

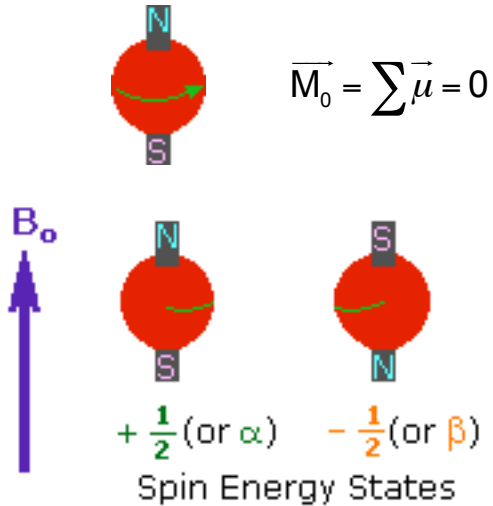
NMR/EPR Proteínov

Jozef Hritz

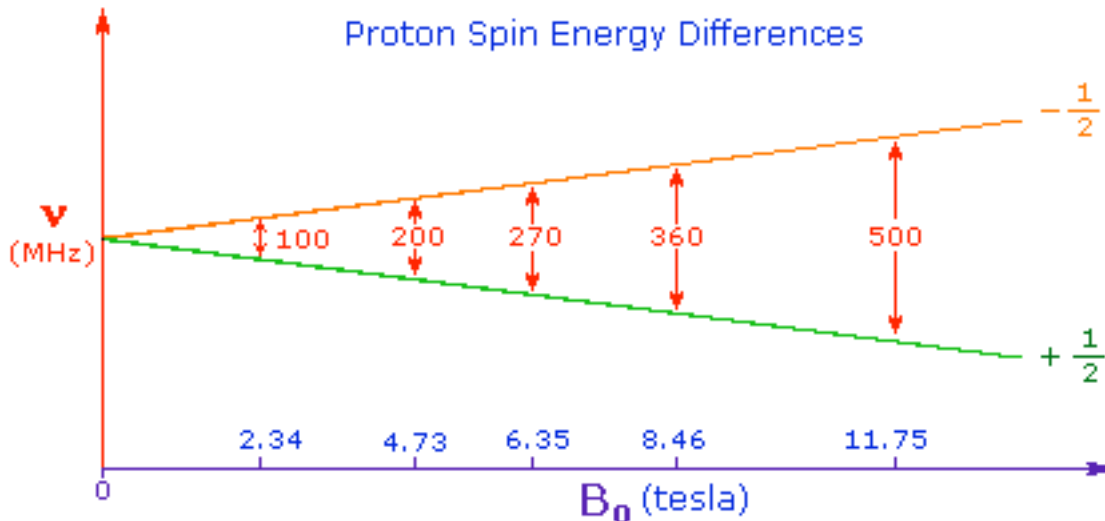
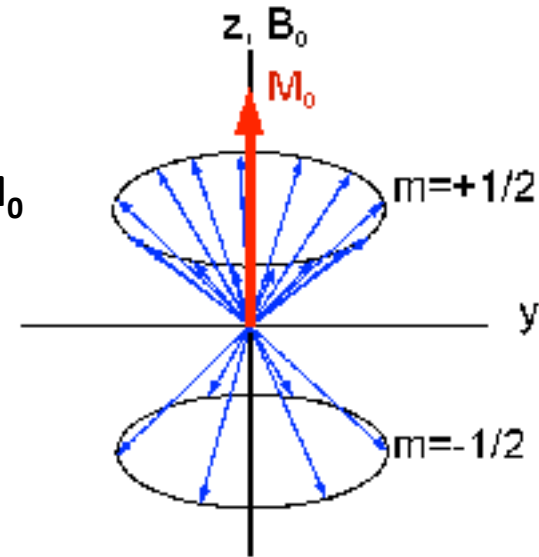
*Central European Institute of Technology (CEITEC)
Structural Biology, Brno*



Základné pojmy



Výsledná nenulová Magnetizácia M_0
vo vonkajšom magnetickom poli B_0



$$\Delta E = \gamma h B_0 / 2\pi = h \nu_0 / 2\pi$$

γ – gyromagnetický pomer

ν_0 – Larmorova frekvencia

h – Planckova konštanta

Odhad citlivosti NMR

| Nuclei | $\gamma 10^7 \text{T}^{-1} \text{s}^{-1}$ | ν/MHz | Natural Abundance |
|-----------------|---|------------------|-------------------|
| ^1H | 26.75 | 400 | 99.985 |
| ^2H | 4.11 | 61.4 | 0.015 |
| ^{13}C | 6.73 | 100.6 | 1.108 |
| ^{15}N | -2.71 | 40.5 | 0.37 |
| ^{19}F | 25.18 | 376.5 | 100.0 |
| ^{31}P | 10.84 | 162.1 | 100.0 |

$$B_0 = 2.35 \text{ T}$$

$$\nu = \frac{\mu B_0}{h I} = \frac{4.68 \mu}{h}$$



Aký je podiel protónov ktorých spiny smerujú nahor (smer B_0) vs. nadol v magnetickom poli 22.3 T (950MHz)?

$$\begin{aligned} N_{\alpha}/N_{\beta} &= \exp(\Delta E/kT) \\ &= \exp((22.3T * 26.75 * 10^7 T^{-1}s^{-1} * 1.05 * 10^{-34}Js)/(1.38 * 10^{-23} J.K^{-1} * 297K)) \\ &= \exp(0.000153) \\ &= 1.000153 \end{aligned}$$

Pre celkový počet protónov 2000153 ich bude smerovať

nahor: 1000153

nadol: 1000000

Citlivosť NMR metódy je omnoho nižšia v porovnaní s napr. optickými metódami

Princíp NMR pulzných meraní

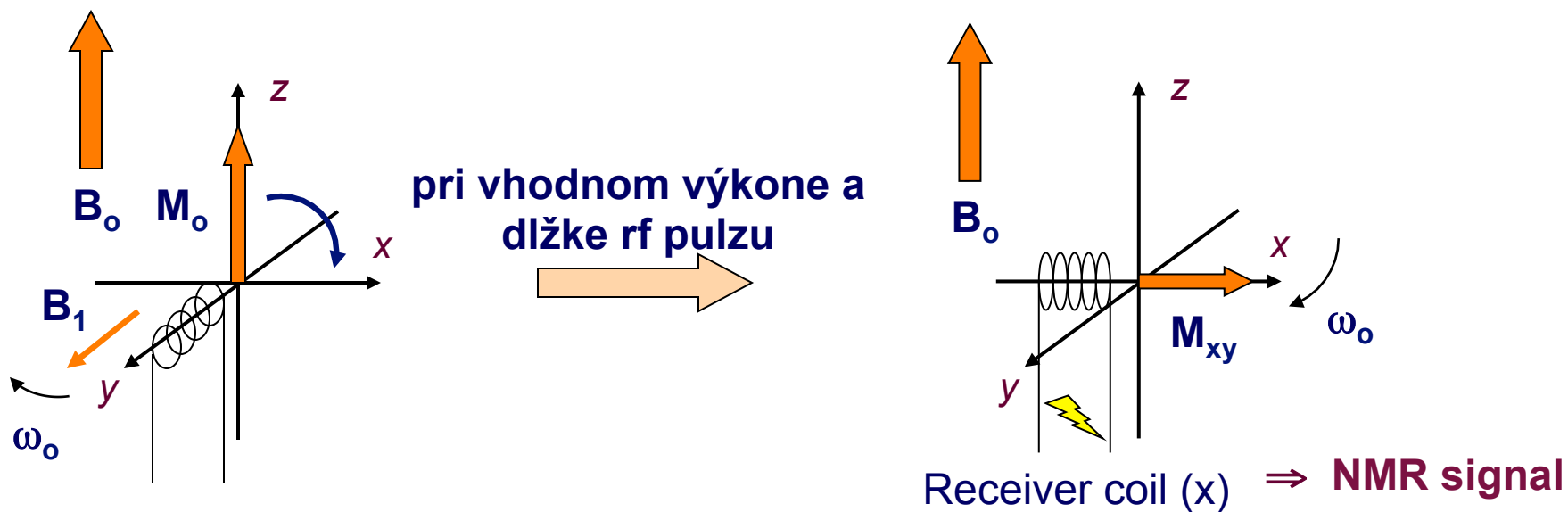
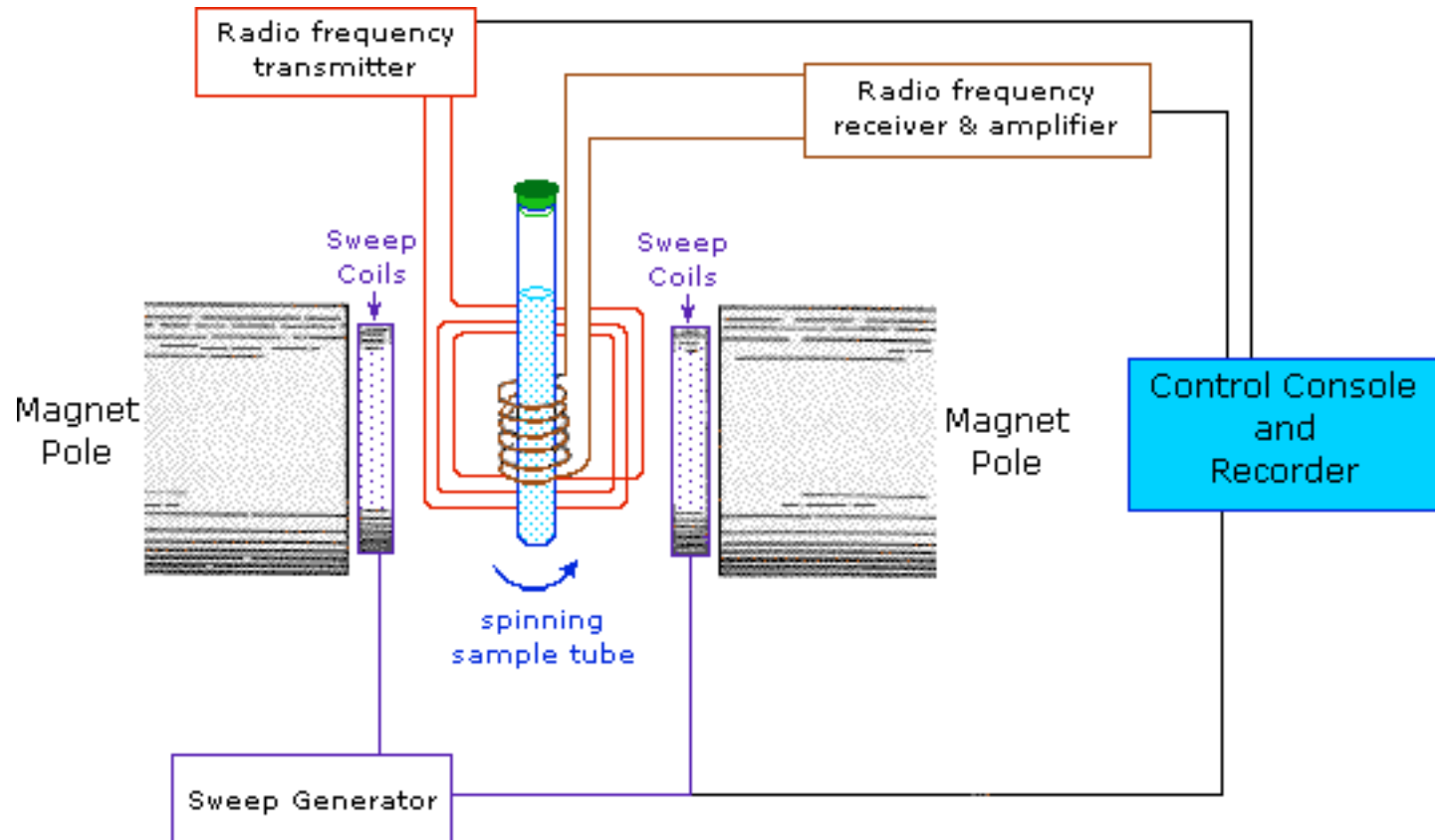


Schéma NMR spektrometra



The chemical shift

V praxi sa namiesto rezonančnej frekvencie určitého atómu používa chemický posun, ktorý je definovaný ako:

$$\delta(\text{ppm}) = 10^6 \cdot \frac{\nu(\text{vzorka}) - \nu(\text{referencia})}{\text{frekvencia NMR spektrometra}}$$

Výhody:

- **kompaktnejší zápis**
- **nezávislosť na poli NMR spektrometra**

Typický rozsah ^1H chemických posunov: 0-10 ppm

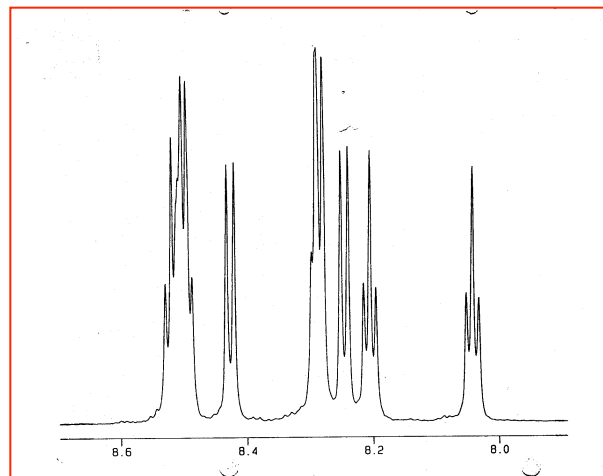
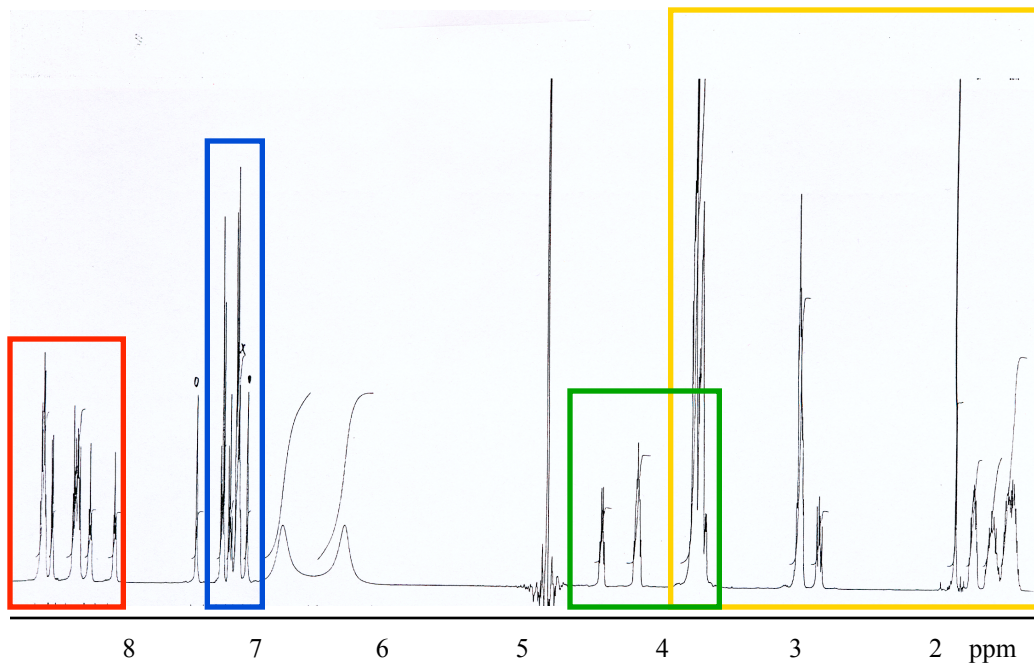
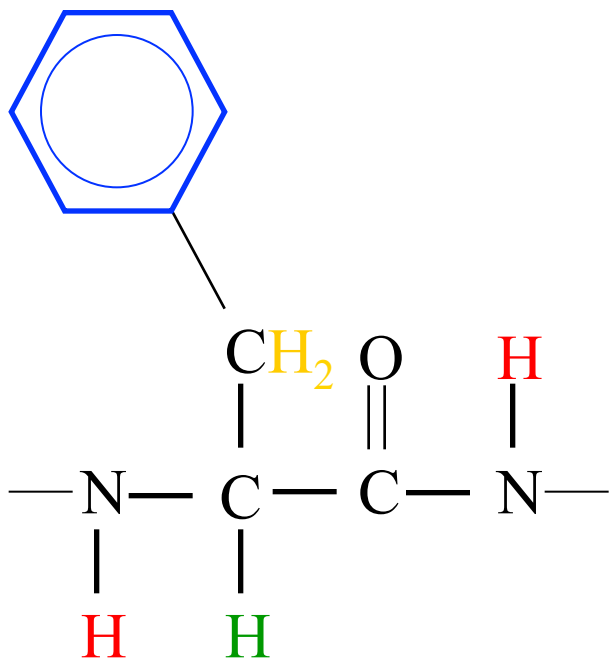
Chemický posun atómu závisí na:

- **type atómu (HN, alifatický, aromatický vodík, ...)**
- **type aminokyseliny (Ala, Phe, ...)**
- **chemické okolie atómu**

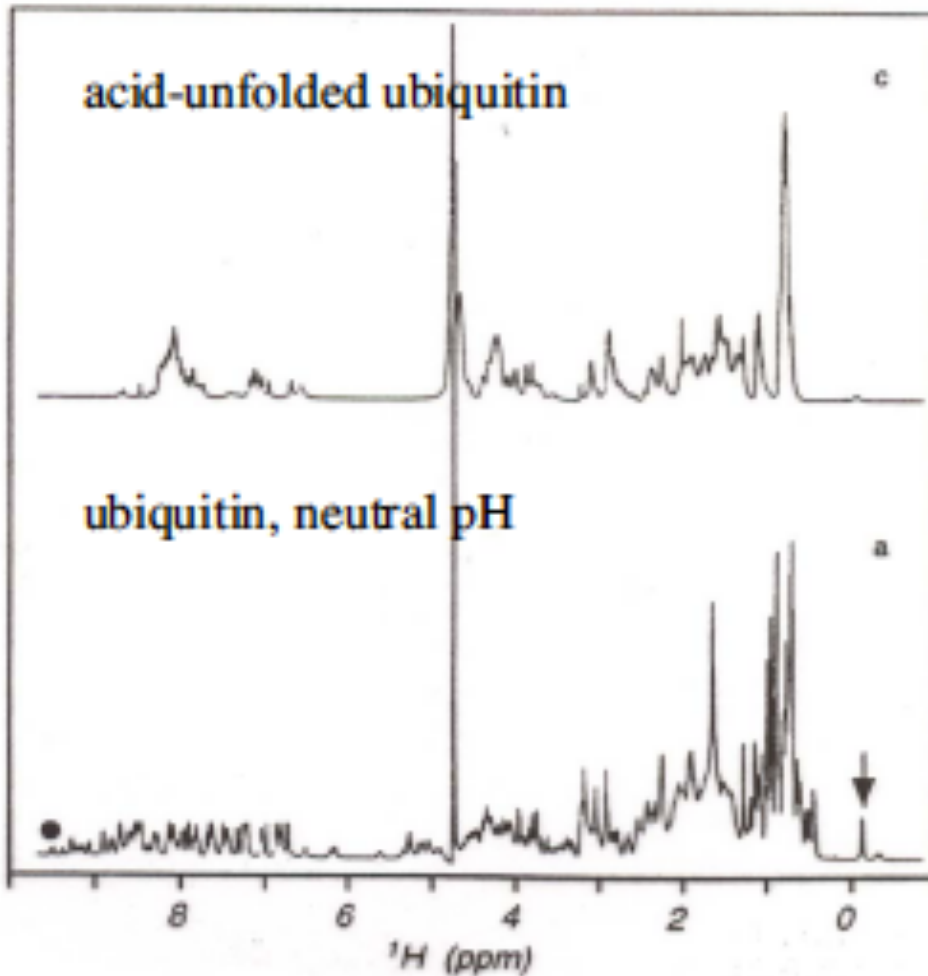
Praktické aspekty NMR proteínov

- 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

Typické ^1H 1D spektrum peptidu



1D ^1H NMR spektrum ubiquitínu

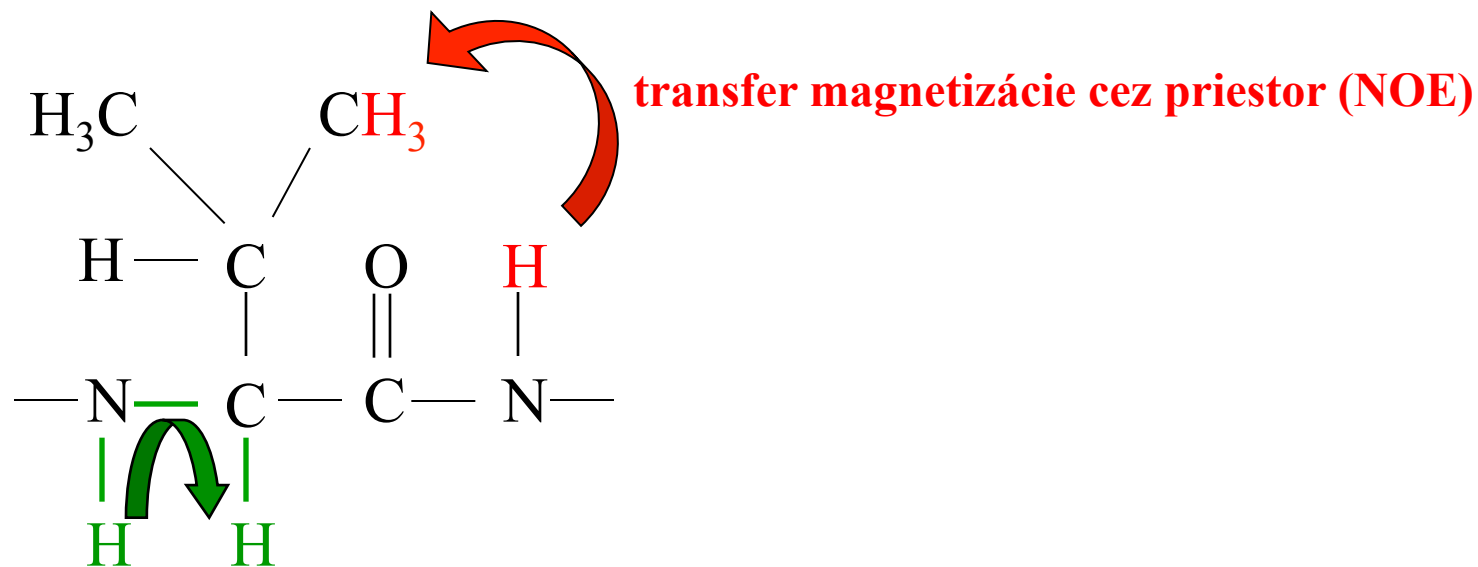


U denaturovaného ubiquitínu sú peaky širšie a v oblasti amidických vodíkov sú rozprestrené v podstatne užšej oblasti ako je tomu u zbaleného ubiquitínu (~6-10 ppm)

