

NMR Proteínov

Jozef Hritz, hritz@ceitec.muni.cz

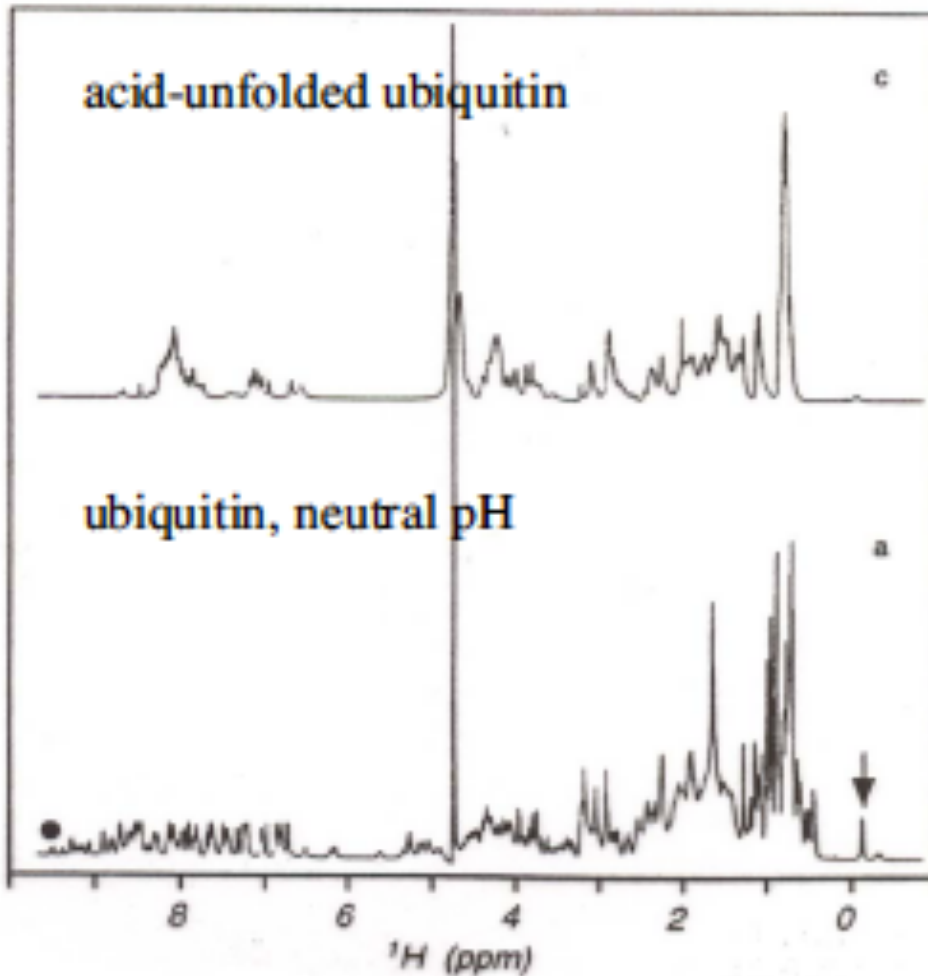
Študijný materiál:

http://www.ncbr.muni.cz/~lzidek/C9530/nuklearni_magneticka_rezonance.pdf

Praktické aspekty NMR proteínov

- Potrebné značné množstvo proteínu v optimálnej koncentrácii $> 1\text{mM}$. V mnohých prípadoch potrebné izotopické značenie
- Poskytuje informáciu o jednotlivých aminokyselinách/atómoch
- Určenie 3D štruktúry je časovo aj finančne relatívne náročné
- NMR umožňuje dať aj čiastočnejšiu odpoveď použitím jednoduchších/rýchlejších experimentov

1D ^1H NMR spektrum ubiquitínu

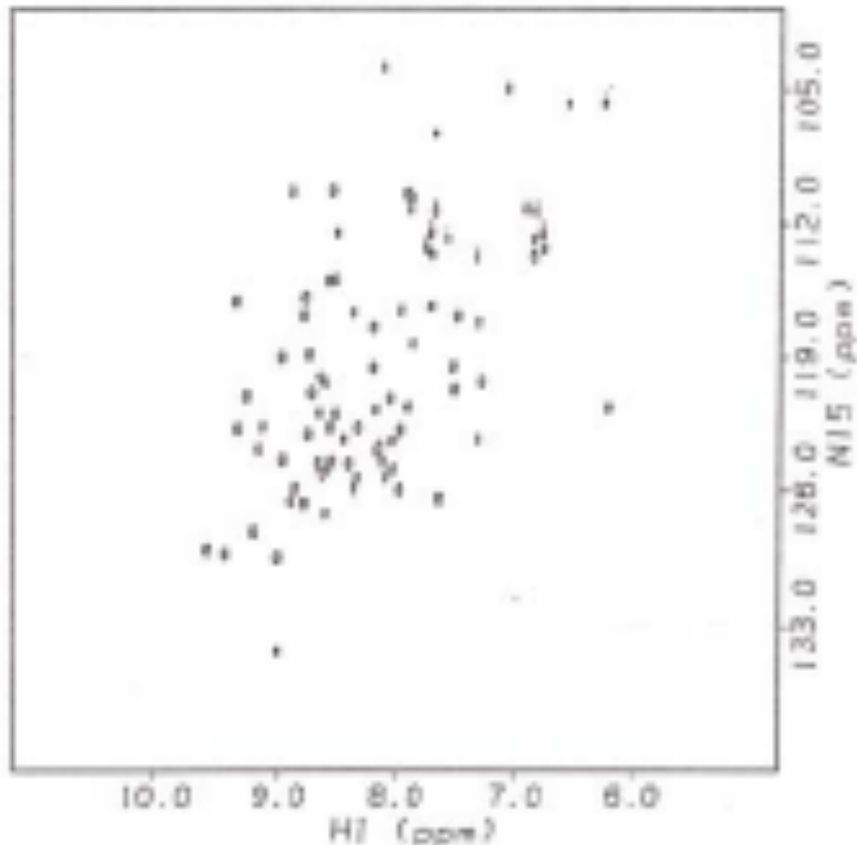


U denaturovaného ubiquitínu sú peaky širšie a v oblasti amidických vodíkov sú rozprestrené v podstatne užšej oblasti ako je tomu u zbaleného ubiquitínu (~6-10 ppm)

