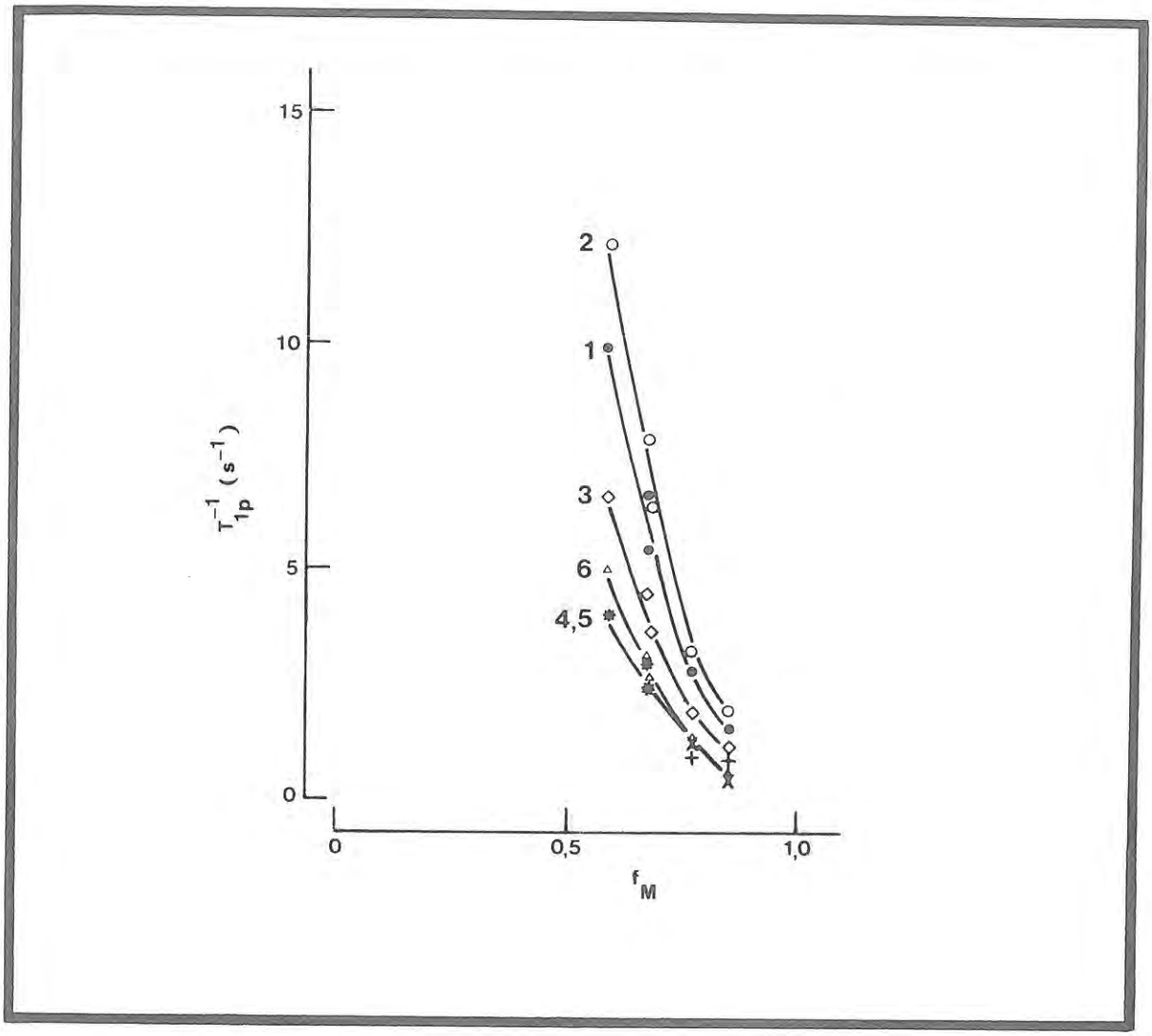


Fig. V-11 : Verloop van de paramagnetische relaxatiebijdrage T_{1p}^{-1} in functie van de fractie monomeer f_M.

De T_{1p}^{-1} waarden zijn deze zoals aangegeven in Tabel V-8 voor de verschillende LF1 concentraties. De fractie monomeer bij deze LF1 concentraties werd berekend op basis van een associatie-constante voor dimeervorming van 500 M^{-1}.

van 500 M^{-1} (Sophianopoulos en Van Holde, 1964). Hieruit blijkt dat het paramagnetisch effect niet kan beschreven worden door vergelijking V-6. Dit betekent dat het monomeer-dimeer model evenmin voldoet om de relaxatie-metingen te verklaren.

Het effect van de lanthanide-ionen op de F-signalen moet waarschijnlijk verklaard worden door de aanwezigheid van niet-specifiek gebonden Ln^{3+}, dit zijn lanthanide-ionen welke niet gebonden zijn tussen Asp-52 en Glu-35.

Op basis van een bindingsconstante van 7000 M^{-1} (Ostroy et al., 1978) kan berekend worden dat voor 0,2 mM LF1 en 0,672 Gd^{3+}/LF1 er 48% van de Gd^{3+}-ionen specifiek gebonden zijn. De titraties met Dy^{3+}, Ho^{3+} en Yb^{3+} werden uitgevoerd met een molaire verhouding van 0 tot 75 Ln^{3+}/LF1, waardoor ook hier een grote concentratie aan niet-specifiek gebonden Ln^{3+} aanwezig is.

Het is mogelijk dat de lanthanide-ionen binden aan secundaire bindingsplaatsen, namelijk aan de overige carboxylaationen.

Campbell et al. (1975) vermeldden dat Asp-101, Asp-87 en Glu-7 een lage affiniteit hebben voor lanthanide-ionen met een associatie-constante van maximaal 10 M^{-1}.

In een ^{13}C NMR studie van ester-35,108-lysozyme onderzochten Dill en Allerhand (1977) de invloed van Gd^{3+} op de niet-geprotoneerde aromatische C-signalen en stelden vast dat de lichte verbreding van bepaalde signalen niet uitsluitend kan verklaard worden door binding van Gd^{3+} aan Asp-52 maar dat ook een tweede bindingsplaats, mogelijk bij Asp-101, moet in rekening gebracht worden.

Uit onze metingen blijkt echter dat het relaxatie-effect op de F-signalen evenmin kan verklaard worden door binding van Gd^{3+} aan één van de overige carboxylaatgroepen :

- op basis van de F-coördinaten in Tabel V-5 en de coördinaten voor de zuurstofatomen in de carboxylgroepen (Imoto et al., 1972) kunnen we berekenen dat de carboxylgroepen welke het dichtst bij de Lys-13 fluoratomen gesitueerd zijn deze van Leu-129 en Asp-18, op resp. ongeveer 0,6 nm en 0,85 nm, zijn;
- de kleinste afstand van de overige fluoratomen t.o.v. deze carboxylgroepen is 1,4 nm voor Lys-96 t.o.v. Asp-18;
- vermits T_{1p}^{-1} evenredig is met r^{-6} neemt T_{1p}^{-1} sterk af met een toename van de afstand tussen Gd^{3+} en het beschouwde atoom : het relaxatie-

effect voor een fluoratoom op 1,4 nm van Gd^{3+} is ongeveer een factor 20 kleiner dan voor een atoom op 0,85 nm afstand;

- uit Tabel V-8 blijkt dat T_{1p}^{-1} voor signaal 1, dat het grootste effect ondervindt na signaal 2, slechts een factor 1,2 lager is dan T_{1p}^{-1} voor signaal 2.

Dit betekent dat de relaxatiemetingen evenmin te correleren zijn met de binding van Gd^{3+} aan één enkele van de overige carboxylgroepen.

Het paramagnetisch effect op de F-signalen kan wel te wijten zijn aan de interactie van de lanthanide-ionen met meerdere carboxylaatgroepen waarbij het verschil in grootte van T_{1p}^{-1} voor de zes F-signalen een verschillende nabijheid van carboxylaatgroepen en een verschil in solventtoegankelijkheid van de fluoratomen kan weerspiegelen.

Bradbury en Brown (1973) onderzochten de invloed van Gd^{3+} op het ^1H NMR spectrum van methylgroepen van de N-methyllysines in gemethyleerd lysozyme. Op basis van de relatieve verbreding van de ^1H signalen en de berekende afstand (op basis van het kristalmodel) tussen de lysine-methylgroepen en de Gd^{3+}-bindingsplaats, werden de ^1H signalen toegewezen aan de zes lysines : het signaal dat de geringste verbreding ondervindt werd toegeschreven aan het lysine op de grootste afstand van de Gd^{3+} bindingsplaats, namelijk aan Lys-13. Deze auteurs bepaalden eveneens de pK_a-waarden voor de ^1H signalen en correleerden deze met de toewijzing van de lysine-methylgroepen.

Onze metingen tonen echter aan dat deze methode voor toewijzing hier niet bruikbaar is : Lys-13, dat in onze studie duidelijk toegewezen werd aan signaal 2, ondervindt het grootste relaxatie-effect alhoewel het de grootste afstand tot de Gd^{3+}-bindingsplaats heeft. De toewijzing van signalen op basis van een relaxatie-effect en door middel van berekende afstanden is niet bruikbaar voor atomen op grote afstand van de Gd^{3+}-bindingsplaats.