Použitelnosť ako pre izotopicky značené, tak aj neznačené vzorky proteínov

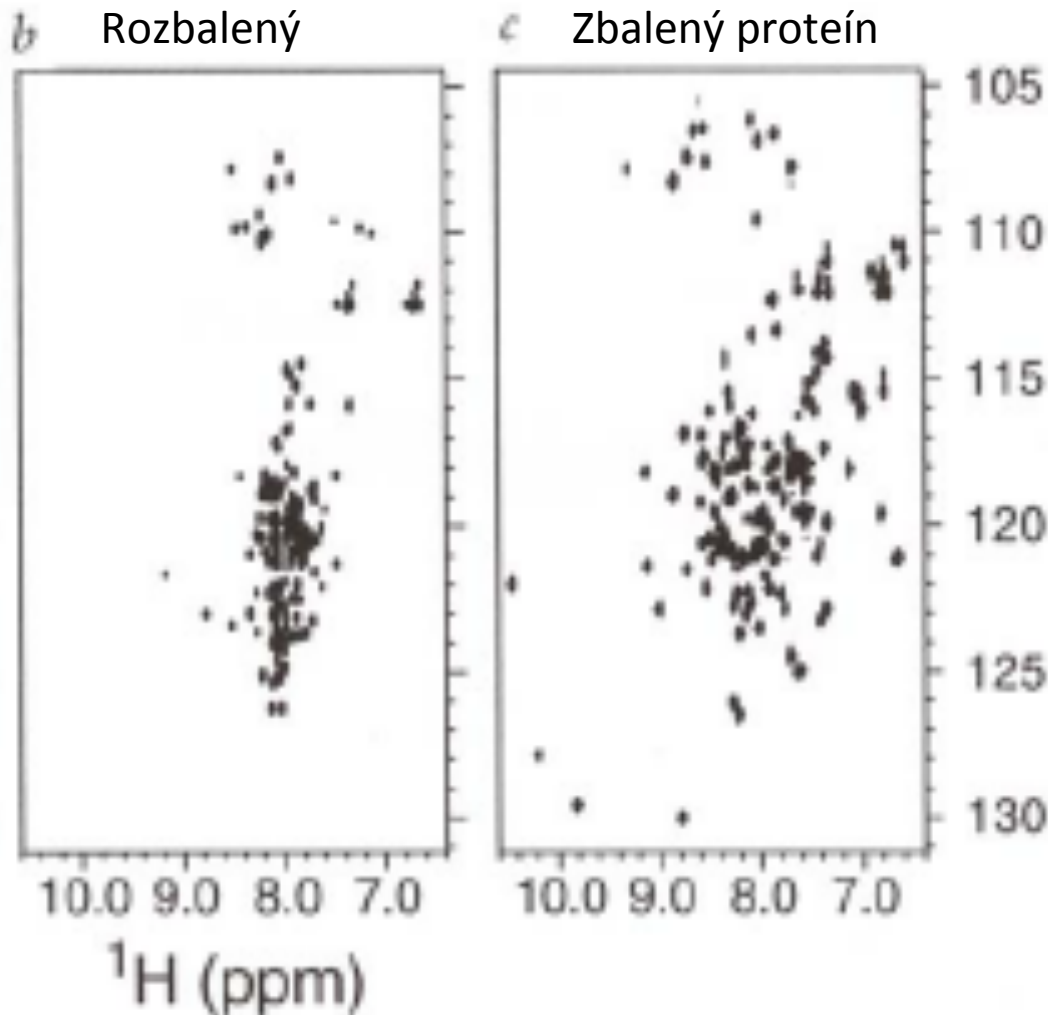
Korelačná spektroskopia

prenos magnetizácie z jedného jadra (zdroja) na iné jadro (príjemca)



transfer magnetizácie cez kovalentné chemické vazby (J-couplings)

Charakteristické HSQC pre zbalený a rozbalený proteín

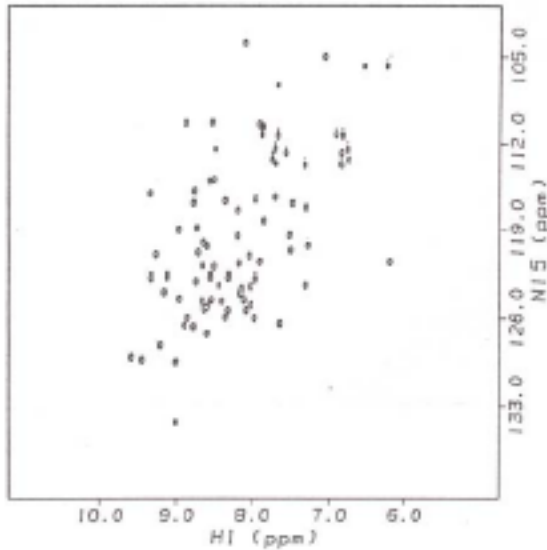


- Je potrebná ^{15}N izotopicky značená vzorka
- Oproti 1D ^1H spektru omnoho vyššie rozlíšenie, jeden peak zodpovedá jednej amidickej skupine.
- Častokrát označované aj ako proteín “finger-print” experiment

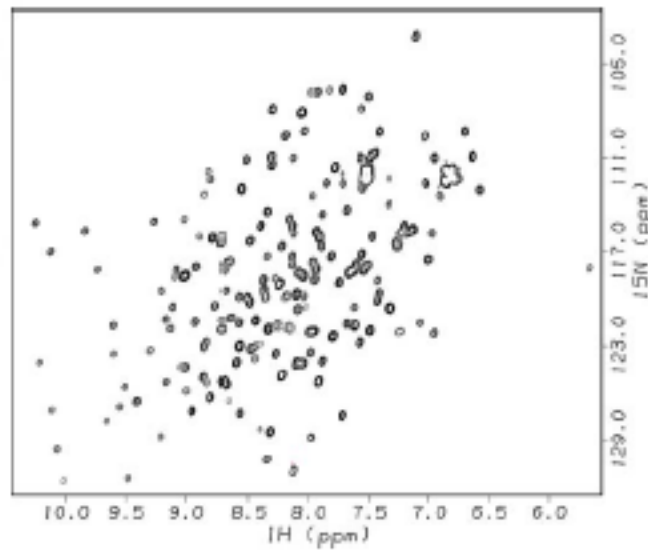
Hlavné rozdiely pre zbalený vs. nezbalený proteín v disperzii a šírke peakov

Problémy NMR väčších proteínov

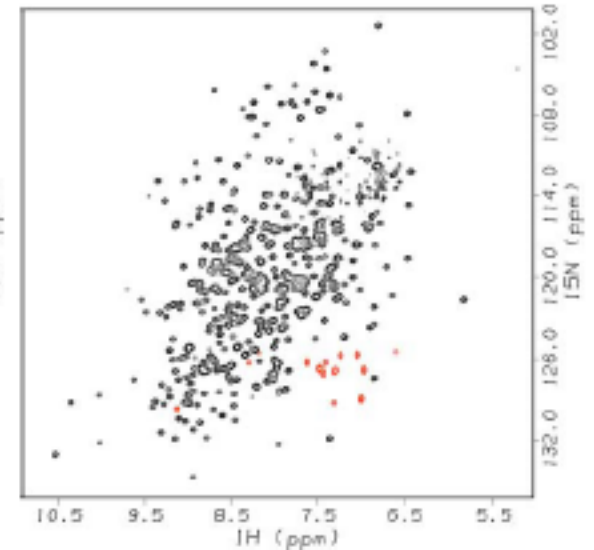
ubiquitin (76 amino acids, 8.5 kDa)



AlgH (189 amino acids, 20.2 kDa)

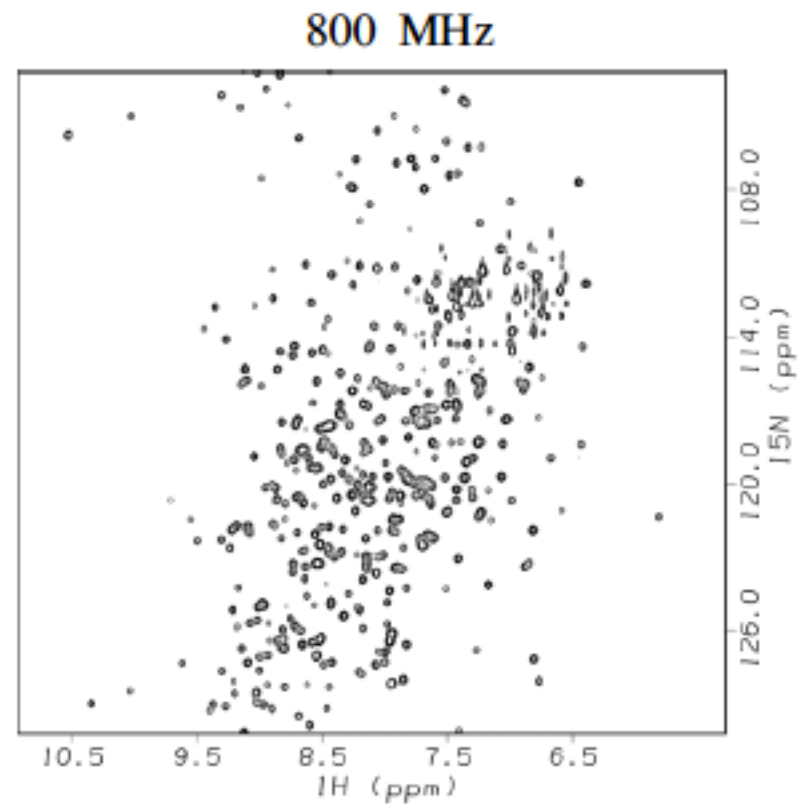
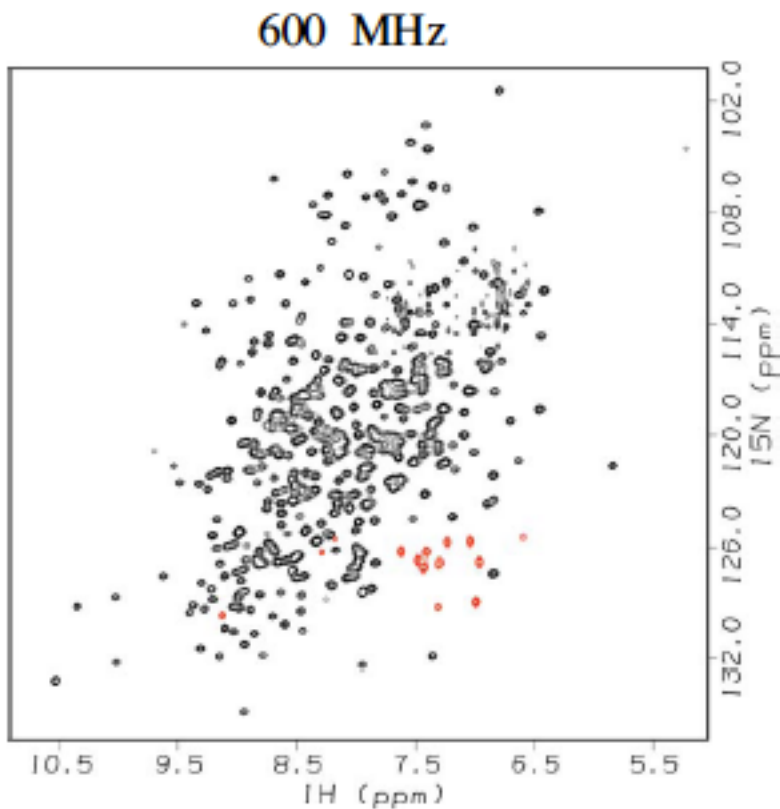


EPSP synthase (427 amino acids, 46.2 kDa)



