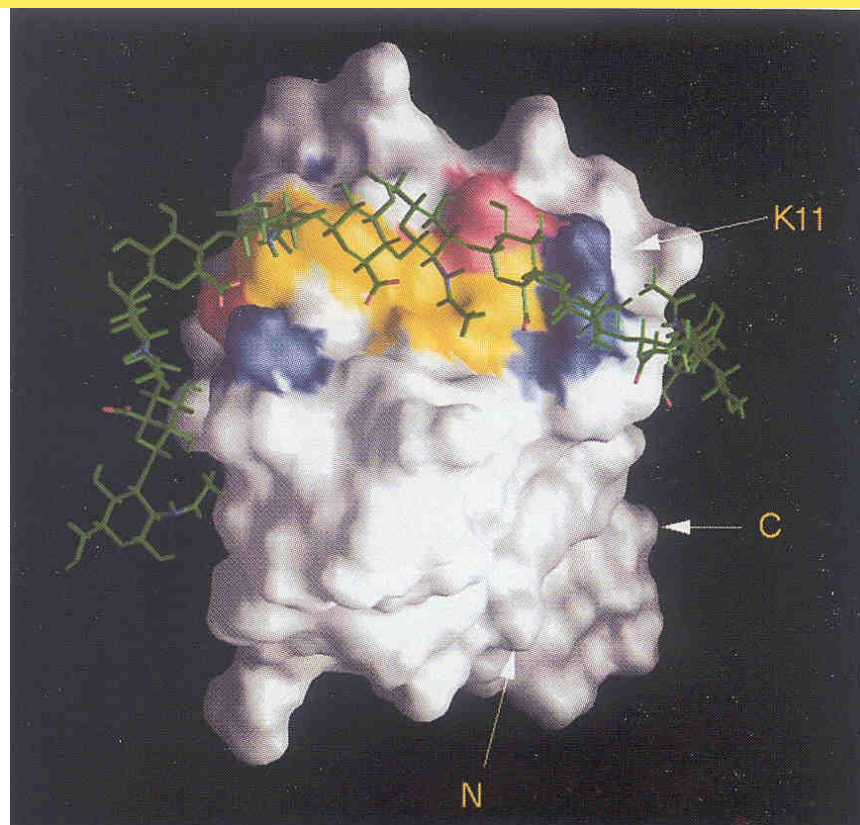
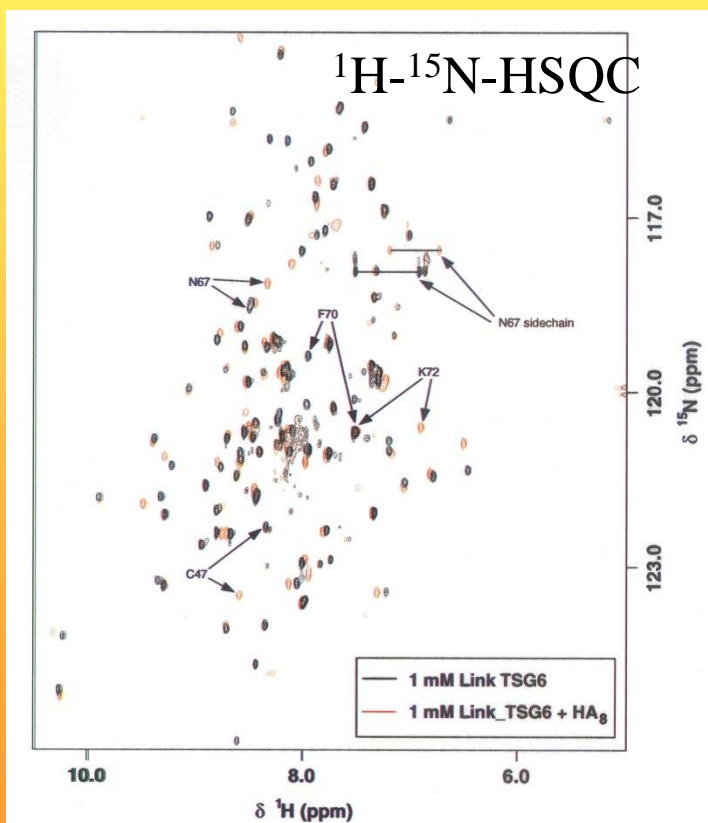




# Biológiailag aktív molekulák kölsönhatásvizsgálata NMR-spektroszkópiával



Budapest, 2004. 03. 26.

Ugyanazt az NMR paramétert ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ) követjük.



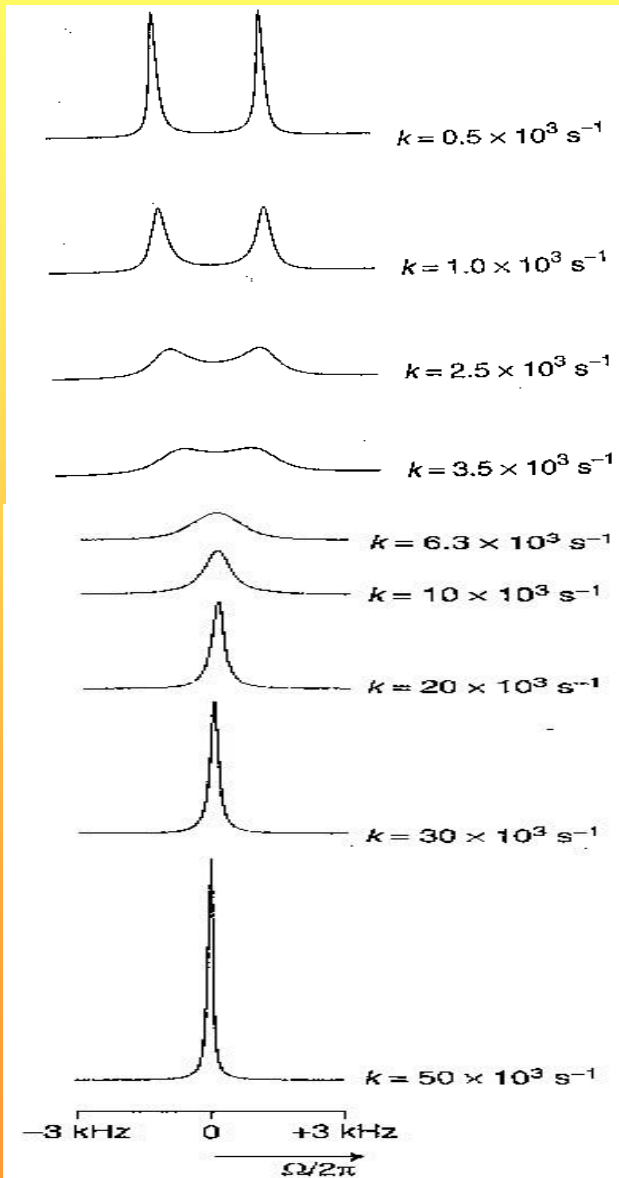
## Cserefolyamatok az NMR-spektroszkópiában

„Chemical exchange” kémiai csere avagy  
a mag kémiai környezetének a cseréje

Csere: ugyanaz a mag kettő vagy több kémiai környezet között „ugrál”, amelyek NMR paraméterei eltérnek:

- kémiaieltolódás-értékei (CSA),
- skaláris vagy dipoláris csatolási állandók (J, D)
- relaxációs paraméterek ( $T_1$ ,  $T_2$ , NOE)

**A cserefolyamat megjelenése a spektrumban annak függvénye, hogy miként viszonyul egymáshoz a cserefolyamat sebessége és a különböző állapotok NMR paramétereinek a nagysága.**

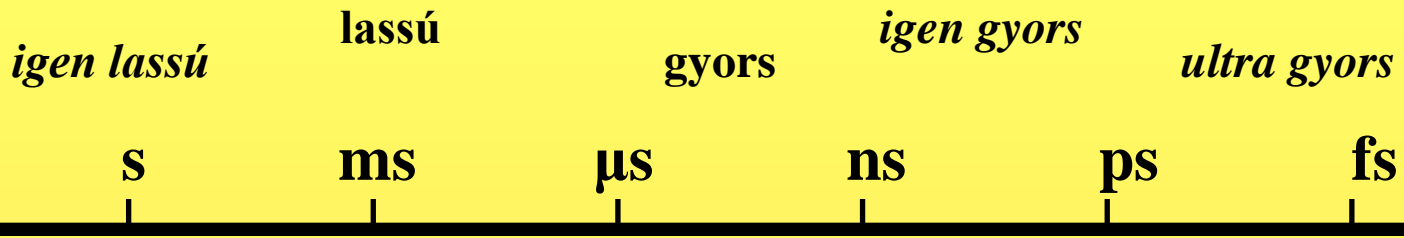


az NMR időskálán **lassú csere** miatt a kötött és a szabad forma jelei szétválnak

az NMR időskálán **közepes sebességű csere** (a jel eltűnhet)

az NMR időskálán a **gyors csere** miatt egybeolvadnak a kötött és a szabad forma jelei

# Jellegzetes NMR mozgási időskálák



relaxációs időskála

spin-rács relaxációs  
Időállandó ( $T_1$ )  
(tipikusan  
*sec.*, vagy *min.*)

makroszkópikus  
diffúzió és  
áramlás

spektrális időskála

a spektrum reciproka (Hz) **rotáció**  
 $(\omega_1 - \omega_2)\tau^{\text{spek}} \approx 1$   
 $\Delta\omega = 2500\text{Hz}$  (5ppm 11.74T)  
 $\tau^{\text{spek}} \approx 32\mu\text{s}$

kémiai csere

molekuláris

Larmor-időskála

ami alatt a spin  
1 radiánnyt precesszál

**molekuláris vibráció**  
 $|\omega^0\tau^0| \approx 1$   
 pl.  $\omega^0 = 500\text{MHz}$   
 $\tau^0 \approx 0.3\text{ns}$

jelalak perturbáció

lassú csere

gyors csere



az NMR időskála relatív: ugyanazon molekuláris komplexben egyszerre lehet **lassú, közepes és gyors** cseresebességet megfigyelni

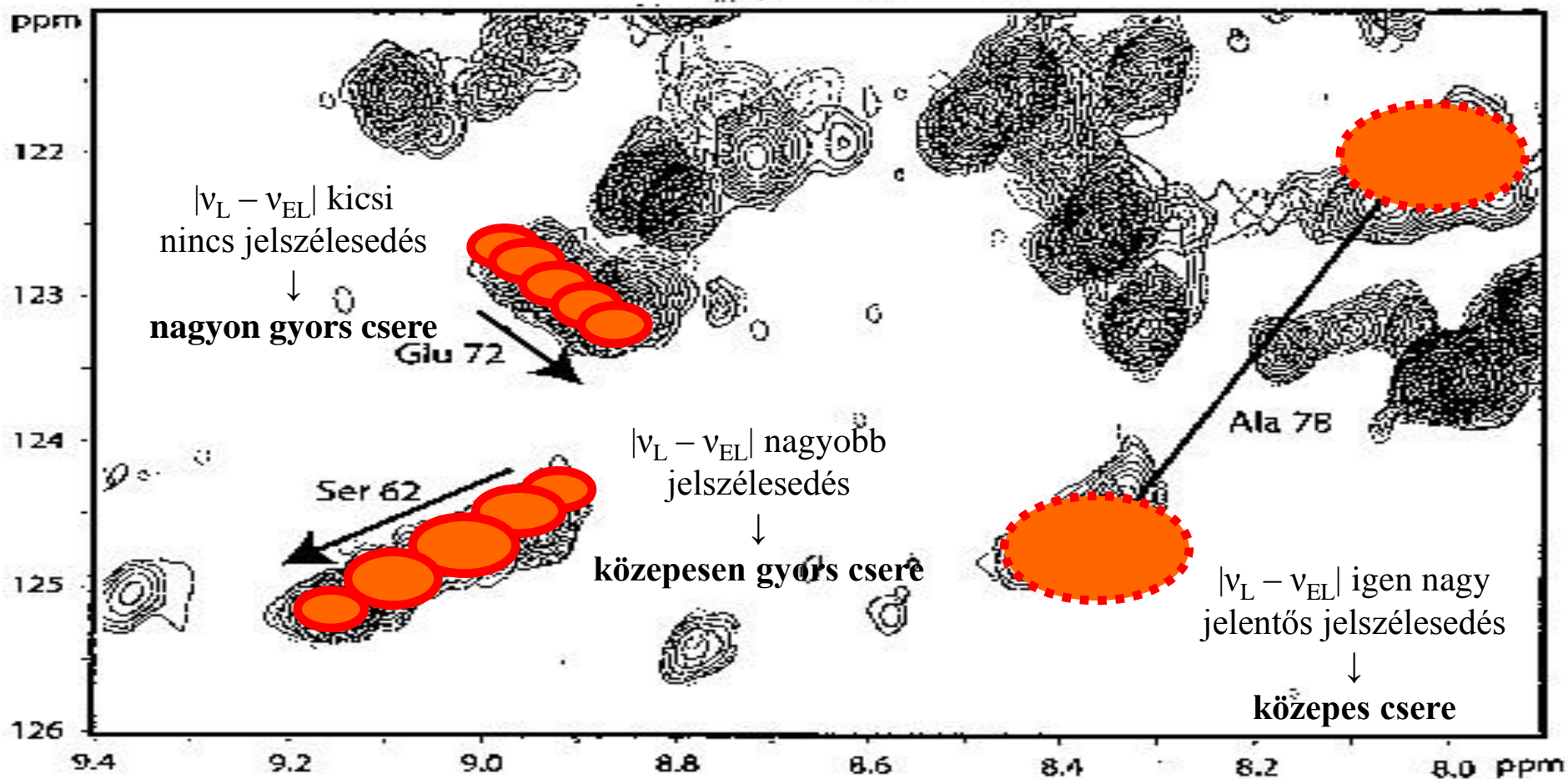
A  $^{15}\text{N}$  jelölt S100B fehérje és a CapZ peptid

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektruma.

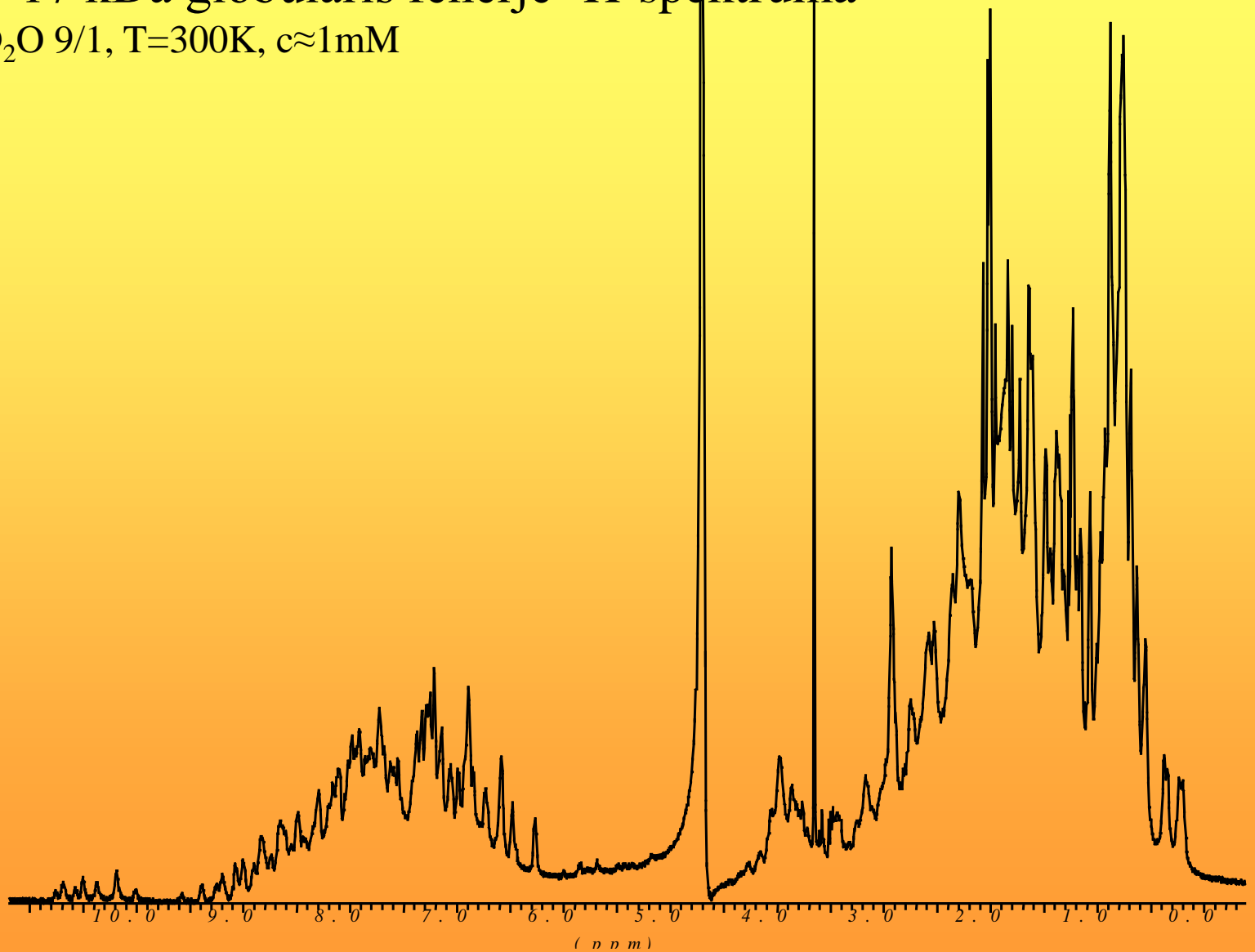
(1mM fehérje +

0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2,5 mM peptid)

