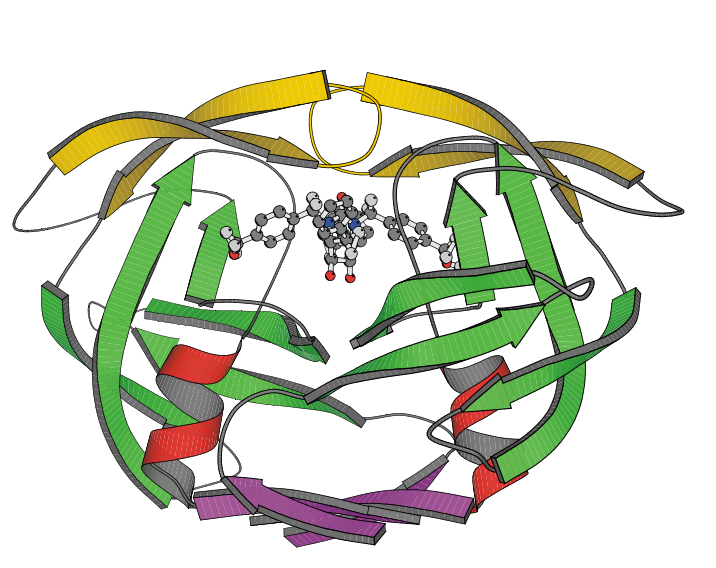


NMR spektroskopie biologicky aktivních molekul



Využití NMR spektroskopie v jednotlivých oborech podle Prof. Richarda Ernsta:

Medicine

Biochemistry

Chemistry

Physics

J.W. Emsley:

“NMR started as the plaything of the physicists, became the favourite toy of the chemists and finally went on to seduce biochemists.”

1. Jaké typy biologický aktivních molekul ?

peptidy a proteiny

nukleové kyseliny

oligosacharidy

2. Jaký typ informace může být pomocí NMR získán?

identifikace substrátu

prostorová struktura molekuly

studium dynamického chování systému

prostorová struktura komplexu

zkoumání vazby ligandu a substrátu

První historicky dochované NMR spektrum proteinu.

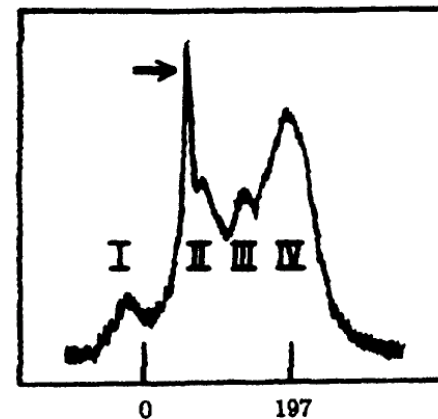
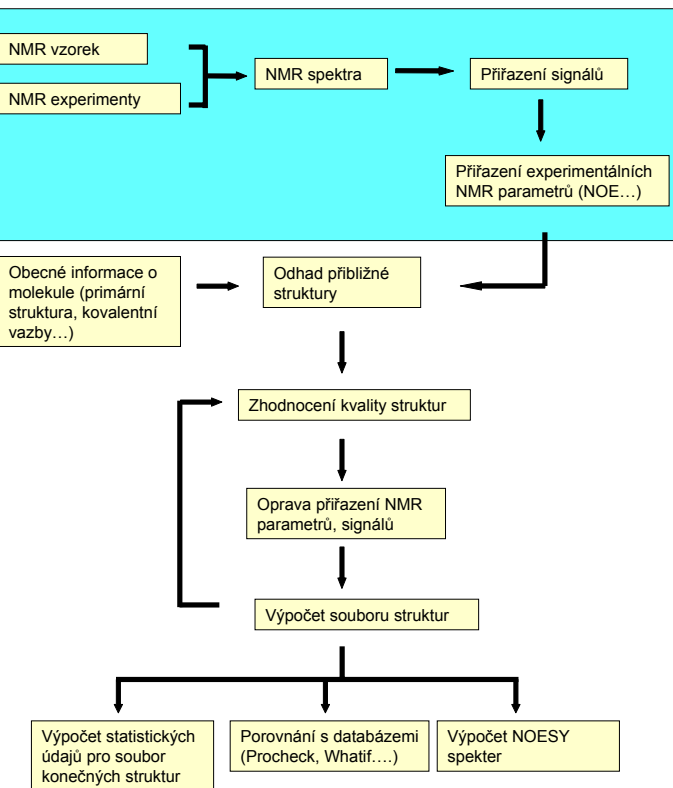


Fig. 1. The first NMR spectrum of a protein (RNase A; 20% (w/v) in D_2O) published, a single slow scan at 40 MHz [14].

Saunders M., Wishnia A. and Kirkwood J.G: J.Am.Chem.Soc. 79, 3289 (1957).

Strategie pro určování struktur biomolekul



Vzorek pro NMR experimenty



Úspěšné řešení bezpodmínečně vyžaduje kvalitní spolupráci mezi NMR spektroskopiky a biochemiky !

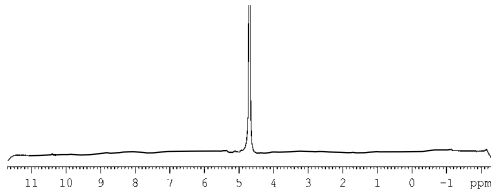
Vzorek musí zůstat aktivní a nedenaturovaný během NMR experimentů!

- rozpuštědlo** H₂O
- pH** kompromis mezi minimalizací chemické výměny mezi signály labilních protonů a signálem vody a optimem pro studovaný protein (4.0 - 7.0)
- pufr** fosfátový pufr neobsahuje žádné protony acetátový pufr (nutno připravit deuterovaný)
- teplota** podle požadavků studovaného materiálu (15 – 40°C)
- aditiva** nutná aditiva je možné zaměnit za deuterovaná analoga
- koncentrace** pro NMR experimenty musí být v rozsahu alespoň 0.5-2.0 mM, vzorek nesmí podléhat agregaci, koagulaci, sebezničení v tomto konc. rozmezí
- stabilita** nutná dlouhodobá stabilita v rozsahu minimálně několika týdnů

Potlačení signálu vody

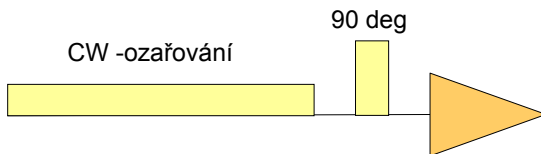
Proč H₂O?

