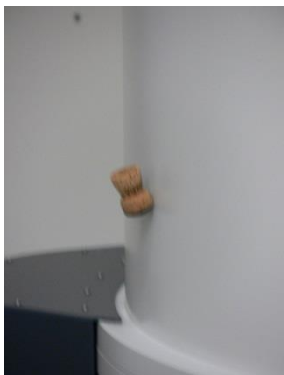
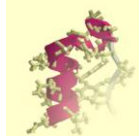
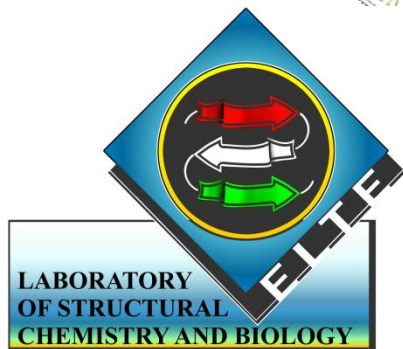


Lehetőségek és kihívások a modern bioNMR spektroszkópia területén



Perczel András és munkatársai
Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium
és
ELTE-MTA Fehérjemodellező Kutatócsoport



MTA-ELTE
Fehérjemodellező
Kutatócsoport





The Nobel Prize in Physics 1952

"for their development of new methods for nuclear magnetic precision measurements and discoveries in connection therewith"



Felix Bloch
(1905-1983)



Edward Mills Purcell
(1912-1997)

FELIX BLOCH

The principle of nuclear induction

Nobel Lecture, December 11, 1952

It is a tribute to the inherent harmony and the organic growth of our branch of science that every advance in physics is largely due to the developments that preceded it. The discovery for which Purcell and I have received the honor of the Nobel Prize award for the year 1952 is a typical example of this situation, and before describing the principle I shall therefore present an outline of its long and distinguished background.

Both the method and the object go back ultimately to spectroscopy, a field to which modern physics owes so much in other respects. Among the various aspects of this field there are two which are of particular importance here: the Zeeman effect for introducing magnetic fields as an essential element of spectroscopy, and the hyperfine structure of spectral lines for revealing the existence of nuclear moments. The correct interpretation of hyperfine structures was first given in 1924 by Pauli¹, who proposed that atomic nuclei may possess an intrinsic angular momentum (spin) and, parallel to its orientation, a magnetic moment. The energy of interaction of this magnetic moment with the magnetic field $H_{(0)}$, produced by the atomic electrons at the position of the nucleus, depends upon the angle between them and leads thus to the observed small splitting of the energy levels. Converse-

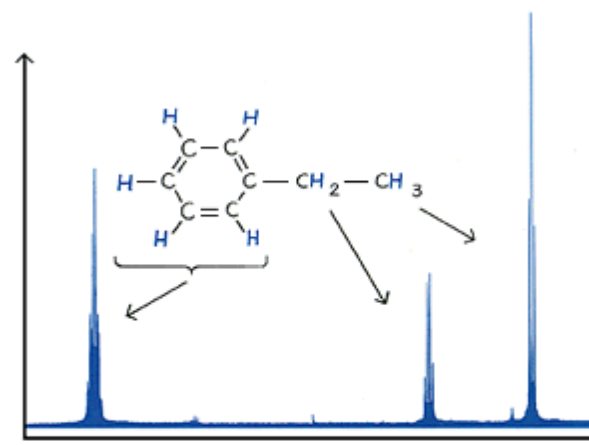
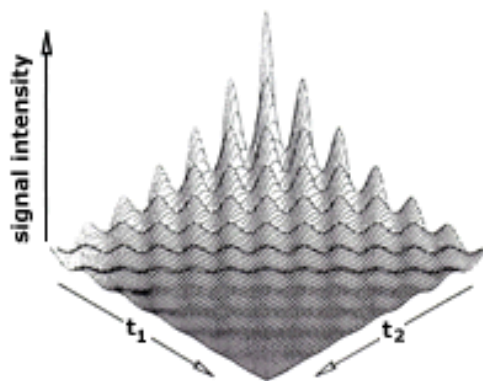
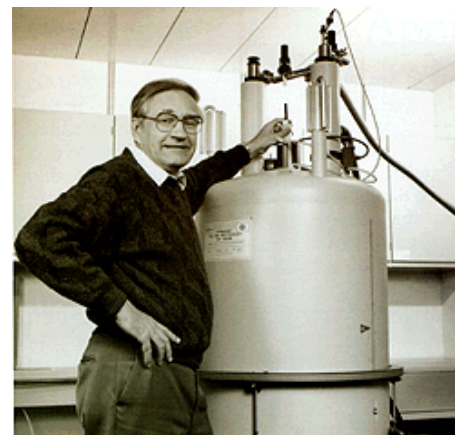


The Nobel Prize in Chemistry 1991

"for his contributions to the development of the methodology of high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy"



Richard R. Ernst



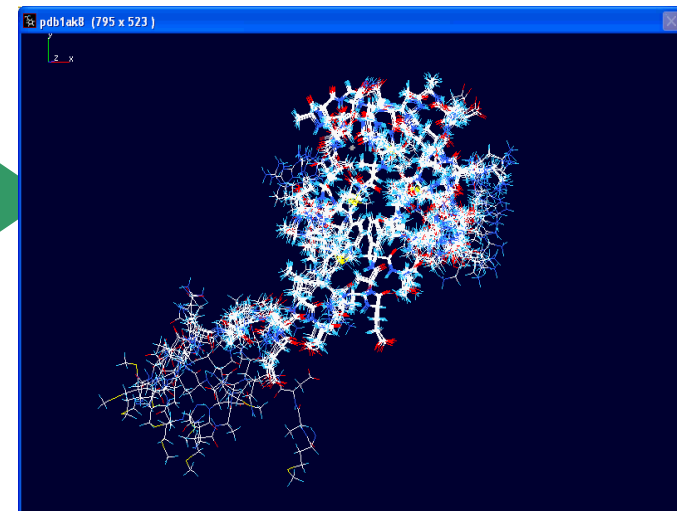
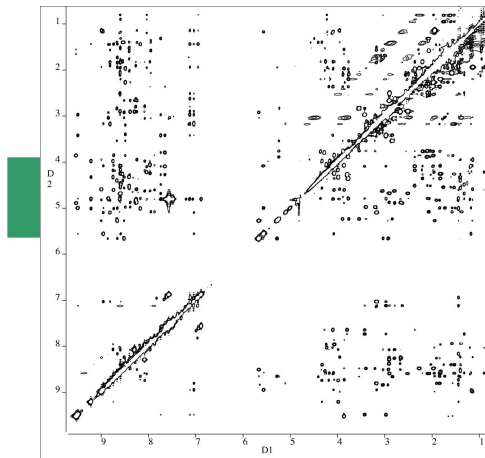
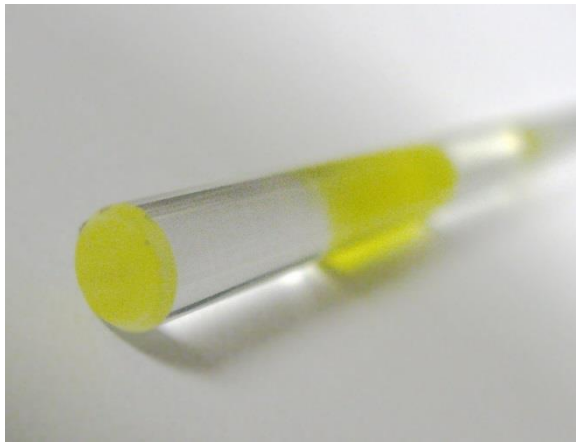
A proton NMR spectrum of a solution containing a simple organic compound, ethyl benzene. Each group of signals corresponds to protons in a different part of the molecule.

Fehérjék oldatban: NMR-spektroszkópia

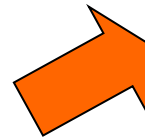
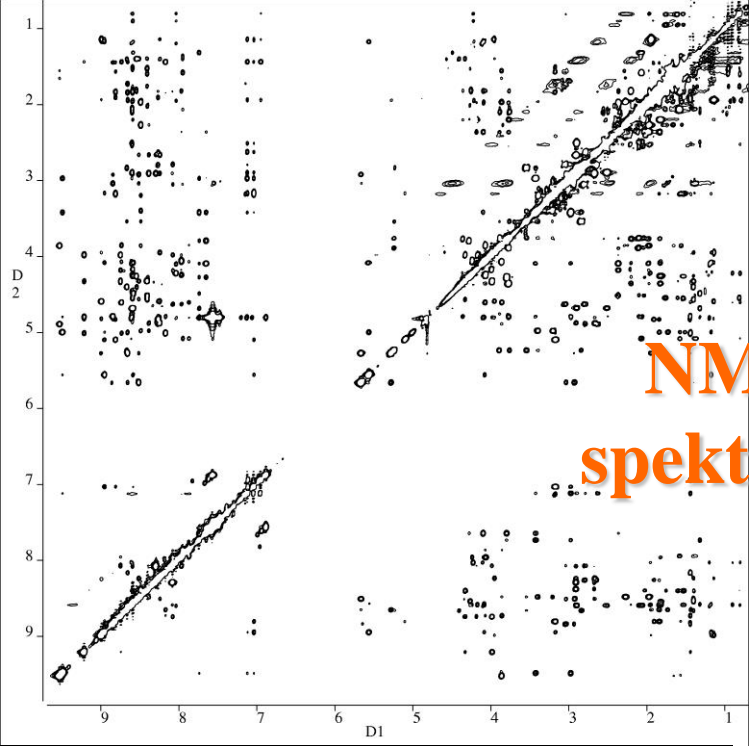


Fehérje NMR:
kémiai Nobel-díj,
2002

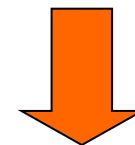
Kurt Wüthrich



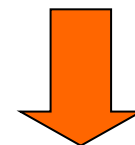
A dinamikára és a belső mozgásra is
reflektáló szerkezeti sokaság⁴



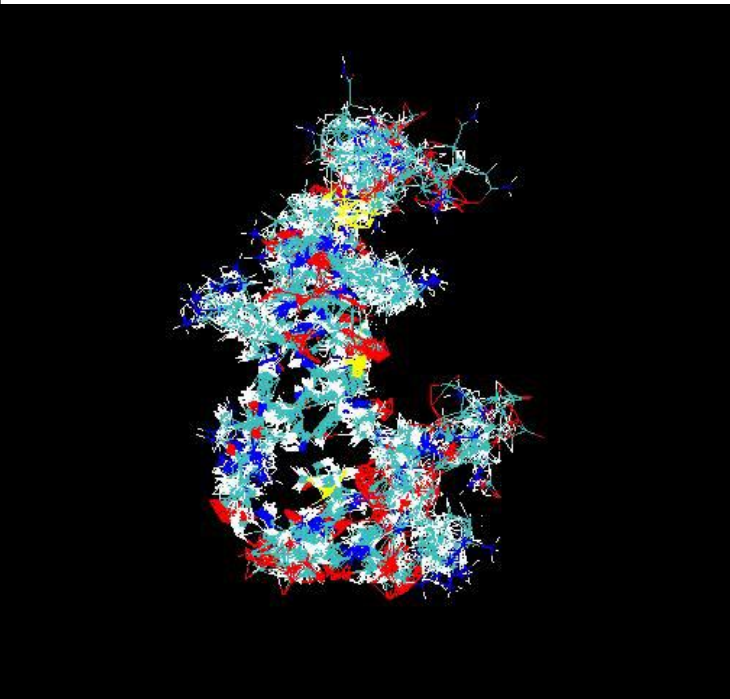
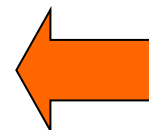
**spinrendszerek
azonosítása**



**spinrendszerek
szekvenciális
rendezése**



**kényszerfeltételek
alapján
szerkezetszámolás**



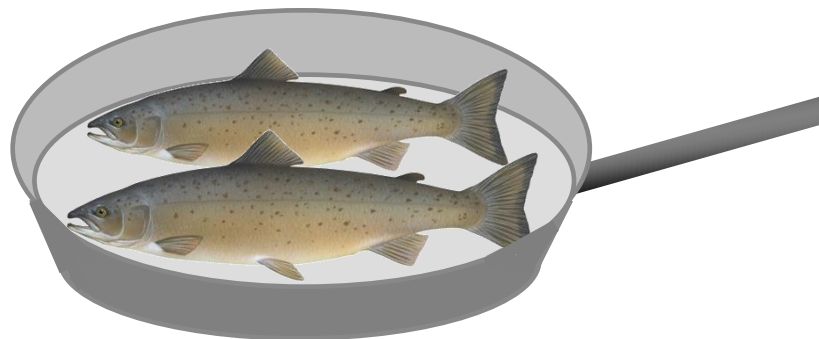
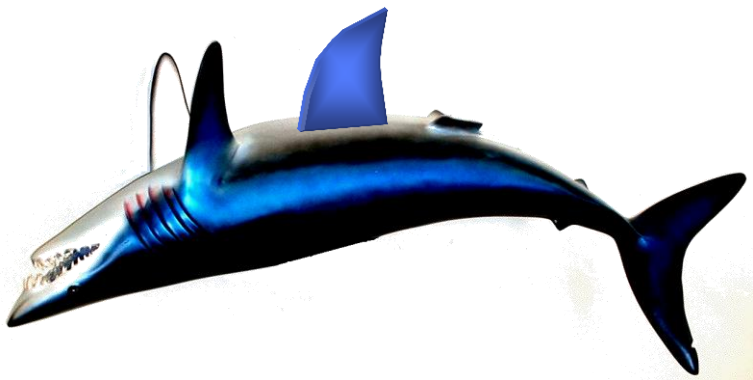
Miért az NMR?

Powerful modern structural tools for looking at complexes

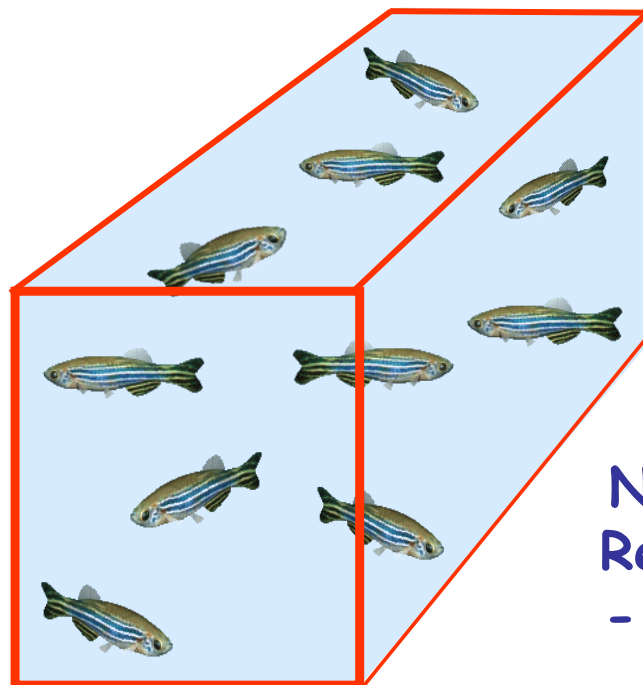


Crystallography ~
45,000 structures

Molecular modelling



Electron microscopy ~190



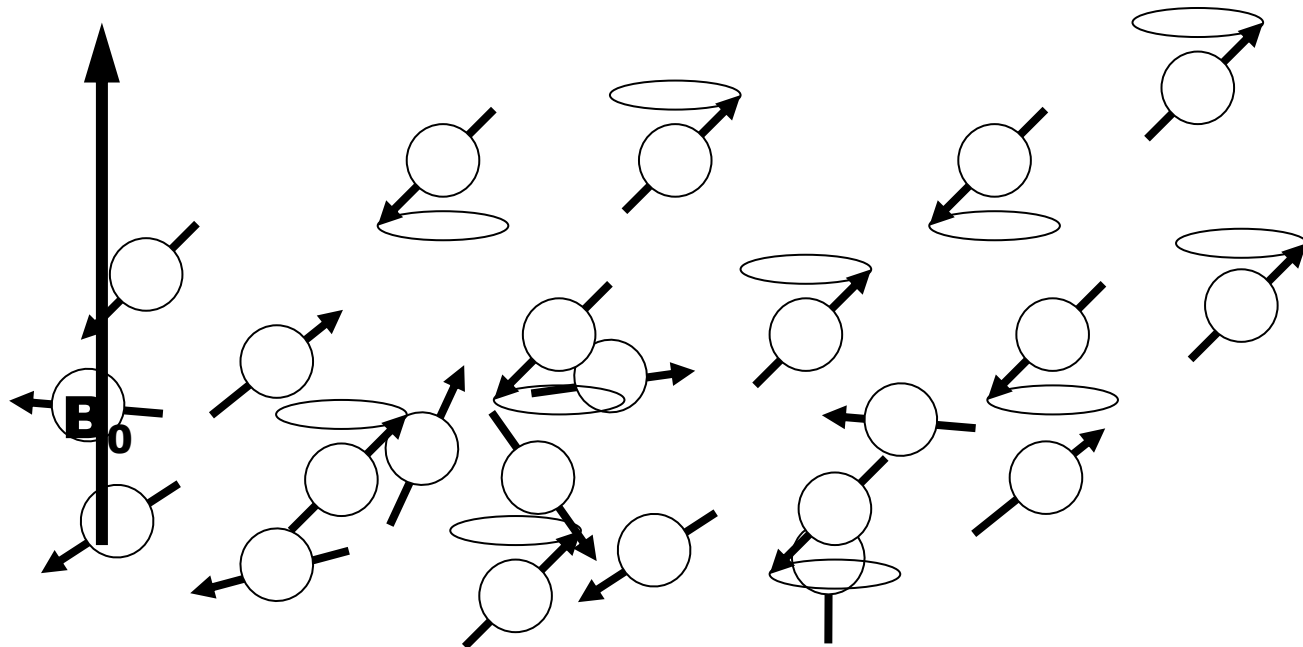
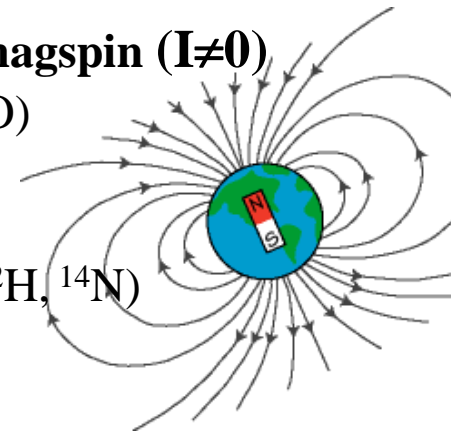
Nuclear Magnetic
Resonance ~7,500
- can also give K_d
and k

Az **NMR**-spektroszkópia szükséges feltétele a **nullától különböző magspin ($I \neq 0$)**

1) **$I = 0$** , ha **mind** a protonok **mind** a neutronok száma **páros**: (^{12}C , ^{16}O)

2) **$I = 1/2$** , ha tömegszáma páratlan (^1H , ^3H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{57}Fe , ^{113}Cd)
vagy a protonok, **vagy** a neutronok száma páratlan.

3) **$I = k$** ($k=1,2,..$) **mind** a protonok **mind** a neutronok száma páratlan (^2H , ^{14}N)



Külső mágneses tér hatásában rendeződnek és spinprecessáló magok

Feles spin esetén az impulzusmomentum (perdület) z-komponensének operátora: \hat{I}_Z

- két sajátfüggvénye: $\psi_{+1/2}$ és $\psi_{-1/2}$

- két sajátértéke van: $+1/2\hbar$ és $-1/2\hbar$

A megfelelő két sajátérték egyenlet: $\hat{I}_Z \psi_{+1/2} = +1/2\hbar \psi_{+1/2}$ és $\hat{I}_Z \psi_{-1/2} = -1/2\hbar \psi_{-1/2}$

vagy röviden $\hat{I}_Z \psi_m = m\hbar \psi_m$ ahol $m = \pm 1/2$.

A feles-spin *Hamilton*-operátorának sajátértékei:

Az impulzusmomentum z-komponense (\hat{I}_Z) és a B_0 indukciójú mágneses tér ($B_0 \parallel z$) kölcsönhatását egyetlen spin esetében leíró *H*-operátor:

$$\hat{H}_{\text{egy-spin}} = -\gamma B_0 \hat{I}_Z \quad (\text{ahol } \gamma = \text{giromágneses együttható})$$

a $\psi_{+1/2}$ és $\psi_{-1/2}$ függvények a $\hat{H}_{\text{egy-spin}}$ -nek is sajátfüggvényei

(hiszen \hat{I}_Z -től csak a $-\gamma B_0$ konstansban tér el.).

$$\begin{aligned} \text{Az egyik (} m = +1/2 \text{) sajátérték egyenlet tehát: } \hat{H}_{\text{one-spin}} \psi_{+1/2} &= -\gamma B_0 [\hat{I}_Z \psi_{+1/2}] \\ &= -\gamma B_0 [+1/2\hbar \psi_{+1/2}] \\ &= -1/2 \hbar \gamma B_0 \psi_{+1/2} \end{aligned}$$

Tehát $\hat{H}_{\text{egy-spin}}$ egyik sajátfüggvénye a $\psi_{+1/2}$, melyhez tartozó sajátérték a $-1/2 \hbar \gamma B_0$, míg a másik sajátfüggvénye a $\psi_{-1/2}$, melyhez tartozó sajátérték a $+1/2 \hbar \gamma B_0$.

Az egy-spin spektruma:

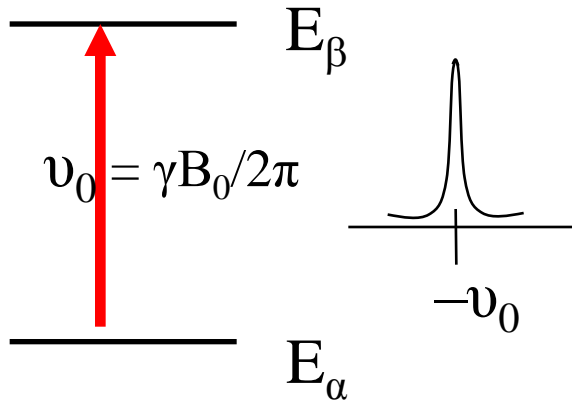
Spin $1/2$ esetén tehát 2 energiaszint van: $E_m = -m \hbar \gamma B_0$

ahol $m = \pm 1/2$.

Tehát $E_{+1/2} = -1/2 \hbar \gamma B_0$ (E_α vagy *spin up*),
 illetve $E_{-1/2} = +1/2 \hbar \gamma B_0$. (E_β vagy *spin down*)

A kiválasztási szabály értelmében (mivel $m = +1$ vagy -1)

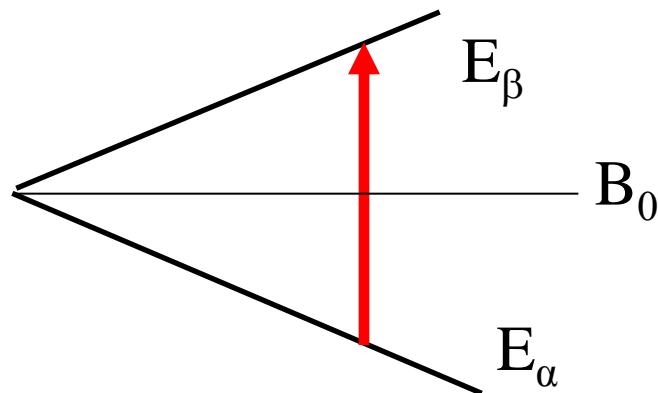
a $\Delta m_{\alpha \rightarrow \beta} = (-1/2) - (+1/2) = -1$, tehát az az α -ból β -ba való átmenet megengedett.



$$\Delta E_{\alpha \rightarrow \beta} = E_\beta - E_\alpha = +1/2 \hbar \gamma B_0 - (-1/2 \hbar \gamma B_0) = \hbar \gamma B_0$$

$$h\nu_{\alpha \rightarrow \beta} = (h/2\pi)\gamma B_0$$

$$\nu_{\alpha \rightarrow \beta} = -\nu_0 = \gamma B_0/2\pi \text{ ami a Larmor-frekvencia}$$



Pl. Ha $B_0 = 9,4\text{T}$ és
 $\gamma = 2,67522 \cdot 10^8 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$
 (protonra) akkor a *Larmor*-
 frekvencia = $4,00229 \cdot 10^8 \text{ Hz}$
 $\sim 400\text{MHz}$

Két csatolt spin spektruma:

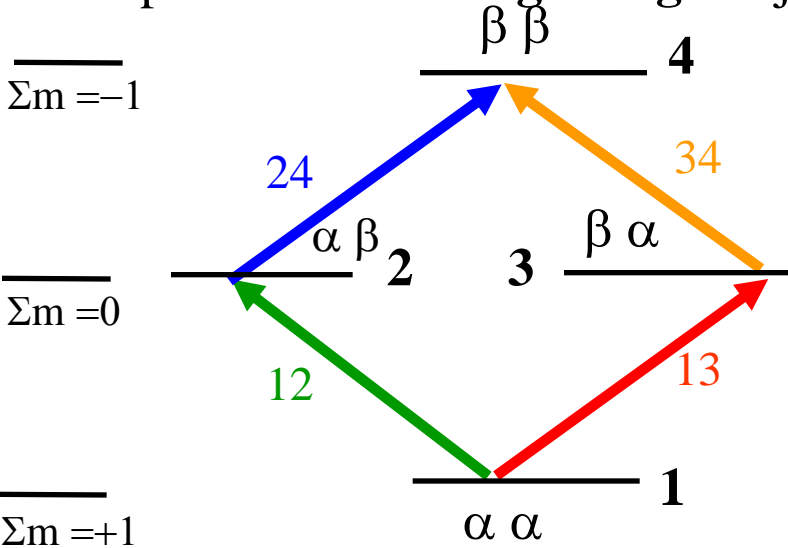
Ha az egy-spin: $\hat{H}_{\text{egy-spin}} = \nu_0 \hat{I}_z$, akkor

két **csatolatlan** spin esetében: $\hat{H}_{\text{két-spin, csatolatlan}} = \nu_{0,1} \hat{I}_{1z} + \nu_{0,2} \hat{I}_{2z} = \nu_I \hat{I}_z + \nu_S \hat{S}_z$, illetve

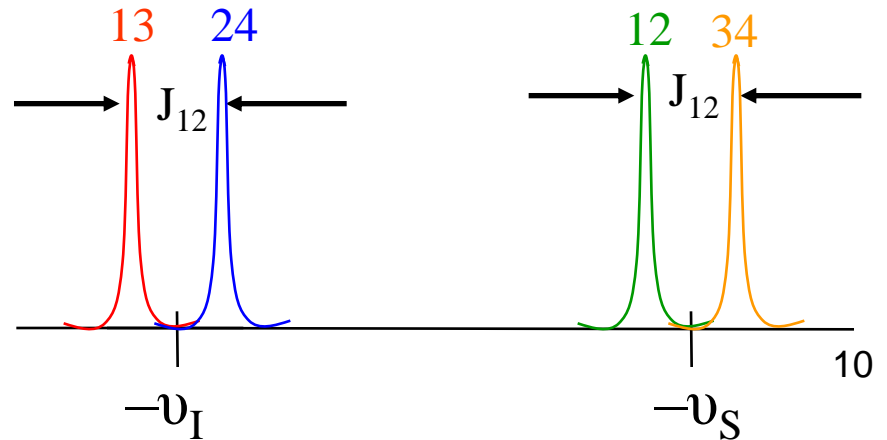
két **csatolt** spin esetében: $\hat{H}_{\text{két-spin, csatolat}} = \nu_I \hat{I}_z + \nu_S \hat{S}_z + J_{12} \hat{I}_z \hat{S}_z$,

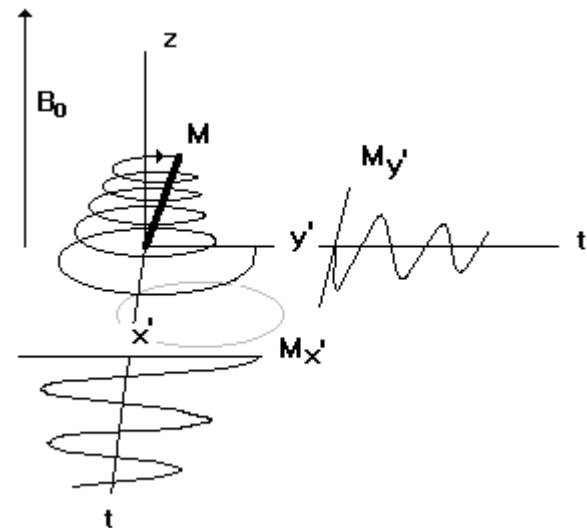
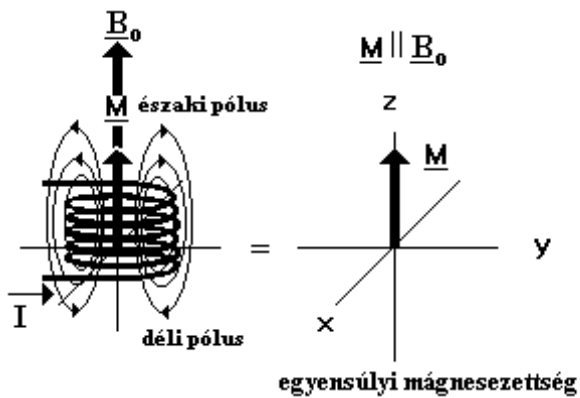
ahol J_{12} a skaláris csatolási állandó spin1 és spin2 között.