Kilby, Van Eldik és Roberts.  
*Protein Sci.* **1997**, *6*, 2494-2503



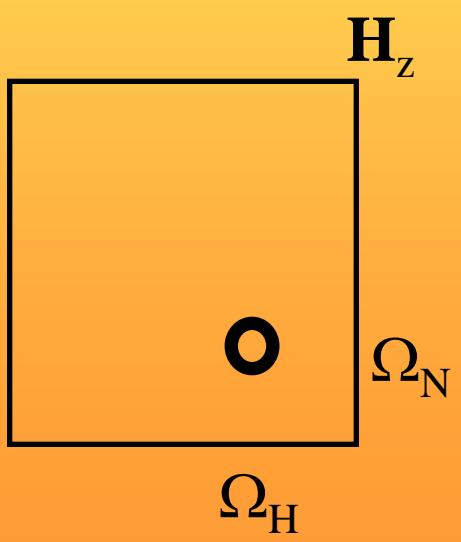
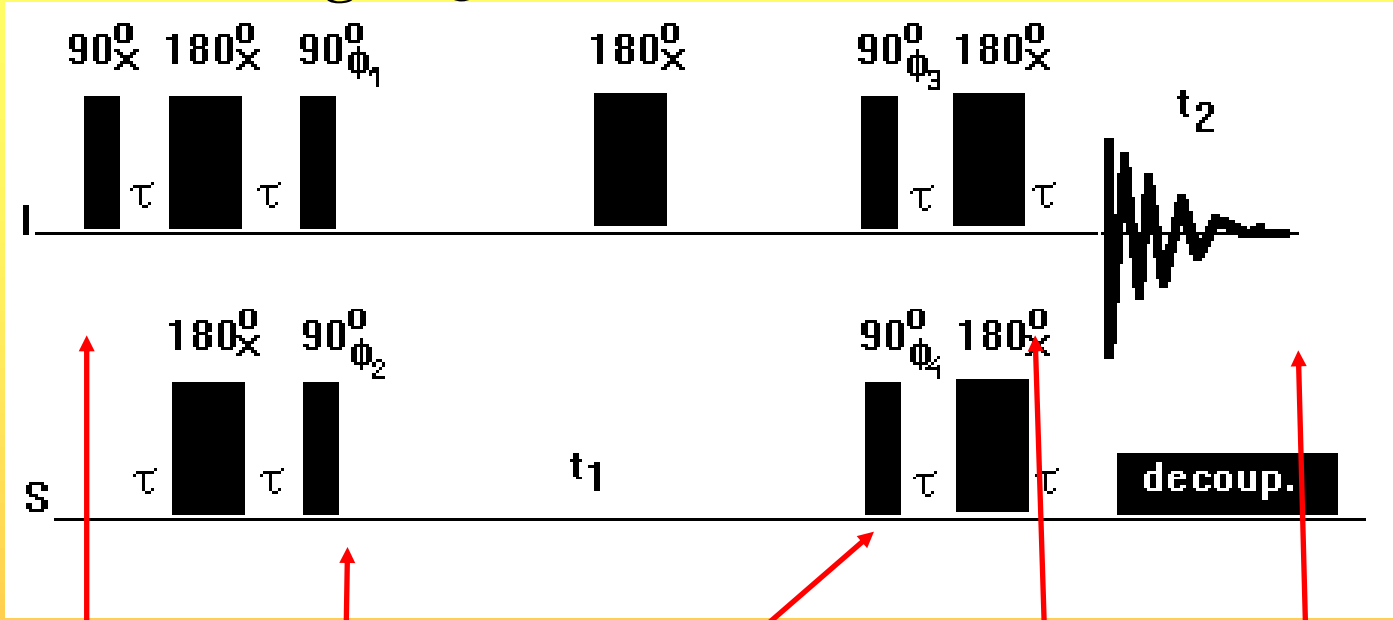
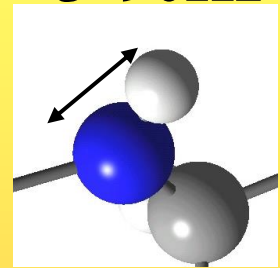
Egy ~17 kDa globuláris fehérje  $^1\text{H}$ -spektruma  
 $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9/1,  $T=300\text{K}$ ,  $c\approx 1\text{mM}$



# Heteronukleáris egyszeres-kvantum koherencia spektrum

HSQC = Heteronuclear Single-Quantum Coherence

$1,1J \sim 90\text{Hz}$



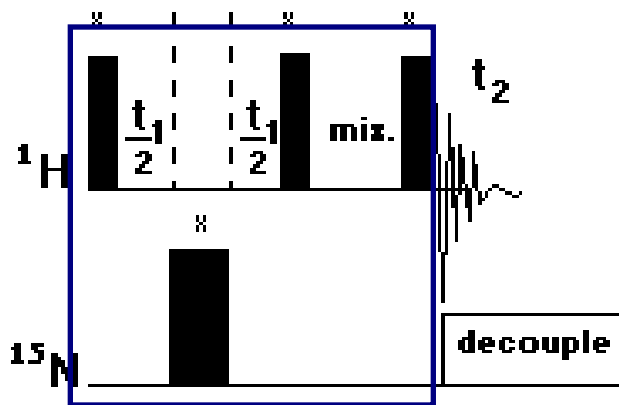
$$-2H_z N_y + 2H_z N_y \cos(\Omega_N t_1)$$

$$H_x \cos(\Omega_N t_1)$$

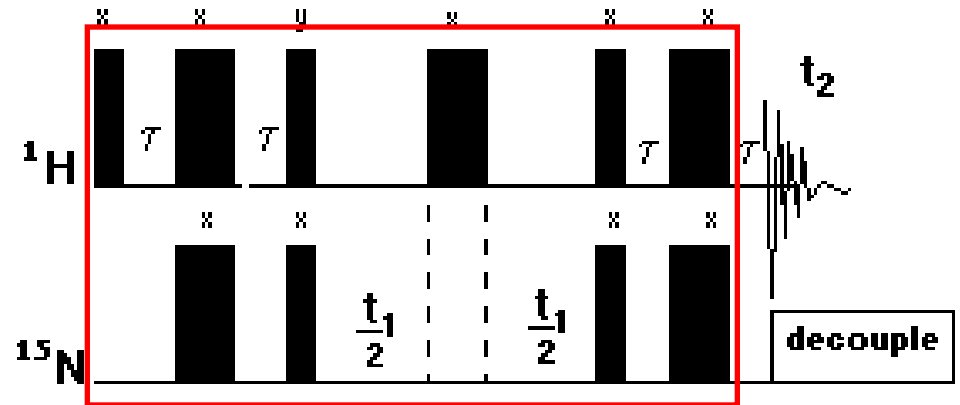
$$H_x \cos(\Omega_N t_1) \cos(\Omega_H t_2)$$

# 3D-NOESY-HSQC

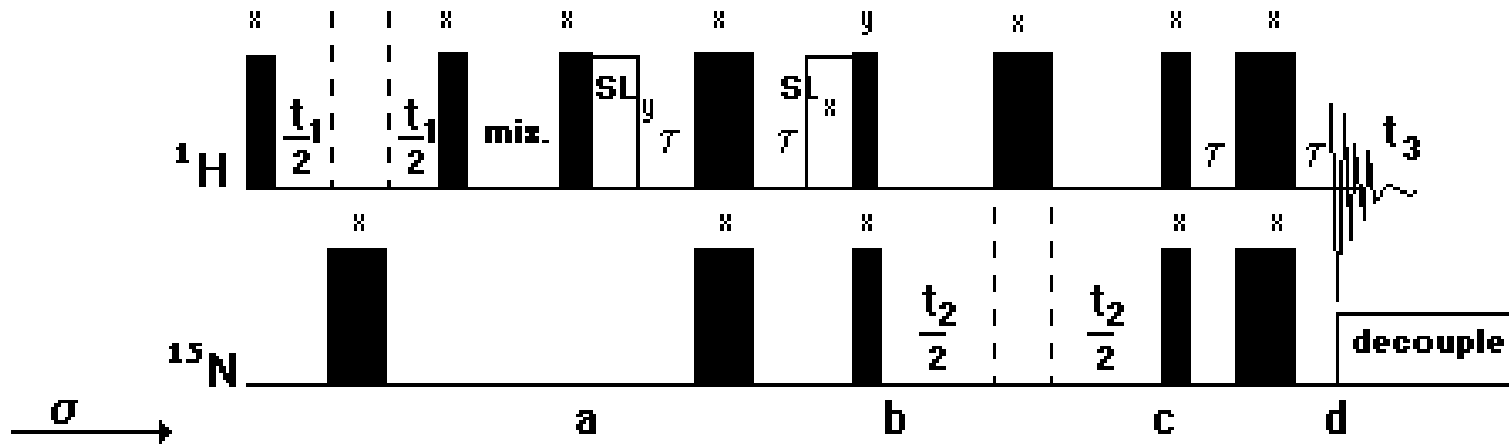
## 2D NOESY



## 2D HSQC

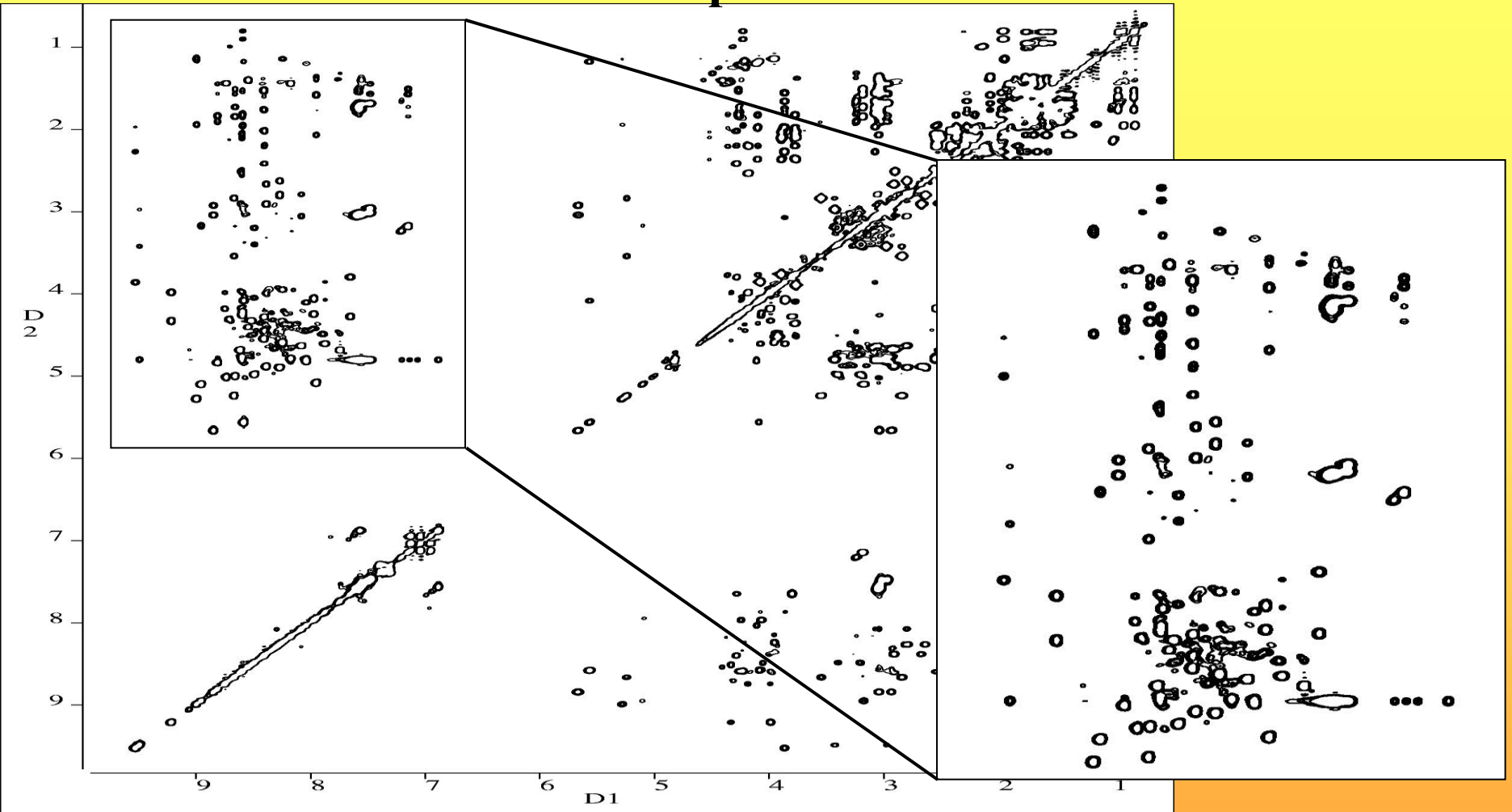


## 3D NOESY-HSQC





# 2D és 3D NMR-spektrumok összevetése

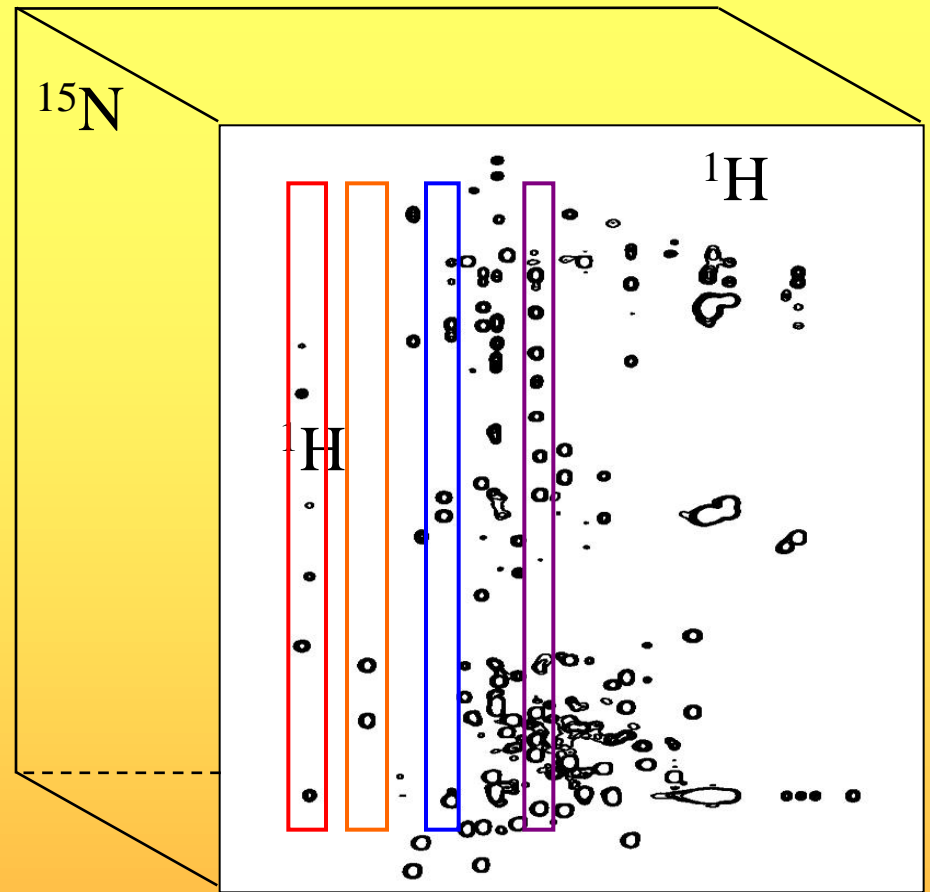


Homonukleáris 2D TOCSY

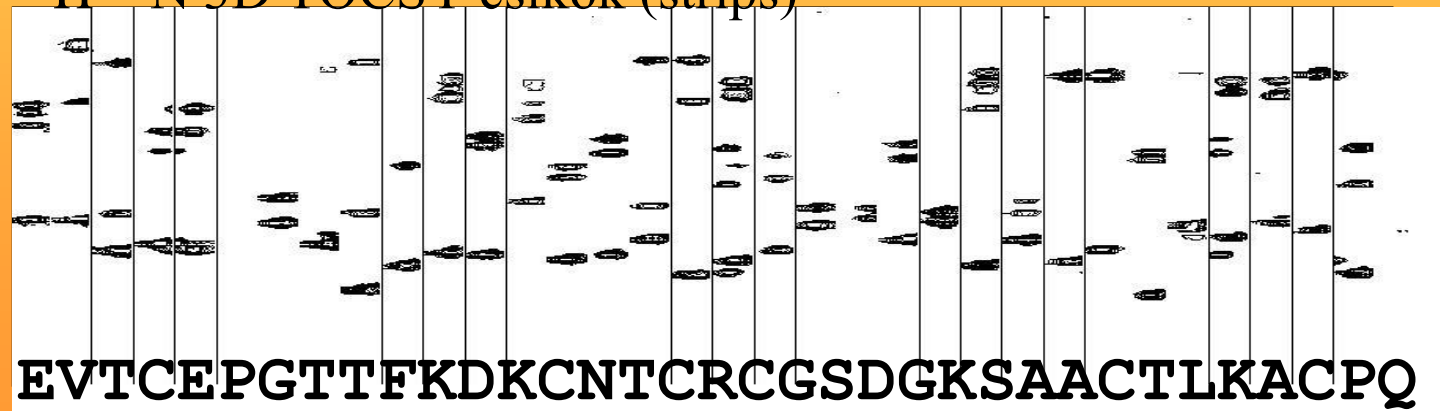
Homonukleáris 2D TOCSY  
amid NH (ujjlényomat) tartománya

# 2D és 3D NMR-spektrumok

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSYamid NH  
(ujjlenyomat) tartománya



$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  3D TOCSY csíkok (strips)



# **Három esettanulmány**

**1) Természetes szerinproteáz-inhibitorok  
kötődésvizsgálata**

**2) A dUTPáz katalitikus mechanizmusának és  
ligandumkötésének vizsgálata**

**3) Kalmodulin és egy Vinca alkaloid analóg (KAR2)  
kötődésvizsgálata**

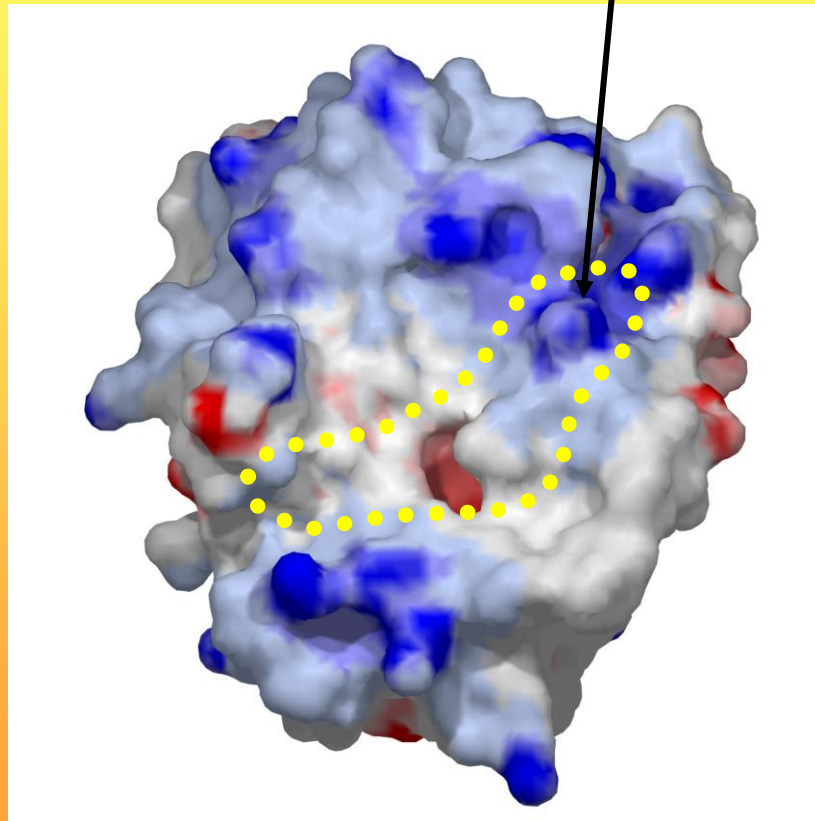
# Természetes szerinproteázinhibitorok kötődésvizsgálata NMR-rel

jelölt ligandum (4kDa), jelöletlen fehérje (25kDa)

együtműködésben Gráf Lászlóval  
és munkatársaival  
(ELTE Biokémiai Tanszék)

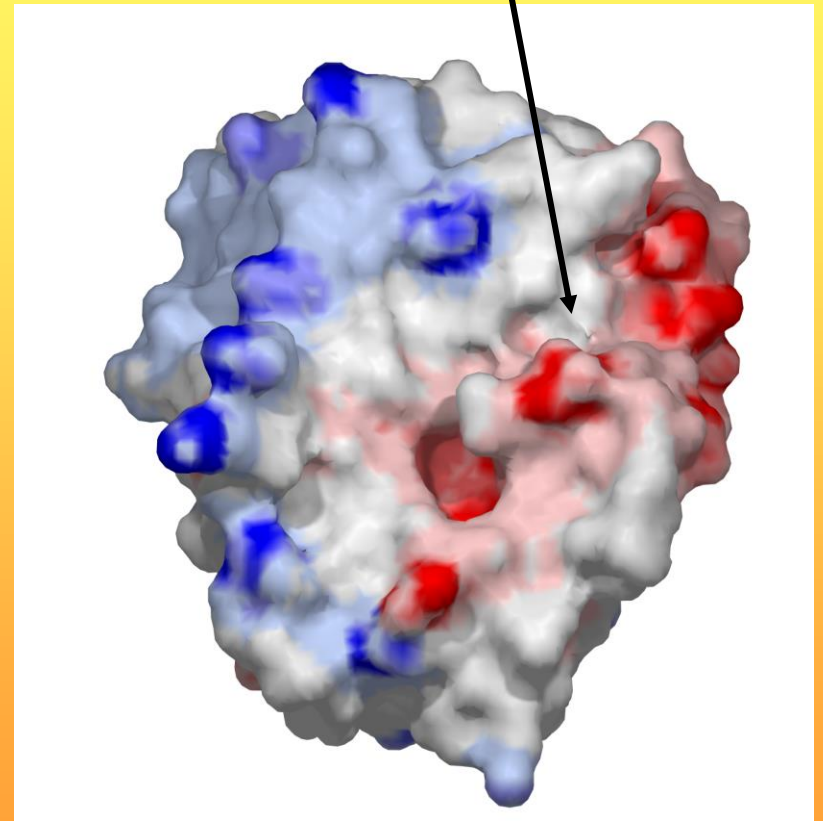
# Töltések a humán tripszin felületén

Arg193=S<sub>2</sub>'



