

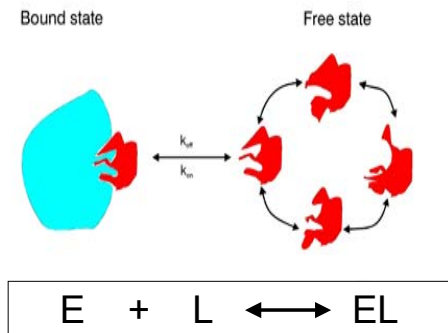
NMR spektroskopie komplexů

- Struktury dvou nebo více interagujících částí komplexu
- Vzájemná orientace interagujících částí
- Určení parametrů, které charakterizují komplex (disociační konstanta, rychlost přístupu, event. odstupu interagujících částí)

Metodické přístupy:

- Izotopově neobohacené molekuly
Transferred nuclear Overhauser effect
- Izotopově obohacený ligand nebo receptor
Izotopově filtrované NOESY experimenty

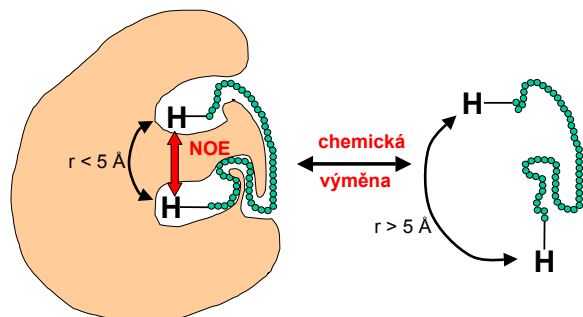
Transferred nuclear Overhauser effect



$$K_d = \frac{[E][L]}{[EL]}$$

$$K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Transferred nuclear Overhauser effect



Princip: informace o struktuře ligandu ve vázaném stavu je pomocí chemické výměny přenesena na volný, kde je detekována

Uspořádání: „malý“ ligand, který je viditelný NMR spektroskopii a velký substrát ($M_w > 40$ kDa) neviditelný pro NMR

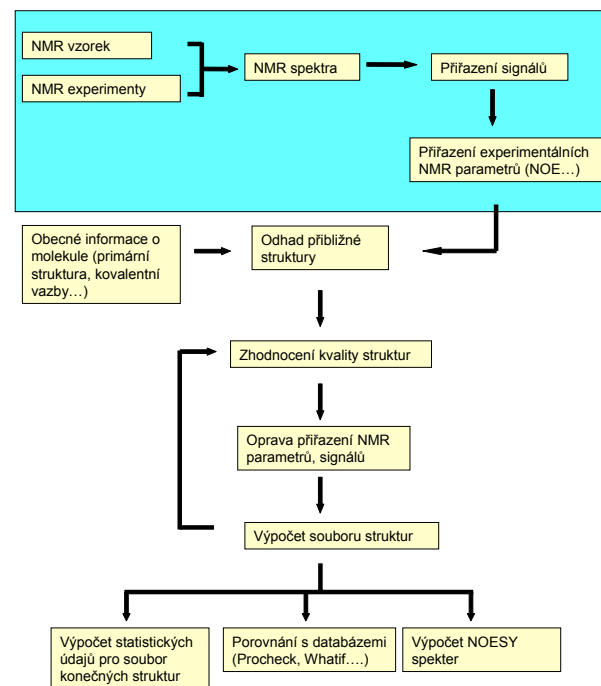
Podmínka: vhodná kinetika systému $10^{-8} > K_d > 10^{-3} \text{ M}^{-1}$

Využití:

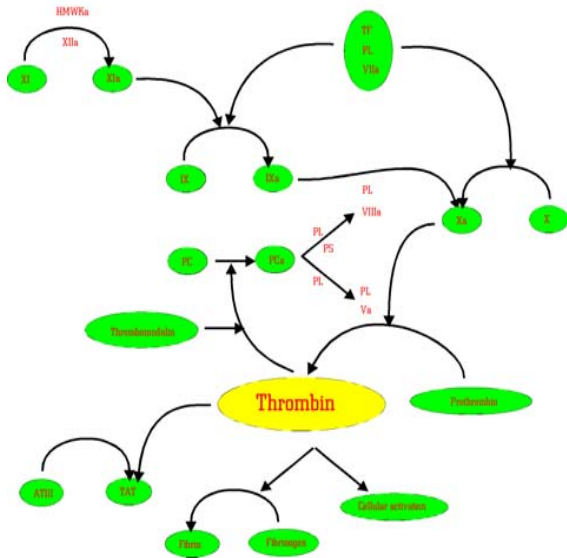
- struktura ligandu
- nepřímo struktura vazebného místa
- způsob vazby

