



KÖLCSÖNHATÁS ÉS DINAMIKA

az NMR spektroszkópia, mint a modern szem



Bodor Andrea



ELTE

Szerkezeti Kémiai és Biológiai Laboratórium



Edvard Munch: A Nap (1911-1916)



AZ ELEKTROMÁGNESES SUGÁRZÁS

hullámhossz:

1nm

1 μ m

1mm

1m

1km

frekvencia:

10¹⁸

10¹⁵

10¹²

10⁹

10⁶

1GHz

1MHz

energia: ←

γ - sugarak	X- sugarak	UV	IR	távoli IR	mikro- hullámok	rádió- hullámok
-----------------------	---------------	----	----	--------------	--------------------	--------------------

<i>mag</i> <i>átmenetek</i>	<i>belső</i> <i>elektronok</i>	<i>külső</i> <i>elektronok</i>	<i>rezgések</i> <i>forgások</i>	<i>e⁻ - mágneses</i> <i>átmenetek</i>	<i>mag - mágneses</i> <i>átmenetek</i>
--------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------	------------------------------------	---	---

Mössbauer

Optikai
spektroszkópia

ESR

NMR



AZ NMR SPEKTROSZKÓPIA ÉS A PERIÓDUSOS RENDSZER

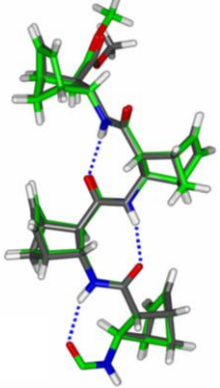
Group	I	II	IIIa	IVa	Va	VIa	VIIa	VIIIa	VIIIb	VIIIc	IB	IIB	III	IV	V	VI	VII	VIII	
Period																			
1	1 H																	2 He	
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne	
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar	
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr	
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe	
6	55 Cs	56 Ba	*	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra	**	103 Lr	104 Unq	105 Unp	106 Unh	107 Uns	108 Uno	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
*Lanthanides			*	57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb		
**Actinides			**	89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No		

Nuclear Spins 1/2 1 3/2 5/2 7/2 9/2



ALKALMAZÁSI TERÜLETEK

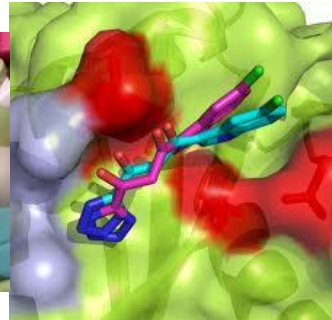
Kémia:
szerkezet, konformáció



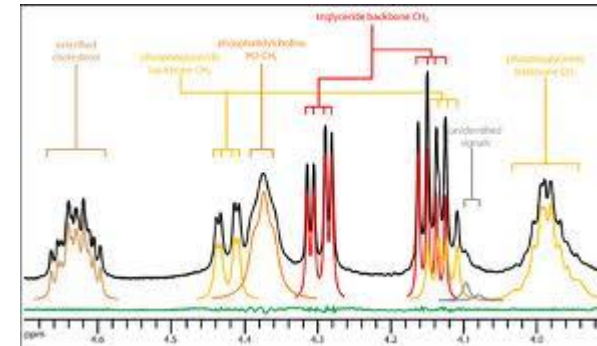
Analitika:
eredet, minőség



Gyógyszer kutatás



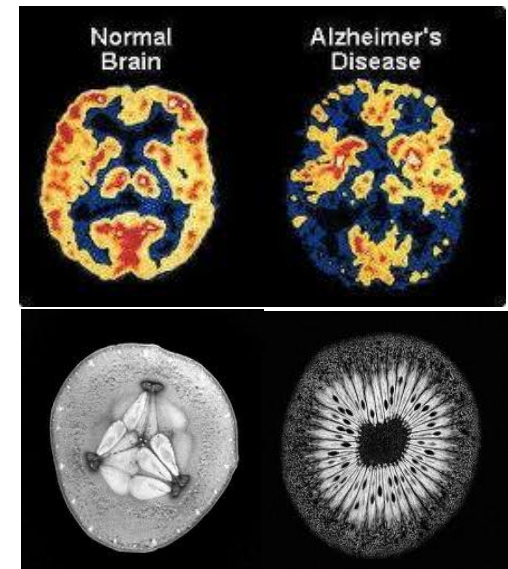
-omika:
metabolomika



Szerkezeti biológia
dinamika



MRI





AZ NMR SPEKTROSZKÓPIA A BIOLÓGIAI RENDSZEREK SZOLGÁLATÁBAN

OLDAT

fiziológias körülmények
pH, ionkoncentráció,
(NaCl, Mg²⁺, Ca²⁺)
hőmérséklet, ...



nem invazív módon:
atomi szintű információ

Fehérje szerkezet:
feltekeredés –
letekeredés
denaturáló közegek
(8M urea, 6M GdCl)

FUNKCIÓ

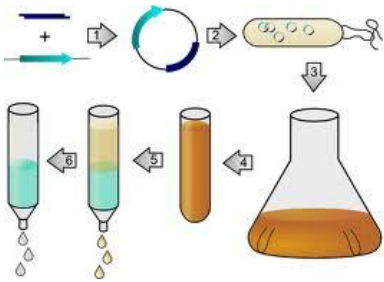
Fehérje dinamika:
ps – 10³ s skálán
szerteágazó mozgások



AZ NMR MINTA

A maximális mérettartomány: kb. 255 kDa

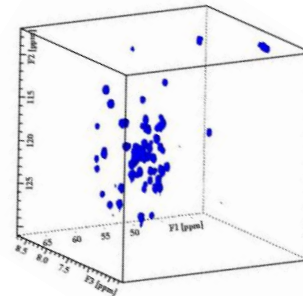
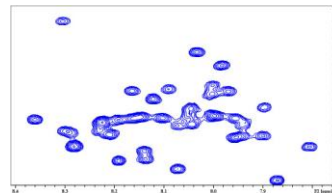
Izotóp jelölés:
fehérje expresszió
 ^{13}C , ^{15}N , ^2D jelölés



Térerő:
11,7 – 23,5 T
500 MHz – 1GHz

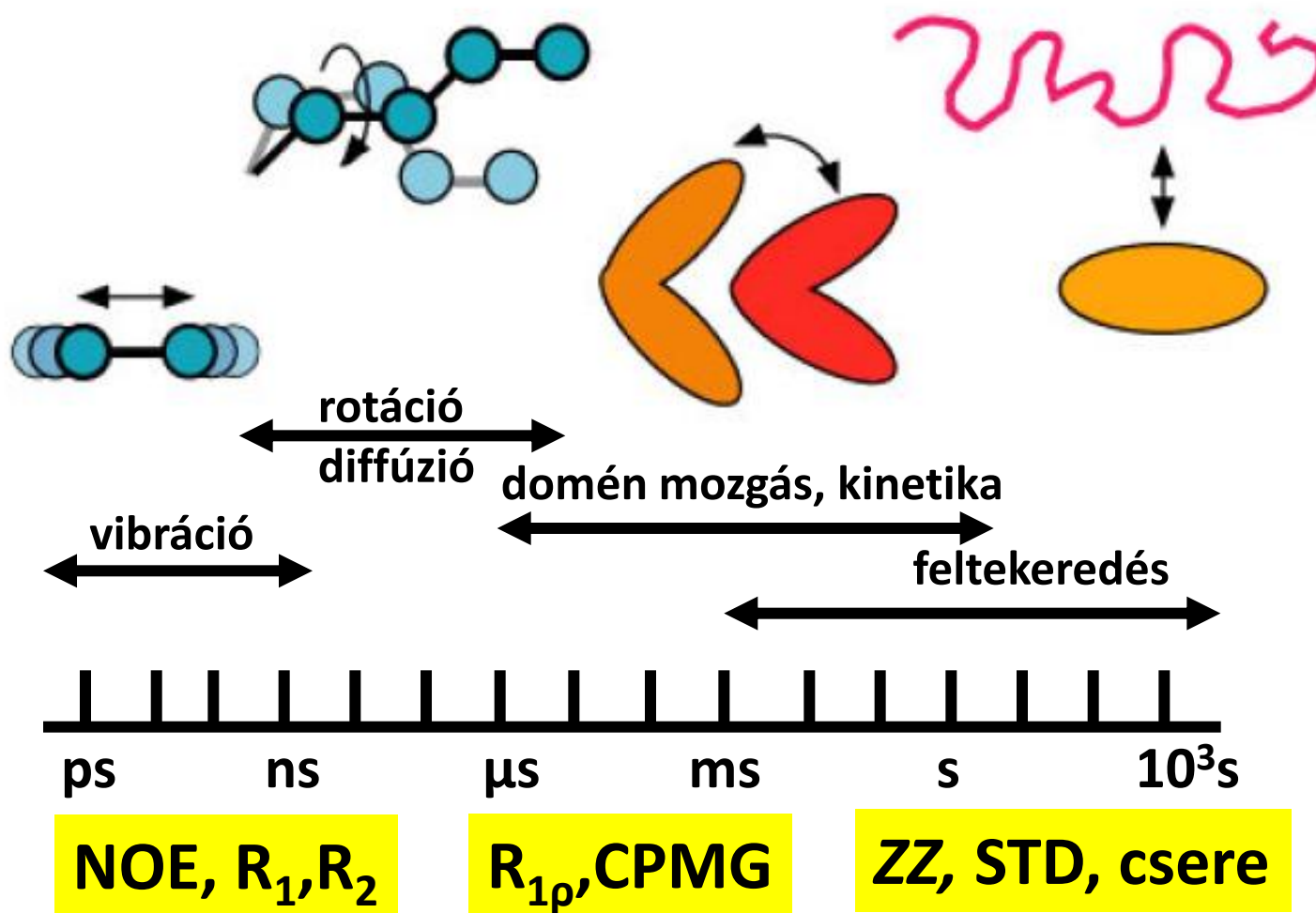
Egyéb NMR aktív magok:
 ^{31}P , ^{19}F szelektív jelölés,
...