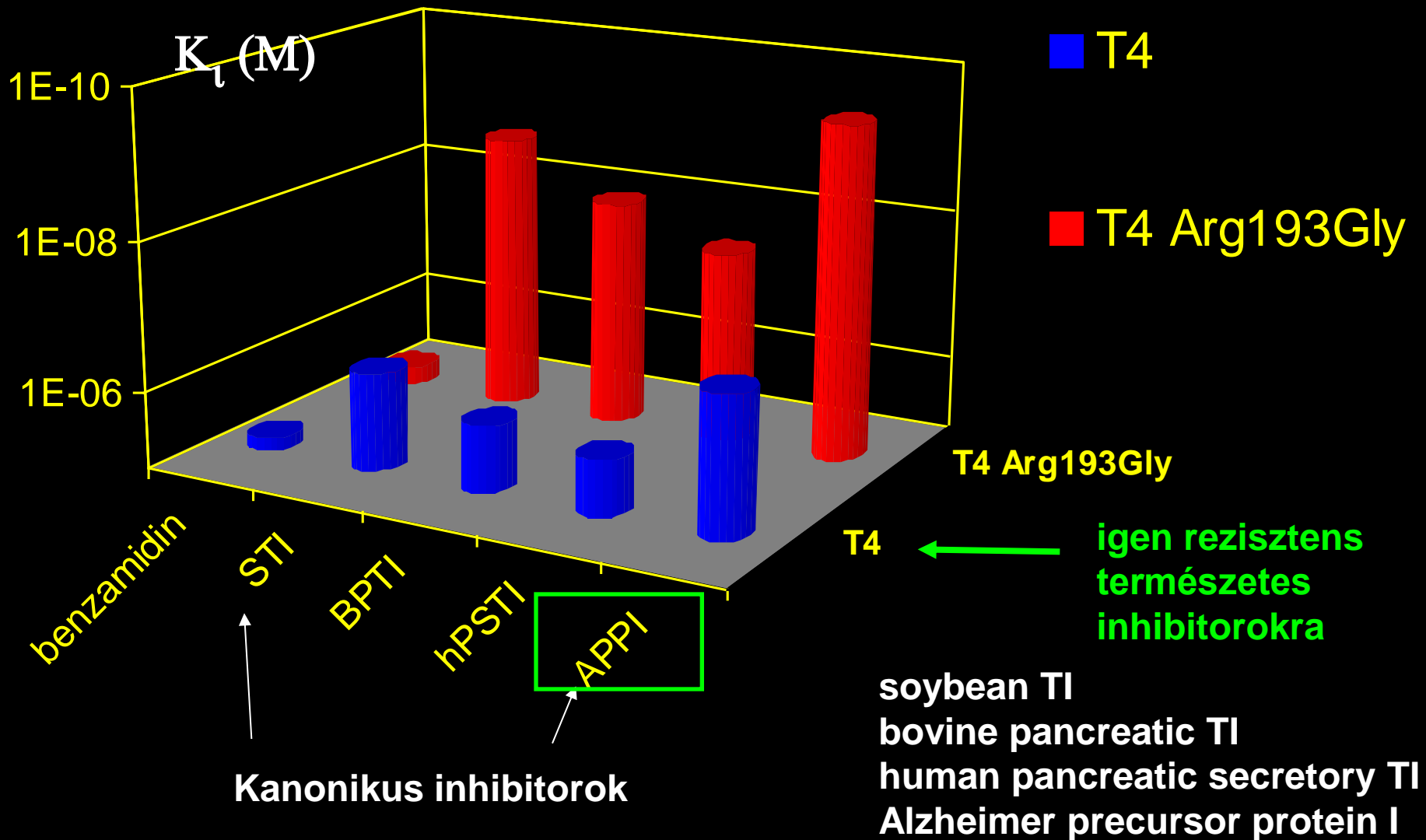
humán tripszin 4

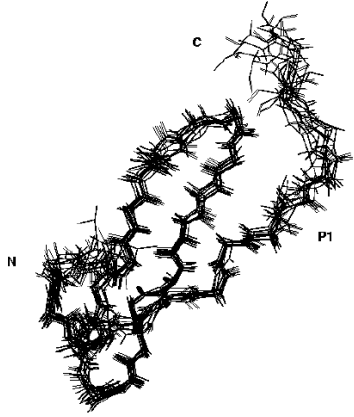
Gly193=S<sub>2</sub>'



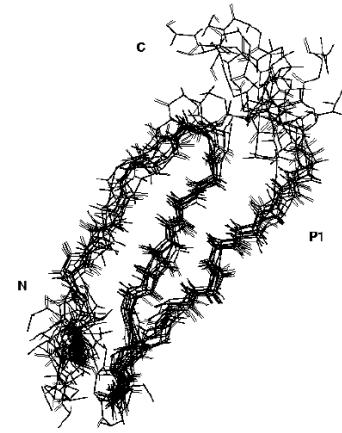
humán tripszin 1

# Arg193→Gly csere





SGCI



SGTI

inhibitorok  
SGTI  
(SGCI var.)

szerepe lehet a  
humán tripszin 4-nek

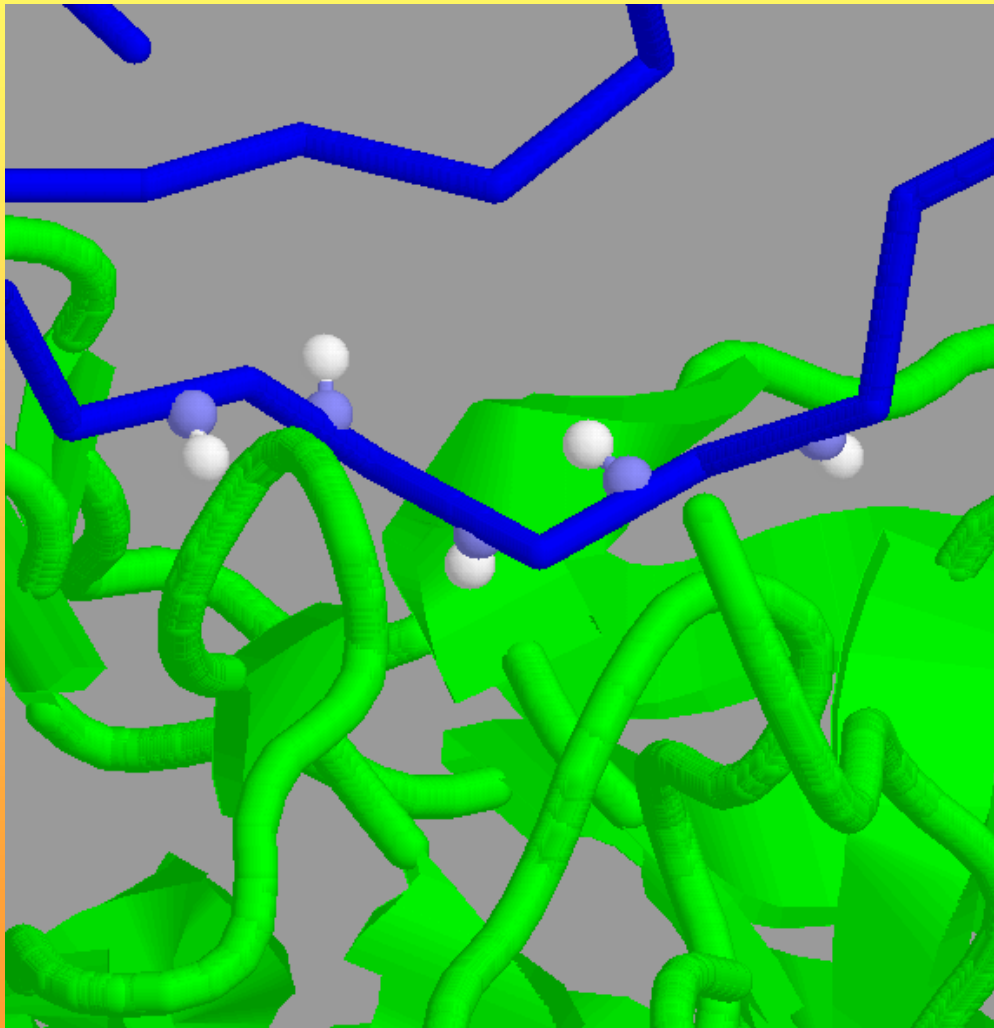
Alzheimer prekursor  
fehérje (100kDa)

$\beta$ -amiloid peptidek  
e.g. A1-40, A1-42

Xxx-Lys(Arg)

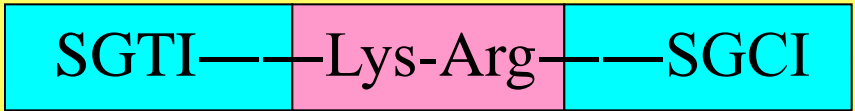
# Enzim-inhibitor komplex

kötődési vizsgálatok  $^{15}\text{N}$  jelölt inhibitorral

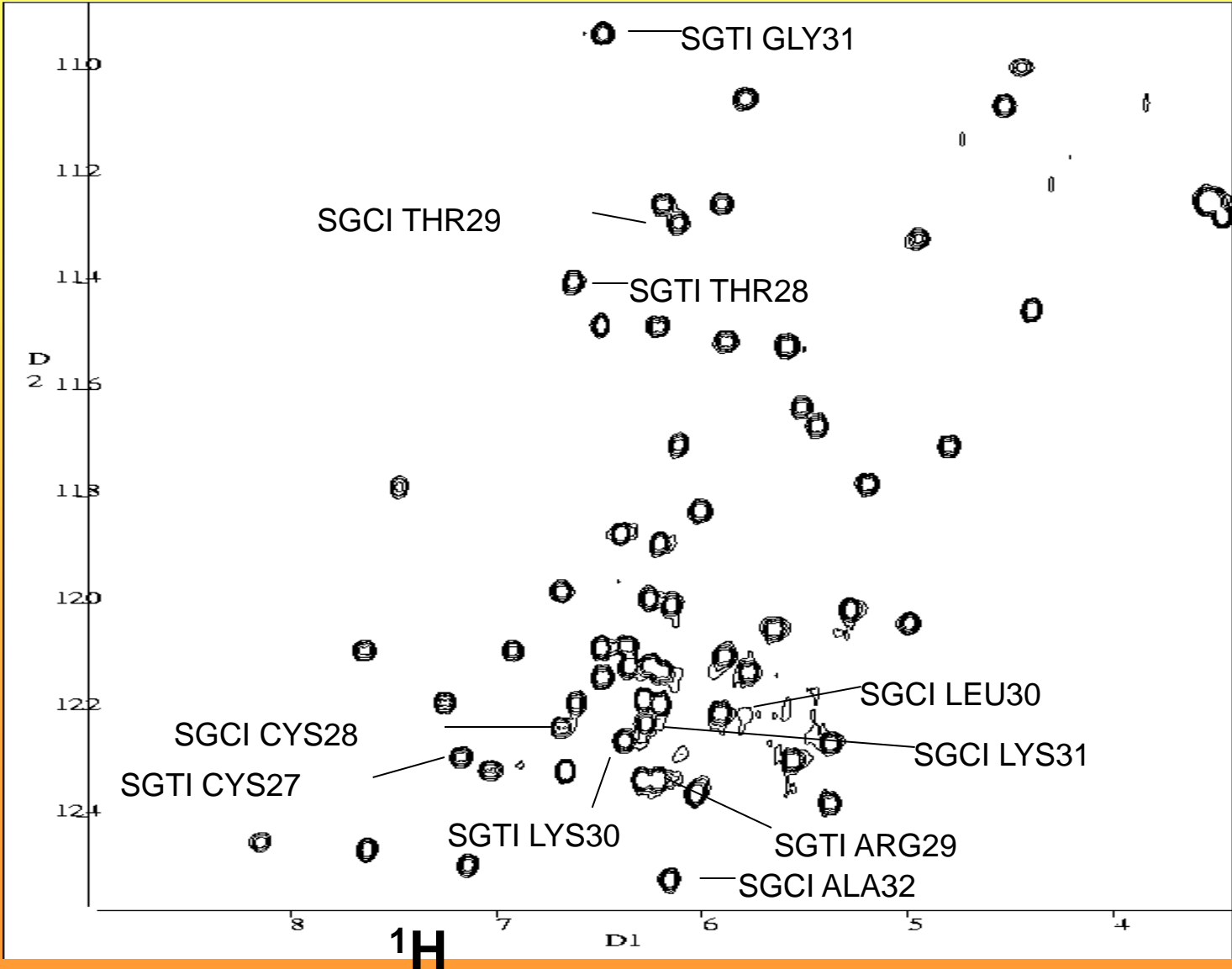


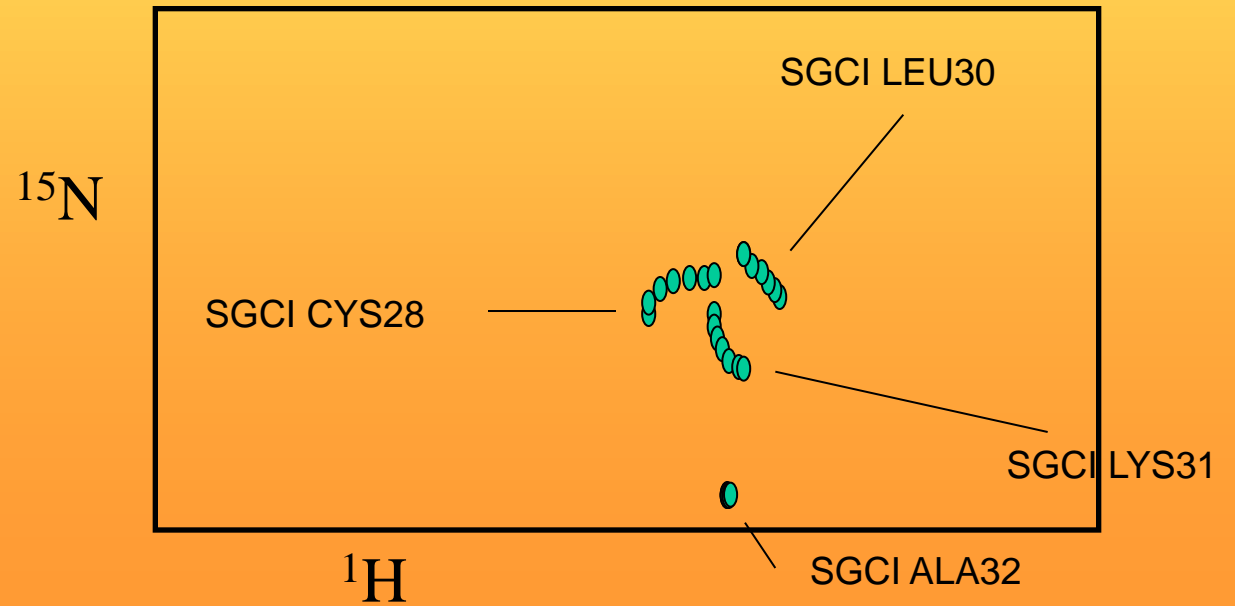
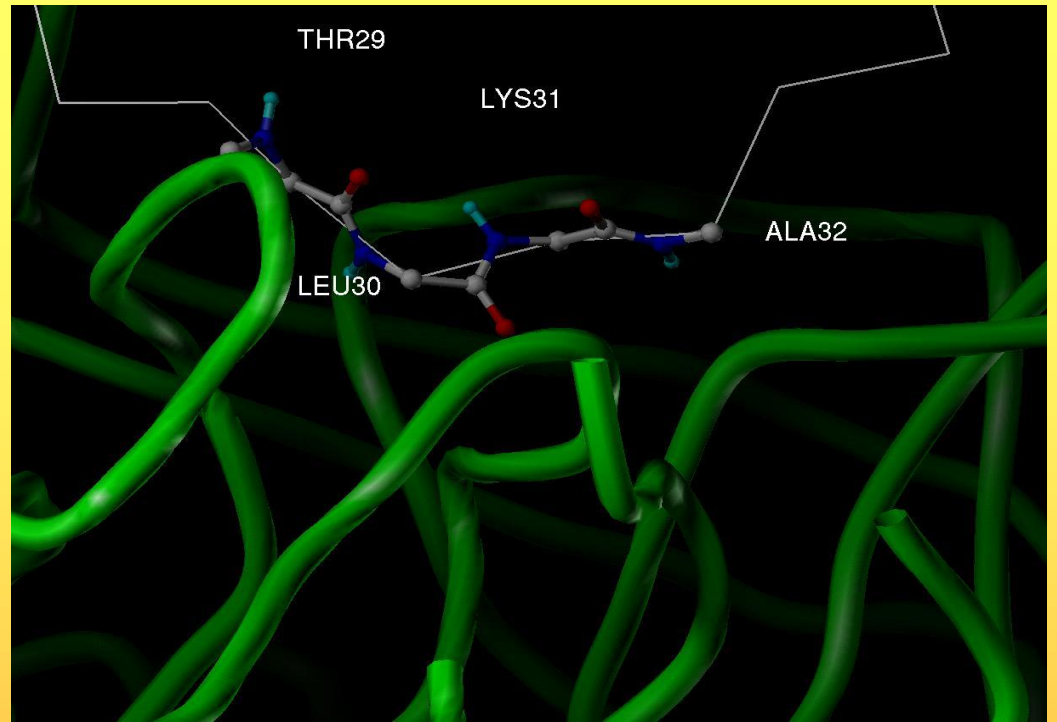