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

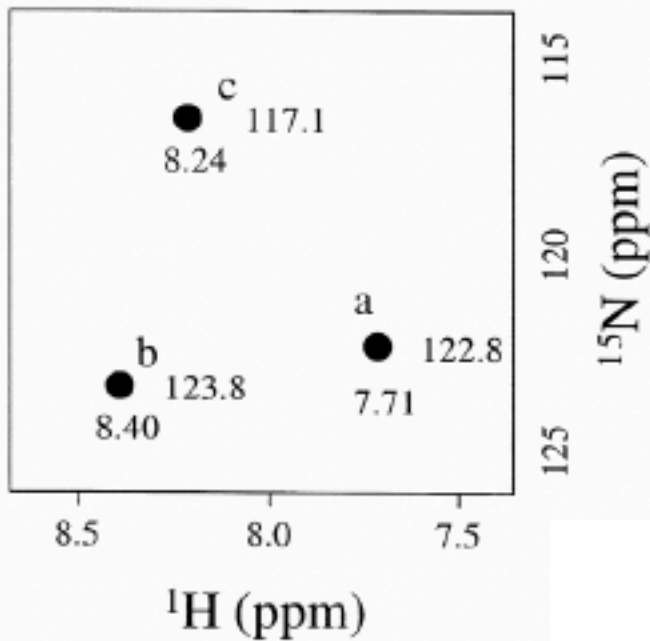


Trosy HSQC

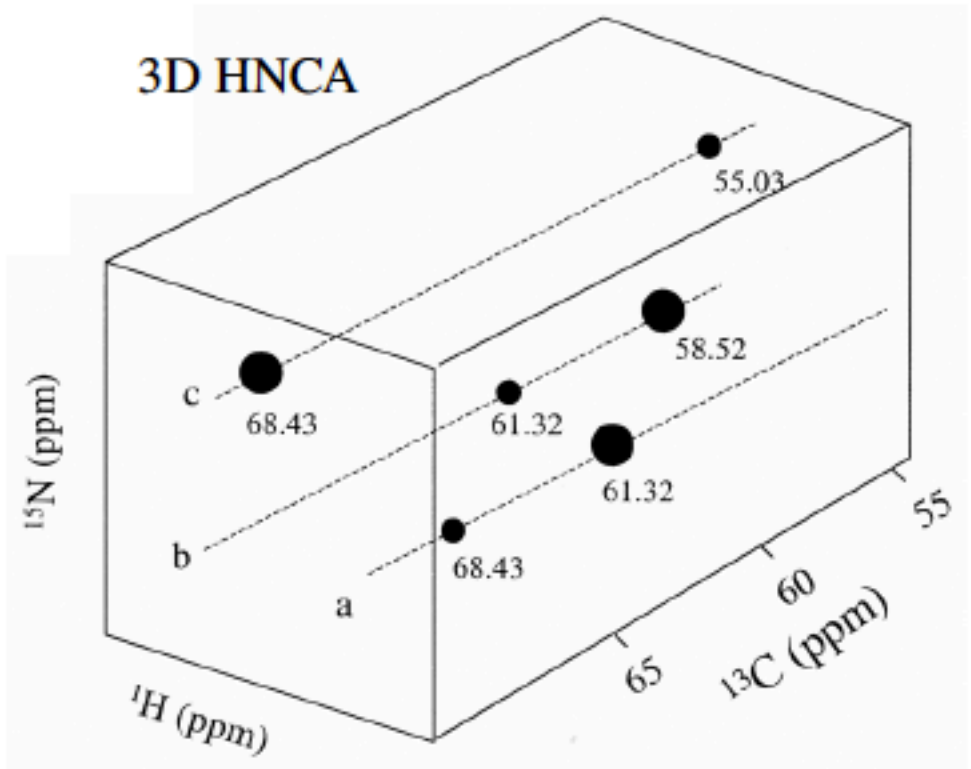
3D NMR spektroskopia

Príklad zvýšeného rozlíšenia na 3D HNCA NMR experimente

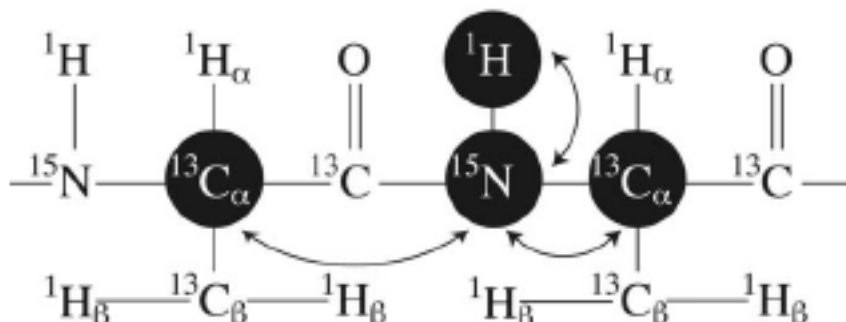
2D HNCA projection



3D HNCA

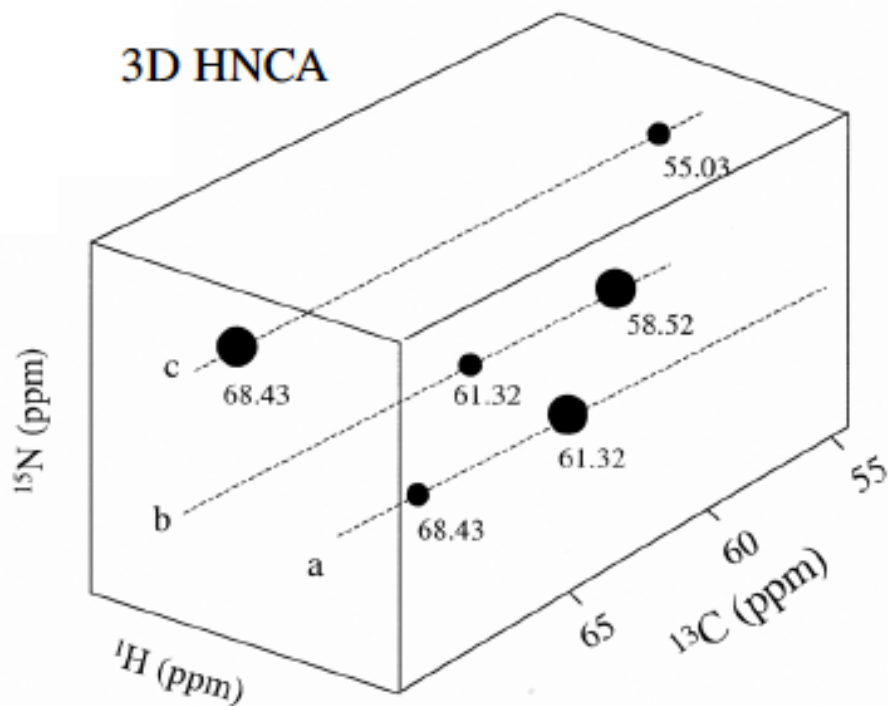


Priradenie peakov v HSQC jednotlivým aminokyselinám pomocou HNCA



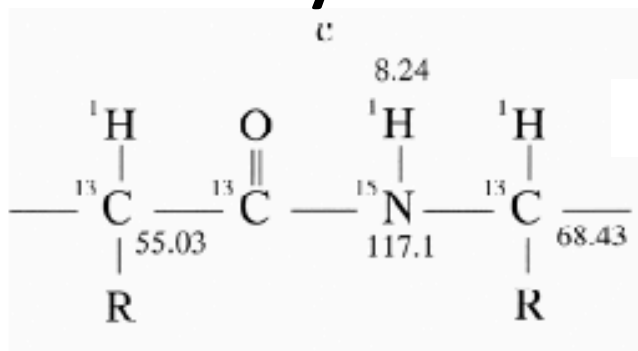
V HNCA experimente sú korelované chemické posuny $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^{\alpha}_i$ a $^{13}\text{C}^{\alpha}_{i-1}$

3D HNCA

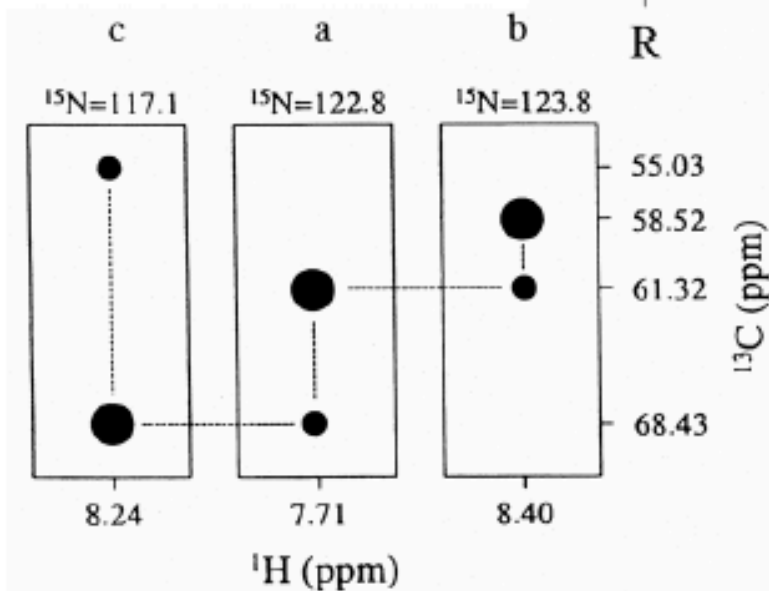
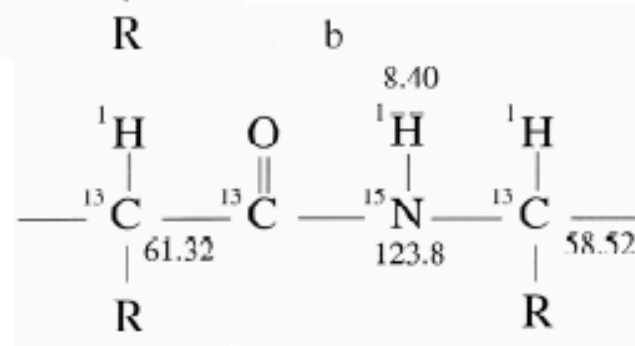
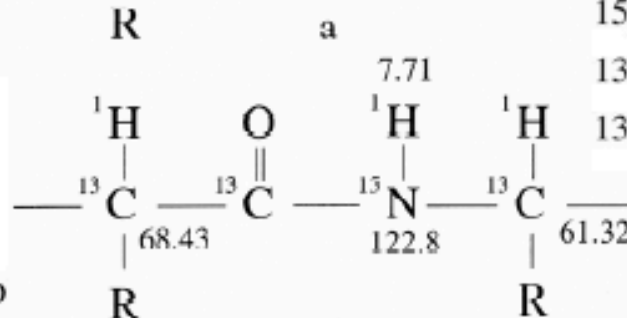


| | c | a | b |
|--------------------------------|-------|-------|-------|
| $^1\text{H}^{\text{N}}_i$ | 8.24 | 7.71 | 8.40 |
| $^{15}\text{N}_i$ | 117.1 | 122.8 | 123.8 |
| $^{13}\text{C}^{\alpha}_i$ | 68.43 | 61.32 | 58.52 |
| $^{13}\text{C}^{\alpha}_{i-1}$ | 55.03 | 68.43 | 61.32 |

Priradenie peakov v HSQC jednotlivým aminokyselinám pomocou HNCA



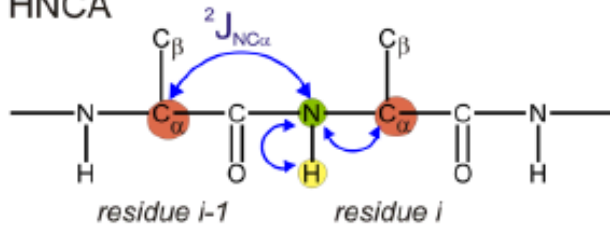
| | c | a | b |
|--------------------------------|-------|-------|-------|
| $^1\text{H}_{\text{N}_i}$ | 8.24 | 7.71 | 8.40 |
| $^{15}\text{N}_i$ | 117.1 | 122.8 | 123.8 |
| $^{13}\text{C}^{\alpha}_i$ | 68.43 | 61.32 | 58.52 |
| $^{13}\text{C}^{\alpha}_{i-1}$ | 55.03 | 68.43 | 61.32 |



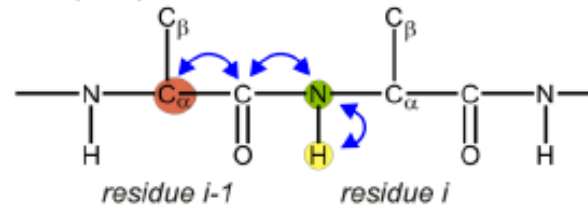
Pri väčších proteínoch problém s rozlíšením silnejších a slabších signálov, prekryv