Két-spin rendszer **energiadiagramja**, a megengedett **átmenetek** és a **spektrum**:

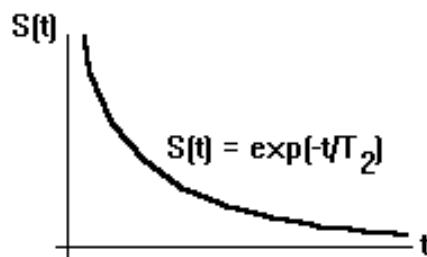


átmenet	spin állapotok	frekvencia
12	$\alpha\alpha \rightarrow \alpha\beta$	$-\nu_S - \frac{1}{2}J_{12}$
34	$\beta\alpha \rightarrow \beta\beta$	$-\nu_S + \frac{1}{2}J_{12}$
13	$\alpha\alpha \rightarrow \beta\alpha$	$-\nu_I - \frac{1}{2}J_{12}$
24	$\alpha\beta \rightarrow \beta\beta$	$-\nu_I + \frac{1}{2}J_{12}$

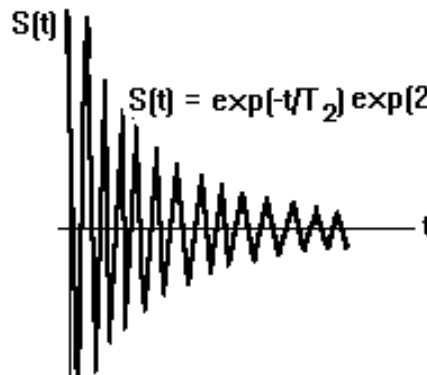




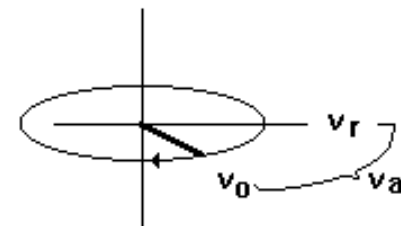
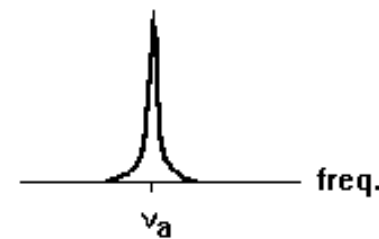
Külső B_0 indukciójú mágneses térben a makroszkopikus mágnesezettség (M) gerjesztése, annak precessziójához vezet, amely mérhető indukált feszültséget (mV) eredményez.



FT(t)



FT(t)



A Vektor modell és a *Bloch*-egyenletek

z-irányú mágnesezettség időbeni alakulása:

$$dM_z/dt = -(M_z - M_0)/T_1 \quad M_z(t) = M_0(1 - \exp(-t/T_1))$$

az x,y-síkban zajló csillapított amplitúdójú precesszió alakulása:

$$dM_x/dt = (\omega_0 - \omega)M_y - M_x/T_2$$

$$dM_y/dt = -(\omega_0 - \omega)M_x - M_y/T_2$$

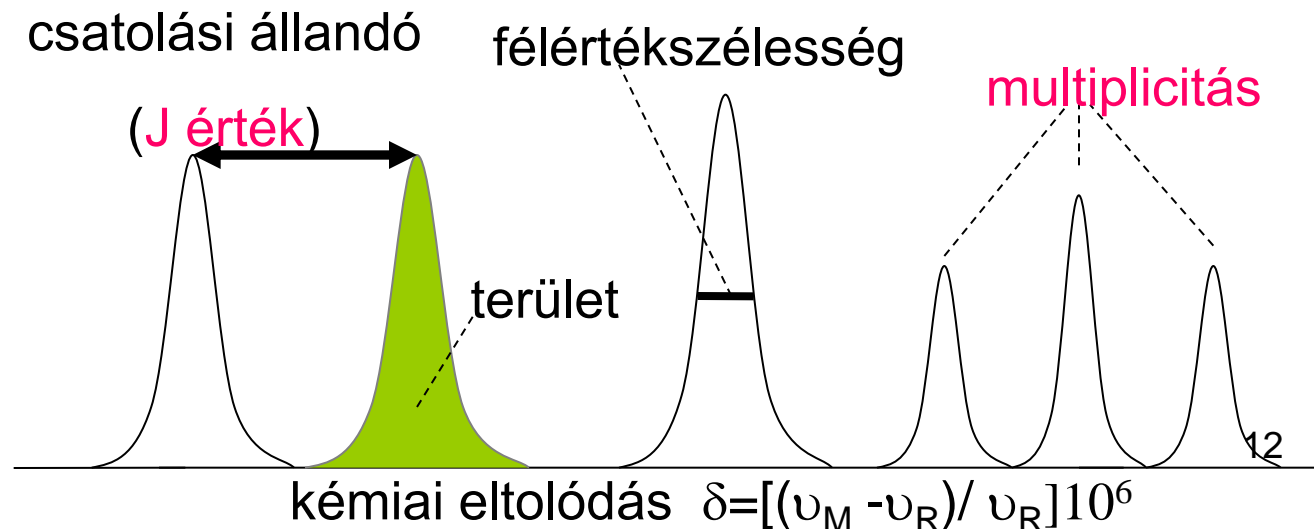
Csatolt differenciál-egyenletrendszer megoldásaként a következőt kapjuk:

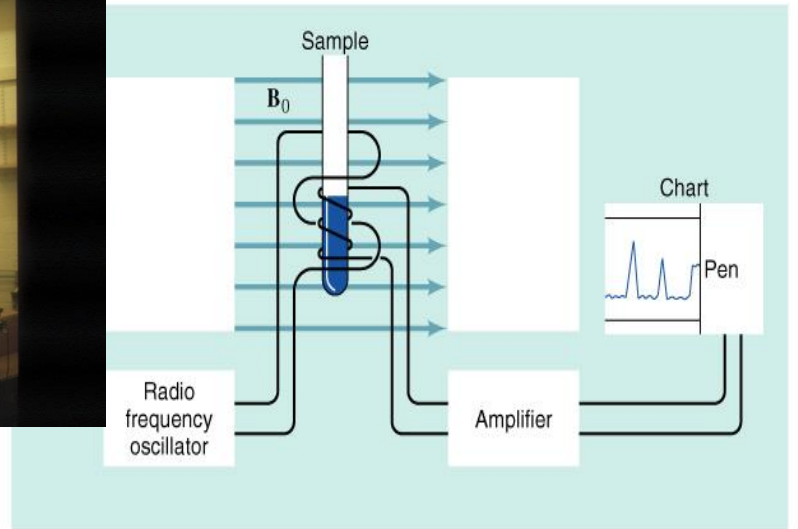
$$M_x(t) = M_0 \exp(-t/T_2) \sin(\omega_0 - \omega)$$

$$M_y(t) = M_0 \exp(-t/T_2) \cos(\omega_0 - \omega),$$

ahol $(\omega_0 - \omega)$ a forgó referencia rendszerben a precesszió szögsebessége.

A nagy felbontású NMR-spektrumok öt jellemző paramétere:





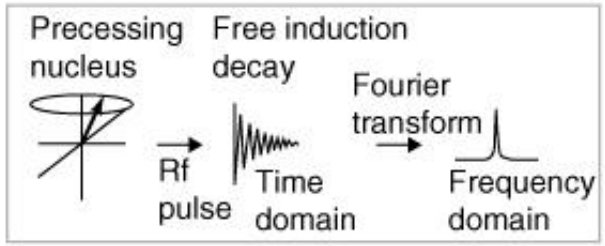
Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.

Superconducting magnet (cooled by liquid helium)

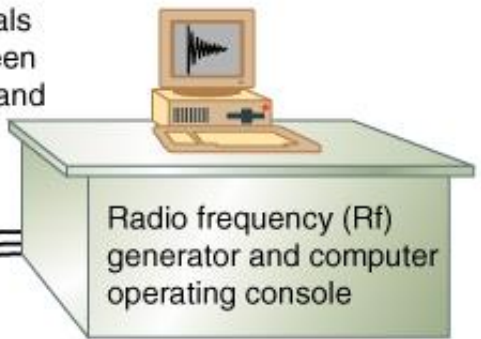


Sample tube spins within the probe coils in the hollow bore at the center of the magnet.

Copyright 2000 John Wiley and Sons, Inc.



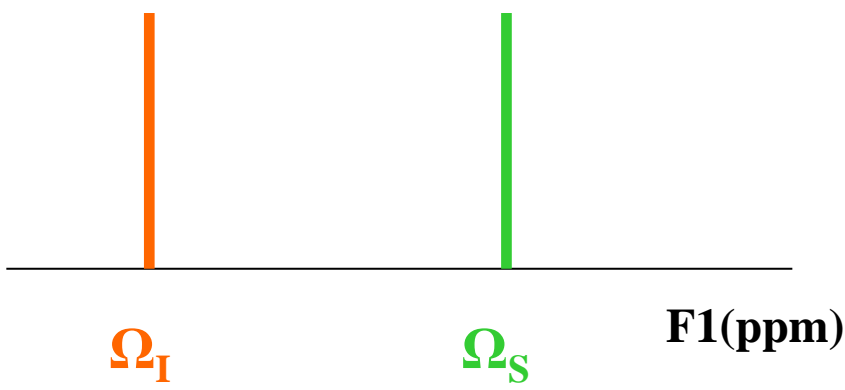
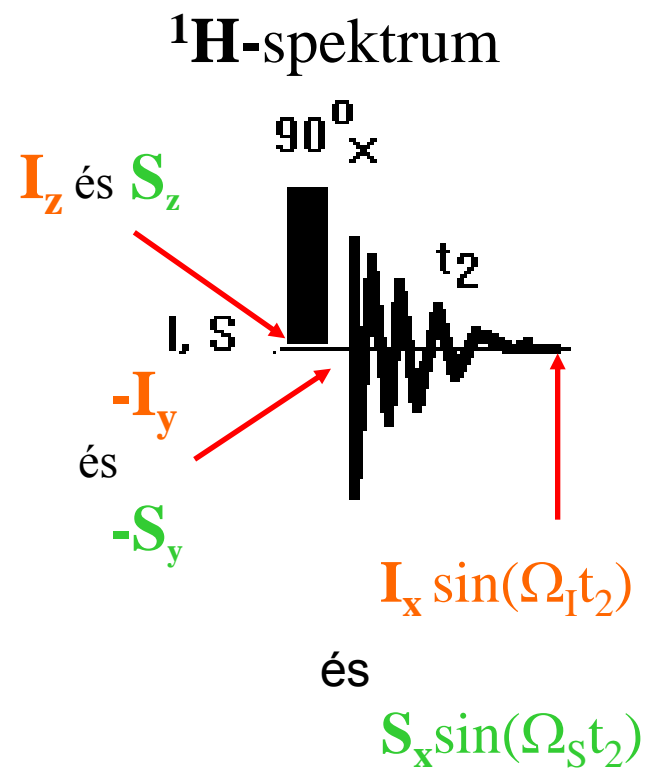
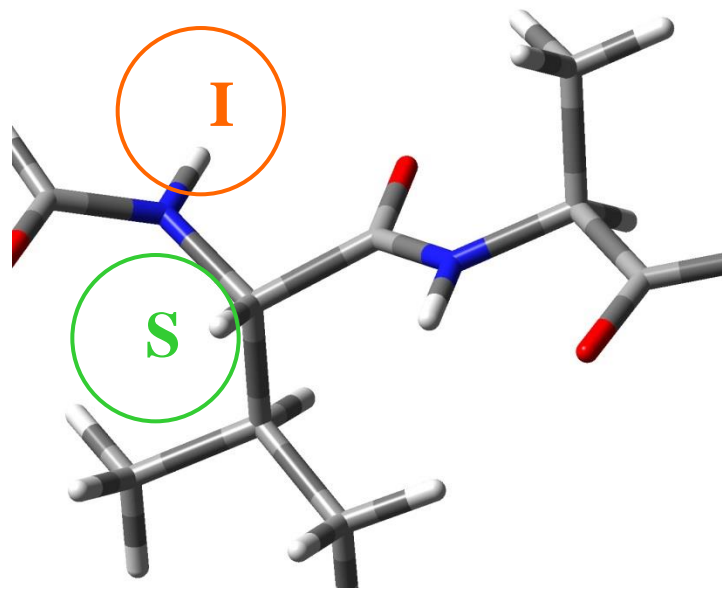
The radio frequency excitation pulse and resulting NMR signals are sent through cables between the probe coils in the magnet and the computer.



Radio frequency (Rf) generator and computer operating console. Fourier transformation of the signal from the time domain to the frequency domain occurs at the computer console.



spinrendszerek azonosítása



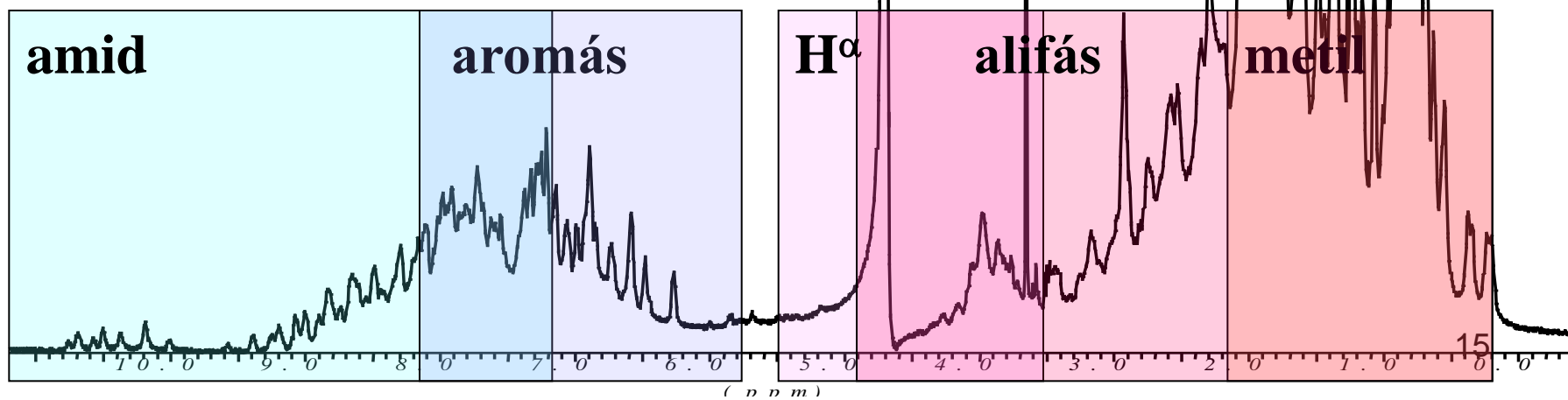
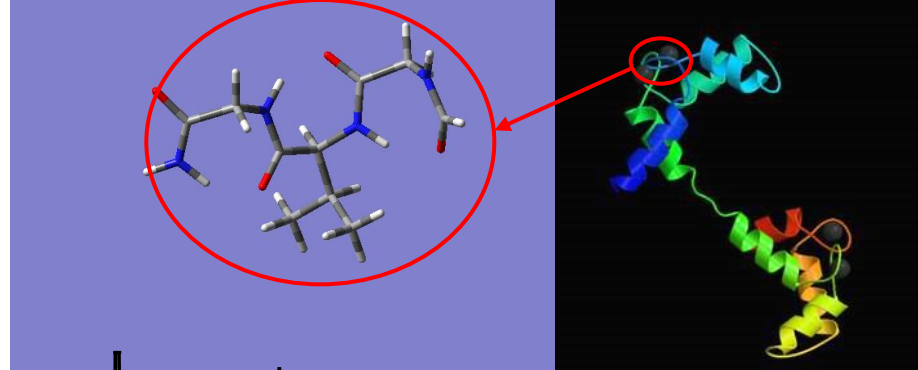
A spektrumban a J_{IS} okozta modulációtól eltekintünk

spinrendszerek azonosítása

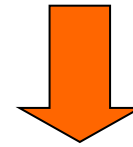
Egy ~17 kDa globuláris fehérje

^1H -spektruma

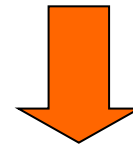
$\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9/1, $T=300\text{K}$, $c\approx 1\text{mM}$



**1. spinrendszerek
azonosítása**



**2. spinrendszerek
szekvenciális
rendezése**



**3. kényszerfeltételek
alapján
szerkezetszámolás**

Homonukleáris eljárás (homonukleáris 3J , $M < 8\text{kDa}$)
(^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H RELAY, ^1H - ^1H TOCSY)

Heteronukleáris eljárás (heteronukleáris 1J , 2J , 3J)

^{15}N -szerkesztés ($M < 15\text{kDa}$)

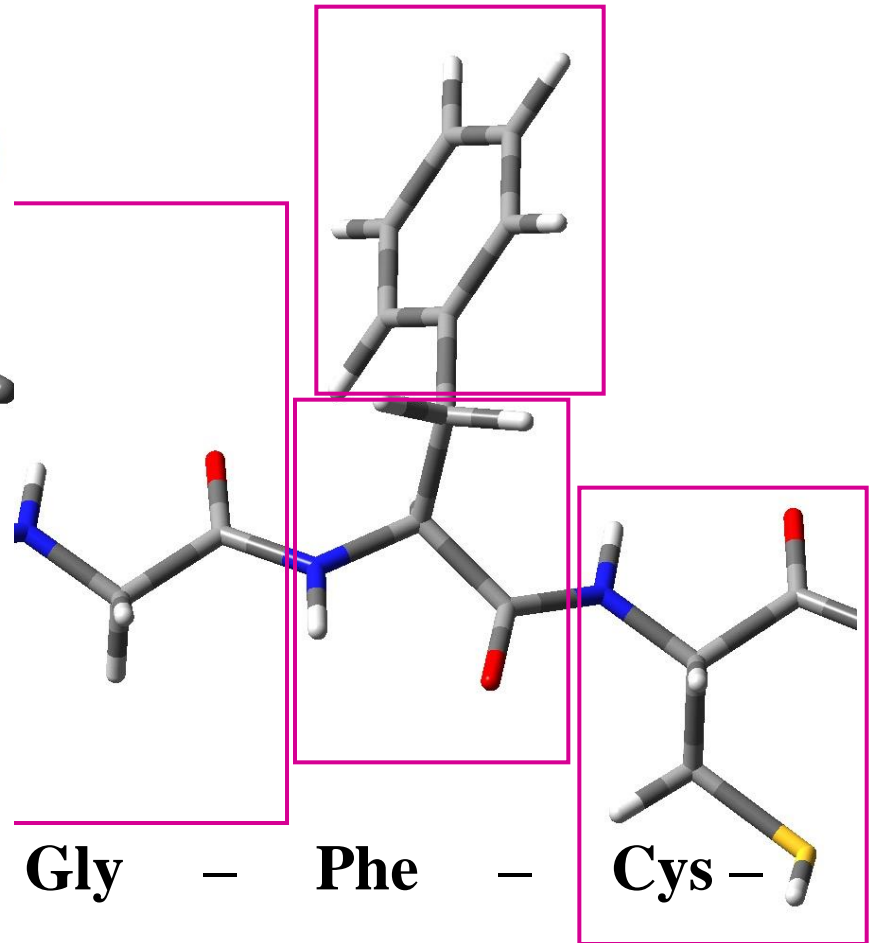
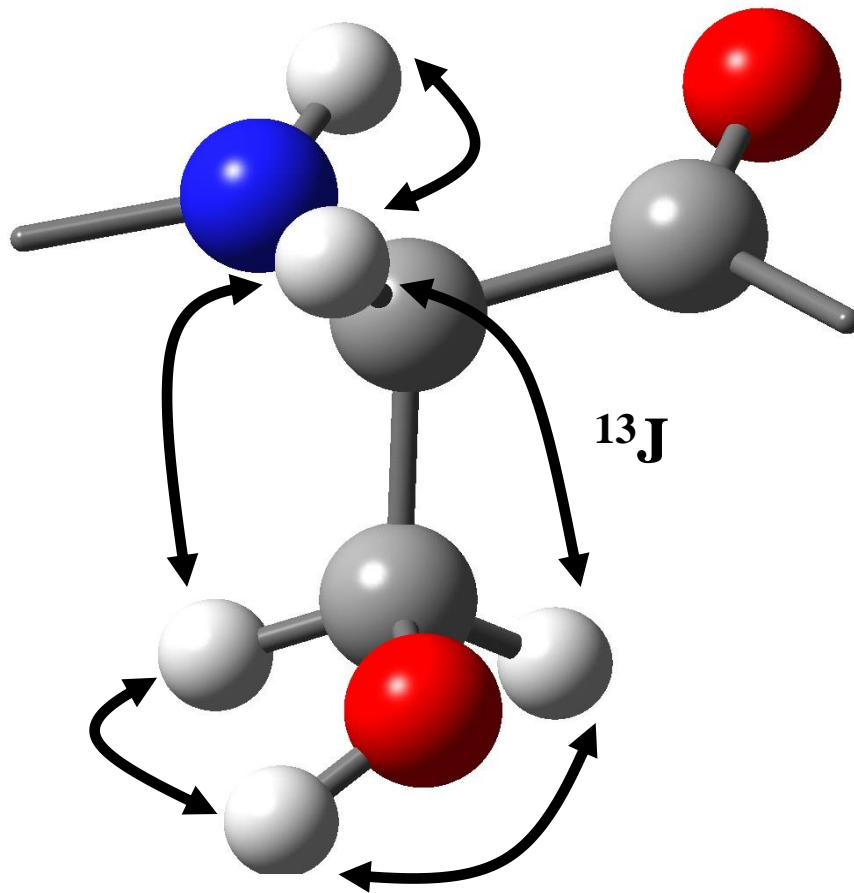
(^1H - ^{15}N TOCSY-HSQC, ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC)

^{15}N , ^{13}C -szerkesztés ($M < 20\text{kDa}$)

(HNCA, HNCOCA,)

^{15}N , ^{13}C -szerkesztés (2H) ($M < 30\text{kDa}$)

Peptidekben és a fehérjékben az aminosavak hidrogénatomjai elkülönülő spinrendszereket alkotnak



A Vektor modell és a *Bloch*-egyenletek helyett a **szorzatoperátor-elmélet**

Alapfogalmak:

magspin-operátor vagy impulzusnyomaték-operátor: $\hat{\mathbf{I}}$ $\hat{\mathbf{I}} = \hat{\mathbf{I}}_x, \hat{\mathbf{I}}_y, \hat{\mathbf{I}}_z$

az időtől függő **spinsűrűség**-operátor $\sigma(t)$

az időtől függő **Hamilton**-operátor $\hat{H}(t)$

az időtől függő, normalizált **állapotfüggvény** $\psi(t)$

Az **alapegyenlet**: $d\sigma(t)/dt = -i\hbar^{-1}[\hat{H}(t), \sigma(t)]$ *Liouville- von Neumann-egyenlet*

Mi kerül a *Hamilton*-operátorba?

Az **I** és **S** spinek (**AX** spinrendszer) esetén, oldatfázisban:

Zeeman-effektust + a skaláris **csatolást** + a rádiófrekvenciás **gerjesztést** leíró három tag.

$$\hat{H} = -\omega_1 \hat{\mathbf{I}}_x - \omega_2 \hat{\mathbf{S}}_x + J \hat{\mathbf{I}}_z \hat{\mathbf{S}}_z - \Omega_I \hat{\mathbf{I}}_z - \Omega_S \hat{\mathbf{S}}_z$$

Cél a mérhető makroszkopikus mágnesezettség-vektor (M) nagyságának és moduláltságának meghatározása:

A megfigyelhető makroszkopikus mágnesezettség pl. M_y összetevője a következő:

$$M_y(t) = N\gamma\hbar \text{Tr}[\sum_k I_{ky} \sigma(t)]$$

ahol γ és \hbar mellett, N az egységnyi térfogatban vett spinek darabszáma.

A feladat: A magspin operátor (I) valamint a spinsűrűség-operátor $\{\sigma(t)\}$ szorzatának **valamilyen bázison** vett mátrixreprezentációjának a spurját (Tr) kell meghatároznunk!

A nagy kérdés: mi legyen az alkalmas bázis?

Mi legyen az s elemből álló báziskészlet (B_s) ? $\sigma(t) = \sum_s b_s(t) B_s$

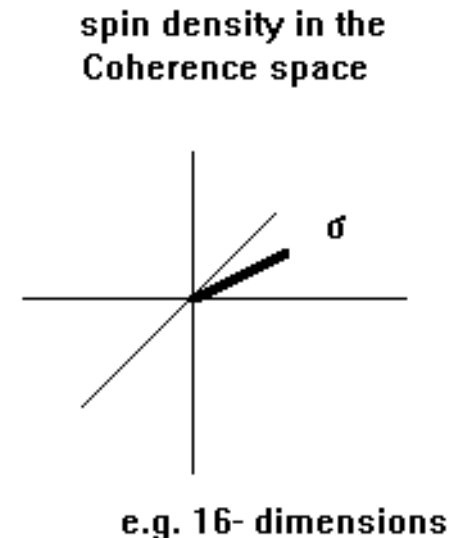
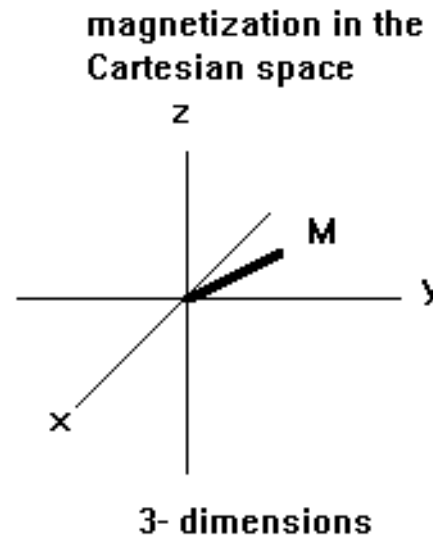
A megoldás: a B_s báziskészlet legyen a spin impulzusmomentum-operátor. **Sorensen** korábbi javaslata értelmében a Descartes-típusú I_{kl} bázisoperátorok használata az alábbiak szerint felettebb eredményes:

$$B_s = 2^{(q-1)} \prod_{k=1}^n (I_{kl})^{a_{sk}}$$

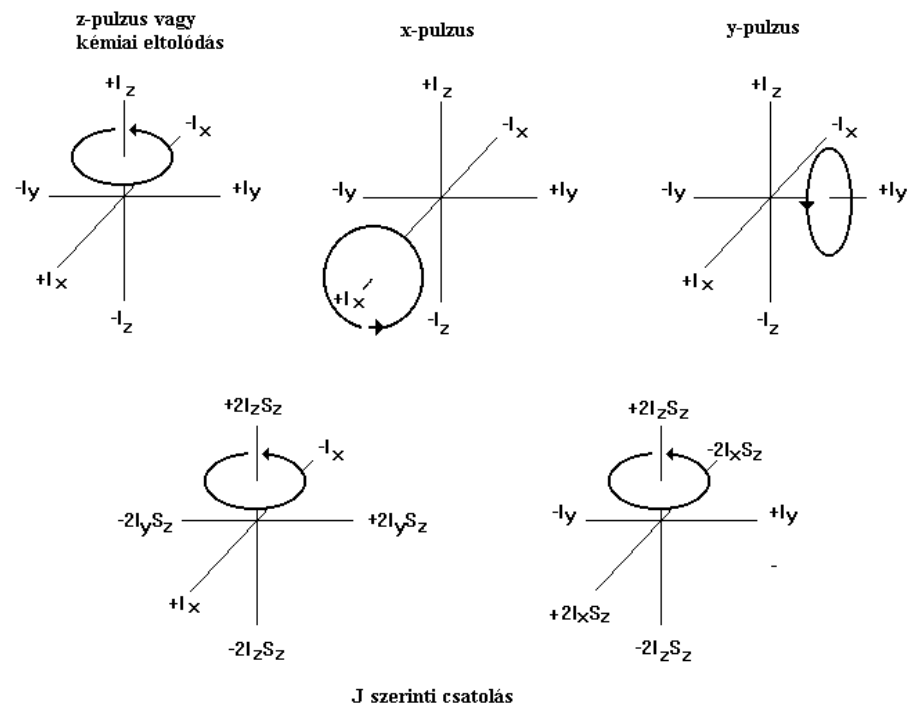
Az **I** és **S** spinek (**AX** spinrendszer) 16 bázisoperátort táblázatos alakban:

	E	S_x	S_y	S_z	
E	E	S_x	S_y	S_z	B_s elemeihez milyen fizikai kép rendelhető? mágnesezettség (populáció, NOE)
I_x	I_x	$2I_x S_x$	$2I_x S_y$	$2I_x S_z$	szin-fázisú egyszeres kvantumkoherenciáik.
I_y	I_y	$2I_y S_x$	$2I_y S_y$	$2I_y S_z$	S spinen lokalizálható ellentétesfázisú koherenciák
I_z	I_z	$2I_z S_x$	$2I_z S_y$	$2I_z S_z$	

I spinhez tartozó ellentétesfázisú koherenciák



Tipikus transzformációk a 16
bázisoperátor által kifeszített
koherencia-térben:

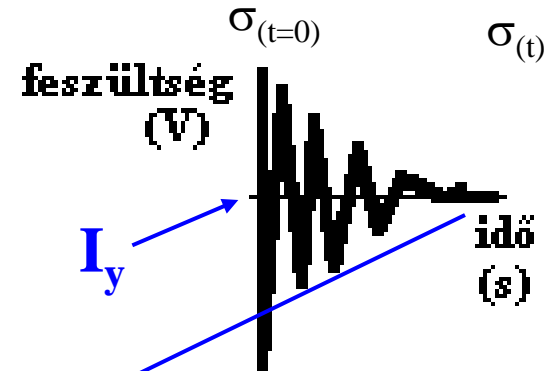


$$\sigma_{(t=0)} = hB_0 (\gamma_I I_y + \gamma_S S_z) / (8\pi kT)$$

$$H = \Omega_I I_z + \Omega_S S_z - \pi J_{IS} I_z S_z$$

$\sigma_{(t=0)}$

$$\begin{aligned}
 & S_z[\Omega_S t] \\
 & I_z[\Omega_I t] \\
 & + I_y \cos(\Omega_I t) - I_x \sin(\Omega_I t) \\
 & 2I_z S_z (J_{IS} \pi t) \\
 & \Downarrow \\
 & + I_y \cos(\Omega_I t) \cos(J_{IS} \pi t) \\
 & - 2I_x S_z \cos(\Omega_I t) \sin(J_{IS} \pi t) \\
 & - I_x \sin(\Omega_I t) \cos(J_{IS} \pi t) \\
 & - 2I_y S_z \sin(\Omega_I t) \sin(J_{IS} \pi t)
 \end{aligned}$$



