

NMR spektroskopie

Metody biofyzikální chemie - seminář (C5856)

Martin Novák
323460@mail.muni.cz

24. října 2016

Interakce jaderného spinového momentu - kontext

Doplňte k zadaným interakčním mechanismům symbolické znázornění a příslušný Hamiltonián:

Dipol-dipolová interakce

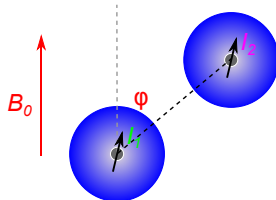
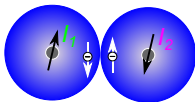
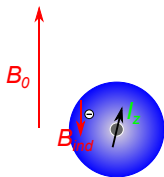
Chemický posun

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

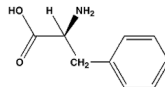
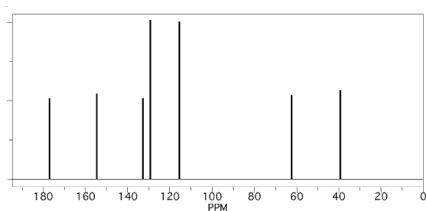
- 1 Metodou NMR strukturní analýzy se rutinně studují biosystémy o velikosti do 10 kDa.
- 2 Nukleární Overhauserův efekt umožňuje korelovat NMR aktivní jádra pouze v rámci jednoho spinového systému.
- 3 V NMR pevné fáze jsou spektra ovlivněna anizotropií chemického stínění a přímou dipól-dipólovou interakcí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

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

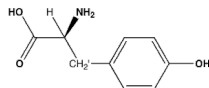
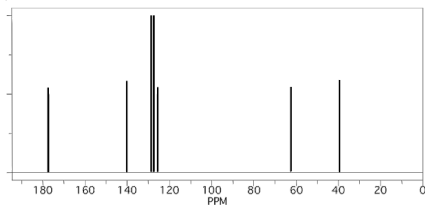
- 1 Metodou NMR strukturní analýzy se rutinně studují biosystémy o velikosti do 10 kDa.
- 2 Nukleární Overhauserův efekt umožňuje korelovat NMR aktivní jádra pouze v rámci jednoho spinového systému.
- 3 V NMR pevné fáze jsou spektra ovlivněna anizotropií chemického stínění a přímou dipól-dipólovou interakcí
- 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.
- 7 Počet signálů v uhlíkovém 1D NMR spektru určité molekuly odpovídá počtu neekvivalentních atomů izotopu ^{13}C .

Úloha 1: Chemický posun - identifikace aminokyselin

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



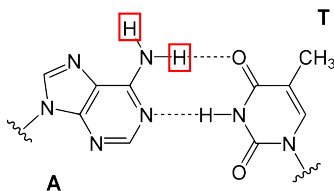
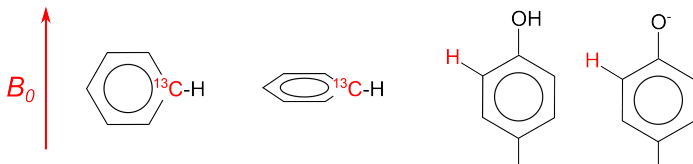
phenylalanine



tyrosine

Úloha 2: Chemický posun - rozlišení

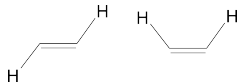
Pro dané systémy, rozhodněte, který z dvojice označených atomů bude mít vyšší hodnotou chemického posunu:



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).

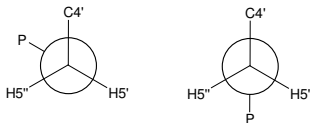
- Kvalitativní pohled:* Na základě srovnání orbitálního překryvu rozhodněte, v jaké konfiguraci nabývá 3J větší hodnoty.



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

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

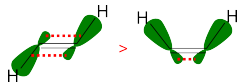
Vypočtete hodnotu konstanty pro znázorněné konformery a charakterizujte je pomocí velikosti standartního úhlu β :



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).

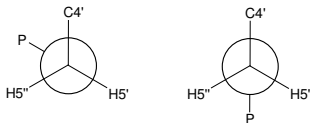
- Kvalitativní pohled:* Na základě srovnání orbitálního překryvu rozhodněte, v jaké konfiguraci nabývá 3J větší hodnoty.



