

# NMR spektroskopie

*Metody biofyzikální chemie - seminář (C5856)*

Martin Novák  
323460@mail.muni.cz

18. listopadu 2015

# Interakce jaderného spinového momentu - kontext

Doplňte k zadaným interakčním mechanismům symbolické znázornění a příslušný Hamiltonián:

**Dipol-dipolová interakce**

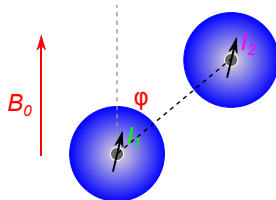
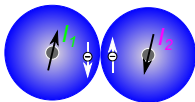
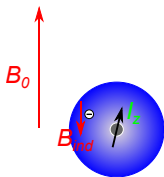
**Chemický posun**

**Nepřímá spin-spinová interakce**

$$\hat{H}_i = -\mu \cdot B_{ind} \propto \gamma_i \hat{I}_z \cdot \sigma \cdot B_0$$

$$\hat{H}_{ij} \propto \frac{\gamma_i \gamma_j (3 \cos^2 \varphi - 1)}{r^3} \hat{I}_i \cdot \hat{I}_j$$

$$\hat{H}_{ij} \propto 2\pi J \cdot \hat{I}_i \cdot \hat{I}_j$$



# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- Metodou NMR strukturní analýzy se rutinně studují biosystémy o velikosti do 10 kDa.

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Metodou NMR strukturní analýzy se rutinně studují biosystémy o velikosti do 10 kDa.
- 2 Nukleární Overhauserův efekt umožňuje korelovat NMR aktivní jádra pouze v rámci jednoho spinového systému.

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Metodou NMR strukturní analýzy se rutinně studují biosystémy o velikosti do 10 kDa.
- 2 Nukleární Overhauserův efekt umožňuje korelovat NMR aktivní jádra pouze v rámci jednoho spinového systému.
- 3 V NMR pevné fáze jsou spektra ovlivněna anizotropií chemického stínění a přímou dipól-dipólovou interakcí

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Metodou NMR strukturní analýzy se rutinně studují biosystémy o velikosti do 10 kDa.
- 2 Nukleární Overhauserův efekt umožňuje korelovat NMR aktivní jádra pouze v rámci jednoho spinového systému.
- 3 V NMR pevné fáze jsou spektra ovlivněna anizotropií chemického stínění a přímou dipól-dipólovou interakcí
- 4 Rozlišení signálů v NMR spektru roste s velikostí externího magnetického pole, protože rezonanční frekvence je úměrná  $B_0$ .

# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Metodou NMR strukturní analýzy se rutinně studují biosystémy o velikosti do 10 kDa.
- 2 Nukleární Overhauserův efekt umožňuje korelovat NMR aktivní jádra pouze v rámci jednoho spinového systému.
- 3 V NMR pevné fáze jsou spektra ovlivněna anizotropií chemického stínění a přímou dipól-dipólovou interakcí
- 4 Rozlišení signálů v NMR spektru roste s velikostí externího magnetického pole, protože rezonanční frekvence je úměrná  $B_0$ .
- 5 Rezonanční signál ovlivněný pomalou výměnou vzhledem k NMR časové škále se projevuje ve spektru rozšířením a polohou rezonanční linie odpovídající váženému průměru chemických posunů limitních stavů.

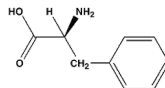
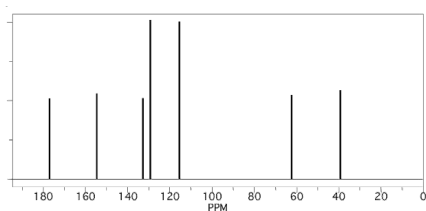
# Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Metodou NMR strukturní analýzy se rutinně studují biosystémy o velikosti do 10 kDa.
- 2 Nukleární Overhauserův efekt umožňuje korelovat NMR aktivní jádra pouze v rámci jednoho spinového systému.
- 3 V NMR pevné fáze jsou spektra ovlivněna anizotropií chemického stínění a přímou dipól-dipólovou interakcí
- 4 Rozlišení signálů v NMR spektru roste s velikostí externího magnetického pole, protože rezonanční frekvence je úměrná  $B_0$ .
- 5 Rezonanční signál ovlivněný pomalou výměnou vzhledem k NMR časové škále se projevuje ve spektru rozšířením a polohou rezonanční linie odpovídající váženému průměru chemických posunů limitních stavů.
- 6 NMR spektrum proteinu s malým stupněm strukturovanosti(foldu) se vyznačuje úzkými signály a malou disperzí.