Použitelnosť ako pre izotopicky značené, tak aj neznačené vzorky proteínov

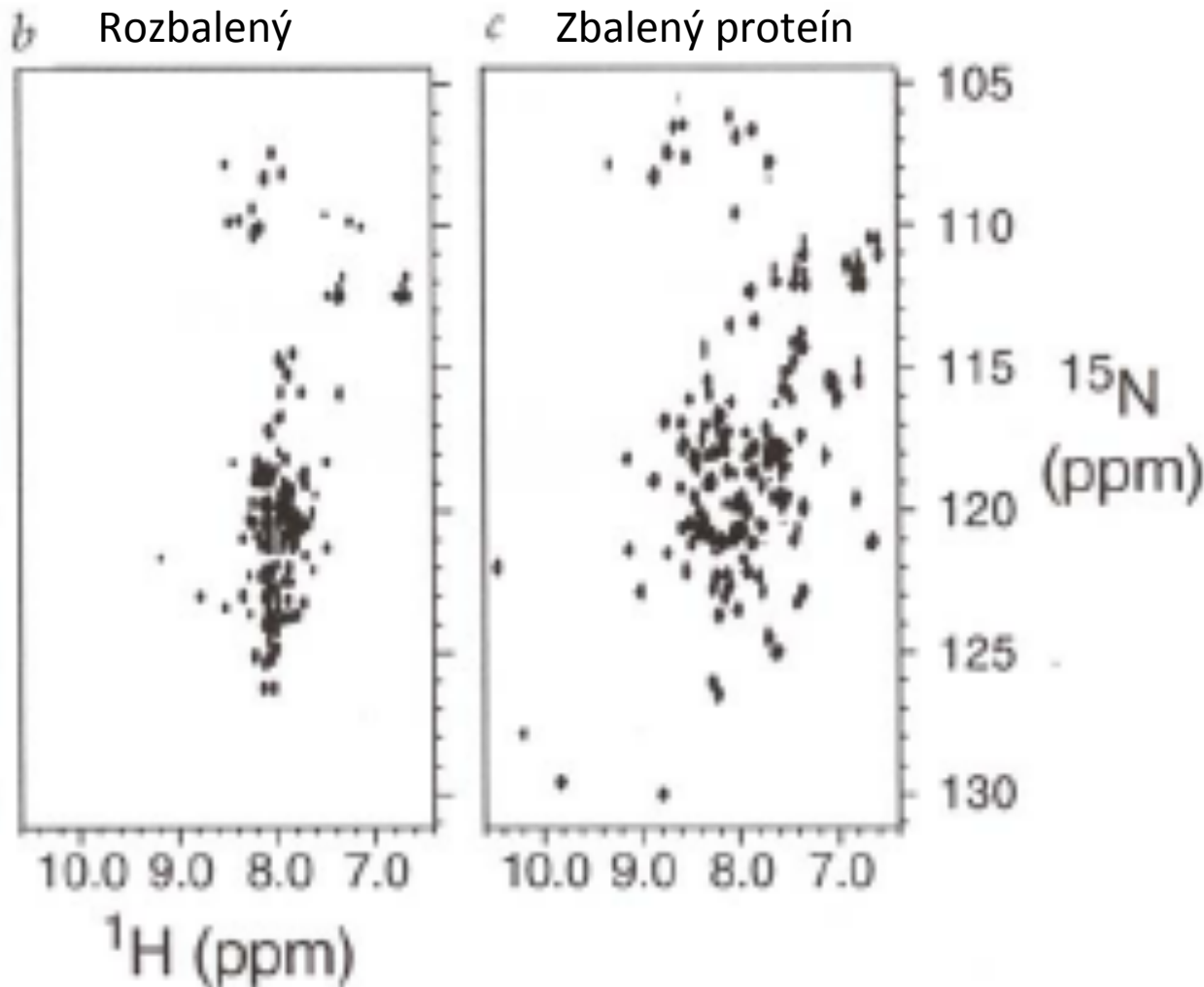
2D ^1H , ^{15}N korelačné NMR spektra (HSQC)

ubiquitin (76 amino acids, 8.5 kDa)



- Je potrebná ^{15}N izotopicky značená vzorka
- Oproti 1D ^1H spektru omnoho vyššie rozlíšenie, jeden peak zodpovedá jednej amidickej skupine.
- Častokrát označované aj ako proteín “finger-print” experiment

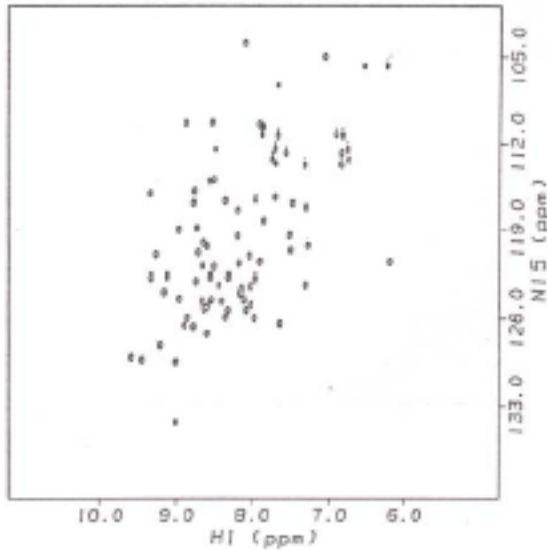
Charakteristické HSQC pre zbalený a rozbalený proteín



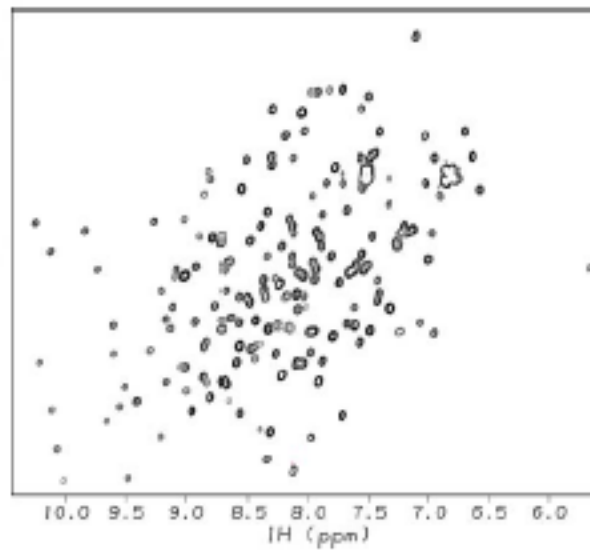
Hlavné rozdiely v disperzii a šírke peakov

Problémy NMR väčších proteínov

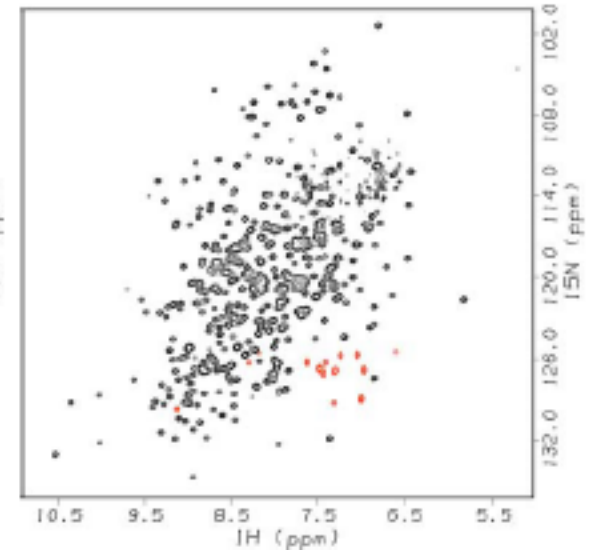
ubiquitin (76 amino acids, 8.5 kDa)



AlgH (189 amino acids, 20.2 kDa)

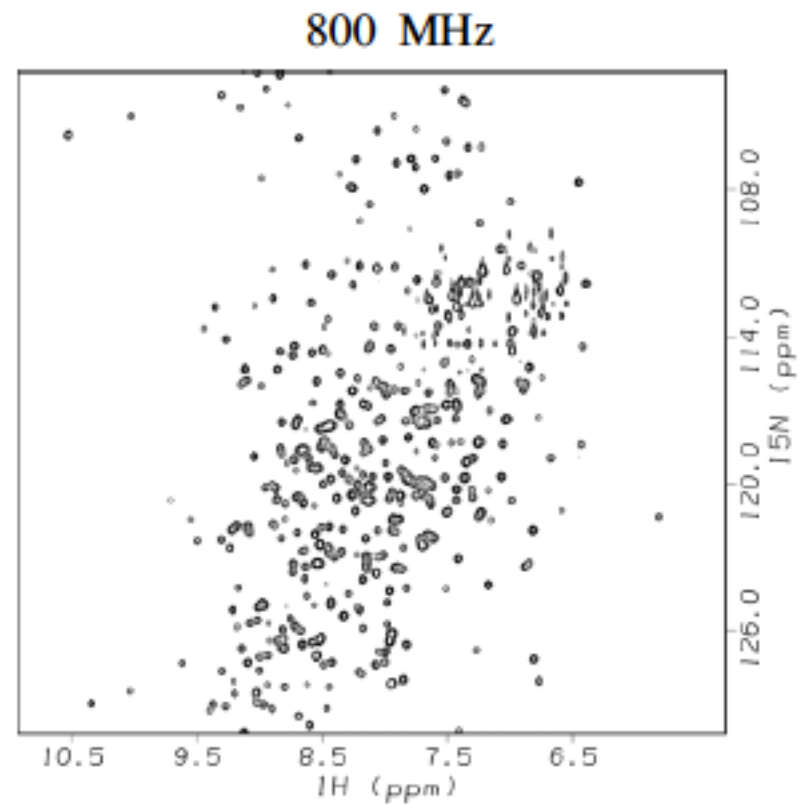
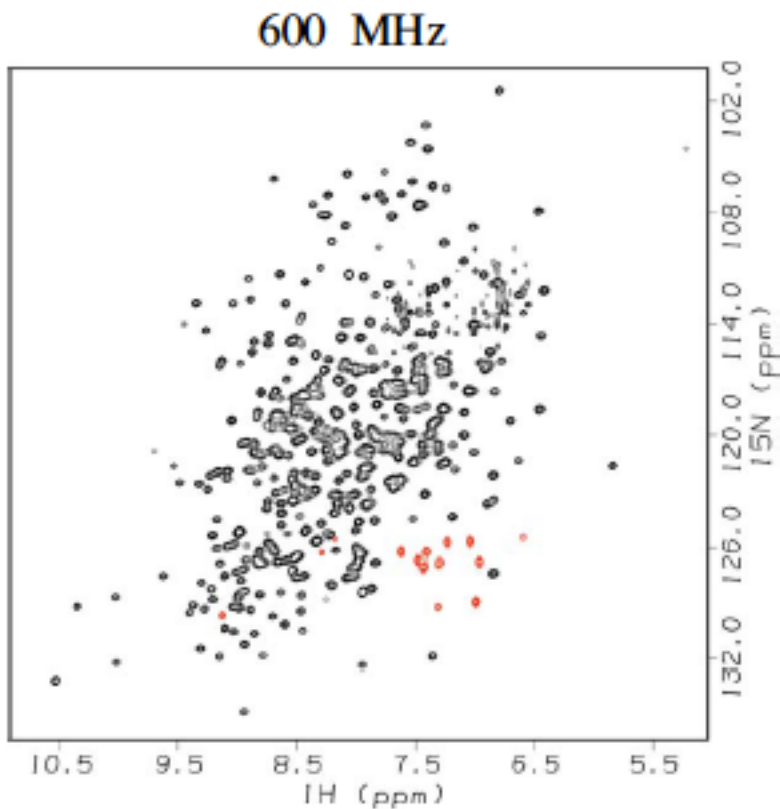