1. Voda je fyziologické prostředí
2. Nelze použít D₂O z důvodů chemické výměny s amidickými protony.



Signál H₂O je 10⁴-10⁵ násobně intenzivnější než odezva měřené molekuly.

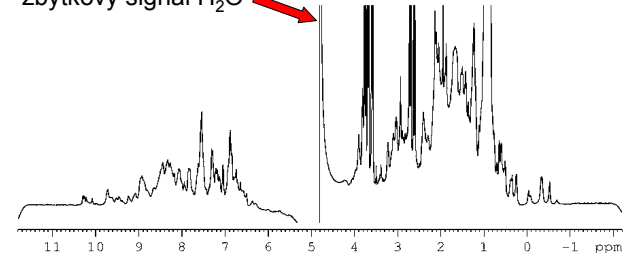
Metoda presaturace



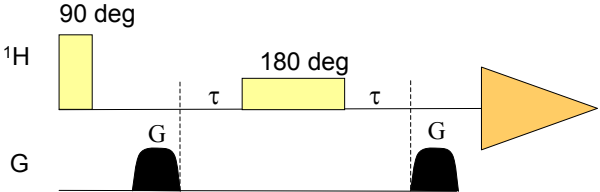
Během relaxační doby ozařujeme signál vody slabým RF polem.

¹H spektrum proteinu po presaturaci H₂O

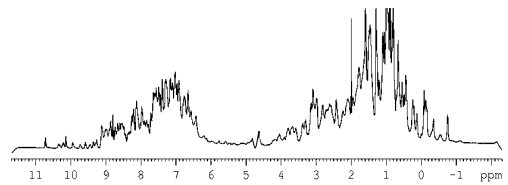
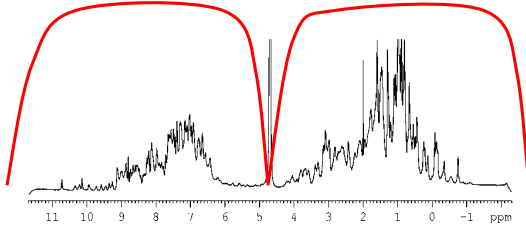
zbytkový signál H₂O



WATERGATE: Založena na selektivní manipulaci signálů vody a rozpuštěné látky spolu s gradientním echem.



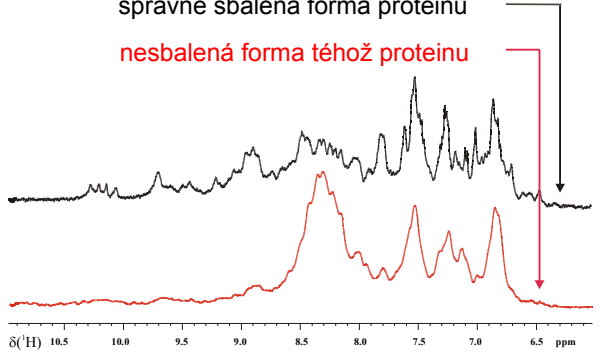
180 deg puls



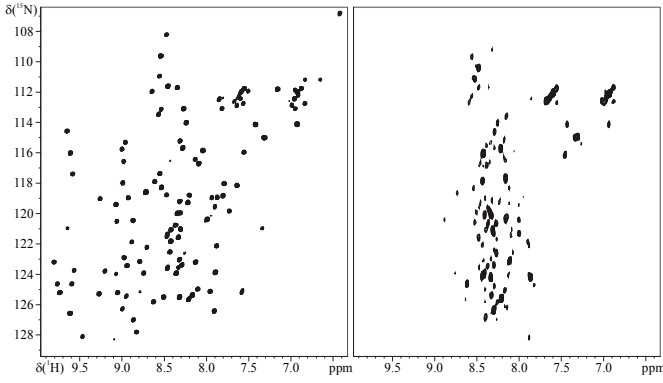
Srovnání sbalené a nesbalené struktury

správně sbalená forma proteinu

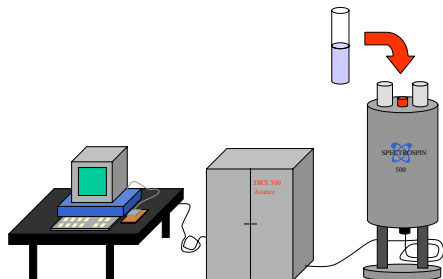
nesbalená forma téhož proteinu



¹H- ¹⁵N korelace v oblasti amidických vodíků (vzorek nespecificky obohacen ¹⁵N)



NMR spektroskopie



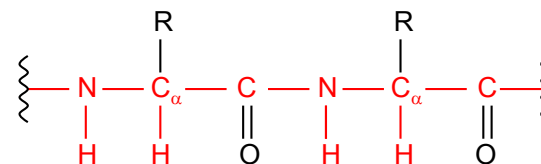
Měřená jádra jsou ^1H , ^{13}C a ^{15}N , případně ^2H

- ^1H :
- vysoké přirozené zastoupení (99.98%)
- vysoká citlivost (1.00)
- malá disperze chemických posunů NMR signálů (~15.0 ppm)
- ^{13}C :
- velká disperze chemických posunů NMR signálů (~200.0 ppm)
- nízké přirozené zastoupení (1.108%), možné uměle navýšit až na 100%
- nízká citlivost (1.76×10^{-4}), po 100%ním izotopovém obohacení (1.59×10^{-2})
- ^{15}N :
- střední disperze chemických posunů NMR signálů (~30.0 ppm) (oproti ^{13}C nezávislost na typu aminokyseliny)
- nízké přirozené zastoupení (0.37%), možné uměle navýšit až na 100%
- velmi nízká citlivost (3.85×10^{-6}), po 100%ním izotopovém obohacení (1.04×10^{-3})
- ^2H :
- používá se pro speciální účely

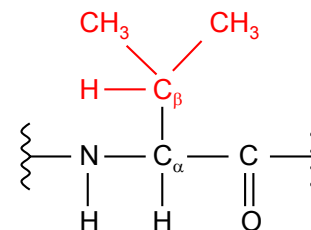
Interpretace NMR spekter

A. Přiřazení signálů (rezonancí)

1) signály páteře (^1H , ^{13}C , ^{15}N)



2) signály postranních řetězců



- typ aminokyseliny (Phe, Tyr...)
- sekvenční zařazení aminokyseliny (Phe 13, Tyr55...)