Priradenie kostry väčších proteínov

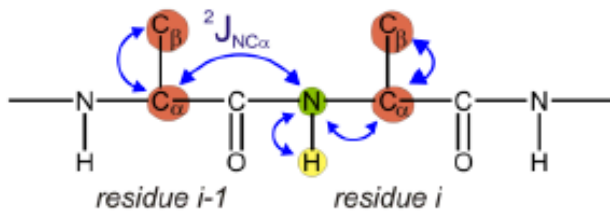
HNCA



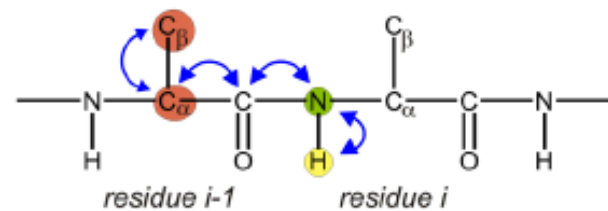
HN(CO)CA



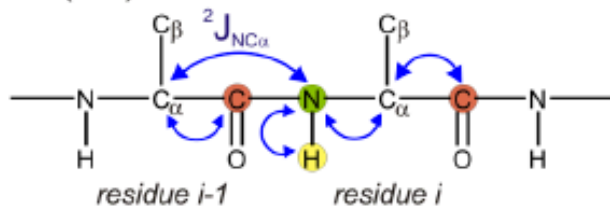
HNCACB



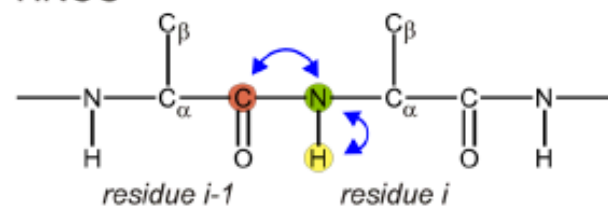
HN(CO)CACB



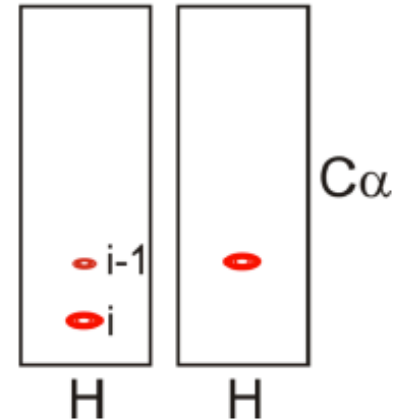
HN(CA)CO



HNCO



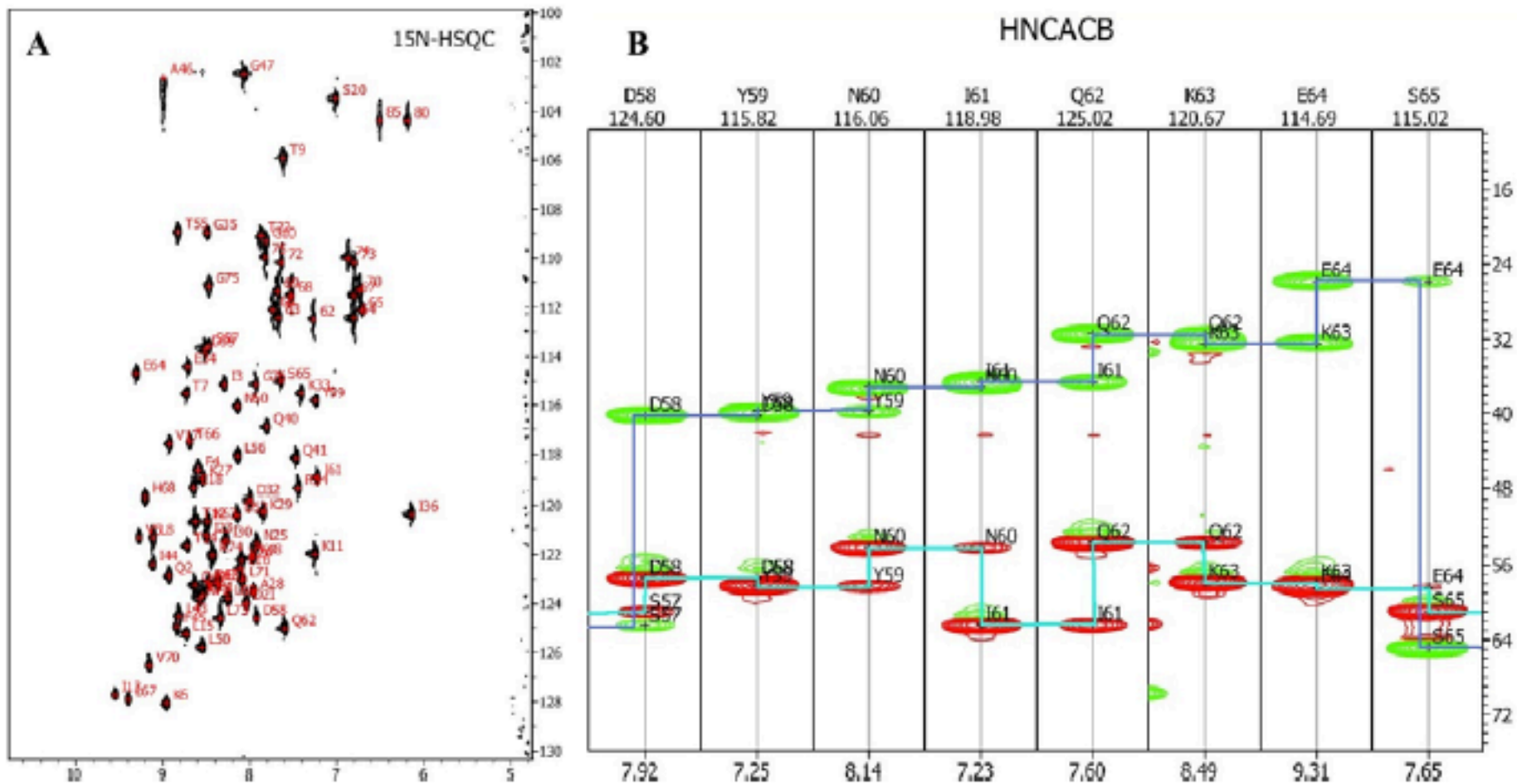
HNCA HN(CO)CA



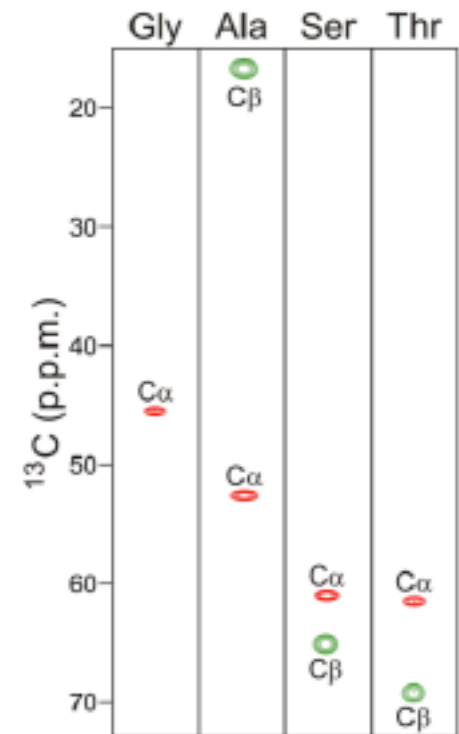
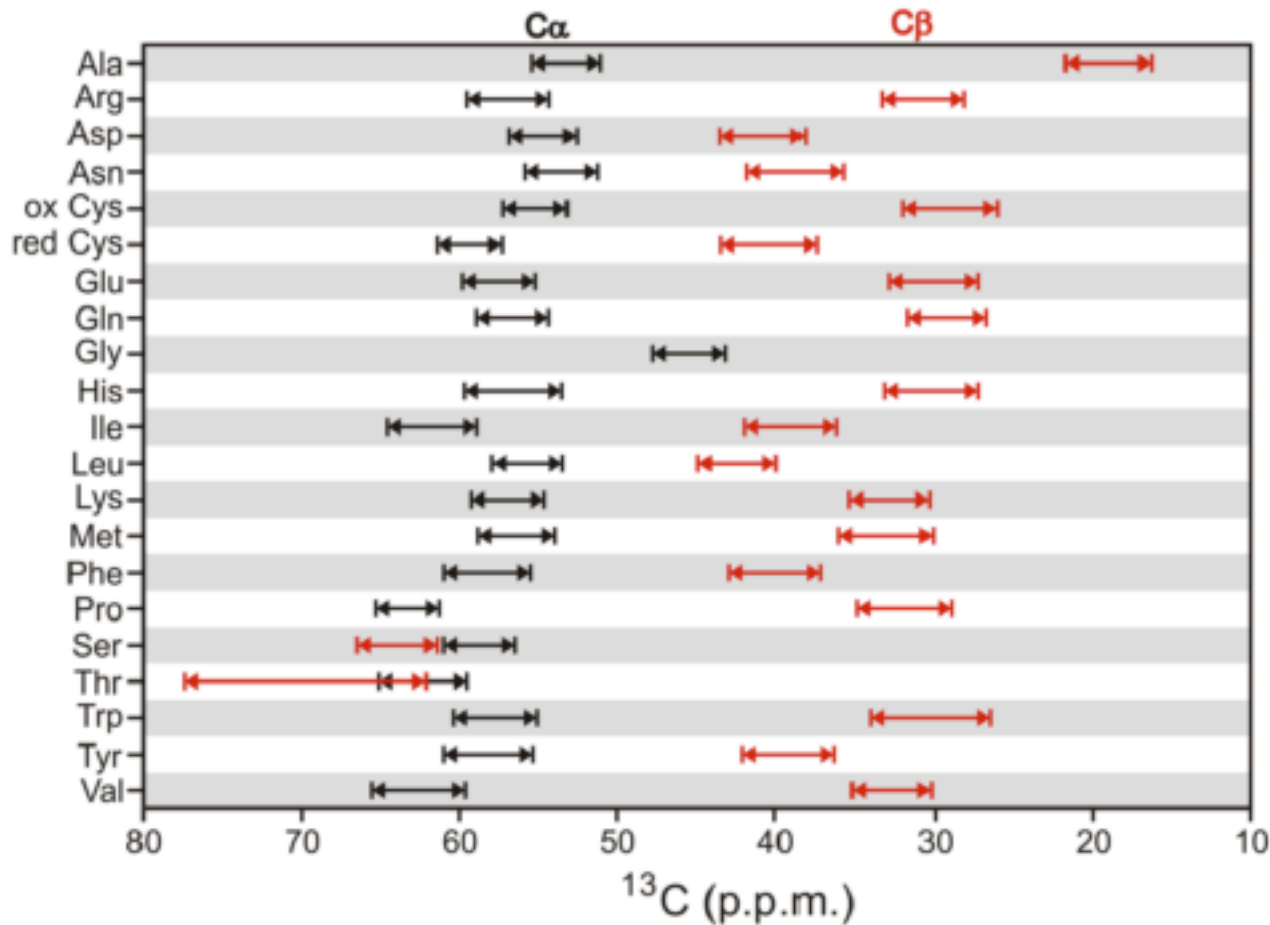
Intra/Inter-residue