# Az SGTCI $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC spektrumának részlete



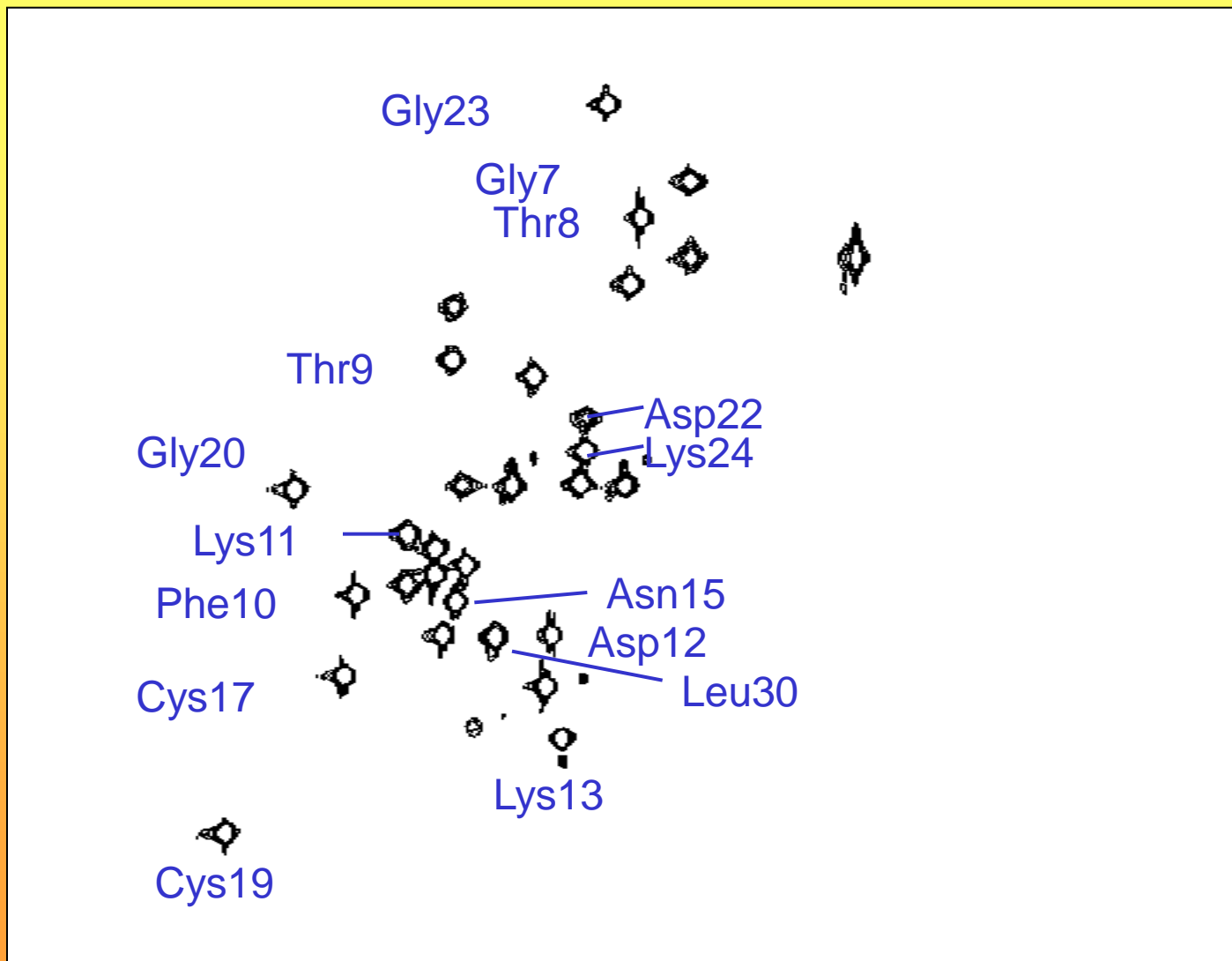
$^{15}\text{N}$





# SGCI

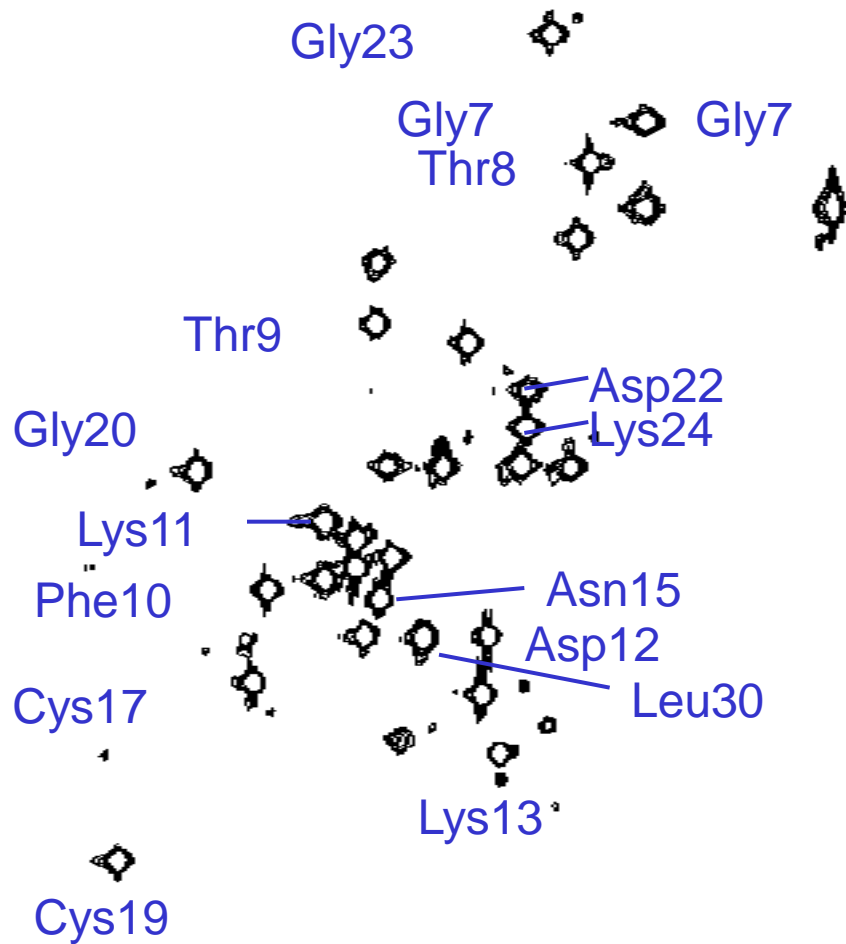
$^{15}\text{N}$



$^1\text{H}$

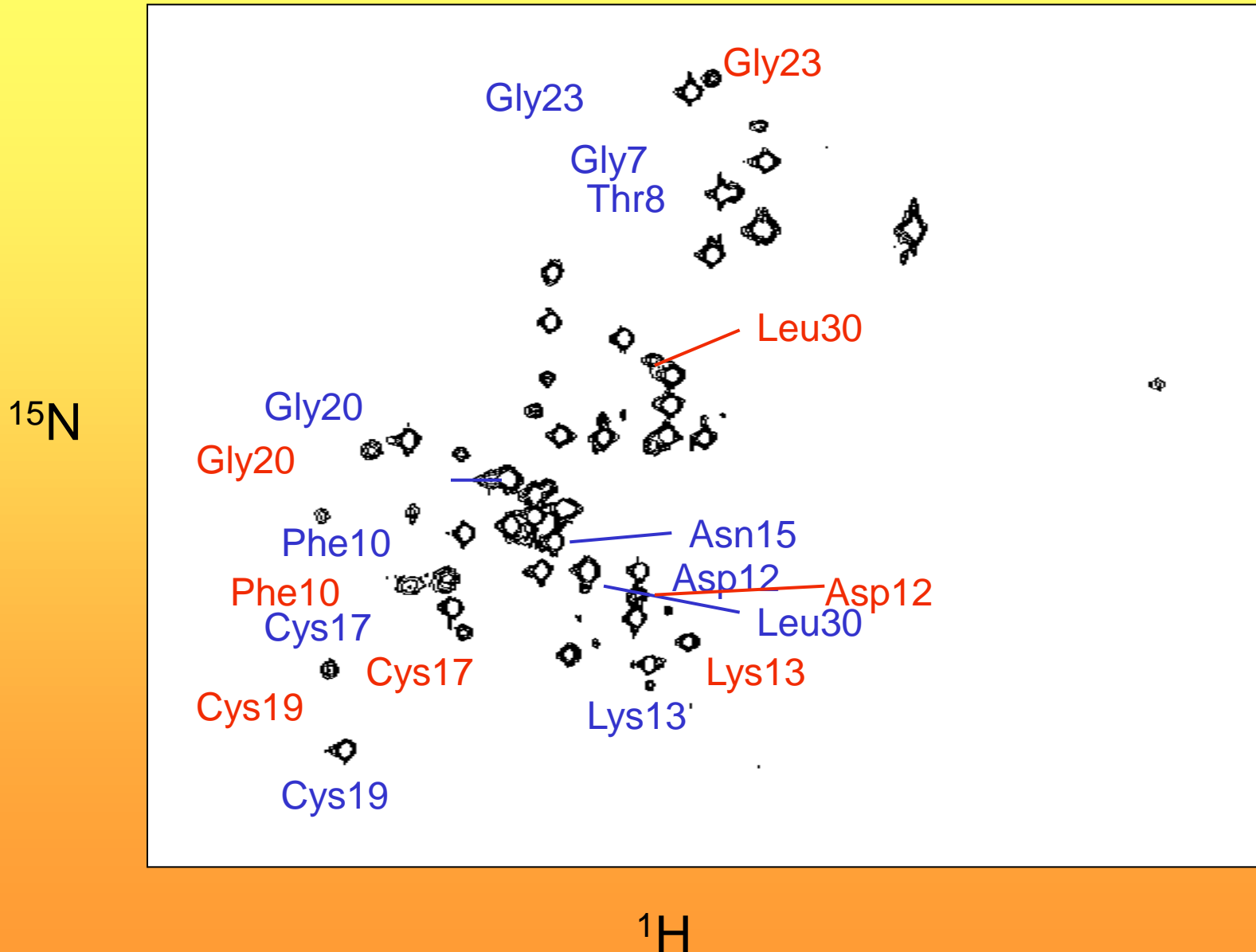
# SGCI + 10% kimotripszin

$^{15}\text{N}$

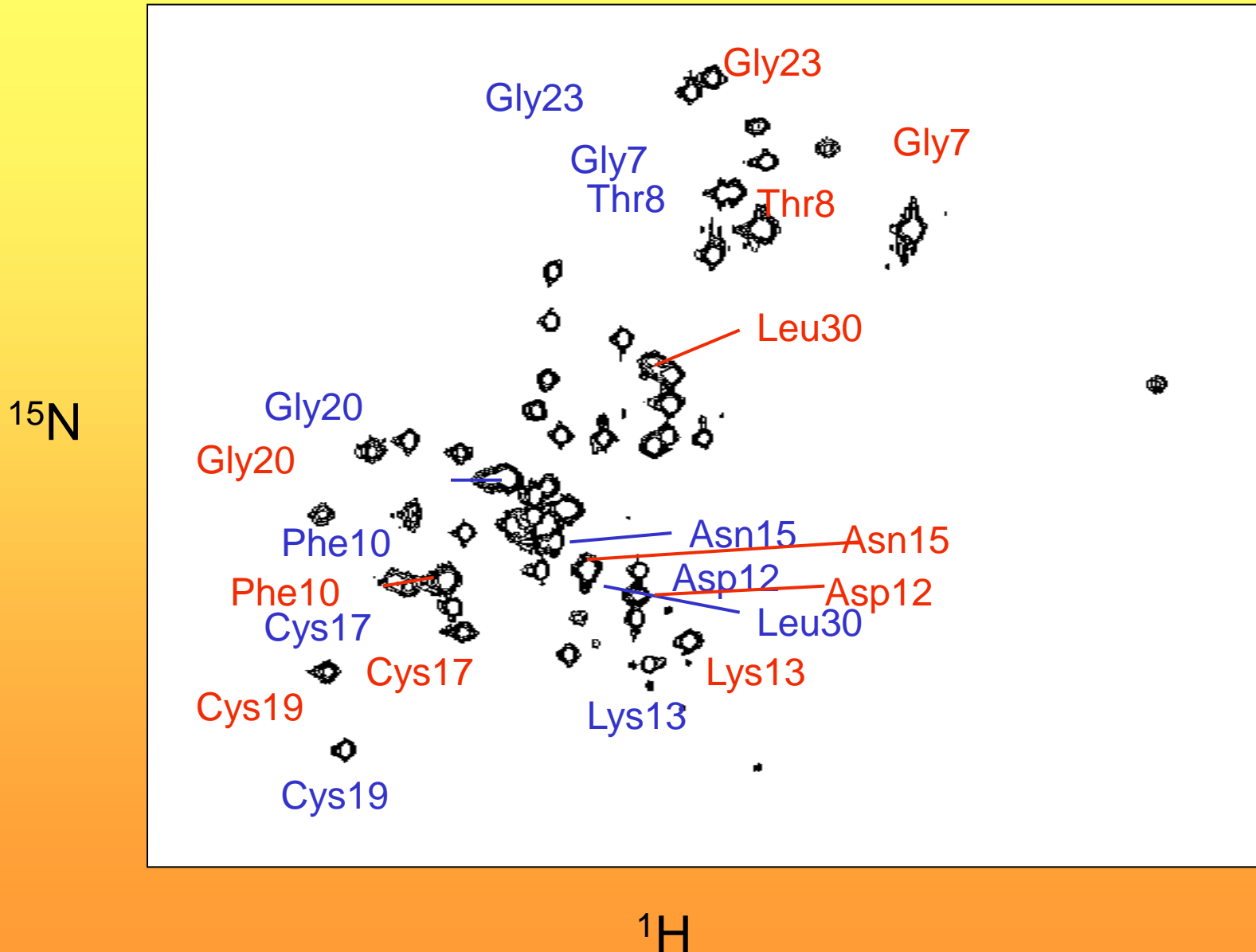


$^1\text{H}$

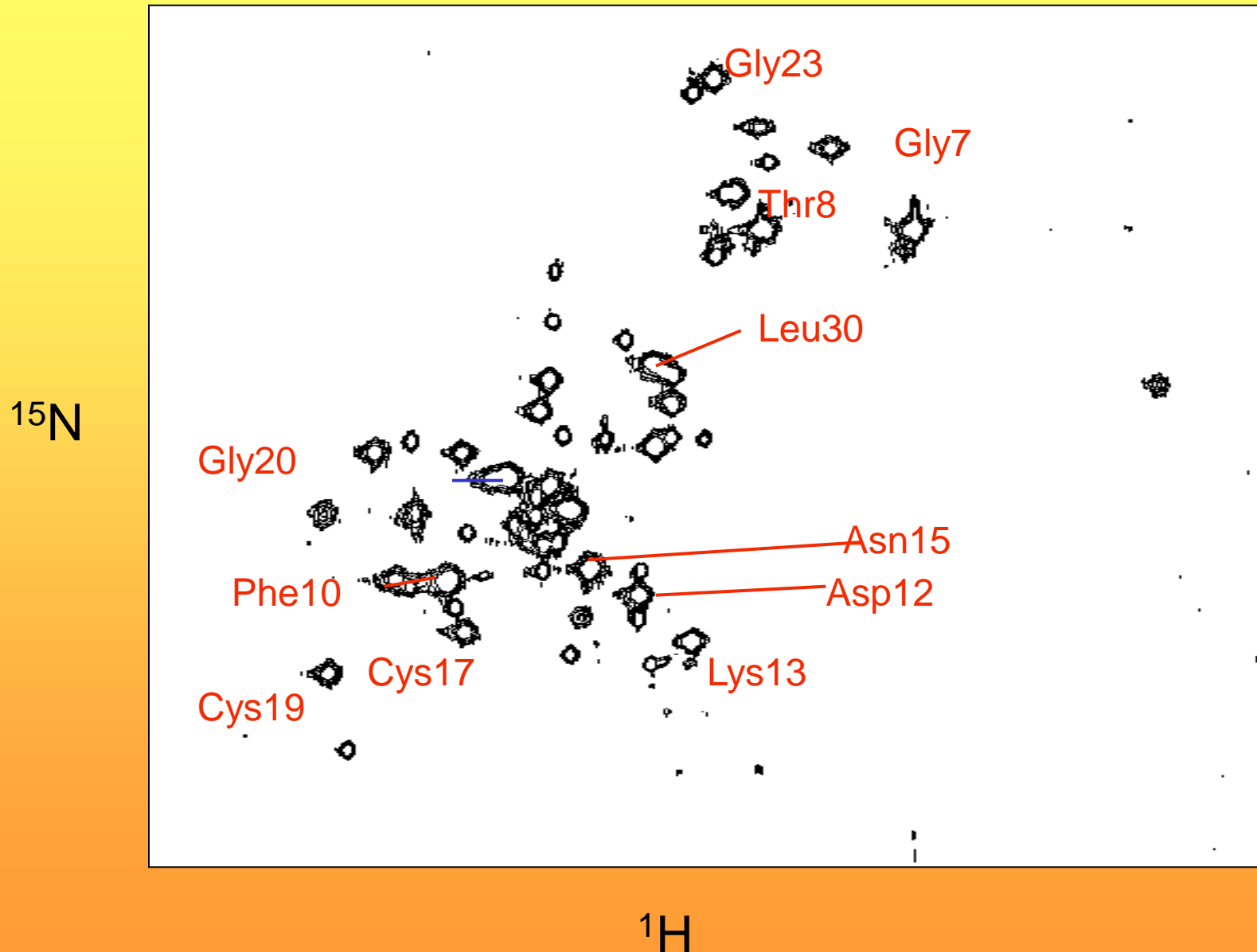
# SGCI + 30% kimotripszin



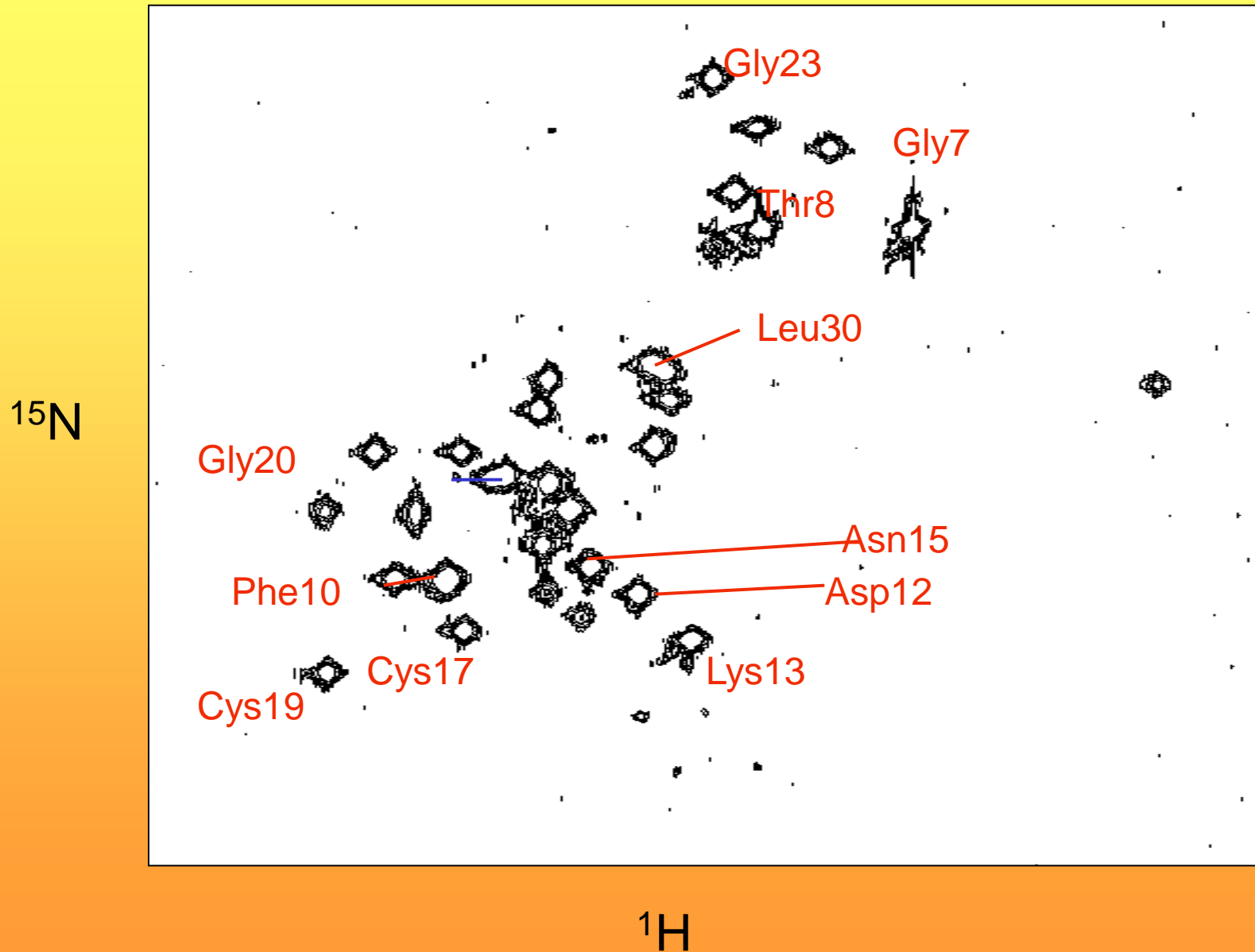
# SGCI + 50% kimotripszin



# SGCI + 70% kimotripszin

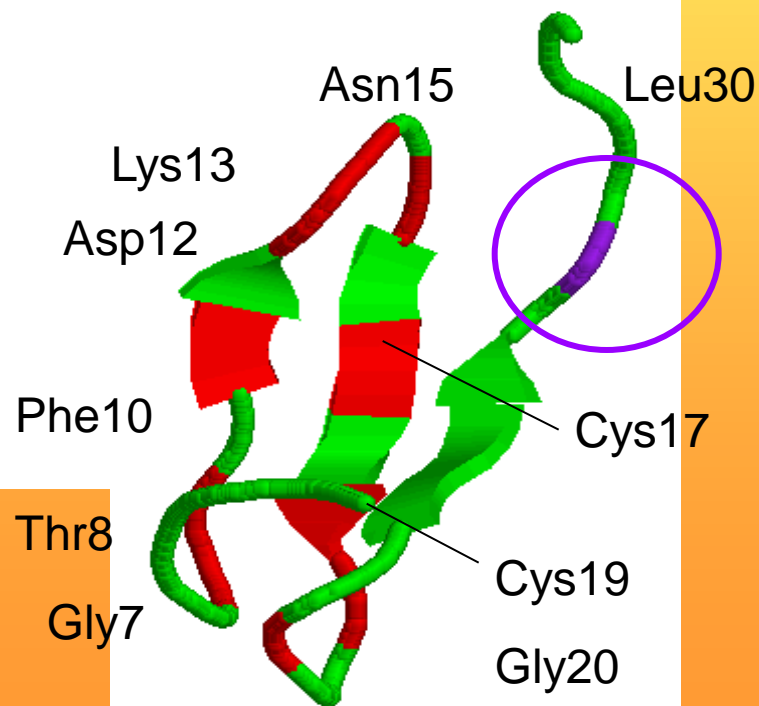
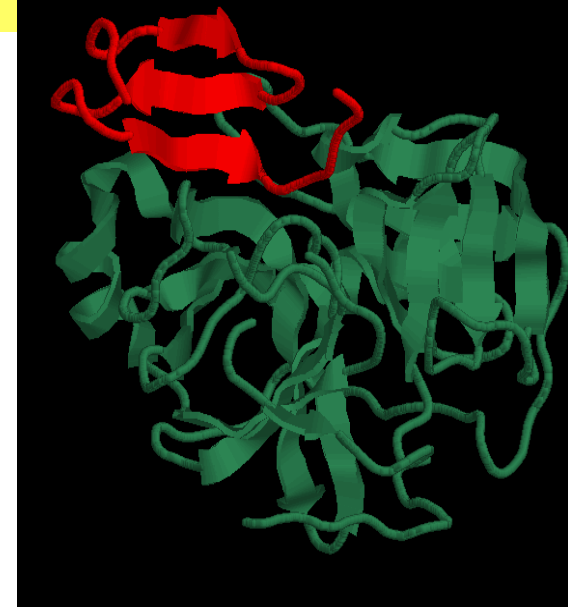