☞ Před započítáním zkoumání struktury biomolekuly je nutné znát posloupnost jejích stavebních kamenů. V případě proteinů je to posloupnost aminokyselinových zbytků (primární struktura)

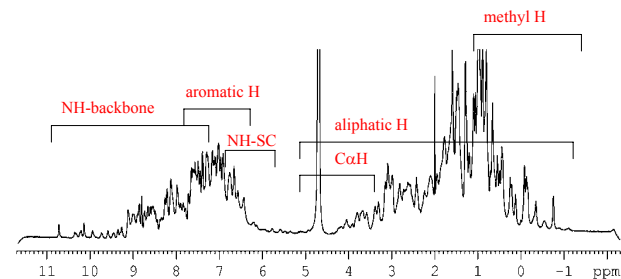
B. Přiřazení parametrů získaných z NMR spekter

- NOE interakce (meziatomová vzdálenost)
 - interakční konstanta (dihedrání úhel)
 - chemický posun (chemické okolí jádra)
 - vodíková vazba (vzdálenost, vazebný úhel)
 - prochirální atomy (skupiny) (CH_2 , metyly, orientace v prostoru)
 - anizotropie chemického posunu (CSA)
 - dipolární interakční konstanty (orientace vazby v prostoru)
- (paramagnetické species)
- interakce s jaderným momentem nespárovaného elektronu
 - chemický posun (vzdálenost)
 - rychlost relaxace (vzdálenost)

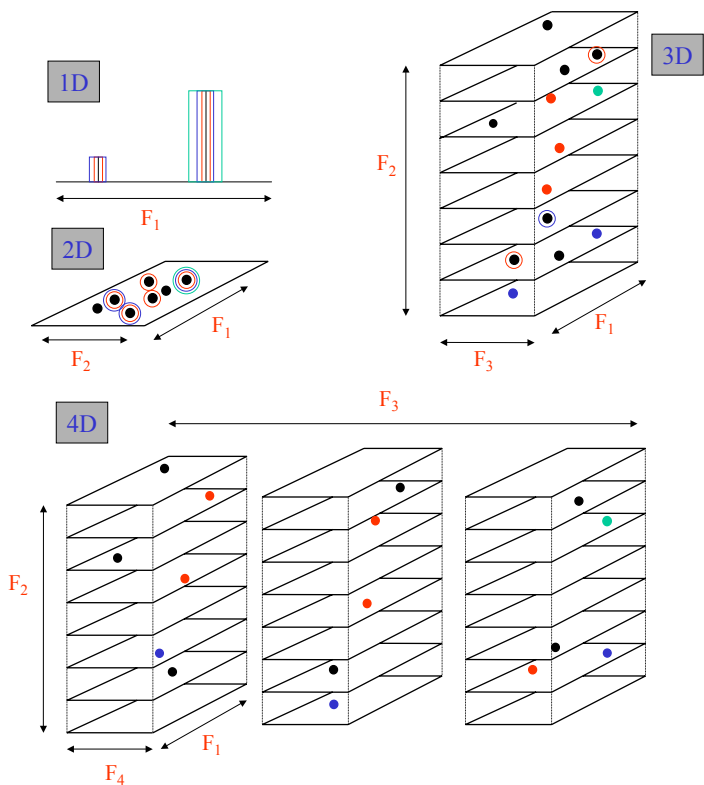
^1H spektrum proteinu

kuřecí lysozym

129 AA, $M_w = 14.6$ kDa



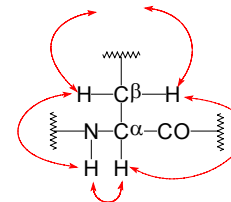
Zjednodušení komplikovaných NMR spekter expanzí do více dimenzí.



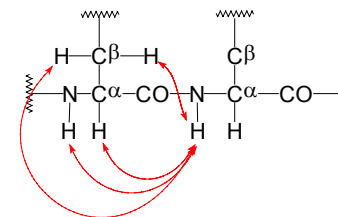
NMR experimenty

Malé molekuly M.W. < 6-7 kDa (60 AA)

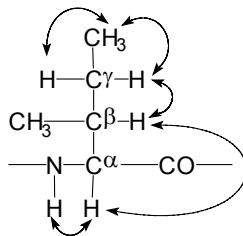
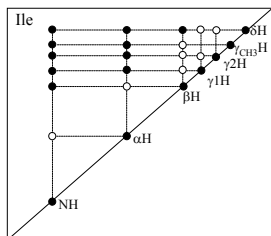
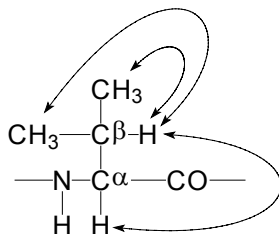
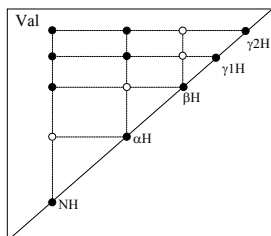
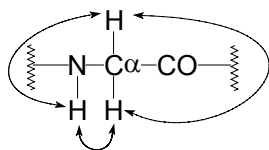
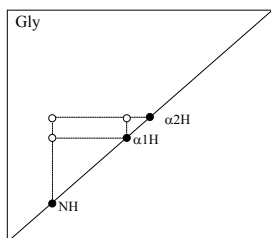
- izotopově neobohacený materiál
- homokorelované ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) 2D experimenty
- přiřazení ^1H rezonancí specifickému typu aminokyseliny
- experimenty s koherentním přenosem magnetizace (COSY, TOCSY)



- sekvenční přiřazení, tj. zařazení každého jednotlivého AA systému na správné místo v peptidovém řetězci
- experimenty využívající nekoherentní přenos magnetizace (NOESY, ROESY)



Spinové systémy získané z COSY a TOCSY

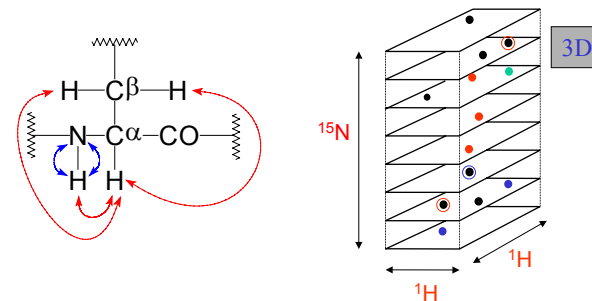


NMR experimenty

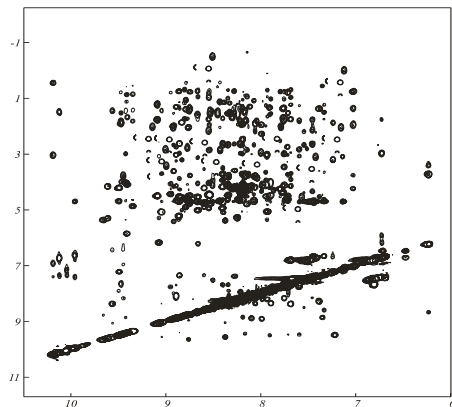
Středně velké molekuly M.W. < 10 -12 kDa (100 AA)

Problém: ^1H spektra jsou již velmi komplikovaná!