$\sigma_{(t)}$

$$+ I_y \cos(\Omega_I t) \cos(J_{IS} \pi t):$$

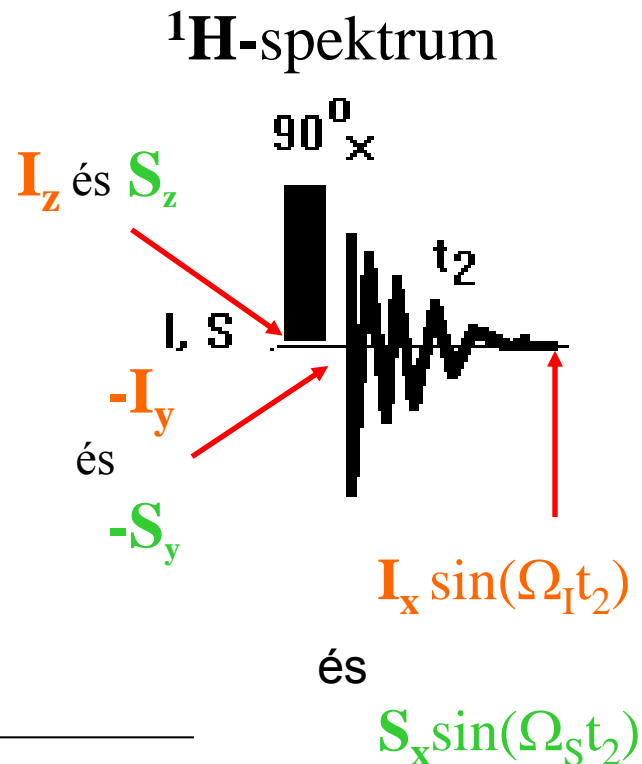
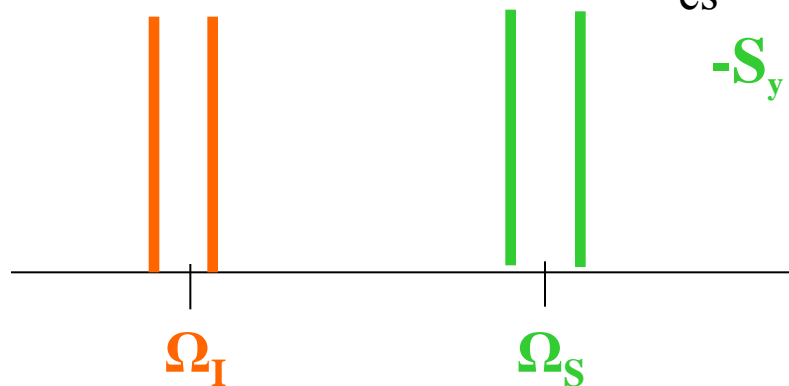
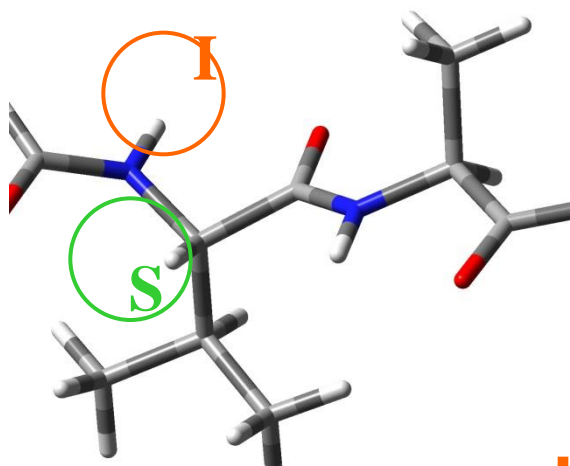
$$\cos(A)\cos(B) = 1/2[\cos(A+B) + \cos(A-B)]$$

következően a spektrum alakja:

$$+1/2 I_y [\cos\{(\Omega_I + \pi J_{IS})t\} + \cos\{(\Omega_I - \pi J_{IS})t\}]$$

$I_y [+a, +a] \Omega_I$ kémiai eltolódásértéknél

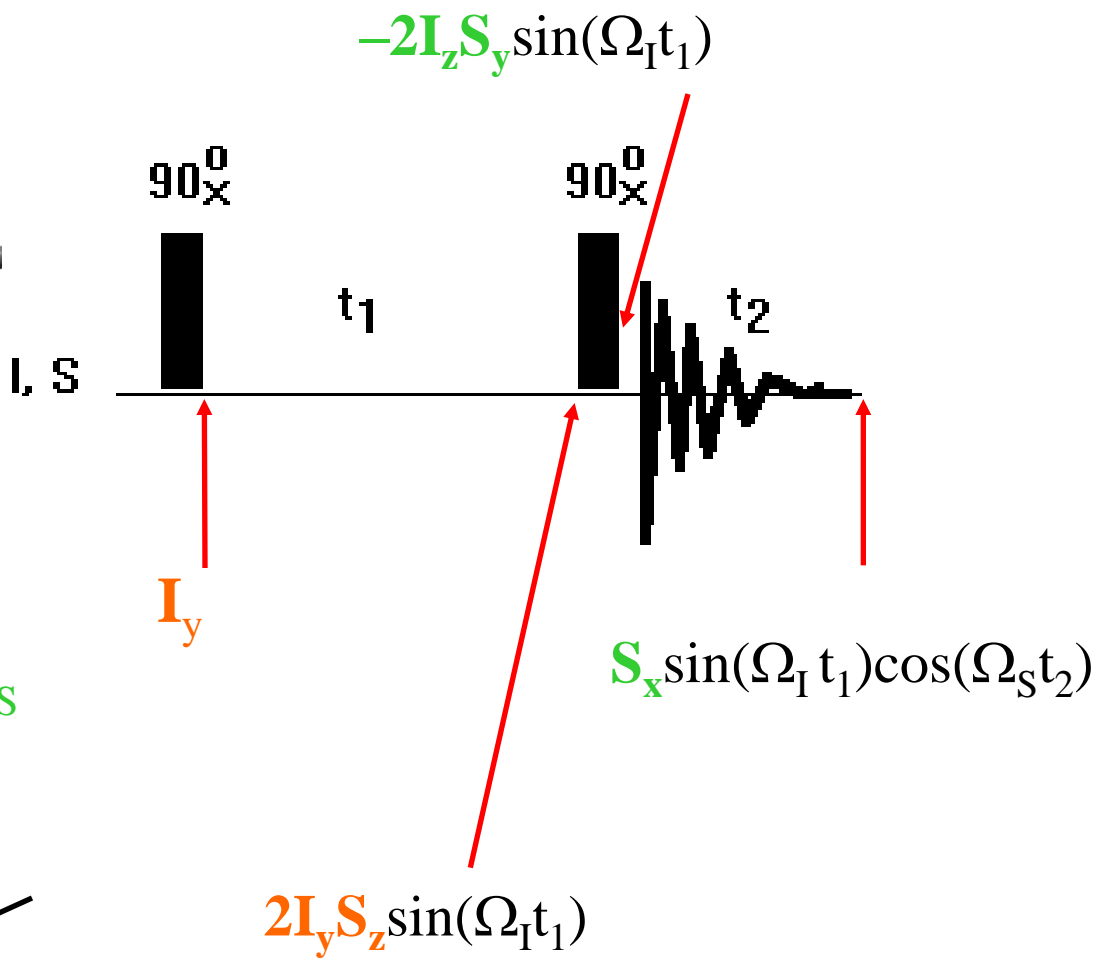
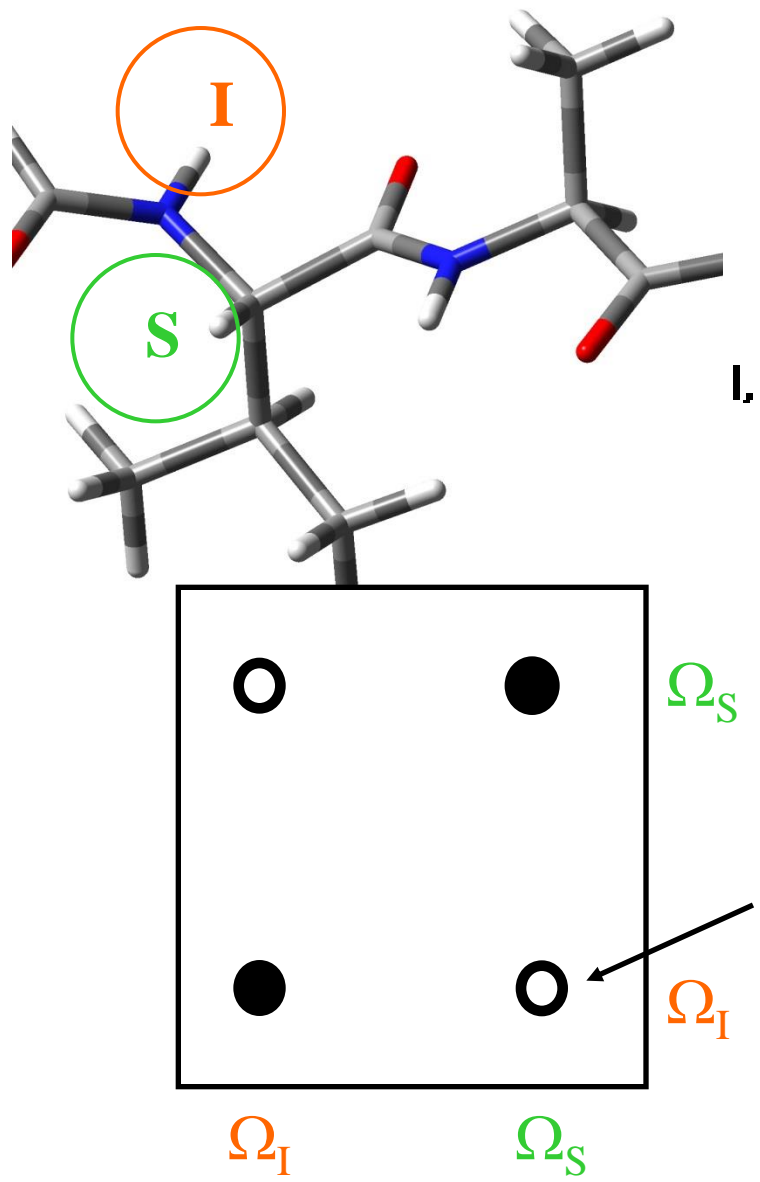
memo: az spektrum a Bloch-egyenlet alapján: $S(t) = C \cdot \exp(-t/T_2) \cos(\Omega_I t)$.

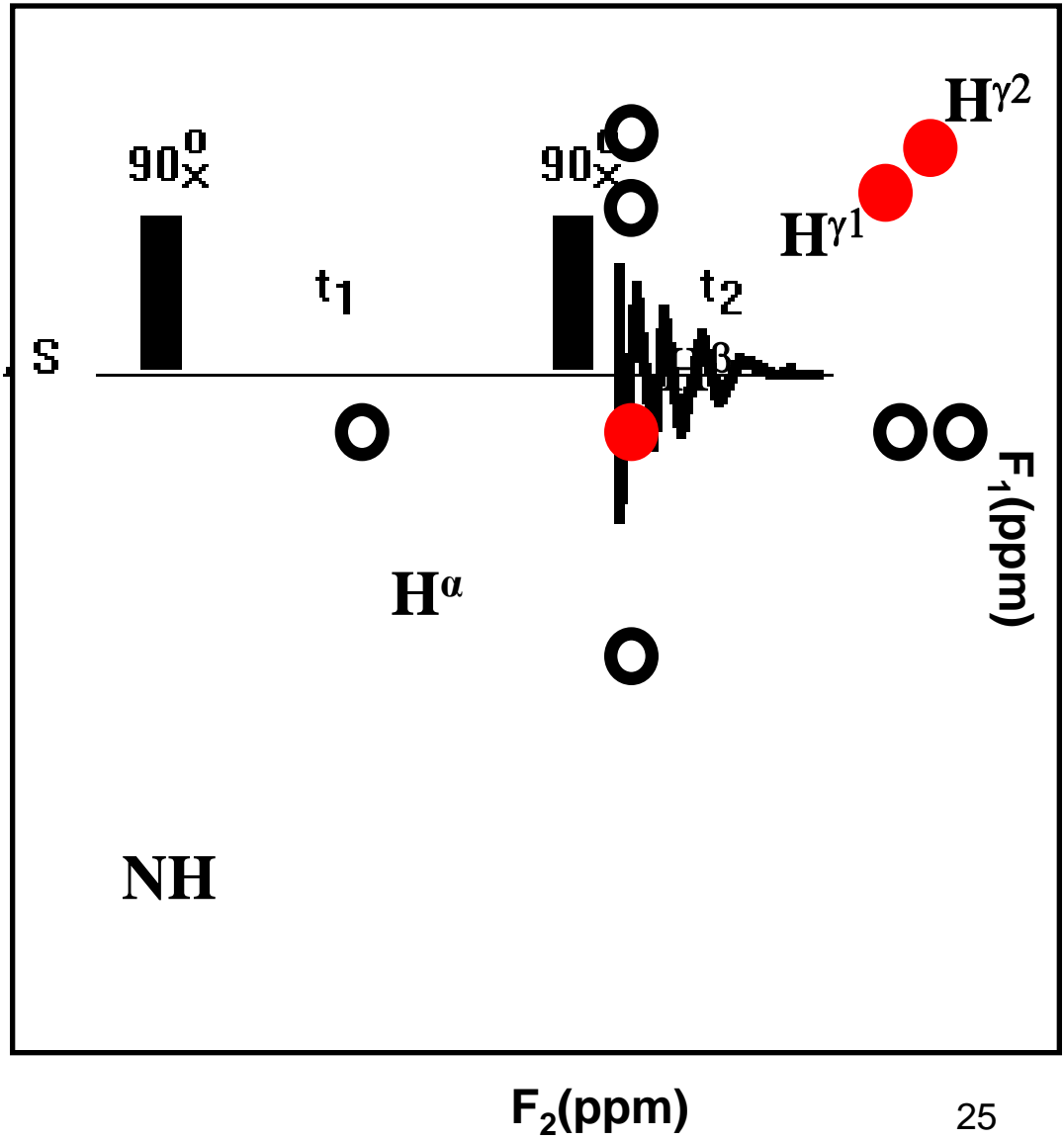
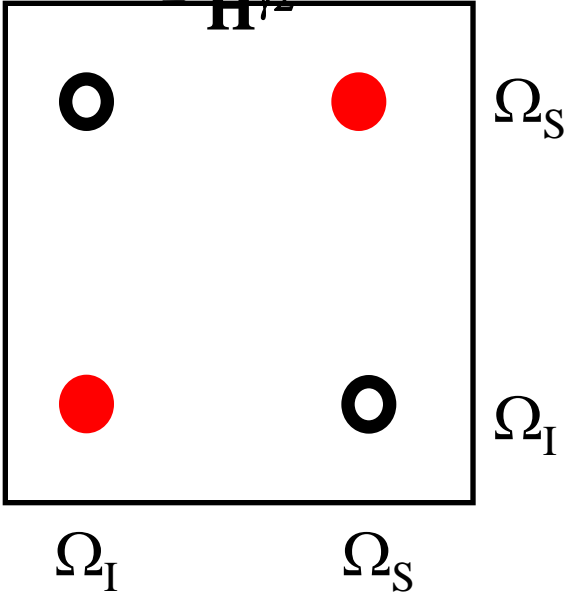
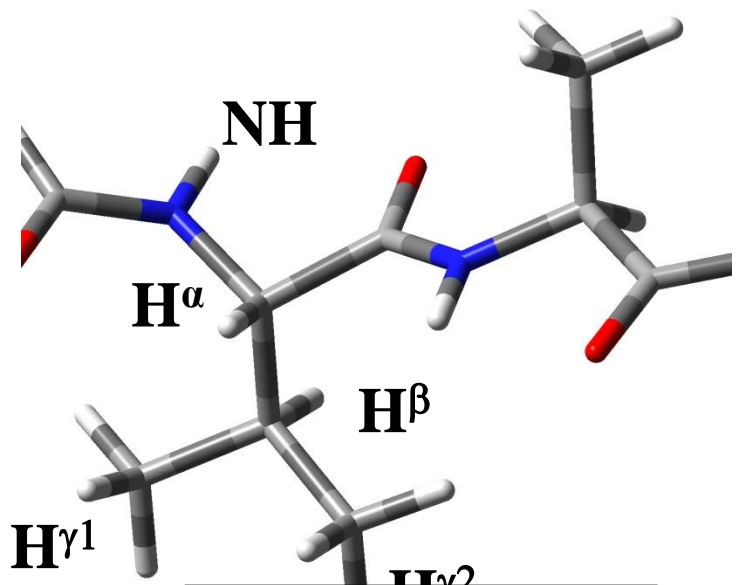


F1(ppm)

spinrendszerek azonosítása

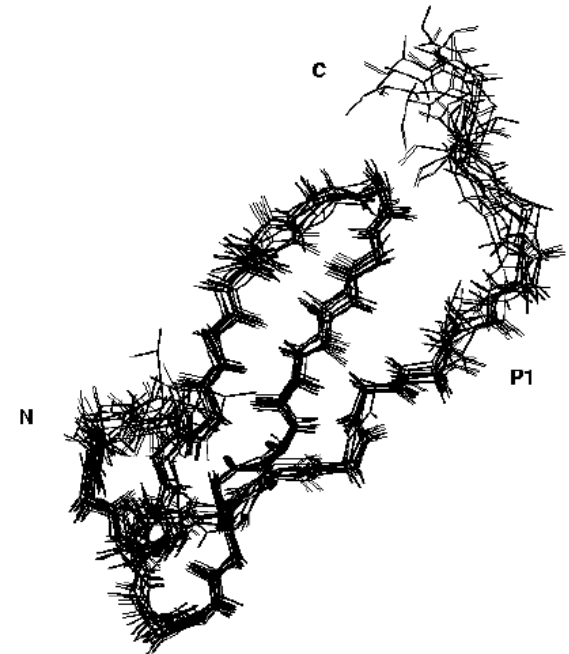
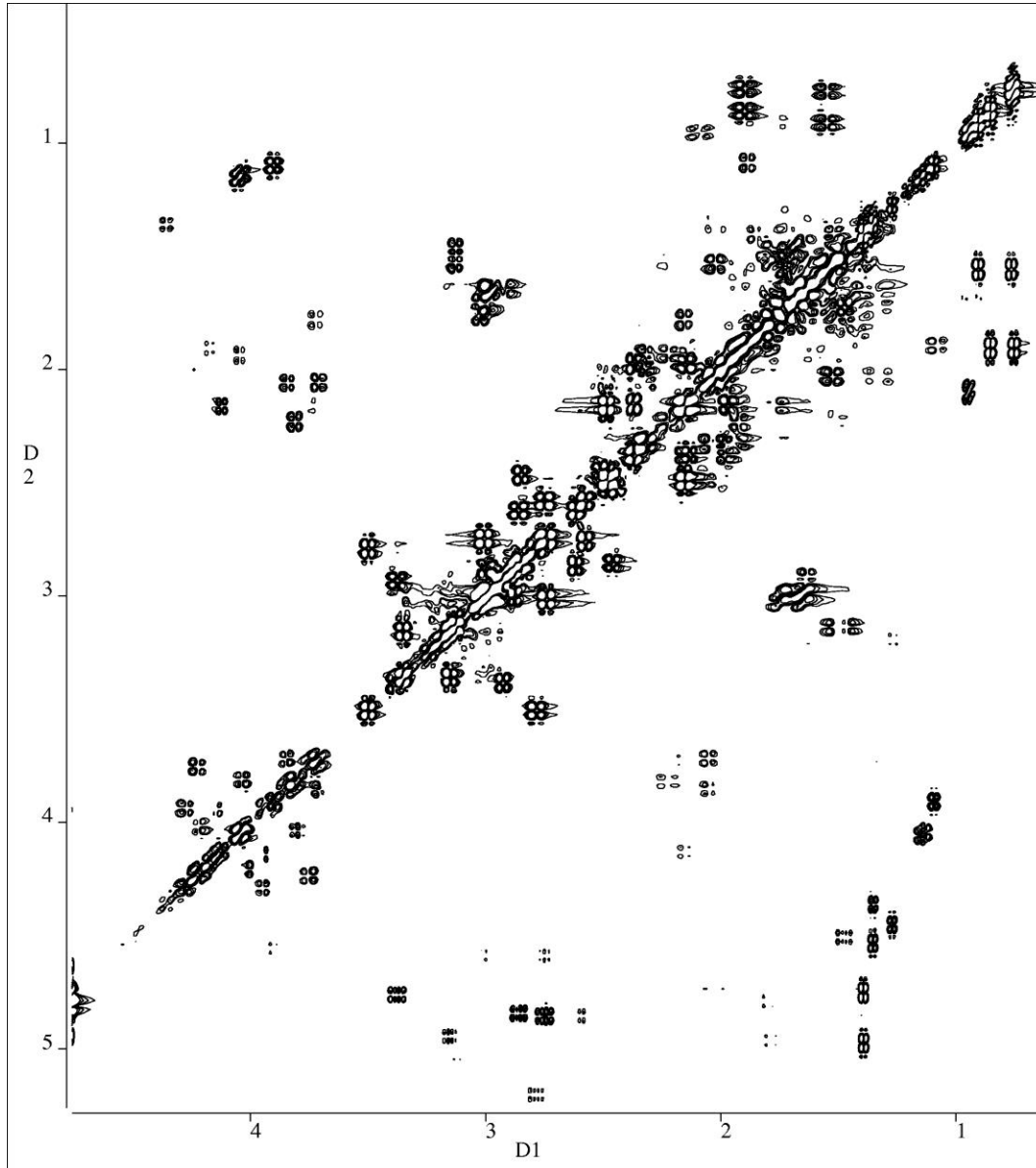
¹H-¹H COSY
(homonukleáris korrelációs spektrum)





A spektrumban a J_{IS} okozta modulációtól eltekintünk

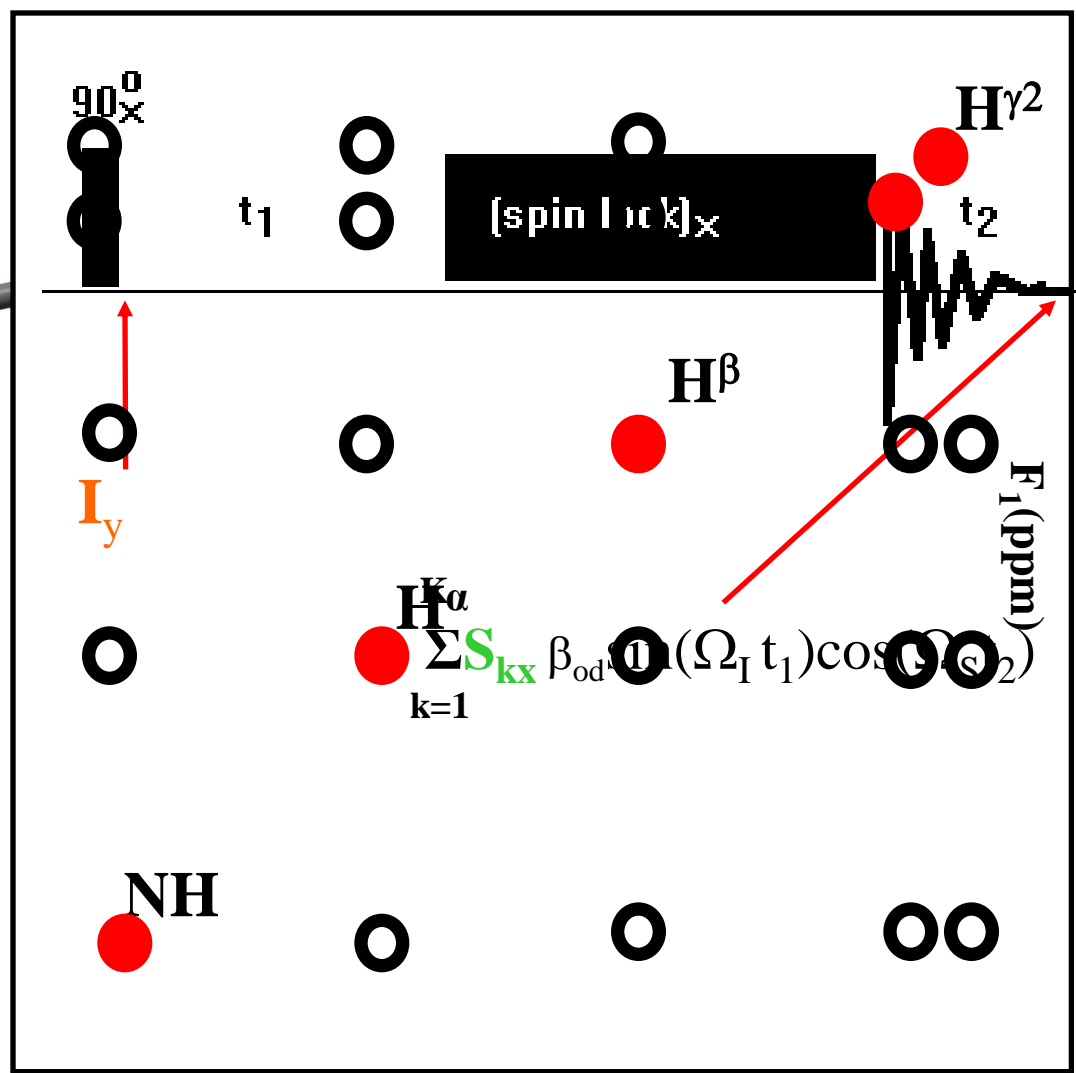
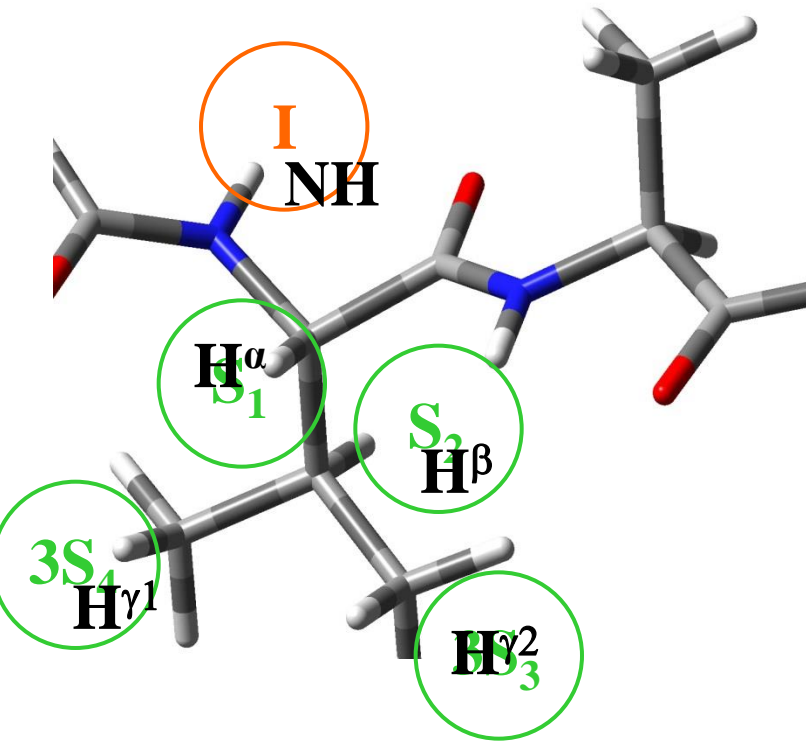
Fehérje modul ^1H - ^1H COSY spektruma



spinrendszerek azonosítása

¹H-¹H TOCSY

protonok teljes korrelációját létrehozó spektrum

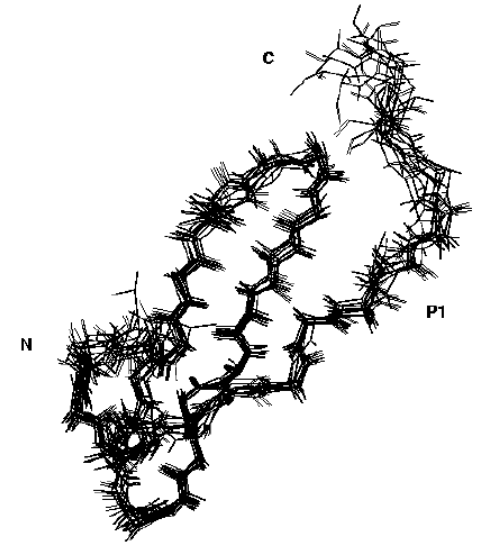
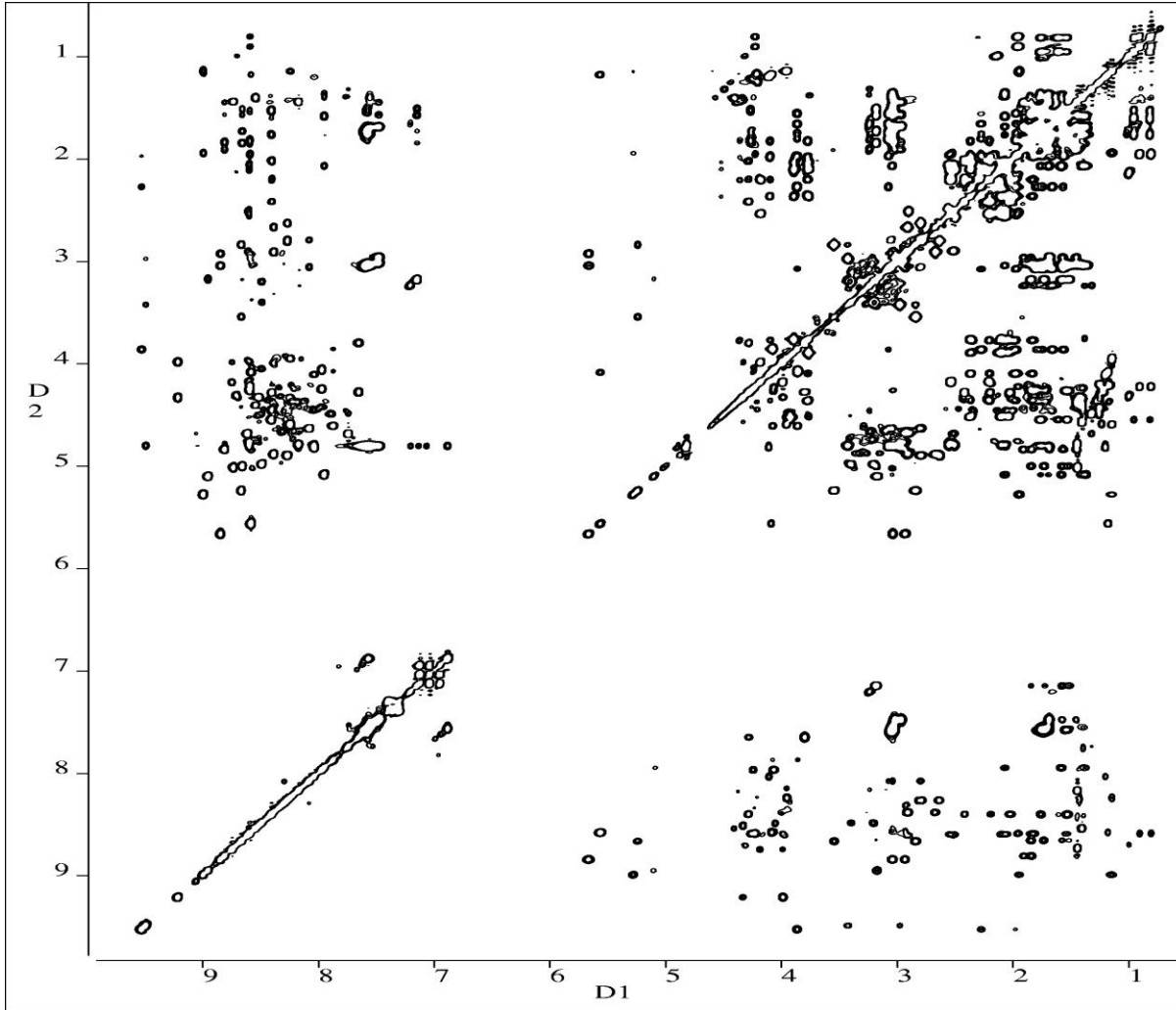