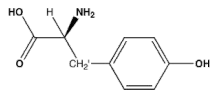
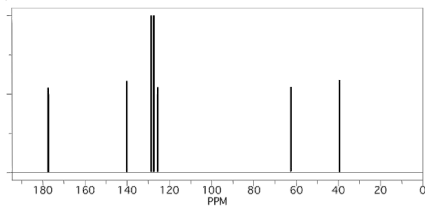


# Úloha 1: Chemický posun - identifikace aminokyselin

Pro daná  $^{13}\text{C}$  NMR spektra určete, jaké aromatické aminokyseliny náleží a proč.



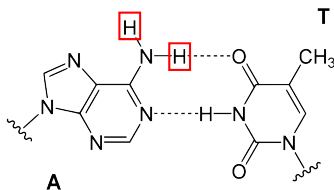
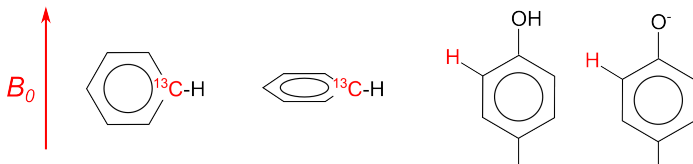
phenylalanine



tyrosine

## Úloha 2: Chemický posun - rozlišení

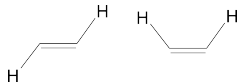
Pro dané systémy, rozhodněte, který z dvojice označených atomů bude mít vyšší hodnotou chemického posunu:



# Úloha 3: $J$ -coupling a konformace vazby, Karplusova rovnice

Pro určení torzního úhlu v kovalentních strukturách slouží analýza vicinálních spin-spinových konstant (tzv.  $^3J$ -coupling).

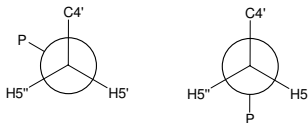
- *Kvalitativní pohled*: Na základě srovnání orbitálního překryvu rozhodněte, v jaké konfiguraci nabývá  $^3J$  větší hodnoty.



- *Kvantitativní pohled*: K určení konformace cukr-fosfátové páteře nukleových kyselin se používá Karplusova rovnice parametrizovaná mj. pro interakci H5' a P:

$$^3J_{HCOP} = 15.3\cos^2\varphi - 6.2\cos\varphi + 1.5.$$

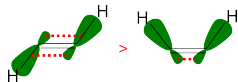
Vypočtete hodnotu konstanty pro znázorněné konformery a charakterizujte je pomocí velikosti úhlu  $\beta$  :



# Úloha 3: $J$ -coupling a konformace vazby, Karplusova rovnice

Pro určení torzního úhlu v kovalentních strukturách slouží analýza vicinálních spin-spinových konstant (tzv.  $^3J$ -coupling).

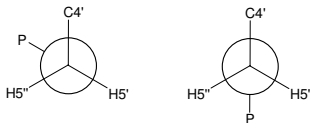
- Kvalitativní pohled:** Na základě srovnání orbitálního překryvu rozhodněte, v jaké konfiguraci nabývá  $^3J$  větší hodnoty.



- Kvantitativní pohled:** K určení konformace cukr-fosfátové páteře nukleových kyselin se používá Karplusova rovnice parametrizovaná mj. pro interakci H5' a P:

$$^3J_{HCOP} = 15.3\cos^2\varphi - 6.2\cos\varphi + 1.5.$$

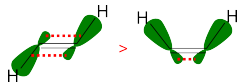
Vypočtete hodnotu konstanty pro znázorněné konformery a charakterizujte je pomocí velikosti úhlu  $\beta$  :



# Úloha 3: $J$ -coupling a konformace vazby, Karplusova rovnice

Pro určení torzního úhlu v kovalentních strukturách slouží analýza vicinálních spin-spinových konstant (tzv.  $^3J$ -coupling).

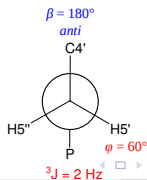
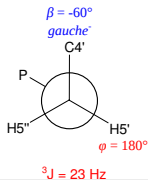
- Kvalitativní pohled:** Na základě srovnání orbitálního překryvu rozhodněte, v jaké konfiguraci nabývá  $^3J$  větší hodnoty.