EPSP synthase (427 amino acids, 46.2 kDa)



U väčších proteínov zvažujúca sa šírka peakov z dôvodu väčšieho rotačného korelačného času. Väčšia šírka peakov spolu s ich vyšším počtom vedie k prekryvu peakov a problémom s ich rozlíšením.

Vplyv vyššieho magnetického poľa na rozlíšenie spektra

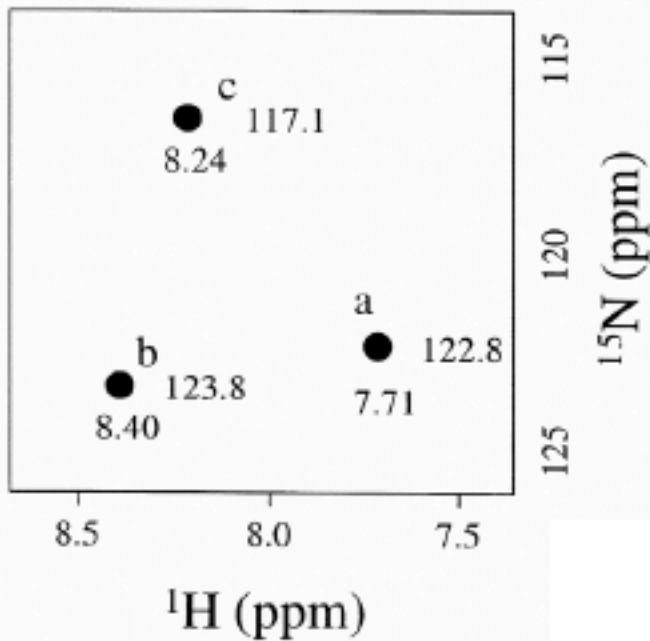


Trosy HSQC

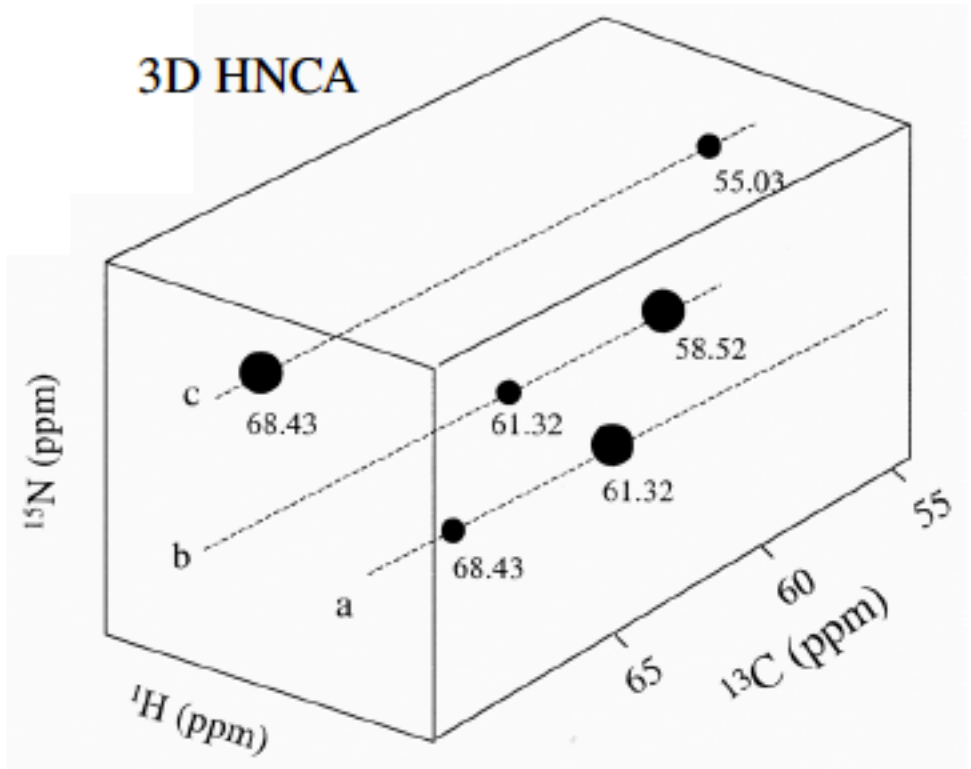
3D NMR spektroskopia

Príklad zvýšeného rozlíšenia na 3D HNCA NMR experimente

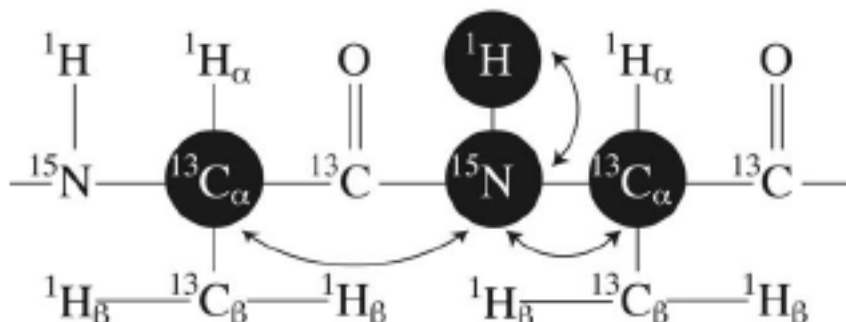
2D HNCA projection



3D HNCA

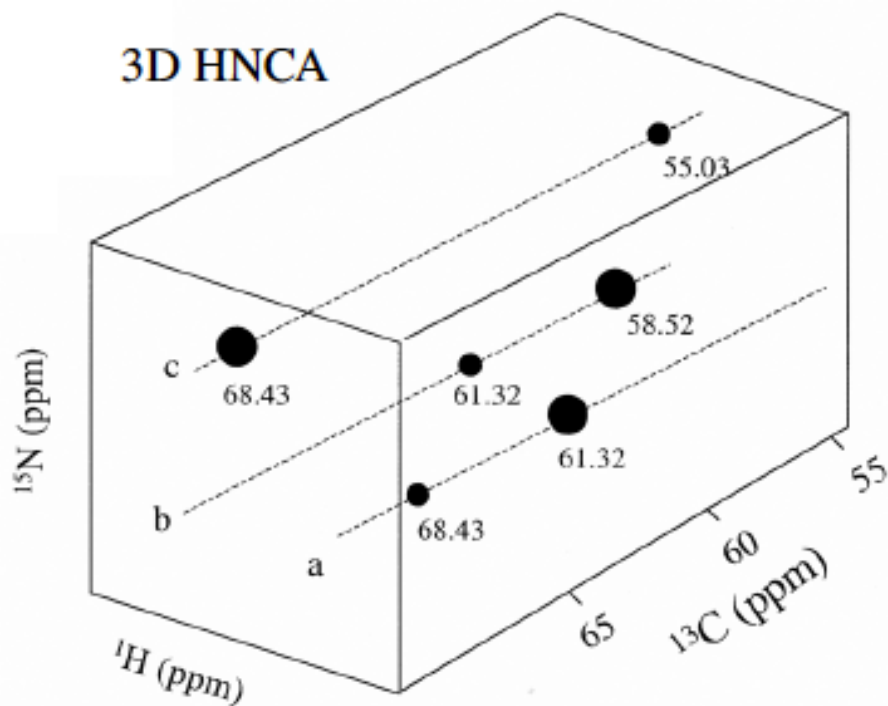


Priradenie peakov v HSQC jednotlivým aminokyselinám pomocou HNCA



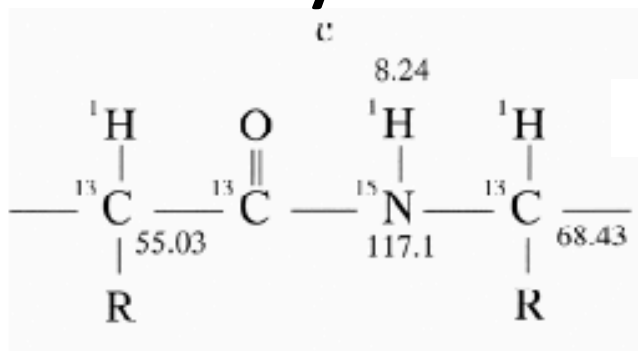
V HNCA experimente sú korelované chemické posuny $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^{\alpha}_i$ a $^{13}\text{C}^{\alpha}_{i-1}$

