

Gyors mérések adaptálása és tesztelése



Bodor Andrea
ELTE, Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium

Biológiai minták jellemzői

- kevés fehérje ($<$, \ll 1mM)
- nem stabil a fehérje napokig
- in-cell körülmények között igen kis koncentráció és a rendszer rövid élettartamú

MÉGIS
ATOMI SZINTŰ JELLMZÉS KÉNE...

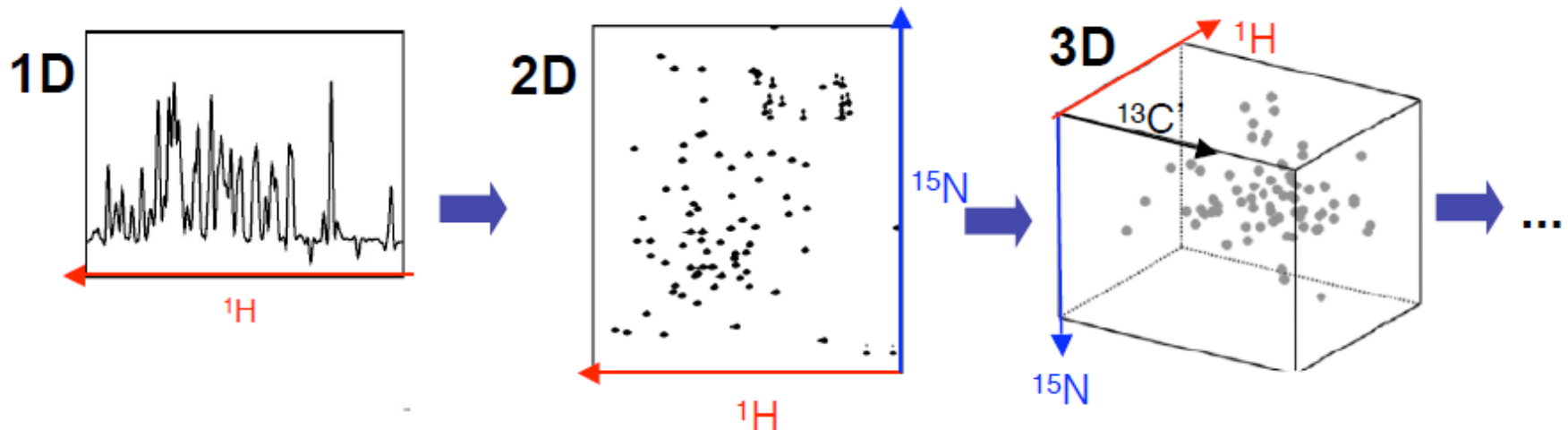
NMR spektroszkópia: atomi felbontás

Minden ^1H , ^{13}C , ^{15}N spin információ:

- kémiai környezet
- szerkezet
- dinamika

Követelmények:

- érzékenység:
 - B_0 növelése
 - krio mérőfej
 - optimált pulzus szekvenciák
 - minta konc. (Shigemi cső)
- felbontás:



A mérések időtartama

1D

s



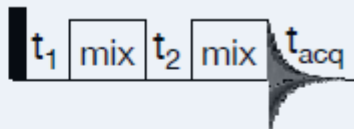
2D

min

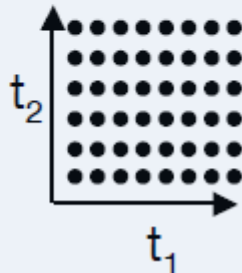
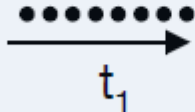