- Kvantitativní pohled:** K určení konformace cukr-fosfátové páteře nukleových kyselin se používá Karplusova rovnice parametrizovaná mj. pro interakci H5' a P:

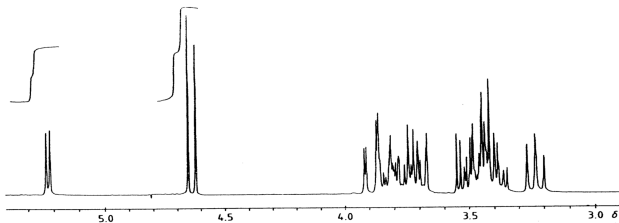
$$^3J_{HCOP} = 15.3\cos^2\varphi - 6.2\cos\varphi + 1.5.$$

Vypočtete hodnotu konstanty pro znázorněné konformery a charakterizujte je pomocí velikosti úhlu  $\beta$  :



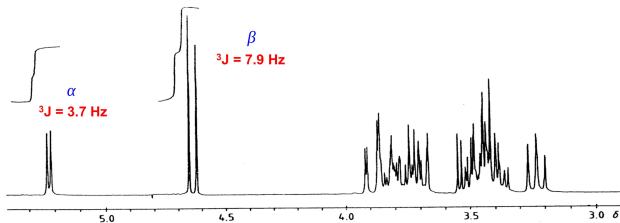
# Úloha 3: $J$ -coupling a konformace vazby

Pomocí přiloženého 1D  $^1\text{H}$  NMR spektra odhadněte poměr  $\alpha$  a  $\beta$  izomeru v roztoku D-glukopyranozy naměřeném v  $\text{D}_2\text{O}$ .



# Úloha 3: $J$ -coupling a konformace vazby

Pomocí přiloženého 1D  $^1\text{H}$  NMR spektra odhadněte poměr  $\alpha$  a  $\beta$  izomeru v roztoku D-glukopyranozy naměřeném v  $\text{D}_2\text{O}$ .



# Úloha 4: Příklady biochemických aplikací

K uvedeným problémům strukturní analýzy přiřaďte odpovídající techniku:

Potlačení dipol-dipolové relaxace u proteinu

Rozlišení intra- a intermolekulárních kontaktů v komplexu ligand-receptor

Odstranění signálů labilních protonů v molekule nukleové kyseliny

Přiřazení málo rozlišených signálů v nestrukturované části proteinu

Mapování reziduí směřujících k povrchu proteinu

Převedení vzorku do D<sub>2</sub>O

<sup>13</sup>C editované NOESY spektrum

Expres proteinu v deuterovaném médiu

Aplikace paramagnetických sond

Multidimenzionální inverzní experimenty (4D, 5D)



# Úloha 4: Příklady biochemických aplikací

K uvedeným problémům strukturní analýzy přiřaďte odpovídající techniku:

**Potlačení dipol-dipolové relaxace u proteinu**

exprese proteinu v deuterovaném médiu

**Rozlišení intra- a intermolekulárních kontaktů v komplexu ligand-receptor**

$^{13}\text{C}$  editované NOESY spektrum

**Odstranění signálů labilních protonů v molekule nukleové kyseliny**

převedení vzorku do  $\text{D}_2\text{O}$

**Přiřazení málo rozlišených signálů v nestrukturované části proteinu**

multidimenzionální inverzní experimenty (4D, 5D)

**Mapování reziduí směřujících k povrchu proteinu**

exprese proteinu v deuterovaném médiu

# Úloha 5: Protein vs. Nukleové kyseliny: NMR aspekty

Diskutujte o následujících praktických okolnostích NMR experimentů při srovnání protein a DNA/RNA:

	Proteiny	NA
<b>Syntéza vzorku</b>		
<b>Izotopické značení</b>		
<b>Hustota <math>^1\text{H}</math></b>		
<b>Sekvenční přiřazení</b>		
<b>Restrainy pro určení struktury</b>		

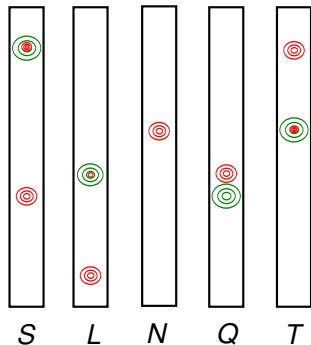
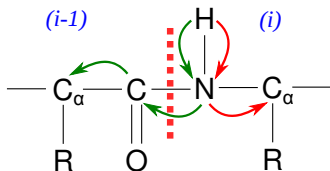
# Úloha 5: Protein vs. Nukleové kyseliny: NMR aspekty