- diagonális jelek
- diagonálison kívüli jelek

β_{od} = diagonálison kívüli intenzitások

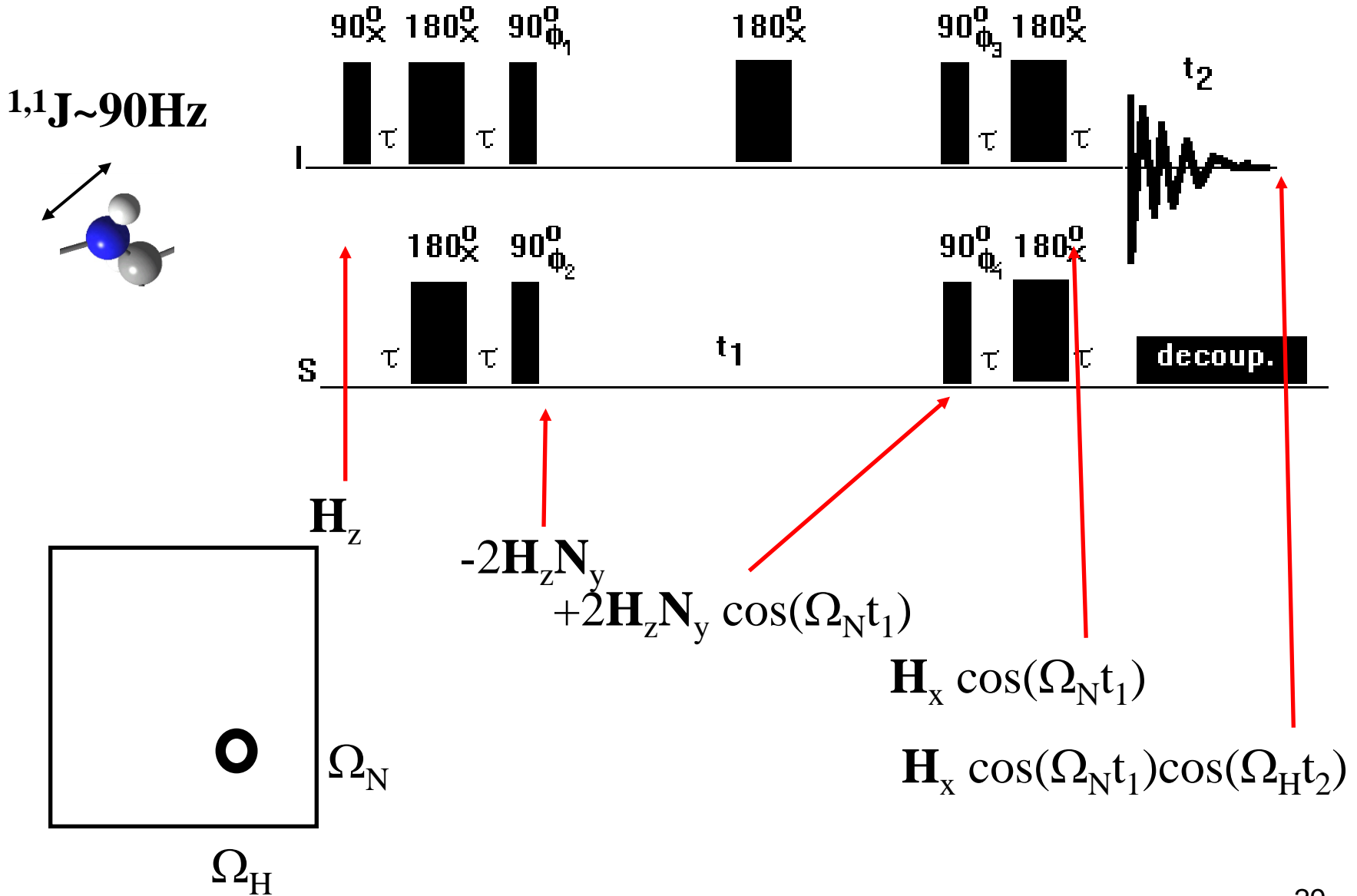
A spektrumban a J_{IS} okozta modulációtól eltekintünk

Fehérje modul ^1H - ^1H TOCSY spektruma

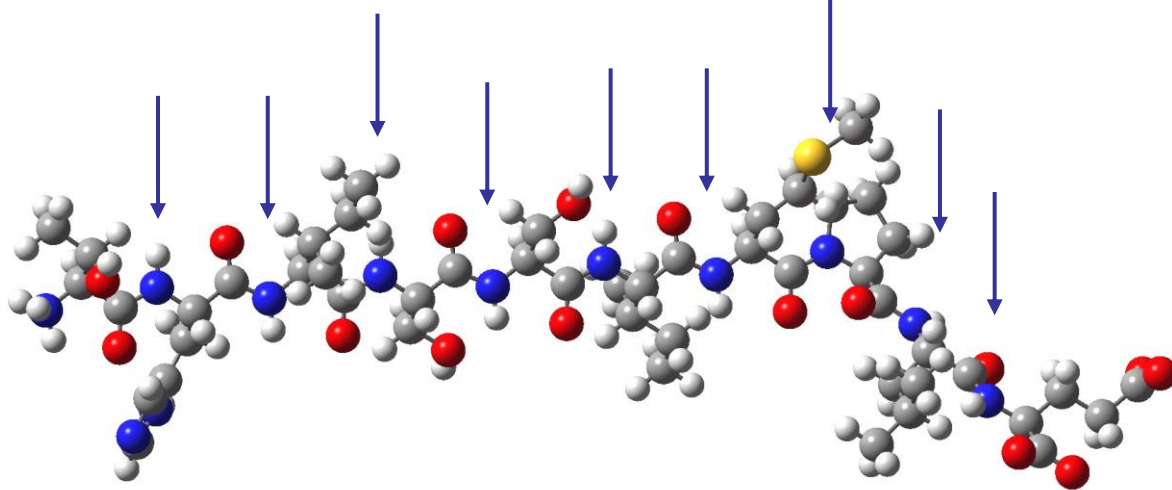


Heteronukleáris egyszeres-kvantum koherencia spektrum

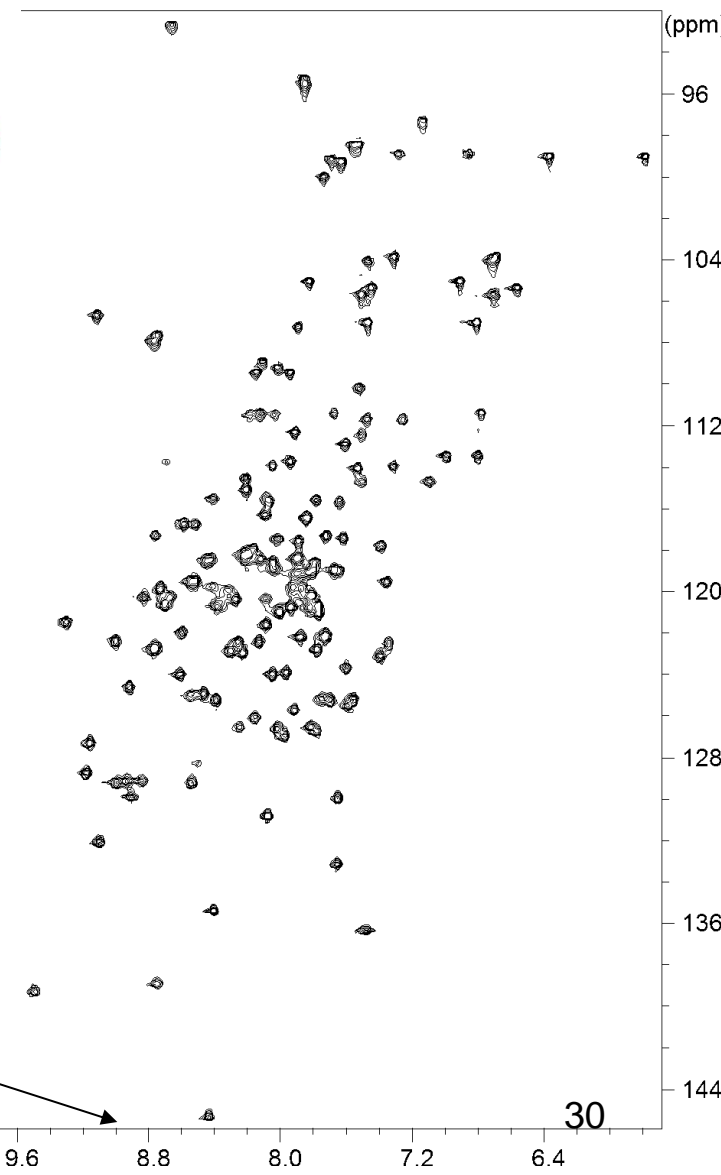
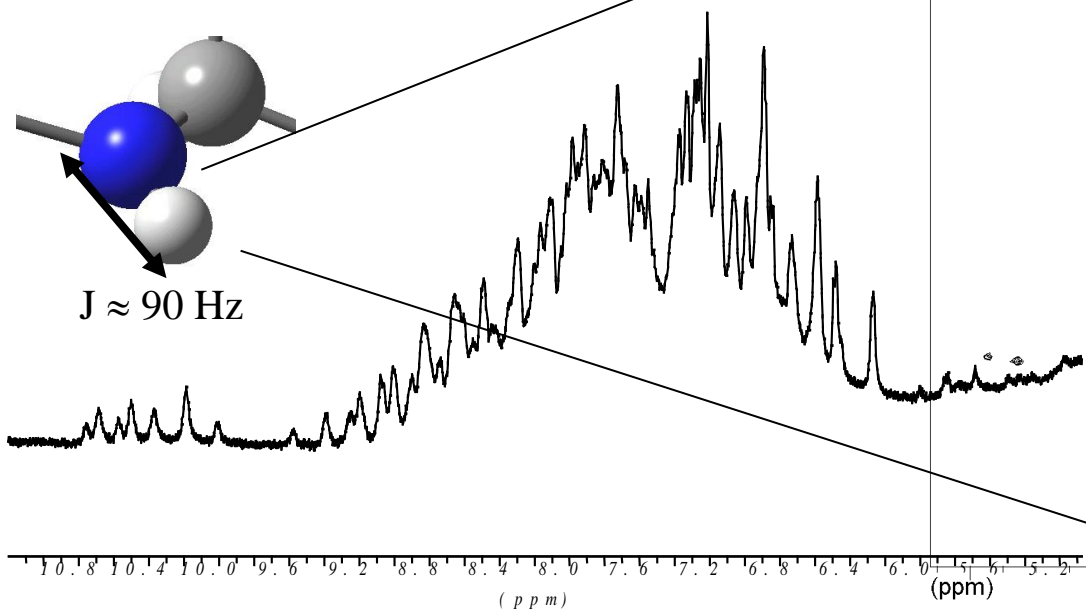
HSQC = Heteronuclear Single-Quantum Coherence



A kalmodulin ^1H - ^{15}N HSQC spektruma



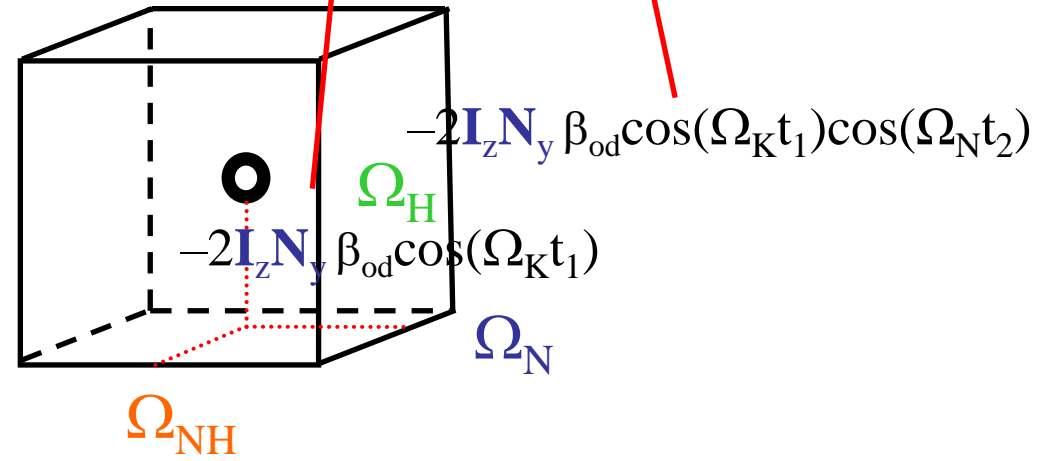
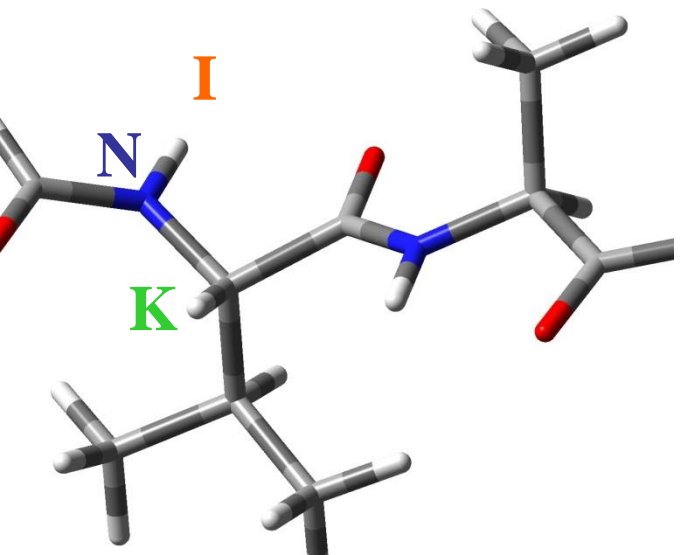
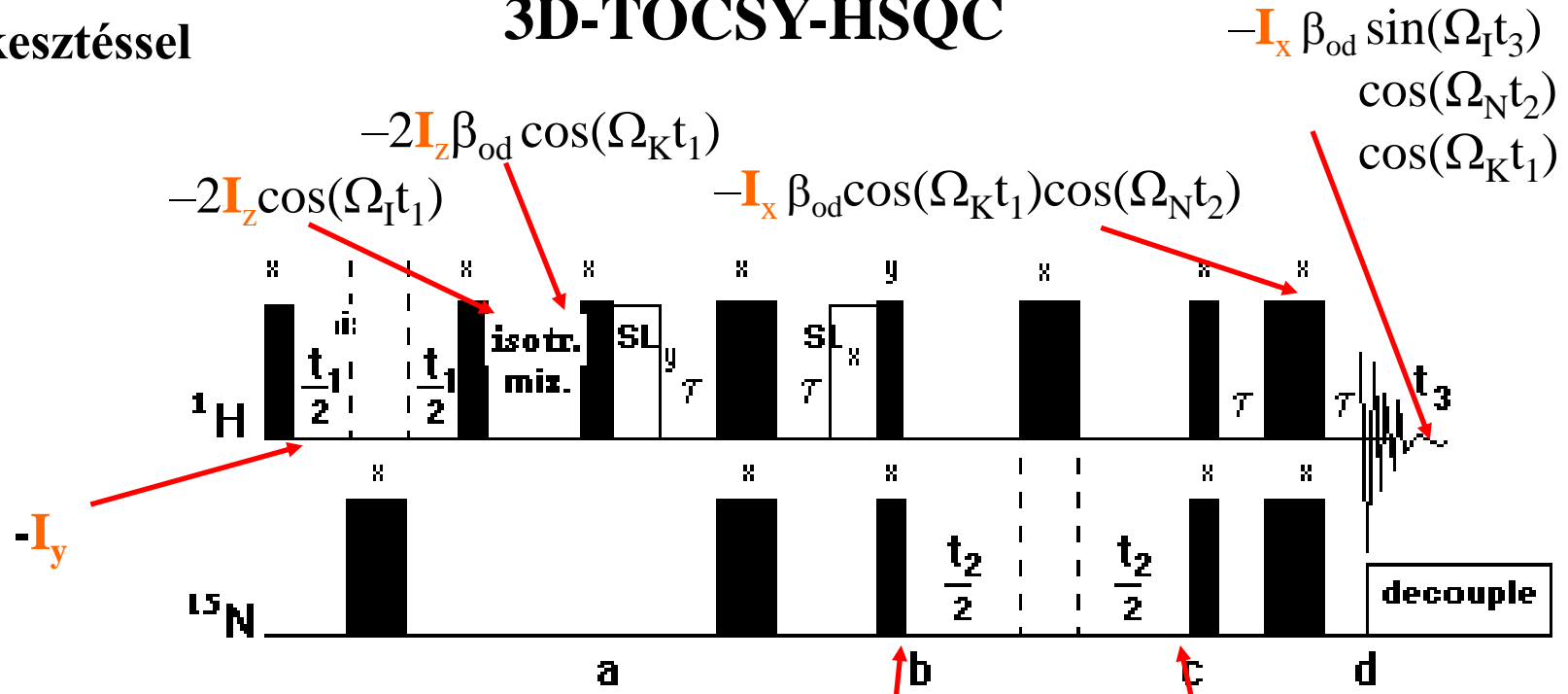
A kalmodulin ^1H spektrumának amid NH és aromás tartománya



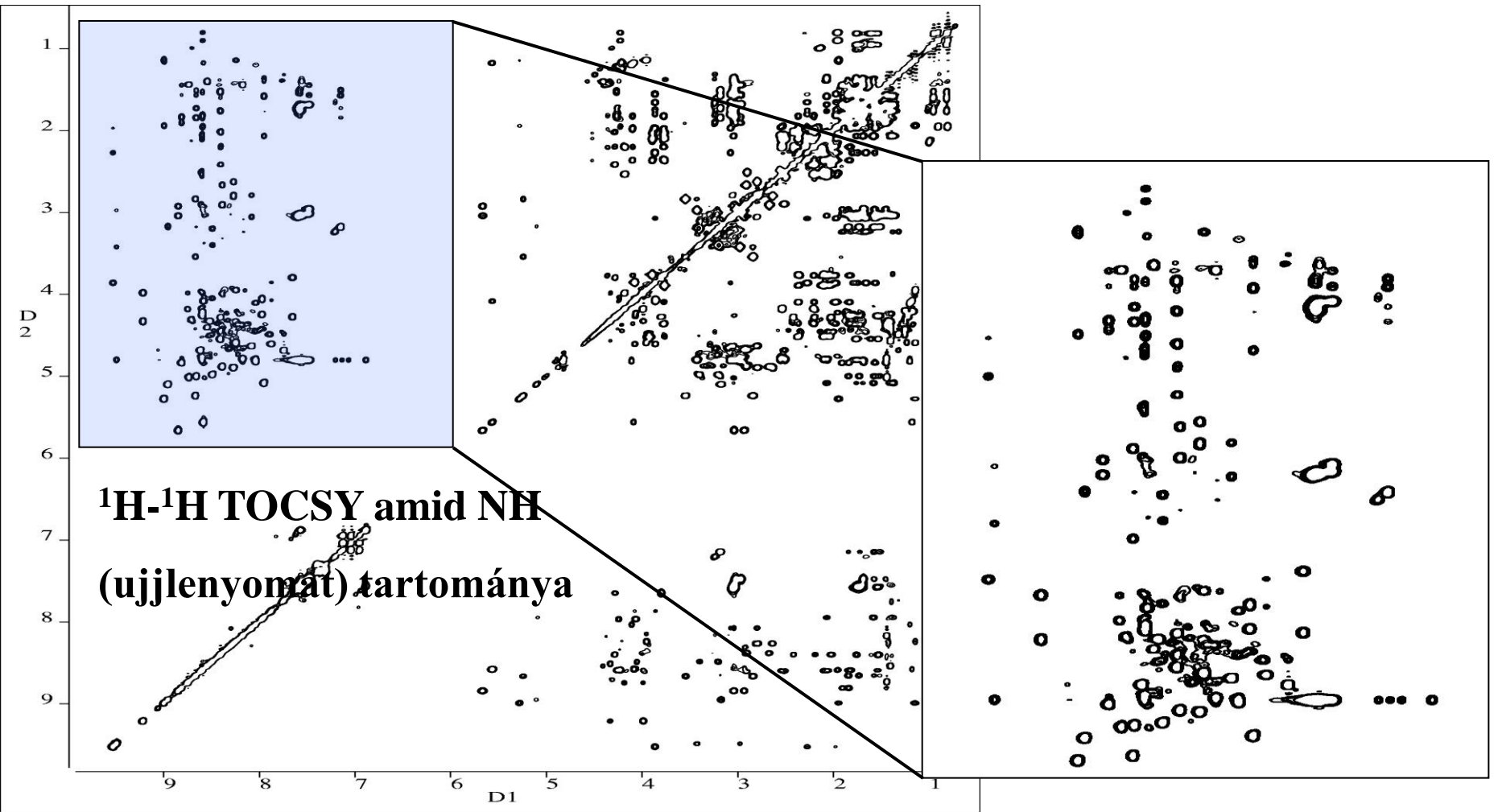
spinrendszerek azonosítása

¹⁵N-szerkesztéssel

3D-TOCSY-HSQC

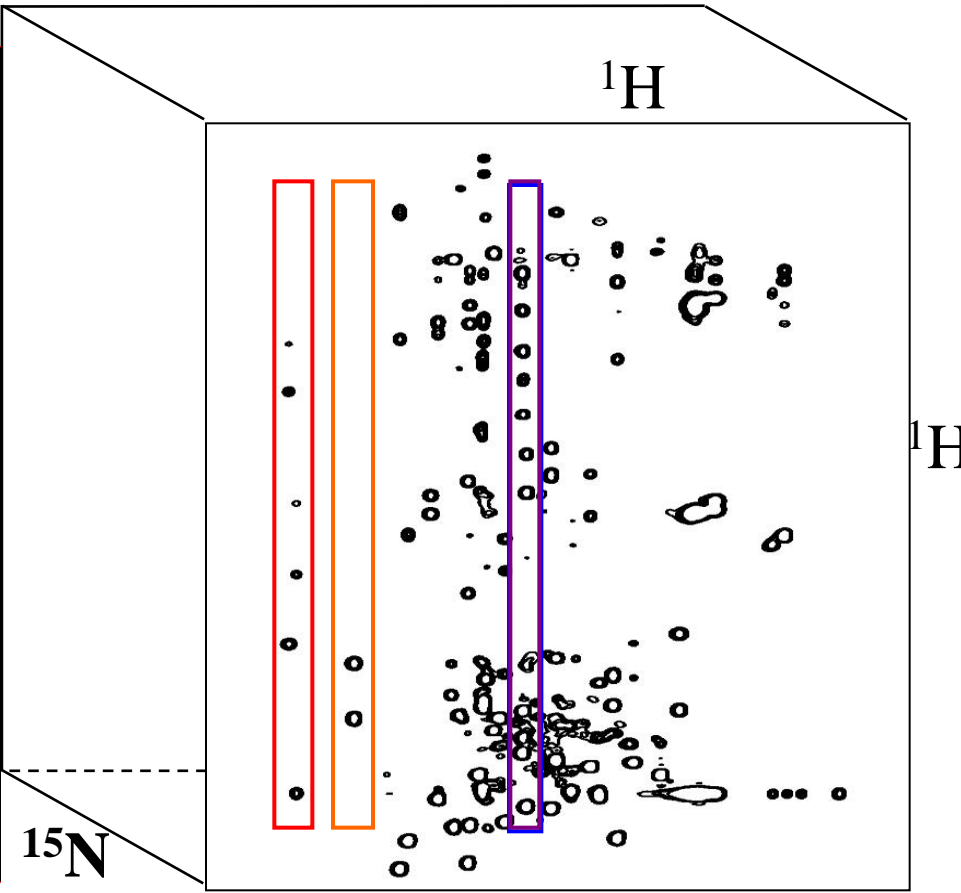
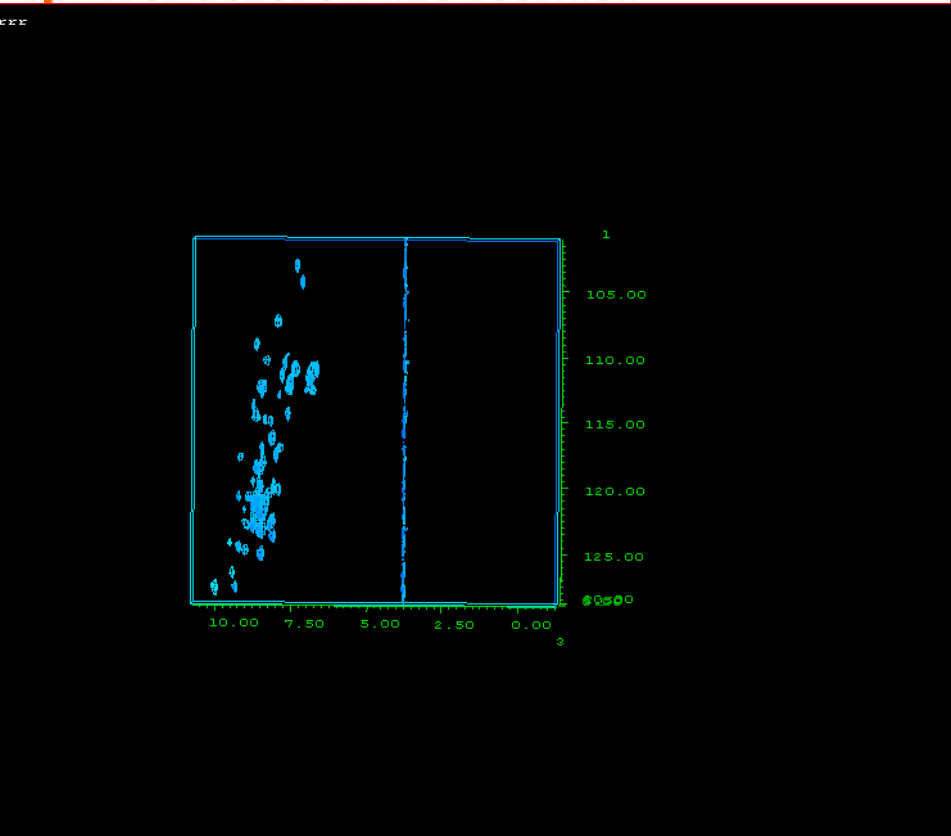