3D

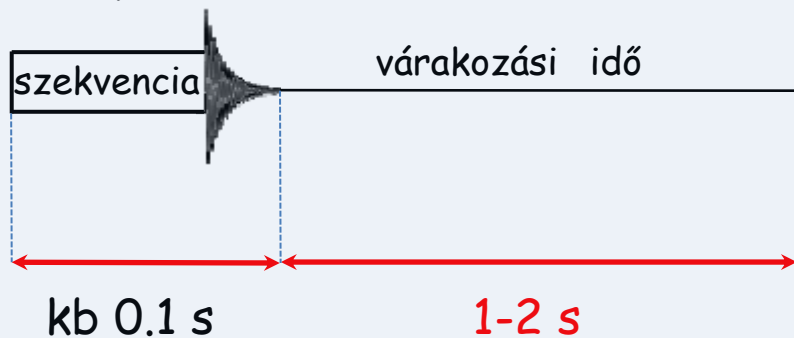
h/napok



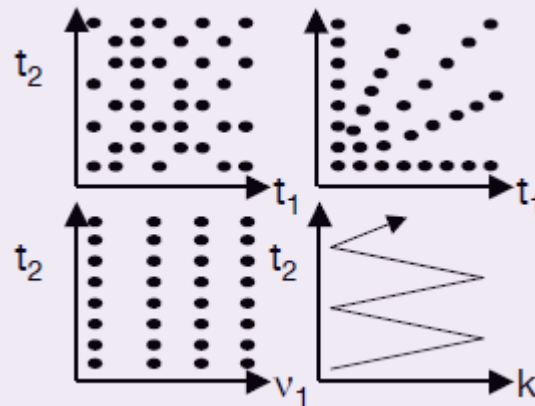
•



Minden pont felvétele kb. 1-2s időtartam



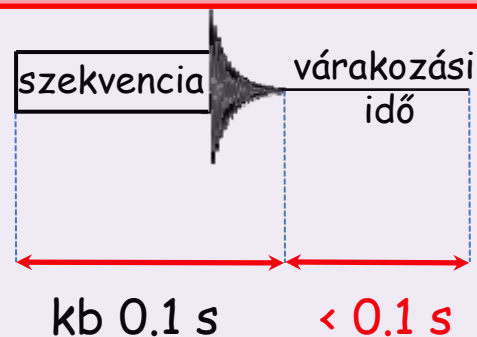
