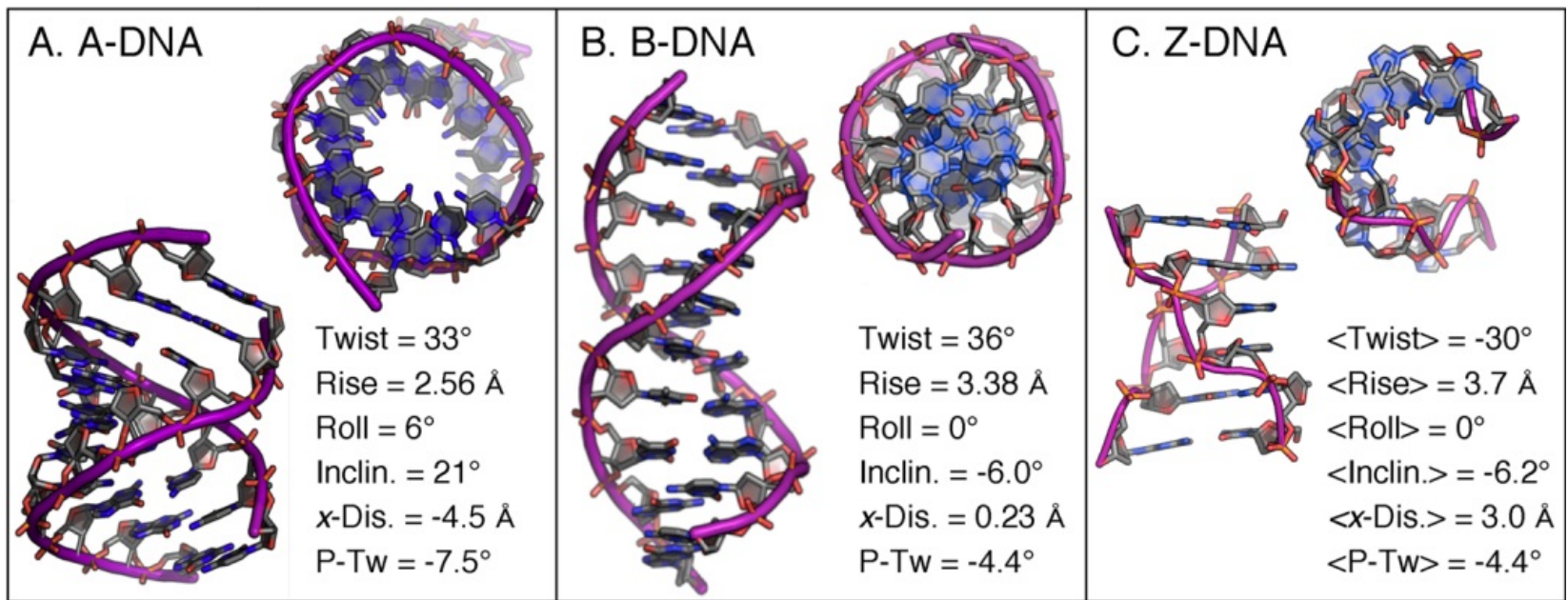


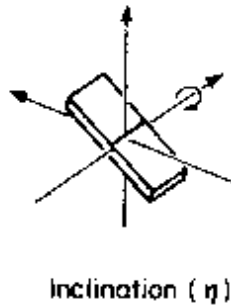
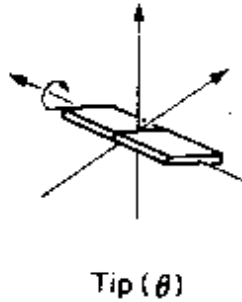
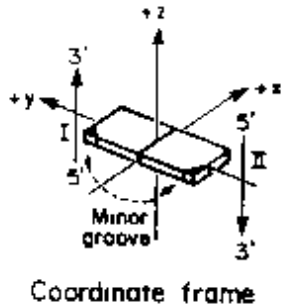
# Část 3 & 4:



# Opakování: Helikální parametry

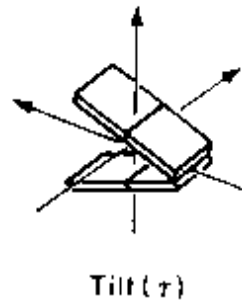
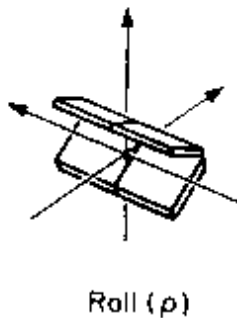
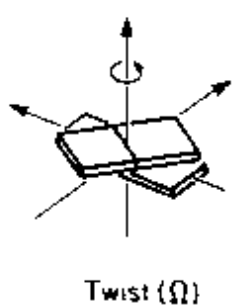
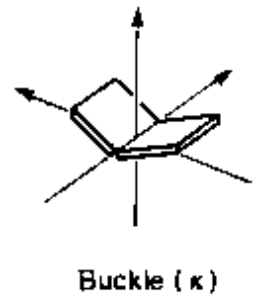
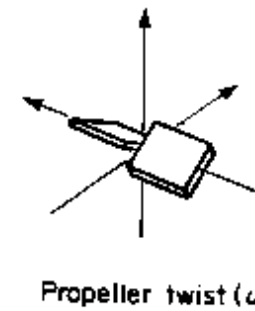
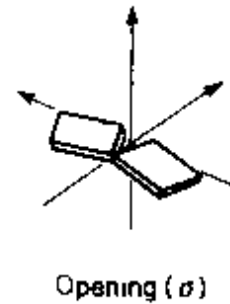


# 9 rotačních helikálních parametrů



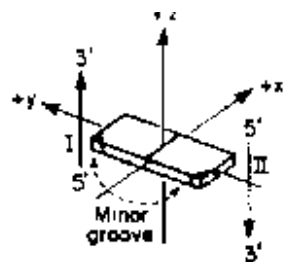
**Vzhledem k helikální ose**

**Báze vůči sobě**

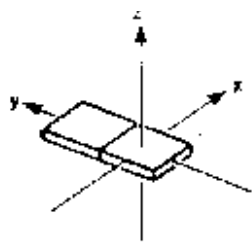


**Páry bazí vůči sobě**

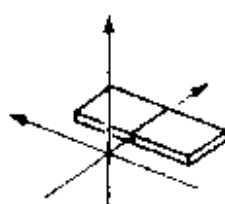
# 9 tranlačných helikálnych parametrov



Coordinate frame



y displacement (dy)

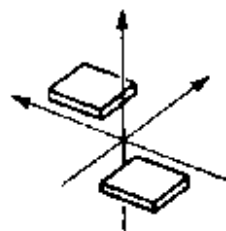


x displacement (dx)

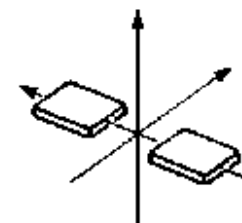


**Vzhľadom k helikálnej ose**

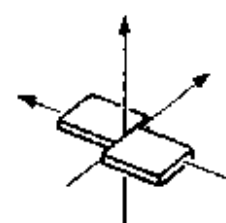
**Báze vŕči sobe**



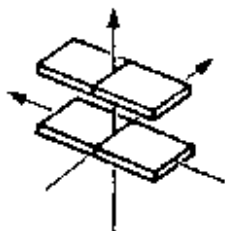
Stagger ( $S_z$ )



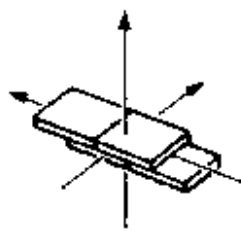
Stretch ( $S_y$ )



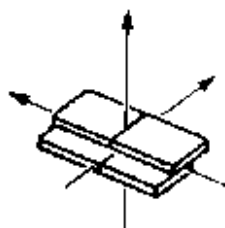
Shear ( $S_x$ )



Rise ( $D_z$ )



Slide ( $D_y$ )