3D HNCA

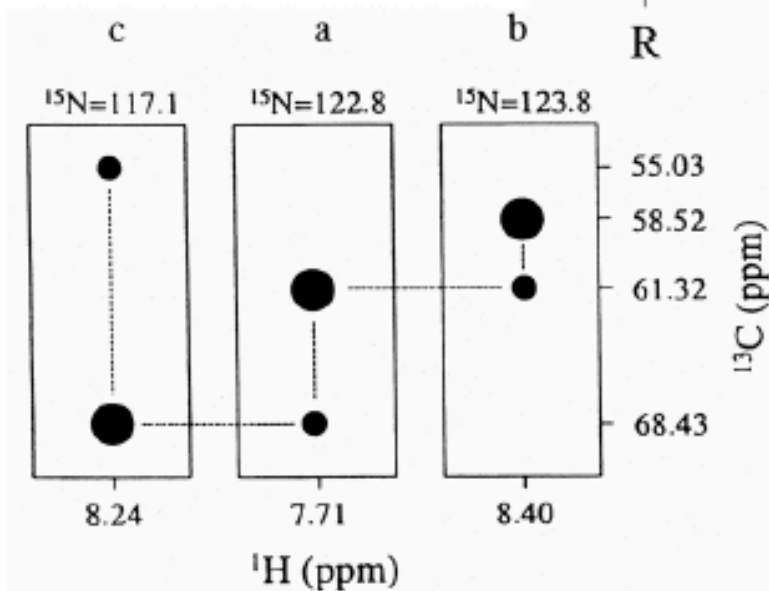
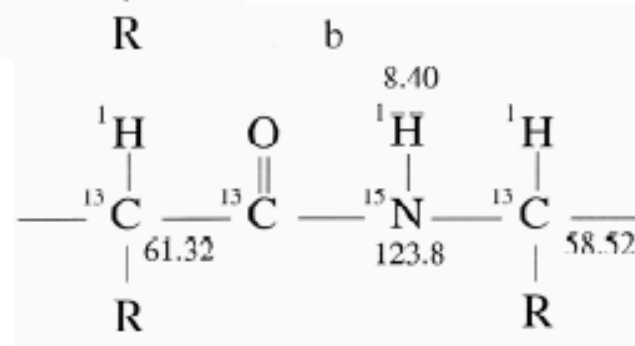
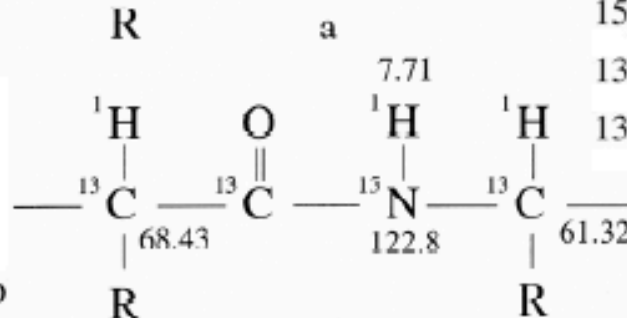


	c	a	b
$^1\text{H}^{\text{N}}_i$	8.24	7.71	8.40
$^{15}\text{N}_i$	117.1	122.8	123.8
$^{13}\text{C}^{\alpha}_i$	68.43	61.32	58.52
$^{13}\text{C}^{\alpha}_{i-1}$	55.03	68.43	61.32

Priradenie peakov v HSQC jednotlivým aminokyselinám pomocou HNCA



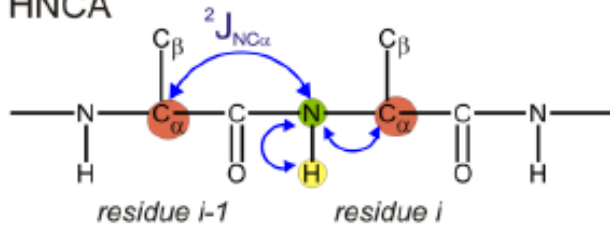
	c	a	b
$^1\text{H}_{\text{N}_i}$	8.24	7.71	8.40
$^{15}\text{N}_i$	117.1	122.8	123.8
$^{13}\text{C}^{\alpha}_i$	68.43	61.32	58.52
$^{13}\text{C}^{\alpha}_{i-1}$	55.03	68.43	61.32



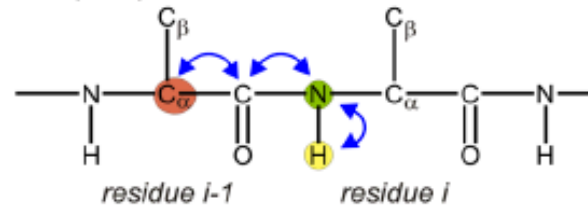
Pri väčších proteínoch problém s rozlíšením silnejších a slabších signálov, prekryv