Csökkenthető-e a mérési idő?



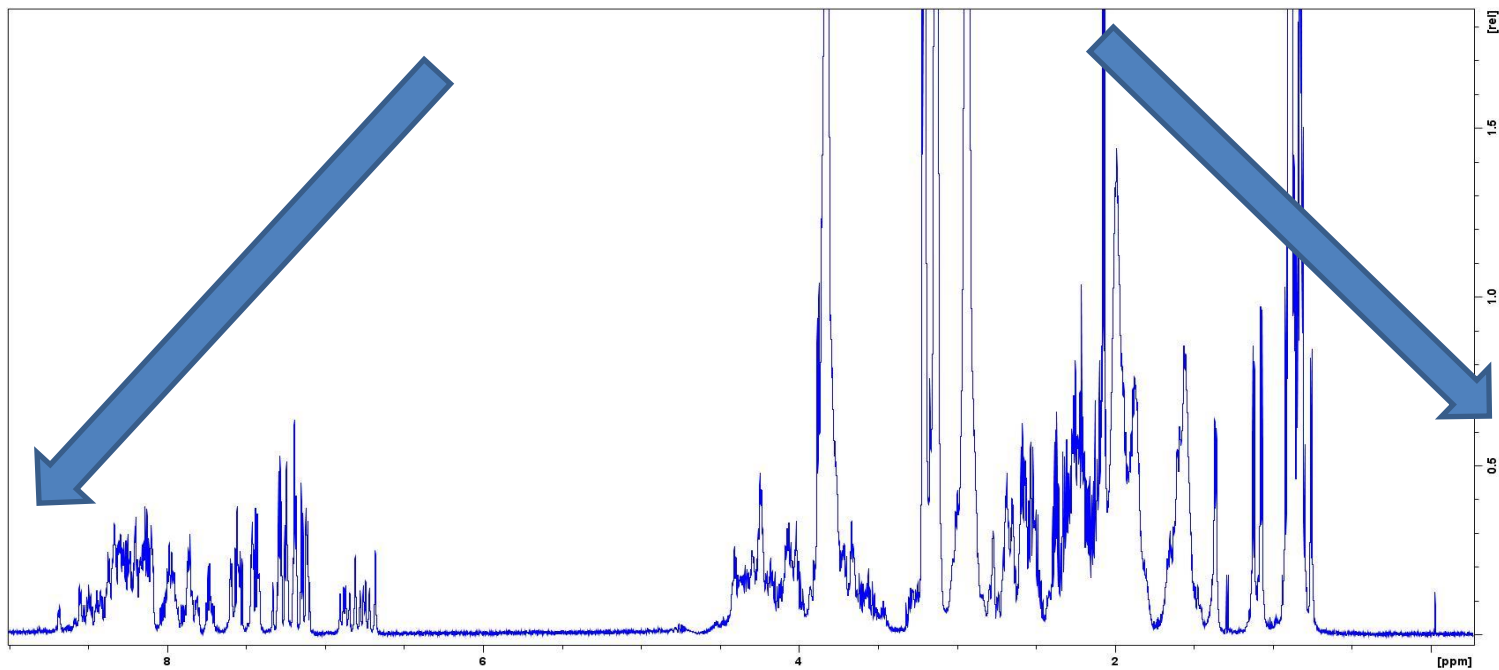
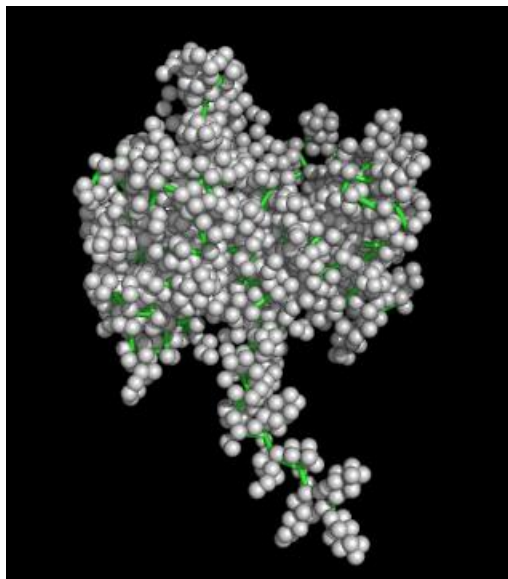
Nem minden pontot veszünk fel. Pld:
NUS: nem lineáris mintavételezés