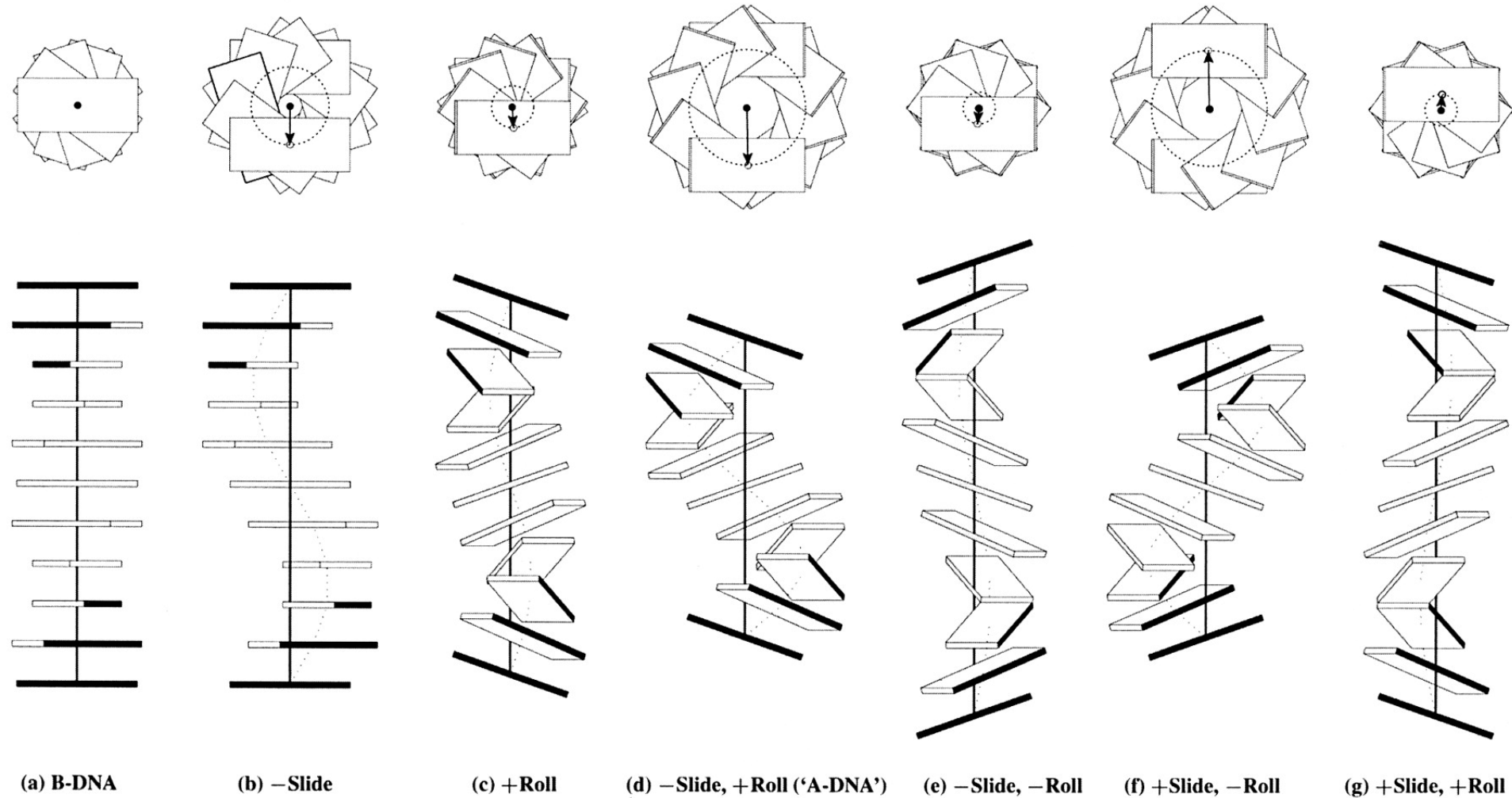


Shift ( $D_x$ )



**Páry bazí vŕči sobe**

# Helikální osa

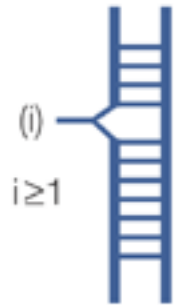


# Přehled základních strukturních motivů NK

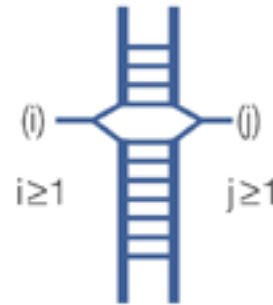
**a**



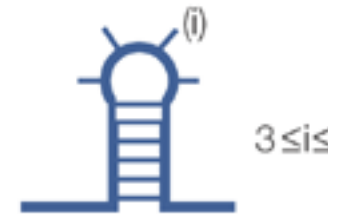
Double-stranded segment (dsRNA)



Bulge



Internal loop (if  $i = j$ , symmetric internal loop; if  $i \neq j$ , asymmetric internal loop)



Hairpin (stem-loop)

**b**



Two-stem junction (coaxial stack)



Pseudoknot



Kissing hairpins

# Přehled základních strukturních motivů NK



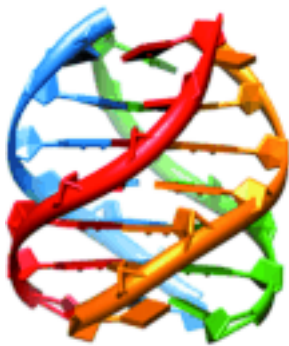
Duplex DNA



Three-way DNA junction



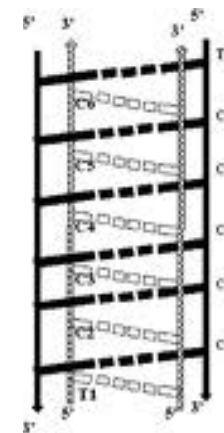
H-DNA



G-quadruplex DNA



Four-way DNA junction



i-motif

# Přehled metod strukturní analýzy

**Vysoké rozlišení  
(atomární struktura)**

**Difrakce:**

- a) Elektronová
- b) Neutronová
- c) Roentgenová

**Nukleární magnetická  
resonance**

**Nízké rozlišení  
(strukturní vlastnosti)**

**Spektroskopie:**

- a) Cirkulární dichroismus
- b) Fluorescenční (FRET)
- c) Elektronová  
paramagnetická resonance
- d) Hmotnostní spektrometrie  
(?)

**Elektronová mikroskopie  
IČ/Ramanova spektroskopie**



# Metody vysokého rozlišení: statistika

Exp.Method	Proteins	Nucleic Acids	Protein/NA Complexes	Other
X-RAY	77603	1481	4072	3
NMR	8861	1046	193	7
ELECTRON MICROSCOPY	471	45	129	0
HYBRID	52	3	2	1
other	151	4	6	13
Total	87138	2579	4402	24

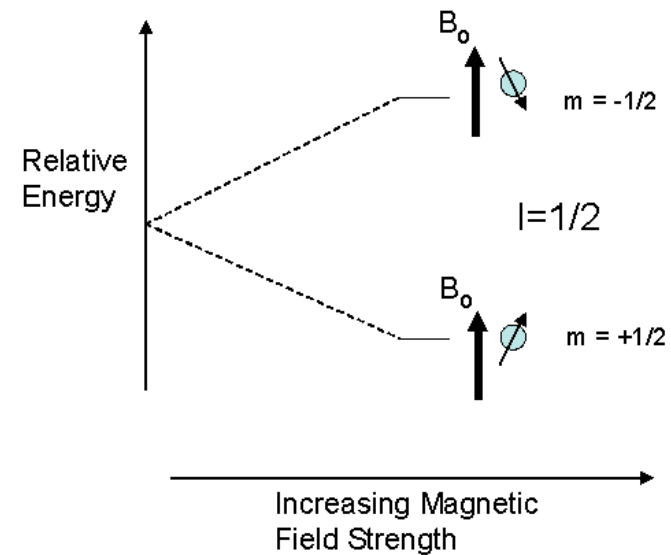
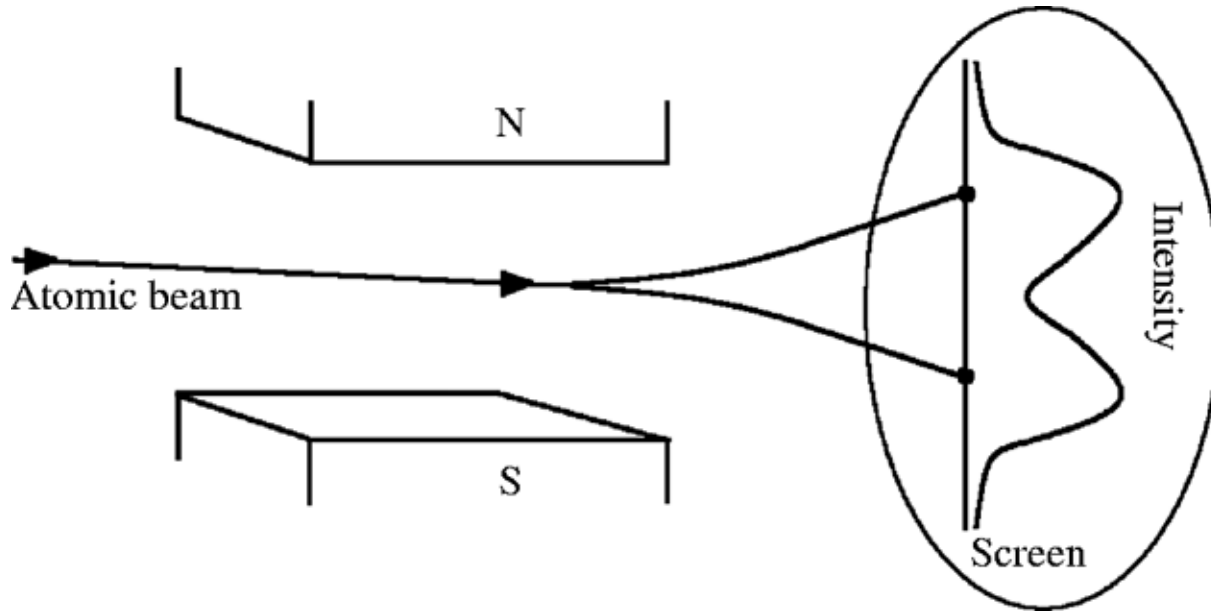
# Nukleární magnetická rezonance