Priradenie kostry väčších proteínov

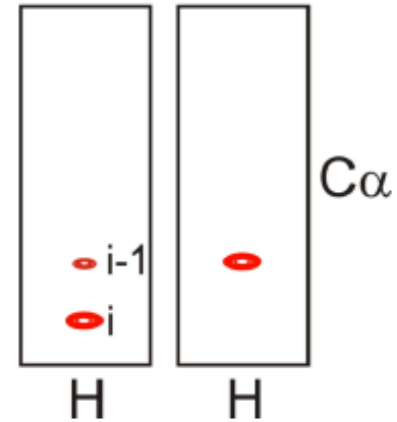
HNCA



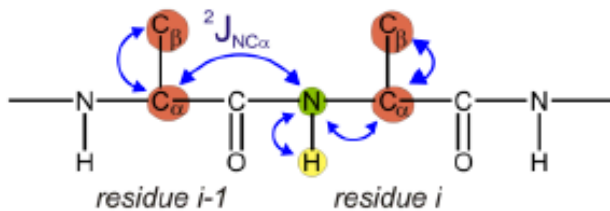
HN(CO)CA



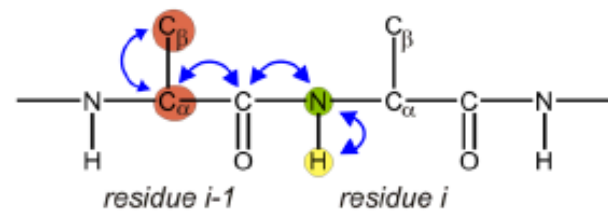
HNCA HN(CO)CA



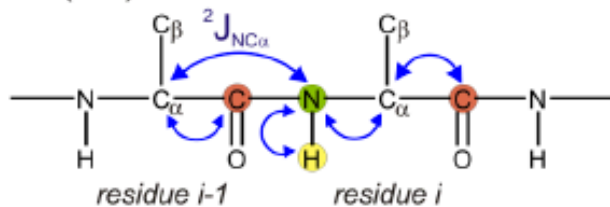
HNCACB



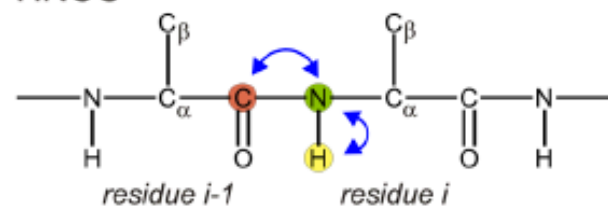
HN(CO)CACB



HN(CA)CO



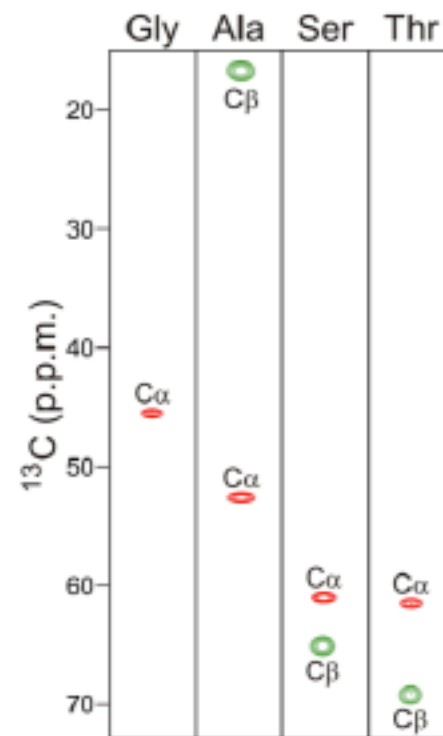
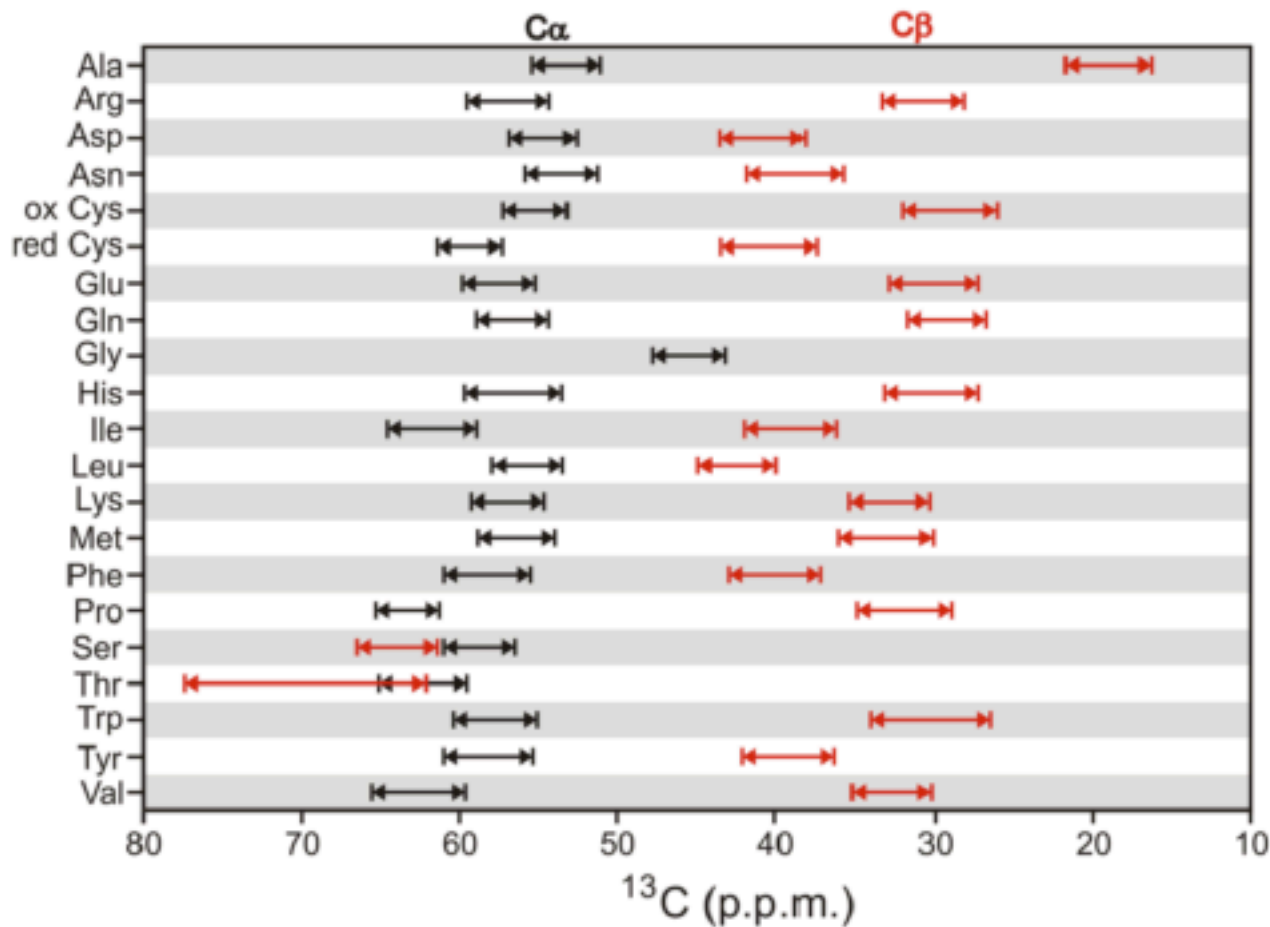
HNCO