VAGY

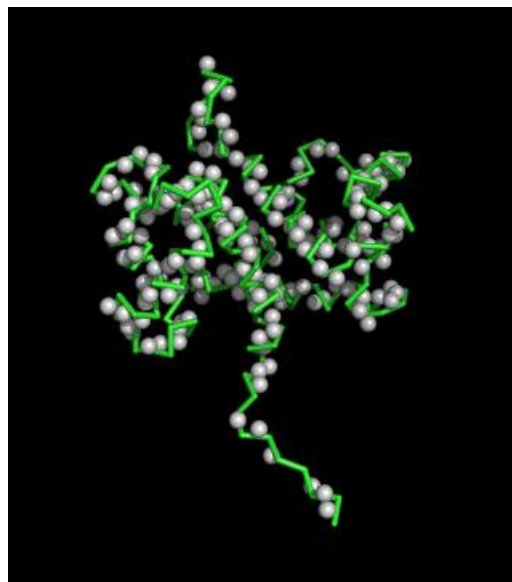
A várakozási idő csökkentése



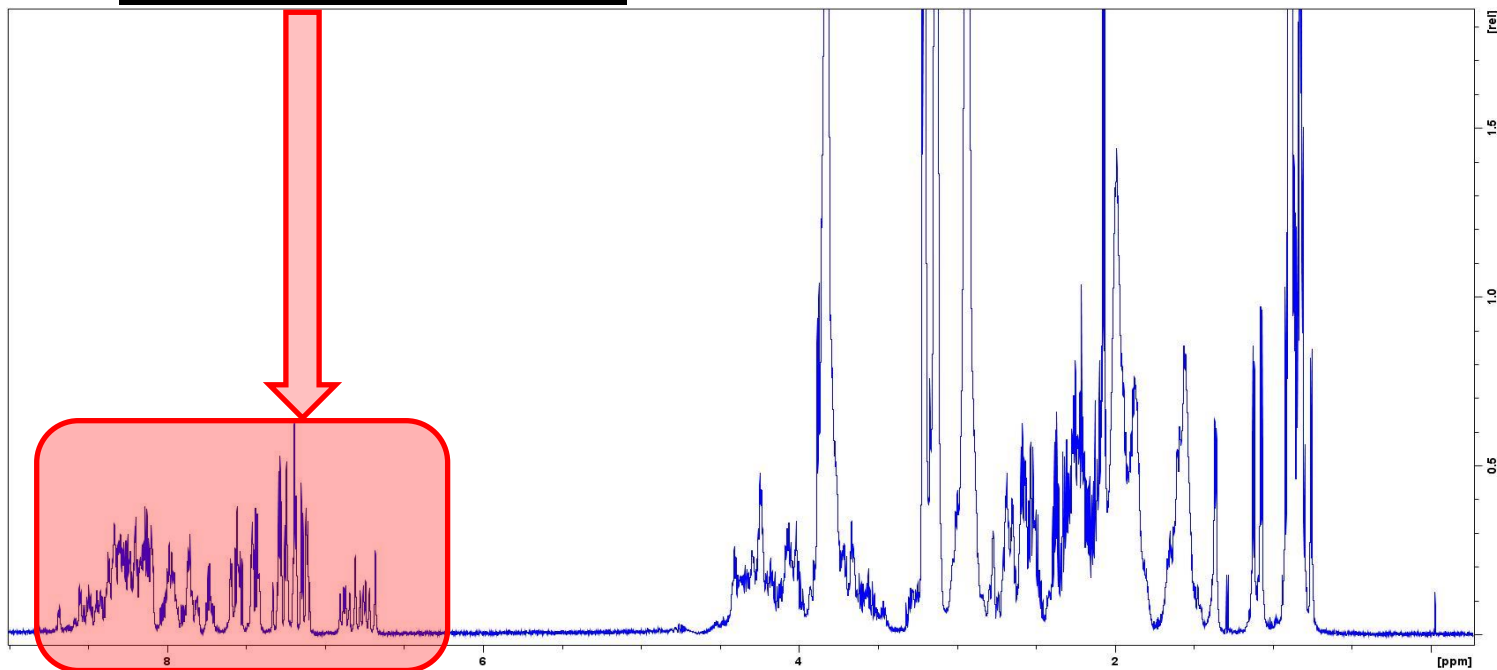
Klasszikus út:
minden H gerjesztése



szelektív
NH
gerjesztés



Gyorsabb relaxáció
Rövidebb várakozási idő



2D SOFAST (Band Selective Optimised Flip Angle Short Transient) HMQC
Időtartam **kb. 1 min, vagy kevesebb**

3D BEST (Band-Selective Excitation Short-Transient Experiments): HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB, HNCO és HN(CA)CO

	klasszikus	BEST	NS
HNCO	8 h 46 min	2h 32 min	8
HNCA	16 h 45 min	7h 21 min	8
HNCOCA	16 h 58 min	6h 54 min	8
HNCACB	1d 8h	23h 56 min	16