Mérések:
2D, 3D, nD





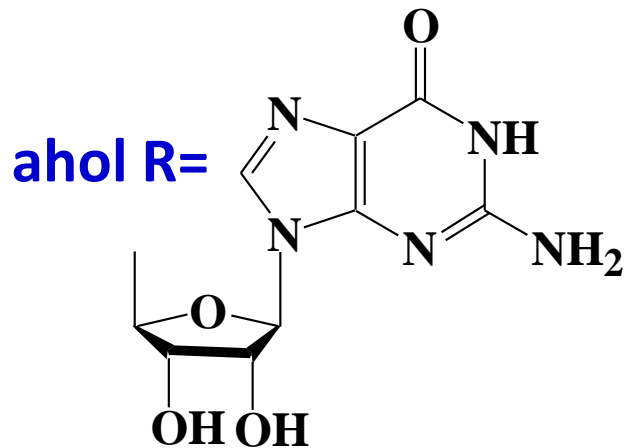
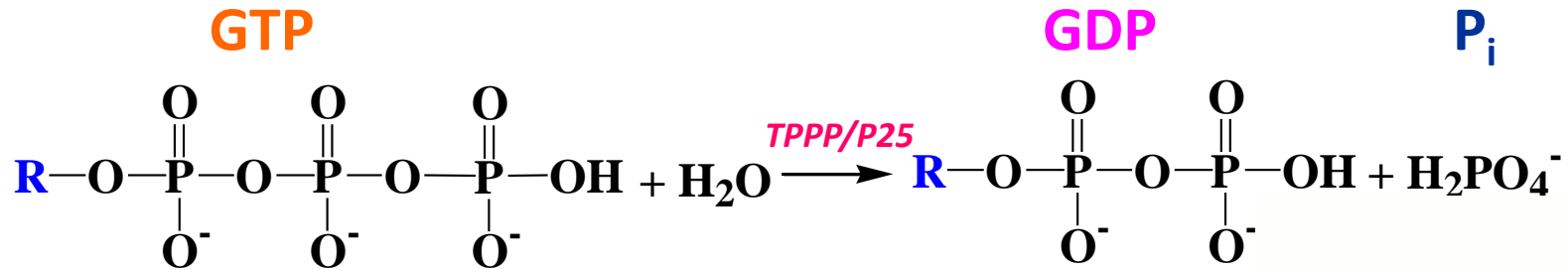
AZ NMR IDŐSKÁLA



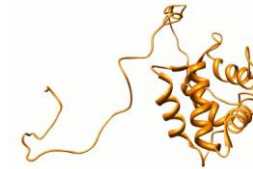


I) KÉMIAI KINETIKA

Enzim-katalizált foszfoészter kötés hidrolízise



TPPP/p25:

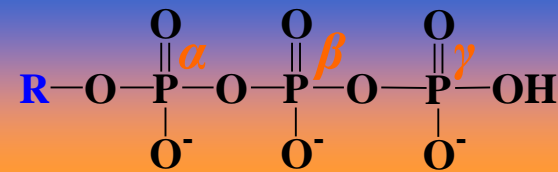


p20
(2JRF.pdb)

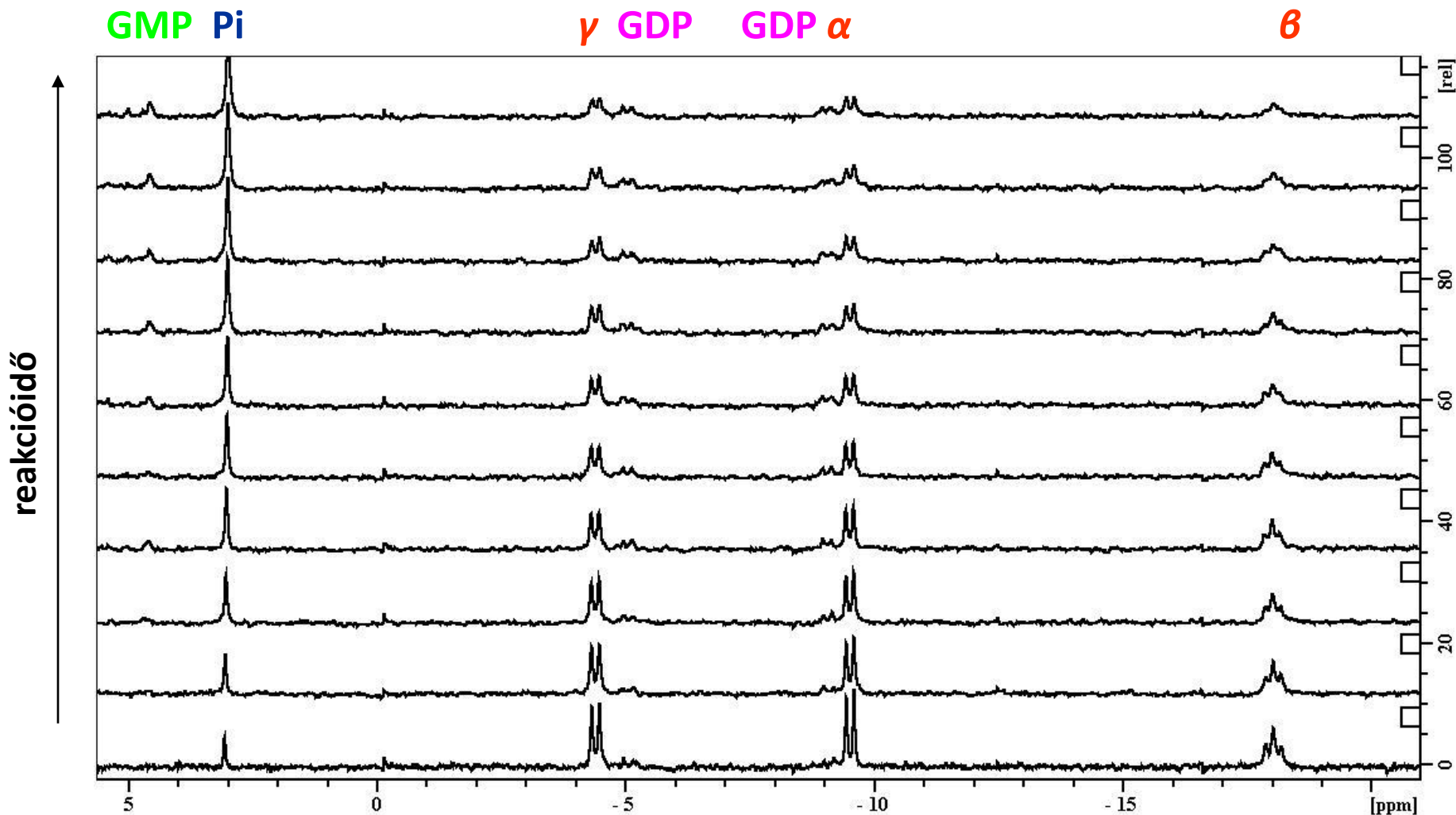
- Tubulin Polimerization Promoting Protein
- 219 aminosav
- rendezett és rendezetlen részek
- Zn²⁺ kötő helyek
- GTP kötő helyek
- GTPáz aktivitás