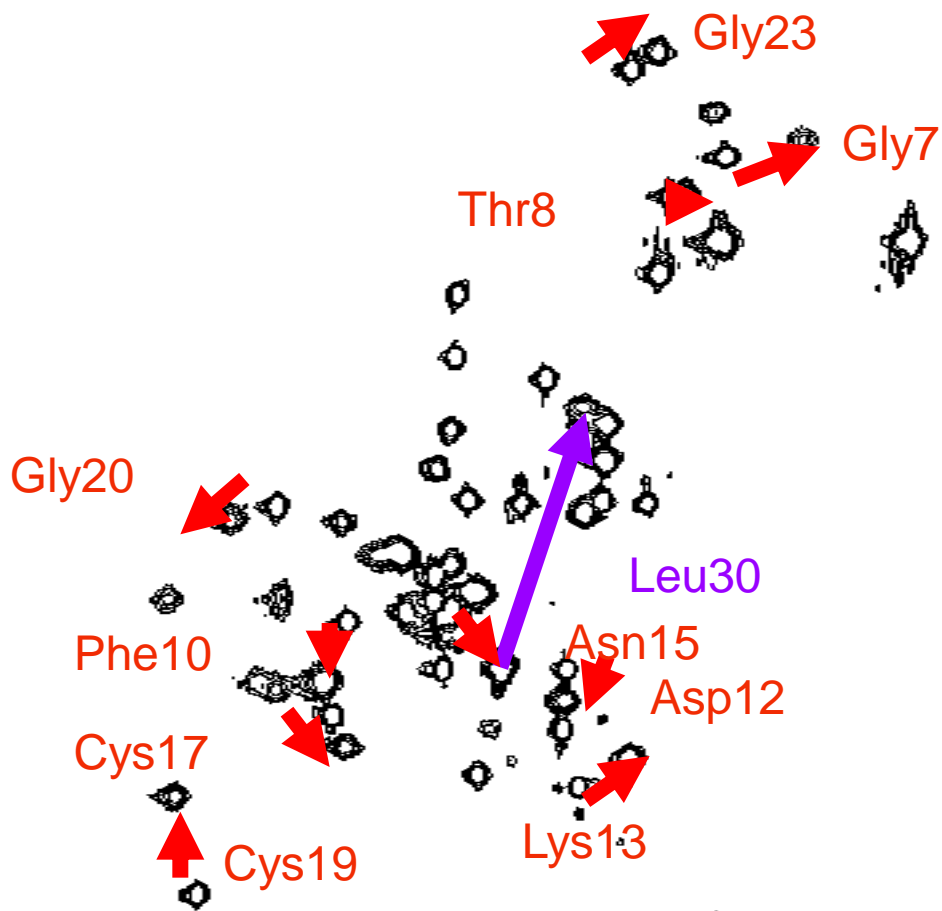


# SGCI + 90% kimotripszin





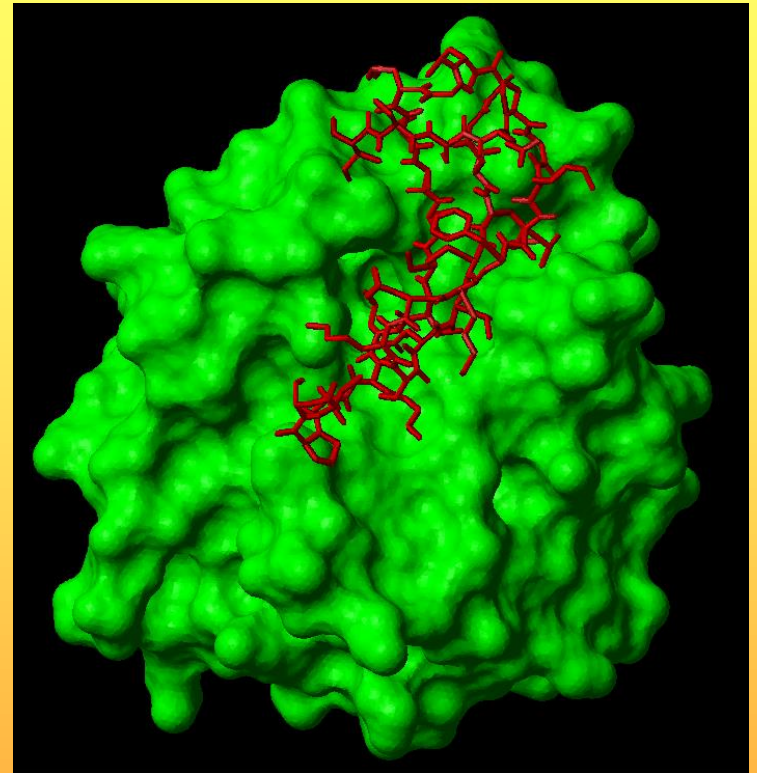
# Néhány észlelt változás



# Miért volt hasznos az NMR?

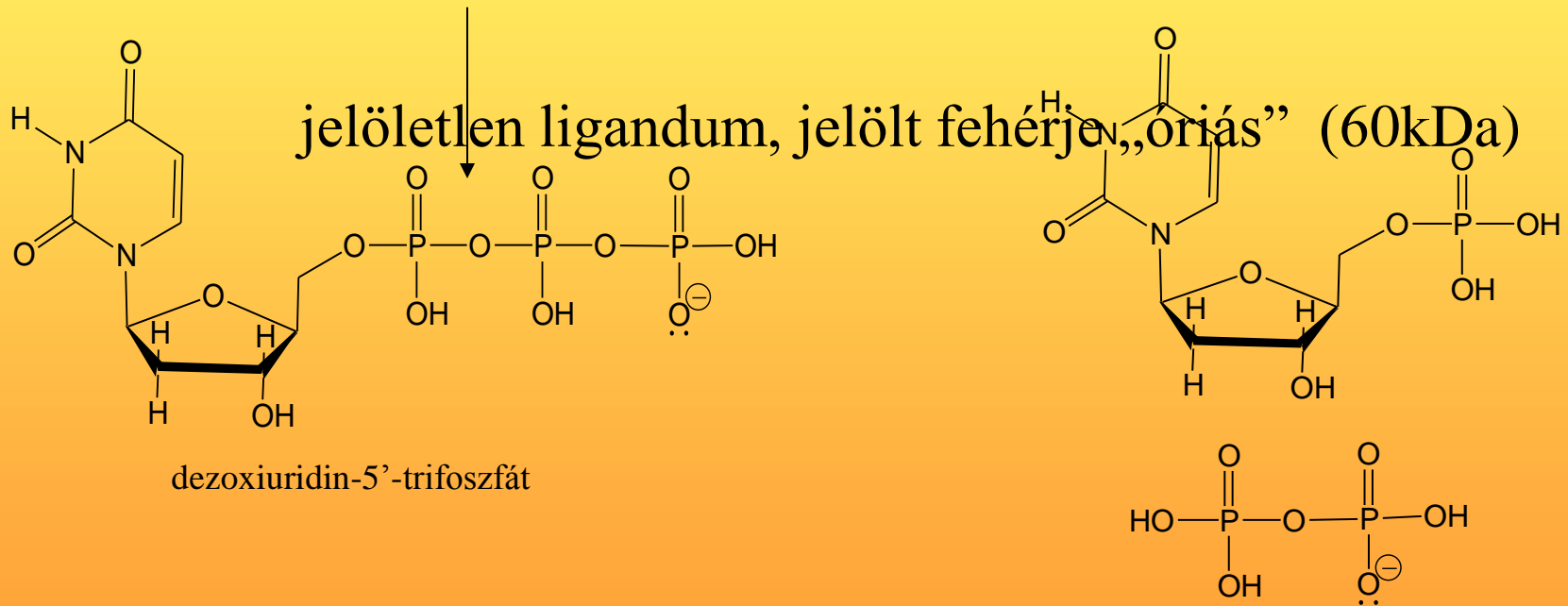
**1) Megállapítottuk, hogy a ligandkötődés az NMR időskálán nem gyors, hanem közepesen lassú.**

**2) Behatároltuk a kötődésben résztvevő aminosavakat.**



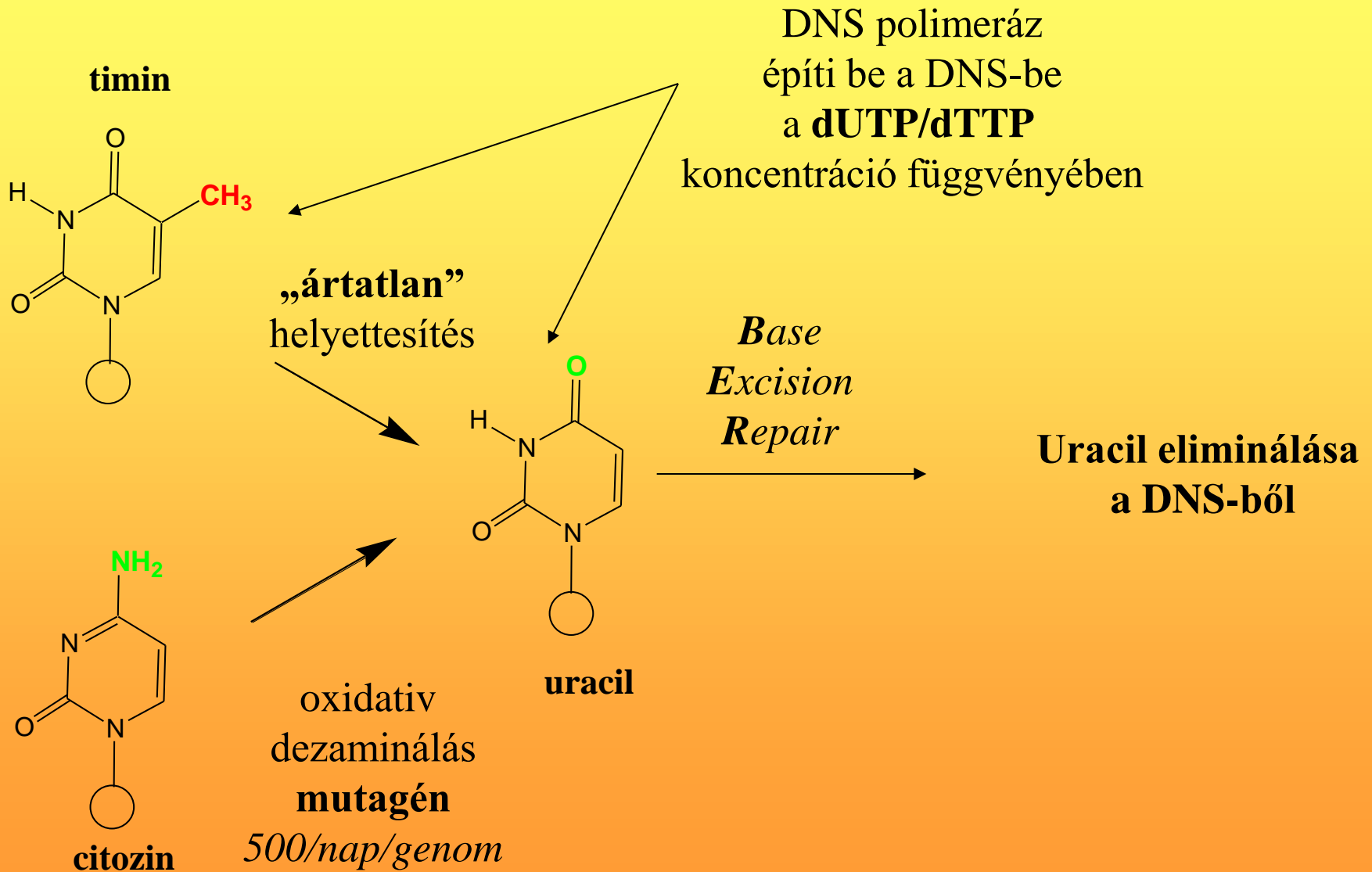
# A dUTPáz katalitikus mechanizmusának és ligandumkötésének vizsgálata

dezoxiuridin-trifoszfát nukleotidohidroláz

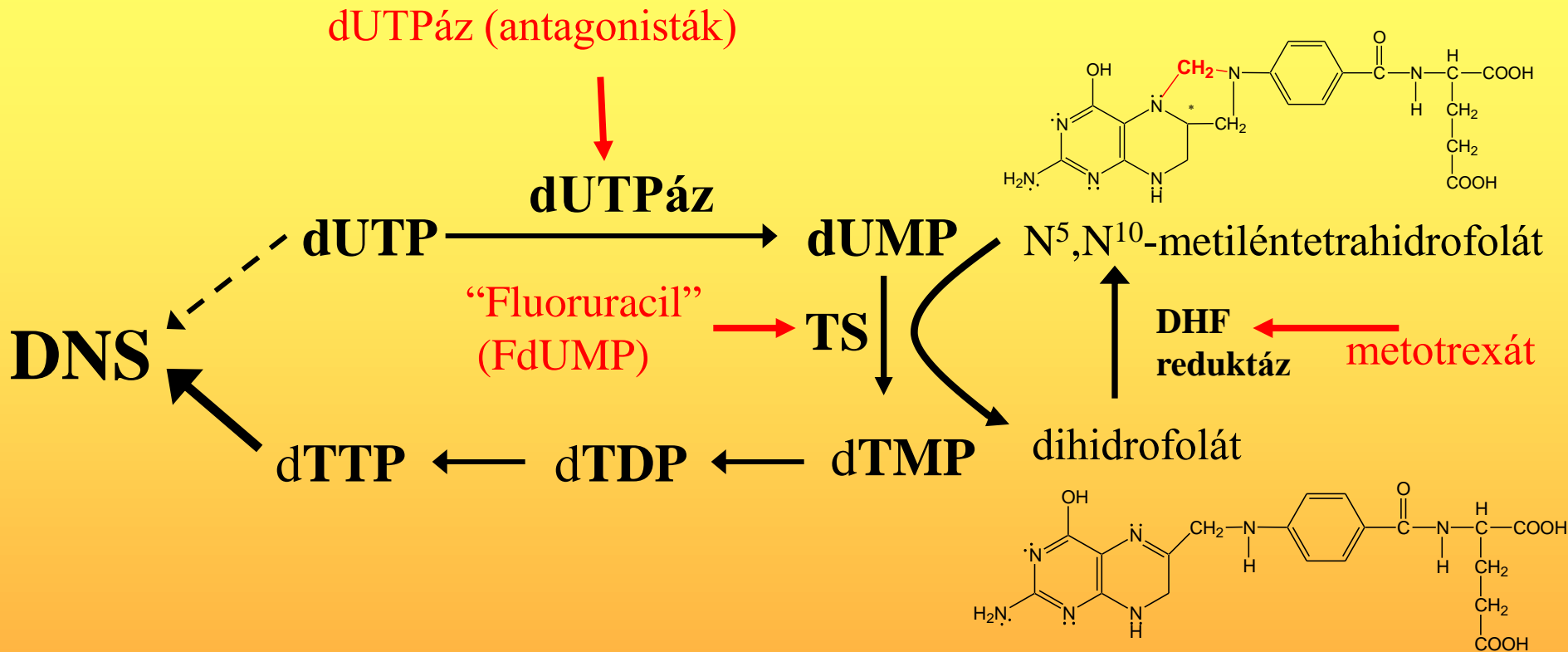


együttműködésben Vértessy Beátával és  
munkatársaival  
(MTA SZBK Enzimológiai Intézet)