Inter-residue

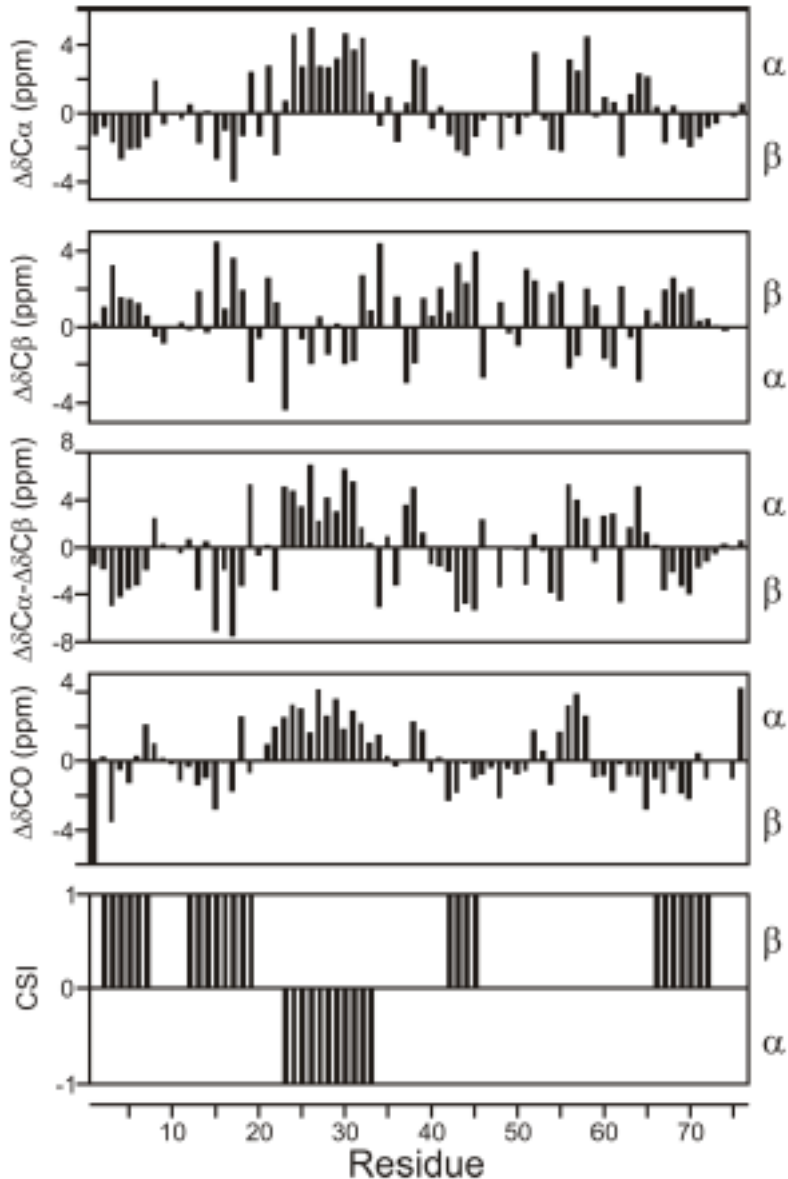
Veľké Puzzle



Sekvenčné priradenie



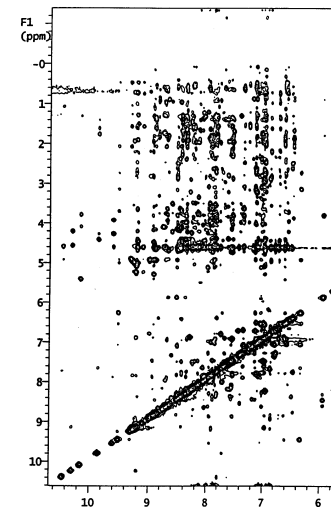
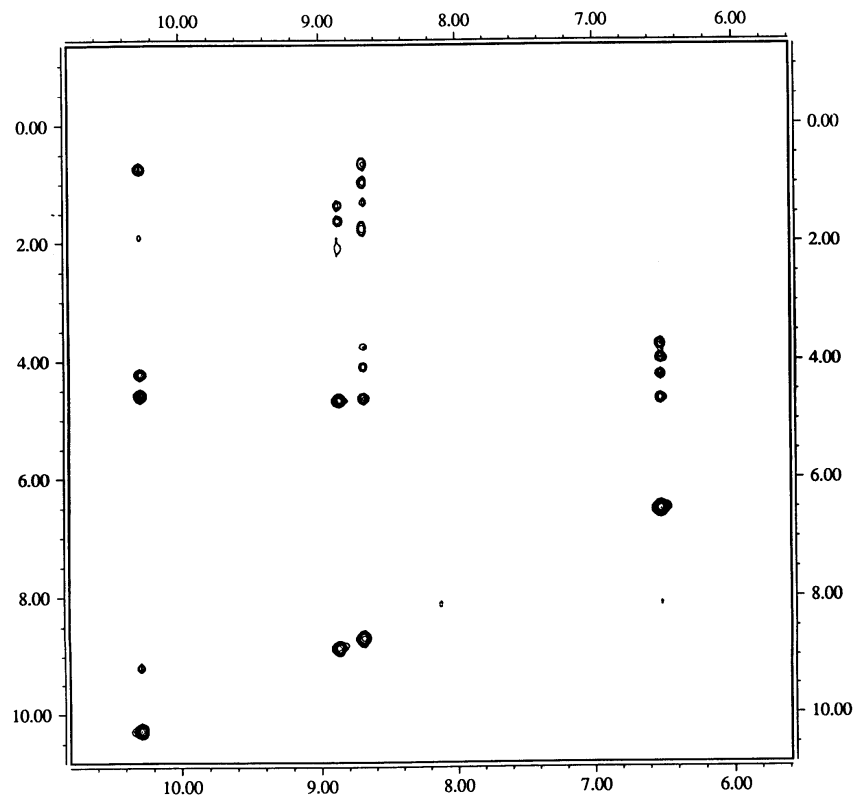
Predikcia sekundárnej štruktúry



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 .

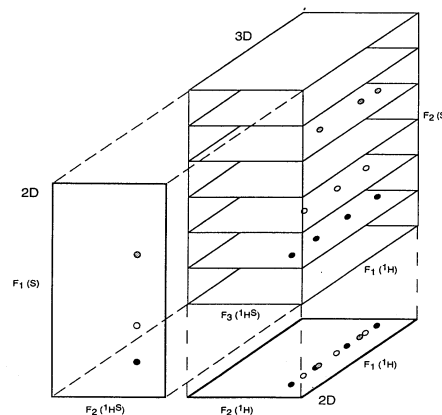
Wishart, D.S. and B.D. Sykes. The ^{13}C chemical shift index. A simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical shift data. J. Biomol. NMR 4:171-180 (1994)

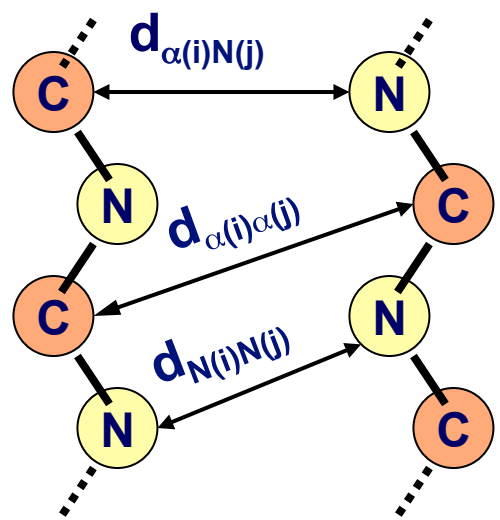
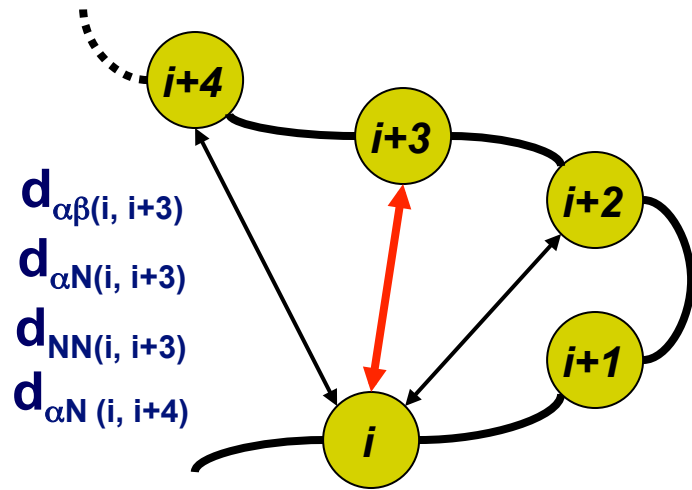
A 2D plane of a 3D NMR spectrum (NOESY)



$$\text{NOE} \sim r^{-6}$$

| | |
|--------------------|--------------------|
| Silné NOE | 1.8 - 2.7 Å |
| Stredné NOE | 1.8 - 3.3 Å |
| Slabé NOE | 1.8 - 5.0 Å |





Určenie štruktúry proteínu pomocou NMR

Cieľom je nájsť takú 3D štruktúru proteínu, ktorá ma čo najlepšiu zhodu s:

- nameranou sadou NOE proton-proton párov
- torzné uhly dané 3J coupling prostredníctvom Karplusovej rovnice:

$$^3J = A * \cos(\phi)^2 + B \cos(\phi) + C$$

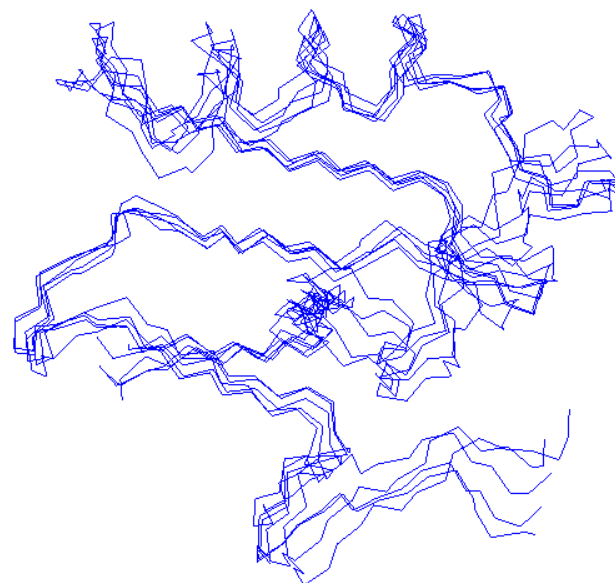
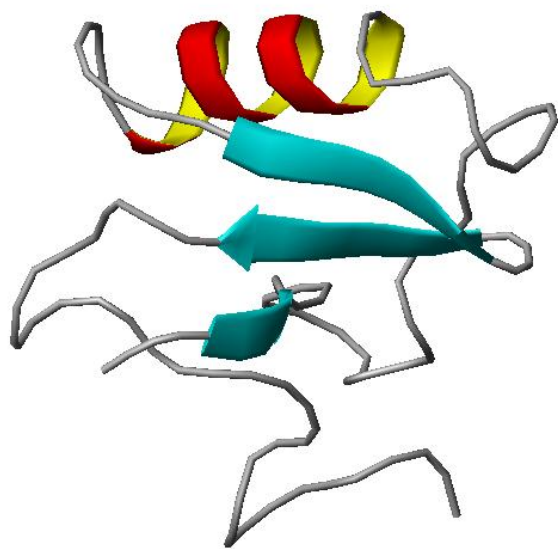
- predpoveďou sekundárnych štruktúr pre jednotlivé aminokyseliny
- RDCs (residual dipolar couplings)
- PRE data

Jednou z možností nájdania rozumných proteínových štruktúr je použiť optimalizačnú techniku simulovaného žihania kde v rámci molekulej dynamiky sú zavedené jednotlivé geometrické obmedzenia spolu so štandardnými parametrami silového poľa. Pre NOE:

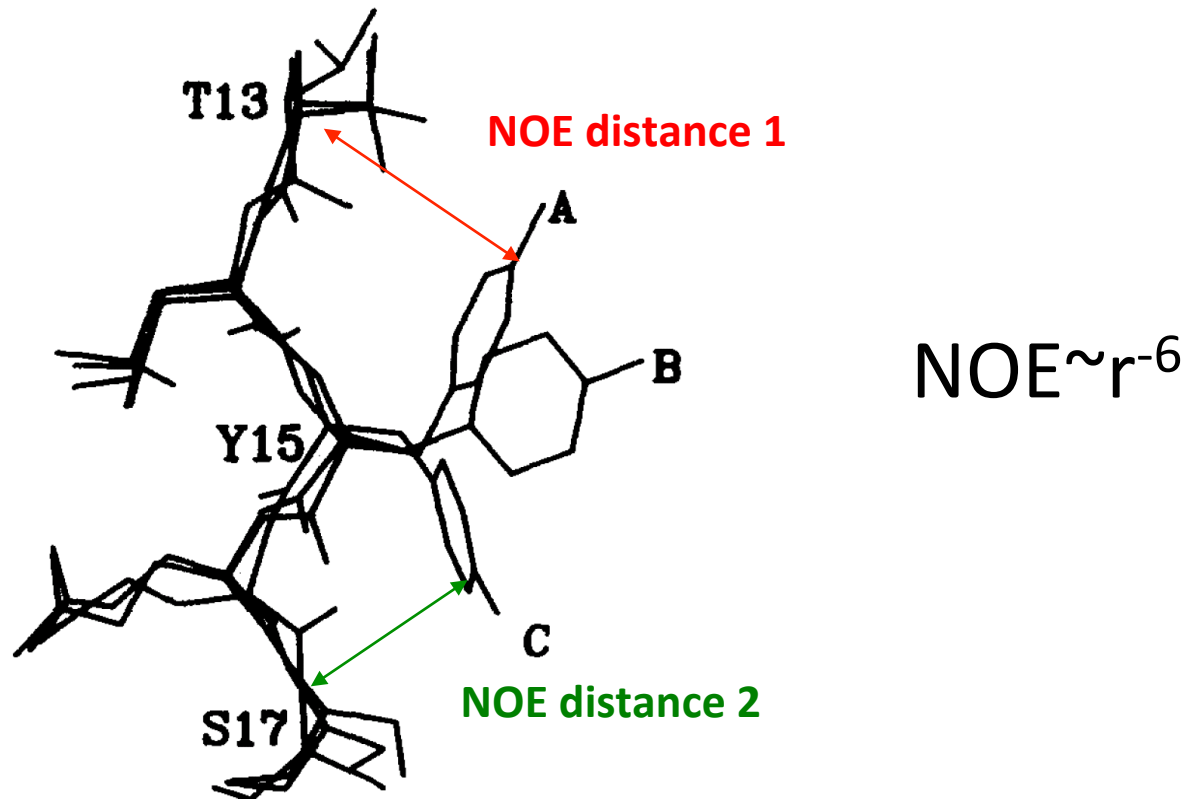
$$E_{\text{NOE}} = K_{\text{NOE}} * (r_{\text{calc}} - r_{\text{max}})^2 \quad \text{pre } r_{\text{calc}} > r_{\text{max}}$$

$$E_{\text{NOE}} = 0 \quad \text{pre } r_{\text{max}} > r_{\text{calc}} > r_{\text{min}}$$

$$E_{\text{NOE}} = K_{\text{NOE}} * (r_{\text{min}} - r_{\text{calc}})^2 \quad \text{pre } r_{\text{calc}} < r_{\text{min}}$$



Pozor: Proteíny sú flexibilné!