I) KÉMIAI KINETIKA



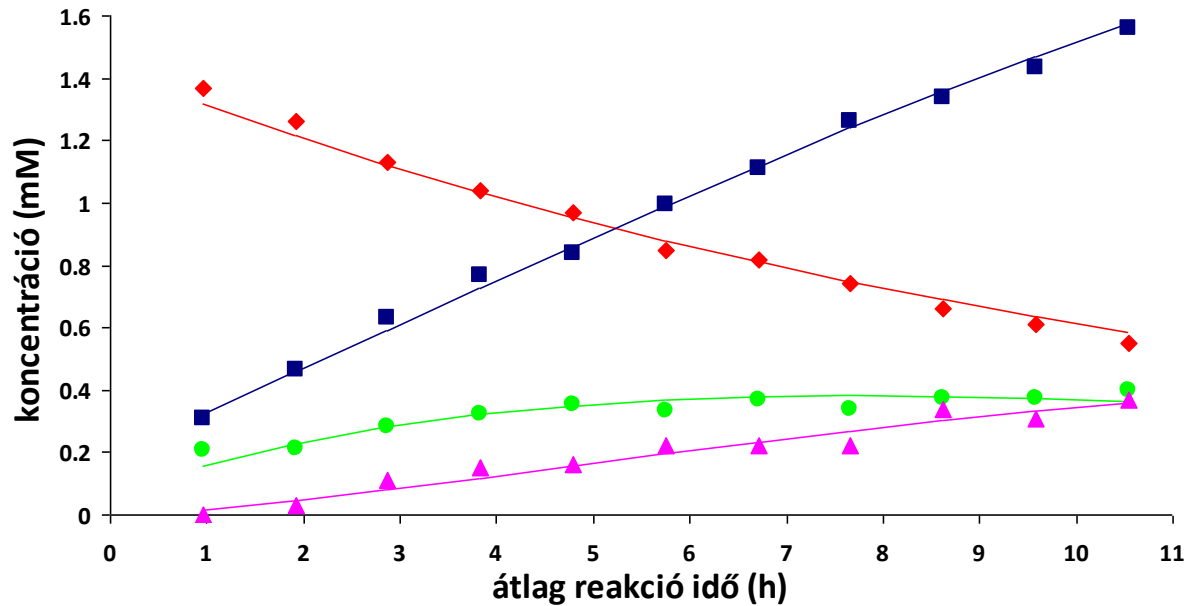
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR, 250 MHz



200 μM TRPP/p25; 1,36 mM GTP; 4,0 mM Mg^{2+} ; 50 mM Tris; pH= 7,0; 300 K



I) KÉMIAI KINETIKA



$$k_1 = 0.093 \pm 0.001 \text{ mM h}^{-1}$$



$$k_2 = 0.178 \pm 0.009 \text{ mM h}^{-1}$$



$$k_3 = 0.119 \pm 0.019 \text{ mM h}^{-1}$$



I) KÉMIAI KINETIKA

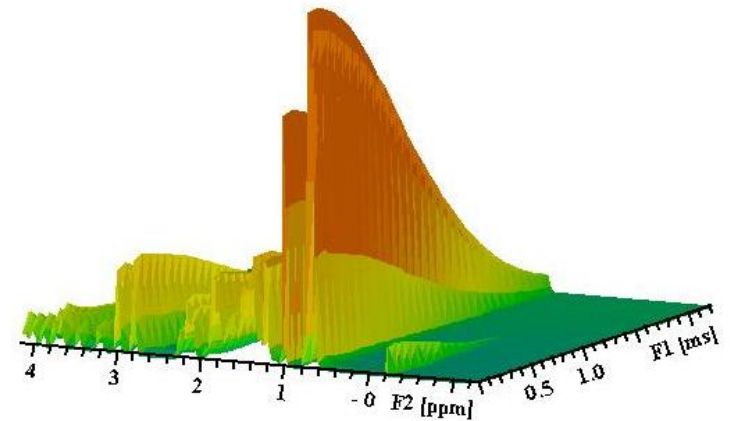
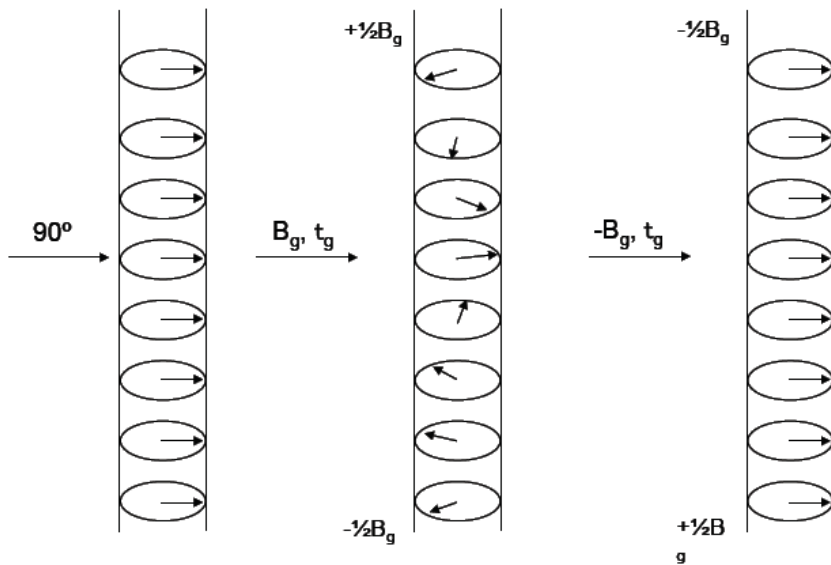
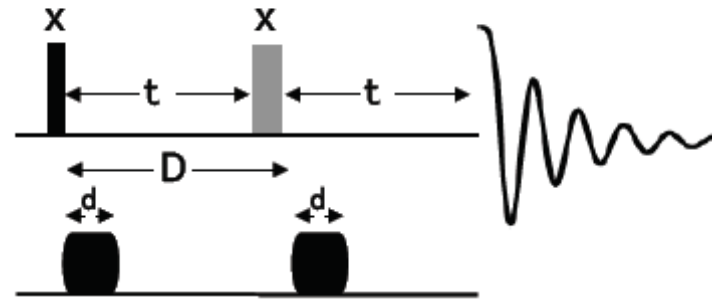
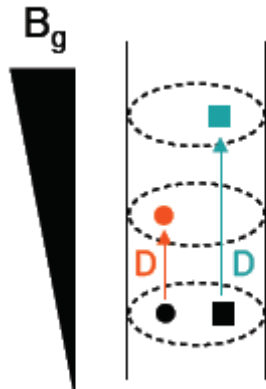
KÖLCSÖNHATÁS - FUNKCIÓ

Fehérje	k_{cat} (min ⁻¹)
Rac1	0.11
H-Ras	0.028
Rap1A	0.0031
Ran	0.0032
TPPP/p25	0.0155 NMR 0.018 malachitzöld

- a TPPP/p25 GTPáz aktivitása: a kis G fehérjék aktivitásához hasonló
- ³¹P NMR mérések: a reakció teljes útvonala
sebességi állandók meghatározása



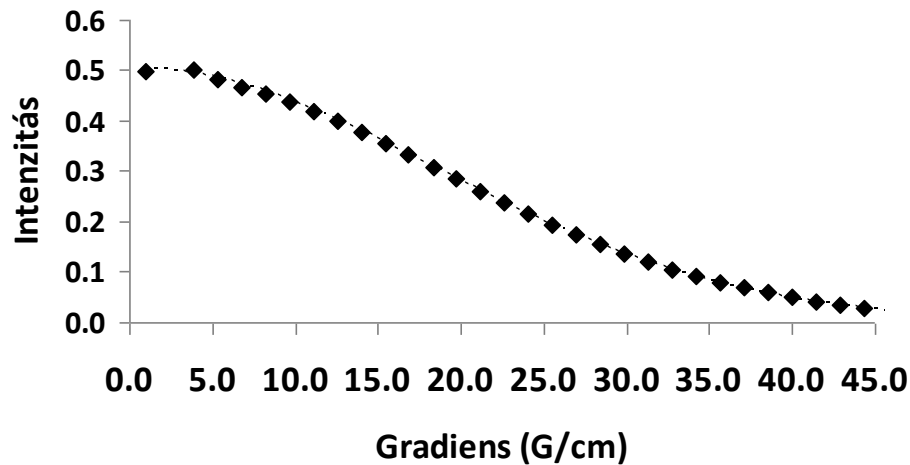
II) TRANSZLÁCIÓS DIFFÚZIÓ





II) TRANSZLÁCIÓS DIFFÚZIÓ

$$I = I(0) \exp[-D (2 \pi \gamma G_i \delta)^2 (\Delta - \delta/3)]$$



Stokes – Einstein:

$$r_H = kT / 6 \pi \eta D$$



II) TRANSZLÁCIÓS DIFFÚZIÓ

Rendezetlen fehérjék (IUP, IDP)