Diskutujte o následujících praktických okolnostích NMR experimentů při srovnání protein a DNA/RNA:

	Proteiny	NA
<b>Syntéza vzorku</b>	<i>in vivo</i>	chemickou cestou
<b>Izotopické značení</b>	snadné	nákladné
<b>Hustota <math>^1\text{H}</math></b>	rel. vysoká	nižší
<b>Sekvenční přiřazení</b>	through bond J-coupling	through space NOE
<b>Restrainy pro určení struktury</b>	$\delta$ : alfa vs. beta, NOE, RDC	mj. NOE, RDC, J-coupling(riboza), $^{31}\text{P}$

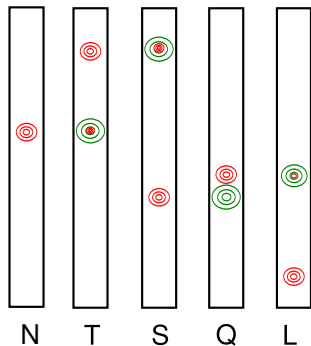
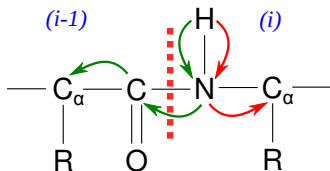
# Úloha 6: Sekvenční přiřazení peptidu

Pomocí fiktivních výsledků (strip-plotu) 3D NMR experimentů (**HNCA**, **HN(CO)CA**) určete N→C sekvenci hypotetického peptidu:



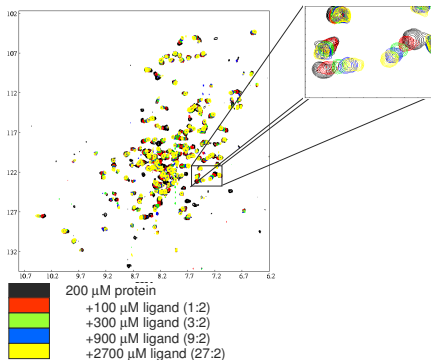
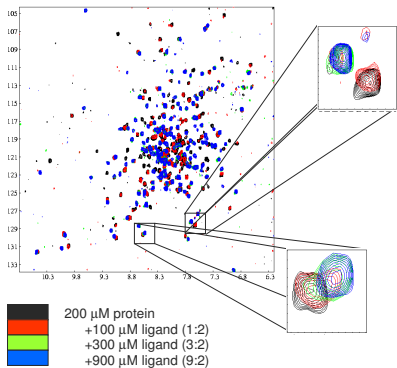
# Úloha 6: Sekvenční přiřazení peptidu

Pomocí fiktivních výsledků (strip-plotu) 3D NMR experimentů (**HNCA**, **HN(CO)CA**) určete N→C sekvenci hypotetického peptidu:



# Úloha 7: Časová škála interakce ligand-receptor

Charakterizujte přiložená  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC spektra zobrazující titrační experiment pomocí: *rychlá, střední a pomalá výměna*:



## Úloha 8: Populace jaderného spinu

Vypočtete rozdíl v populaci izolovaných jaderných spinů  $\alpha - \beta$  pro atom  $^1\text{H}$  (magnetogyrická konstanta  $\gamma = 2.68 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) v magnetickém poli 11.7 T a teplotě 298 K.

## Úloha 8: Populace jaderného spinu

Vypočítejte rozdíl v populaci izolovaných jaderných spinů  $\alpha - \beta$  pro atom  $^1\text{H}$  (magnetogyrická konstanta  $\gamma = 2.68 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) v magnetickém poli 11.7 T a teplotě 298 K.

### Řešení

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \hbar\omega = \hbar\gamma B_0$$

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{(E_\beta - E_\alpha)}{kT}} = e^{-\frac{\hbar\gamma B_0}{kT}} = 0.999919 \approx \frac{100000}{100008}$$



## Úloha 9: Nukleární Overhauserův efekt

Uvažujme zjednodušený NOE experiment provedený na malém proteinu. Krátkým ozařováním o délce 25 ms saturujeme populaci spinu  $H\beta$  a okamžitě měříme signál blízkého spinu  $H\gamma$  v leucinu - za podmínky aproximace počátečního stavu ( $t \rightarrow 0$ ). Ukažte, jak se za těchto podmínek zjednoduší kinetická rovnice prvního řádu popisující časový vývoj magnetizace spinu  $H\gamma$  v závislosti na auto-relaxaci (rychlostní konstanta  $\rho$ ) a cross-relaxaci ( $\sigma$ ):

$$\frac{dI_\gamma}{dt} = -\rho[I_\gamma - I_\gamma(0)] - \sigma[I_\beta - I_\beta(0)]$$