Elegantní metoda pro design nových typů léčiv

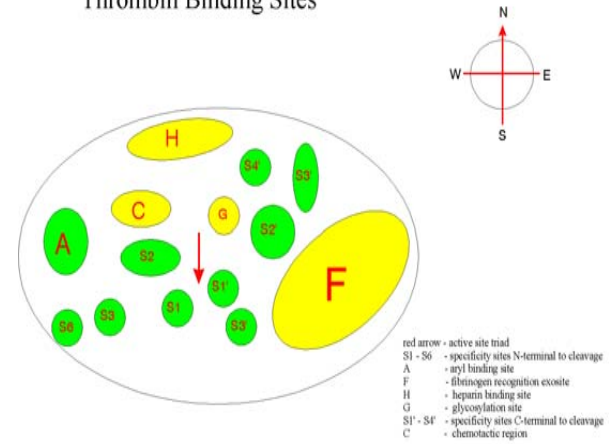
Strategie pro určování struktur biomolekul



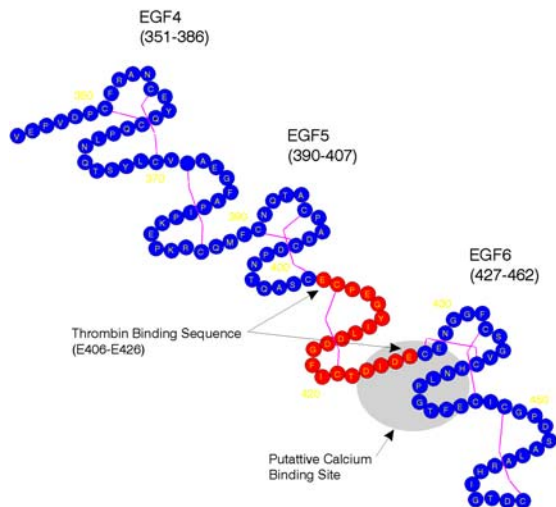
Blood coagulation pathway



Thrombin Binding Sites



Thrombomodulin



Uspořádání experimentu

A. Peptidové fragmenty z thrombomodulinu (5. EGF)

C-P-E-G-Y-I-L-D-D-G-F-I-C-T-D-I-D-E	TM52+5C
C-P-E-G-Y-I-L-D-D-G-F-x-C-T-D-I-D-E	TM52-1+5C
C-E-A-P-E-G-Y-I-L-D-D-G-F-I-C-T-D-I-D-E	TM52+2+5C
E-C-P-E-G-Y-I-G-D-x-x-F-x-C-T-D-I-D-E	TM52-3+6C
C-P-E-G-Y-F-G-D-D-G-S-x-C-T-D-I	TM52-1+4C

$M_w \approx 2$ kDa, konc. 0.7 mM

B. Bovine thrombin,

$M_w \approx 40$ kDa, konc. 0.07 mM, poměr k peptidu 1 : 10

Bovine prothrombin (prekursor)

$M_w \approx 70$ kDa, konc. 0.0035 mM, poměr k peptidu 1 : 20

C. NMR experimenty

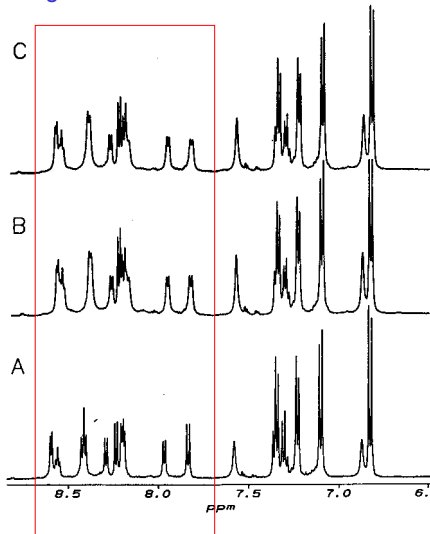
a) ^1H –titrace peptidu thrombinem (prothrombinem)

b) clean-TOCSY pro přiřazení rezonancí

c) NOESY (WATERGATE)