**Nukleární** – protože využívá vlastnosti atomových jader některých izotopů majících nenulový rotační moment (spin) a s ním spojený magnetický moment.

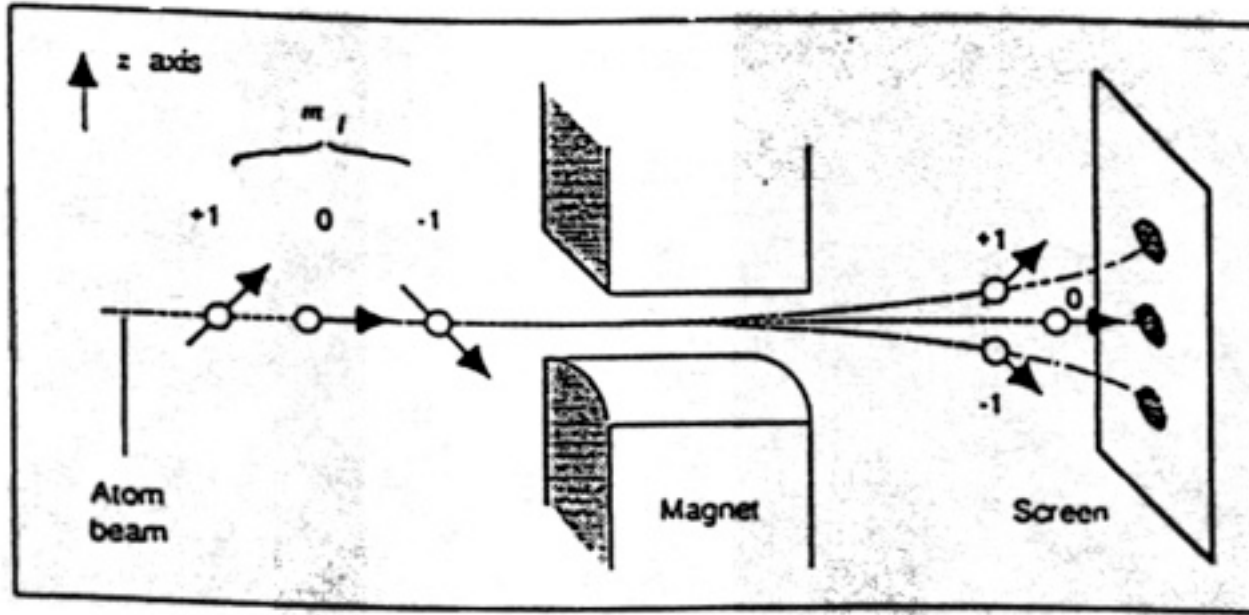
**Magnetická** – protože magnetické momenty těchto jader zaujmou v homogením magnetickém poli  $2I+1$  orientací lišící se svojí energií. Příčemž magnetický moment vykonává kolem směru mg. pole precesní pohyb.

**Rezonanční** – protože jádra na nižší energetické hladině jsou schopna absorbovat energii z vysokofrekvenčního pole, jestliže frekvence precesního pohybu jejich mg. momentu a kruhová frekvence pole je stejná.

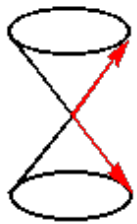
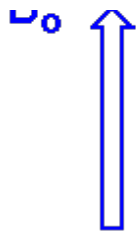
# Stern-Gerlach experiment



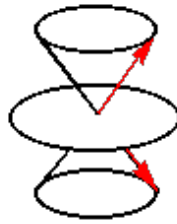
# Kvantové číslo jaderného spinu I



-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	s
			1				Spin-0
		1	1				Spin-1/2
		1	1	1			Spin-1
		1	1	1	1		Spin-3/2
		1	1	1	1	1	Spin-2
		1	1	1	1	1	Spin-5/2
		1	1	1	1	1	Spin-3



$I = 1/2$



$I = 1$

$I = 0$  - sudé hmotnostní a atomové číslo -  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$

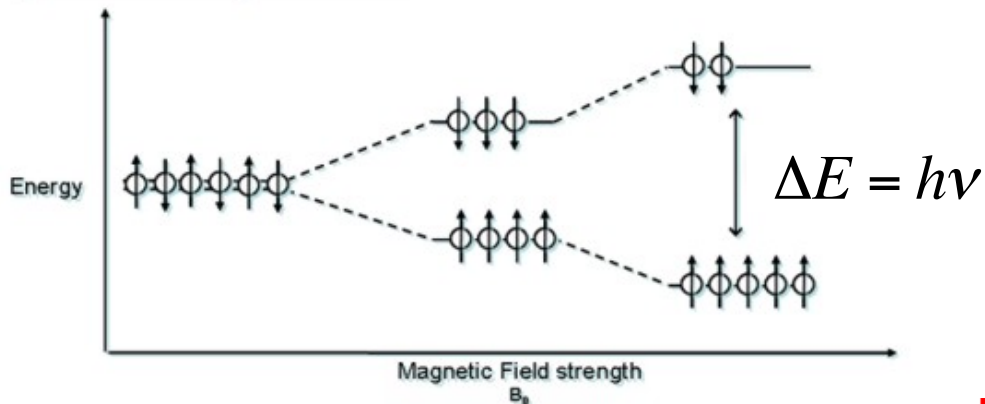
$I =$  celočíselné - sudé hmotnostní a liché atomové číslo -  $^{14}\text{N}$ ,  $^{10}\text{B}$ ,  $^2\text{H}$

$I =$  polovinové - liché hmotnostní číslo -  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{31}\text{P}$