β_{od} = off diagonális intenzitás
 A J_{IK} okozta modulációtól eltekintünk



Homonukleáris 2D TOCSY

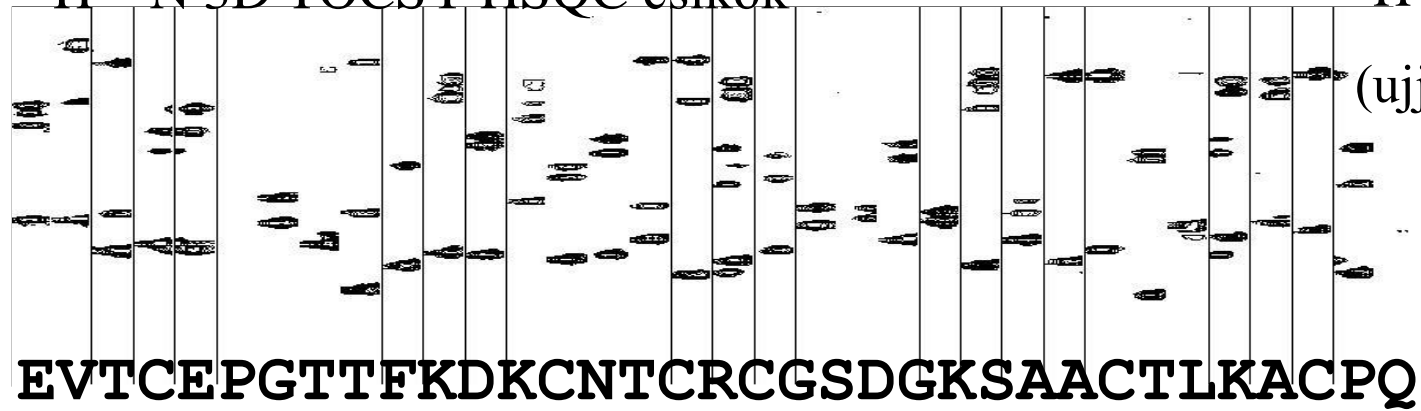
spinrendszerek azonosítása



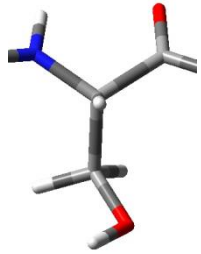
^1H - ^{15}N 3D TOCSY-HSQC csíkok

^1H - ^1H TOCSYamid NH

(ujjlennyomat) tartománya



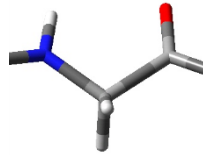
(AMX) Ser



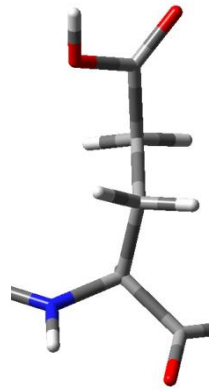
(A₃X) Ala



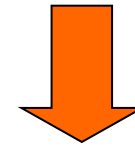
(AX) Gly



(A₂M₂X) Glu



**1. spinrendszerek
azonosítása**

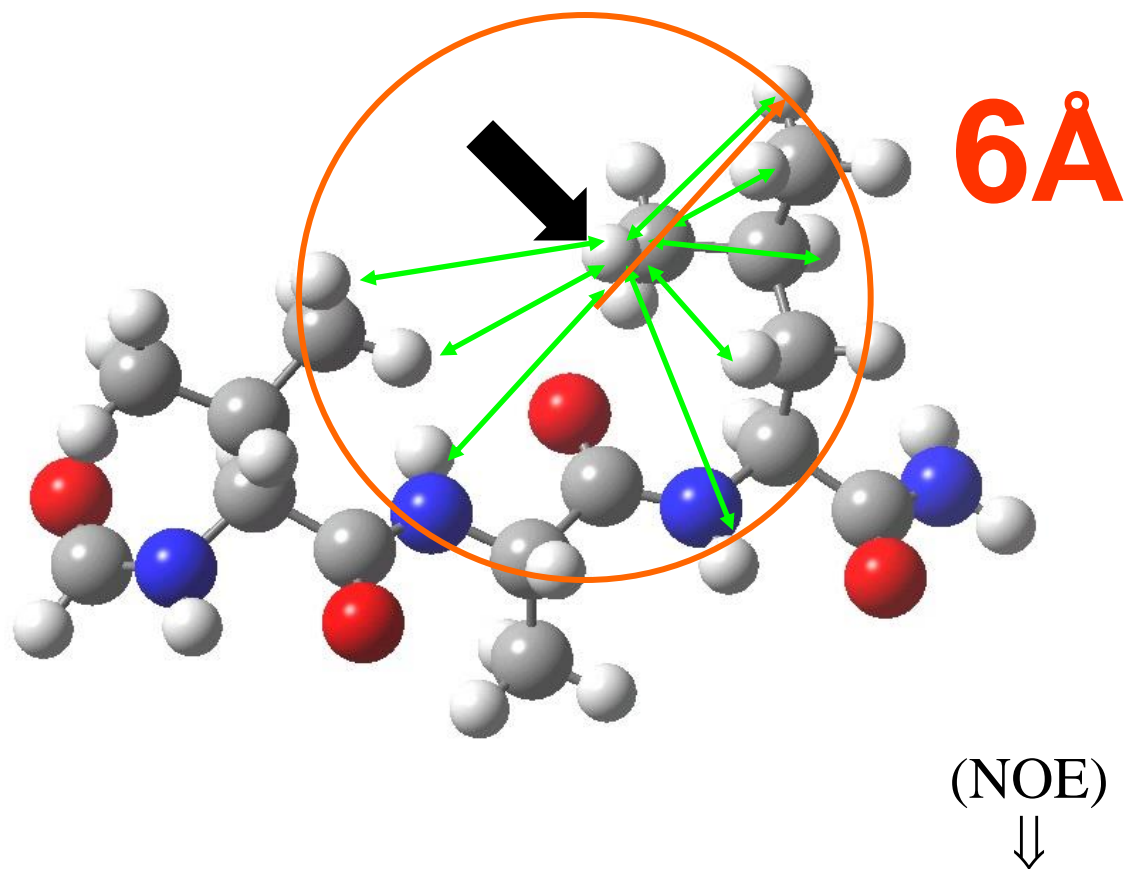


**2. spinrendszerek
szekvenciális
rendezése**



**3. kényszerfeltételek
alapján
szerkezetszámolás**

A szekvenciális hozzárendelés és a szerkezetszámolás alapja a nukláris *Overhauser*- effektus (NOE)

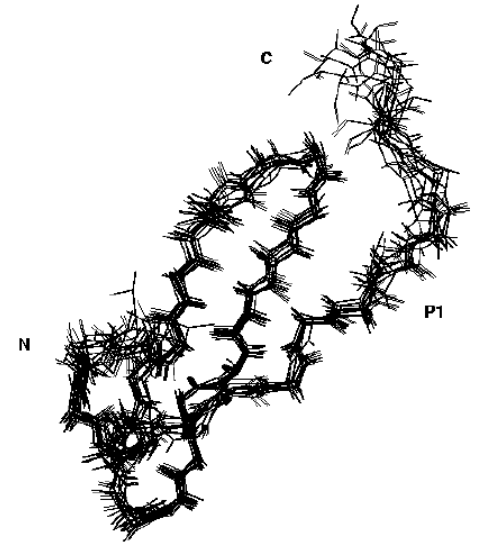
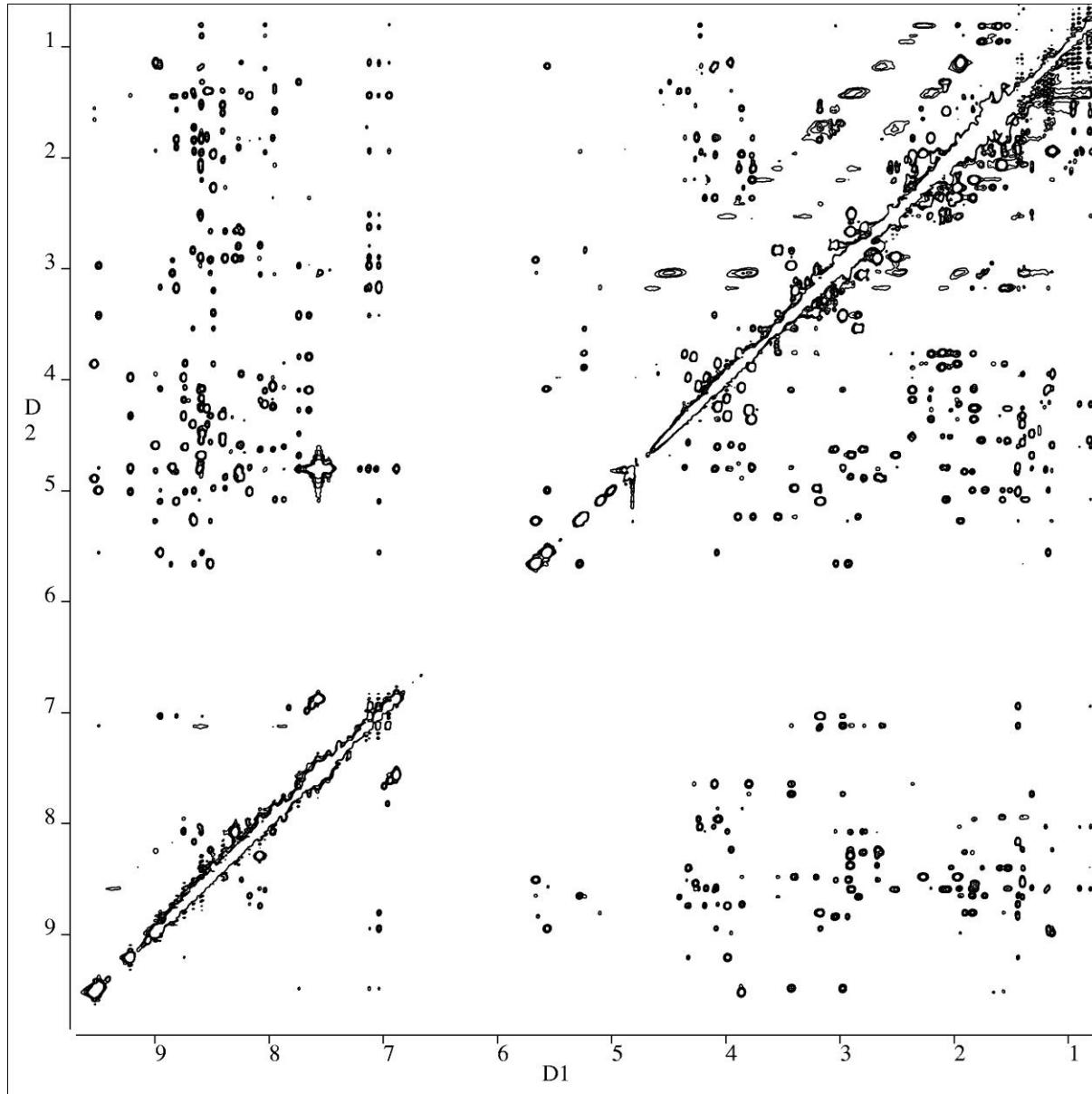


(NOE)



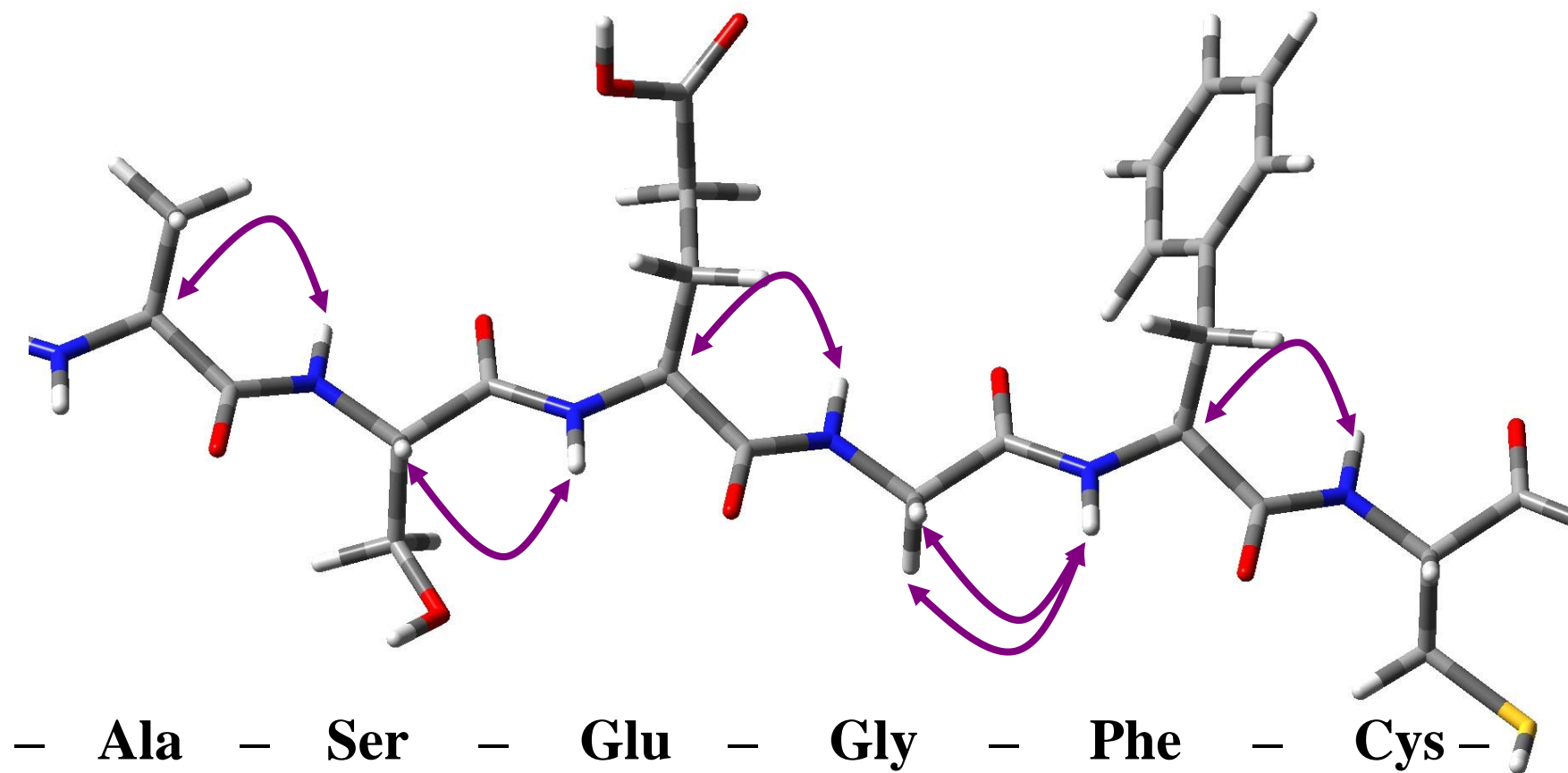
Távolság jellegű adatok

Fehérje modul ^1H - ^1H NOESY spektruma

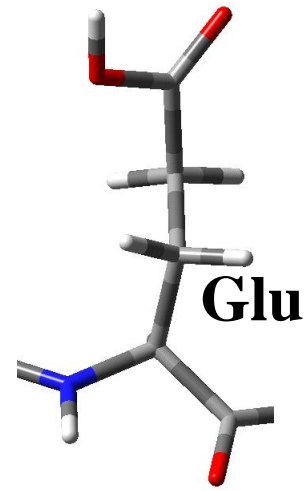
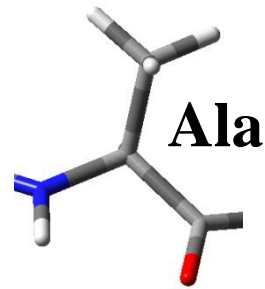
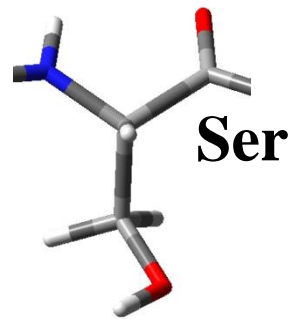


spinrendszerek szekvenciális rendezése

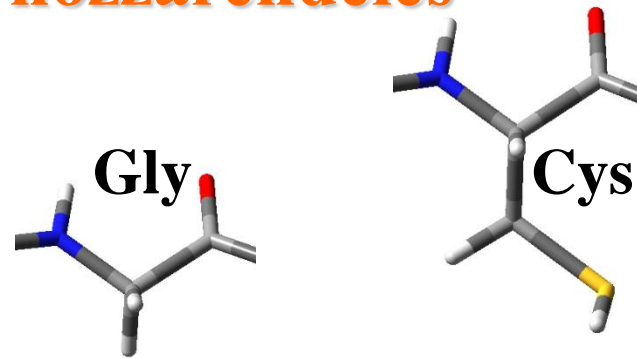
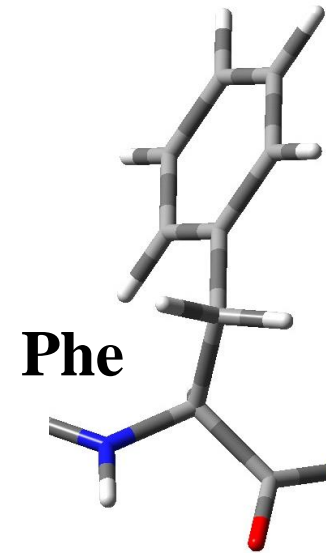
A spinrendszerek szekvenciális rendezését
biztosító $H^{\alpha}_{i-1}-H^{NH}_i$ NOE-k



spinrendszerek szekvenciális rendezése



A szekvenciális
hozzárendelés



Ala

Ser

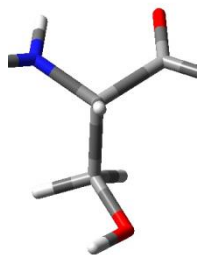
Glu

Gly

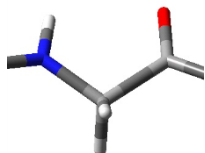
Phe

Cys

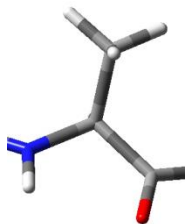
(AMX) Ser



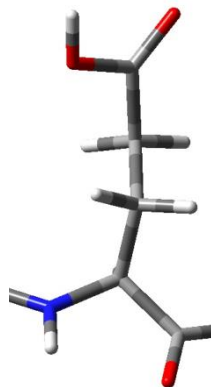
(AX) Gly



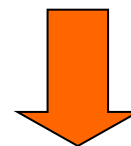
(A₃X) Ala



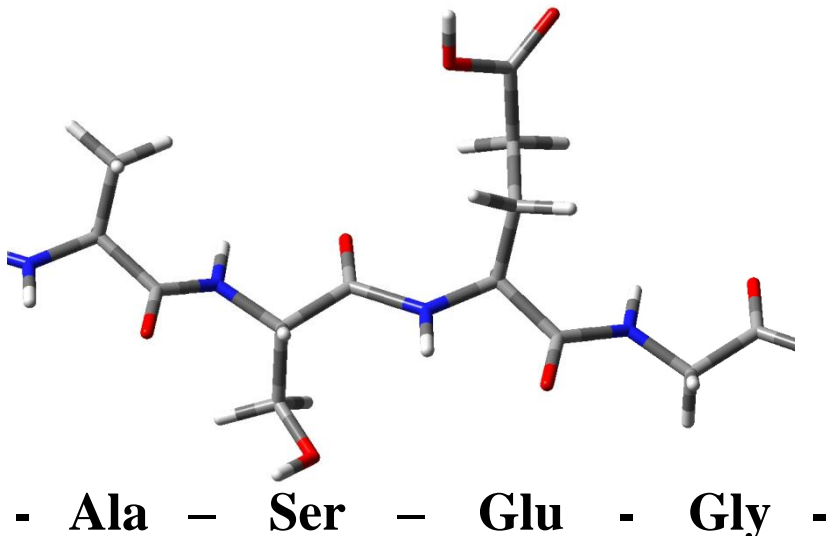
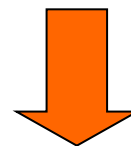
(A₂M₂X) Glu



1. spinrendszerek
azonosítása



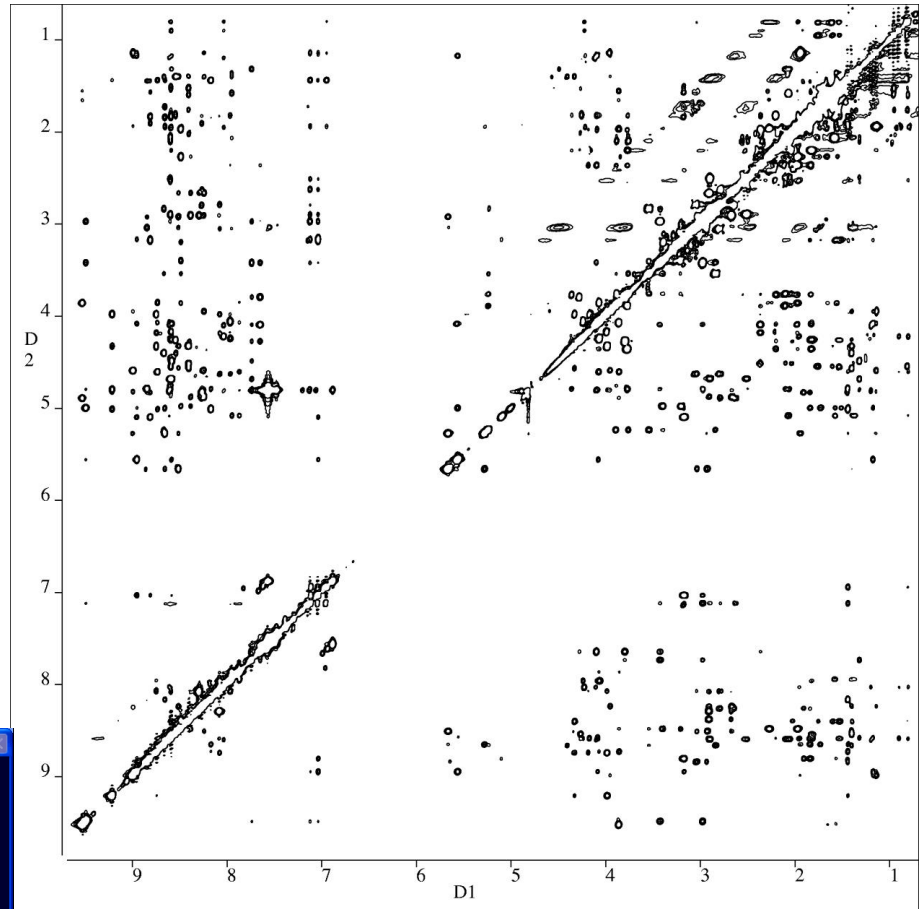
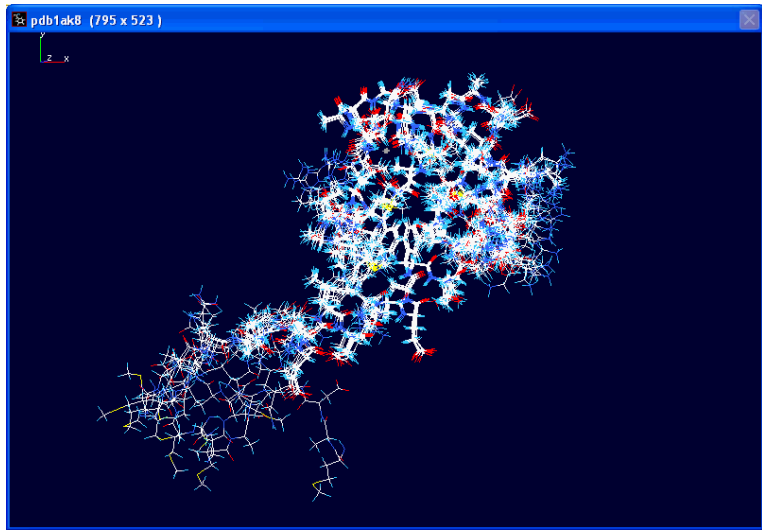
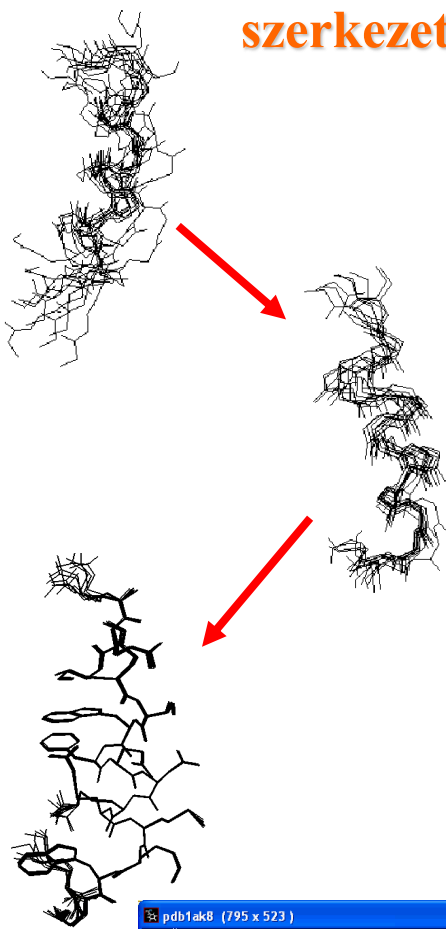
2. spinrendszerek
szekvenciális
rendezése



3. kényszerfeltételek
alapján
szerkezetszámolás

szerkezetszámolás

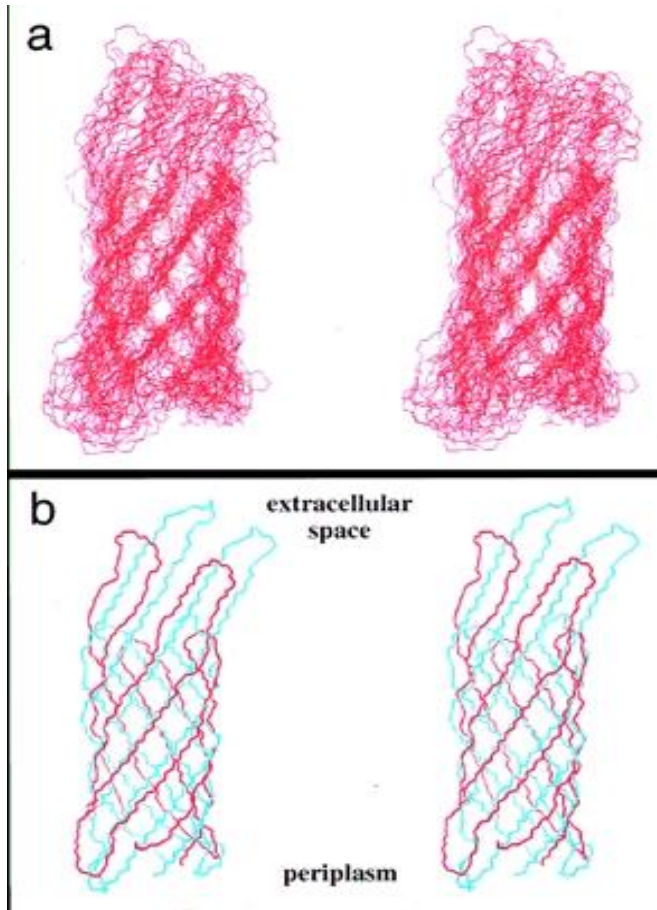
Egy fehérje modul ^1H - ^1H NOESY spektruma