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

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

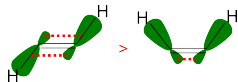
Vypočtete hodnotu konstanty pro znázorněné konformery a charakterizujte je pomocí velikosti standartního úhlu β :



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).

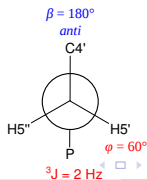
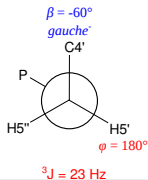
- Kvalitativní pohled:** Na základě srovnání orbitálního překryvu rozhodněte, v jaké konfiguraci nabývá 3J větší hodnoty.



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

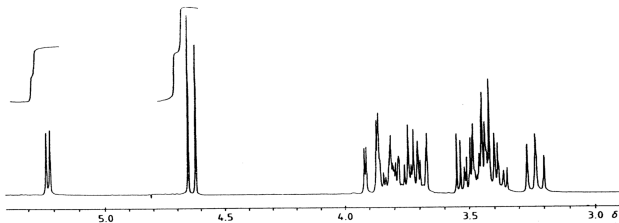
$${}^3J_{HCOP} = 15.3\cos^2\varphi - 6.2\cos\varphi + 1.5.$$

Vypočtete hodnotu konstanty pro znázorněné konformery a charakterizujte je pomocí velikosti standartního úhlu β :



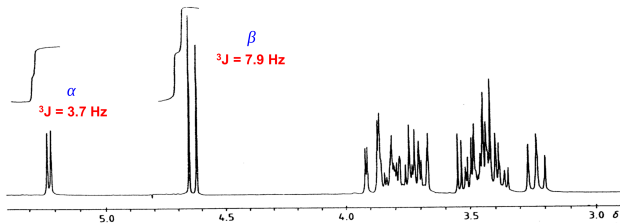
Úloha 3: J -coupling a konformace vazby

Pomocí přiloženého 1D ^1H NMR spektra odhadněte poměr α a β izomeru v roztoku D-glukopyranozy naměřeném v D_2O .



Úloha 3: J -coupling a konformace vazby

Pomocí přiloženého 1D ^1H NMR spektra odhadněte poměr α a β izomeru v roztoku D-glukopyranozy naměřeném v D_2O .

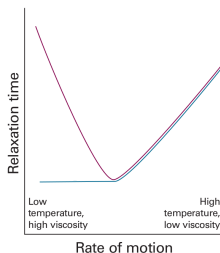


Úloha 4: Relaxační mechanismy

Návrat NMR signálu do rovnovážného stavu se děje dvěma ději: tzv. **spin-mřížkovou** a **spin-spinovou relaxací**. Na základě přiloženého popisu přiřaďte odpovídající křivku závislosti relaxačního času T_1 , T_2 na rychlosti pohybu.

Spin-mřížková relaxace odpovídá konverzi $\alpha \rightleftharpoons \beta$ stavu vlivem lokálních fluktuací magnetického pole o frekvenci blízké rezonanční frekvenci. Je charakterizovaná kinetickým parametrem T_1 .

Spin-spinová relaxace odpovídá ztrátě koherence excitovaného signálu (rozfázování) vlivem lokálních fluktuací magnetického pole. Pomalý pohyb vystavuje spin v molekule nehomogenitám a vede ke změně precesní frekvence, zatímco rychlý pohyb průměruje lokální změny pole a spin-spinová relaxace je méně účinná. Je charakterizovaná kinetickým parametrem T_2 .

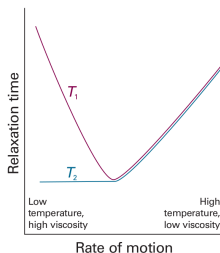


Úloha 4: Relaxační mechanismy

Návrat NMR signálu do rovnovážného stavu se děje dvěma ději: tzv. **spin-mřížkovou** a **spin-spinovou relaxací**. Na základě přiloženého popisu přiřad'te odpovídající křivku závislosti relaxačního času T_1 , T_2 na rychlosti pohybu.

Spin-mřížková relaxace odpovídá konverzi $\alpha \rightleftharpoons \beta$ stavu vlivem lokálních fluktuací magnetického pole o frekvenci blízké rezonanční frekvenci. Je charakterizovaná kinetickým parametrem T_1 .