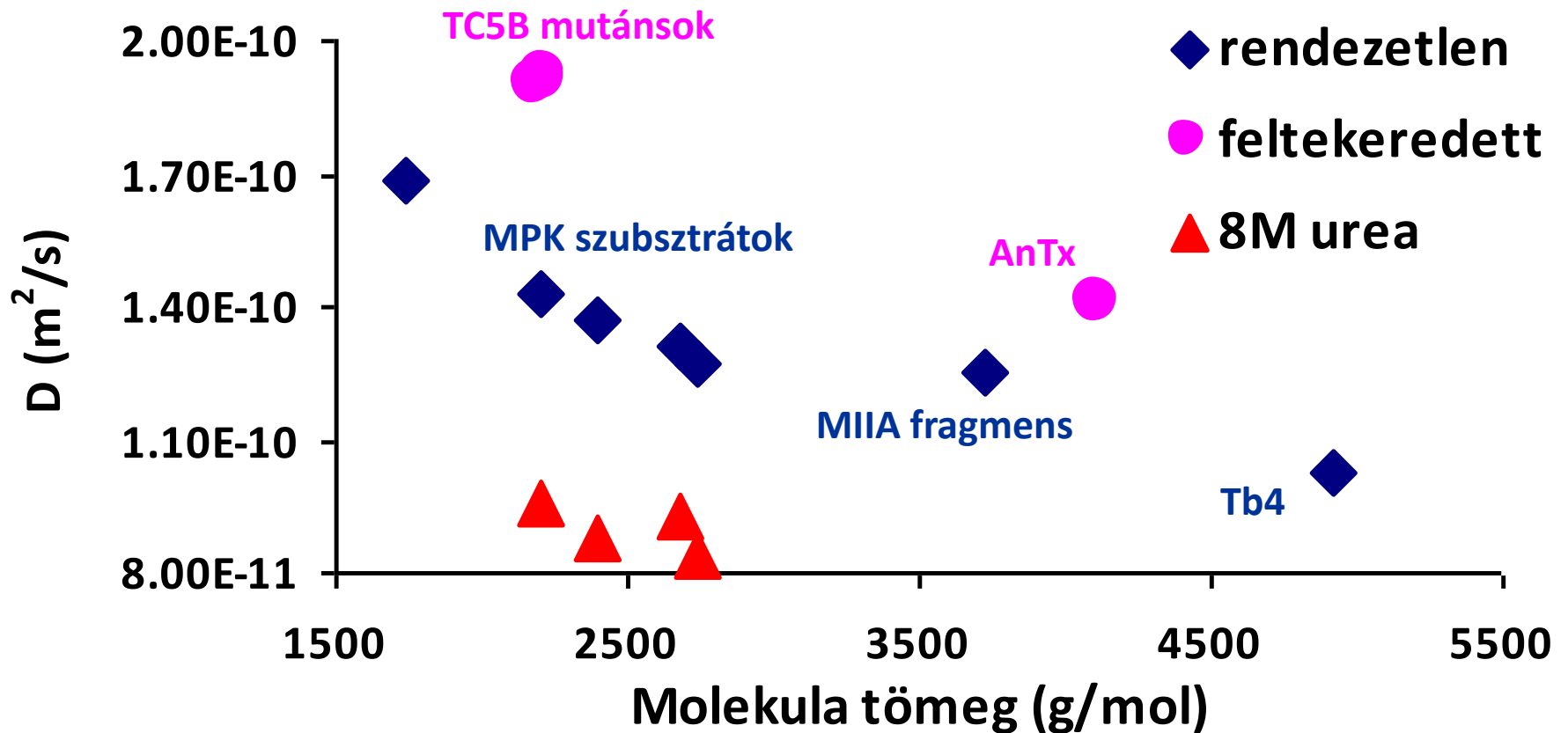
Más módszerekkel nehezen tanulmányozhatók

Szerkezeti vonások: NMR

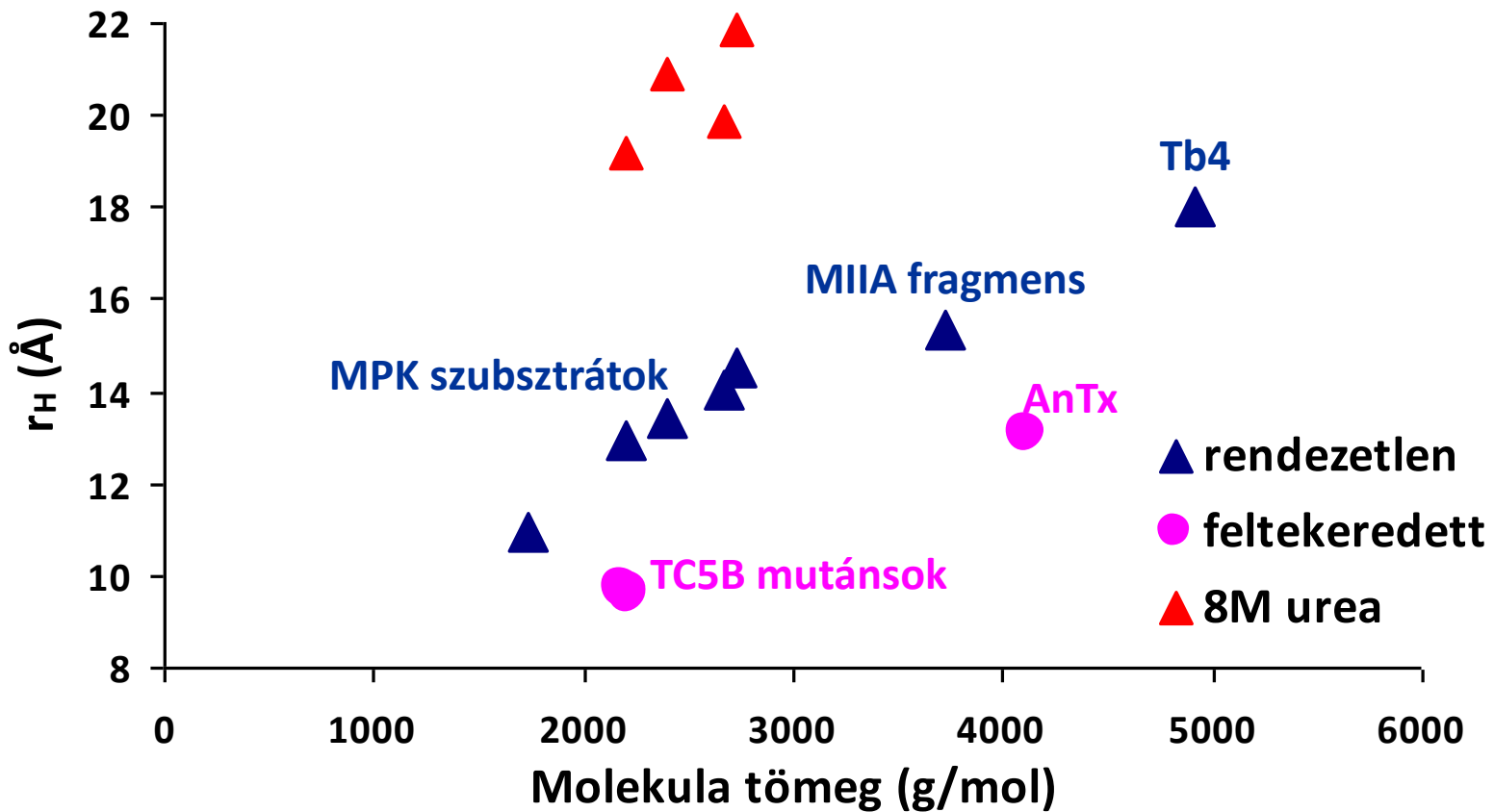
- kémiai eltolódás
- hidrodinamikai sugár