De pK_a-waarden welke door Bradbury en Brown (1973) bepaald werden voor de lysine aminogroepen, werden geciteerd door Kuramitsu en Hamaguchi (1980). We moeten opmerken dat deze waarden waarschijnlijk niet juist zijn.

§ 8. Toewijzing van de F-signalen aan de lysines in LF1

8.1. Rechtstreekse toewijzingsinformatie

Uit het voorgaande blijkt dat, via een vergelijking van de spectra van LF1 en des-Leu-129-LF1, signaal 2 is toegewezen aan de Lys-13 trifluoroacetylgroep.

Voor de overige F-signalen in LF1 werd geen rechtstreekse toewijzingsinformatie bekomen :

- de relaxatiestudie met Gd^{3+} toont aan dat het paramagnetisch effect op de F-signalen niet kan gecorreleerd worden met de afstand tussen de fluoratomen en de Gd^{3+}-bindingsplaats tussen Asp-52 en Glu-35;
- door middel van aminopeptidasen kan het N-eindstandige Lys-1 in natief lysozyme en in LF1 niet afgesplitst worden.

Om de veranderingen in een NMR spectrum o.i.v. bijvoorbeeld pH, inhibitorbinding, ... te kunnen interpreteren in functie van de structuur van het bestudeerde molecule is het nodig de signalen in het NMR spectrum toe te wijzen aan de overeenkomstige atomen in het molecule.

Uit de ^{19}F NMR studie van LF1 kunnen we afleiden dat de signalen in het ^{19}F NMR spectrum beïnvloed worden door factoren zoals pH en binding van inhibitoren en dat deze effecten zeer specifiek zijn : bij pH-verandering ondergaan de zes F-signalen een verschuiving met verschillende pK_a en $\Delta\delta$ (Tabel V-1) en bij de binding van inhibitoren en de concentratie-verandering ondergaan slechts één of twee F-signalen een verschuiving.

De waargenomen verschuivingen van de F-signalen zijn dus een gevolg van lokale veranderingen in de omgeving van de trifluoroacetylgroepen.

Vermits deze studie werd uitgevoerd op het lysozyme van kippe-eiwit, een enzym waarvan de kristalstructuur gekend (Blake et al., 1967a) en zeer analoog is aan de structuur in oplossing (Blake et al., 1978), is het mogelijk de resultaten van de ^{19}F NMR studie te interpreteren in functie van de omgeving van de fluoratomen in het enzym en op basis hiervan een voorstel tot toewijzing van de F-signalen aan de lysines te formuleren.

signaal	pH		inhibitorbinding		concentratieverhoging			T_1 (s) [1]	T_2 (s) [1]
	pK_a	$\Delta\delta$ (ppm)	$\Delta\delta_{NAG}$ (ppm)	$\Delta\delta_{(NAG)_3}$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	T_2 (s) 0,378 mM	T_2 (s) 1,203 mM		
1'	4,25 ± 0,7	-0,040							
1	4,30 ± 0,7	-0,041		-0,057				0,838 ± 0,015	0,392 ± 0,072
2	3,61 ± 0,04	-0,264						0,802 ± 0,009	0,249 ± 0,036
3	3,97 ± 0,3	-0,045	+0,010	+0,013		0,205 ± 0,014	0,135 ± 0,016	0,852 ± 0,015	0,205 ± 0,014
4								0,830 ± 0,011	0,196 ± 0,011
5	3,04 ± 0,6	+0,013			-0,033			0,881 ± 0,011	0,231 ± 0,030
6			+0,023	+0,040		0,124 ± 0,012	0,083 ± 0,008	0,966 ± 0,012	0,124 ± 0,012

Tabel V-9 : Overzicht van de resultaten van de ^{19}F NMR studie betreffende :

- de invloed van pH, inhibitorbinding en de concentratieverhoging op de chemische verschuiving van de F-signalen,
- de invloed van de concentratie-verhoging op de spin-spin relaxatietijd van de F-signalen,
- de spin-rooster en spin-spin relaxatietijd.

[1] T_1 en T_2 voor 0,378 mM LF1.

8.2. Voorstel tot toewijzing van de F-signalen aan de lysines in LF1

Hierna wordt voor ieder F-signaal in LF1 de resultaten van de ^{19}F NMR studie besproken en geïnterpreteerd op basis van de lysozyme structuur (een model van lysozyme (Labquip) werd gebouwd volgens de coördinaten gegeven door Imoto et al. (1972)).

Tabel V-9 geeft een samenvatting van de ^{19}F NMR resultaten.

signaal **1**

De ^{19}F NMR metingen (Tabel V-9) tonen aan dat signaal **1** :

- een verschuiving van 0,041 ppm naar lager veld ondergaat bij overgang van pH 2 naar pH 5,6, met pK_a 4,3 voor de naburige ioniserende groep (Fig. V-3, Tabel V-1);
- niet beïnvloed wordt door binding van NAG, maar een verschuiving van -0,057 ppm ondervindt door binding van $(NAG)_3$ (Fig. V-6);
- geen concentratie-effect ondergaat;
- een hoge spin-spin relaxatietijd T_2 heeft (Tabel V-3);
- een positie van -0,397 ppm heeft t.o.v. deze van ε-TFA-Lys bij pH 2,15.

Op basis van deze resultaten kunnen we signaal **1** toewijzen aan de Lys-97 trifluoroacetylgroep omwille van volgende argumenten :

1. Signaal **1** verschuift door binding van $(NAG)_3$, in bindingsplaatsen A-B-C, maar niet door binding van NAG, in plaats C. De verschuiving weerspiegelt de trage uitwisseling van $(NAG)_3$ (Dahlquist en Raftery, 1969) : er wordt geen gemiddeld signaal, met een positie evenredig met de fractie $(NAG)_3$ gebonden, waargenomen. Dit betekent dat de trifluoroacetylgroep van signaal **1** zich dicht bij bindingsplaats A of B moet bevinden.
   Lys-97 bevindt zich aan de bovenkant van de aktieve plaats, dicht bij Asp-101 dat waterstofbruggen vormt met de suikereenheden in plaatsen A en B.
   Voor Lys-97 werd op basis van deze nabijheid verondersteld dat het betrokken zou zijn bij de binding van suikereenheden (Neuberger en Wilson, 1967). Davies en Neuberger (1969) toonden echter aan dat de lysines geen invloed hebben op de hydrolyse van NAG-oligomeren.
   De overige lysines bevinden zich op grotere afstand van de bindingsplaatsen A en B.
2. Asp-101 heeft een pK_a 4,4-4,5 in natief lysozyme (Nakae et al., 1975b;

Fukae et al., 1979), zodat de ioniserende groep met pK_a 4,3 welke signaal 1 beïnvloedt mogelijk Asp-101 is.

3. Lys-97 is vrij toegankelijk voor het solvent (Imoto et al., 1972) waardoor de zijketen een grotere beweeglijkheid heeft dan deze van de overige lysines, overeenkomend met de grote spin-spin relaxatietijd T_2.
4. De positie van signaal 1 bij laag veld t.o.v. de overige signalen bij pH 2 is mogelijk te wijten aan een ringstroom effect van de naburige Trp-62 en Trp-63.

signaal 1'

Uit de ^{19}F NMR studie blijkt dat signaal 1' :

- een verschuiving van -0,040 ppm ondergaat bij pH-verhoging van pH 2 naar pH 5,6 met een pK_a 4,25 voor de ioniserende groep (Fig. V-3, Tabel V-1);
- niet beïnvloed wordt door binding van NAG en $(NAG)_3$ of door concentratie-veranderingen;
- een lage intensiteit heeft in het ^{19}F NMR spectrum van LF1 en een grotere intensiteit heeft in de spectra van LF2 en LF3 (Fig. V-1).

De effecten op signaal 1' door veranderingen in pH (Fig. V-3, Tabel V-1) en in ionensterkte (Fig. V-5) zijn analoog aan deze voor signaal 1.

Uit de spectra van LF1, LF2 en LF3 (Fig. V-1) lijkt er een verband te bestaan tussen de intensiteit van signalen 1 en 1' en de substitutiegraad van de lysozyme derivaten : in het LF1 spectrum zien we voornamelijk signaal 1, in de spectra van LF2 en LF3 neemt de intensiteit van signaal 1' toe en daalt de intensiteit van signaal 1.

Hieruit kunnen we afleiden dat signaal 1' eveneens te wijten is aan de Lys-97 trifluoroacetylgroep, maar afkomstig van lysozyme derivaten met een lagere substitutiegraad. Dit betekent dat de resonantiepositie van de Lys-97 trifluoroacetylgroep afhankelijk is van de substitutie van één of meer van de overige lysine aminogroepen.

In tegenstelling tot signaal 1 ondergaat signaal 1' geen verschuiving onder invloed van $(NAG)_3$.