Titrace ligandu substrátem

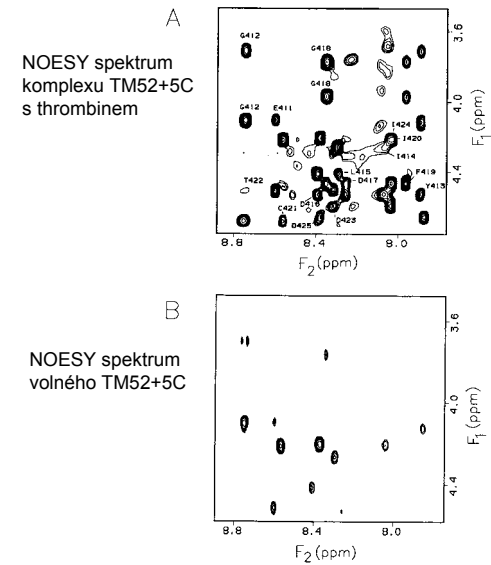
Důvod: testování specifické vazby substrátu a ligandu



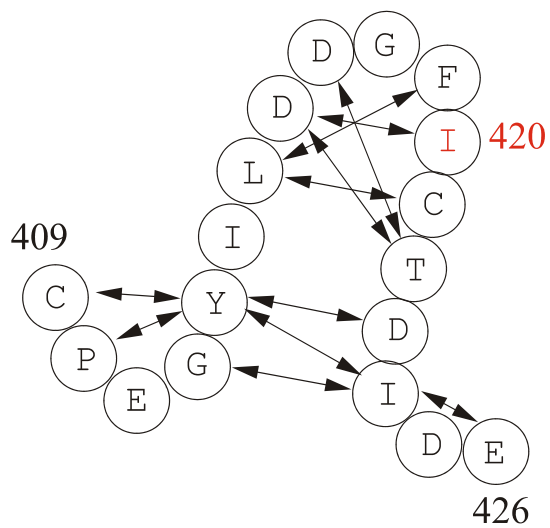
- A volný peptid TM52+5C
- B TM52+5C + bovine thrombin (1:10)
- C TM52+5C + bovine prothrombin (1:20)

NOESY spektrum peptidu TM52+5C ve volném a vázaném stavu.

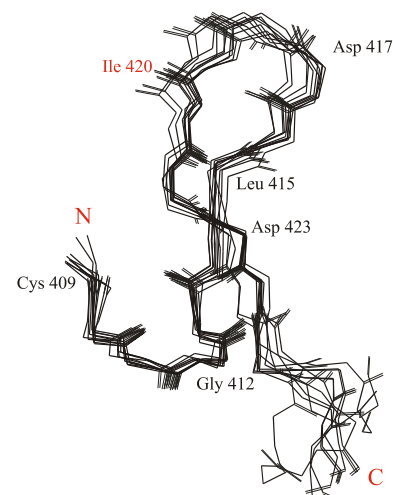
Možná struktura ligandu ve volném stavu nesmi interferovat se strukturou ve stavu vázaném !!!