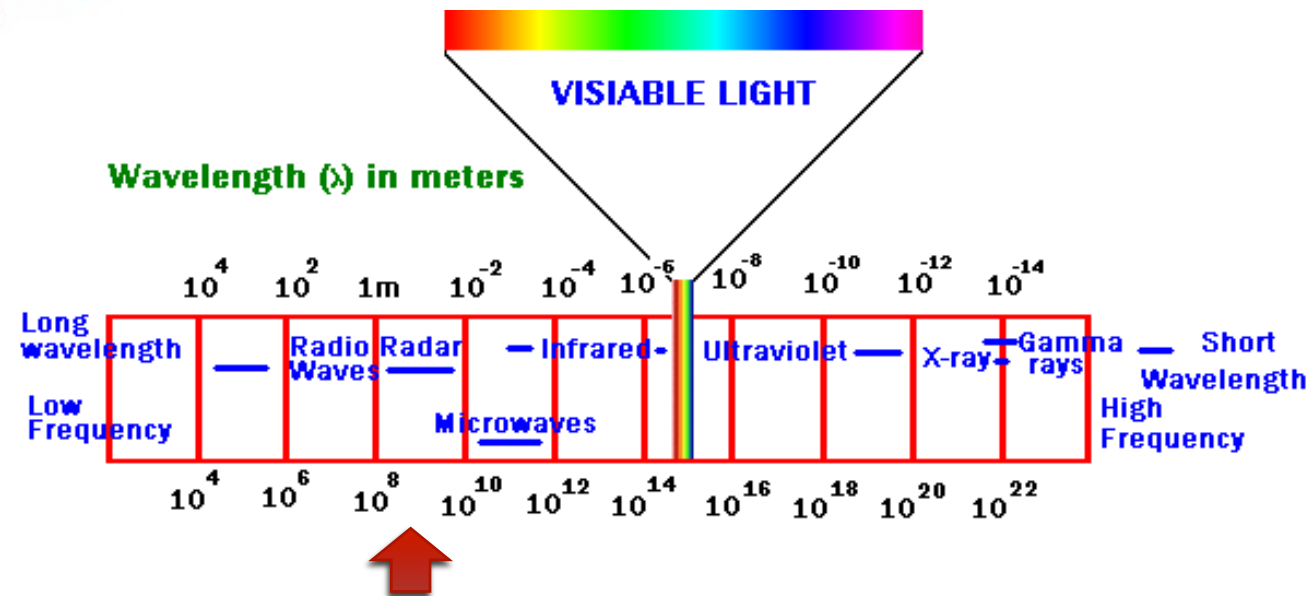
**Z interpretačních důvodů máme radi jadra s  $I = 1/2$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ).**

# Podmínka resonance

⊕ Aligned with  $B_0$     ⊙ Opposing  $B_0$



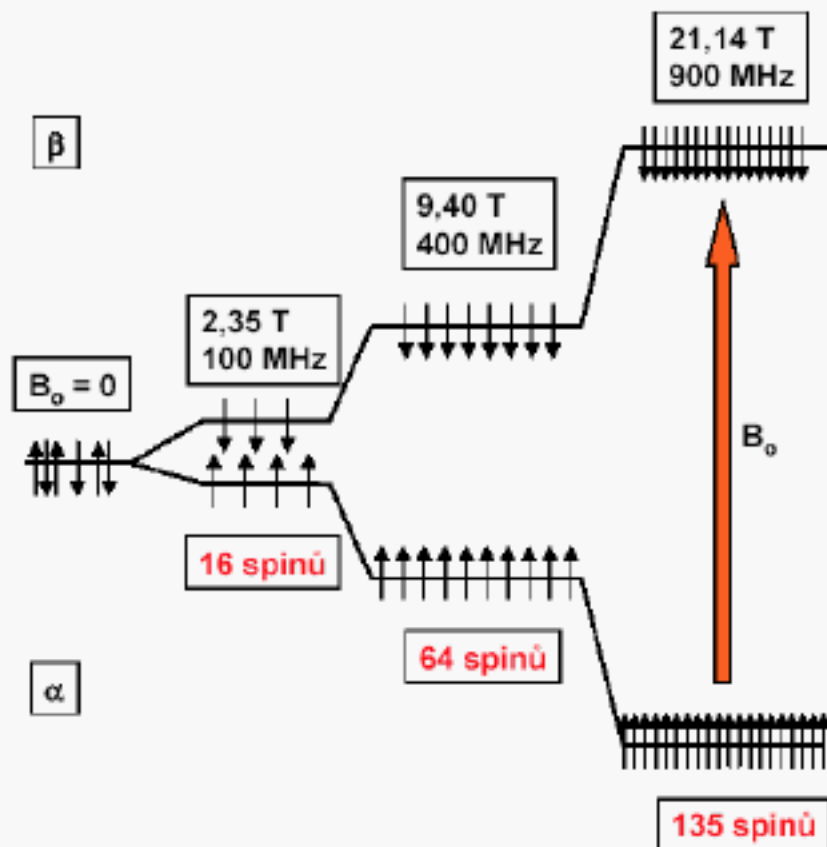
$$2\pi\nu = \gamma B$$



# Citlivost NMR

Zvyšující se rozdíl v populacích obou spinových stavů  $\alpha$  a  $\beta$  pro jádro  $^1\text{H}$  vlivem vyššího externího magnetického pole.

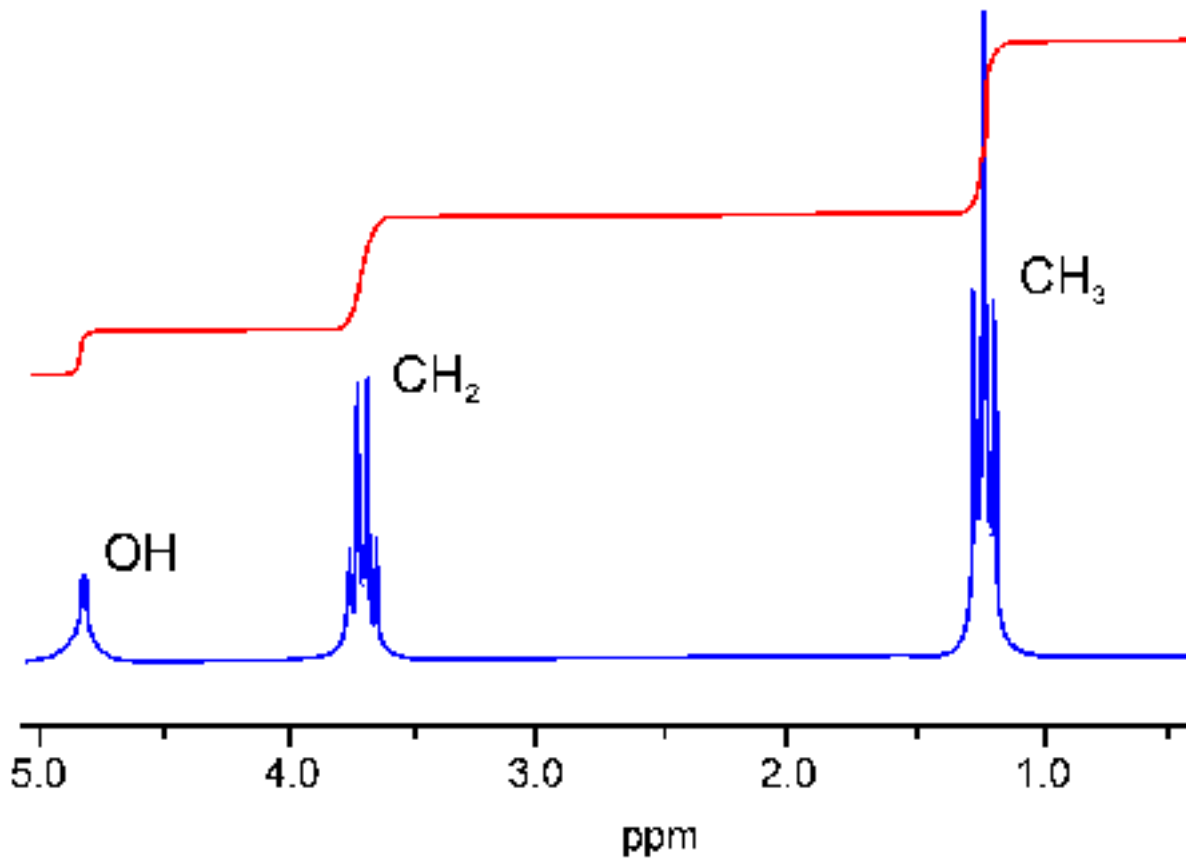
Je-li stav  $\beta$  obsazen  $10^8$  spinů, stav  $\alpha$  obsahuje  $10^8 + \text{přebytek}$ .