Spin-spinová relaxace odpovídá ztrátě koherence excitovaného signálu (rozfázování) vlivem lokálních fluktuací magnetického pole. Pomalý pohyb vystavuje spin v molekule nehomogenitám a vede ke změně precesní frekvence, zatímco rychlý pohyb průměruje lokální změny pole a spin-spinová relaxace je méně účinná. Je charakterizovaná kinetickým parametrem T_2 .



Úloha 5: Příklady strukturně-biologických 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 D₂O

¹³C editované NOESY spektrum

Expres proteinu v deuterovaném médiu

Aplikace paramagnetických sond

Multidimenzionální inverzní experimenty (4D, 5D)

Úloha 5: Příklady strukturně-biologických 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}C editované NOESY spektrum

Odstranění signálů labilních protonů v molekule nukleové kyseliny

převedení vzorku do D_2O

Přiřazení málo rozlišených signálů v nestrukturované části proteinu

multidimenzionální inverzní experimenty (4D, 5D)

Mapování reziduí směřujících k povrchu proteinu

aplikace paramagnetických sond

Úloha 6: Protein vs. Nukleové kyseliny: NMR aspekty

Diskutujte o následujících praktických okolnostech NMR experimentů při srovnání protein vs. DNA/RNA:

	Proteiny	NA
Syntéza vzorku		
Izotopické značení		
Hustota ^1H		
Sekvenční přiřazení		
Restrainy pro určení struktury		

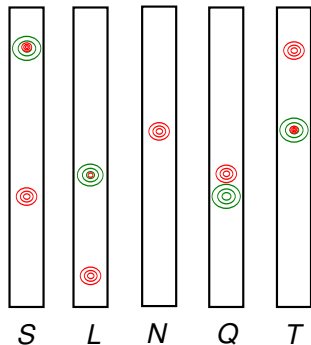
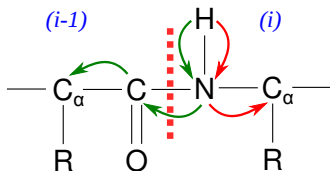
Úloha 6: Protein vs. Nukleové kyseliny: NMR aspekty

Diskutujte o následujících praktických okolnostech NMR experimentů při srovnání protein vs. DNA/RNA:

	Proteiny	NA
Syntéza vzorku	<i>in vivo</i>	chemickou cestou
Izotopické značení	snadné	nákladné
Hustota ^1H	rel. vysoká	nižší
Sekvenční přiřazení	přes vazby: J-coupling	dipól-dopólová interakce: NOE
Restrainy pro určení struktury	δ : alfa vs. beta, NOE, RDC	mj. NOE, RDC, J-coupling(riboza), ^{31}P

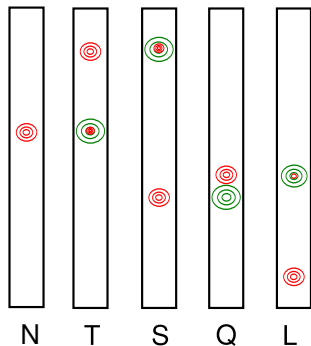
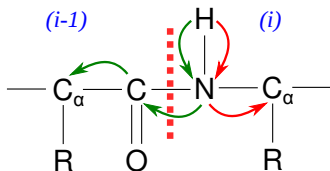
Úloha 7: Sekvenční přiřazení peptidu

Pomocí fiktivních výsledků (strip-plotu) 3D NMR experimentů (**HNCA**, **HN(CO)CA**) určete N→C sekvenci hypotetického peptidu. Dbejte na správné pořadí od N-konce k C-konci peptidu.