Deze resultaten doen veronderstellen dat de Lys-97 trifluoroacetylgroep zich in een licht verschillende omgeving bevindt indien één of meer van de overige lysine aminogroepen niet getrifluoroacetyleerd zijn, overeen-

komend met signaal 1' en signaal 1, en dat binding van $(NAG)_3$ slechts de fluoratomen in een omgeving overeenkomend met signaal 1 beïnvloedt.
Op basis van de beschikbare gegevens is de verklaring hiervoor niet duidelijk.

signaal 3

Voor signaal 3 kunnen we het volgende afleiden uit de ^{19}F NMR metingen:

- een verschuiving van -0,045 ppm bij pH verhoging met pK_a 3,97 voor de ioniserende groep (Fig. V-3, Tabel V-1);
- een zeer lichte verschuiving naar hoger veld door binding van NAG en $(NAG)_3$ (Fig. V-6);
- een lichte daling van T_2 bij concentratieverhoging (Tabel V-3).

Uit de pH-titratie blijkt dat signaal 3 beïnvloed wordt door de ionisatie van een carboxylgroep met pK_a 3,97. Van de zes lysines in lysozyme bevinden Lys-13, Lys-97 en Lys-1 zich in de omgeving van carboxylgroepen. Vermits signaal 2 is toegewezen aan Lys-13 en signaal 1 kan toegewezen worden aan Lys-97 en vermits signalen 4, 5 en 6 weinig beïnvloed worden door pH-veranderingen, kan signaal 3 toegewezen worden aan de trifluoroacetylgroep gebonden aan de ε-aminogroep van Lys-1.

De groep met pK_a 3,97 die signaal 3 beïnvloedt is mogelijk Glu-7 :

1. In het lysozyme kristal is er een zoutbrug tussen Glu-7 en de ε-aminogroep van Lys-1 (Browne et al., 1969).
2. Door een ^{13}C NMR studie van de carboxylgroepen in lysozyme bepaalden Shindo et al. (1978) een pK_a 2,6 voor Glu-7 in natief lysozyme. Na omvormen van 4,7 lysines in homoarginyl groepen vonden deze auteurs een pK_a 3,2 voor Glu-7, en besloten dat er in oplossing eveneens een zoutbrug gevormd wordt tussen Glu-7 en Lys-1.
   Deze zoutbrug werd bevestigd door een ^{13}C NMR studie van dimethyllysine groepen in ^{13}C gemethyleerd lysozyme (Gerken et al., 1982).
3. De pK_a 3,97 voor Glu-7 bepaald op basis van de verschuiving van signaal 3, is hoger dan de pK_a 2,6 in natief lysozyme hetgeen de interactie tussen Glu-7 en Lys-1 nogmaals bevestigt. Het verschil met de pK_a 3,2, bepaald door Shindo et al. (1978) voor Glu-7 in homoarginyllysozyme, is mogelijk te wijten aan de onvolledige reactie tot homoarginyl groepen in deze studie.

signaal 5

Uit de ^{19}F NMR studie blijkt dat signaal 5 :

- weinig beïnvloed wordt door pH-veranderingen;
- niet verschuift door binding van NAG en $(NAG)_3$ aan LF1;
- bij concentratie-verhoging 0,033 ppm naar lager veld verschuift (Fig. V-7).

Lysozyme ondergaat zelf-associatie bij hogere pH waarbij de aktieve plaats (Banerjee et al., 1975; Norton en Allerhand, 1977; Shindo et al., 1977) en de omgeving van His-15 (Venkatappa en Steinrauf, 1969; Shindo et al., 1977; Wooten en Cohen, 1979; Perkins en Dwek, 1980) betrokken zijn.

Vermits geen van de lysines zich in de aktieve plaats bevindt, moet signaal 5 afkomstig zijn van de trifluoroacetylgroep gebonden aan een lysine in de omgeving van His-15. Lys-96 bevindt zich op ongeveer 0,7 nm van de histidine ring, de overige lysines bevinden zich of afstanden van ongeveer 1 nm voor Lys-1 tot 3,1 nm voor Lys-116 van His-15.

Hieruit kunnen we afleiden dat signaal 5 vermoedelijk kan toegewezen worden aan de Lys-96 trifluoroacetylgroep.

Het effect van de concentratie-verhoging op de spin-spin en spin-rooster relaxatietijd van signaal 5 is moeilijk na te gaan omwille van het samenvallen van signaal 5 met signaal 4 bij hogere concentratie.

Hierbij dient opgemerkt dat de pH-curve van signaal 5 geen aanduiding geeft voor de ionisatie van His-15. In natief lysozyme heeft His-15 een pK_a 5,8 zodat men boven pH 5 een verschuiving van signaal 5 zou verwachten. Dit is echter niet het geval (Fig. V-3). Een mogelijke verklaring is dat de reactie op de ε-aminogroepen de pK_a van His-15 doet stijgen zodat de ionisatie buiten het bestudeerde pH-gebied valt.

signaal 6

Uit de ^{19}F NMR studie kunnen we afleiden dat signaal 6 :

- naar lager veld verschuift boven pH 5 (Fig. V-3);
- in aanwezigheid van NAG en $(NAG)_3$ naar hoger veld verschuift met resp. 0,023 ppm en 0,040 ppm (Fig. V-6);
- een kleine T_2 en grote T_1 heeft (Tabel V-3);
- door concentratie-verhoging niet verschuift, maar een daling van T_2 ondervindt (Tabel V-3).

Vermits signaal 6 een verschuiving ondervindt naar hoger veld door binding van NAG en van $(NAG)_3$ is dit effect voornamelijk te wijten aan binding in bindingsplaats C, de plaats welke door beide inhibitoren bezet wordt.

De lysines welke zich in de omgeving van de bindingsplaats bevinden zijn Lys-97, aan de bovenkant van de aktieve plaats dicht bij Asp-101, en Lys-33, aan de onderkant van de aktieve plaats.

Op basis van de verschuiving door binding van $(NAG)_3$ en van de pH-curve die de ionisatie van een groep met pK_a 4,3 aanduidt, werd signaal 1 toegewezen aan Lys-97.

Dit betekent dat signaal 6 kan toegewezen worden aan de Lys-33 trifluoroacetylgroep, eveneens omwille van volgende argumenten :

1. De verschuiving van signaal 6 door pH-verhoging, boven pH 5, kan veroorzaakt worden door de ionisatie van Glu-35. Deze groep heeft een pK_a 6,1 in natief lysozyme (Kuramitso en Hamaguchi, 1980).
   De afstand tussen de Lys-33 trifluoroacetylgroep en de Glu-35 carboxylgroep bedraagt ongeveer 1,5 nm waardoor een rechtstreeks ladingseffect van de ionisatie van Glu-35 op de fluoratomen weinig waarschijnlijk is. De deprotonering van de Glu-35 carboxylgroep veroorzaakt een lichte conformatie-verandering rond Glu-35 en Trp-108 en dit effect kan de positie van naburige groepen, o.a. Lys-33, beïnvloeden (Blake et al., 1978).
2. In aanwezigheid van NAG en $(NAG)_3$ verschuift signaal 6 naar hoger veld. De Lys-33 trifluoroacetylgroep bevindt zich op grote afstand (meer dan 1,5 nm) van de bindingsplaats zodat ook hier een rechtstreeks effect weinig waarschijnlijk is.
   Een mogelijke verklaring voor deze verschuiving kan gezocht worden in de invloed van inhibitorbinding op de pK_a van Glu-35. Door binding van β-methyl-NAG en van $(NAG)_3$ stijgt de pK_a van Glu-35 van 6,1 naar 6,5 (Nakae et al., 1975b). Dit betekent dat, bij constante pH, door binding van inhibitoren de fractie van de Glu-35 carboxylgroep in de geprotoneerde vorm stijgt, hetgeen de verschuiving van signaal 6 naar hoger veld kan verklaren.
3. Alhoewel Lys-33 een relatief hoge solventtoegankelijkheid heeft (Tabel I-4), heeft signaal 6 de laagste T_2 van de zes F-signalen van LF1.
   De zijketen van Lys-33 wordt omringd door de zijgroepen van Phe-34, Trp-123, Phe-38 en Asn-37 waardoor de Lys-33 zijketen een geringe beweeglijkheid bezit, hetgeen de lage spin-spin relaxatietijd kan verklaren.

signaal 4

De ^{19}F NMR metingen tonen aan dat signaal 4 :

- weinig verschuift door pH-veranderingen;
- niet beïnvloed wordt door binding van inhibitoren of door concentratie-verandering.

Vermits de overige signalen toegewezen zijn aan de lysines op basis van specifieke veranderingen in het ^{19}F NMR spectrum, kan signaal 4 toegewezen worden aan het resterende Lys-116.

De geringe effecten op signaal 4 komen overeen met de afwezigheid van groepen die in het beschouwde pH-gebied ioniseren in de omgeving van Lys-116 en de grote afstand van Lys-116 tot de aktieve plaats.

8.3. Besluit

We kunnen besluiten dat de resultaten van de ^{19}F NMR studie van LF1 kunnen geïnterpreteerd worden in functie van de gekende lysozymestructuur en dat op basis hiervan een voorstel tot toewijzing van de F-signalen aan de trifluoroacetyllysine groepen in LF1 kan geformuleerd worden. Dit toewijzingsvoorstel wordt samengevat in Tabel V-10.

signaal	toewijzing	
1'	Lys-97	pH
1	Lys-97	$(NAG)_3$, pH
2	Lys-13	des-Leu-129-LF1
3	Lys-1	pH
4	Lys-116	-
5	Lys-96	concentratie
6	Lys-33	NAG, $(NAG)_3$

Tabel V-10 : Voorstel tot toewijzing van de F-signalen in LF1 aan de lysines op basis van de aangegeven perturbaties van het ^{19}F NMR spectrum.
Signaal 2 werd eenduidig toegewezen aan Lys-13 op basis van de vergelijking van de ^{19}F NMR spectra van LF1 en des-Leu-129-LF1.