*Typický biomolekulární NMR vzorek:*

- a) **Koncentrace** – 250  $\mu\text{M}$  – 3 **mM**
- b) Vodný roztok
- c) pH = 5 – 8, iontová síla 25 – 300 mM
- d) Teplota 1-35  $^{\circ}\text{C}$

# Charakteristiky NMR spekter



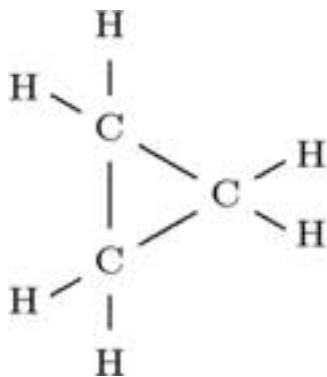
# Charakteristiky NMR spekter

- 1) Počet signálů** – počet strukturně neekvivalentních atomů sledovaného isotopu v molekule
- 2) Poloha signálů** – odráží vliv elektronického okolí zkoumaného jádra
- 3) Intenzita signálů** – odráží relativní zastoupení magneticky ekvivalentních atomů
- 4) Štepení signálů** – charakterizuje ovlivnění lokálního magnetického pole působící na studované jádro magnetickými momenty jader vázaných v okolí

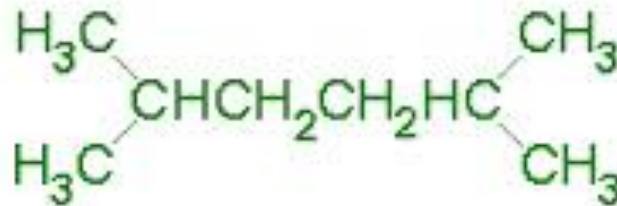


# Počet signálů– symetrická (ne)ekvivalence

**Ad 1) Počet signálů ve spektru = počtu symetricky neekvivalentních atomů daného isotopu ve zkoumané molekule**



1 signál



3 signály (6:2:1)

**Symetricky ekvivalentní jádra/skupiny = jádra/skupiny zaměnitelné libovolnou operací symetrie.**

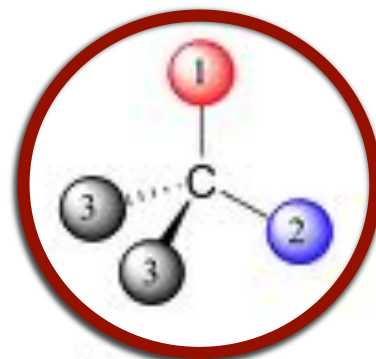
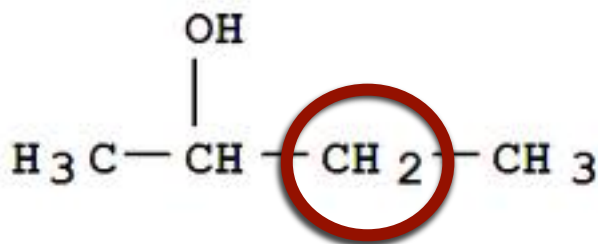
# Počet signálů– symetrická (ne)ekvivalence

**Vzorový příklad ke zkoušce:**

**Jakou strukturu má sloučenina vzorce  $C_3H_8O$ , sestává-li její vodíkově NMR spektrum ze tří signálů s poměrem intenzit 1:1:6?**

# Počet signálů a prochiralita

Je vyznačená  $\text{CH}_2$  prochirální? Pokud ano, je tato skupina enantiotopní nebo diastereotopní?

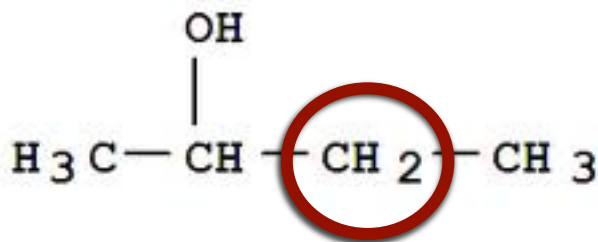


a prochiral carbon center

Pokud existuje pomyslná rovina půlící úhel 3-C-3, která je zároveň rovinou symetrie celé molekuly je prochirální centrum **enantiotopní**. Pokud tomu tak není, klasifikujeme prochirální skupinu jako **diastereotopní**.

# Počet signálů– prochiralita

Kolik signálů lze očekávat v NMR spektru?



Diastereotopní, 2 signály (1:1)

Pokud je prochirální centrum **enantiotopní** => chemicky stejné substituenty dávají pouze jeden signál ve spektru.

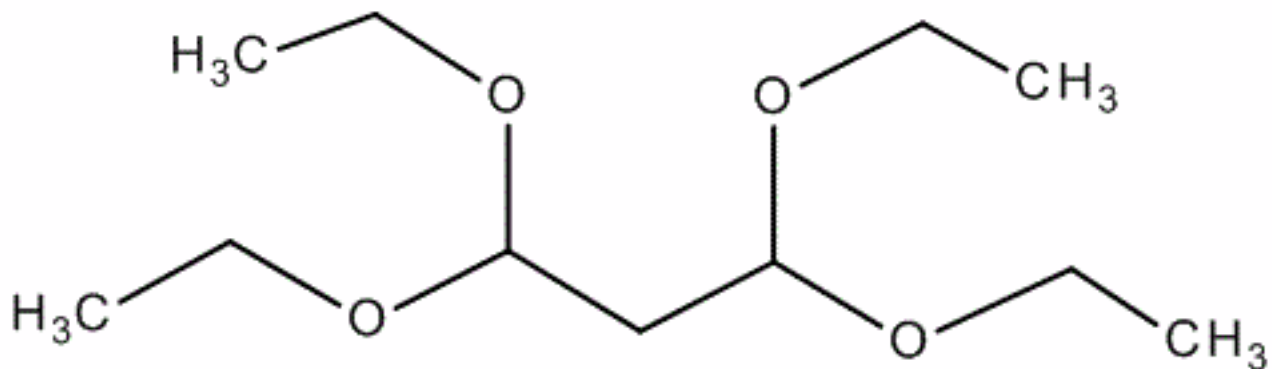
Pokud je prochirální centrum **diastereotopní** => chemicky stejné substituenty dávají dva signály ve spektru.

**Pomůcka:** prochirální substituenty v chirální (dissymetrické) molekule jsou vždy diastereotopní.

# Počet signálů– prochiralita

Vzorový příklad ke zkoušce:

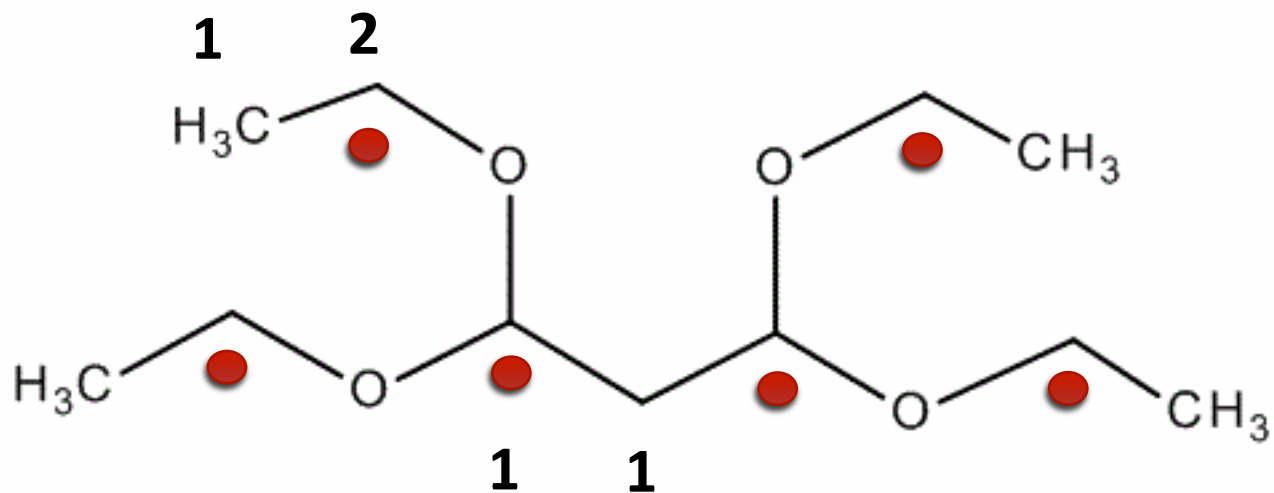
**Najděte prochirální centra v molekule a určete možný počet signálu v  $^1\text{H}$  NMR spektru.**



# Počet signálů– prochiralita

Vzorový příklad ke zkoušce:

**Najděte prochirální centra v molekule a určete možný počet signálu v  $^1\text{H}$  NMR spektru. Stanovte relativní poměr jejich intenzit.**