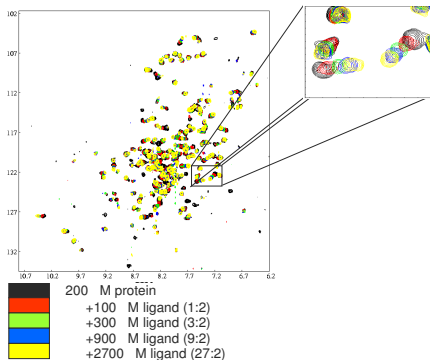
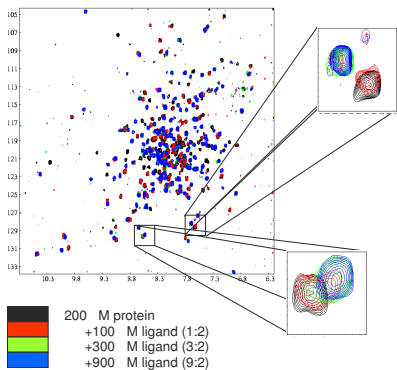
Úloha 7: Sekvenční přiřazení peptidu

Pomocí fiktivních výsledků (strip-plotu) 3D NMR experimentů (**HNCA**, **HN(CO)CA**) určete N→C sekvenci hypotetického peptidu. Dbejte na správné pořadí od N-konce k C-konci peptidu.



Úloha 8: Časová škála interakce ligand-receptor

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



Úloha 9: Populace jaderného spinu

Vypočtete rozdíl v populaci izolovaných jaderných spinů $\alpha - \beta$ pro atom ^1H (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 9: Populace jaderného spinu

Vypočtete rozdíl v populaci izolovaných jaderných spinů $\alpha - \beta$ pro atom ^1H (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 10: 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 ρ) a cross-relaxaci (rychlostní konstanta σ):

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

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 10: 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 ρ) a cross-relaxaci (rychlostní konstanta σ):

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

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

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

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

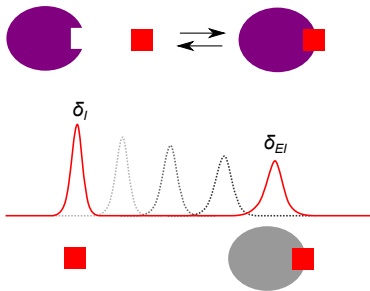
Úloha 11: Určování vazebné konstanty

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



V případě rychlé výměny pozorujeme posun zprůměrovaného signálu inhibitoru v závislosti na poměru volné a vázané formy inhibitoru (relativní frakce $f_I = \frac{[I]}{[E]+[I]}$, $f_{EI} = \frac{[EI]}{[E]+[I]}$). Ukažte, čemu se rovnají parametry lineární závislosti **počáteční koncentrace inhibitoru I_0 na změně chemického posunu inhibitoru** během titrace

$\Delta\delta_I = \delta_I - \delta_I(0)$, pokud je počáteční koncentrace inhibitoru mnohem větší než koncentrace enzymu. V této závislosti vystupují jako parametry interakce: **počáteční koncentrace enzymu E_0 , disociační konstanta inhibice K_D a rozdíl chemického posunu volné a vázané formy inhibitoru $\delta_{EI} - \delta_I$**



Úloha 11: Určování vazebné konstanty

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



V případě rychlé výměny pozorujeme posun zprůměrovaného signálu inhibitoru v závislosti na poměru volné a vázané formy inhibitoru (relativní frakce $f_I = \frac{[I]}{[E]+[I]}$, $f_{EI} = \frac{[EI]}{[E]+[I]}$). Ukažte, čemu se rovnají parametry lineární závislosti **počáteční koncentrace inhibitoru I_0 na změně chemického posunu inhibitoru** během titrace

$\Delta\delta_I = \delta_I - \delta_I(0)$, pokud je počáteční koncentrace inhibitoru mnohem větší než koncentrace enzymu. V této závislosti vystupují jako parametry interakce: **počáteční koncentrace enzymu E_0 , disociační konstanta inhibice K_D a rozdíl chemického posunu volné a vázané formy inhibitoru $\delta_{EI} - \delta_I$**

Řešení

$$\Delta\delta_I = \frac{[EI]}{I_0} (\delta_{EI} - \delta_I)$$

$$[EI] = \frac{E_0 I_0}{K_D + I_0}$$

$$I_0 = E_0 (\delta_{EI} - \delta_I) \frac{1}{\Delta\delta_I} - K_D \rightarrow \text{směrnice: } E_0 (\delta_{EI} - \delta_I), \text{ průsečík s osou y: } -K_D.$$

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

P. Atkins, J. de Paula: Physical Chemistry

Příště: M. Novák: Molekulové modelování