Jaká je přibližná vzdálenost atomů  $H\beta$  a  $H\gamma$ , jestliže jsme při tomto experimentu pozorovali změnu signálu v důsledku NOE o velikosti -0.04 a pro referenční vzdálenost atomů  $H\beta_1 - H\beta_2$  1.75Å bylo naměřeno NOE -0.3?

## Úloha 9: Nukleární Overhauserův efekt

Uvažujme zjednodušený NOE experiment provedený na malém proteinu. Krátkým ozařováním o délce 25 ms saturujeme populaci spinu  $H\beta$  a okamžitě měříme signál blízkého spinu  $H\gamma$  v leucinu - za podmínky aproximace počátečního stavu ( $t \rightarrow 0$ ). Ukažte, jak se za těchto podmínek zjednoduší kinetická rovnice prvního řádu popisující časový vývoj magnetizace spinu  $H\gamma$  v závislosti na auto-relaxaci (rychlostní konstanta  $\rho$ ) a cross-relaxaci ( $\sigma$ ):

$$\frac{dI_\gamma}{dt} = -\rho[I_\gamma - I_\gamma(0)] - \sigma[I_\beta - I_\beta(0)]$$

Jaká je přibližná vzdálenost atomů  $H\beta$  a  $H\gamma$ , jestliže jsme při tomto experimentu pozorovali změnu signálu v důsledku NOE o velikosti -0.04 a pro referenční vzdálenost atomů  $H\beta_1 - H\beta_2$  1.75Å bylo naměřeno NOE -0.3?

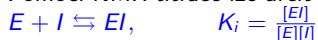
### Řešení

$$\left. \frac{dI_\gamma}{dt} \right|_{t \rightarrow 0} = -\rho[I_\gamma(0) - I_\gamma(0)] + \sigma I_\beta(0) = \sigma I_\beta(0) \Rightarrow I_\gamma = \sigma I_\beta(0)t$$

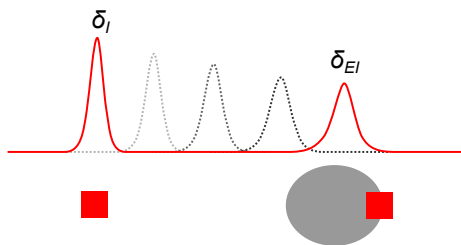
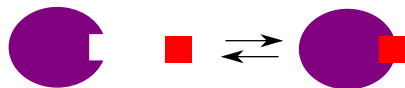
$$\frac{NOE_{\gamma-\beta}}{NOE_{\beta_1-\beta_2}} = \frac{r_{\beta_1-\beta_2}^6}{r_{\gamma-\beta}^6} \Rightarrow r_{\gamma-\beta}^6 = 1.75^6 \frac{-0.3}{-0.04} = 2.44 \text{Å}$$

# Úloha 10: Určování vazebné konstanty

Pomocí NMR titrace lze určit vazebnou konstantu např. interakce enzym-inhibitor:



V případě rychlé výměny pozorujeme posun zprůměrovaného signálu inhibitoru v závislosti na poměru volné a vázané formy inhibitoru ( $f_I, f_{EI}$ ). Ukažte, čemu se rovná směrnice a průsečík lineární závislosti počáteční koncentrace inhibitoru na změně chemického posunu  $[I]_0 \propto \delta_I - \delta_{EI}$ , pokud je počáteční koncentrace inhibitoru mnohem větší než koncentrace enzymu.



## Použitá a doporučená literatura

<http://bouman.chem.georgetown.edu/nmr/dipolar/dipolar.html>

<http://groups.chem.ubc.ca/straus/l2.pdf>

<http://www.columbia.edu/itc/chemistry/chem-c1403/lectures/Fall2005/>

[http://otter.biochem.ubc.ca/publications/BcX\\_Tyrosine\\_JBNMR\\_2011.pdf](http://otter.biochem.ubc.ca/publications/BcX_Tyrosine_JBNMR_2011.pdf)

P. Atkins, J. de Paula: Physical Chemistry

# Příště: Biosenzory a jejich aplikace