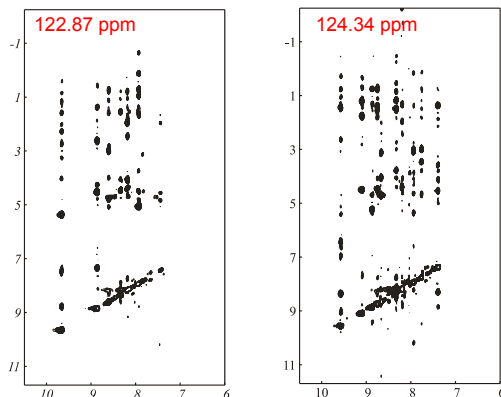
- Řešení:
- stejná strategie jako u malých molekul
 - obohacení vzorku ^{15}N nebo ^{13}C
 - využití X-editovaných experimentů 2D nebo 3D NMR experimentů
 - přiřazení ^1H rezonancí (HSQC-TOCSY)
 - sekvenční přiřazení (HSQC-NOESY)



NOESY



¹⁵N-editované NOESY

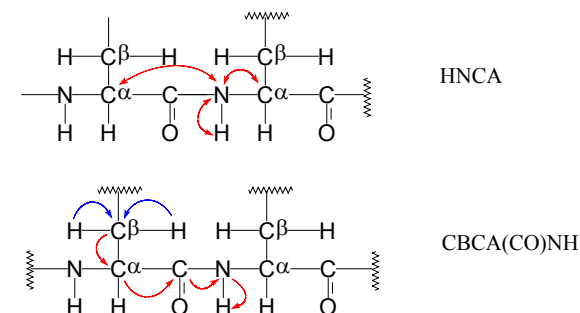


NMR experimenty

Velké molekuly M.W. > 10-12 kDa (100 AA)

- Problém č. 1: příliš komplikovaná ¹H spektra !
 Problém č. 2: příliš velká molekula → dlouhý korelační čas
 → velmi rychlá spin-spinová relaxace →
 → široké čáry → přenos magnetizace přes malé interakční konstanty je neefektivní !
 $^3J_{HH} (R_2 > ^3J_{HH})$

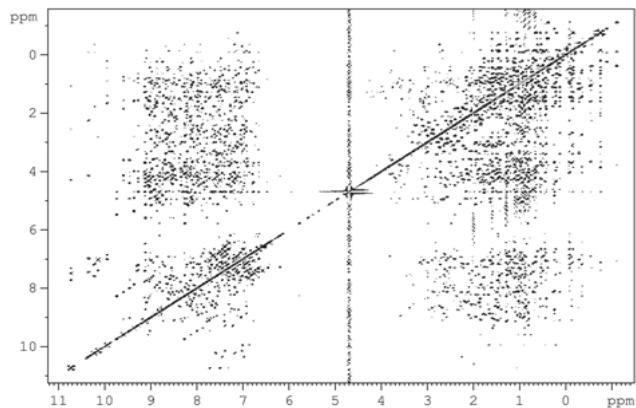
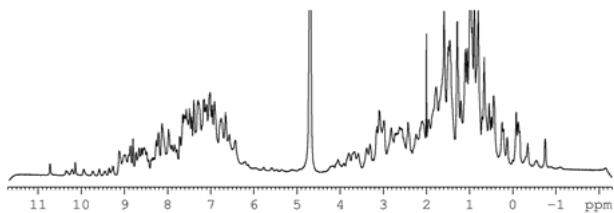
- Řešení:
- dvojnásobné izotopové obohacení ¹³C, ¹⁵N
 - přiřazení signálů a sekvenční přiřazení AA pomocí experimentů s trojnásobnou rezonancí 3D a 4D experimenty
 - využití větších heteronukleárních interakčních konstant (J_{CC}, J_{HC}, J_{HN})



Velká molekula

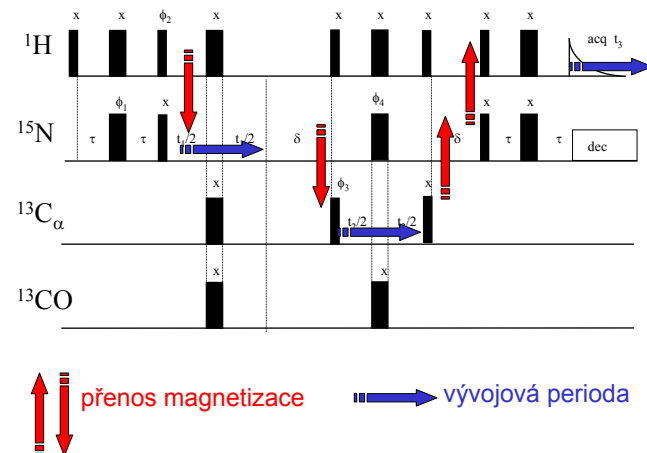
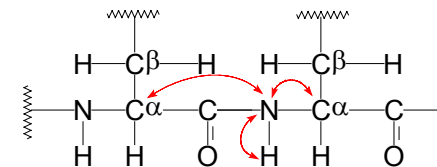
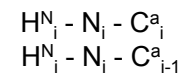
Kuřecí lysozym

129 AA, $M_w = 14.6$ kDa



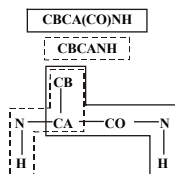
HNCA

Pozorovatelné korelace (krospíky)