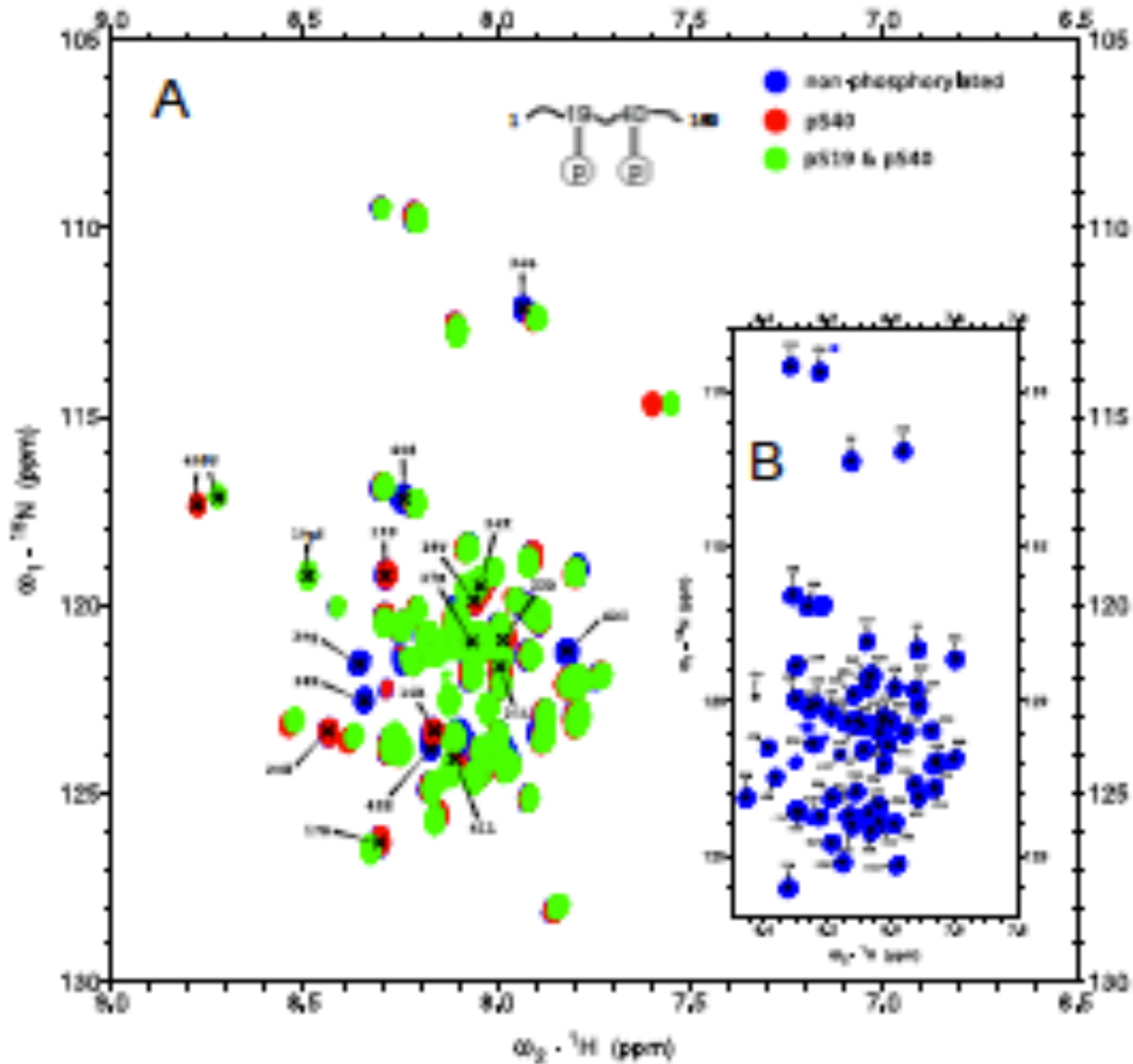


J. Mol. Biol. (1990) 214, 223-235

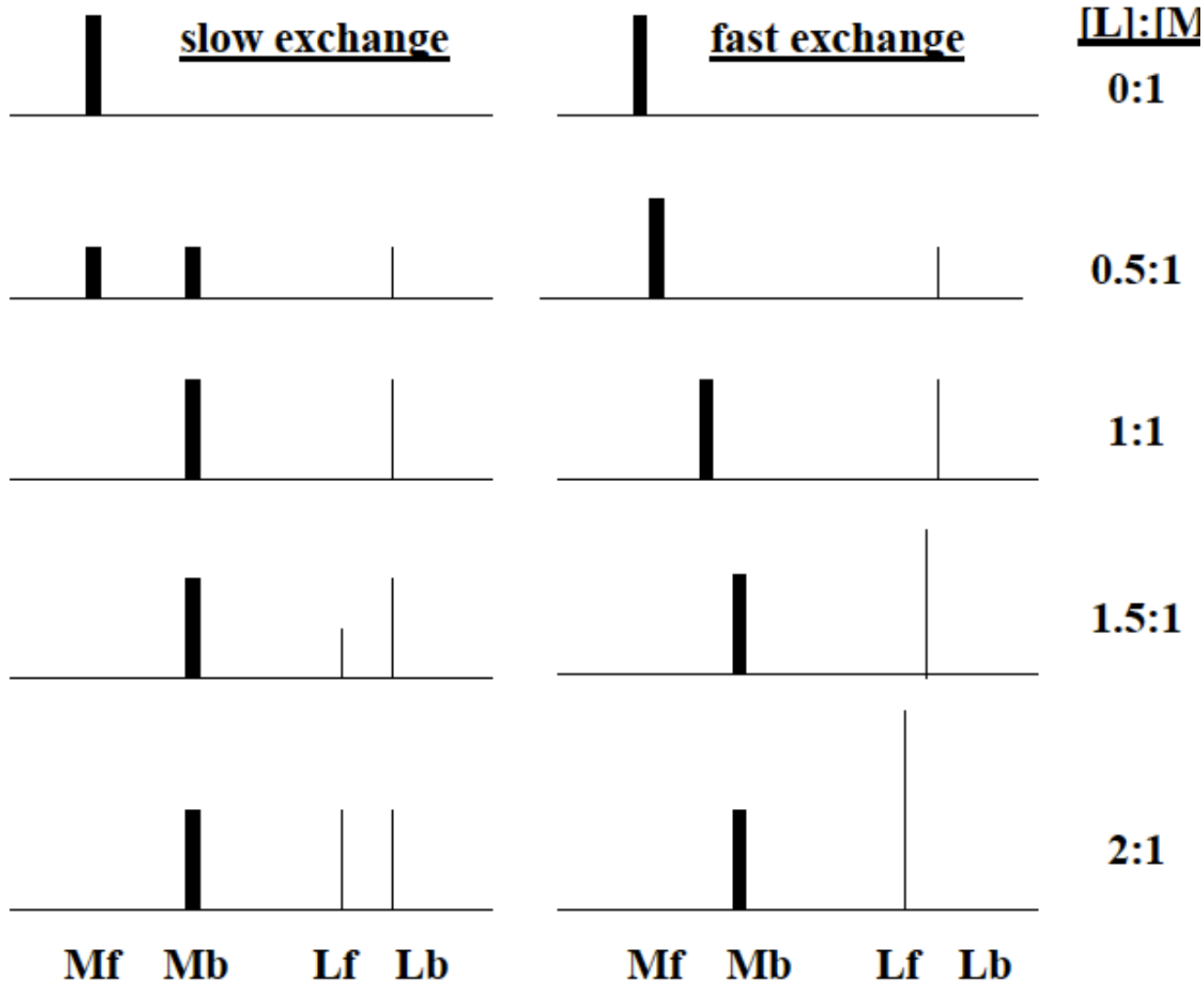
Time-averaged Nuclear Overhauser Effect Distance Restraints Applied to Tendamistat