§ 9. Onderzoek van het $^{19}F\{^1H\}$ nucleair Overhauser effect in LF1

9.1. Het nucleair Overhauser effect

Het nucleair Overhauser effect kan informatie opleveren over de ruimtelijke nabijheid van atomen in een moleculaire structuur.

In een fluor gemerkt proteïne kan de nabijheid van fluor- en waterstofatomen nagegaan worden door het bestralen van bepaalde signalen in het ^1H NMR spectrum en door het effect hiervan op het ^{19}F NMR spectrum te onderzoeken. De fluoratomen welke zich dicht bij de bestraalde waterstofatomen bevinden kunnen een verandering in de intensiteit van hun ^{19}F NMR signaal ondervinden.

9.2. $^{19}F\{^1H\}$ NOE metingen

Het $^{19}F\{^1H\}$ NOE werd bepaald d.m.v. de DOCYCL sequentie (Gray, 1984), zodanig uitgebreid dat verschilspectra worden bekomen op het niveau van het FID (Hoofdstuk II, § 9.4).

De metingen werden uitgevoerd met LF1 1,4 mM in D_2O bij 37°C.
Fig. V-12a toont het ^{19}F NMR spectrum van LF1 onder deze omstandigheden.
Het $^{19}F\{^1H\}$ NOE werd nagegaan bij bestraling van het H_2O signaal (Fig. V-12b), van het Ile-98 γCH_3 signaal (Fig. V-12c) en van het His-15 C_2H signaal (Fig. V-12c).
Uit Fig. V-12 blijkt dat :

- bij bestraling van H_2O, van Ile-98 γCH_3 en van His-15 C_2H het resulterende NOE verschilspectrum de zes F-signalen bevat;
- bij bestraling van H_2O (Fig. V-12b) de relatieve intensiteit van signaal **6** toeneemt in vergelijking met de intensiteit in het ^{19}F NMR spectrum (Fig. V-12a);
- door bestraling van Ile-98 γCH_3 (Fig. V-12c) de relatieve intensiteit van signalen **1**, **2** en **3** toeneemt en deze van signalen **5** en **6** afneemt (t.o.v. signaal **4** als referentie) in vergelijking met de intensiteit in het ^{19}F NMR spectrum (Fig. V-12a);
- bij bestraling van His-15 C_2H (Fig. V-12d) de relatieve intensiteit van signalen **2**, **3**, **5** en **6** toeneemt (t.o.v. signaal **4** als referentie) in vergelijking met de intensiteit in het ^{19}F NMR spectrum (Fig. V-12a).

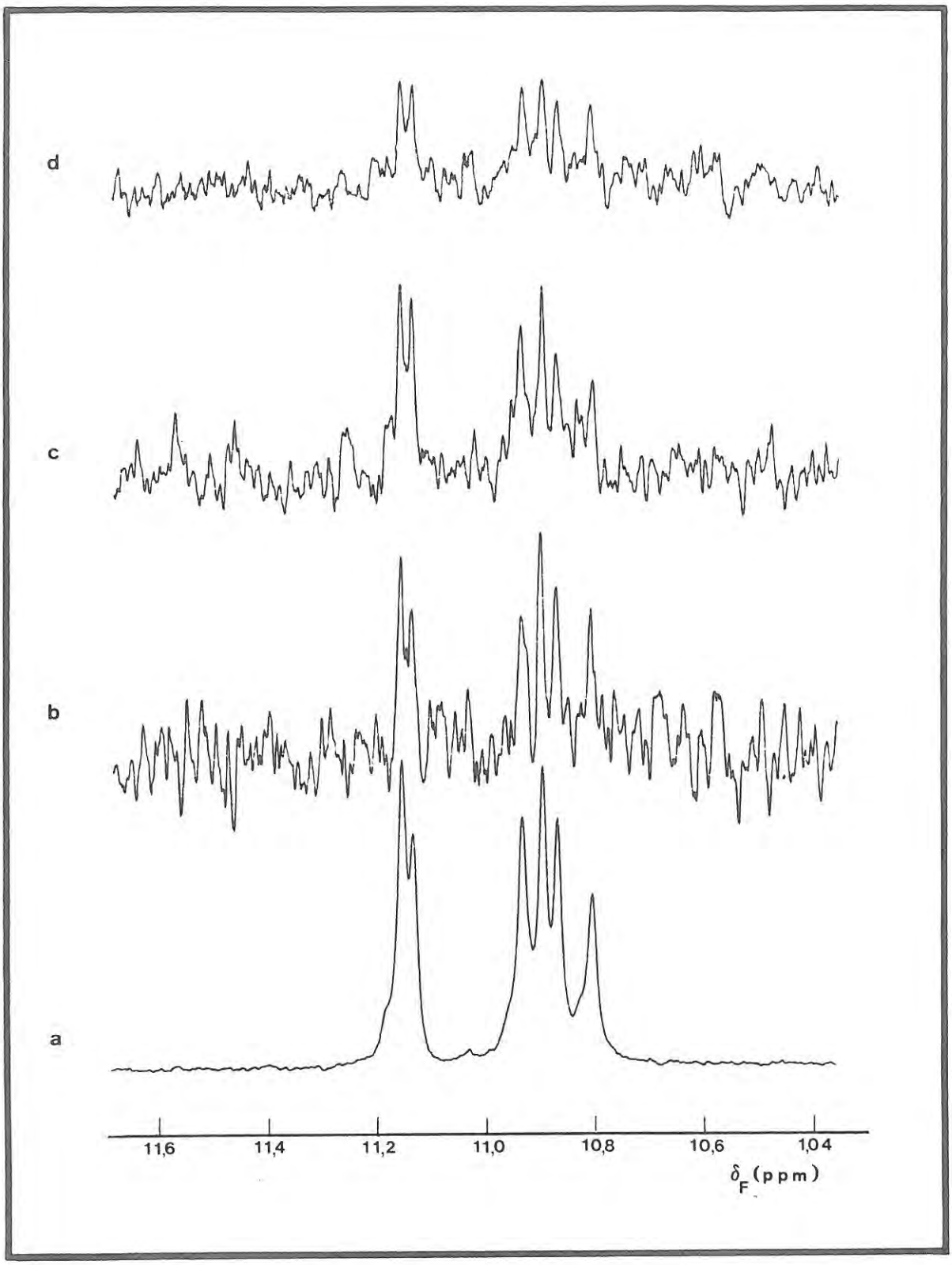


Fig. V-12 : $^{19}F\{^1H\}$ NOE metingen : het ^{19}F NMR spectrum van LF1 1,4 mM in D_2O bij 37°C (a) en NOE verschilspectra bekomen d.m.v. de DOCYCL sequentie bij bestraling van het H_2O signaal (b), van het Ile-98 γCH_3 signaal (c) en van het His-15 C_2H signaal (d). De NOE verschilspectra werden verkregen met NT 3136 (b), 5818 (c) en 4000 (d).

9.3. Bespreking

De bestraling van het ^1H signaal van H_2O, van Ile-98 γCH_3 en van His-15 C_2H veroorzaakt een NOE op de zes F-signalen van LF1 (Fig. V-12). Er is echter een verschil in de intensiteit van de signalen in de NOE verschilspectra (Fig. V-12).

Uit de $^{19}F\{^1H\}$ NOE metingen kunnen we het volgende afleiden :

1. Vermits de zes F-signalen een NOE ondervinden bij bestraling van het H_2O signaal bezitten de fluoratomen een grote solventtoegankelijkheid. Signaal **6** ondervindt een relatief groter NOE dan de overige signalen (in vergelijking met de intensiteit van de signalen in het ^{19}F NMR spectrum). Dit betekent dat de trifluoroacetylgroep overeenkomend met signaal **6** een relatief grotere solventtoegankelijkheid bezit dan de overige fluoratomen.
2. Een bestraling van de ^1H signalen van Ile-98 γCH_3 en van His-15 C_2H geeft geen selectief NOE op een van de F-signalen.
   De ^1H signalen van Ile-98 γCH_3 en van His-15 C_2H zijn geresolveerd in het ^1H NMR spectrum van LF1 in D_2O (bij 0,24 ppm en 8,34 ppm resp.). Deze waterstofatomen bevinden zich relatief dicht (0,6-1 nm) bij de trifluoroacetylgroepen gebonden aan Lys-97 en Lys-96 resp.. Op basis hiervan zou men verwachten dat de Lys-97 en Lys-96 trifluoroacetylgroepen een groter NOE zouden ondervinden dan de overige F-signalen. Dit is echter niet het geval.
   Het waargenomen NOE in Fig. V-12c en in Fig. V-12d weerspiegelt dus niet de nabijheid van bepaalde fluoratomen t.o.v. de bestraalde waterstofatomen, maar is een gevolg van magnetisatie-overdracht tussen de bestraalde waterstofatomen en de fluoratomen via snel uitwisselende H_2O moleculen.
3. Dit betekent dat deze $^{19}F\{^1H\}$ NOE metingen van LF1 niet kunnen gebruikt worden om het toewijzingsvoorstel, dat besproken werd in § 8.2, te bevestigen.