# Poloha signálů - chemické stínění

Elektrony v okolí sledovaného jádra vytvářejí pod vlivem vloženého magnetického pole  $B_0$  sekundární magnetické pole ( $B_{eff}$ ).

$$2\pi\nu = \gamma B_{eff} \quad B_{eff} = B_0 \cdot (1 - \sigma)$$

**Stínící konstanta ( $\sigma$ ) charakterizuje polohu jádra v molekule (odráží jeho chemické okolí).**

# Poloha signálů - chemický posun

**Chemický posun** – ustálený způsob zapisu polohy signálu ve NMR spektrech. Jednotky **ppm**.

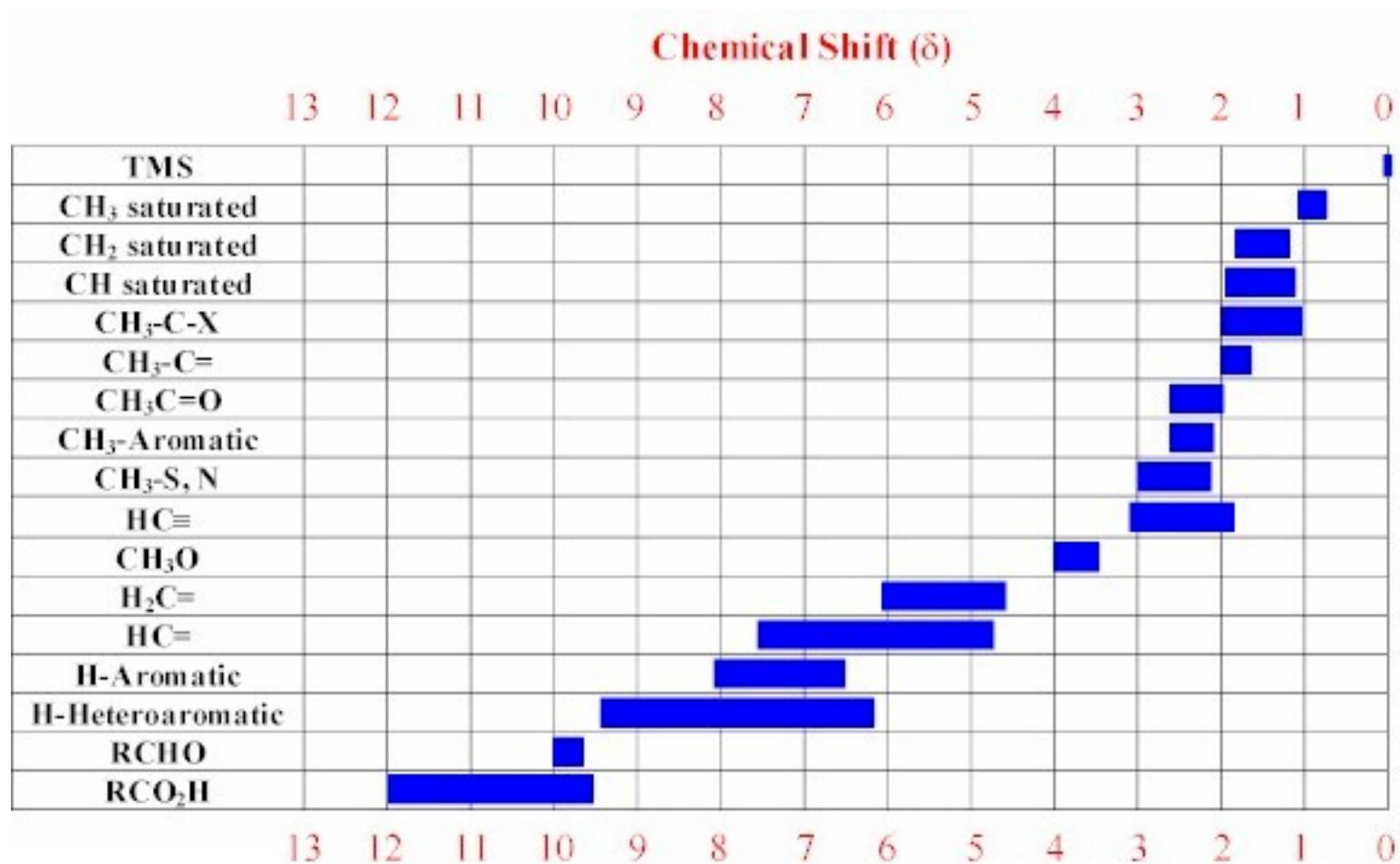
Rezonanční frekvence  
referenční sloučeniny.