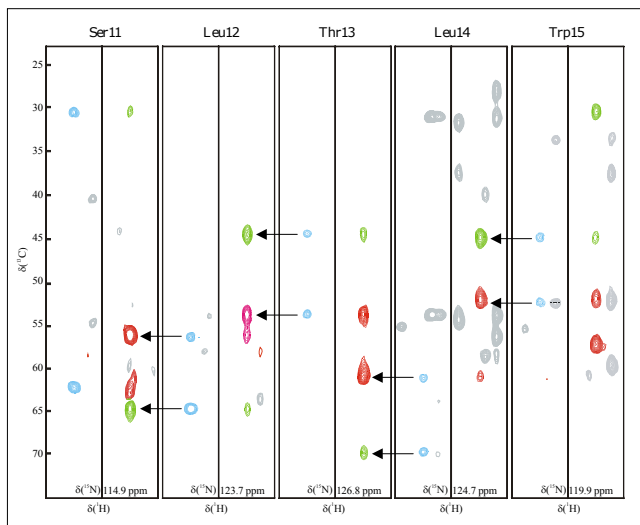


Sekvenční přiřazení

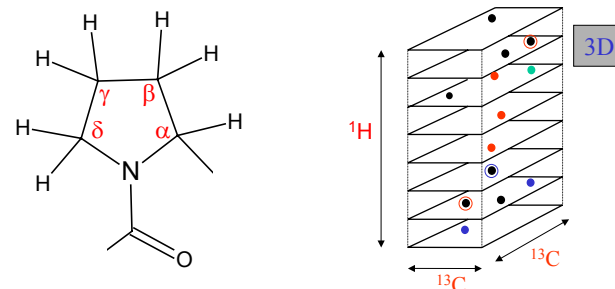
Zvolená strategie



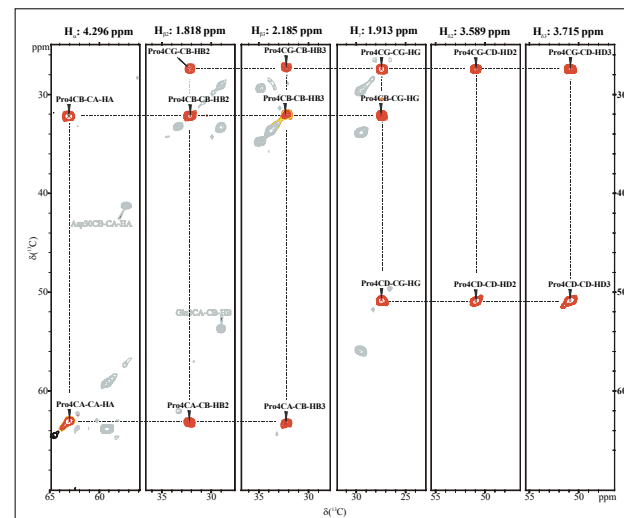
Sekvenční přiřazení aminokyselin Ser11 až Trp15 M-PMV proteázy pomocí HNCACB a CBCA(CO)NH experimentů



Přiřazení postranních řetězců



Kompletní přiřazení Prolinu 4 proteázy M-PMV pomocí HcCH-COSY spektra



NMR experimenty

Extra velké molekuly M.W. > 20 -25 kDa (200 AA)

Problém č. 1: příliš komplikovaná ^1H spektra !

Problém č. 2 příliš velká molekula \rightarrow dlouhý korelační čas \rightarrow velmi rychlá spin-spinová relaxace \rightarrow široké čáry \rightarrow přenos magnetizace i přes větší heteronukleární interakční konstanty je neefektivní !

$^n\text{J}_{\text{HX}}$ ($R_2 > ^n\text{J}_{\text{HX}}$)

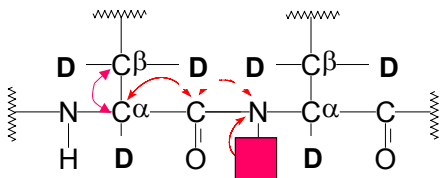
Řešení: - stejná strategie přiřazování signálů jako v případě značení ^{13}C / ^{15}N

- trojnásobné izotopové značení, navíc ještě ^2H za všechny atomy H kromě amidických

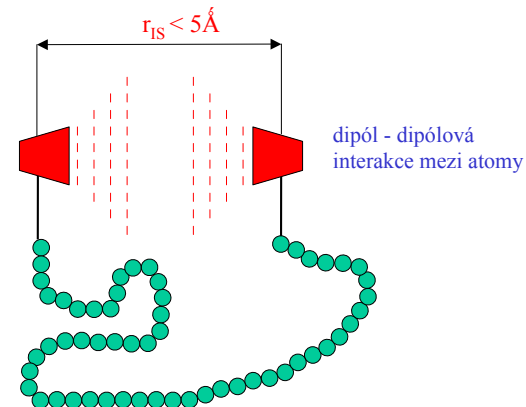
Důvod: - ^2H má šestkrát menší γ než ^1H

$$\sigma_{IS} = \left(\frac{\mu_o}{4\pi} \right)^2 \frac{h^2 \gamma_A^2 \gamma_B^2}{10} \left[\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} - \tau_c \right] r_{IS}^{-6}$$

- využívá se deuteriový dekupling



Nukleární Overhauserův efekt



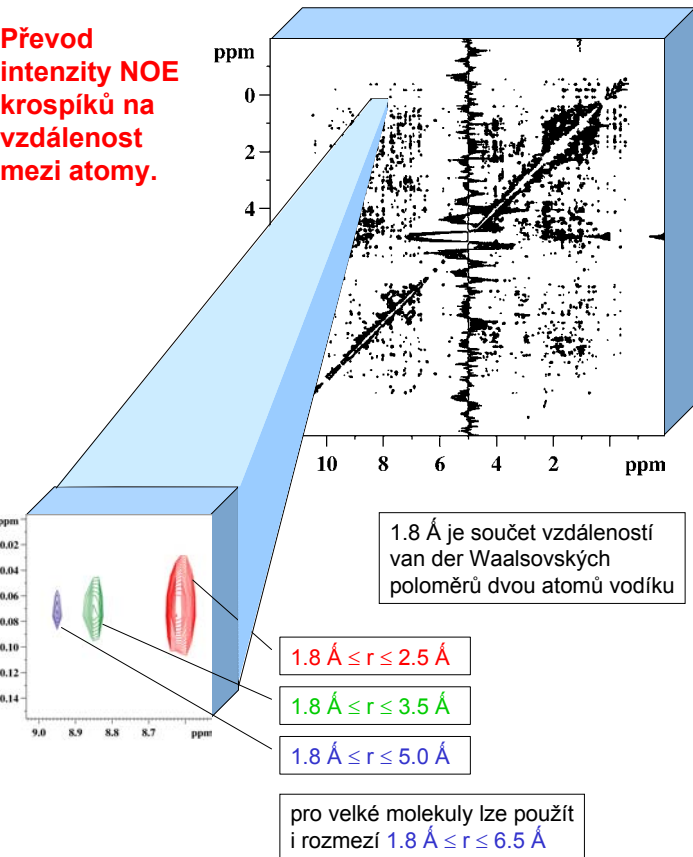
$$\sigma_{IS} = \left(\frac{\mu_o}{4\pi} \right)^2 \frac{h^2 \gamma^4}{10} \left[\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} - \tau_c \right] r_{IS}^{-6}$$