Důležité NOE interakce dalekého dosahu
ligandu TM52+5C v komplexu s thrombinem

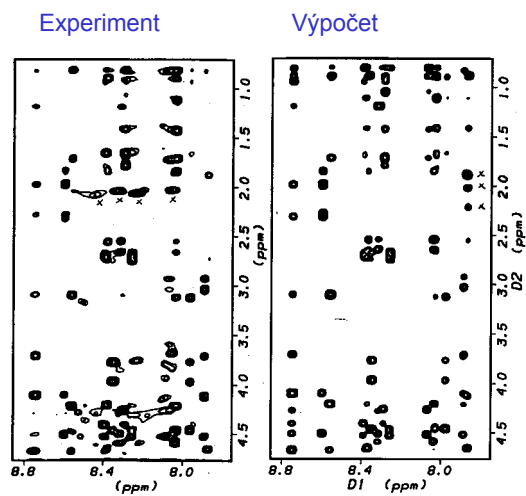


TM52+5 11 best structures

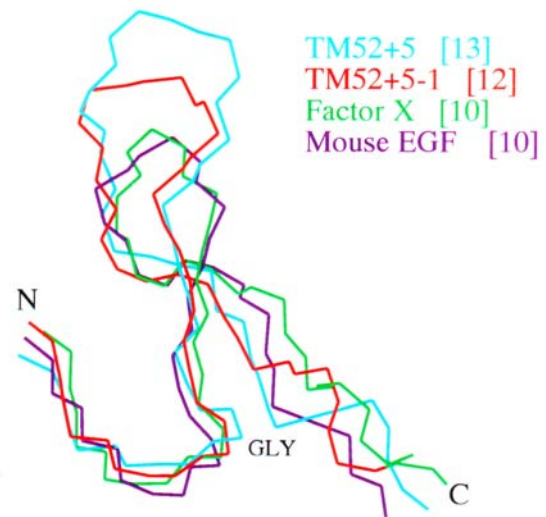


Structures were aligned according to the backbone atoms of residues Cys409-Leu415 and Ile420-Ile424. Root mean square deviation for residues Cys409-Ile424 is 0.46 Å calculated for the backbone atoms and 0.89 Å for all heavy atoms, respectively. There is no NOE violation larger than 0.5 Å.

Srovnání experimentálního a vypočteného NOESY spektra jako kritérium kvality určené struktury

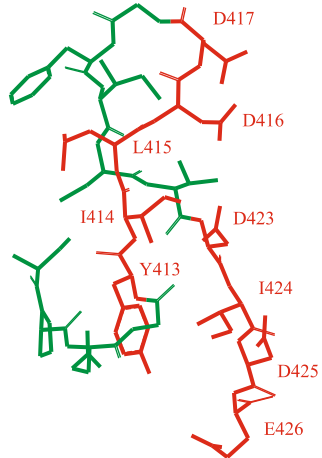


Srovnání struktury ligandu TM52+5C s některými známými EGF motivy

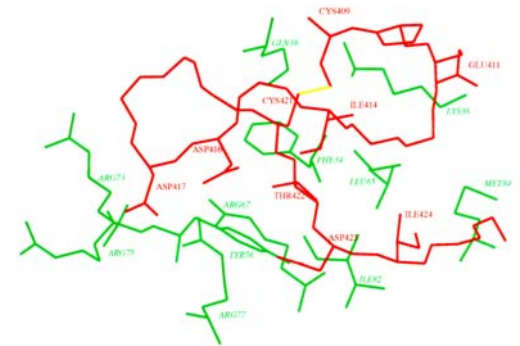


Určení kontaktních míst

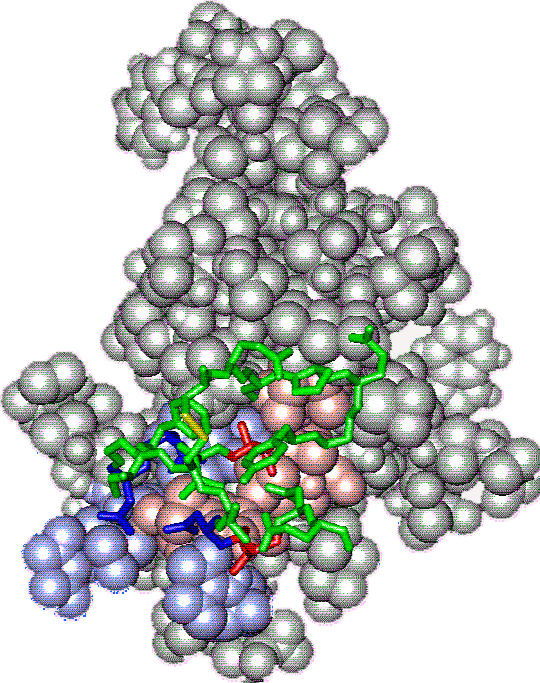
Intenzivním molekulárním modelováním známých struktur thrombinu a fragmentů thrombomodulinu byly vytypovány kontaktní místa mezi oběma molekulami.



Struktura vazebného místa thrombomodulinu a thrombinu



Complex between thrombin and TM52+5C



TM52+5 bound to the thrombin fibrinogen recognition exosite