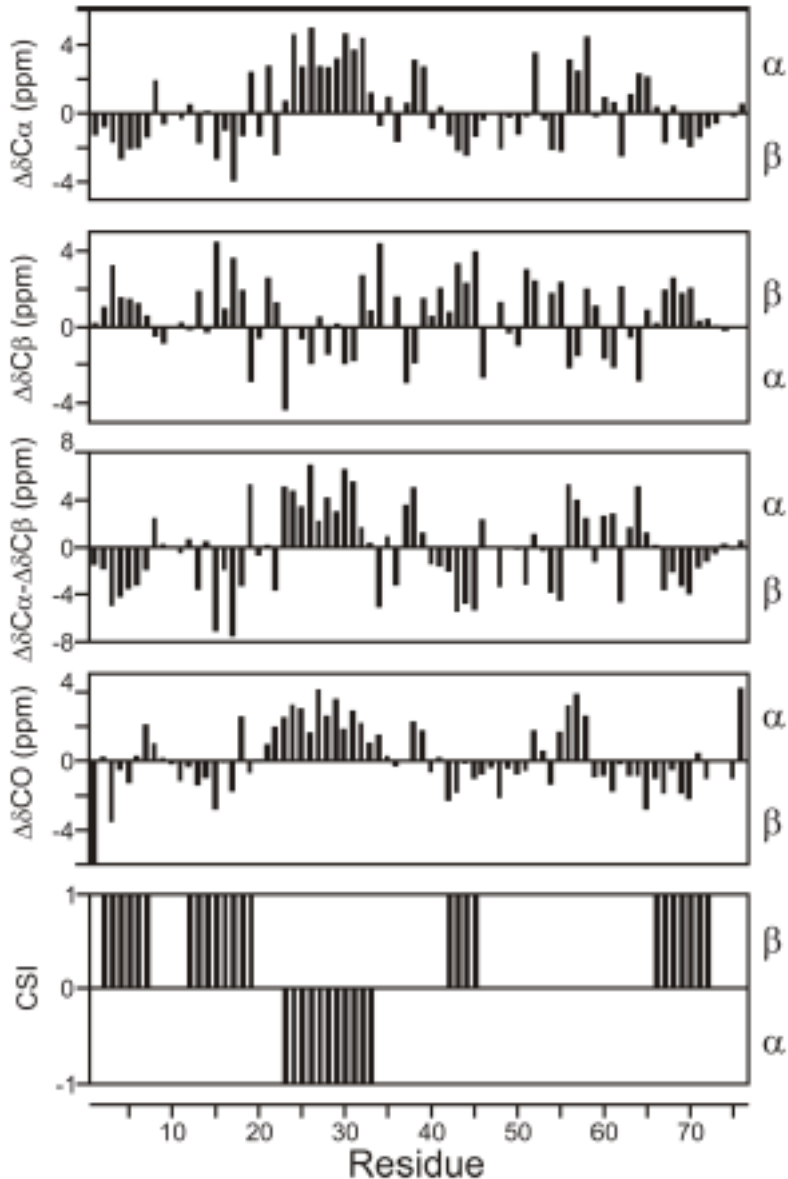
Intra/Inter-residue

Inter-residue

Sekvenčné priradenie



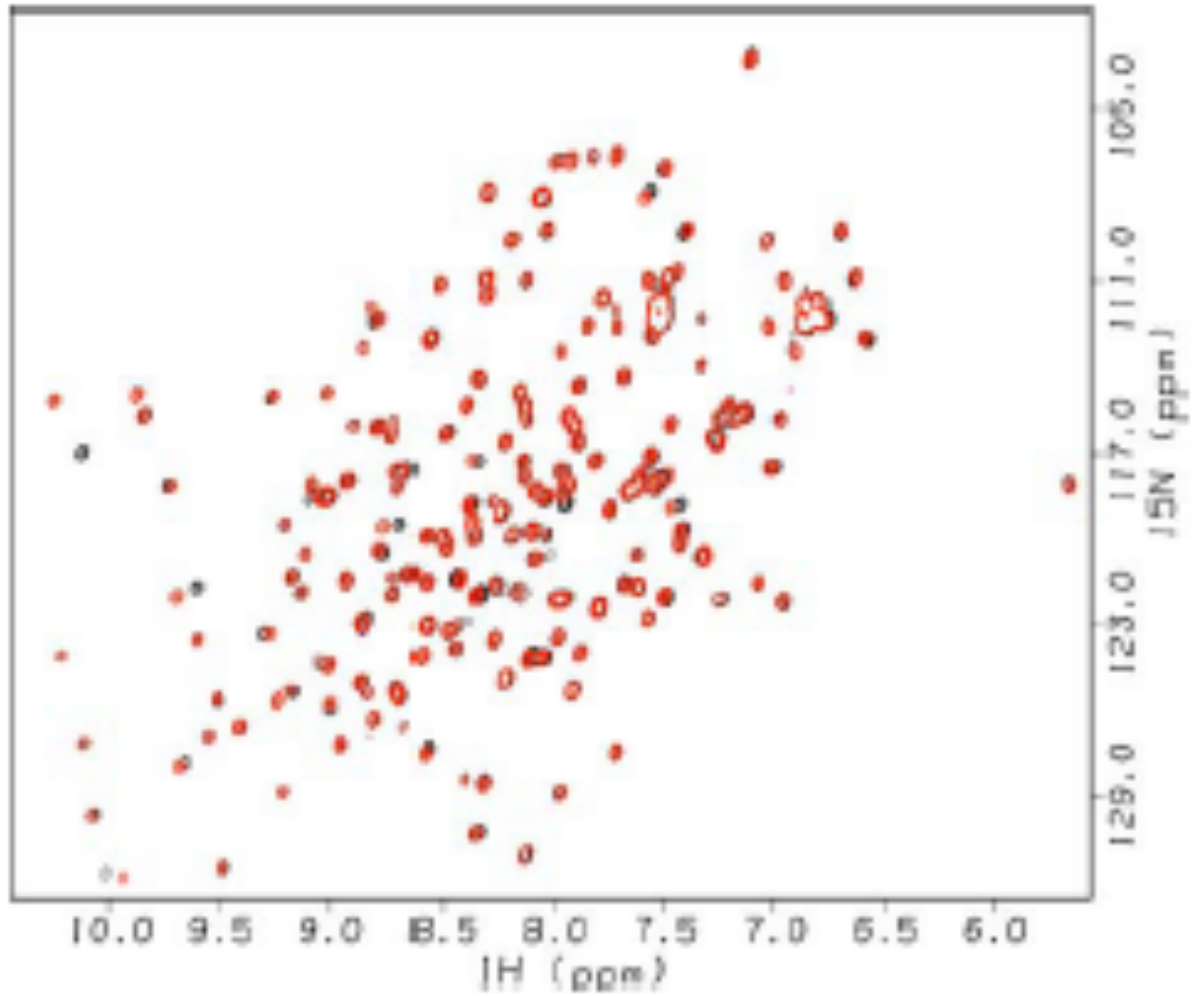
Predikcia sekundárnej štruktúry



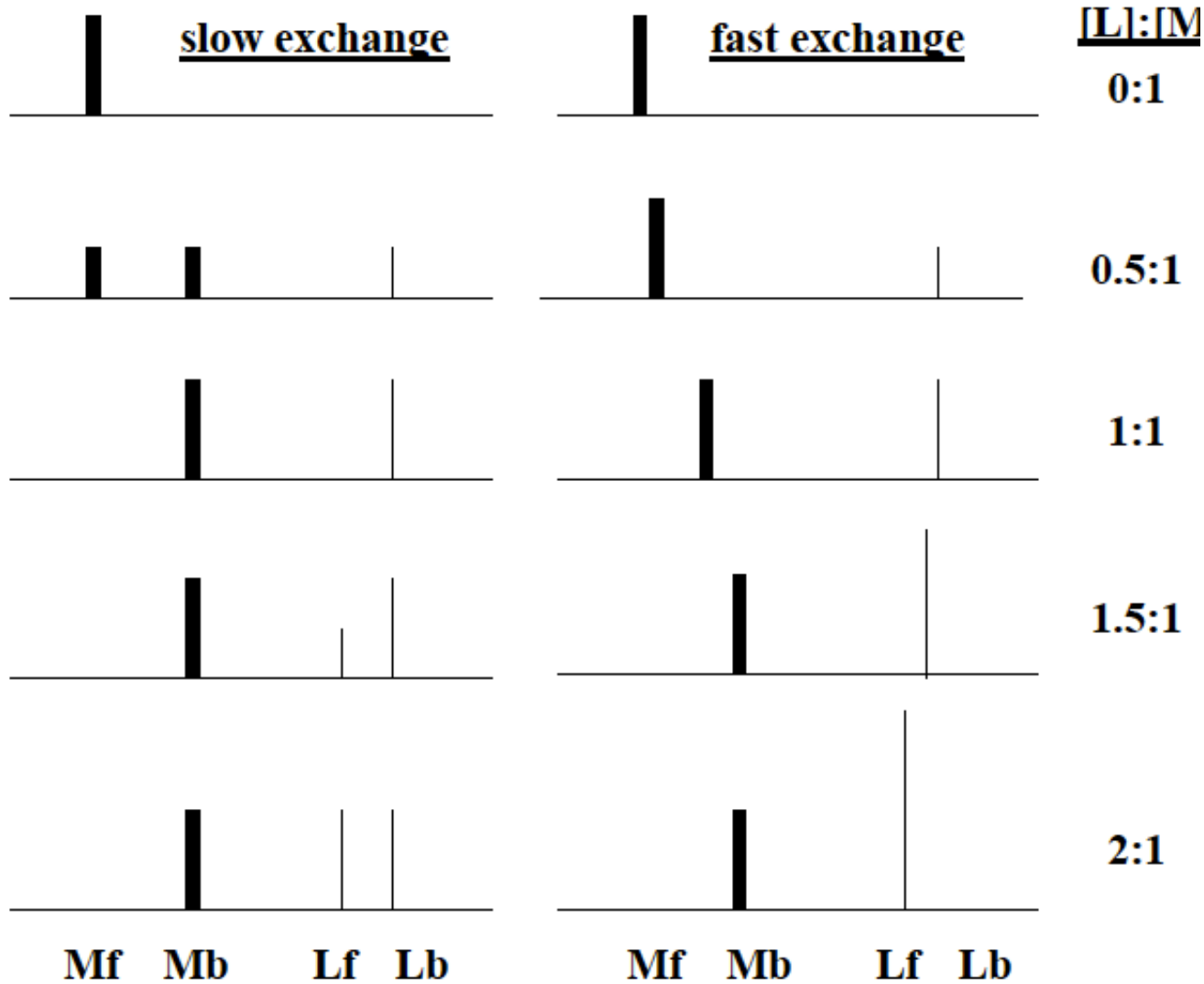
C_{α} , C_{β} a CO chemické posuny relatívne k hodnotám pre náhodný reťazec majú výraznú koreláciu s torznými uhlami kostry proteínu φ a ψ .