σ_{IS} - rychlost nárstu NOE
 τ_c - korelační čas
 r_{IS} - meziatomová vzdálenost
 ω - pracovní frekvence NMR spektrometru

$$\frac{\sigma_{IS}}{\sigma_{cal}} = \left(\frac{r_{IS}}{r_{cal}} \right)^{-6} \quad \frac{f_I \{S_I\}}{f_{cal}} = \left(\frac{r_{IS}}{r_{cal}} \right)^{-6}$$

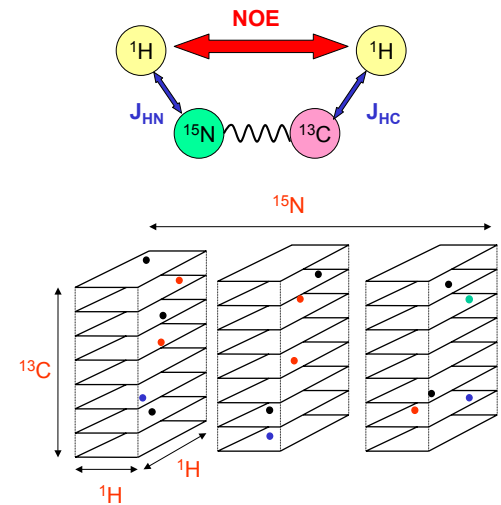
☒ Poměr intenzit NOE efektů $f_I \{S_I\} / f_{cal}$ je úměrný poměru vzdáleností příslušných atomů vodíku pouze pro velmi krátké časy!!!

Převod
intenzity NOE
krospektrů na
vzdálenost
mezi atomy.

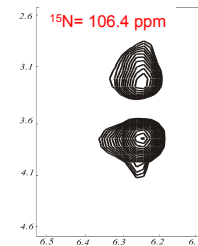


X-editovaná NOESY spektra

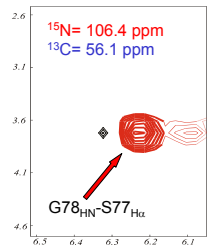
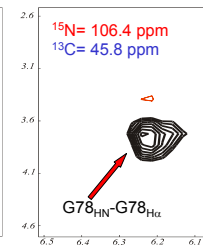
4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -editované NOESY



3D ^{15}N -editované NOESY

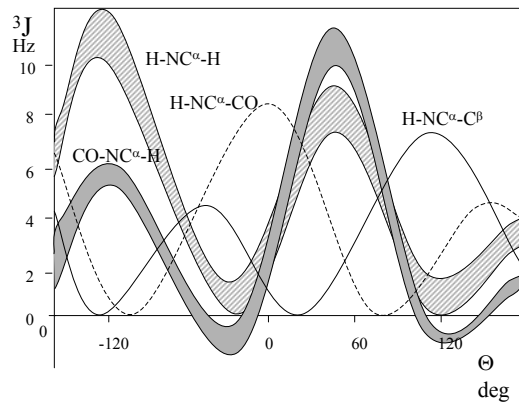
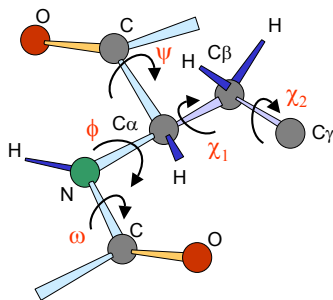


4D $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -editované NOESY

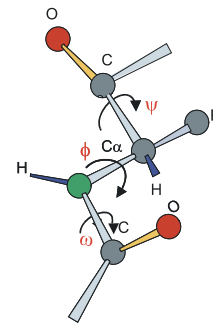


Vztah mezi interakční konstantou a dihedrálními úhly peptidu
Karplusova rovnice

$${}^3J = A \cos^2\Theta + B \cos \Theta + C$$



Typické hodnoty interakčních konstant ${}^3J_{\text{HH}}$
pro dihedrální úhel ϕ

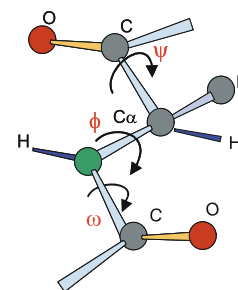


α -helix $\phi \sim -60$ deg

$3 \leq J \leq 6$ Hz

typické nastavení pro úhel ϕ :

$-110 \leq \phi \leq -10$ deg



β -struktura skládaného listu $\phi \sim -120^\circ$

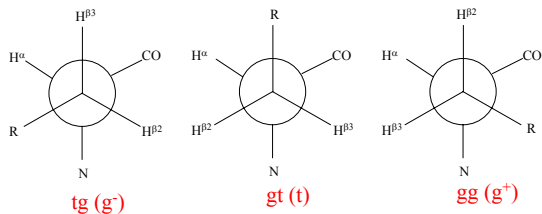
$6 \leq J \leq 9$ Hz

typické nastavení pro úhel ϕ :

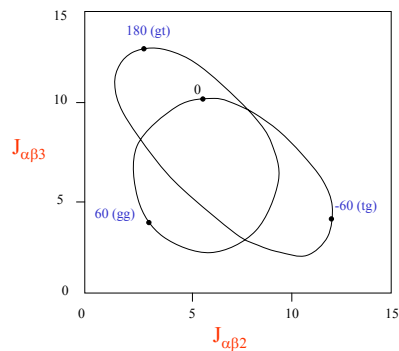
$-170 \leq \phi \leq -70$ deg

Stereospecifické přiřazení diastereotopních atomů v $C_\beta H_2$ skupinách

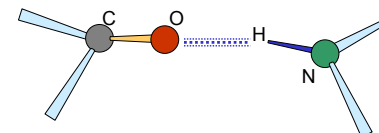
- $J_{\alpha\beta}$ coupling
- H^N-H^β NOE



$$J_{\alpha\beta} = 9.5 \cos^2\theta - 1.6 \cos\theta + 1.8$$



Vodíkové vazby



- Měření:**
- výměnné experimenty s D_2O
 - teplotní závislost výměnitelných protonů (NH, OH...)