In diverse studies van F-gemerkte proteïnen worden wel selectieve $^{19}F\{^1H\}$ NOE's waargenomen, o.a. in de studie van F-gemerkt α-chymotrypsine, via 1-D NMR (Gerig et al., 1979a, 1979b) en via 2-D NMR (Hammond, 1984; Cairi en Gerig, 1985). In dit F-gemerkt proteïne bevinden de fluoratomen zich voornamelijk in het inwendige van het proteïne en zijn grotendeels afgeschermd van het solvent.

Op basis van theoretische berekeningen voor een p-fluorofenylgroep in een proteïne besluit Gerig (1977) dat selectieve $^{19}F\{^{1}H\}$ NOE metingen in een F-gemerkt proteïne moeten toelaten de interagerende waterstofatomen te identificeren, voor proteïnen met een molecuulgewicht lager dan 20000.

Hierbij moeten we echter opmerken dat de selectiviteit van de $^{19}F\{^{1}H\}$ NOE metingen afhankelijk is van de omgeving van de fluoratomen in het proteïne. Uit onze studie blijkt dat het NOE voor de trifluoroacetyl-groepen in LF1, welke zich aan de oppervlakte van het molecule bevinden, voornamelijk afkomstig is van het omringende water en niet rechtstreeks van de bestraalde ^{1}H signalen.

§ 10. Samenvatting

Uit de ^{19}F NMR studie van de trifluoroacetylderivaten van het lysozyme van kippe-eiwit kunnen we het volgende afleiden :

1. Het ^{19}F NMR spectrum van LF1 (Fig. V-1) bevat zes signalen van nagenoeg gelijke intensiteit, overeenkomend met de zes ε-trifluoroacetyllysine groepen.

2. Uit de ^{19}F NMR spectra van LF2 en LF3 (Fig. V-1) blijkt dat deze derivaten mengsels zijn van lysozyme moleculen waarin telkens een verschillende lysine zijketen niet getrifluoroacetyleerd is.

3. De F-signalen in het ^{19}F NMR spectrum van LF1 ondergaan een verschillende verschuiving bij pH-veranderingen (Fig. V-3). Voor signalen **1'**, **1**, **2**, **3** en **5** kan op basis van deze verschuiving de ionisatie-constante van de naburige ioniserende groep bepaald worden (Tabel V-1).

4. Door een vergelijking van de ^{19}F NMR-spectra van LF1 en van des-Leu-129-LF1 (Fig. V-2) kan signaal **2** toegewezen worden aan de Lys-13 trifluoroacetylgroep.

5. Een verandering van de ionensterkte van de LF1 oplossing bij pH 2,15, pH 3,55 en pH 5,60 veroorzaakt een verschuiving van de F-signalen (Fig. V-5).

6. De aanwezigheid van NAG veroorzaakt een lichte verschuiving van signaal **6**; $(NAG)_3$ veroorzaakt een verschuiving van signalen **1** en **6** (Fig. V-6).
   Voor signaal **6** wordt een gemiddeld signaal waargenomen afhankelijk van de fractie $(NAG)_3$ gebonden, voor signaal **1** wordt de afzonderlijke positie in LF1 en in het LF1-$(NAG)_3$ complex waargenomen (Fig. V-6).

7. Bij verhoging van de LF1 concentratie ondergaat signaal **5** een verschuiving naar lager veld (Fig. V-7).

8. De F-signalen in LF1 hebben verschillende T_1 en T_2 waarden (Tabel V-3) hetgeen duidt op een verschil in beweeglijkheid van de omgeving van de fluoratomen.

9. De relaxatiestudie met Gd^{3+} toont aan dat de paramagnetische bijdrage in de spin-rooster relaxatietijd van de F-signalen niet te correleren

is met de afstand tussen de fluoratomen en de Gd^{3+}-bindingsplaats tussen Asp-52 en Glu-35.
Het relaxatie-effect door Gd^{3+} en de verschuiving o.i.v. Dy^{3+}, Ho^{3+} en Yb^{3+} moet toegeschreven worden aan een niet-specifiek effect van de lanthanide-ionen.

10. Op basis van de ^{19}F NMR studie en de gekende lysozyme structuur kan een gefundeerd voorstel tot toewijzing van de F-signalen aan de lysines geformuleerd worden (Tabel V-10).

11. De $^{19}F\{^1H\}$ NOE metingen tonen aan dat de bestraling van de ^1H signalen van Ile-98 γCH_3 en van His-15 C_2H niet resulteert in een selectief NOE op de F-signalen. De NOE metingen kunnen niet gebruikt worden om het toewijzingsvoorstel te bevestigen.

EINDBESPREKING EN SAMENVATTING

Het onderzoek van de structuur en aktiviteit van proteïnen vereist informatie betreffende de omgeving en interacties van de aminozuren in het proteïne. Voor een aantal aminozuren, zoals deze met aromatische zijketens, kan dergelijke informatie via verschillende spectroscopische technieken, waaronder ^{1}H en ^{13}C NMR, verkregen worden. Andere aminozuren, o.a. de lysines, zijn echter moeilijk te bestuderen in een natief proteïne.

In deze studie werd nagegaan of het binden van een fluor merker aan de lysine zijketens van het lysozyme van kippe-eiwit en de ^{19}F NMR studie van het gevormde lysozyme derivaat informatie kan opleveren betreffende de omgeving van de lysines in het enzym.

Door reactie van lysozyme met S-ethyltrifluorothioacetaat en met azijnzuuranhydride en scheiding van de reactiemengsels op de kationenwisselaar CM-Sepharose CL-6B werden de lysozyme derivaten LF1 en LH1 bereid (Hoofdstuk III). Het trifluoroacetyllysozyme derivaat LF1 bevat gemiddeld één vrije aminogroep, welke voornamelijk de α-aminogroep is (Hoofdstuk IV).

Het invoeren van trifluoroacetylgroepen op de zes ε-aminogroepen van lysozyme heeft weinig invloed op de structuur van het enzym. Een vergelijking van het circulair dichroïsme spectrum en het ^{1}H NMR spectrum van LF1 met deze van natief lysozyme wijst op slechts lichte lokale conformationele effecten door de trifluoroacetylering (Hoofdstuk IV).

De aktiviteit en temperatuurstabiliteit van LF1 en LH1 zijn lager dan deze van het natieve lysozyme, door het verlies van de positieve lading op de aminogroepen van het enzym (Hoofdstuk IV).

De ^{19}F NMR studie van LF1 (Hoofdstuk V) toont aan dat de omgeving van de zes trifluoroacetylgroepen verschillend is en dat deze groepen een verschillend effect ondervinden door pH-veranderingen, door binding van inhibitoren en door verandering van de LF1 concentratie.

Door een vergelijking van de ^{19}F NMR spectra en de pH-curven van LF1 met deze van des-Leu-129-LF1 kan signaal 2 toegewezen worden aan de Lys-13 trifluoroacetylgroep. Voor de overige F-signalen werd geen rechtstreekse toewijzingsinformatie bekomen. De relaxatiestudie met Gd^{3+} toont aan dat de paramagnetische bijdrage in de spin-rooster relaxatietijd niet te corre-

leren is met de afstand tussen de fluoratomen en de Gd^{3+}-bindingsplaats tussen Asp-52 en Glu-35.

Op basis van de ^{19}F NMR studie van LF1 en van de gekende lysozyme structuur kan een voorstel tot toewijzing van de F-signalen aan de lysines geformuleerd worden (Tabel V-10).

Door de mobiliteit van de watermoleculen kunnen de $^{19}F\{^1H\}$ NOE metingen niet gebruikt worden ter bevestiging of als tegenargument voor het toewijzingsvoorstel.

Niettegenstaande het feit dat dit onderzoek werd uitgevoerd op het lysozyme van kippe-eiwit, een enzym dat reeds uitvoerig bestudeerd werd, levert de studie van LF1 nieuwe informatie betreffende de structuur en eigenschappen van lysozyme.

De ioniserende groep met pK_a 3,6 welke signaal 2, toegewezen aan de Lys-13 trifluoroacetylgroep, beïnvloedt is de α-carboxylgroep van Leu-129. De pK_a van de α-carboxylgroep in natief lysozyme bedraagt 3,1 (Shindo et al., 1978). Het verbreken van de zoutbrug tussen de Lys-13 ε-aminogroep en de α-carboxylgroep beïnvloedt zowel de pK_a van de Lys-13 ε-aminogroep (Gerken et al., 1982) als de pK_a van de α-carboxylgroep (Shindo et al., 1978; onze studie).

De trifluoroacetylgroepen overeenkomend met signalen **1** en **3** bevinden zich in de omgeving van ioniserende groepen met pK_a 4,30 en pK_a 3,97 resp.. Signalen **1** en **3** kunnen wellicht toegewezen worden aan de Lys-97 en Lys-1 trifluoroacetylgroepen resp..

De groep met pK_a 4,3 is waarschijnlijk Asp-101, waarvoor een pK_a 4,5 vermeld werd (Nakae et al., 1975b; Fukae et al., 1979).