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

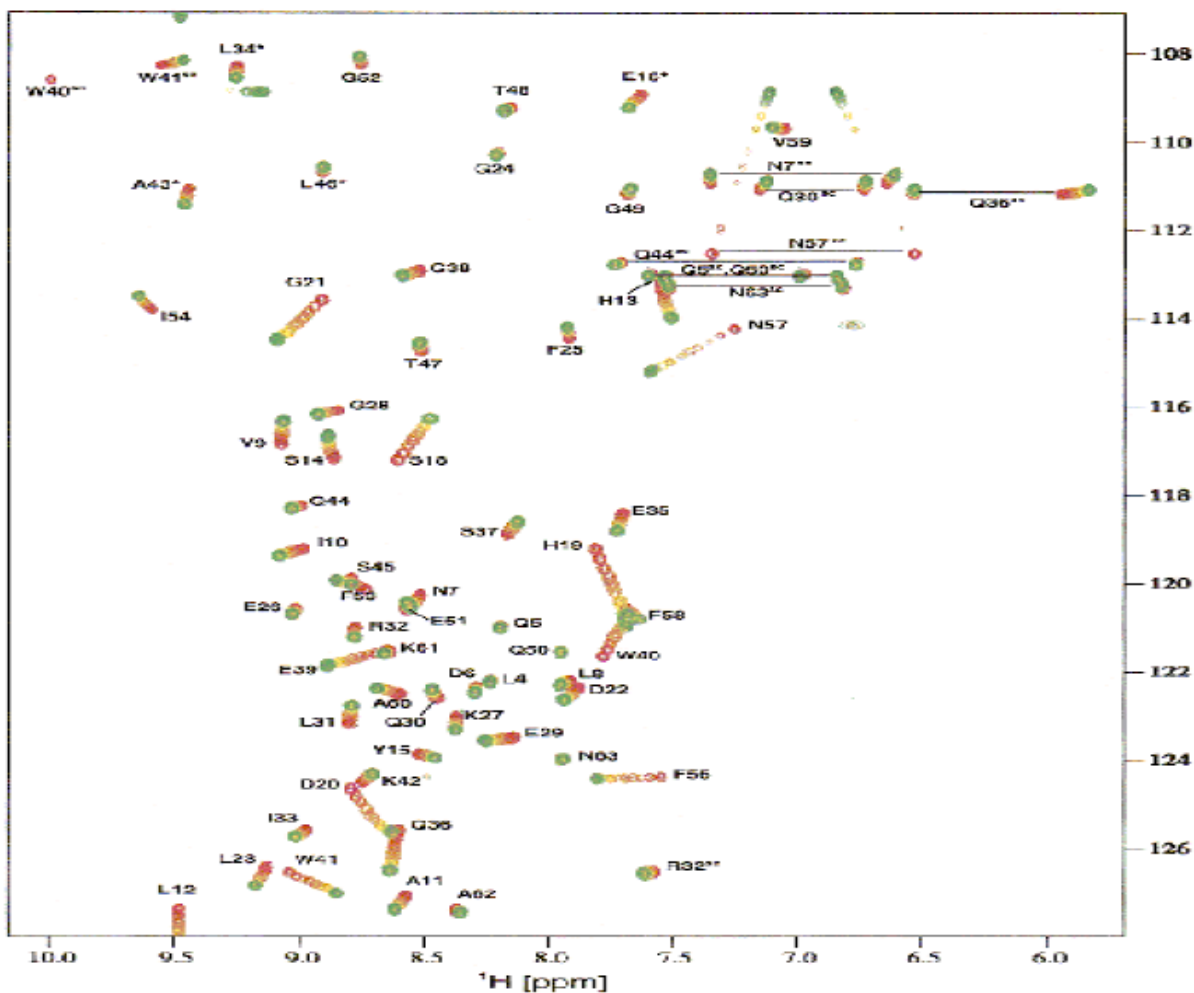
Efekt mutácie/fosforylácie



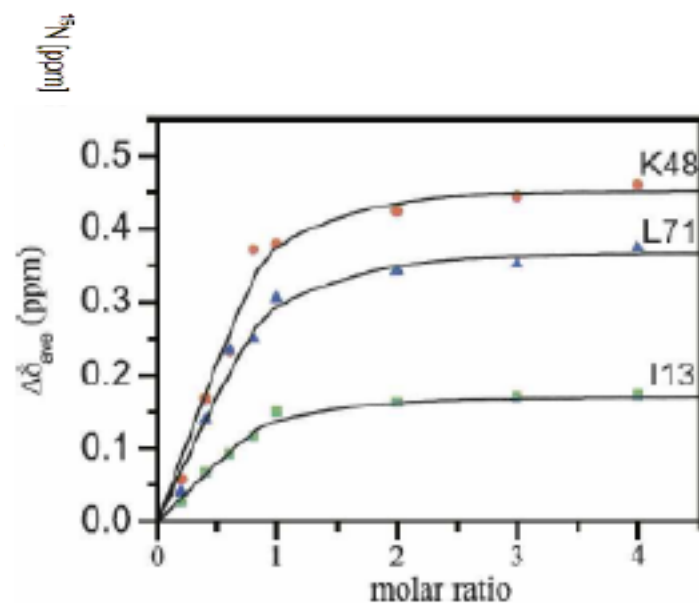
Titračné merania



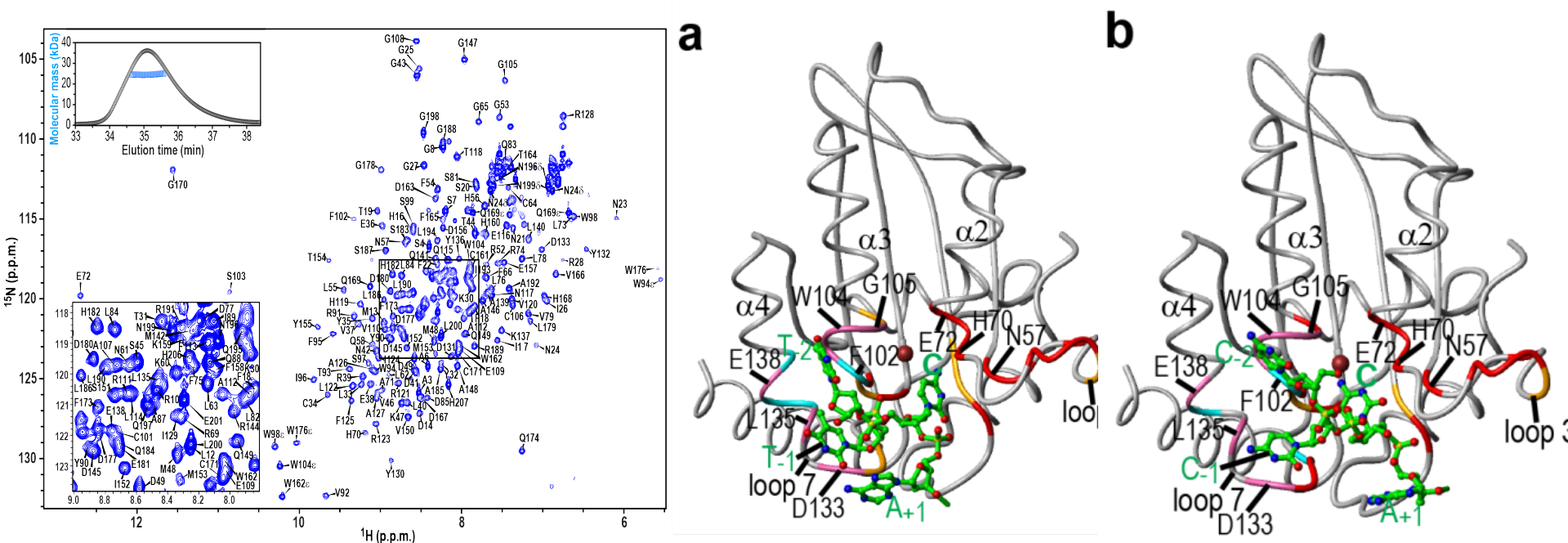
^1H - ^{15}N HSQC titrácia v režime rýchlej výmeny



Možnosť sledovať viazanie ligandu simultánne do viacerých väzobných miest



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

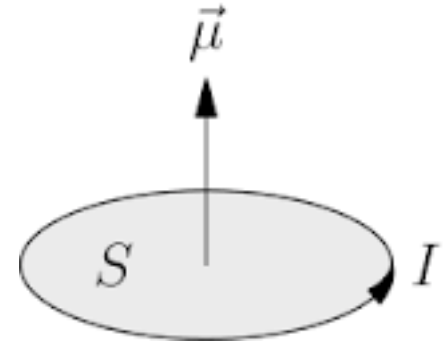


Byeon I-J., Ahn J., Mitra M., Byeon C-H., Hercík K., Hritz J., Charlton L., Levin J., Gronenborn A.M. NMR structure of human restriction factor APOBEC3A reveals substrate binding and enzyme specificity. *Nature Commun.* **2013**, 4, 1890

EPR (Electron paramagnetic resonance)

- tiež nazývaná: Electron Spin Resonance (ESR)

EPR aktívne molekuly obsahujú nespárovaný elektrón, t.j. majú nenulový spin-angular moment



Porovnanie magnetických dipólových momentov:

- protónu: $\sim 14 \times 10^{-27} \text{ J.T}^{-1}$
- elektrónu: $\sim -9285 \times 10^{-27} \text{ J.T}^{-1}$

Zemanove štiepenie energetických hladín elektrónu: $\Delta E = g_e \mu_B B_0 = h\nu$

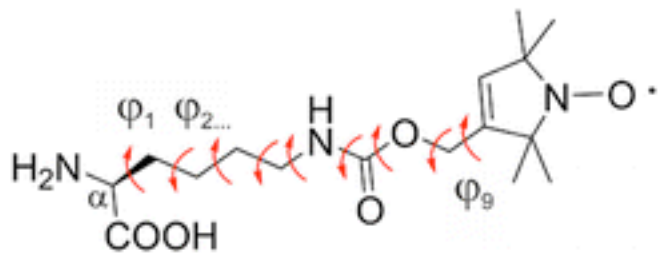
B_0 -externé magnetické pole

g_e - tzv. g-faktor, ktorý závisí od typu molekuly (typické hodnoty: 1-10)

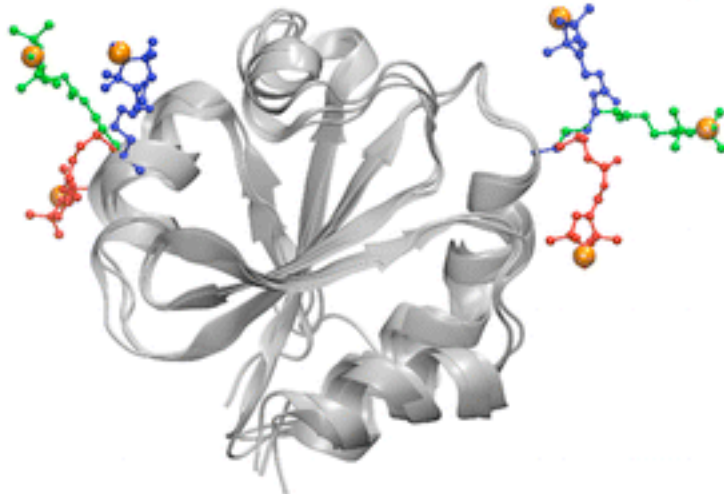
μ_B - Bohrov magnetron

Typical frequency range of EPR: $\sim 10 \text{ GHz}$

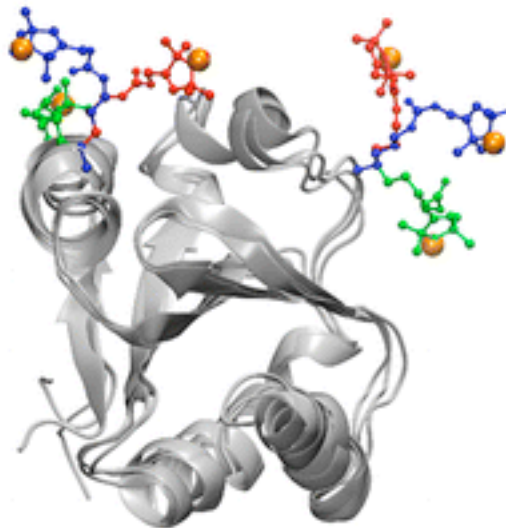
A



B



C



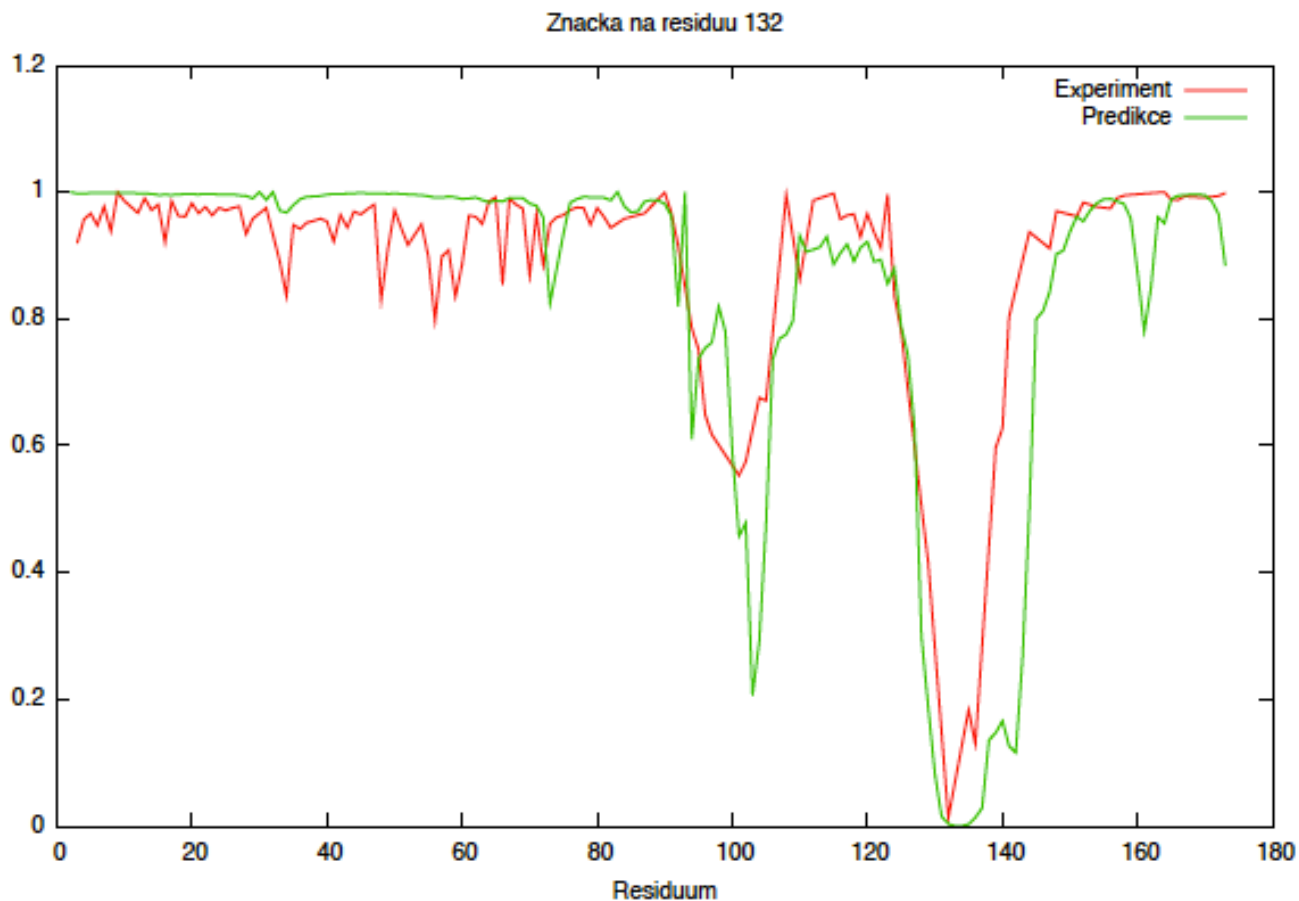
Dipol-dipolová interakcia $\sim \mu_1\mu_2/r^3$

!Interpretácia flexibilných paramagnetických značiek

V súčasnosti približný možný rozsah vzdialenosti určiteľnými EPR spektroskopiou: 15-100 Å

NMR spektroskopia biomaktromolekuly obsahujúcej paramagnetickú značku

Paramagnetic relaxation enhancements (PRE), efektívne do približne 20 Å.



Záver

- Nízka citlivosť NMR podmieňuje vysokú koncentráciu meraných proteínov
- BioNMR umožňuje sledovať štrukturálne zmeny na úrovni jednotlivých aminokyselín a to pre štrukturované ako aj tvz. neštrukturované proteíny (IDP)
- NMR väčších proteínov vyžaduje okrem izotopického značenia ^{15}N , ^{13}C aj ich deuteráciu a NMR spektrometer s vysokým magnetickým poľom (>700 MHz). Ďalšou možnosťou je ich selektívne značenie.
- Určenie štruktúry proteínov na základe stanovených geometrických obmedzení (vzdialenostných, uhlových)
- NMR umožňuje určiť aj značne komplexný väzobný mechanizmus, kde dochádza k interakcii viacerých väzobných miest.
- EPR signál od molekúl obsahujúcich nespárované elektróny. Možnosť merať vzdialenosti medzi paramagnetickými značkami v rozmedzí 15-100 Å
- PRE efekt umožňuje používať paramagnetickú značku ako maják na reziduá vo vzdialenosti do 20 Å