Fehérjék NMR-szerkezetvizsgálata



**Kurt Wüthrich
(ETH, Zürich)**

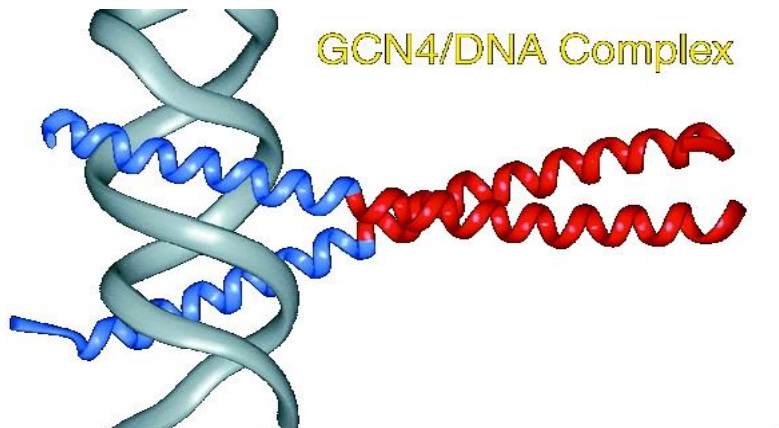


OmpX bakteriális
membránfehérje
tér szerkezete



Mozgékony
szekvenciárésszel
rendelkező prion fehérje

Biomolekulák dinamikai vizsgálata

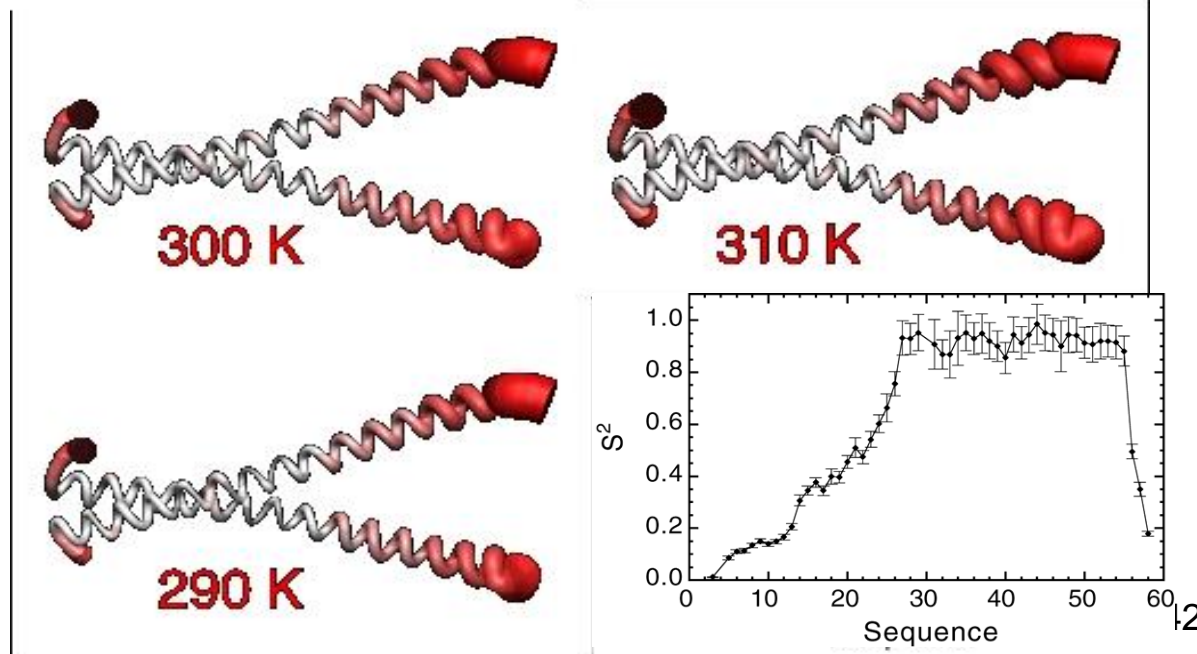


GCN4 élesztő
transzkripciós faktor
gerinc-dinamikájának
vizsgálata

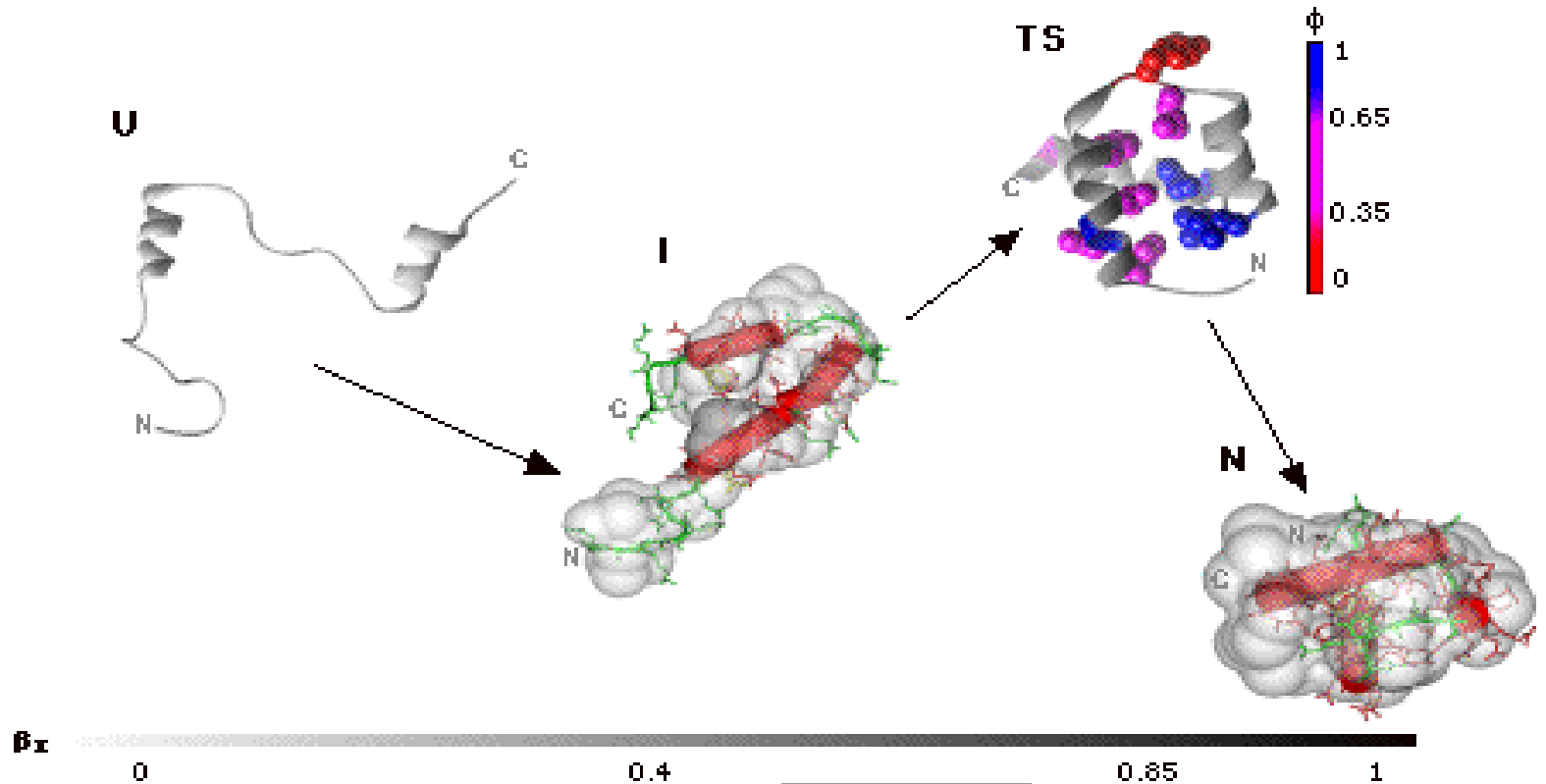
10 20
MKDPAALKRARNTTEAARRSRARKLQRMKQ
30 40 50
LEDKVEELLSKNYHLENEVARLKKLVGER



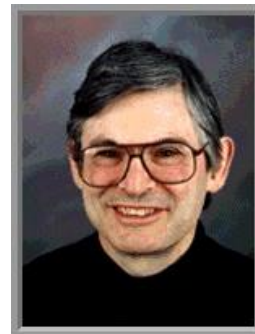
Arthur G. Palmer III
(Columbia University)



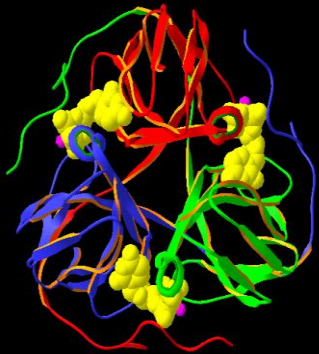
Fehérje feltekeredés vizsgálatok (*ns* és *ms* időskálán)



Alan Fersht
(Cambridge University)

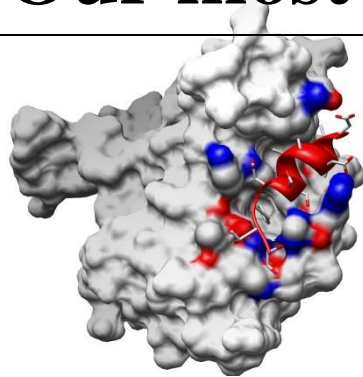


Our most recent targets:



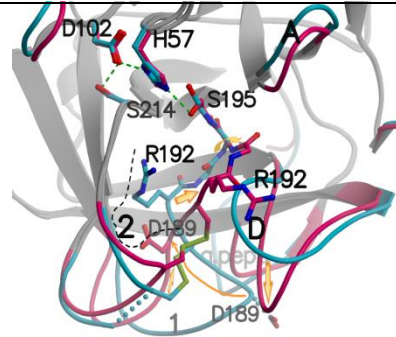
dUTPase

Beáta Vértessy



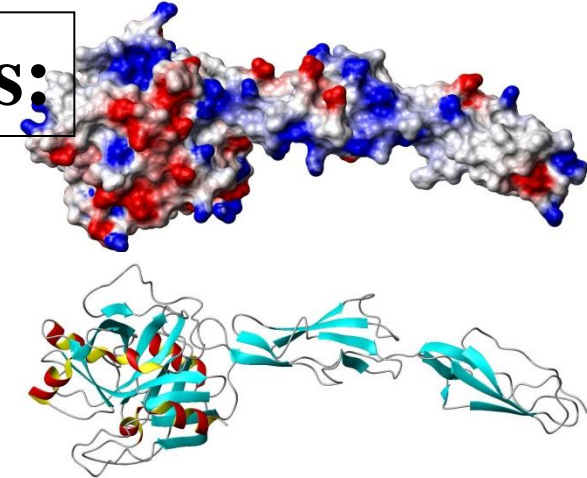
Calpastatin

Péter Tompa



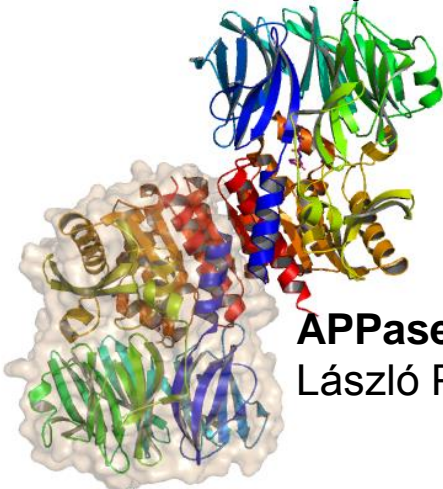
MASP-2

Péter Gál



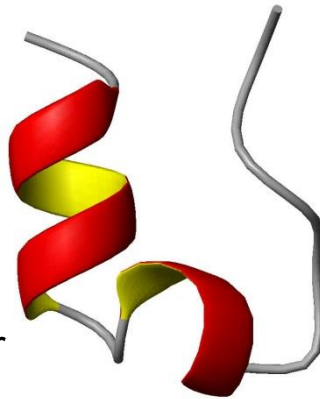
CCP

Péter Gál



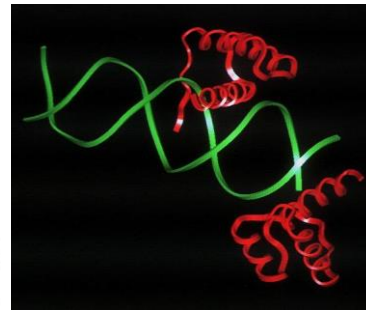
APPase

László Polgár



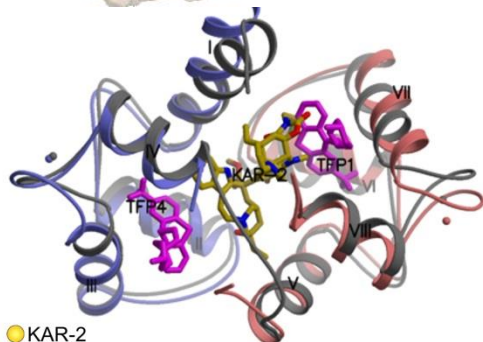
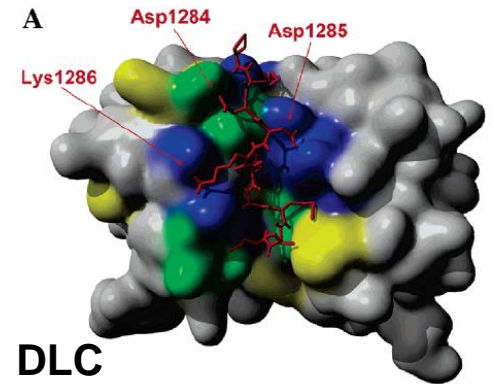
Homeodomains

Botond Penke



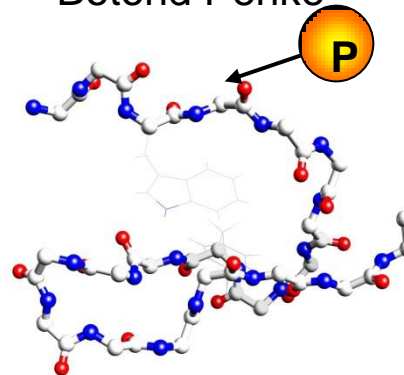
DLC

László Nyitray



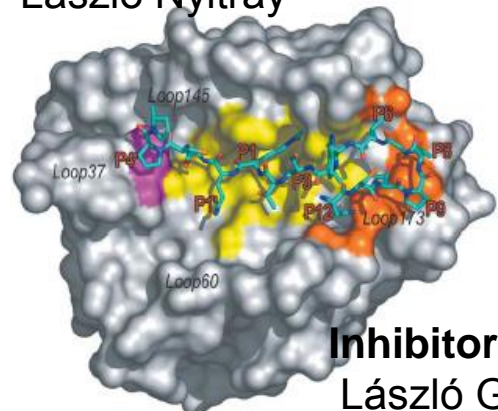
Calmodulin

Ovádi Judit



Peptides and miniproteins

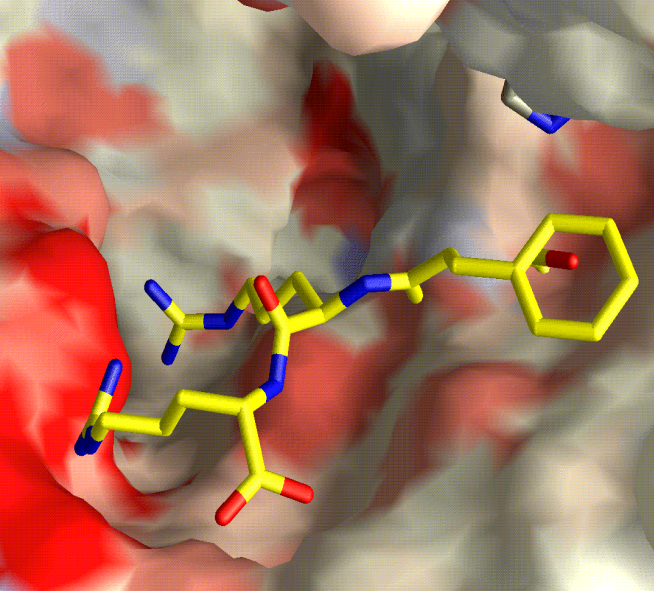
Gábor Tóth



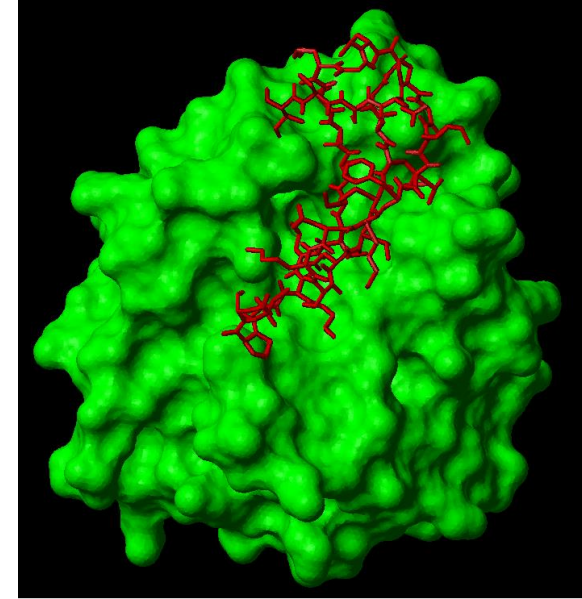
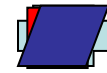
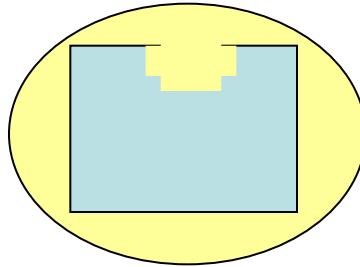
Inhibitors

László Gráf

● KAR-2
● a TFP klasszikus antagonista



A "kulcs & zár" modell (Emil Fischer)

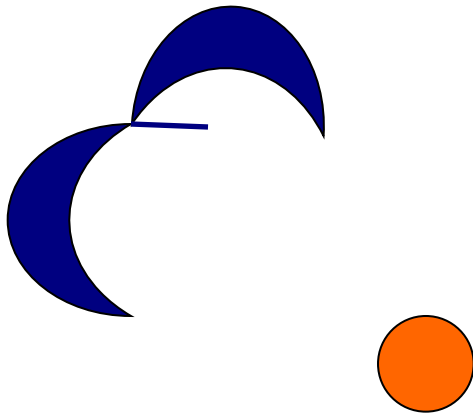


Hogyan tervezünk gyógyszert?



Minél többet meg kell tudnunk a
fehérjék dinamikus téralkatáról!

- A kalmodulin reorientációja
célfehérje vagy antagonistá hatására



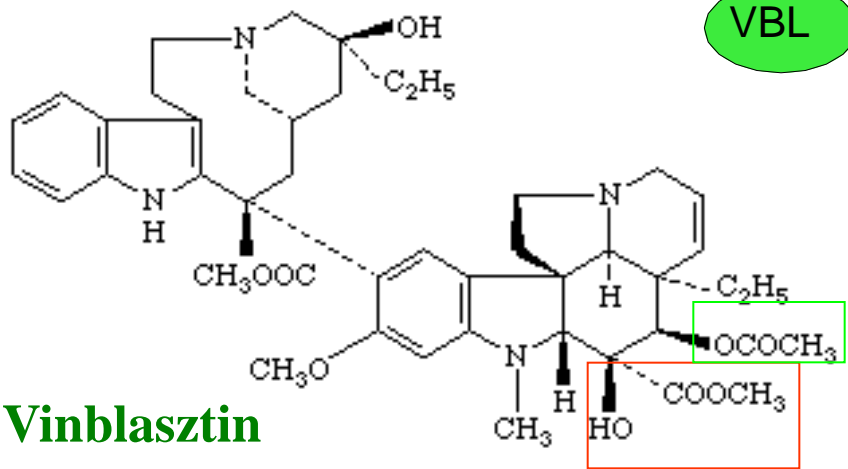
- a molekula „összecsuklik” ,
- az N- és C-terminális közel kerül egymáshoz,
- ám a D és az E α -hélixeket összekötő részből az alacsony elektronsűrűség miatt nincs kristallográfiai információ

*együttműködésben Ovádi Judittal és
munkatársaival
(MTA SZBK Enzimológiai Intézet)*



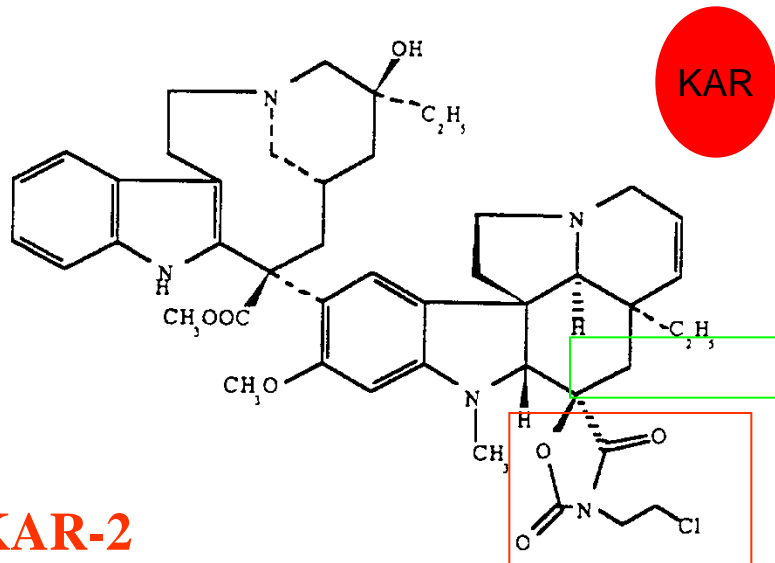
- **Vinca alkaloidok (biszindol) mint CaM antagonisták**

Catharantus (Vinca) roseus alkaloidjai (vinblasztin, vinkrisztin)



Vinblasztin

- sejtosztódásgátló hatás (kemoterápia)
- célpontjuk a sejt mikrotubuláris hálózata
- jelentős mellékhatások (neurotoxicitás)



KAR-2

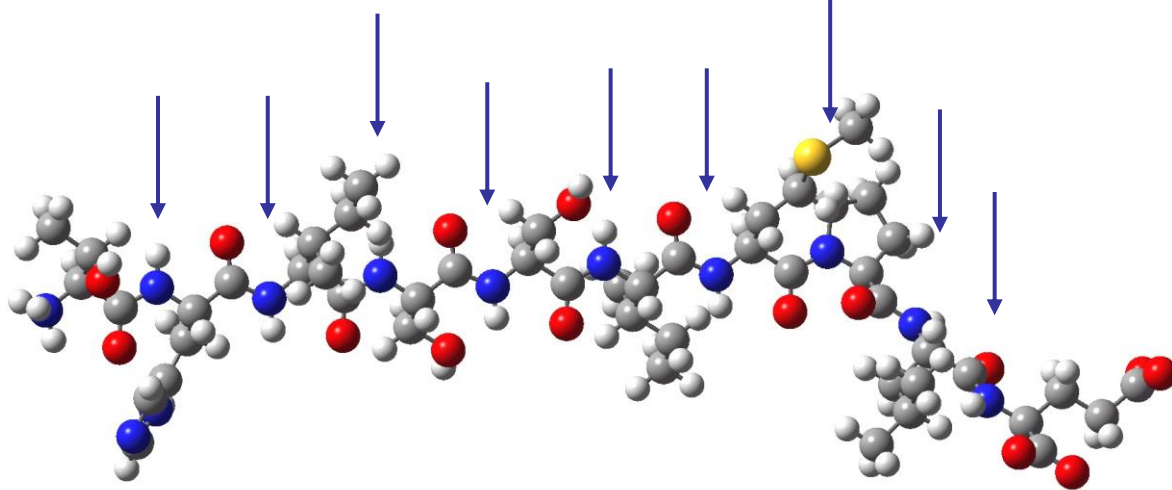
- In vivo kísérletekben ugyanolyan hatékonynak bizonyult, mint a természetes *vinca* alkaloidok
- Mellékhatása jóval kisebb

Orosz és mts. British J.Pharmacol. 1997, 121, 947

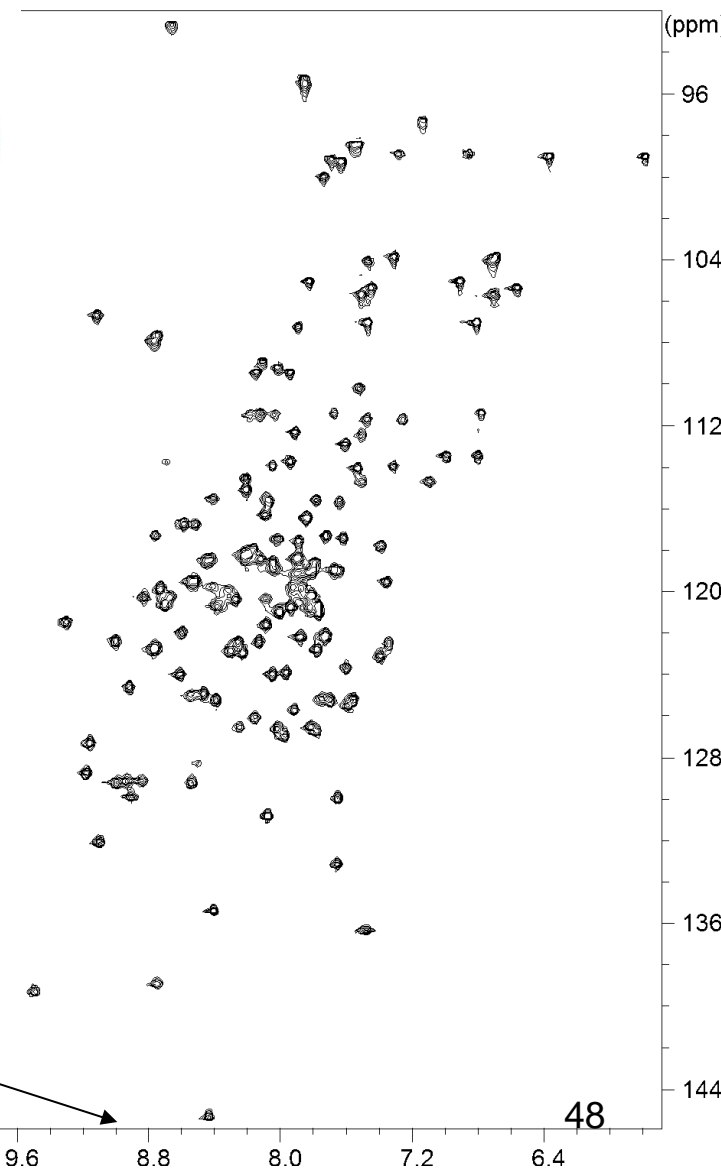
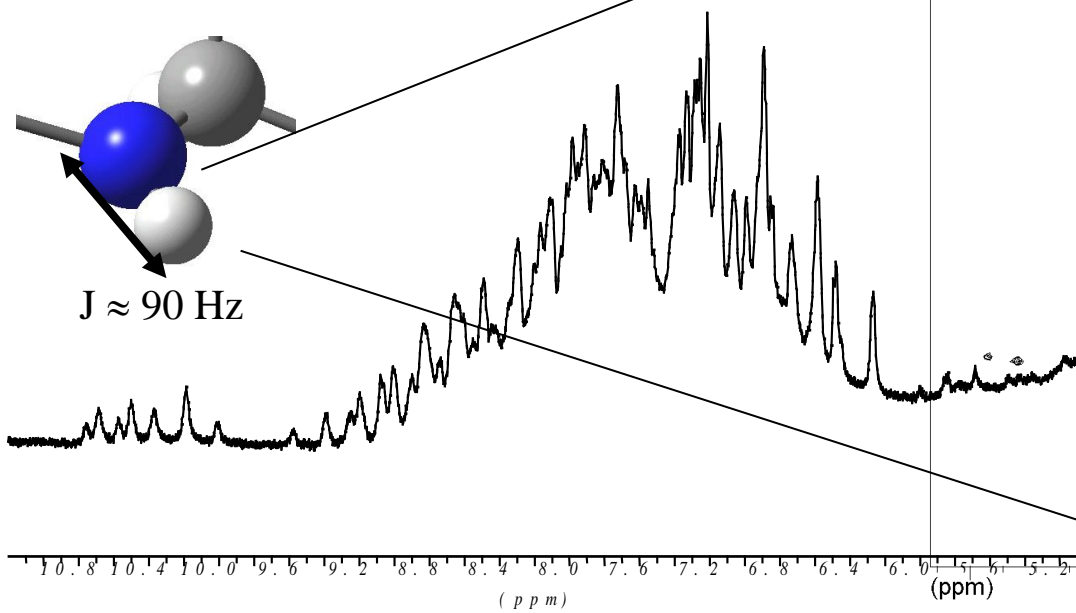
Orosz és mts. British J.Pharmacol. 1997, 121, 955

Orosz és mts. British J.Cancer 1999, 79, 1356

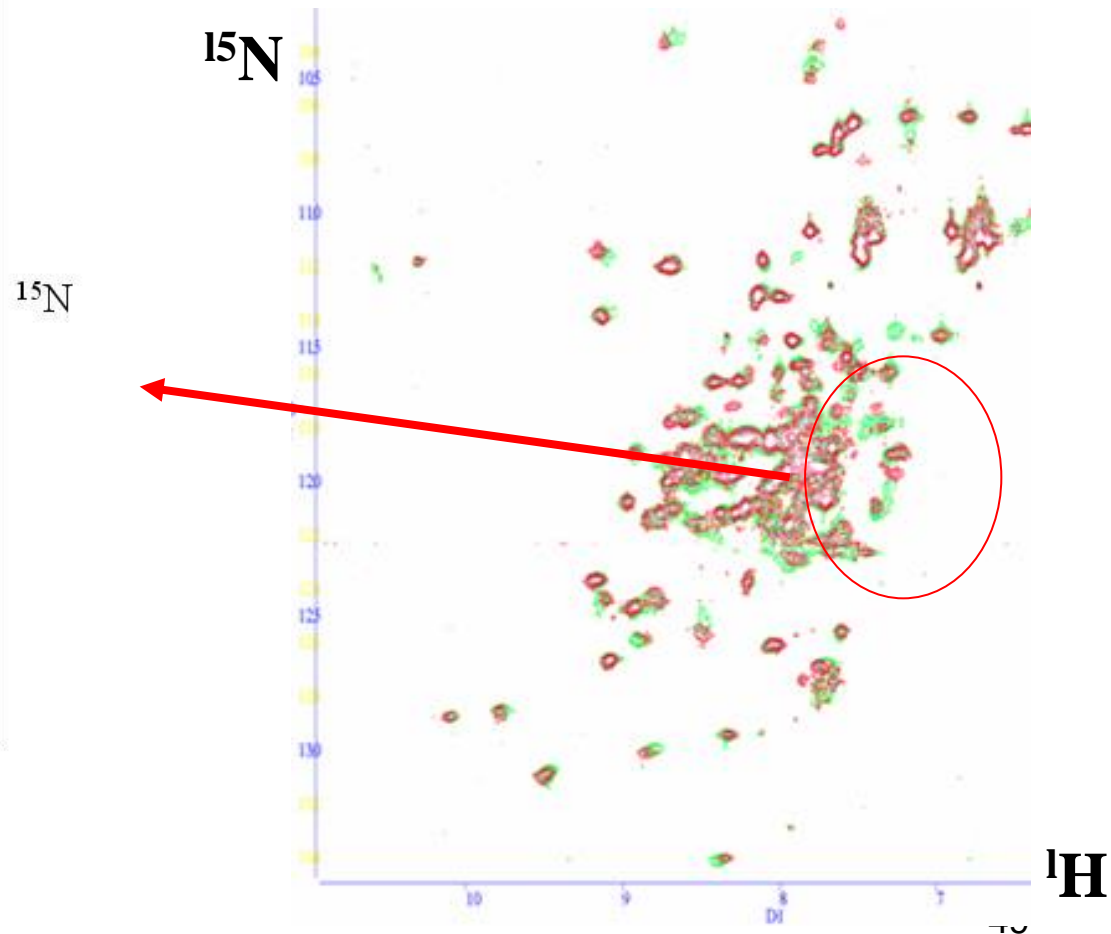
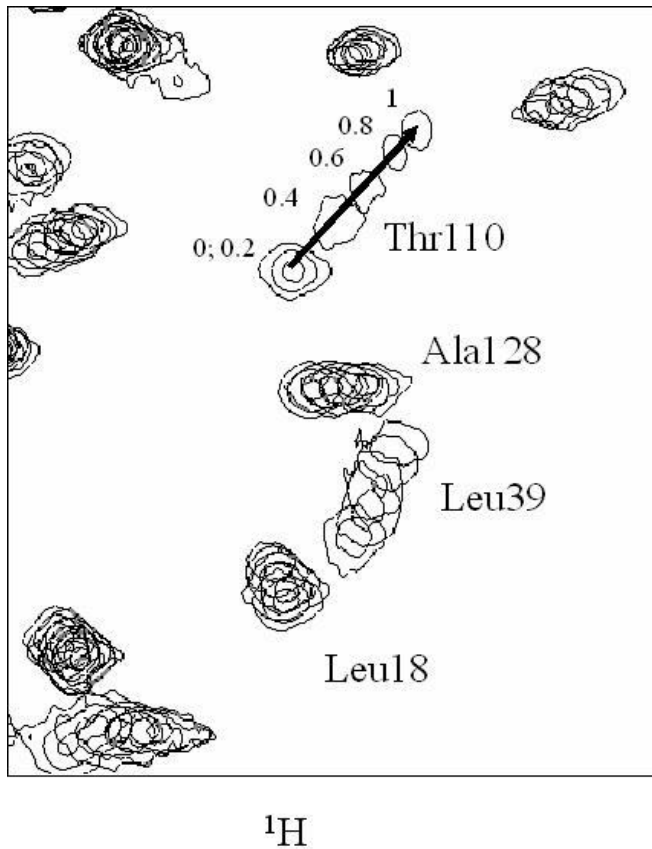
A kalmodulin ^1H - ^{15}N HSQC spektruma