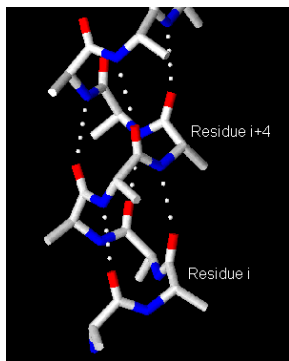
- NMR experimenty:**
- malé molekuly - COSY
 - velké molekuly - 1H - ^{15}N HSQC

Z NMR experimentů je možné získat pouze informaci o donoru!!

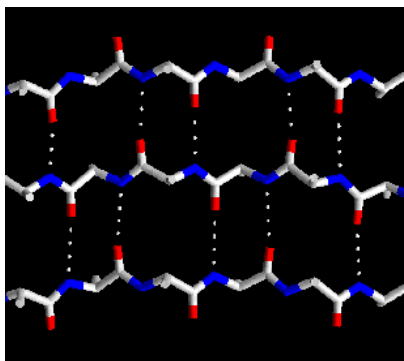
Akceptory jsou většinou určeny až z molekulárního modelování a výpočtů!!

Vodíkové vazby v pravidelných strukturách

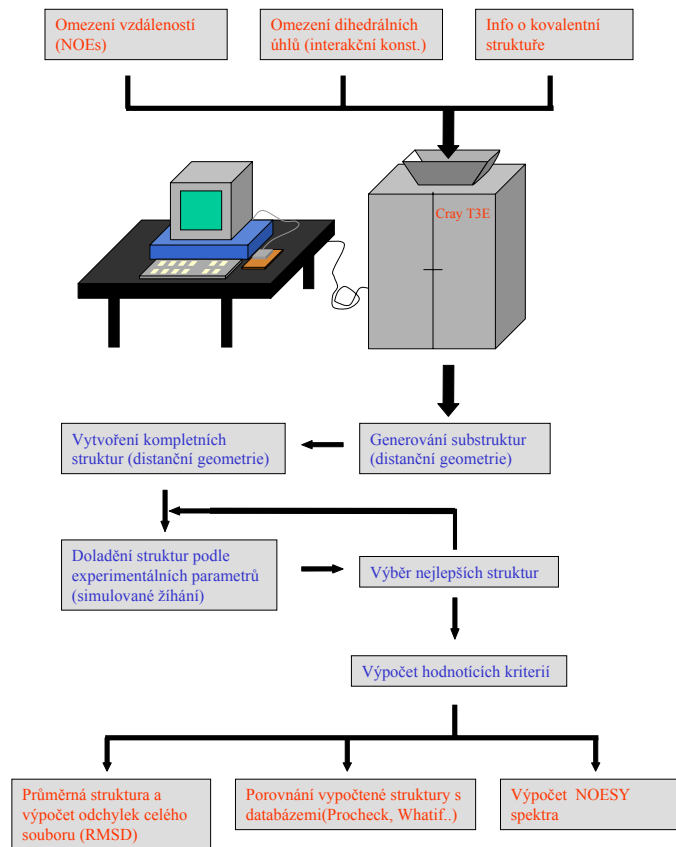
α -helix



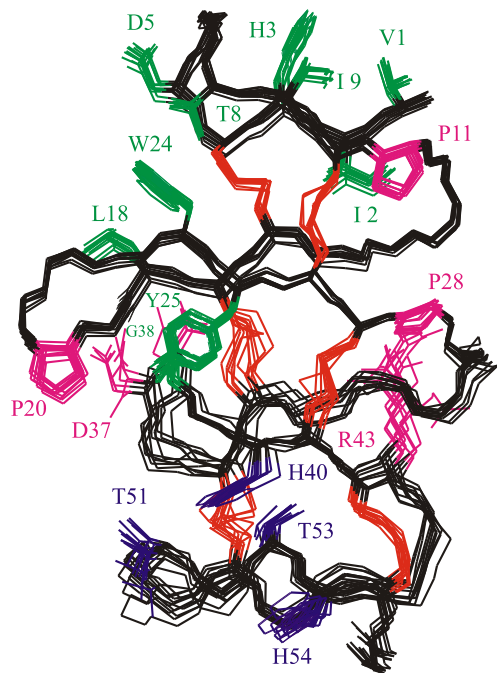
β -sheet



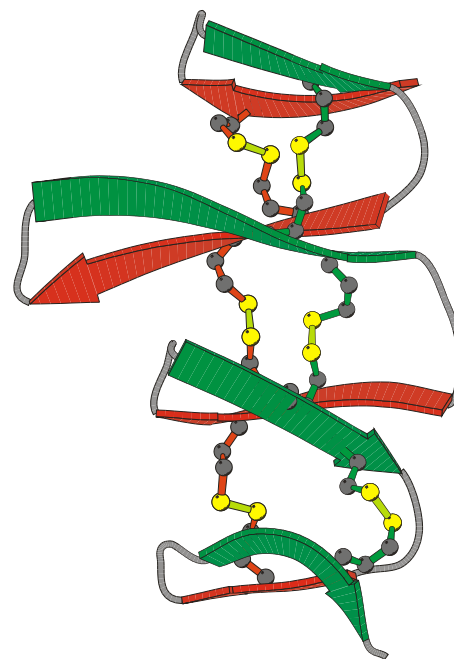
Jak vše poskládat dohromady ????



Růstový modulátor Granulin 1e
Cyprinus carpio



Růstový modulátor Granulin 1e
Cyprinus carpio



Studium dynamických jevů proteinů pomocí NMR spektroskopie. Proč?

- Molekuly nejsou statické, vykonávají pohyby v různých časových škálách.
- Vypočtená statická struktura je často průměrem skutečných stavů molekuly.
- Funkce mnoha biologicky aktivních molekul závisí na jejich flexibilitě.
- V roztoku (fyziologické prostředí) podléhají biologicky aktivní molekuly přirozeným pohybům, které nejsou v krystalové mřížce patrné. Výhoda NMR spektroskopie nad X-ray krystalografií.