# DNS javító mechanizmusok



# Timinmentes sejthalál és kemoterápia

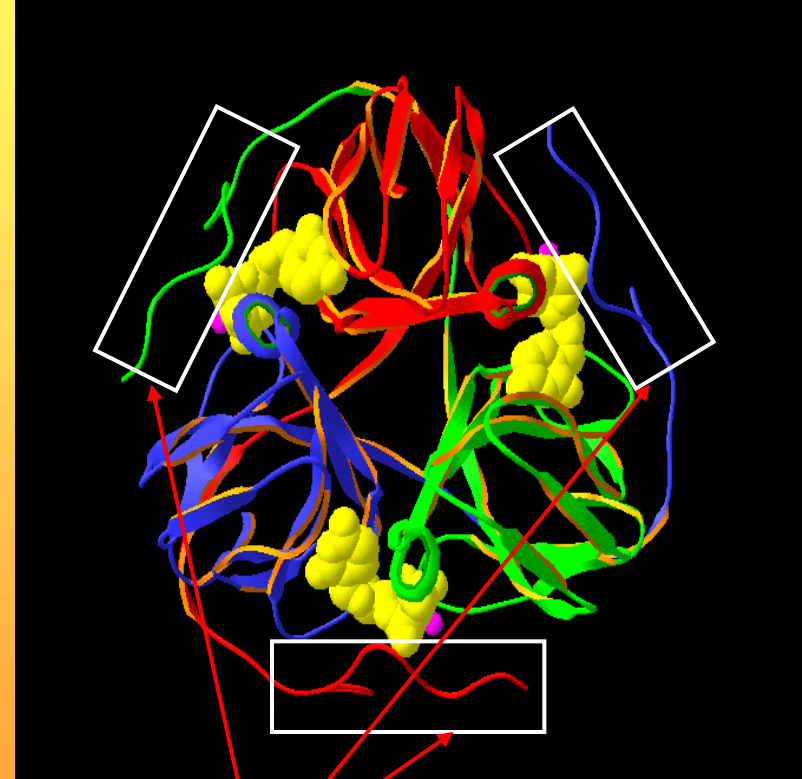
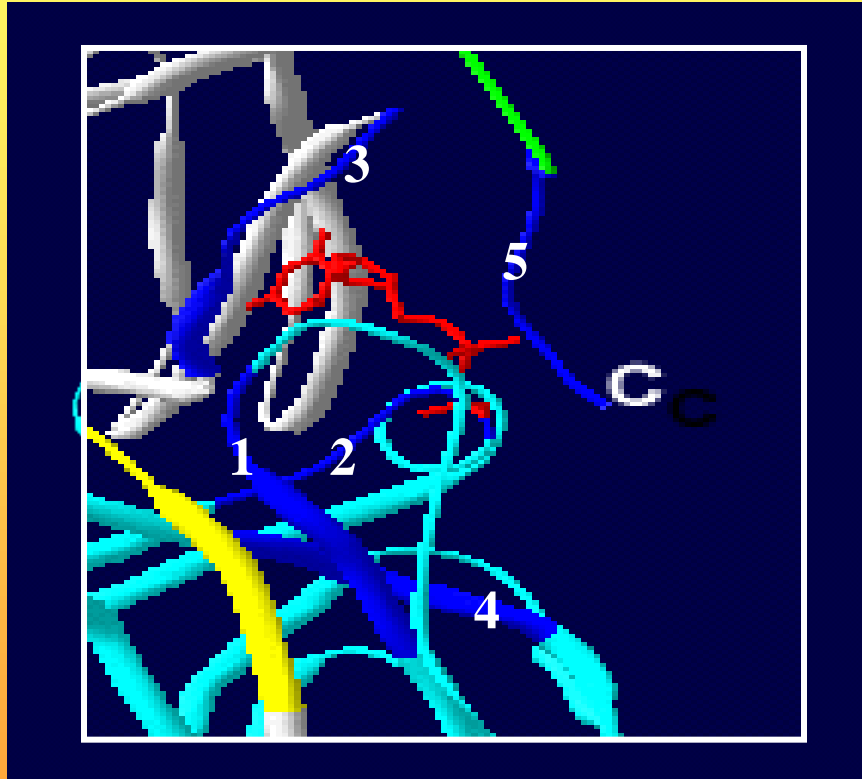


**Programozott sejthalál előidézhető  
a dUTP szint növelésével (dTTP szint csökkentésével)  
antagonisták segítségével : dUTPáz antagonisták  
Fluoruracil  
metotrexát**

# A dUTPáz szerkezete

Szimmetrikus homotrimer, három aktív centrummal

első röntgenszerkezet 1992 *Nature*

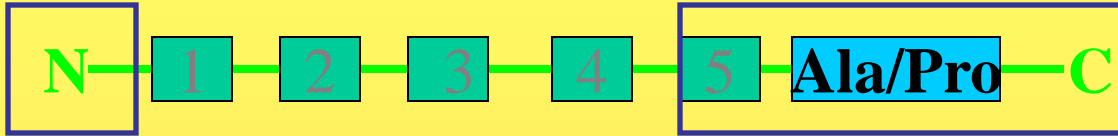


alacsony elektronsűrűség

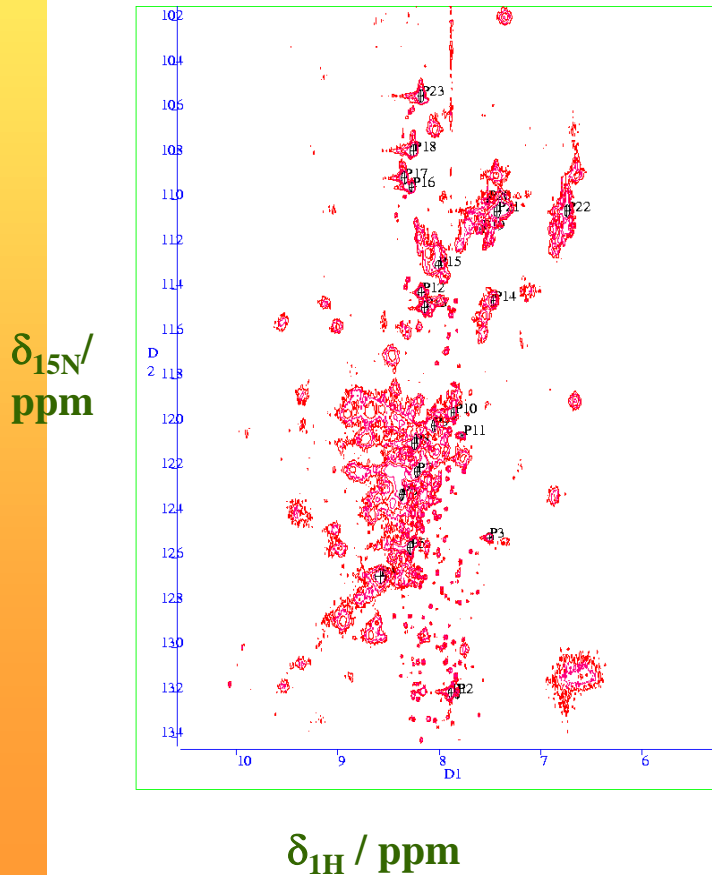
Kovári és mts. *J.Biol.Chem.* (2004)

MW  $\gg$  60 kDa  $\rightarrow$  mit lát az NMR?

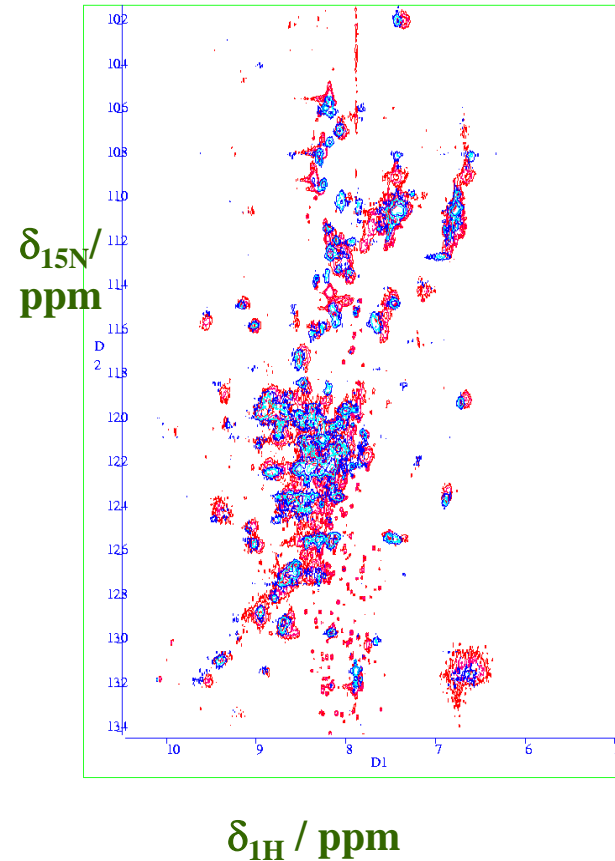
$^{15}\text{N}$  dUTPáznak csak a flexibilis részeit!



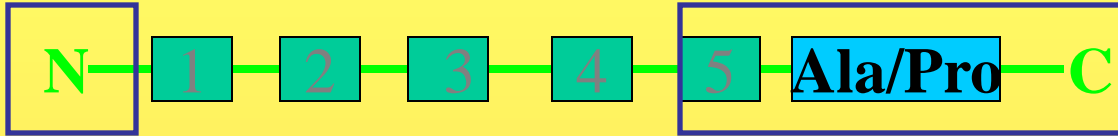
**HSQC: w/o ligands**



**HSQC: w/dUDP**



$^{15}\text{N}$  dUTP-áznak csak a flexibilis részeit!  
MW  $\gg$  50 kDa  $\rightarrow$  mit lát az NMR?



N-terminus:

PSTDFADIPAAKKMK

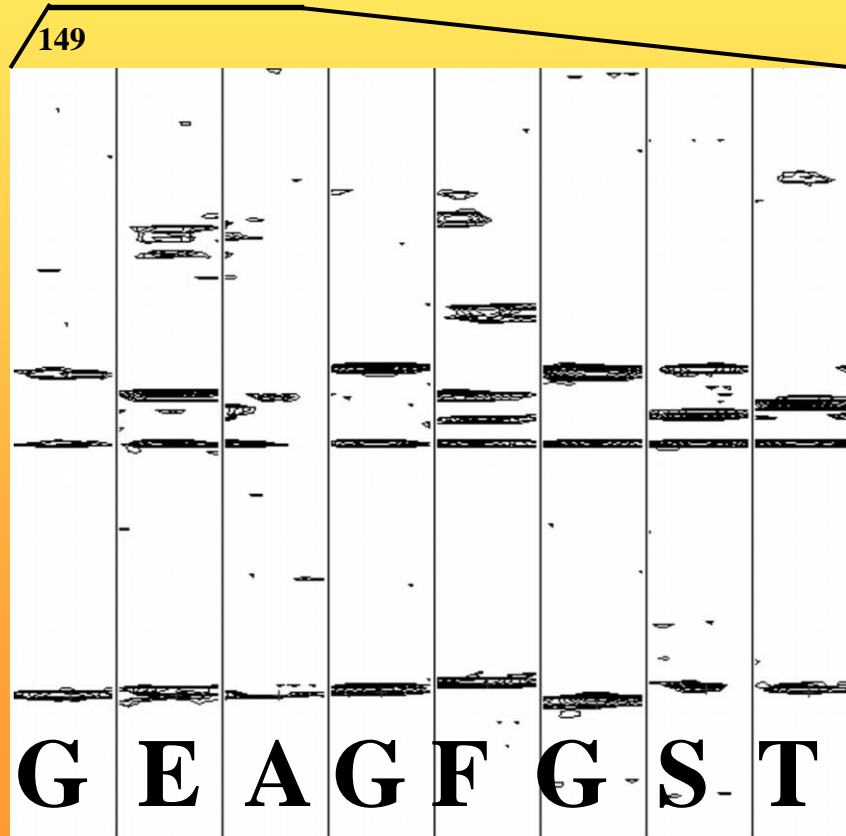
C-terminus (Motif 5):

GEAGFGSTGVK

hozzárendelés

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-TOCSY

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NOESY

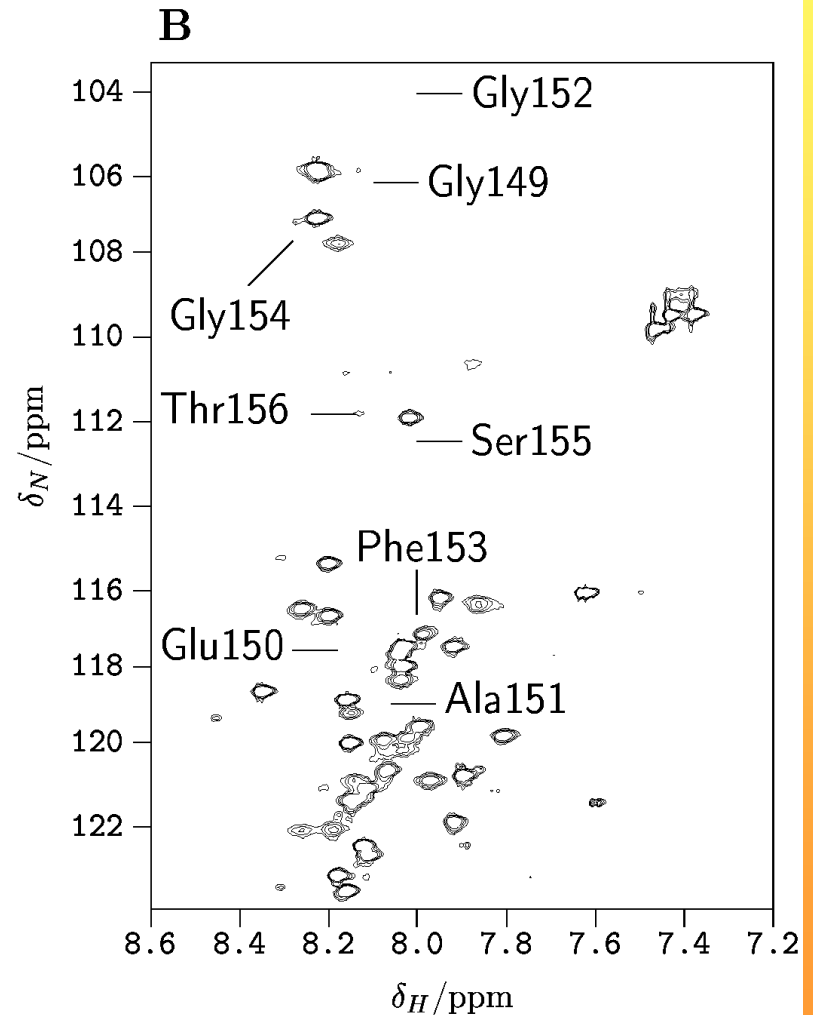
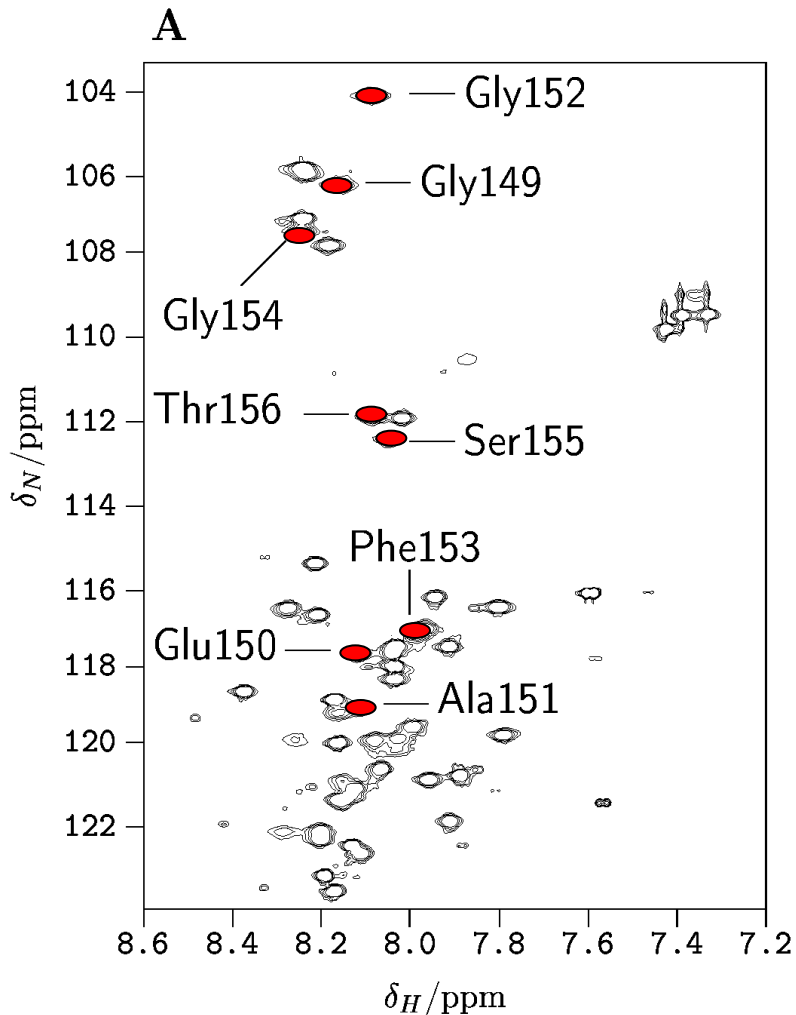




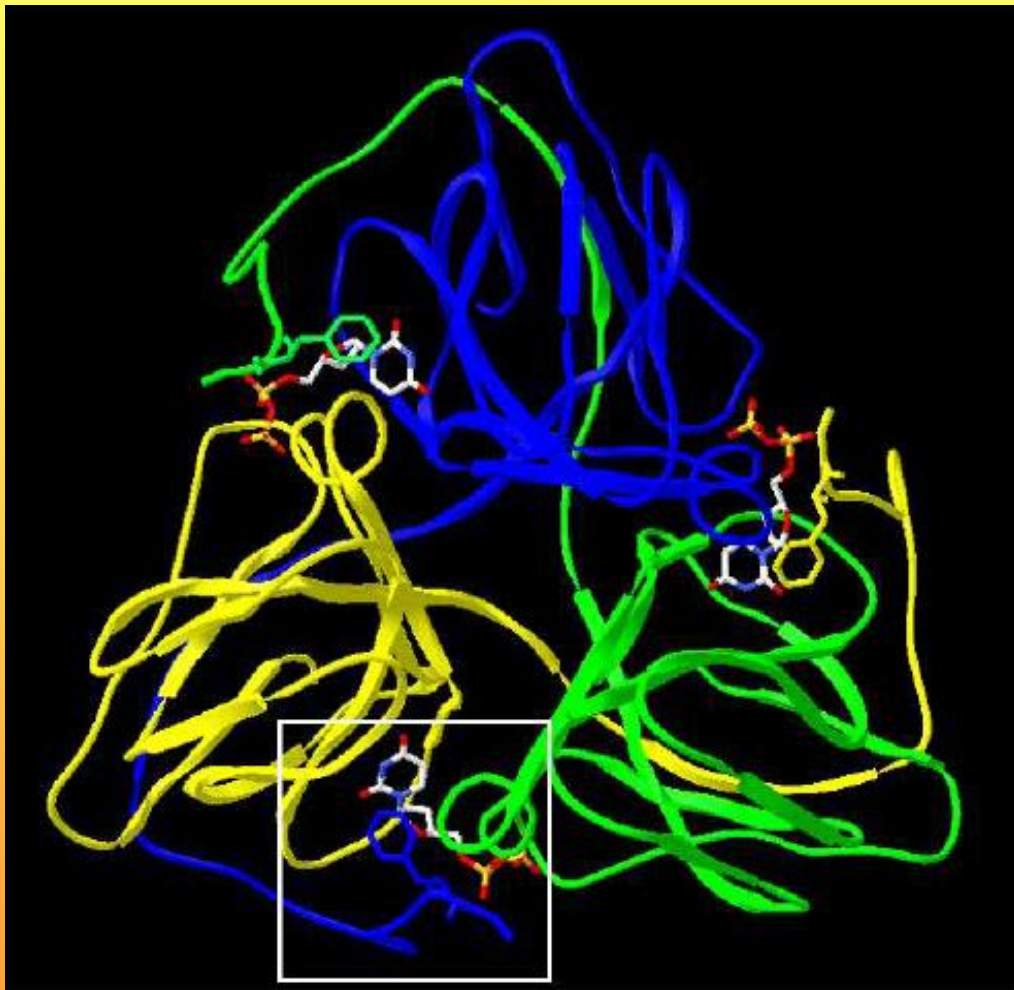
# Inhibitor hatására a 5. motívum (C-terminális) Gly149-Thr156 része rendeződik