Összesen

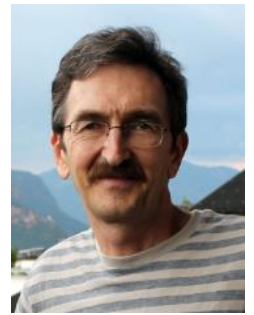
74h29min

40h43min

Felbontás: 2k X 64 X 128
Várakozási idő: 0.2 s, illetve 0.4 s

**TOVÁBB
CSÖKKENTHETŐ !!!**

Tesztrendszer: A p53 fehérje TAD doménje

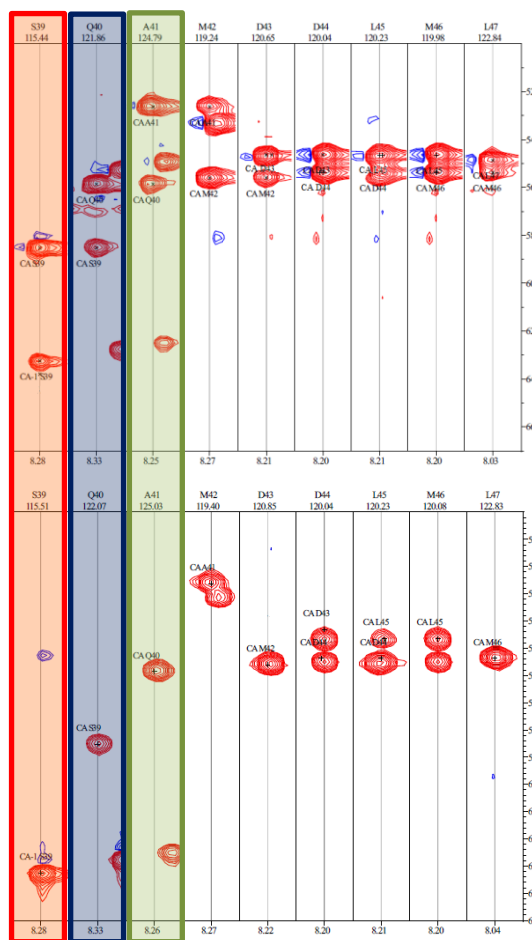
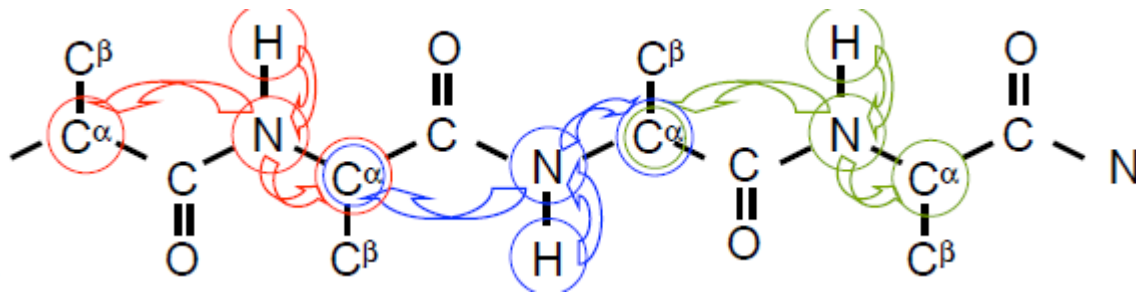
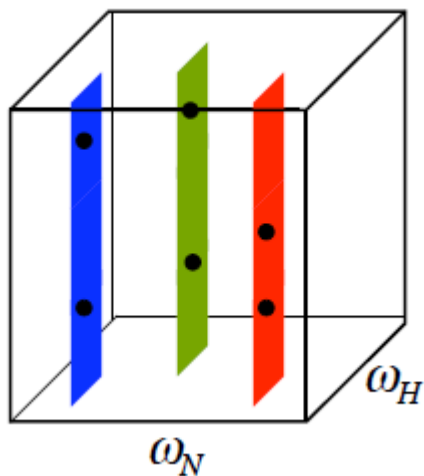


Nyitray László
ELTE-TTK

A TAD domén fiziológias körülmények között rendezetlen (IUPred)