A kalmodulin ^1H spektrumának amid NH és aromás tartománya

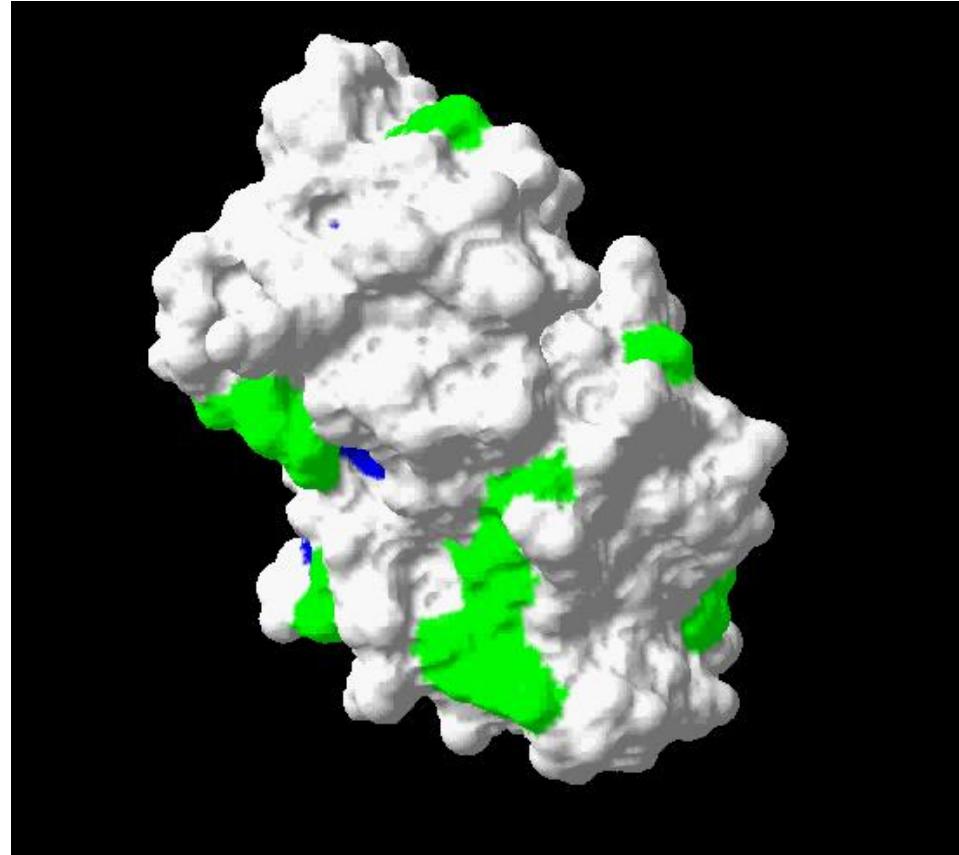
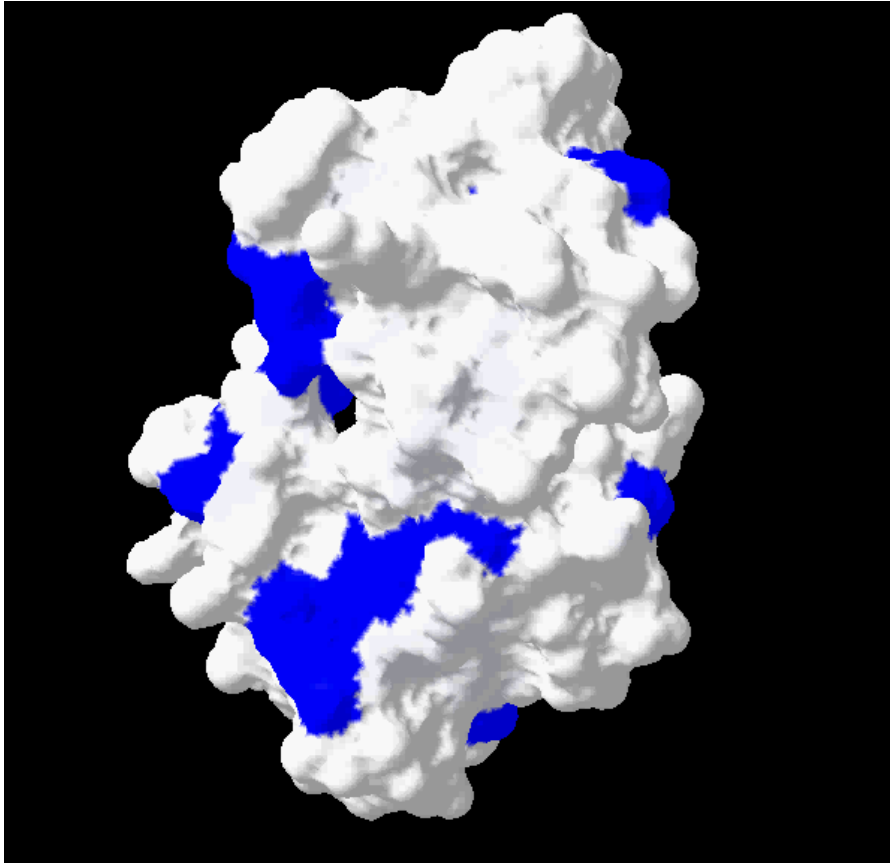


A kalmodulin KAR2 – vel való titrálása során kapott ^1H - ^{15}N HSQC spektrumok összevetése

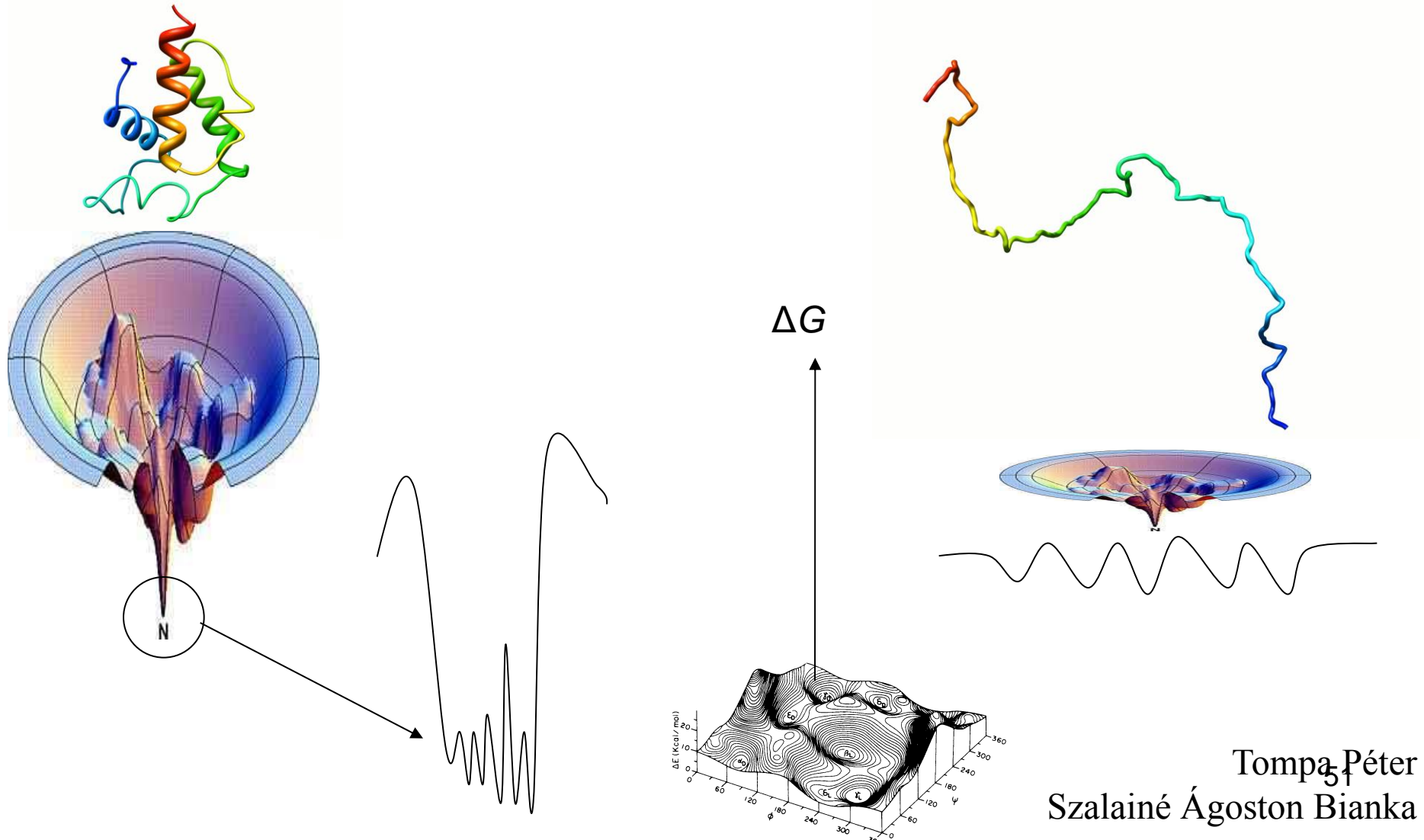


Felület, nmr színezés
alapján (két szín)
(KAR2 yes)

Ligandkötés azonosítása



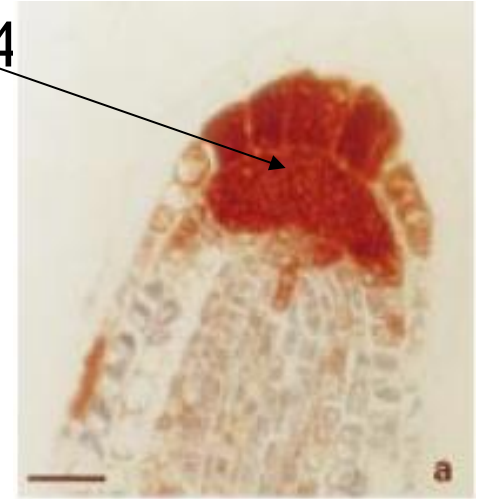
Az ERD-14 egy szerkezetnélküli fehérje: lombiktól az élő sejtig

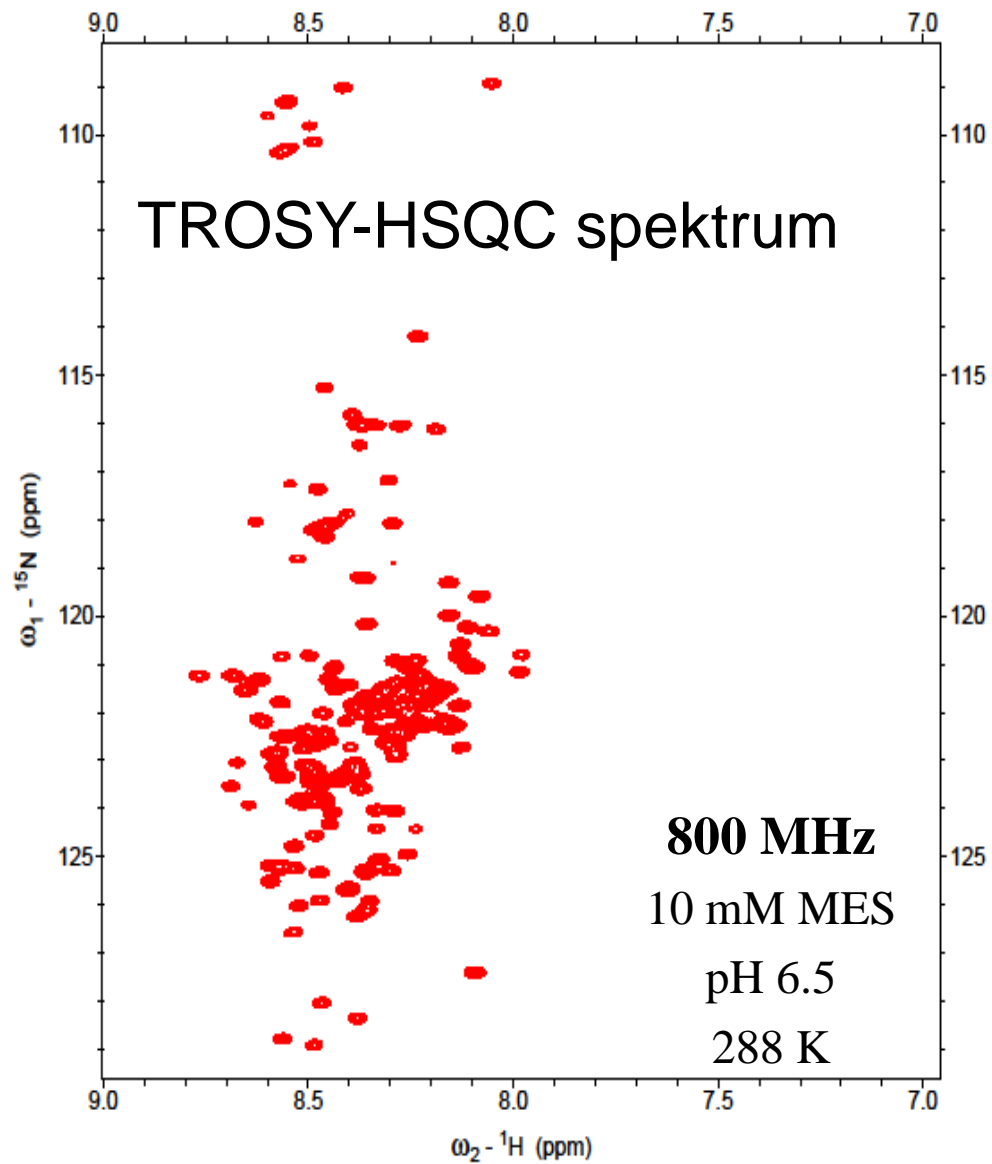
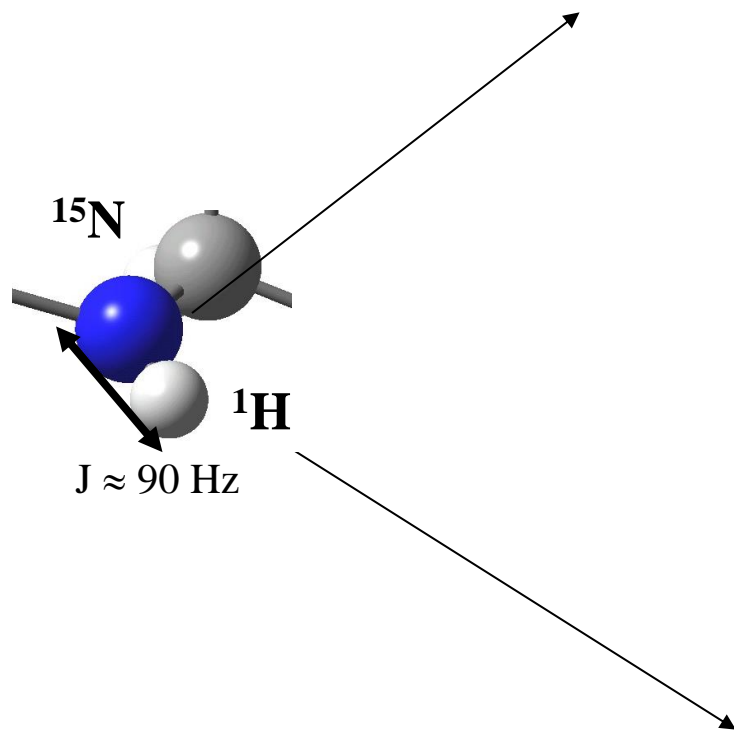
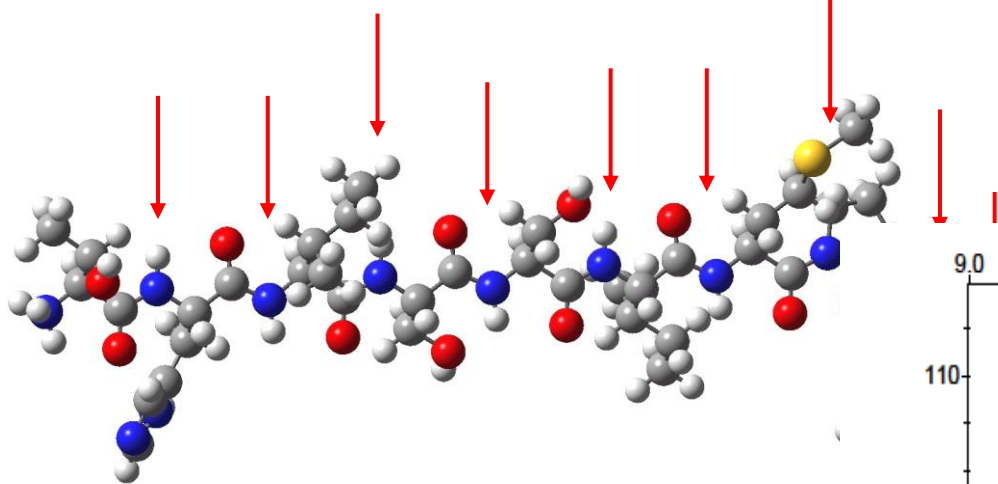


Tompá Péter
Szalainé Ágoston Bianka

Dehidrin = abiotikus stressz (abszcizinsav) hatására fejeződik ki a növényben:

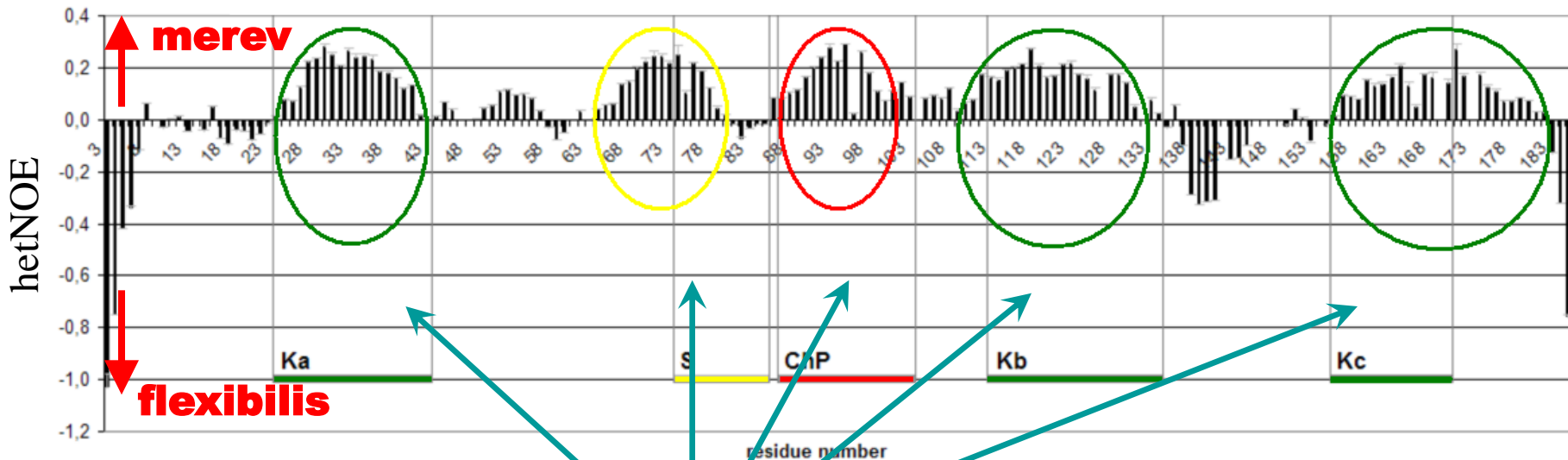
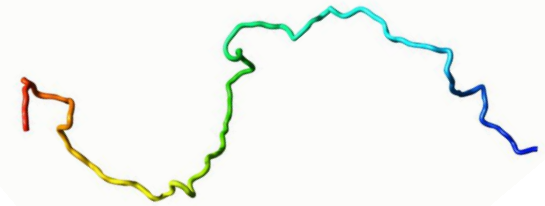
- vízhiány, magas sótartalom (NaCl), hideg
- ERD14 = Early Response to Dehydration 14
- 185 aminosav, 20 kDa
- rendezetlen fehérje
 - sok poláris, töltött aminosav
 - kevés hidrofób aminosav





Az ERD14-nek nincs oldatban térszerkezete (valójában túl sok is van neki)

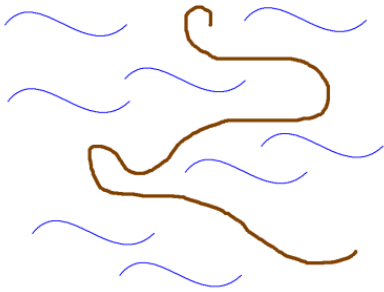
- Relaxációs mérések:



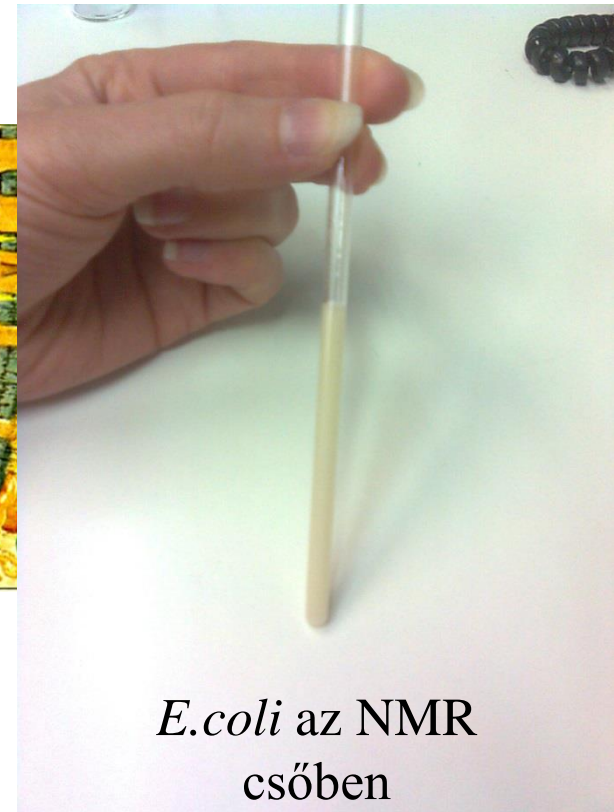
5 régió, amely
5-25 % helikális hajlammal rendelkezik

Vizes oldat vagy puffer \neq sejt

- Ez különösen igaz rendezetlen fehérjékre:
A fehérjezsúfoltság /„crowding” a sejten belül sokat számíthat!



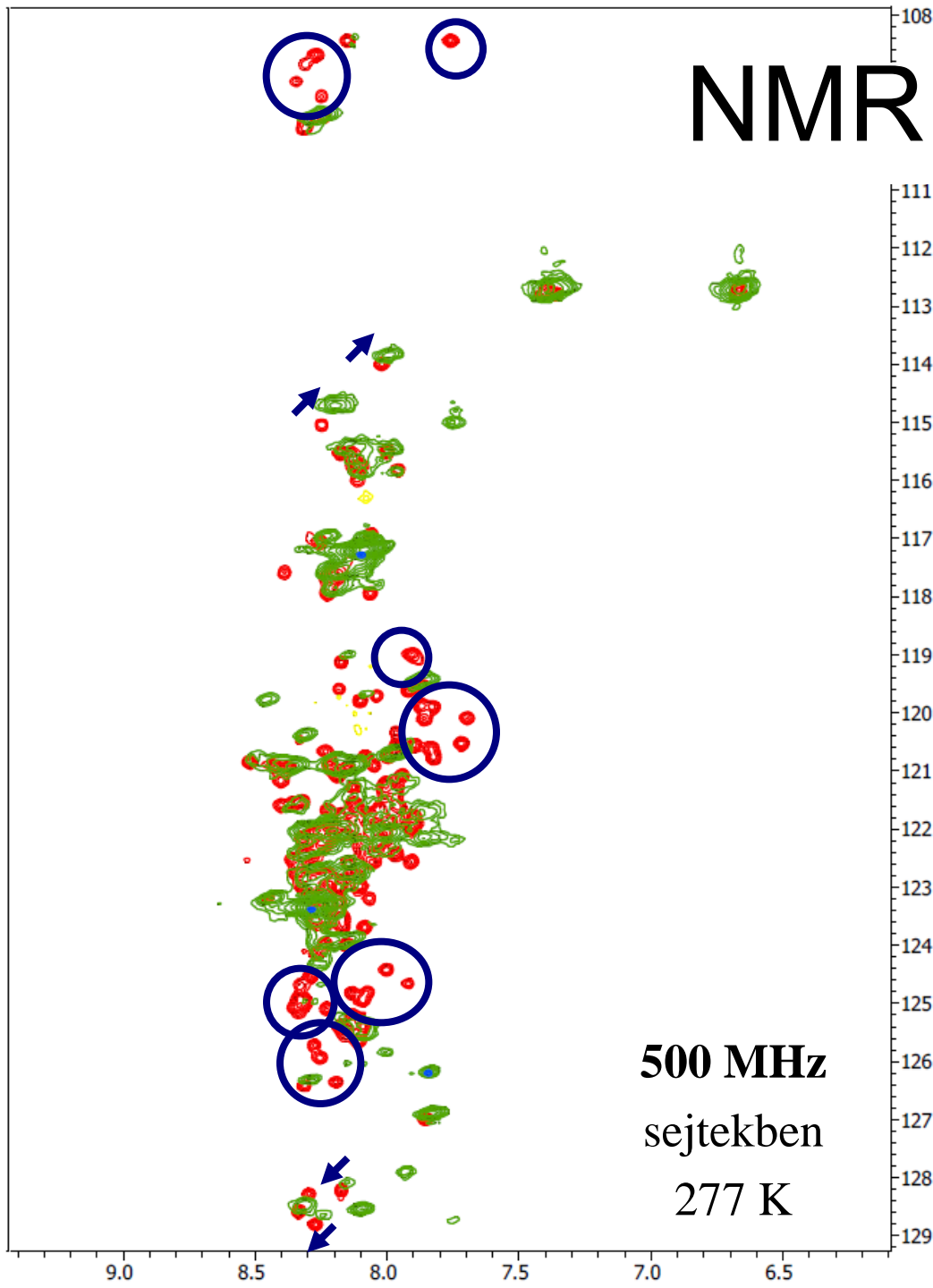
\neq



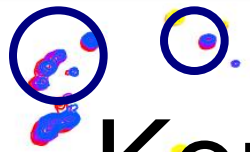
E.coli az NMR
csőben

Élő sejtben kell mérni!