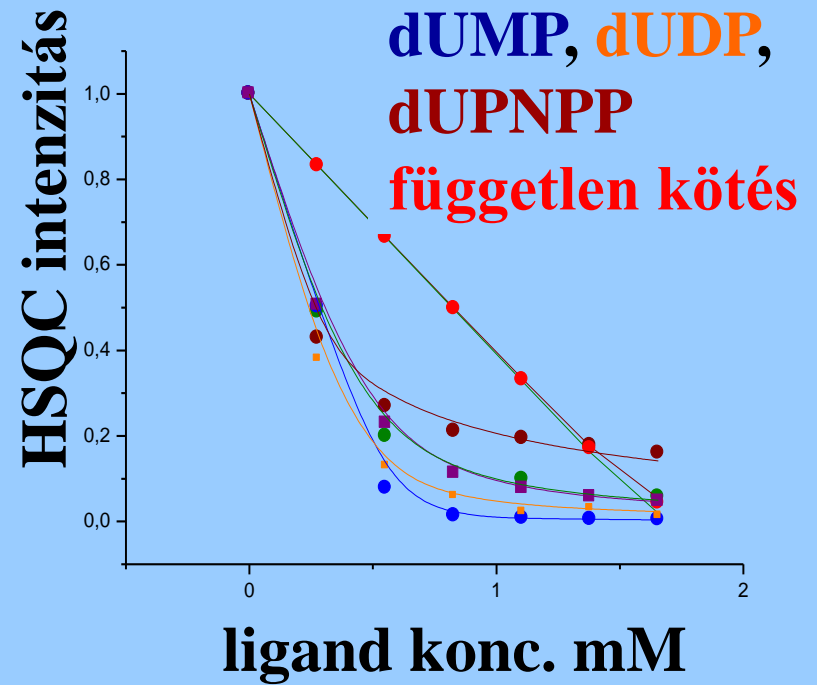
ezek a jelek eltűnnek a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrumból



# Miért volt hasznos az NMR?

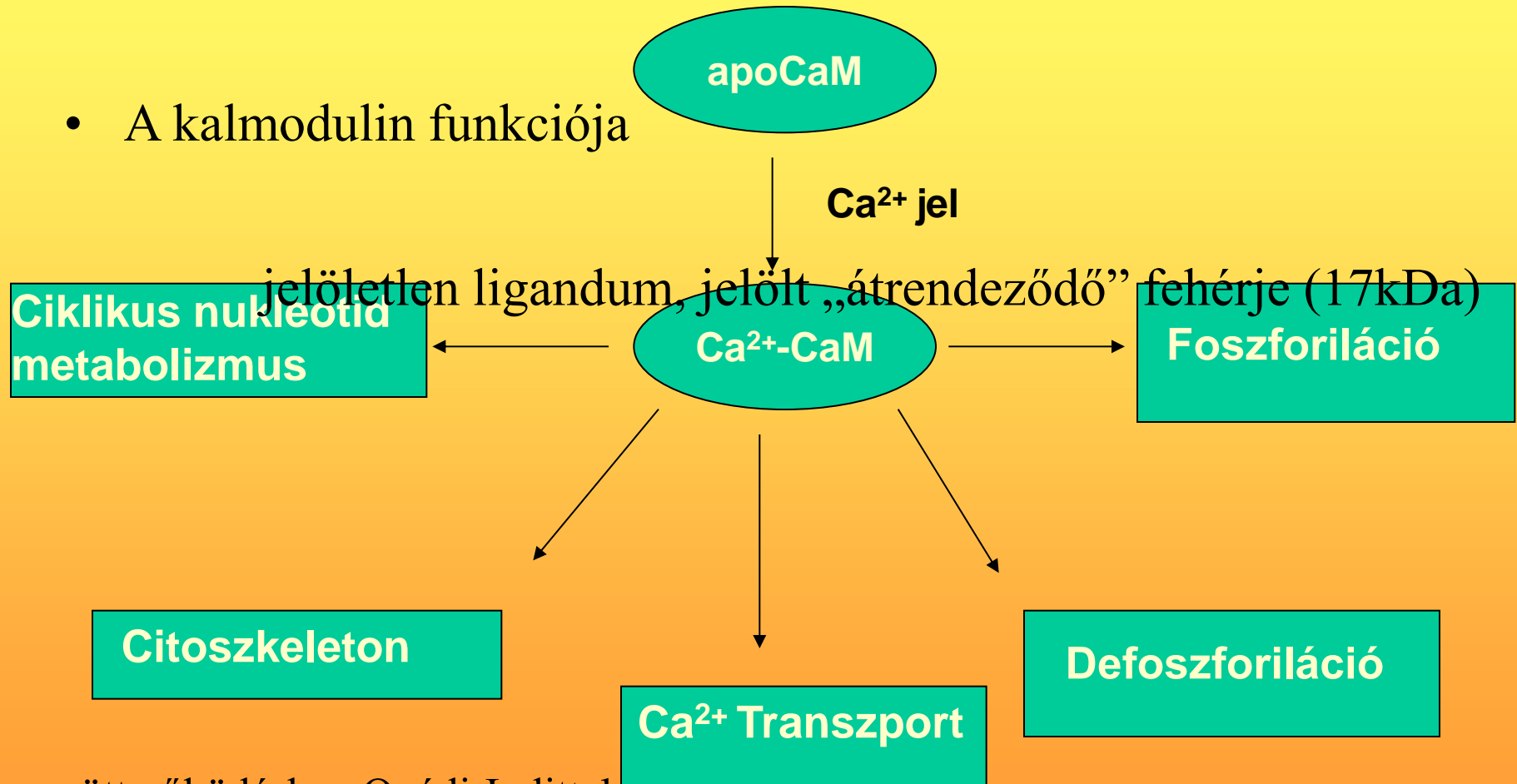


2) allosztérikus modell az eukariota dUTPáz szubsztrátkötésére



# Kalmodulin és egy vinca alkaloid analóg (KAR2) kötődésvizsgálata NMR-rel

- A kalmodulin funkciója

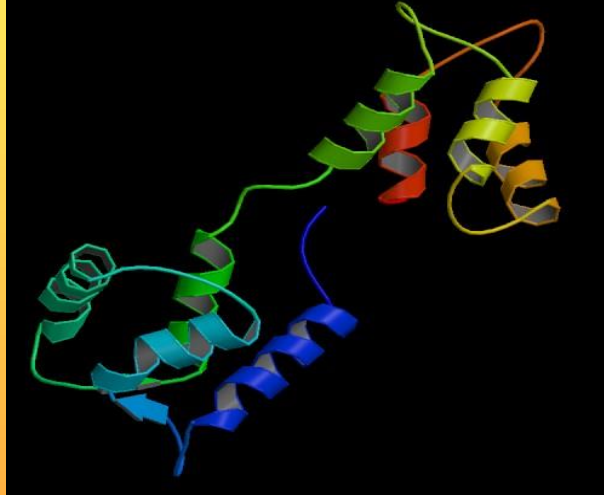


együttműködésben Ovádi Judittal  
és munkatársaival

- A kalmodulin szerkezete

**Ca<sup>2+</sup> mentes CaM**

Bax et al. *Nat.Struct.Biol.* (1995)

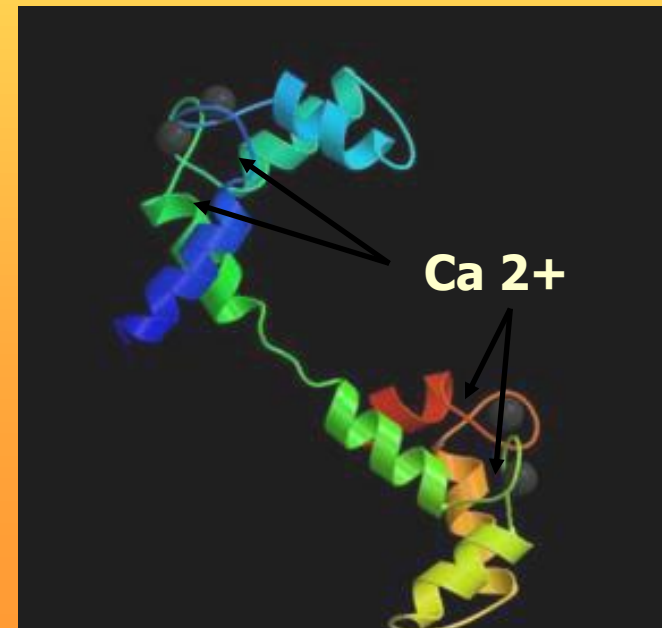


- **Ca<sup>2+</sup> hatása**

- a domének hélicei átrendeződnek
- a hidrofób régiók felszínre kerülnek



- **Ca<sup>2+</sup> kötött állapotban „súlyzó” alakú, a két globuláris domént közepén továbbra is flexibilis  $\alpha$ -hélix köti össze**

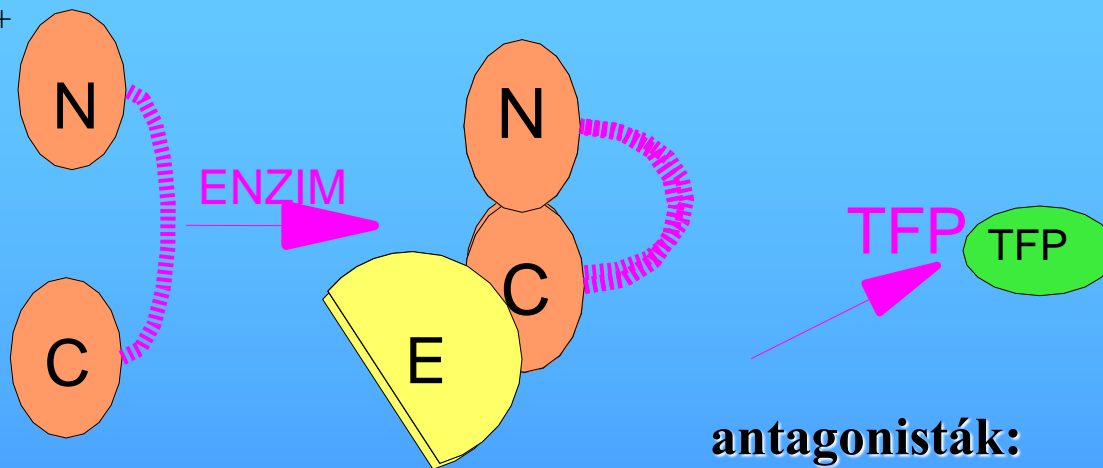


Chattopadhyaya et al. *J.Mol.Biol.* (1992)

# Kalmodulin (CaM) antagonisták tipikus hatásmodellje

kalmodulin

$4\text{Ca}^{2+}$



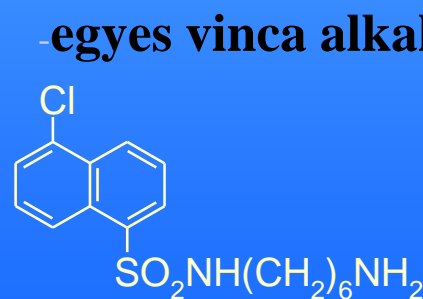
**célfehérjék:**

- foszfodiészteráz
- CaM függő kinázok
- adenilát cikláz
- foszfofruktokináz
- calcineurin
- stb.

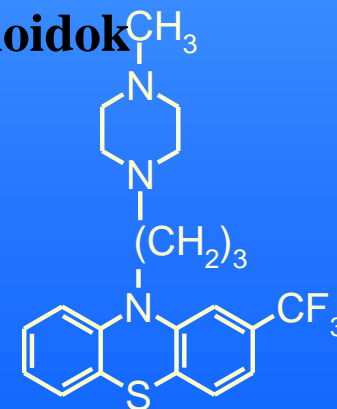
**antagonisták:**

pl.

- fenotiazinok (TFP; trifluorperazin)
- naftilszulfonamidok (W-7)
- egyes vinca alkaloidok

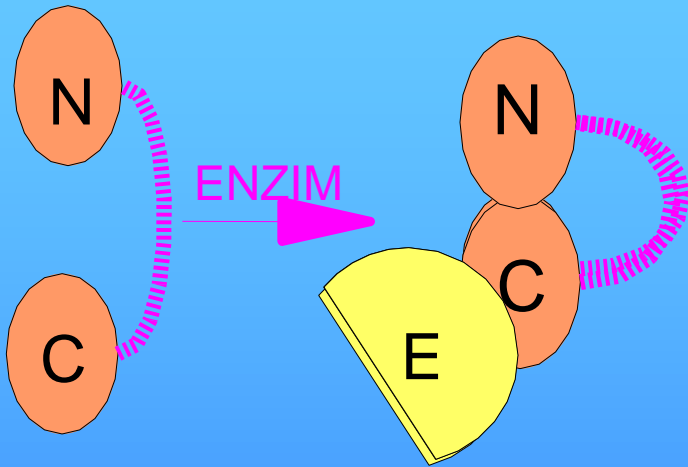


W-7



TFP

- A kalmodulin modul reorientációja célfehérje vagy antagonistá hatására



- „összecsuklik” ,
- - az N- és C-terminális közel kerül egymáshoz,
- - ám a D és az E  $\alpha$ -hélixeket összekötő részről az alacsony elektronsűrűség miatt nincs szerkezeti információ



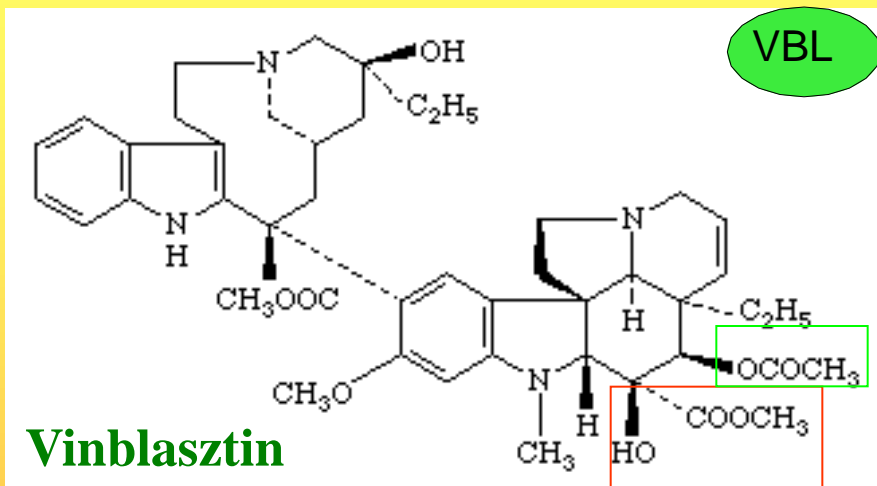
## **A komplikáció oka:**

**A célfehérje vagy antagonistá bekötése során mért kémiaieltolódás-változás eredete kettős:**

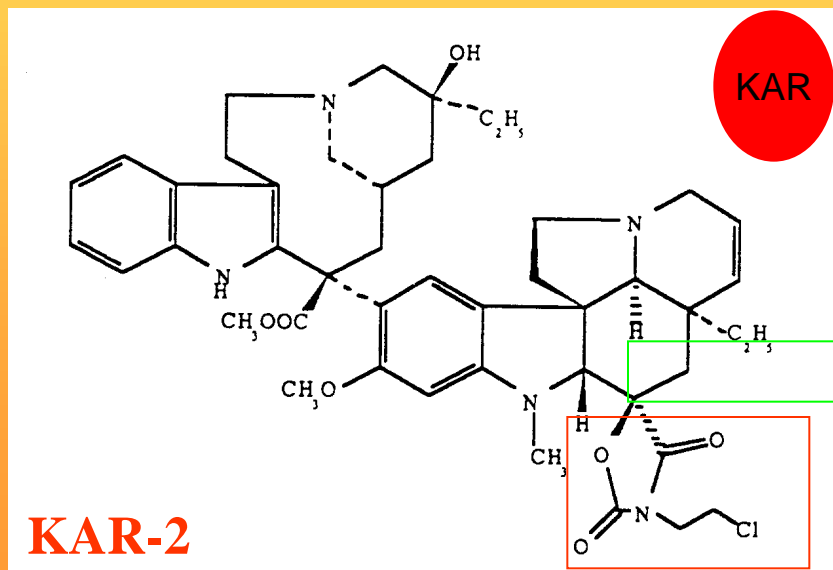
- közvetlenül a kötődés által kiváltott változás**
- modul átrendeződés (reorientáció) által kiváltott változás**

# • Vinca alkaloidok (bisindol) mint CaM antagonisták

*Catharantus (Vinca) roseus* alkaloidjai (vinblasztin, vinkrisztin)



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



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

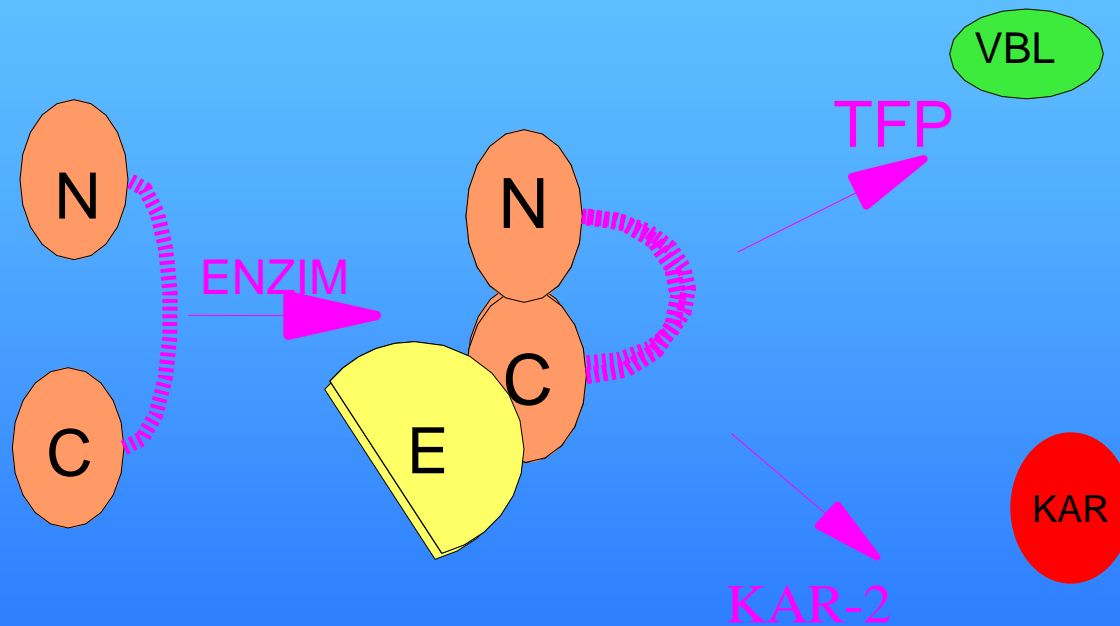
Orosz és mts. British J.Pharmacol. 1997, 121, 947