De ioniserende groep met pK_a 3,97 is waarschijnlijk Glu-7. In natief lysozyme bedraagt de pK_a van deze carboxylgroep 2,6. De hogere pK_a van Glu-7 in LF1 t.o.v. de waarde in natief lysozyme is een aanduiding voor de zoutbrug tussen Glu-7 en de ε-aminogroep van Lys-1 in natief lysozyme. Dit bevestigt de bevindingen van Gerken et al. (1982) en van Shindo et al. (1978).

De binding van $(NAG)_3$ aan LF1 veroorzaakt een verschuiving van signaal **1**. Deze verschuiving weerspiegelt de trage uitwisseling van $(NAG)_3$ (Dahlquist en Raftery, 1969). De trifluoroacetylgroep overeenkomend met signaal **1** bevindt zich dus dicht bij de $(NAG)_3$ bindingsplaats, alhoewel

geen van de lysines in lysozyme betrokken is bij de binding en hydrolyse van sacchariden (Davies en Neuberger, 1969).

Bij verhoging van de LF1 concentratie ondervindt signaal 5 een verschuiving. Dit betekent dat een van de lysines, namelijk deze overeenkomend met signaal 5, beïnvloed wordt door de zelf-associatie van lysozyme en dat dit lysine zich in de omgeving van de associatieplaats moet bevinden.

Het relaxatie-effect van Gd^{3+} op de F-signalen is niet te correleren met de afstand tussen de fluoratomen en de Gd^{3+}-bindingsplaats tussen Asp-52 en Glu-35. In een analoge studie onderzochten Bradbury en Brown (1973) de ionisatie en de invloed van Gd^{3+} op de relaxatie van de gemethyleerde lysine aminogroepen in lysozyme via ^1H NMR. Deze auteurs wezen de N-methylsignalen in het ^1H NMR spectrum toe aan de lysines op basis van het relaxatie-effect van Gd^{3+} en de berekende afstand tussen de N-methylgroepen en de Gd^{3+}-bindingsplaats.

Uit onze studie moeten we echter afleiden dat deze toewijzingsmethode in dit geval niet bruikbaar is (omwille van de grote afstand tussen de geobserveerde atomen en de Gd^{3+}-bindingsplaats). Dit betekent dat de ionisatieconstanten van de lysine aminogroepen zoals deze bepaald werden door Bradbury en Brown (1973), en later vermeld door Kuramitsu en Hamaguchi (1980), waarschijnlijk niet juist zijn.

Uit de circulair dichroïsme spectra blijkt dat de acetylering van de aminogroepen van lysozyme één of meerdere van de aromatische groepen in het enzym beïnvloedt (onze studie; Nakae et al., 1972).
De ^1H NMR spectra van L, LF1 en LH1 tonen aan dat het Trp-108 NH signaal in LF1 en LH1 verschoven is t.o.v. de positie in natief lysozyme. Dit betekent dat de ^1H NMR spectra een duidelijke aanwijzing geven voor een lichte verandering in de oriëntatie van Trp-108 of van groepen in zijn omgeving door acetylering van de aminogroepen van lysozyme. Dit bevestigt de bevindingen van Teichberg et al. (1970) dat veranderingen in het aromatisch circulair dichroïsme spectrum van lysozyme voornamelijk te wijten zijn aan veranderingen in de omgeving van Trp-108.

In deze studie werd eveneens de transitietemperatuur T_m voor L, LF1 en LH1 bepaald in waterig midden. Imoto et al. (1967a) bepaalden in 3 M GuHCl pH 5,5 een T_m van 30,7°C en 48°C voor acetyllysozyme en natief lysozyme resp.. In waterig midden is de T_m voor LF1 en LH1 eveneens lager dan

deze voor natief lysozyme. Boven pH 4 ondergaan deze lysozyme derivaten irreversibele denaturatie bij hogere temperatuur. Dit is duidelijk in tegenstelling met de bevinding van Yamasaki et al. (1968a) dat acetyllysozyme dezelfde temperatuurstabiliteit bezit als natief lysozyme.

We kunnen dus besluiten dat de ^{19}F NMR studie van fluor gemerkte proteïnen een interessante mogelijkheid biedt om bijkomende gegevens over de structuur en eigenschappen van het proteïne te bekomen. Hierbij dient echter wel opgemerkt dat, zoals bij iedere 'probing' techniek, moet nagegaan worden in welke mate het invoeren van de gefluoreerde groepen de conformatie en aktiviteit van het proteïne beïnvloeden.

REFERENTIES

ADLER, A.J., GREENFIELD, N.J. and FASMAN, G.D. (1973). Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. Meth. Enzymol. **27**, 675-735.

AGRESTI, D.G., LENKINSKI, R.E. and GLICKSON, J.D. (1977). Lanthanide induced NMR perturbations of HEW lysozyme : evidence for nonaxial symmetry. Biochem. Biophys. Res. Commun. **76**, 711-719.

ALLERHAND, A., NORTON R.S. and CHILDERS, R.F. (1977). Studies of individual carbon sites of hen egg white lysozyme by natural abundance carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Biol. Chem. **252**, 1786-1794.

ANANTHANARAYANAN, V.S. and BIGELOW, C.C. (1969). Unusual difference spectra of proteins containing tryptophan. II. Studies with proteins. Biochemistry **8**, 3723-3728.

AUNE, K.C., SALAHUDDIN, A., ZARLENGO, M.H. and TANFORD, C. (1967). Evidence for residual structure in acid- and heat-denatured proteins. J. Biol. Chem. **242**, 4486-4489.

AXELSEN, N.H., KRØLL, J. and WEEKE, B. (1973). A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Universiteitsforlaget, Oslo, p. 27.

BANERJEE, S.K., POGOLOTTI, A.Jr. and RUPLEY, J.A. (1975). Self-association of lysozyme. J. Biol. Chem. **250**, 8260-8266.

BANERJEE, S.K. and RUPLEY, J.A. (1973). Temperature and pH dependence of the binding of oligosaccharides to lysozyme. J. Biol. Chem. **248**, 2117-2124.

BARRY, C.D., GLASEL, J.A., WILLIAMS, R.J.P. and XAVIER, A.V. (1974). Quantitative determination of conformations of flexible molecules in solution using lanthanide ions as nuclear magnetic resonance probes : application to adenosine-5'-monophosphate. J. Mol. Biol. **84**, 471-490.

BLAKE, C.C.F., GRACE, D.E.P., JOHNSON, L.N., PERKINS, S.J., PHILLIPS, D.C., CASSELS, R., DOBSON, C.M., POULSEN, F.M. and WILLIAMS, R.J.P. (1978). Physical and chemical properties of lysozyme. Mol. Int. Act. Proteins, Ciba Found. Symp. **60**, 137-185.

BLAKE, C.C.F., JOHNSON, L.N., MAIR, G.A., NORTH, A.C.T., PHILLIPS, D.C. and SARMA, V.R. (1967b). Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. Proc. Roy. Soc. Lond. B **167**, 378-388.

BLAKE, C.C.F., KOENIG, D.F., MAIR, G.A., NORTH, A.C.T., PHILLIPS, D.C. and SARMA, V.R. (1965). Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourrier synthesis at 2 angström resolution. Nature (London) **206**, 757-761.

BLAKE, C.C.F., MAIR, G.A., NORTH, A.C.T., PHILLIPS, D.C. and SARMA, V.R. (1967a). On the conformation of the hen egg-white lysozyme molecule. Proc. Roy. Soc. Lond. B **167**, 365-377.

BRADBURY, J.H. and BROWN, L.R. (1973). Determination of the dissociation constants of the lysine residues of lysozyme by proton magnetic resonance spectroscopy. Eur. J. Biochem. **40**, 565-576.

BROWNE, W.J., NORTH, A.C.T., PHILLIPS, D.C., BREW, K., VANAMAN, T.C. and HILL, R.L. (1969). A possible three-dimensional structure of bovine α-lactalbumin based on that of hen's egg-white lysozyme. J. Mol. Biol. **42**, 65-86.

CAIRI, M. and GERIG, J.T. (1985). Two-dimensional protein-to-ligand transferred NOE in 4-fluorocinnamate-chymotrypsin complexes. J. Magn. Reson. **62**, 131-135.

CAMPBELL, I.D., DOBSON, C.M. and WILLIAMS, R.J.P. (1975). Nuclear magnetic resonance studies on the structure of lysozyme in solution. Proc. Roy. Soc. Lond. A **345**, 41-59.

CAMPBELL, I.D., DOBSON, C.M., WILLIAMS, R.J.P. and XAVIER, A.V. (1973). Resolution enhancement of protein NMR spectra using the difference between a broadened and a normal spectrum. J. Magn. Reson. **11**, 172-181.

CANFIELD, R.E. (1963a). Peptides derived from tryptic digestion of egg white lysozyme. J. Biol. Chem. **238**, 2691-2697.

CANFIELD, R.E. (1963b). The amino acid sequence of egg-white lysozyme. J. Biol. Chem. **238**, 2698-2707.

CASSELS, R., DOBSON, C.M., POULSEN, F.M. and WILLIAMS, R.J.P. (1978). Study of the tryptophan residues of lysozyme using ^{1}H nuclear magnetic resonance. Eur. J. Biochem. **92**, 81-97.

DAHLQUIST, F.W. and RAFTERY, M.A. (1968). A nuclear magnetic resonance study of association equilibria and enzyme-bound environments of N-acetyl-D-glucosamine anomers and lysozyme. Biochemistry **7**, 3269-3277.