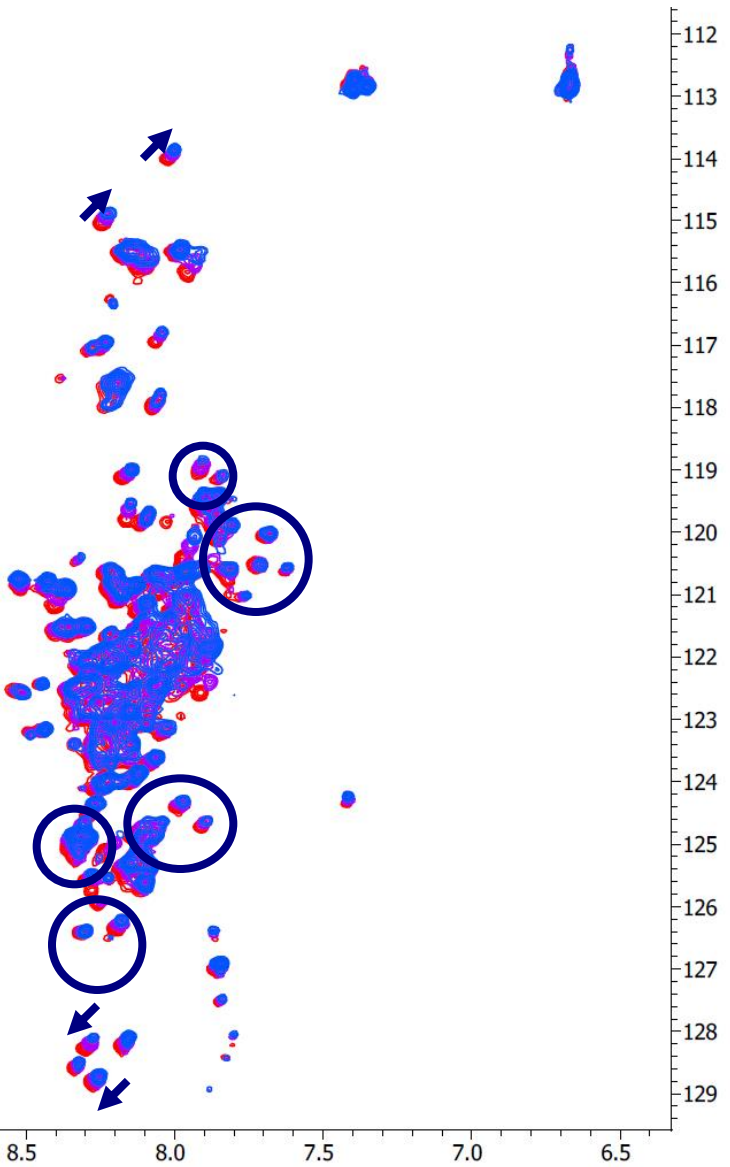
NMR élő *E.coli*-ban



- „*in cell NMR*”
 - *E.coli*
 - ERD14 kifejeztetés
 - Sűrű sejtszuszpenzió az NMR csőben
- **Pufferben**
- **Élő sejtekben**
 - **Sejtek felülúszója üres spektrumot ad**



Kontroll az in cell NMR-hez



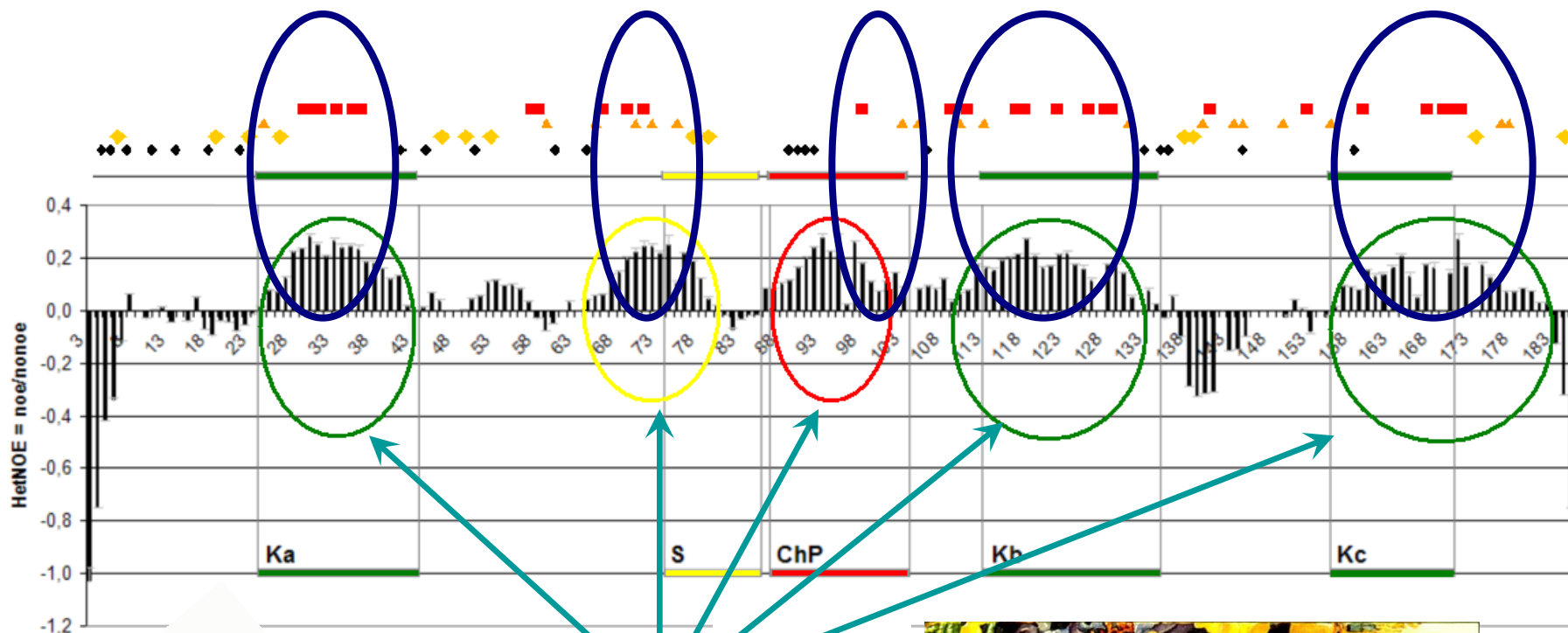
- Dextrán:
 - Sejten belüli állapotot (fehérjesűrűséget és viszkozitást) utánoz
- Itt nem tűnnek el a jelek

- **Puffer**
- **Puffer + 150g/L dextrán**

=> Amit látunk, tényleges kötődés, kölcsönhatás!

Szerkezet sejtben = Rendezetlen

- Eltűnő** – **Elmozduló** – Helyükön maradó csúcsok



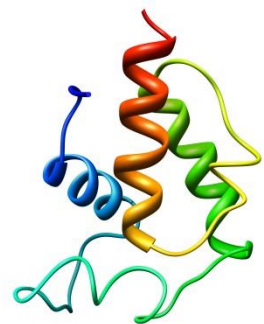
**5 régió, amely
valamihez kötődik a sejtben**



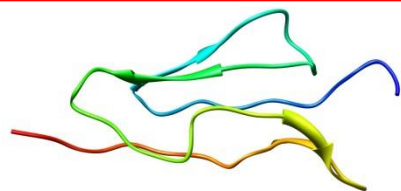
A molekuláris mozgás időskálái

hurkok és kanyarok
záródása

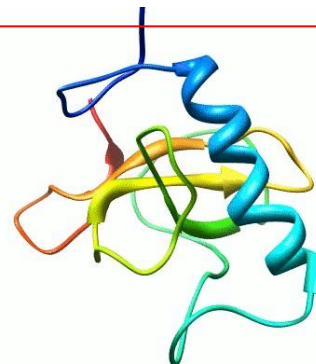
0.1ms ↔ 10ms



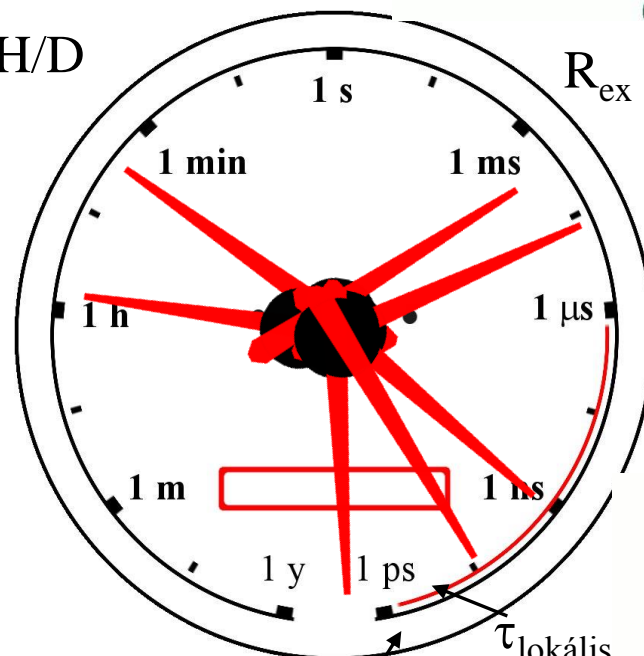
feltekeredés
1ms ↔ 1h



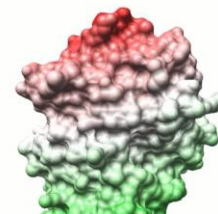
másodlagos szerkezeti
elemek 10ns ↔ 1ms



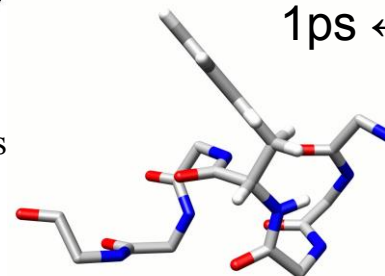
H/D



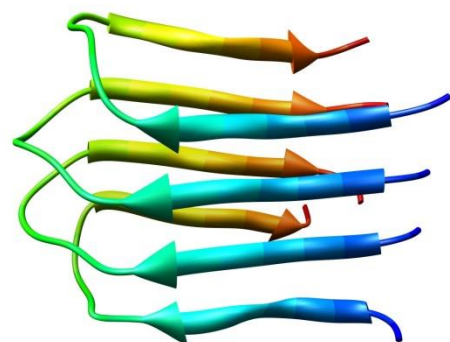
Rot. Dif.
korrel. idő
 $1\text{ ns} < \tau_c < 10\text{ ns}$



gerinc dinamika
1ps ↔ 10ns



oldallánc forgás
0.1ps ↔ 10 ps



aggregáció
1 s ↔ 1 év

$$\tau_{\text{effektív}} = \tau_C + \tau$$

A mozgás időskálái



~ 1s

~ 100 ezer

~ 30 millió



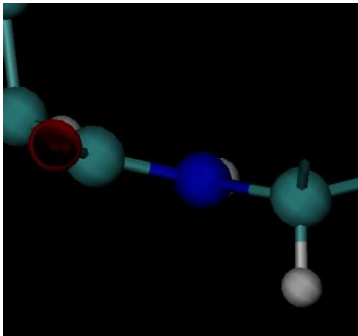
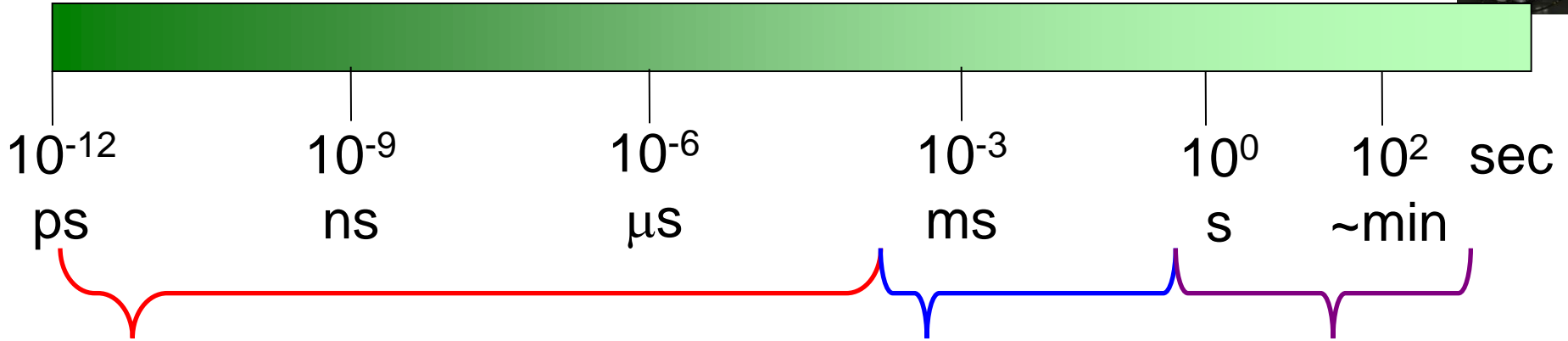
1h

1év

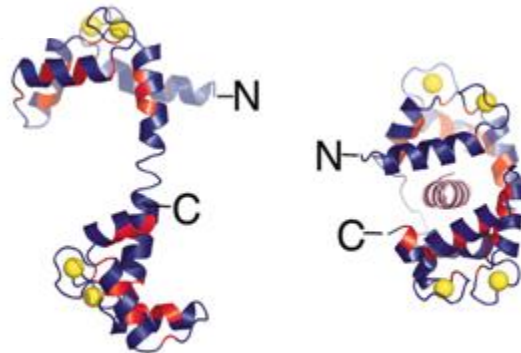


A fehérjék belső dinamikája

NMR

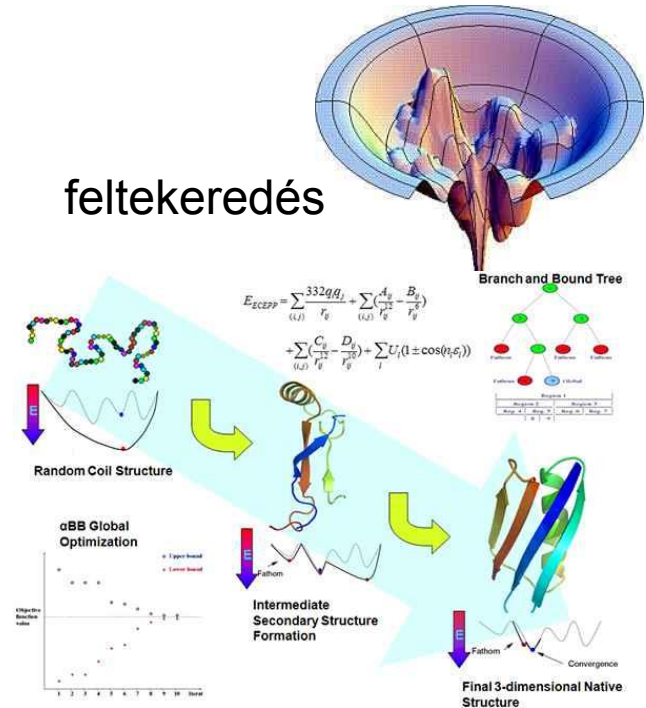


kötések mozgásai



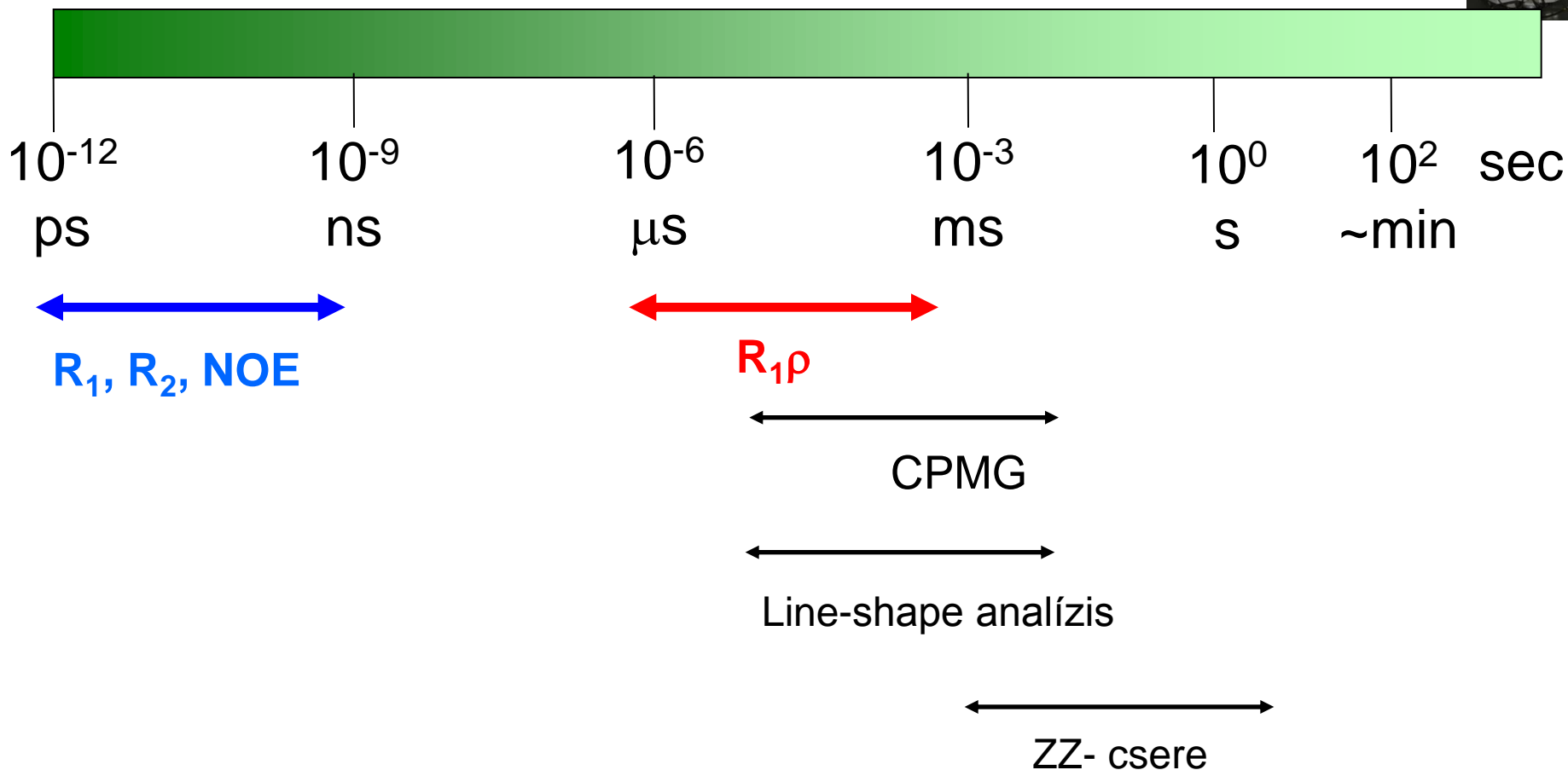
domének, nagyobb szerkezeti egységek mozgásai

feltekeredés



A fehérjék belső dinamikája

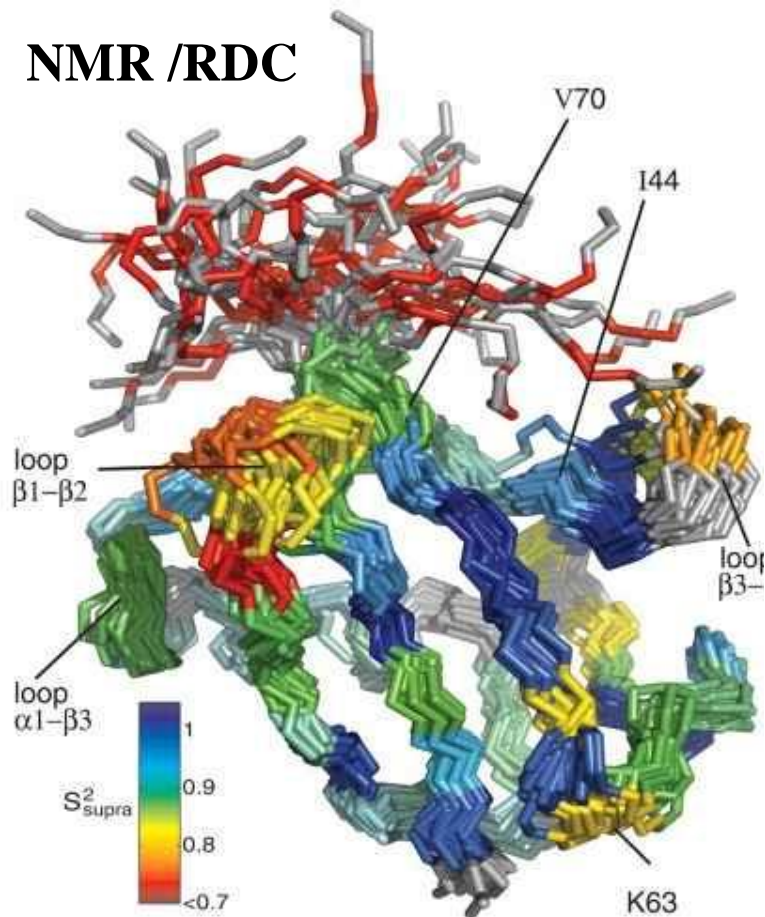
NMR



Fehérjék mozgása; μs - ms időskála

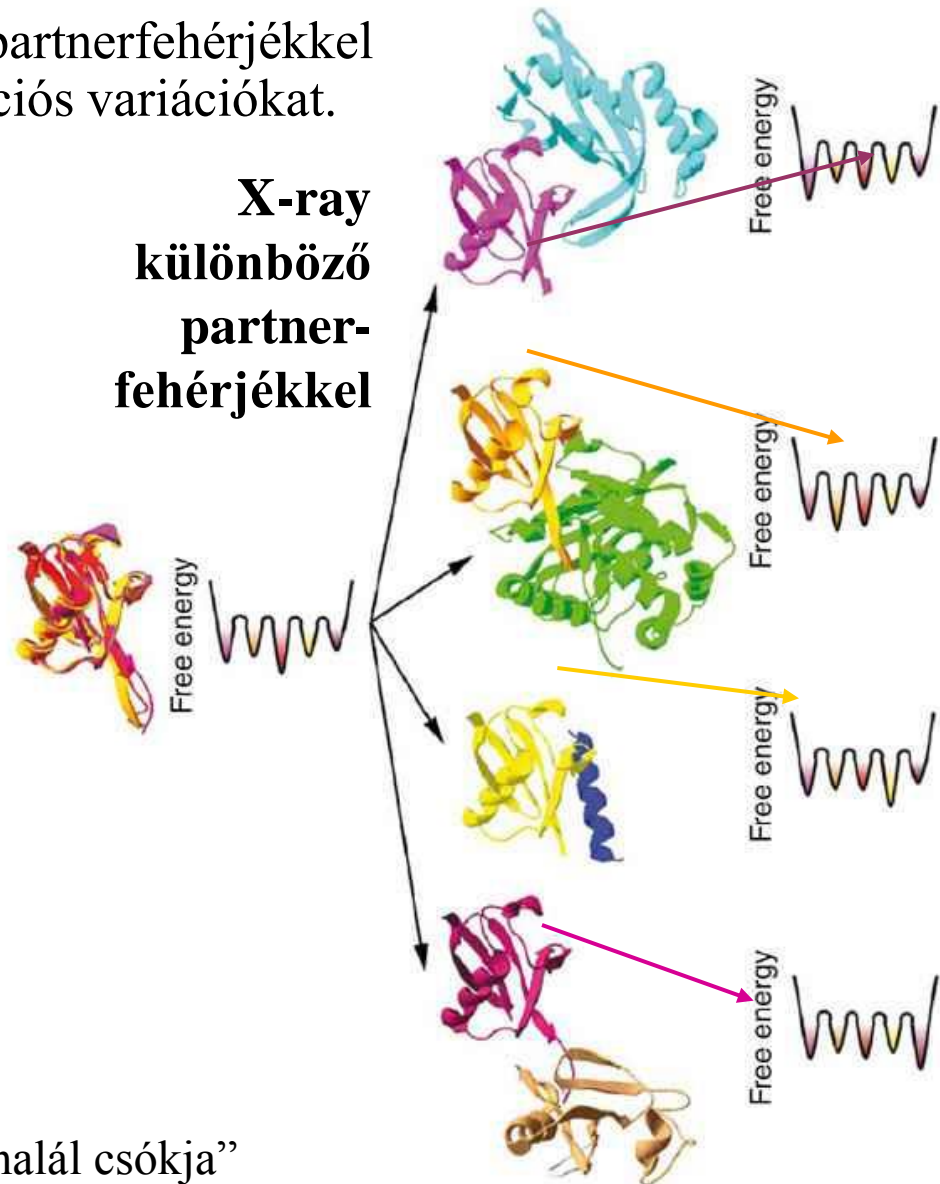
Belső dinamikája „lefedí” a különböző partnerfehérjékkel alkotott komplexeiben észlelt konformációs variációkat.

NMR /RDC



μs - ms időskálájú mozgások alapján számolt S^2

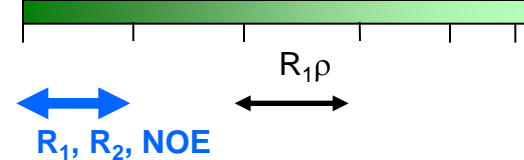
X-ray különböző partnerfehérjékkel



Ubiquitin; a „halál csókja”

Lange és mts., Science, 2008, 320, 1471

Fehérjék mozgása; ns-ps időskála

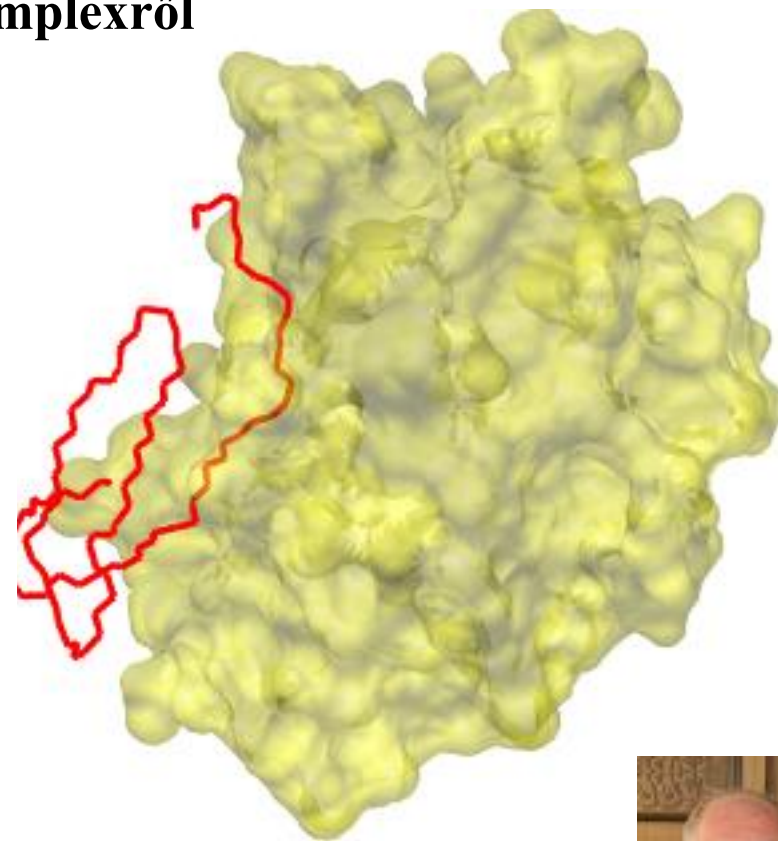
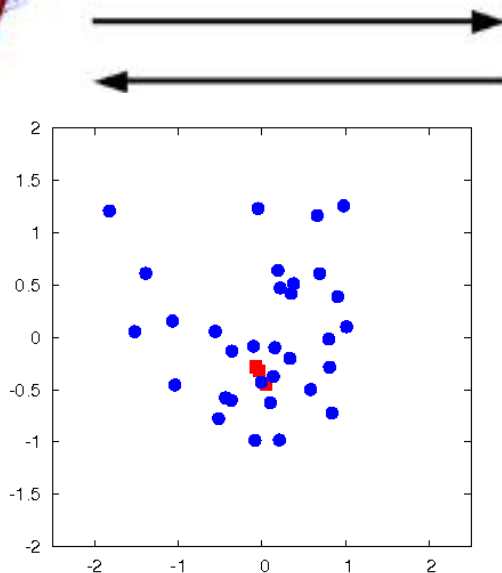
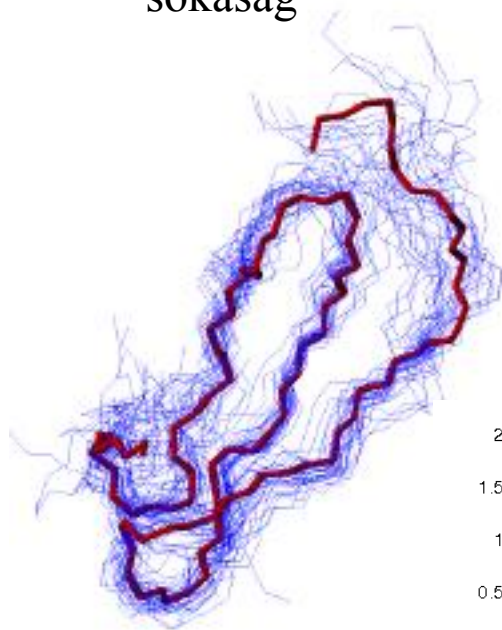


NMR /NOE + S²
MUMO szerkezeti sokaság

Gáspári Zoltán



X-ray a komplexről



főkomponens-elemzés



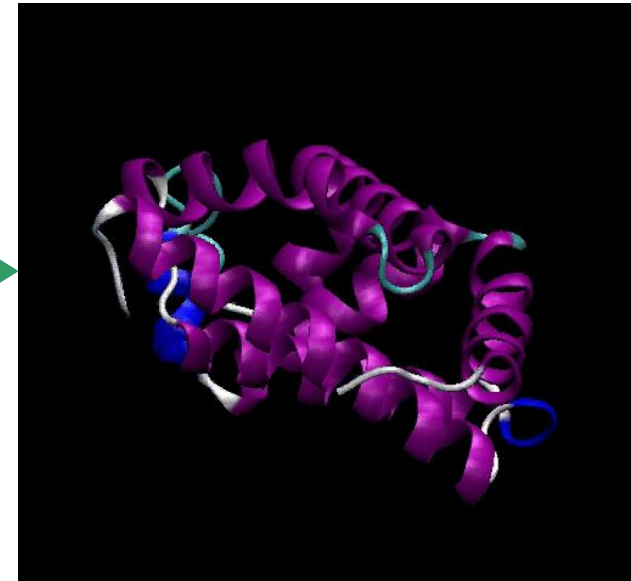
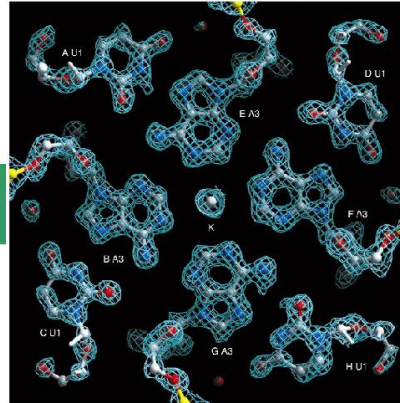
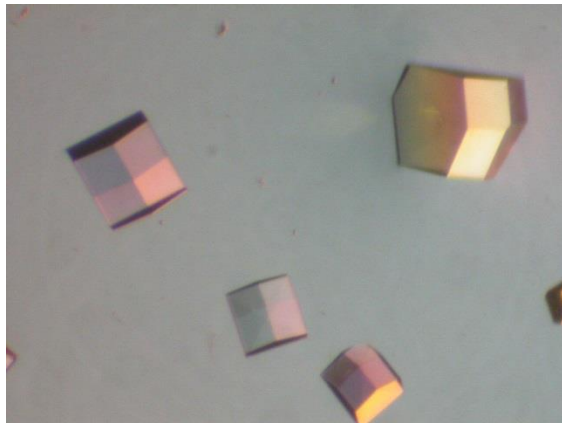
Gráf László

Az inhibitor belső dinamikájával számolt térszerkezetek „lefedik” az enzimmel alkotott komplexben (3 eltérő komplex) mért röntgen konformereket.

Fehérjék szerkezete: mit rejt a kristály?



Fehérje
röntgenkristallográfia:
kémiai Nobel-díj, 1962
Max Perutz, John Kendrew



kristályban az egyes atomok helye térben jól meghatározott \Rightarrow
részletgazdag szerkezet

spinrendszerek azonosítása

3D-NHCA