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

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



**Ezért egy új kötőhelyet feltételezhetünk a kalmodulinon.**

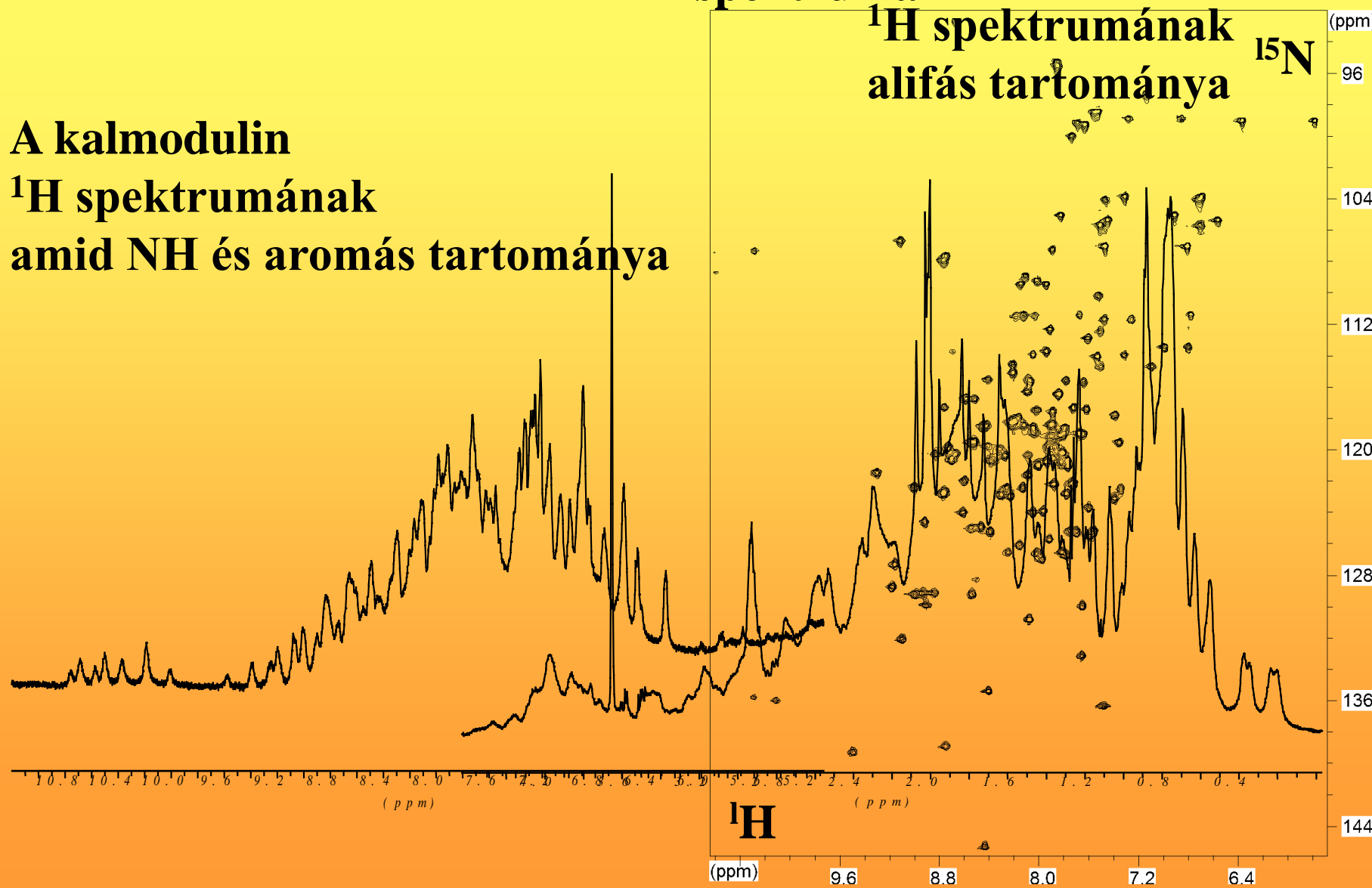


# A kalmodulin

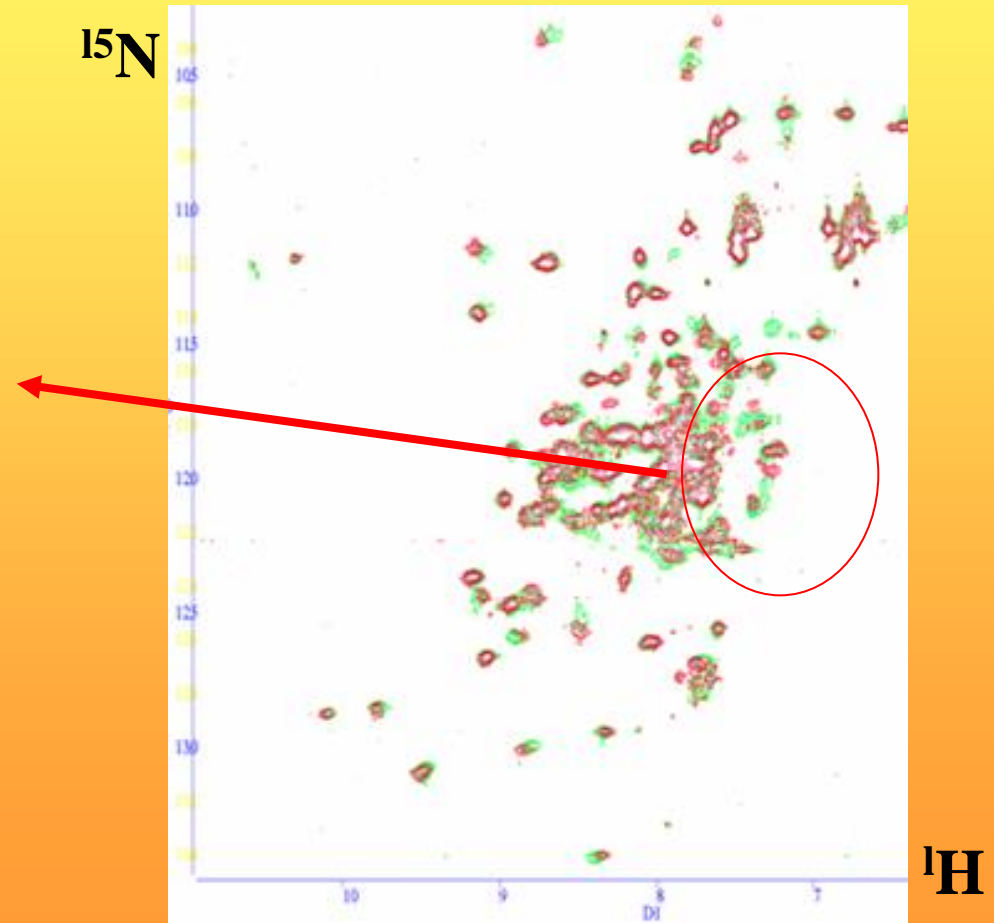
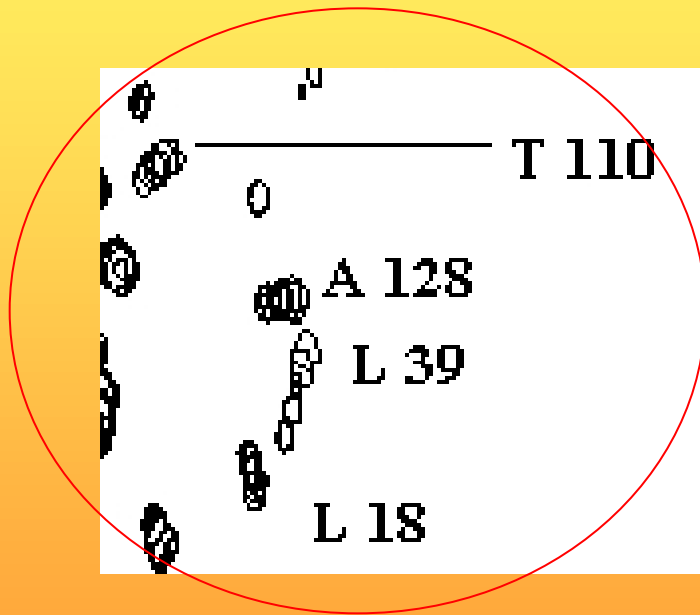
## $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC

### spektruma

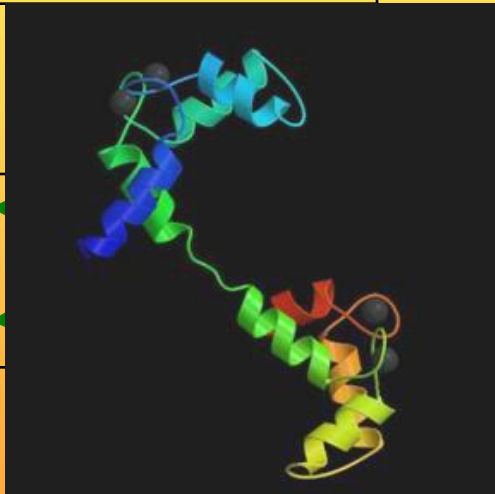
# A kalmodulin $^1\text{H}$ spektrumának amid NH és aromás tartománya

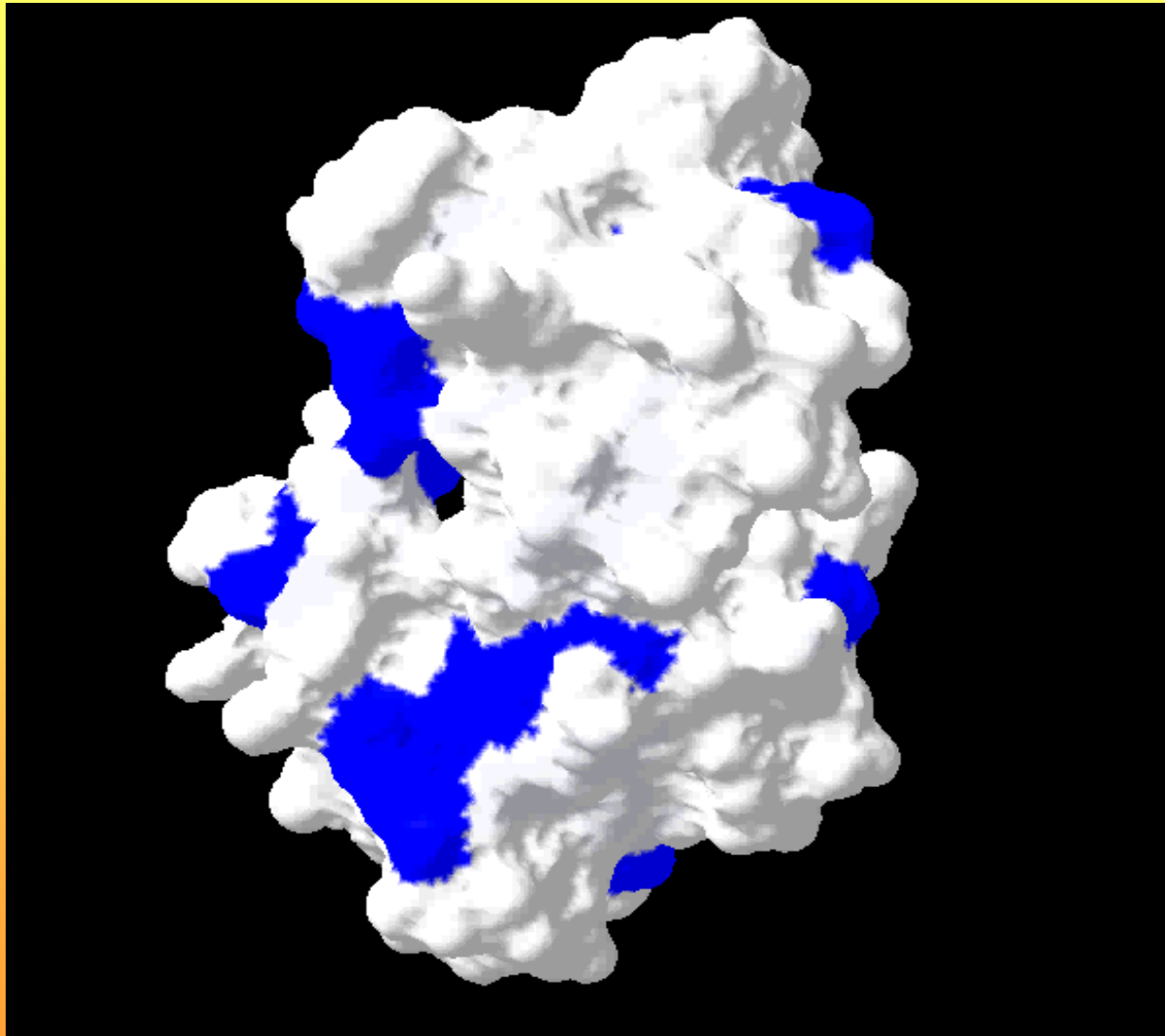


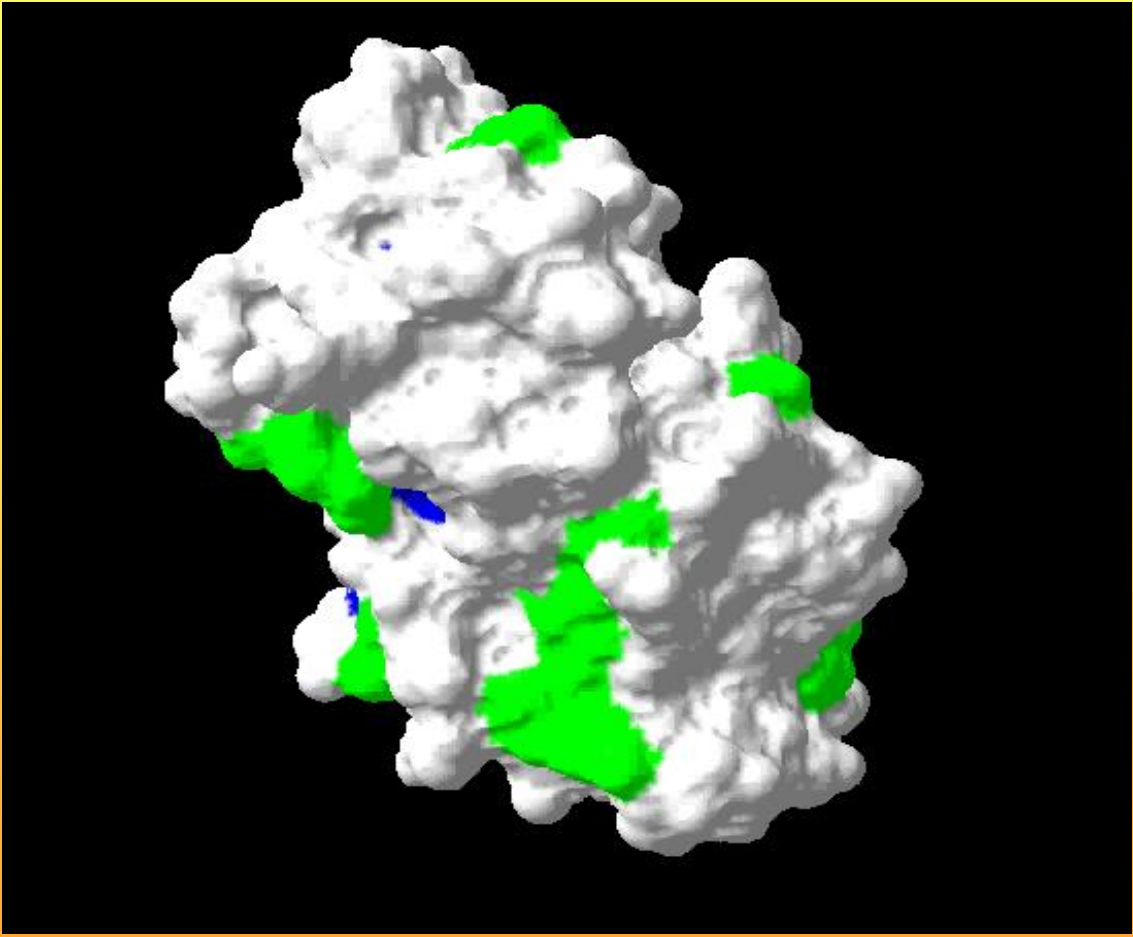
# A kalmodulin és a KAR2 titrálása során kapott $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC spektrumok összevetése



CaM másodlagos szerkezeti elemei	Röntgendiffrakciós vizsgálatokból nyert adatok		NMR-spektroszkópiai adatok
	Aminosavak, amelyek környezete megváltozik az alegységek átrendeződése miatt	Aminosavak, amelyek a KAR2 közvetlen szomszédjai	Aminosavak, amelyek KAR2 megkötése során jelentős kémiaieltolódás-változást mutatnak
<b>A hélix</b>	14 Glu 18 Leu	15 Ala 18 Leu 19 Phe	<u>15 Ala</u> 16 Phe <u>18 Leu</u>
<b>B és C hélix közti hurok</b>	40 Gly 41 Gln 42 Asn,	39 Leu, 41 Gln 68 Phe 71 Met 72 Met	21 Lys, 27 Ile, 32 Leu 36 Met <u>39 Leu</u> <u>40 Gly</u>
<b>E hélix</b>	81 Ser 84 Glu 87 Glu 91 Val	80 Ala 84 Ile 85 Ile 88 Ala	53 Asn <u>81 Ser</u> <u>91 Val</u> 92 Phe 94 Lys
<b>F és G hélix közti hurok</b>	112 Leu 114 Glu	109 Met 112 Leu 114 Glu 116 Leu 124 Met, 144 Met 145 Met 147 Ala 148 Lys	110 Thr <u>114 Glu</u> 129 Asp 130 Ile 136 Val 137 Asp







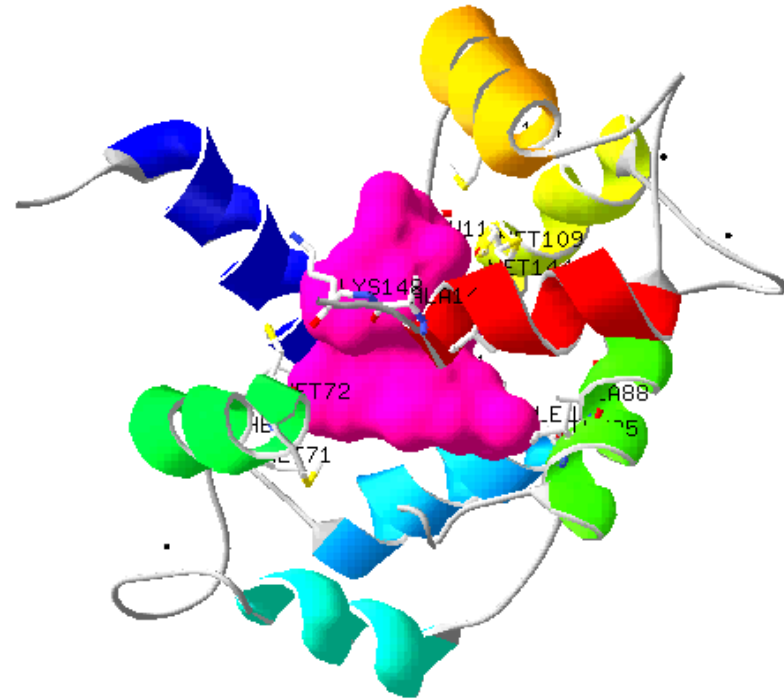
# Miért volt hasznos az NMR?

1) Megállapítottuk, hogy a ligandkötődés az NMR időskálán gyors.

2) Behatároltuk a kalmodulin KAR2 kötésében részt vevő aminosavak jelentős részét.

3) Összhangban a krisztallográfiai adatokkal, egy új kötőhelyet azonosítottunk a kalmodulinon.

4) Igazoltuk, hogy a röntgen szerkezet és az oldatfázisú szerkezet igen hasonló lehet.



Legyen a komplexképződés sebességi együtthatója  $k$   
( $k_{-1} = k_{+1}$  legyen egyforma)

A csere L és EL állapotok között akkor lassú,  
ha:  $k \ll 2\pi |v_L - v_{EL}|$

A csere L és EL állapotok között akkor gyors,  
ha:  $k \gg 2\pi |v_L - v_{EL}|$

Ha pl.  $|v_L - v_{EL}| = 2\text{kHz}$ , akkor  $k \gg 1,3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$