DAHLQUIST, F.W. and RAFTERY, M.A. (1969). Some properties of contiguous binding subsites on lysozyme as determined by proton magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry **8**, 713-725.

DAVIES, R.C. and NEUBERGER, A. (1969). Modification of lysine and arginine residues of lysozyme and the effect on enzymatic activity. Biochim. Biophys. Acta **178**, 306-317.

DAVIES, R.C., NEUBERGER, A. and WILSON, B.M. (1969). The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. Biochim. Biophys. Acta **178**, 294-305.

DICKERSON, R.E. and GEIS, I. (1969). The structure and action of proteins. Benjamin Inc., California.

DILL, K. and ALLERHAND, A. (1977). Effect of chemical modifications at tryptophan-108 on binding of lanthanide ions to hen egg-white lysozyme. Application of natural-abundance carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry **16**, 5711-5716.

DWEK, R.A. (1973). Nuclear magnetic resonance in biochemistry. Applications to enzyme systems. Clarendon Press, Oxford, p. 65-75.

FALES, H.M., NAGAI, Y., MILNE, G.W.A., BREWER, H.B., BRONZERT, T.J. and PISANO, J.J. (1971). Use of chemical ionization mass spectrometry in analysis of amino acid phenylthiohydantoin derivatives formed during Edman degradation of proteins. Anal. Biochem. **43**, 288-299.

FANGER, M.W. and HARBURY, H.A. (1965). Trifluoroacetylated cytochrome c. Biochemistry **4**, 2541-2545.

FEHRNSTRÖM, H. and MOBERG, U. (1977). LKB application note 306.

FORD, L.O., JOHNSON, L.N., MACHIN, P.A., PHILLIPS, D.C. and TJIAN, R. (1974). Crystal structure of a lysozyme-tetrasaccharide lactone complex. J. Mol. Biol. **88**, 349-371.

FOSS, J.G. (1961). Hydrofobic bonding and conformational transitions in lysozyme, ribonuclease and chymotrypsin. Biochim. Biophys. Acta **47**, 569-579.

FOXALL, D.L. (1984). New water suppression experiments. Varian Application Note NMR-23.

FUKAE, K., KURAMITSU, S. and HAMAGUCHI, K. (1979). Binding of N-acetyl-chitotriose to Asp 52-esterified hen lysozyme. J. Biochem. **85**, 141-147.

GALLO, A.A., SWIFT, T.J. and SABLE, H.Z. (1971). Magnetic resonance study of the Mn^{2+}-lysozyme complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. **43**, 1232-1238.

GERIG, J.T. (1977). Fluorine-proton Overhauser effects in fluorine-labeled macromolecular systems. J. Am. Chem. Soc. **99**, 1721-1725.

GERIG, J.T., LOEHR, D.T., LUK, K.F.S. and ROE, D.C. (1979a). Fluorine nuclear relaxation studies of p-trifluoromethylbenzenesulfonyl-α-chymotrypsin. J. Am. Chem. Soc. **101**, 7482-7487.

GERIG, J.T., LUK, K.F.S. and ROE, D.C. (1979b). Selective fluorine-proton nuclear Overhauser effects in 4-trifluoromethylbenzenesulfonyl-α-chymotrypsin. J. Am. Chem. Soc. **101**, 7698-7704.

GERKEN, T.A., JENTOFT, J.E., JENTOFT, N. and DEARBORN, D.G. (1982). Intramolecular interactions of amino groups in ^{13}C reductively methylated hen egg-white lysozyme. J. Biol. Chem. **257**, 2894-2900.

GOLDBERGER, R.F. and ANFINSEN, C.A. (1962). The reversible masking of amino groups in ribonuclease and its possible usefulness in the synthesis of the protein. Biochemistry **1**, 401-405.

GORIN, G., WANG, S.-F. and PAPAPAVLOU, L. (1971). Assay of lysozyme by its lytic action on *M. lysodeikticus* cells. Anal. Biochem. **39**, 113-127.

GRAY, G. (1984). Decoupler frequency cycling. Varian NMR Newsletter **1**, 5-6.

HABEEB, A.F.S.A. (1966). Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. Anal. Biochem. **14**, 328-336.

HAMAGUCHI, K. (1964). Structure of muramidase. V. Effect of N,N-dimethylformamide and the role of disulfide bonds in the stability of muramidase. J. Biochem. **55**, 333-339.

HAMAGUCHI, K. and KURONO, A. (1963). Structure of muramidase. I. The effect of guanidine hydrochloride on muramidase. J. Biochem. **54**, 111-122.

HAMAGUCHI, K. and SAKAI, H. (1965). Structure of lysozyme. IX. The effect of temperature on the conformation of lysozyme. J. Biochem. **57**, 721-732.

HAMMOND, S.J. (1984). Two-dimensional $^{19}F\{^{1}H\}$ Overhauser effects in proteins. J. Chem. Soc., Chem. Commun. 712-713.

HARDY, R.R. and RICHARDS, J.H. (1978). Relation between structure and specificity of antibodies : nuclear magnetic resonance study of binding fluorine-19 labeled nitrophenyl haptens to myeloma immunoglobulins M315, M460 and X25. Biochemistry **17**, 3866-3871.

HARRIS, R.K. (1983). Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Pitman Books, London.

HORE, P.J. (1983). Solvent suppression in Fourier transform nuclear magnetic resonance. J. Magn. Reson. **55**, 283-300.

HORROCKS, W.DeW. and SIPE, J.P. (1971). Lanthanide shift reagents. A survey. J. Am. Chem. Soc. **93**, 6800-6804.

HUESTIS, W.H. and RAFTERY, M.A. (1971). Use of fluorine-19 nuclear magnetic resonance to study conformational changes in selectively modified ribonuclease S. Biochemistry **10**, 1181-1186.

IKEDA, K. and HAMAGUCHI, K. (1972). A tryptophyl circular dichroic band at 305 nm of hen egg-white lysozyme. J. Biochem. **71**, 265-273.

IMOTO, T. (1983). Electrostatic free energy of lysozyme. Biophys. J. **44**, 293-298.

IMOTO, T., FUKUDA, K. and YAGISHITA, K. (1976a). A study of the native-denatured transition in lysozyme. II. Kinetic analysis of protease digestion. J. Biochem. **80**, 1313-1318.

IMOTO, T., JOHNSON, L.N., NORTH, A.C.T., PHILLIPS, D.C. and RUPLEY, J.A. (1972). Vertebrate lysozymes. In : The Enzymes, 3rd ed. Vol.7. BOYER, P.D. (ed.). Academic Press, New York, pp. 665-868.

IMOTO, T., MORIYAMA, S. and YAGISHITA, K. (1976b). A study of the native-denatured transition in lysozyme. III. Effect of alteration of net charge by acetylation. J. Biochem. **80**, 1319-1325.

IMOTO, T. and RUPLEY, J.A. (1973). Oxidation of lysozyme by iodine : identification and properties of an oxindolyl ester intermediate; evidence for participation of glutamic acid 35 in catalysis. J. Mol. Biol. **80**, 657-667.

JOLLES, J., JAUREGUI-ADELL, J. and JOLLES, P. (1963). Preliminary contribution to the study of the disulfide bonds in hen's egg-white lysozyme. Biochim. Biophys. Acta **71**, 488-490.

JOLLES, J. and JOLLES, P. (1966). Isolation and purification of the biologically active des-lysylvalyl phenylalanine-lysozyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. **22**, 22-25.

JOLLES, J., JOLLES, P. et JAUREGUI-ADELL, J. (1960). Etablissement d'une formule provisoire du lysozyme de blanc d'oeuf de poule. Bull. Soc. Chim. Biol. **42**, 1319-1329.

KURACHI, K., SIEKER, L.C. and JENSEN, L.H. (1975). Metal ion binding in triclinic lysozyme. J. Biol. Chem. **250**, 7663-7667.

KURAMITSU, S. and HAMAGUCHI, K. (1980). Analysis of the acid-base titration curve of hen lysozyme. J. Biochem. **87**, 1215-1219.

LENKINSKI, R.E., DALLAS, J.L. and GLICKSON, J.D. (1979). Paramagnetic ion induced perturbations in the ^{1}H NMR spectrum of lysozyme : a reassignment of the tryptophan indole NH resonances. J. Am. Chem. Soc. **101**, 3071-3077.

LEVY, D. and PASELK, R.A. (1973). The trifluoroacetylation of insulin. Biochim. Biophys. Acta **310**, 398-405.

LIGHT, A. (1972). Leucine aminopeptidase in sequence determination of peptides. Meth. Enzymol. **25**, 253-262.

McDONALD, C.C. and PHILLIPS, W.D. (1969). Perturbation of the PMR spectrum of lysozyme by Co^{+2}. Biochem. Biophys. Res. Commun. **35**, 43-51.

MOELLER, T. (1973). The lanthanides. In : Comprehensive inorganic chemistry. Volume 4. BAILAR, J.C., EMELEUS, H.J., NIJHOLM, R. and TROTMAN-DICKINSON, A.F. (eds.). Pergamon Press, New York. pp. 1-101.