GSMEE PQSDP SVEPP LSQET FSDLW KLLPE
5 10 15 20 25 30
NNVLS PLPSQ AMDDL MLSPD DIEQW FTEDP GP
35 40 45 50 55 60 62

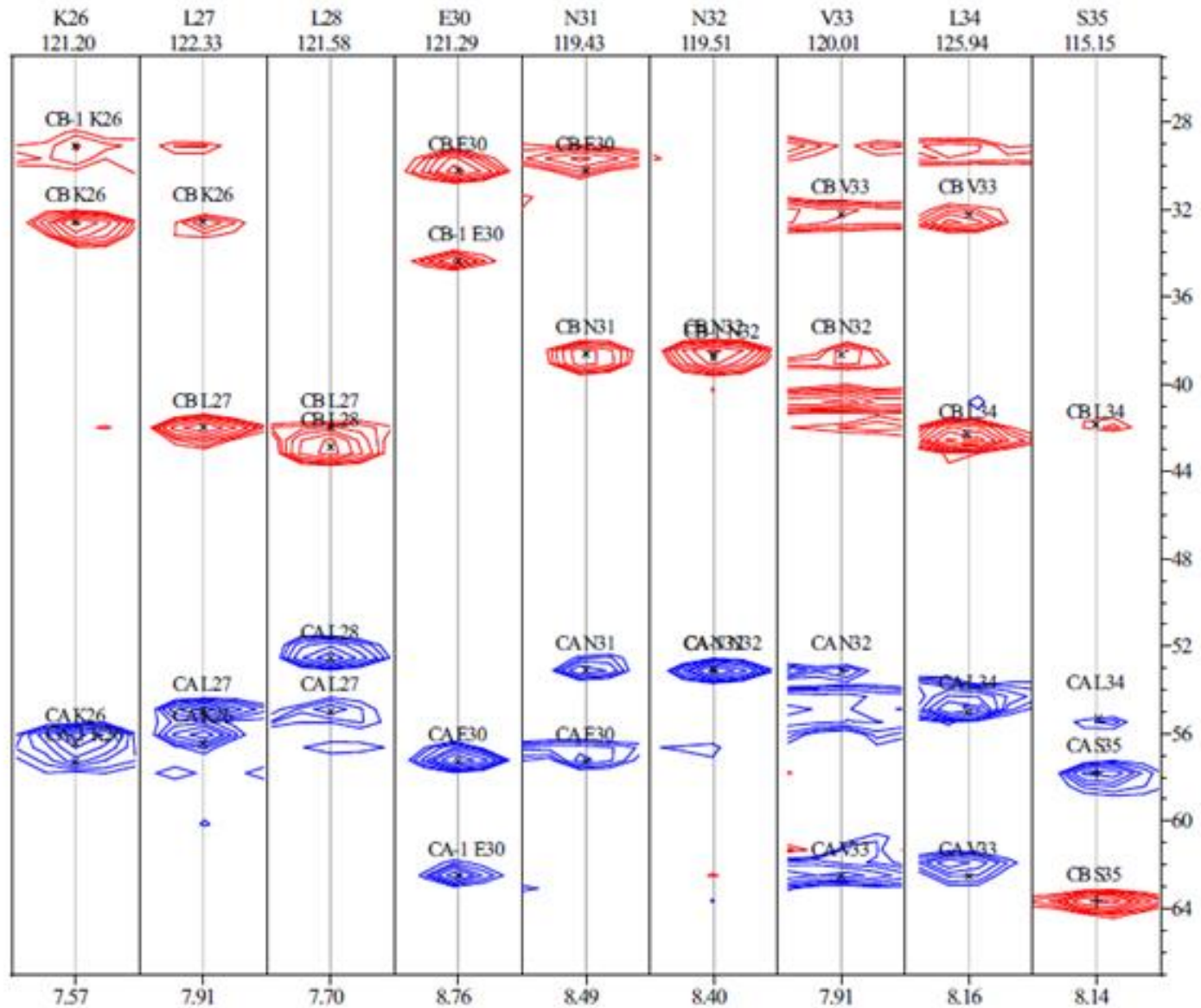
Kiértékelés és a spektrumok minősége