**RENDEZETLEN – DENATURÁLT – FELTEKEREDETT
FEHÉRJÉK HIDRODINAMIKAI SUGARA?**

II) TRANSZLÁCIÓS DIFFÚZIÓ



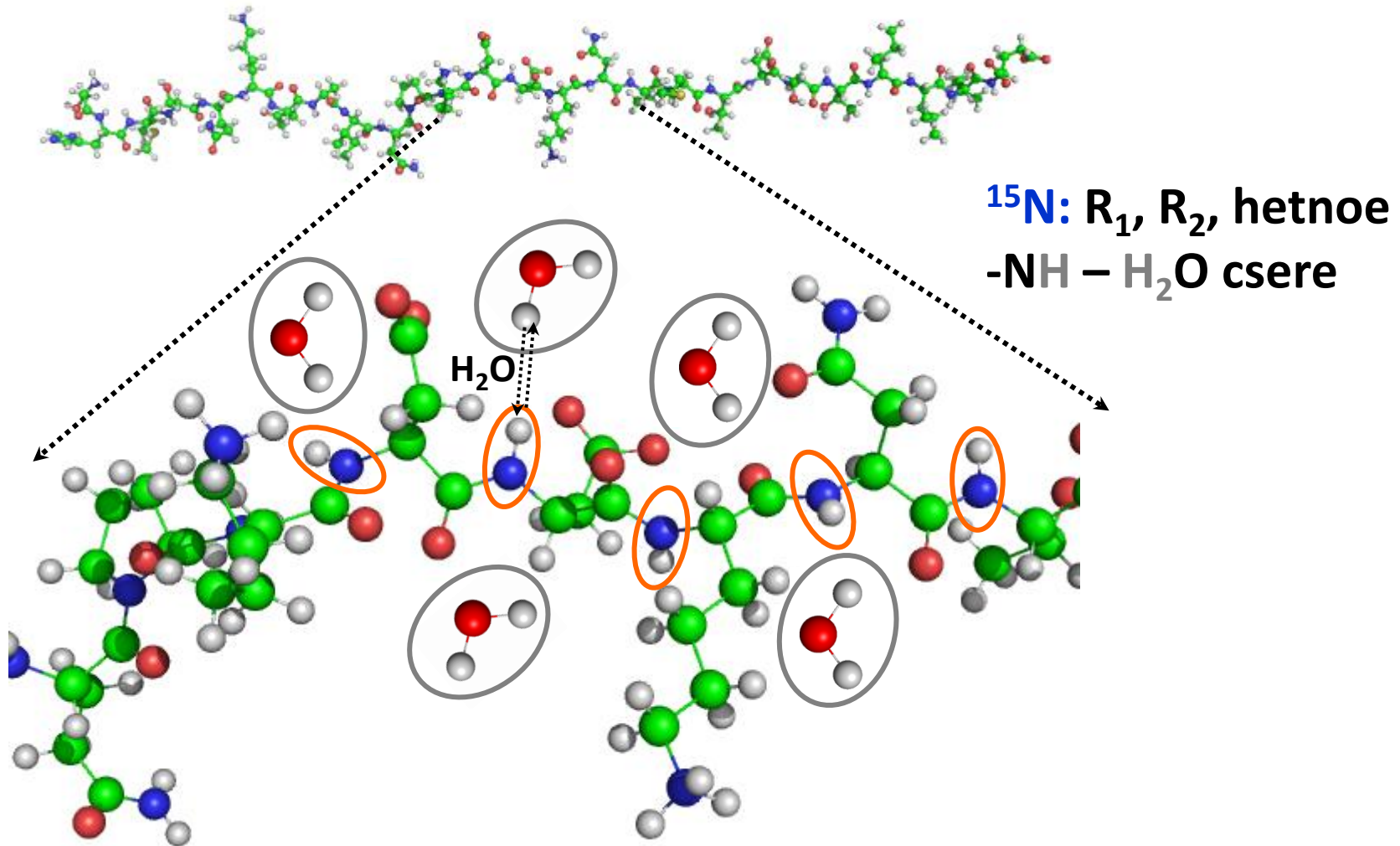
II) TRANSZLÁCIÓS DIFFÚZIÓ



$^1\text{H NMR}$: r_H denaturált $>$ r_H rendezetlen $>$ r_H feltekeredett



III) A PEPTID GERINC DINAMIKÁJA





A molekulák oldatbeli ún. ‘bukdácsoló’ mozgása τ_c rotációs korrelációs idővel jellemezhető.

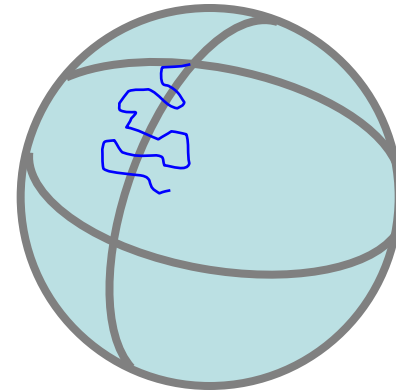
$1/\tau_c$ – rotációs frekvencia

$J(\omega)$ - spektrális sűrűség függvény:

$$J(\omega) = 2 \tau_c / [1 + (\omega\tau_c)^2]$$

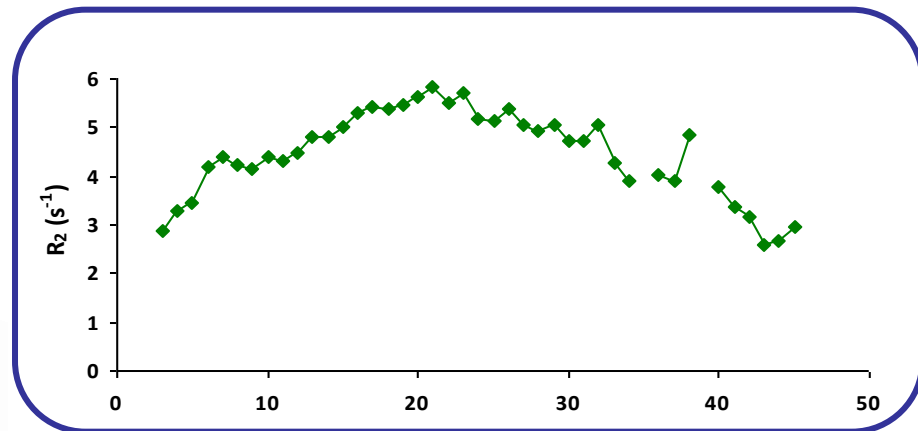
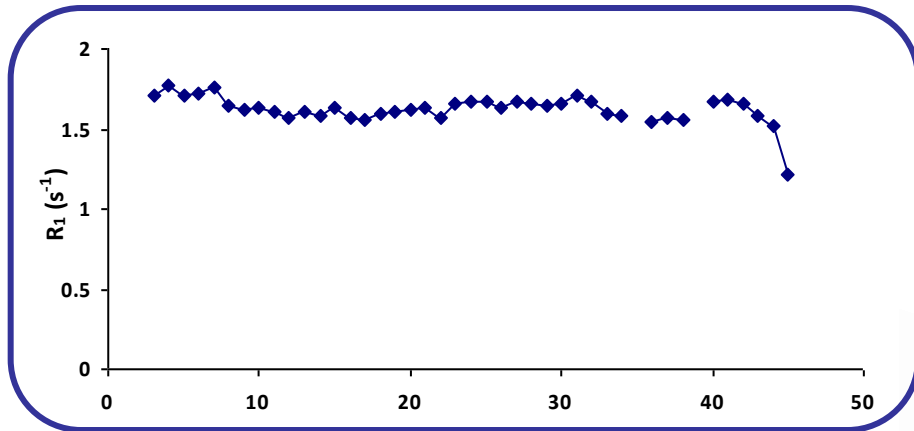
Mért dinamikai paraméterek:

$$R_1, R_2, \text{hetnoe} = f [J(0), J(\omega_N), J(\omega_H)]$$

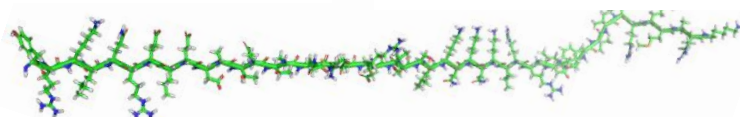




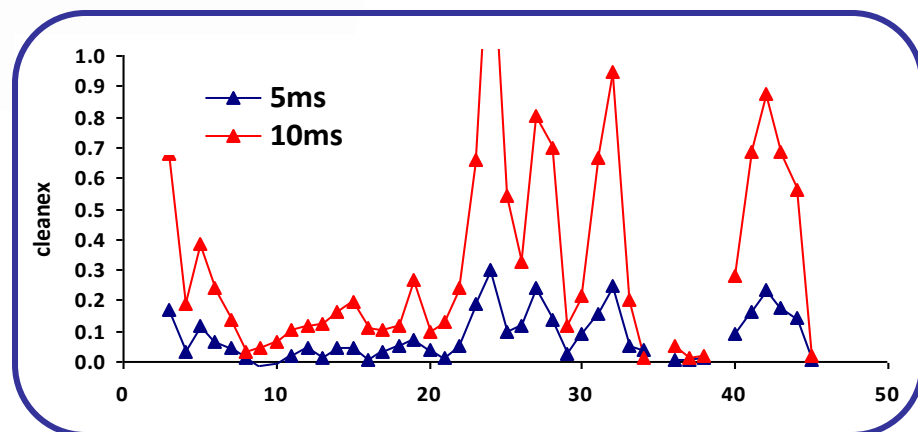
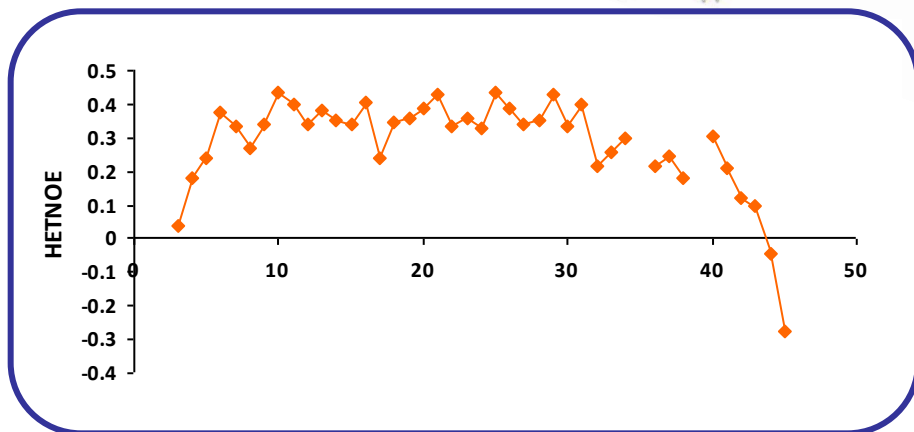
III) A PEPTID GERINC DINAMIKÁJA



MIIA:



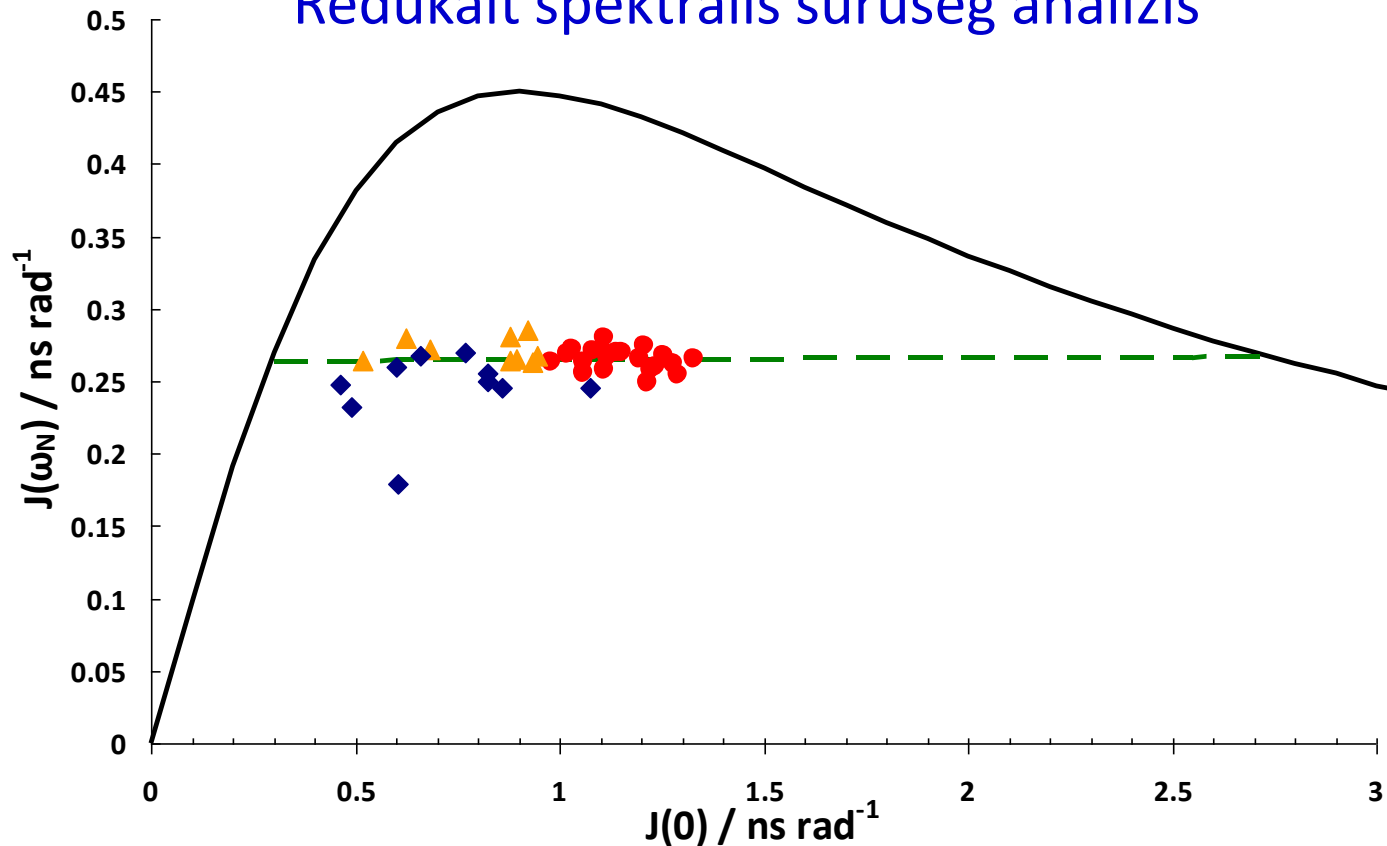
45 aminosav hosszú IUP





III) A PEPTID GERINC DINAMIKÁJA

Redukált spektrális sűrűség analízis

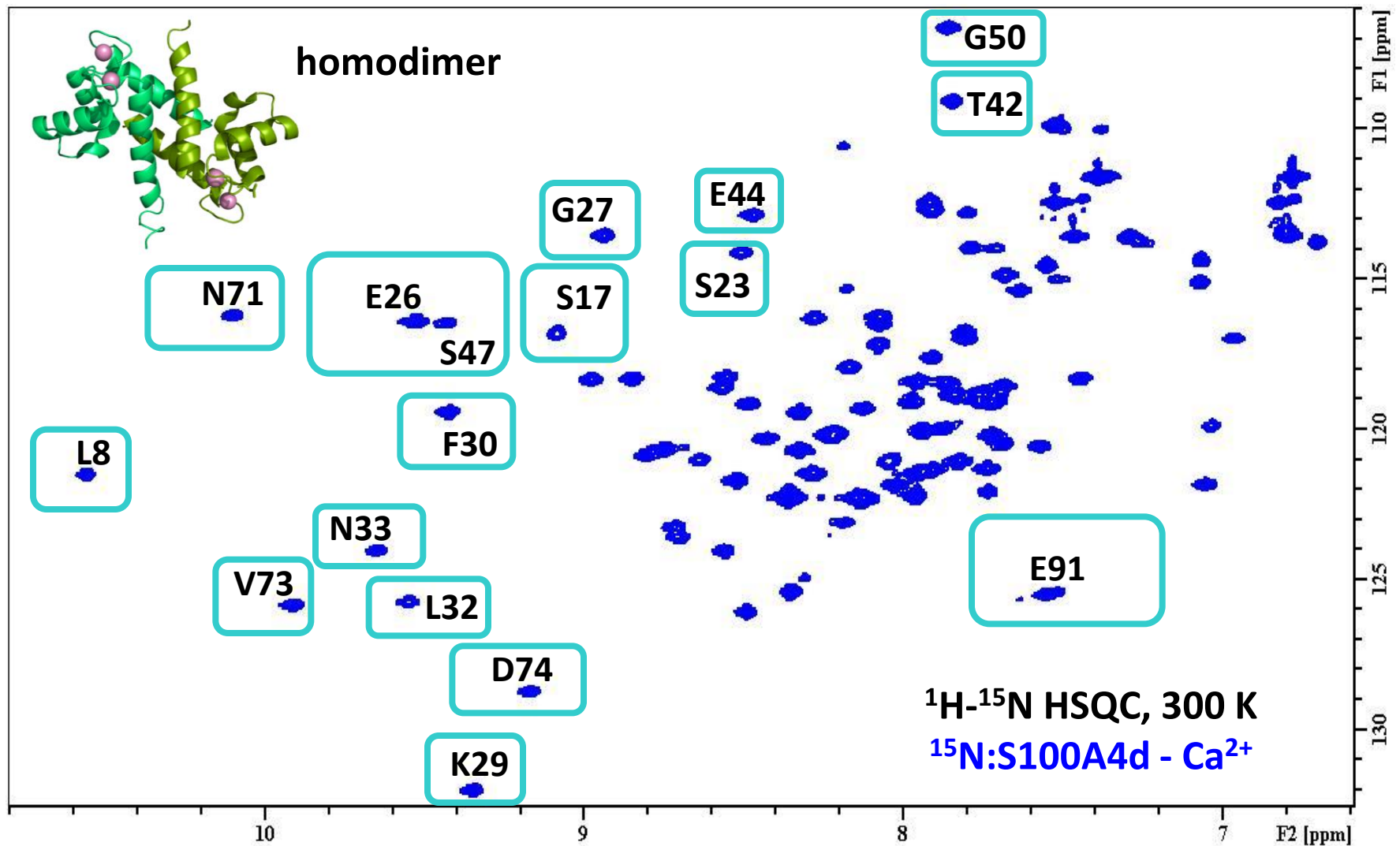


Középső régió: legkevésbé mozgékony, inherens helicitás

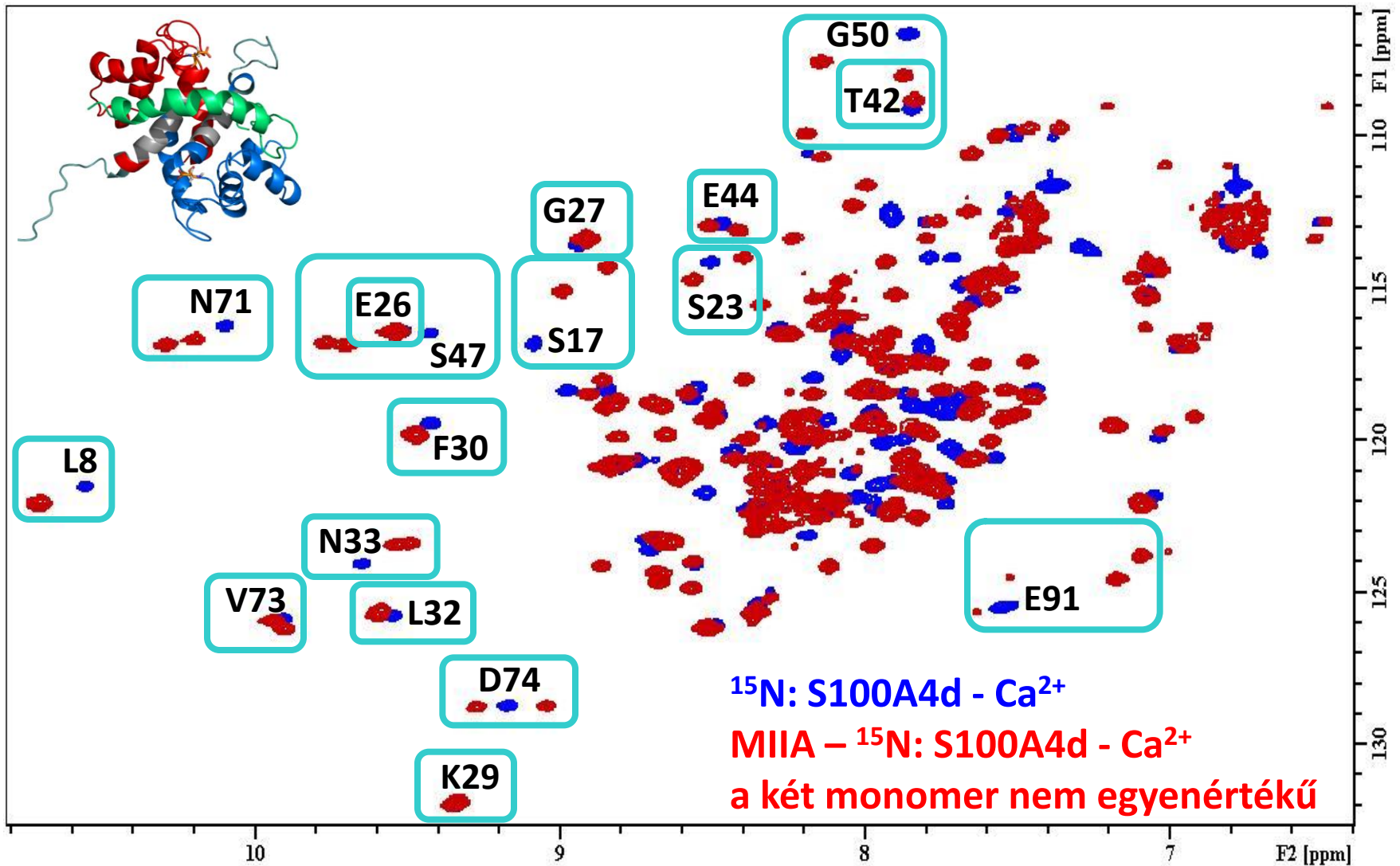
N-terminus: K3-D11

C-terminus: D33-K45

KÖLCSÖNHATÁS - SZERKEZET



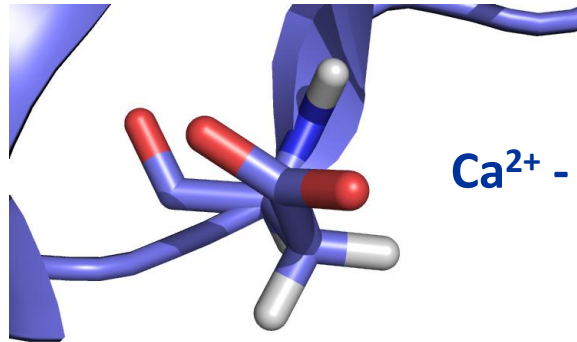
KÖLCSÖNHATÁS - SZERKEZET





KÖLCSÖNHATÁS - SZERKEZET

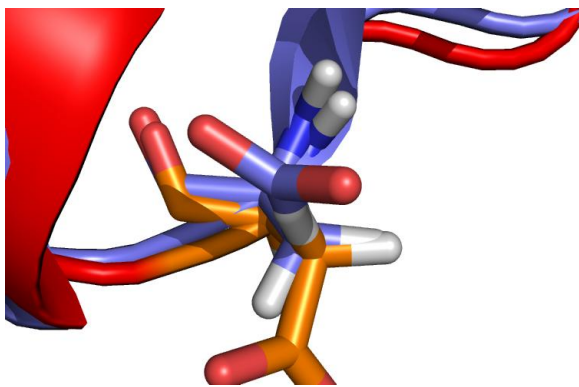
D74



Ca²⁺ - S100A4

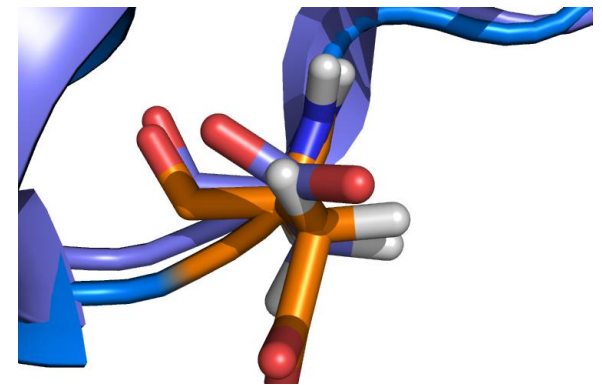
Ca²⁺ - S100A4 - MIIA- A

Ca²⁺ - S100A4



Ca²⁺ - S100A4 - MIIA- A

Ca²⁺ - S100A4

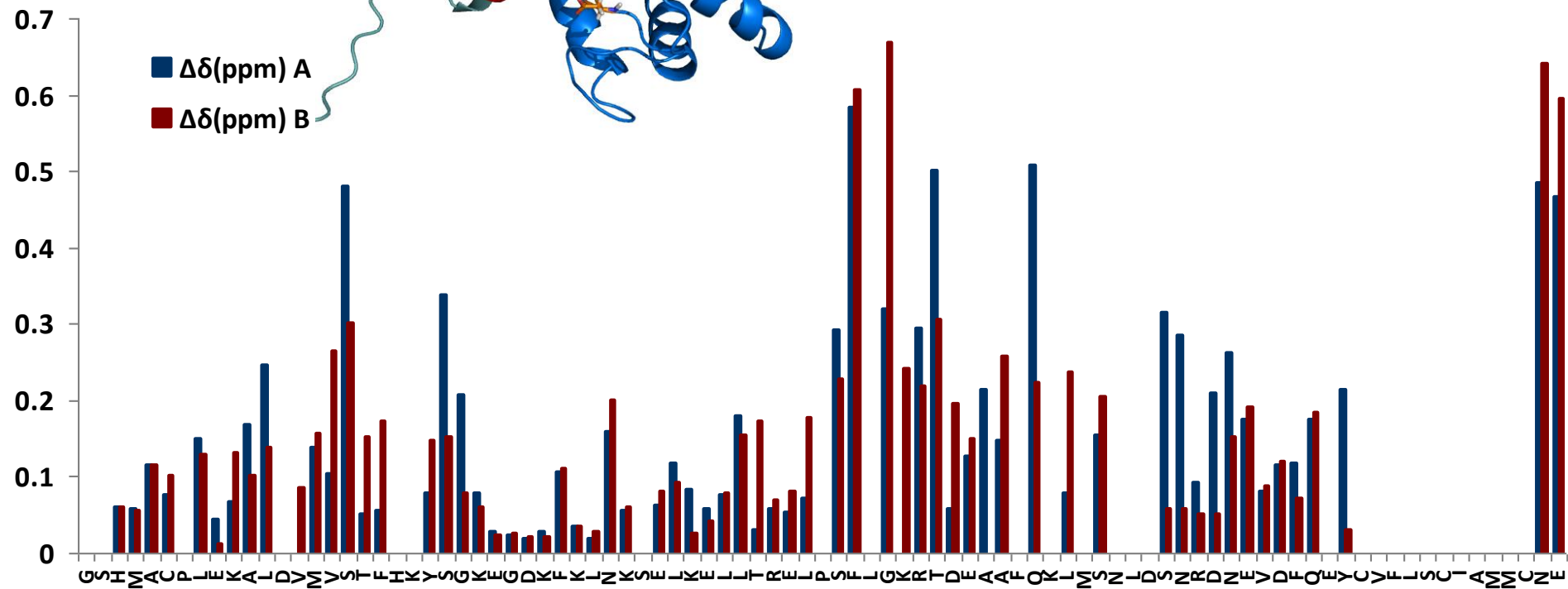




KÖLCSÖNHATÁS - SZERKEZET

átlagolt kémiai eltolódás:

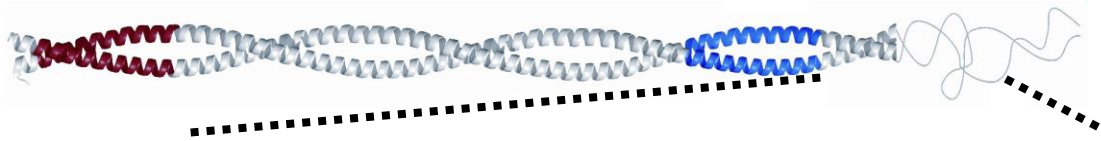