Wishart, D.S. and B.D. Sykes. The ^{13}C chemical shift index. A simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical shift data. J. Biomol. NMR 4:171-180 (1994)

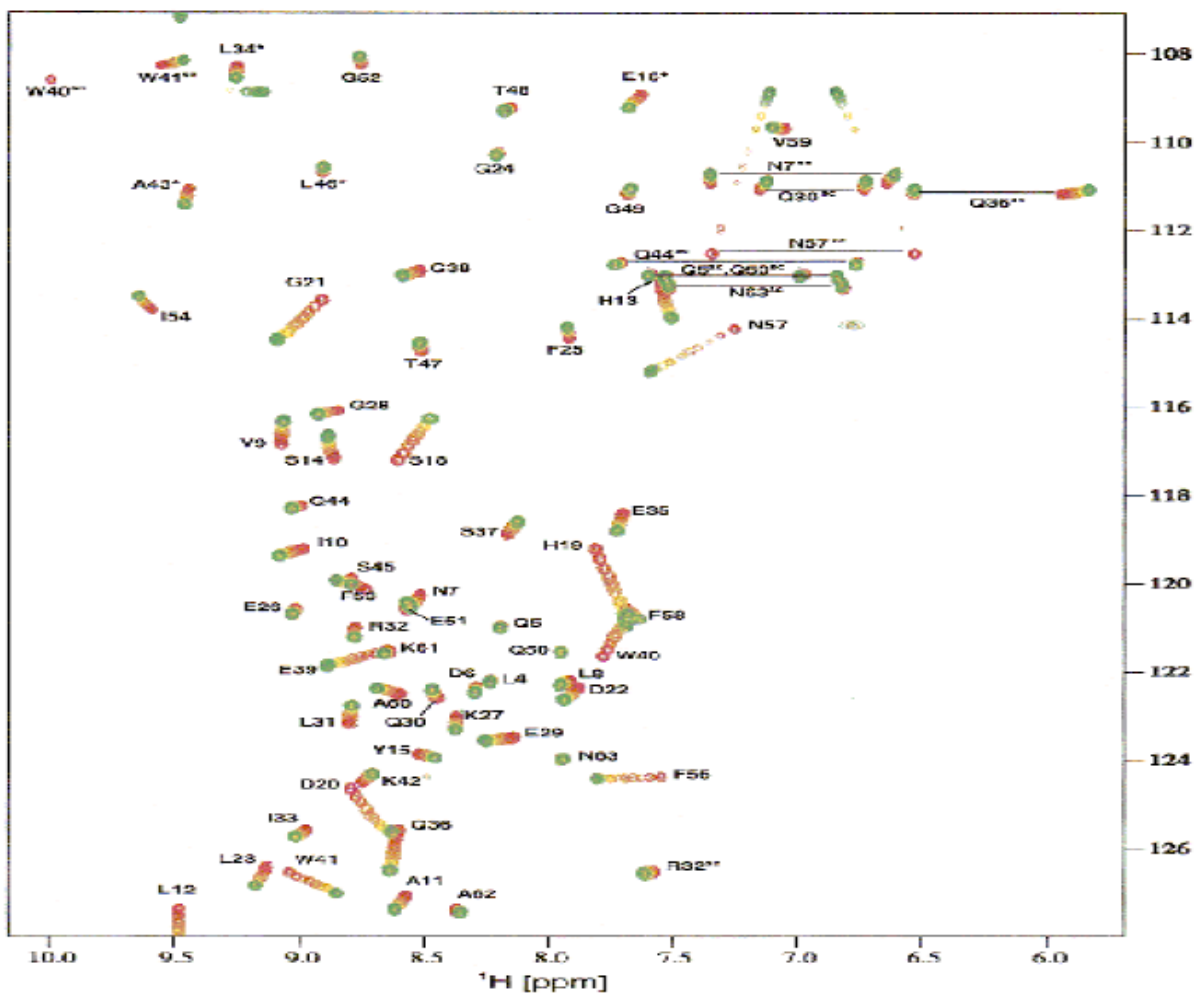
Efekt mutácie



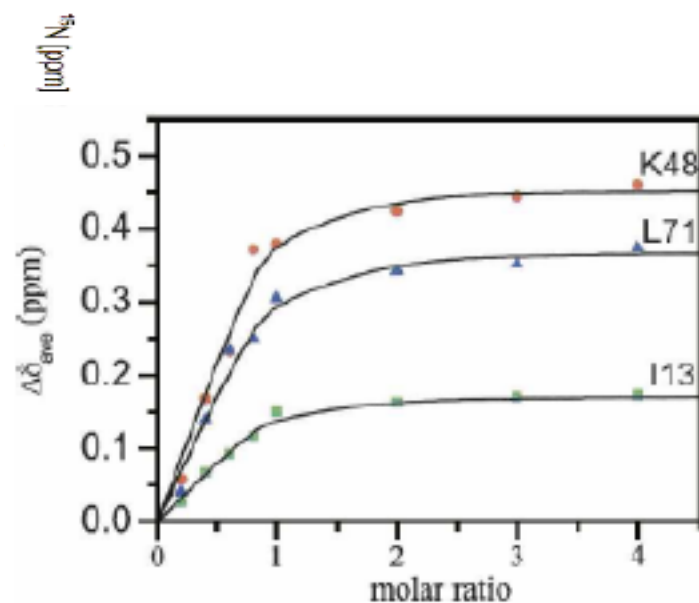
Titračné merania



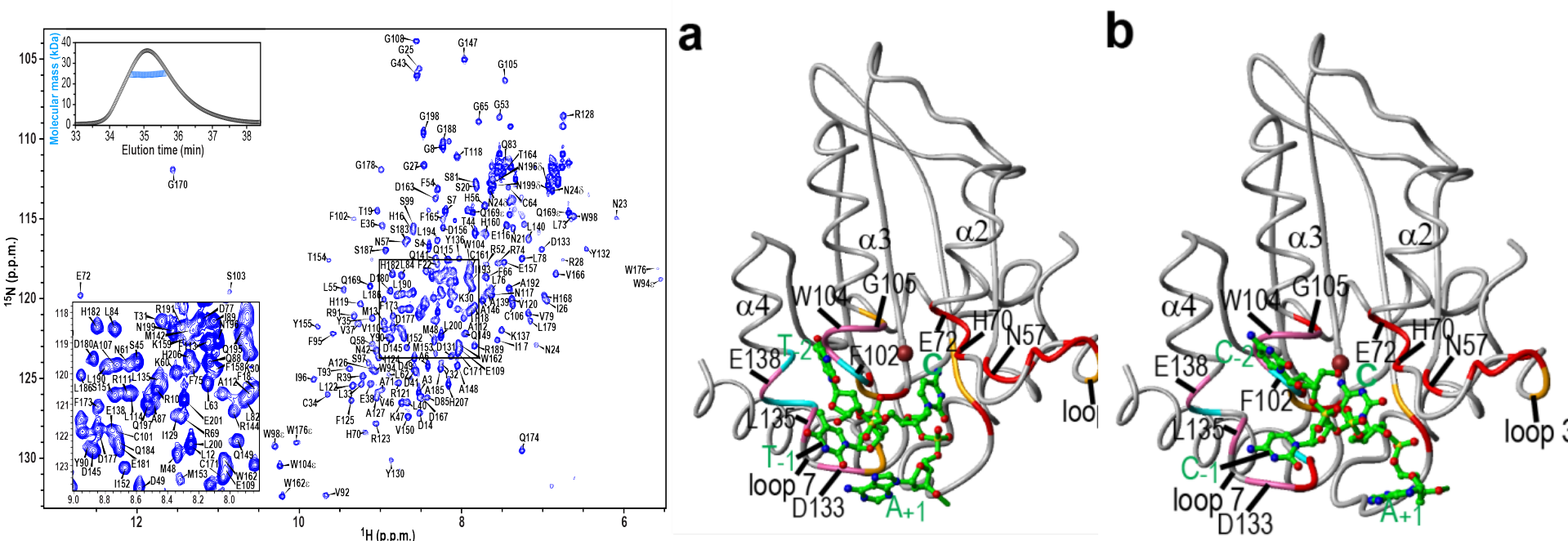
^1H - ^{15}N HSQC titrácia v režime rýchlej výmeny