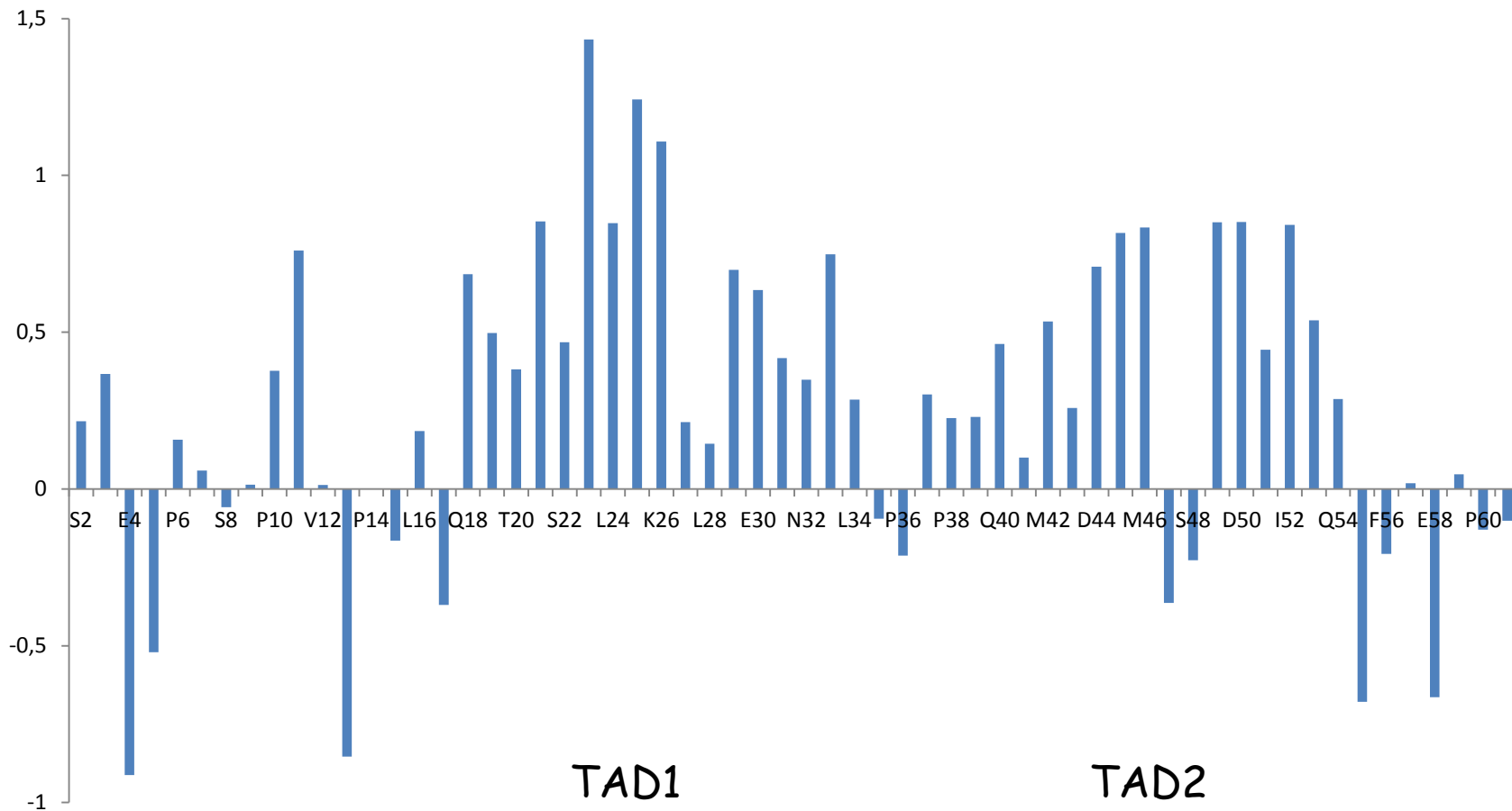
**BEST
HNCA**

**BEST
HN(CO)CA**

Minor jelek azonosítása BEST HNCACB i és i-1 CA és CB



Másodlagos kémiai eltolódás, SCS (Ca-Cb)