$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta\delta_{HN})^2 + 0.17(\Delta\delta_N)^2}$$





KÖLCSÖNHATÁS - SZERKEZET - FUNKCIÓ

MIIA:

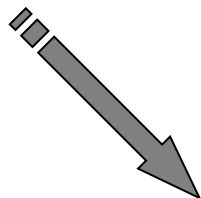


1894 YRKLQRELEDATETADAMNREVSSLKNKLR RGDLPFVVPR RMARK 1937

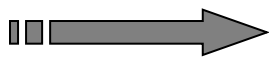
Komplex: filamentum bontó



SZERKEZET

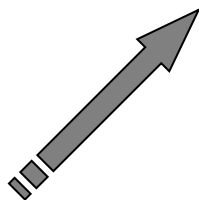


DINAMIKA



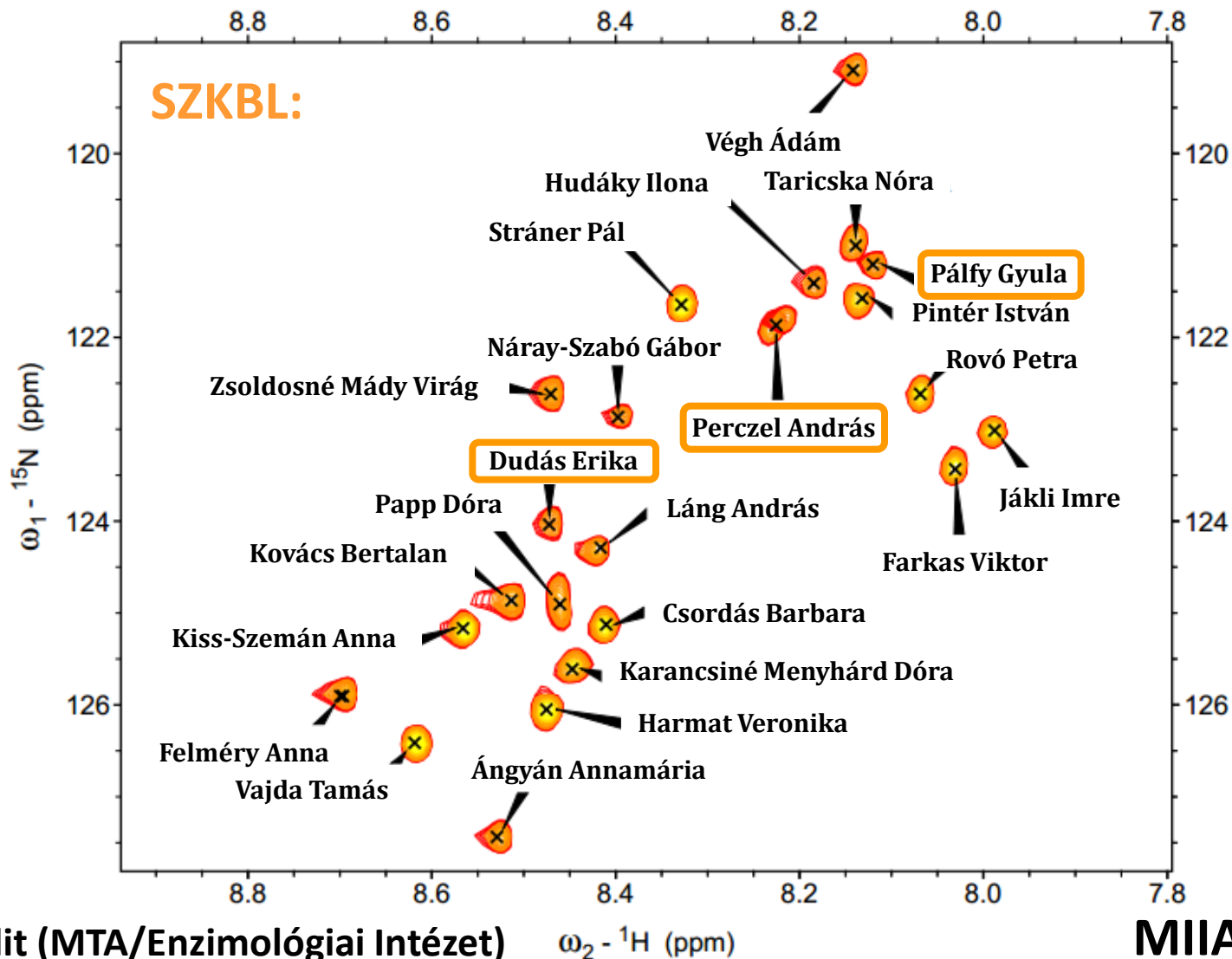
FUNKCIÓ

KÖLCSÖNHATÁS





KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS



GTP:

Ovádi Judit (MTA/Enzimológiai Intézet)

Bányai István (Debreceni Egyetem)

MIIA/S100A:

Nyitra László (ELTE, Biokémiai Tszk)



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS



Edvard Munch:Önarckép - fotó