$$\delta = \frac{\nu - \nu_s}{\nu_0}$$

Pracovní frekvence spektrometru

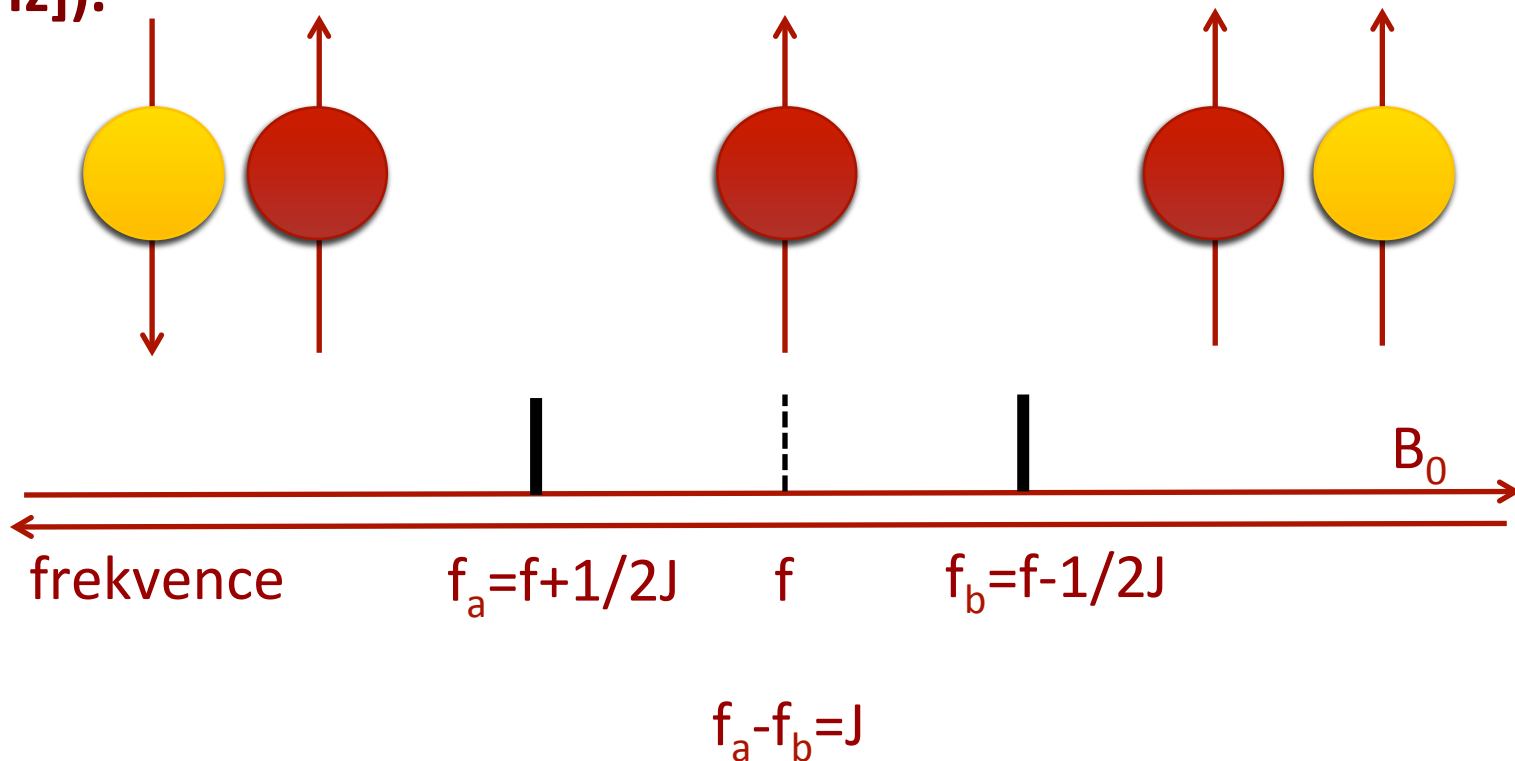


# Chemický posun – závislost na chemickém okolí



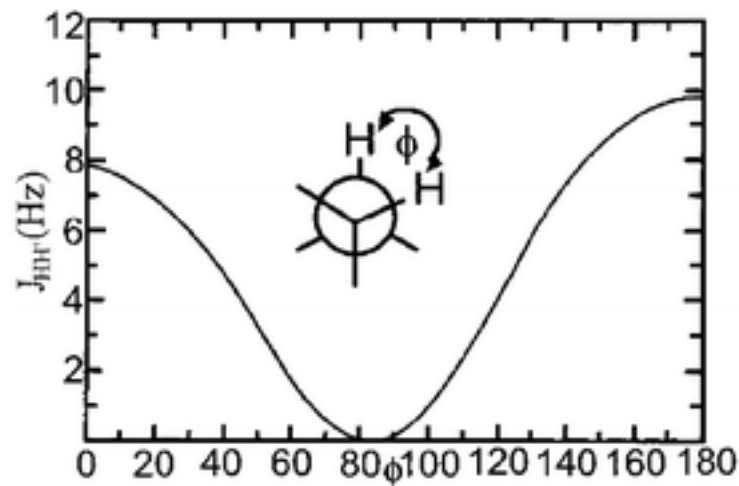
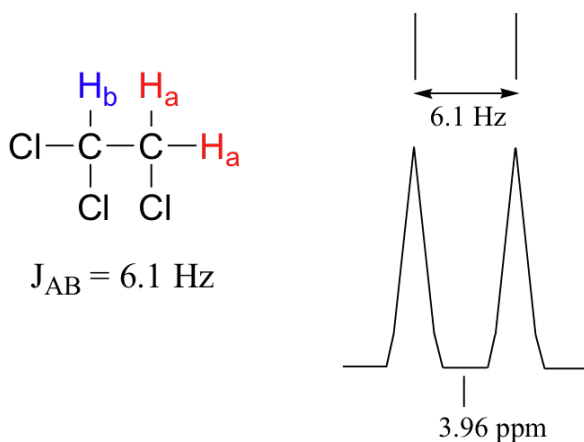
# Hyper-jemná struktura NMR spekter: Skalární interakční konstanta

**Nepřímá spin-spinová interakce magnetických momentů jader** prostřednictvím polarizace orbitálních pohybů valenčních elektronů ( $J$  [Hz]).



# Strukturní interpretace J

**Způsob zápisu:**  ${}^nJ_{X-Y}$ , např.  ${}^3J_{H-H}$  = spin-spinová interakční konstanta popisující interakci mezi dvěma atomy vodíku vzdálených jeden od druhého přes tři kovalentní vazby.

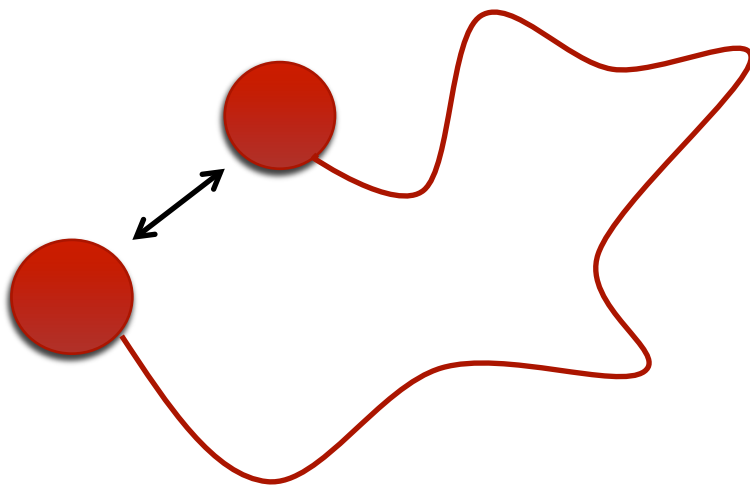


**Karplusova rovnice:**

kvantitativní popis vztahu mezi torzním úhlem a J.

# Nukleární Overhauserův efekt (NOE)

Porucha energetického stavu jednoho z jader může způsobit zvýšení intenzit signálů jader stejného druhu, které jsou prostorově blízko. **NOE závisí na prostorové blízkosti mezi jádry** (nejčastěji vodíků).



**Jedinečný zdroj informace o meziprotonových vzdálenostech ( $< 6 \text{ \AA}$ ). Jeden z hlavních zdrojů strukturní informace v biomolekulární NMR.**

# NMR v biomolekulární strukturní analýze

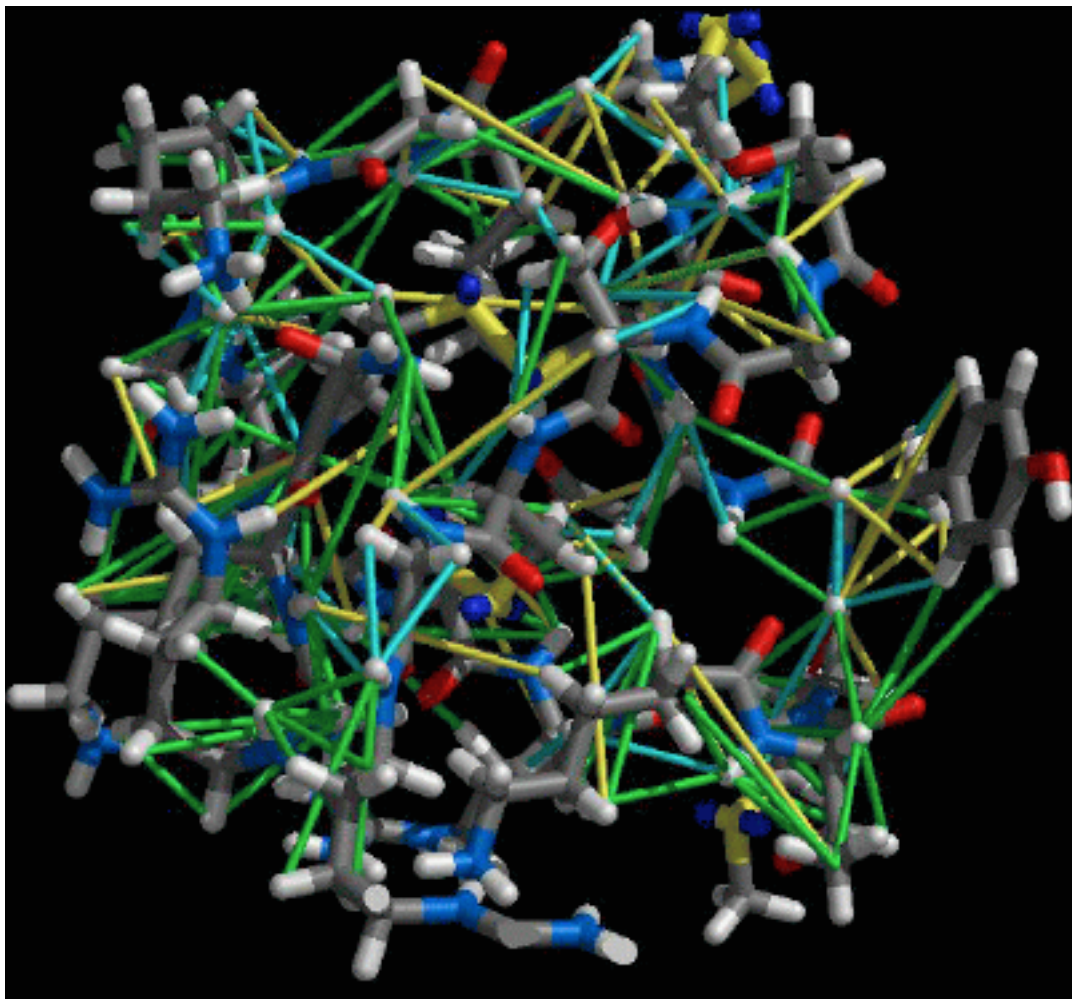
**Strukturní analýza pomocí NMR = konformační analýza**  
(NMR neposkytuje žádnou informaci o vazebných delkách a vazebných úhlech).