Studium dynamických jevů proteinů pomocí NMR spektroskopie

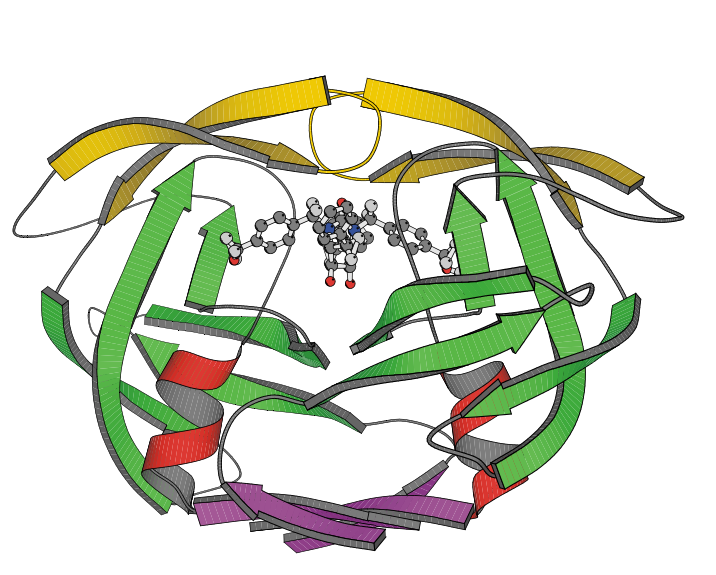
Vztah relaxační rychlostí k molekulárním pohybům v různé časové škále:

NMR parametr	časová škála
podélná relaxace R_1	$10^{12} - 10^8 \text{ s}^{-1}$
podélná relaxace během spin-locku $R_{1\rho}$	$10^6 - 10^3 \text{ s}^{-1}$
příčná relaxace R_2	$10^3 - 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Měřená jádra:

- ^1H – téměř se neměří (obtížně definovatelné)
- ^{15}N – dynamika páteře proteinu (dobře měřitelné, dobře definovatelné)
- ^{13}C – dynamika postranních řetězců i páteře (obtížněji měřitelné, dobře definovatelné)
- ^2H - měří se ve speciálních případech (CH_3) (obtížněji připravitelný vzorek, není jednoduché měřit, dobře definovatelné)

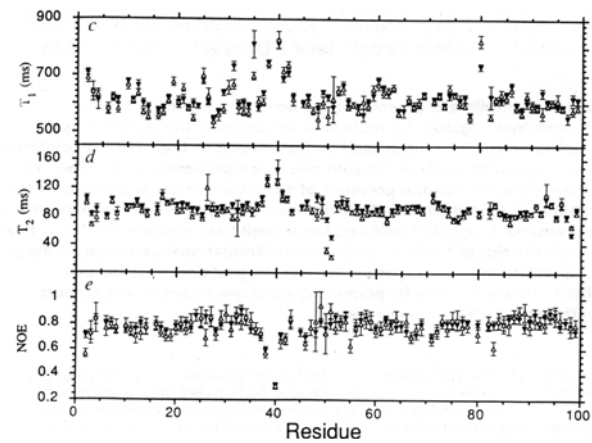
HIV-1 proteáza



Experimentální uspořádání

Relaxační parametry ^{15}N :

Měřeny relaxační časy: spin-mřížka (podélná) T_1
spin-spin (příčná) T_2
krosrelaxační rychlost (NOE) $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$



Zpracování výsledků

Lipari-Szabóův přístup

Pro analýzu je nutný [model pohybu](#) molekuly jako celku a jejích částí.

Jeden z neúspěšnějších je Lipari-Szabóův „bezmodelový“ přístup (“model-free“ approach)

Předpoklady Lipari-Szabóova modelu:

- relaxace je modulována dvěma pohyby: globálním a lokálním
- oba pohyby jsou statisticky nezávislé
- globální reorientace je izotropní
- molekulární pohyb je charakterizován parametry:

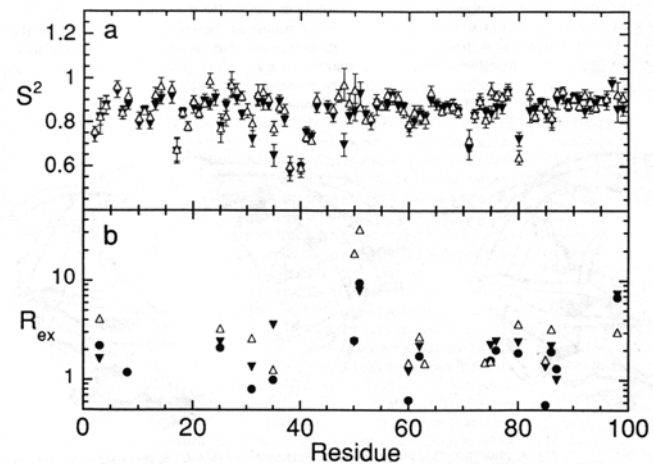
t_M korelační čas globálního pohybu

S^2 parametr uspořádanosti (hodnota 0 - 1)

t_e korelační čas lokálního pohybu

R_{ex} rychlost chemické (konformační) výměny

Výsledky – parametr uspořádanosti a konformační výměna

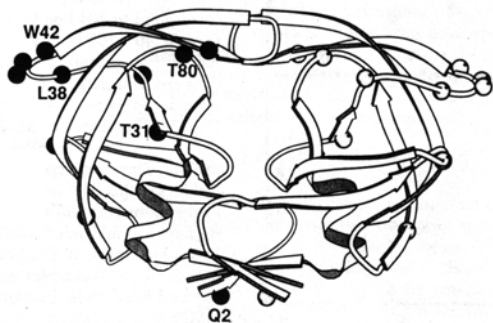


R_{ex} znamená příspěvek konformační výměny k relaxační rychlosti $1/T_2$

$$1/T_2^* = 1/T_2 + R_{ex}$$

Interpretace výsledků měření dynamiky páteře HIV-1 proteázy

Aminokyselinové zbytky podléhající rychlým pohybům v pikosekundové časové škále (1-100 ps) o velké amplitudě



Aminokyselinové zbytky podléhající pomalým pohybům (konformační výměně v mikro- až milisekundové časové škále).