Možnosť sledovať viazanie ligandu simultánne do viacerých väzobných miest

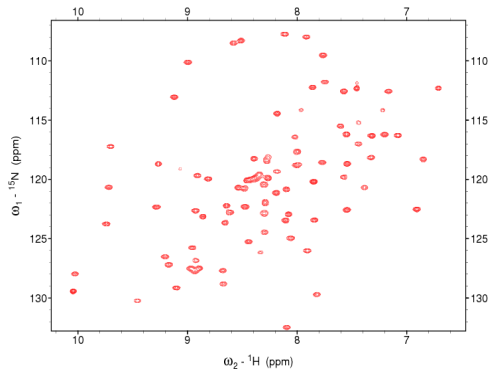


NMR titrácie ako nástroj pre filtrovanie súboru väzobných konformácií ligandu generovaného molekulovým dokovaním



Byeon I-J., Ahn J., Mitra M., Byeon C-H., Hercík K., Hritz J., Charlton L., Levin J., Gronenborn A.M. NMR structure of human restriction factor APOBEC3A reveals substrate binding and enzyme specificity. *Nature Commun.* **2013**, 4, 1890

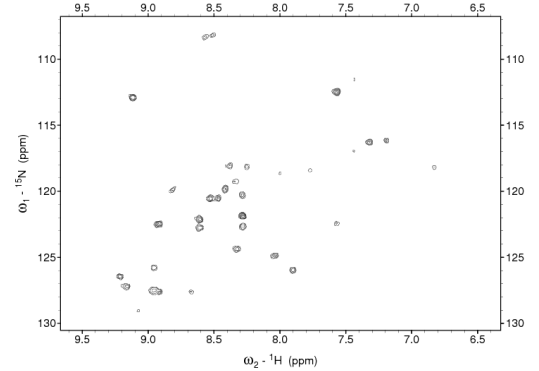
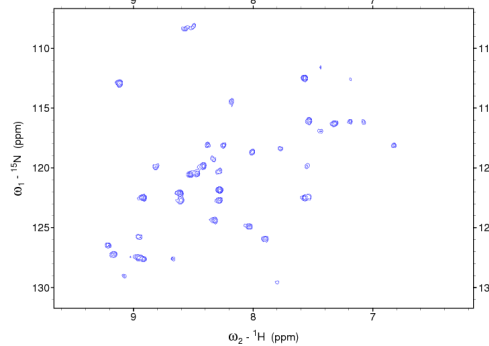
H/D výmena



No D_2O

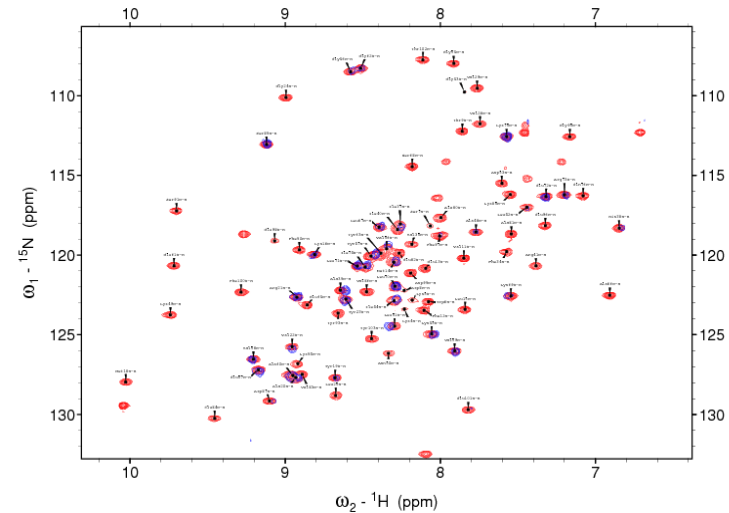


1st HSQC after D_2O

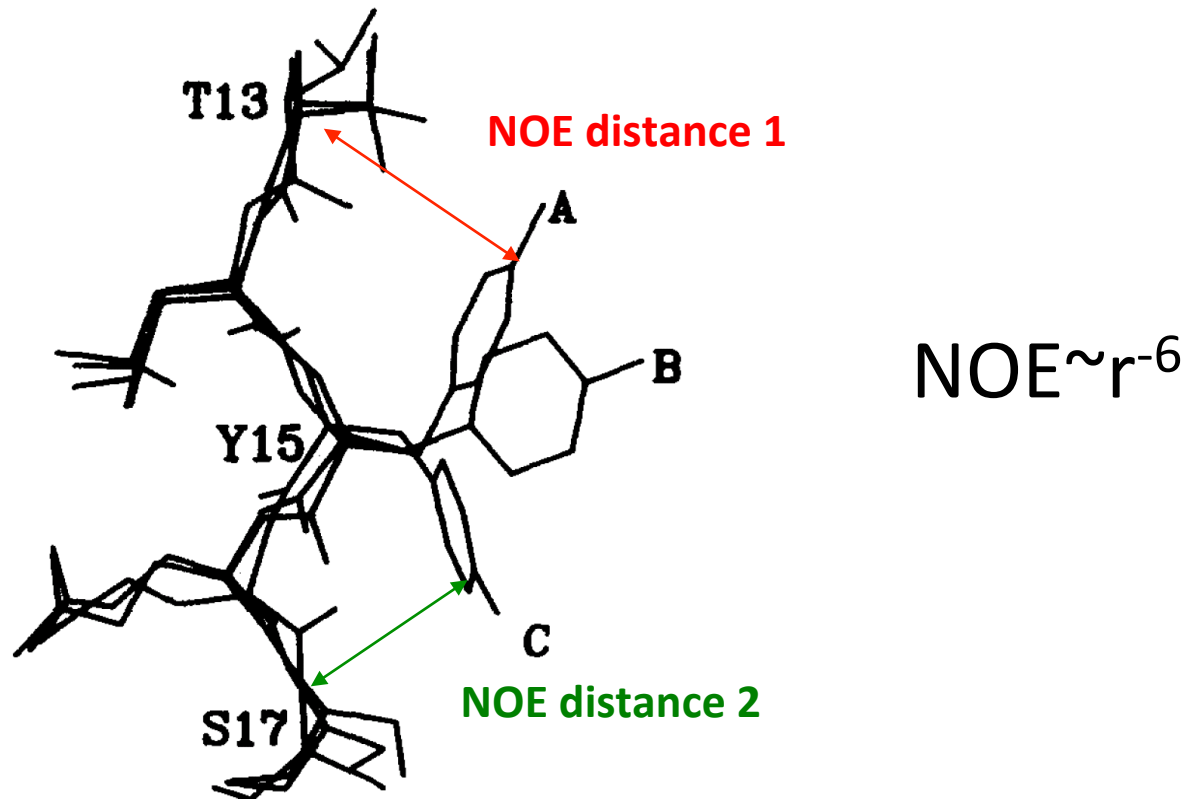


t = 60 min

Po výmene H za D mizne signál v HSQC. Umožňuje to určiť povrchové verzus vnorené reziduá, ktoré sa len zriedkavo dostávajú do kontaktu s D_2O , kde by mohlo dôjsť k výmene.



Pozor: Proteíny sú flexibilné!



J. Mol. Biol. (1990) 214, 223-235

Time-averaged Nuclear Overhauser Effect Distance Restraints Applied to Tendamistat

Andrew E. Torda, Ruud M. Scheek and Wilfred F. van Gunsteren