**Experimentální data NMR** (mezi-protonové vzdálenosti, torzní uhly, relativní orientace vazebných vektorů, ...)

+

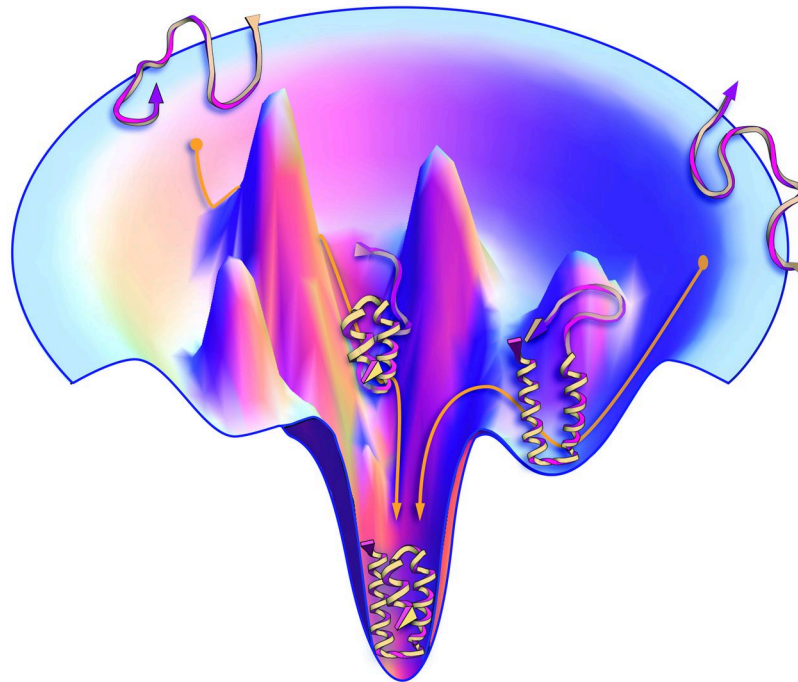
**Externí informace** o topologii studované molekuly, idealizovaných vazebných délkách a vazebných úhlech.

# NMR v biomolekulární strukturní analýze: procedura



# NMR v biomolekulární strukturní analýze: procedura

**V prostoru torzních úhlů, který je omezen experimentálními daty, hledáme stav s nejnižší energií.**

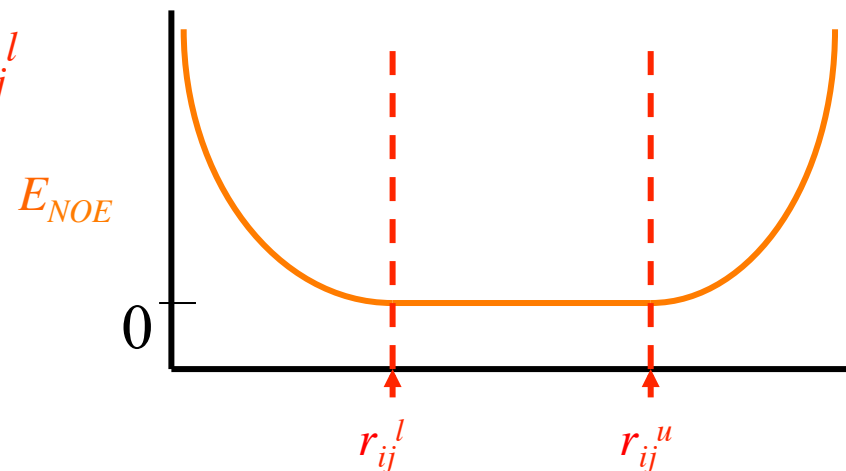


# NMR v biomolekulární strukturní analýze

$$E_{total} = E_{bond} + E_{angle} + E_{dihedr} + E_{vdW} + E_{coulomb} + E_{NMR}$$

$$E_{NMR} = E_{scalar} + E_{NOE} + E_{RDC}$$

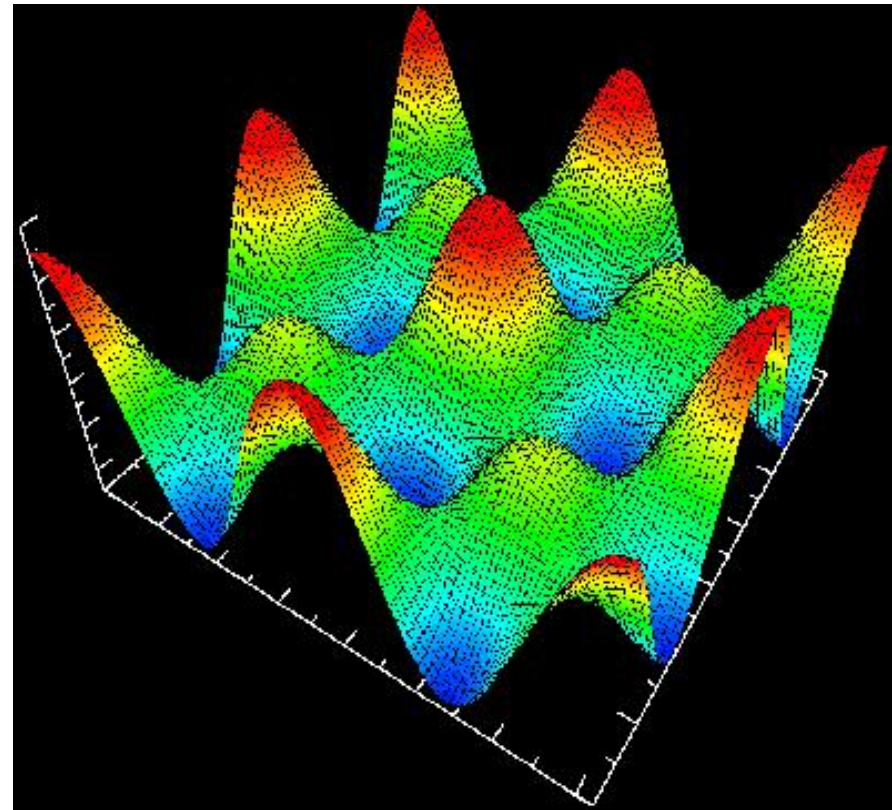
$$E_{NOE} = \begin{cases} K_{NOE}(r_{ij} - r_{ij}^u)^2 & \text{if } r_{ij} > r_{ij}^u \\ 0 & \text{if } r_{ij}^l < r_{ij} < r_{ij}^u \\ K_{NOE}(r_{ij} - r_{ij}^l)^2 & \text{if } r_{ij} < r_{ij}^l \end{cases}$$





# Energeticky degenerované stavy na PES

**Obecně může existovat několik rozdílných struktur se stejnou nebo velmi podobnou energií (kompatibilních stejným způsobem s experimentálními daty).**



# Prezentace struktur z NMR: strukturní soubor



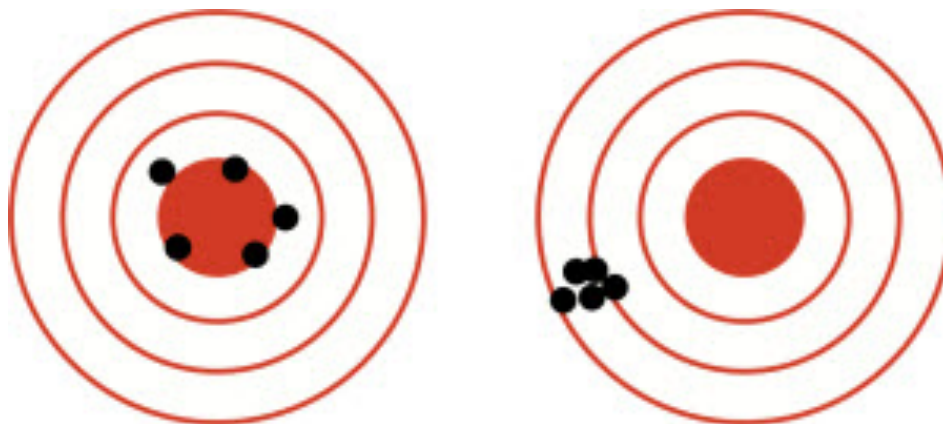
$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

**RMSD:** Míra průměrných vzdáleností mezi odpovídajícími si atomy v superponovaných strukturách. Míra podobnosti uvnitř souboru struktur. Kvantitativní míra přesnosti v biomolekulární NMR.

# Publikační formát



# Správnost vs přesnost,



# Zdroje strukturních artefaktů v NMR