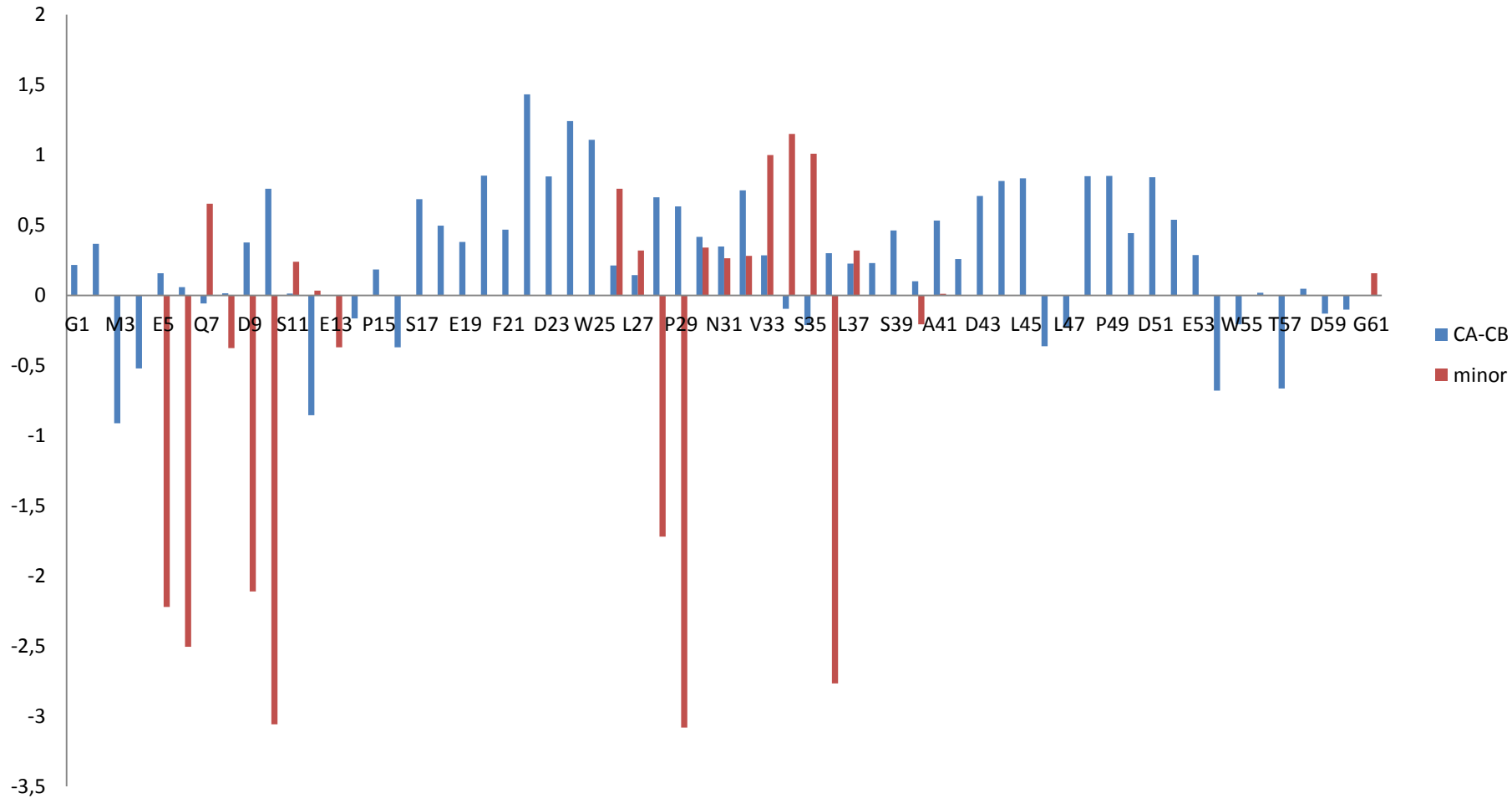
TAD1

TAD2

Naszcents helikális jelleg

A klasszikus mérésekkel megegyező eredmény

Másodlagos kémiai eltolódás, SCS (Ca-Cb) a minor jelek esetében Pro cisz/transz



Eredmény

2D SOFAST HMQC

3D BEST mérések

rutinszerűen alkalmazhatóak

Szinergia
In-cell NMR alkalmazások



Kalmár Lajos
MTA-TTK, Enzimológiai Intézet

a rendezetlen ERD hősök
fehérje esetében, és a teljesen
rendezetlen - ideális IDP -
változat vizsgálata.



Tantos Ágnes
MTA-TTK, Enzimológiai Intézet

STINT-NMR technika :
Kialakulhatnak-e sejtes környezetben is
a szabad állapotban rendezetlen TB4
"fuzzy" komplexei?

Szinergia

Alkalmazások a globuláris rendszerek esetében



Batta Gyula
DE-TTK

**Antifungális hatású,
diszulfid hidas fehérjék
szerkezeti és dinamikai
jellemzése.**



Pál Gábor
ELTE-TTK

**Lektin út gátló
fehérjék oldatfázisú
konformáció analízise.**

Szinergia

Szerteágazó alkalmazási lehetőségek
Dinamikai folyamatok

2D SOFAST HMQC

H/D csere követése

Feltekeredés/letekeredés monitorizálása

Amiloidképződés folyamatának követése

Köszönetnyilvánítás



TÁMOP

4.2.1./B-09/KMR-2010-0003

OIKA

NK100769, NK101072