MORALLEE, K.G., NIEBOER, E., ROSSOTTI, F.J.C., WILLIAMS, R.J.P. and XAVIER, A.V. (1970). The lanthanide cations as nuclear magnetic resonance probes of biological systems. J. Chem. Soc., Chem. Comm. 1132-1133.

MORGAN, W.T. and RIEHM, J.P. (1968). The isolation and some enzymatic properties of des-arginylleucine-lysozyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. **30**, 50-56.

NAKAE, Y., IKEDA, K., AZUMA, T. and HAMAGUCHI, K. (1972). Circular dichroism of hen egg-white lysozyme modified with N-acetylimidazole. J. Biochem. **72**, 1155-1162.

NAKAE, Y., IKEDA, K. and HAMAGUCHI, K. (1973). Ionization behavior of glutamic acid 35 and a tyrosyl residue of hen egg-white lysozyme. J. Biochem. **73**, 1249-1257.

NAKAE, Y., IKEDA, K. and HAMAGUCHI, K. (1975a). Binding of substrate analogues to hen egg-white lysozyme with 2-nitrophenylsulfenylated tryptophan 62. J. Biochem. **77**, 993-1006.

NAKAE, Y., RYO, E., KURAMITSU, S., IKEDA, K. and HAMAGUCHI, K. (1975b). pH dependence of the binding constants of N-acetylglucosamine monomers to hen and turkey egg-white lysozymes. J. Biochem. **78**, 589-597.

NEUBERGER, A. and WILSON, B.M. (1967). Inhibition of lysozyme by derivatives of D-glucosamine. I. Biochim. Biophys. Acta **147**, 473-486.

NORTON, R.S. and ALLERHAND, A. (1977). Participation of tryptophan 62 in the self-association of hen egg white lysozyme. Application of natural abundance carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Biol. Chem. **252**, 1795-1798.

OGASAHARA, K. and HAMAGUCHI, K. (1967). Structure of lysozyme. XII. Effect of pH on the stability of lysozyme. J. Biochem. **61**, 199-210.

OSTROY, F., GAMS, R.A., GLICKSON, J.D. and LENKINSKI, R.E. (1978). Inhibition of lysozyme by polyvalent metal ions. Biochim. Biophys. Acta **527**, 56-62.

PASELK, R.A. and LEVY, D. (1974). Fluorine nuclear magnetic resonance studies of trifluoroacetyl-insulin derivatives. Effect of pH on conformation and aggregation. Biochemistry **13**, 3340-3346.

PERKINS, H.R. (1967). Inhibition of lysozyme by positively charged groups in the mucopeptide of bacterial cell wall. Proc. Roy. Soc. B **167**, 443-445.

PERKINS, S.J. and DWEK, R.A. (1980). Comparisons of ring-current shifts calculated from the crystal structure of egg white lysozyme of hen with the proton nuclear magnetic resonance spectrum of lysozyme in solution. Biochemistry **19**, 245-258.

PERKINS, S.J., JOHNSON, L.N., PHILLIPS, D.C. and DWEK, R.A. (1981). The simultaneous binding of lanthanide and N-acetylglucosamine inhibitors to hen egg-white lysozyme in solution by ^{1}H and ^{13}C nuclear magnetic resonance. Biochem. J. **193**, 573-588.

PERKINS, S.J., JOHNSON, L.N., MACHIN, P.A. and PHILLIPS, D.C. (1979). Crystal structures of hen egg-white lysozyme complexes with gadolinium(III) and gadolinium(III)-N-acetyl-D-glucosamine. Biochem. J. **181**, 21-36.

PINCUS, M.R. and SCHERAGA, H.A. (1981). Prediction of the three-dimensional structures of complexes of lysozyme with cell wall substrates. Biochemistry **20**, 3960-3965.

RAFTERY, M.A. and RAND-MEIR, T. (1968). On distinguishing between possible mechanistic pathways during lysozyme-catalyzed cleavage of glycosidic bonds. Biochemistry **7**, 3281-3289.

REDFIELD, C., POULSEN, F.M. and DOBSON, C.M. (1982). Complete assignment of the ^{1}H NMR spectrum of the aromatic residues of lysozyme. Eur. J. Biochem. **128**, 527-531.

REUBEN, J. (1975). The lanthanides as spectroscopic and magnetic resonance probes in biological systems. Naturwissenschaften **62**, 172-178.

RICHARDS, F.F. and LOVINS, R.E. (1972). Mass spectrometry of methylthiohydantion amino acids : identification, quantitation and the analysis of mixtures. Meth. Enzymol. **25**, 314-326.

RIORDAN, J.F. and VALLEE, B.L. (1967). Acetylation. Meth. Enzymol. **11**, 565-570.

SAINT-BLANCARD, J., MAUREL, J.P., CONSTANT, J.F., BERTHOU, J. and JOLLES, P. (1981). Influence of pH and ionic strength on the lysis of *Micrococcus luteus* cells of hen lysozyme at low (20°C) and high (physiological, 40°C) temperature. Biosci. Rep. **1**, 119-123.

SCHALLENBERG, E.E. and CALVIN, M. (1955). Ethyl thioltrifluoroacetate as an acetylating agent with particular reference to peptide synthesis. J. Am. Chem. Soc. **77**, 2779-2783.

SCHMIDT, P.G. and KUNTZ, I.D. (1984). Distance measurements in spin-labeled lysozyme. Biochemistry **23**, 4261-4266.

SHELLING, J.G., BJORNSON, M.E., HODGES, R.S., TANEJA, A.K. and SYKES, B.D. (1984). Contact and dipolar contributions to lanthanide-induced NMR shifts of amino acid and peptide models for calcium binding sites in proteins. J. Magn. Reson. **57**, 99-114.

SHINDO, H., COHEN, J.S. and RUPLEY, J.A. (1977). Self-association of hen egg-white lysozyme as studied by nuclear magnetic resonance. Biochemistry **16**, 3879-3882.

SHINDO, H., EGAN, W. and COHEN, J.S. (1978). Studies of individual carboxyl groups in proteins by carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Biol. Chem. **253**, 6751-6755.

SHUGAR, D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. Bioch. Biophys. Acta **8**, 302-309.

SOPHIANOPOULOS, A.J. (1969). Association sites of lysozyme in solution. I. The active site. J. Biol. Chem. **244**, 3188-3193.

SOPHIANOPOULOS, A.J. and VAN HOLDE, K.E. (1964). Physical studies of muramidase (lysozyme). II. pH-dependent dimerization. J. Biol. Chem. **239**, 2516-2524.

SOPHIANOPOULOS, A.J. and WEISS, B.J. (1964). Thermodynamics of conformational changes of proteins. I. pH-dependent denaturation of muramidase. Biochemistry **3**, 1920-1928.

STAUDENMAYER, N., SMITH, M.B., SMITH, H.T., SPIES, F.K. and MILLETT, F. (1976). An enzyme kinetics and ^{19}F nuclear magnetic resonance study of selectively trifluoroacetylated cytochrome c derivatives. Biochemistry **15**, 3198-3204.

SYKES, B.D. and HULL, W.E. (1978). Fluorine nuclear magnetic resonance studies of proteins. Meth. Enzymol. **49**, 270-295.

SYKES, B.D., WEINGARTEN, H.I. and SCHLESINGER, M.J. (1974). Fluorotyrosine alkaline phosphatase from *Escherichia coli* : preparation, properties and fluorine-19 nuclear magnetic resonance spectrum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **71**, 469-473.

TEICHBERG, V.I., KAY, C.M. and SHARON, N. (1970). Separation of contributions of tryptophans and tyrosines to the ultraviolet circular dichroism of hen egg-white lysozyme. Eur. J. Biochem. **16**, 55-59.

TSETLIN, V.I., ARSENIEV, A.S., UTKIN, Y.N., GUREVICH, A.Z., SENYAVINA, L.B., BYSTROV, V.F., IVANOV, V.T. and OVCHINNIKOV, Y.A. (1979). Conformational studies of neurotoxin II from *Naja naja oxiana*. Selective N-acylation, circular dichroism and nuclear magnetic resonance study of acylation products. Eur. J. Biochem. **94**, 337-346.

VENKATAPPA, M.P. and STEINRAUF, L.K. (1968). Sedimentation equilibrium studies on heavy atom derivatives of lysozyme. Indian J. Biochem. **5**, 28-33.

WAGNER, T.E., VANDEGRIFT, V. and MOORE, D.S. (1975). Circular dichroism analysis of nucleoprotein complexes. Meth. Enzymol. **40**, 209-238.

WAGNIERE, G.H. (1973). General and theoretical aspects of the carbon-halogen bond. In : The chemistry of the carbon-halogen bond. PATAI, S. (ed.). J. Wiley & Sons, London. pp. 1-47.

WOOTEN, J.B. and COHEN J.S. (1979). Protein mobility and self-association by deuterium nuclear magnetic resonance. Biochemistry **18**, 4188-4191.

YAMASAKI, N., HAYASHI, K. and FUNATSU, M. (1968a). Acetylation of lysozyme. I. Preparation, fractionation and properties of acetylated lysozyme. Agr. Biol. Chem. **32**, 55-63.

YAMASAKI, N., HAYASHI, K. and FUNATSU, M. (1968b). Acetylation of lysozyme. II. Mechanism of lysis by lysozyme. Agr. Biol. Chem. **32**, 64-68.