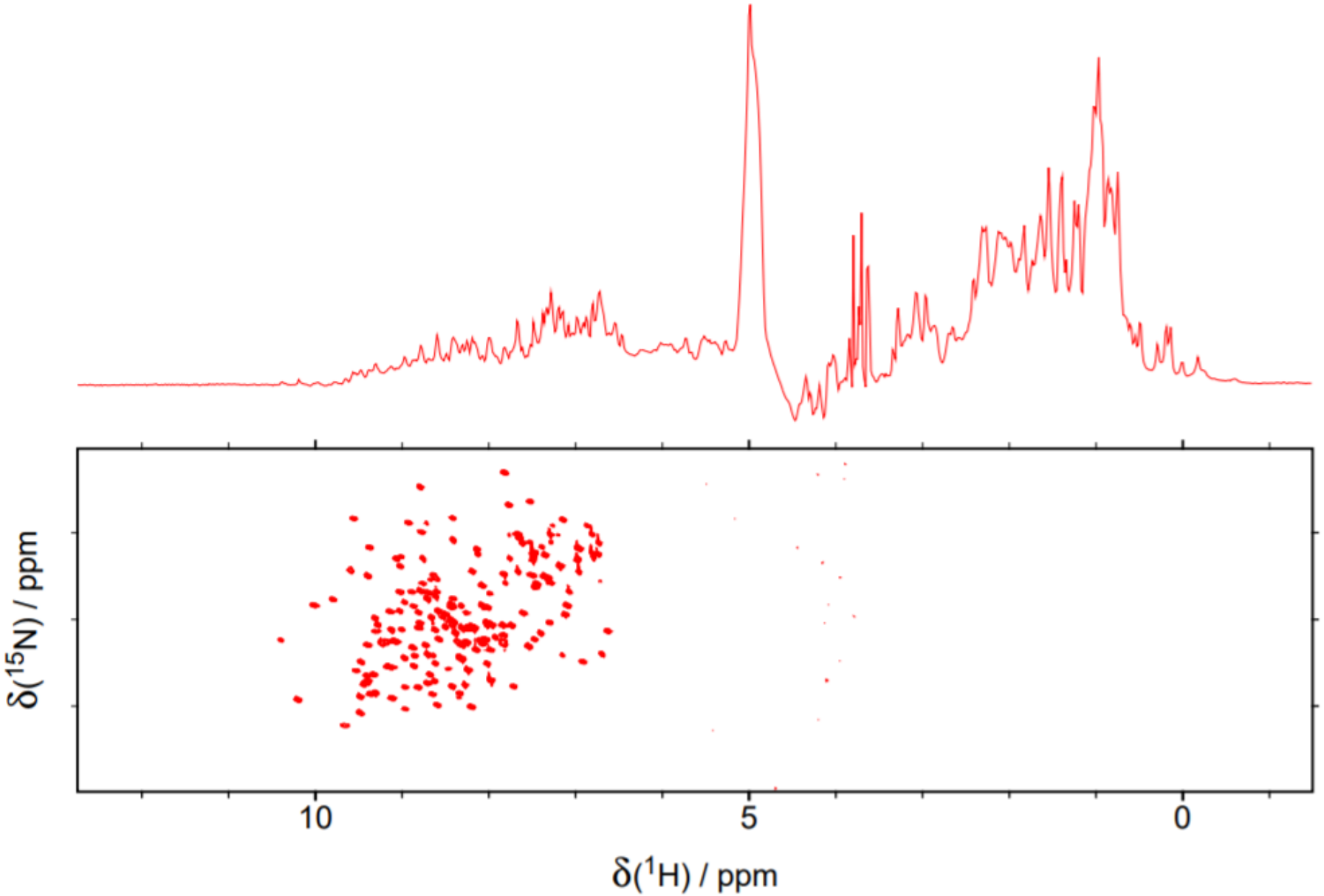
Nukleární magnetická rezonance

Viktor Bartošík

10. 12. 2023

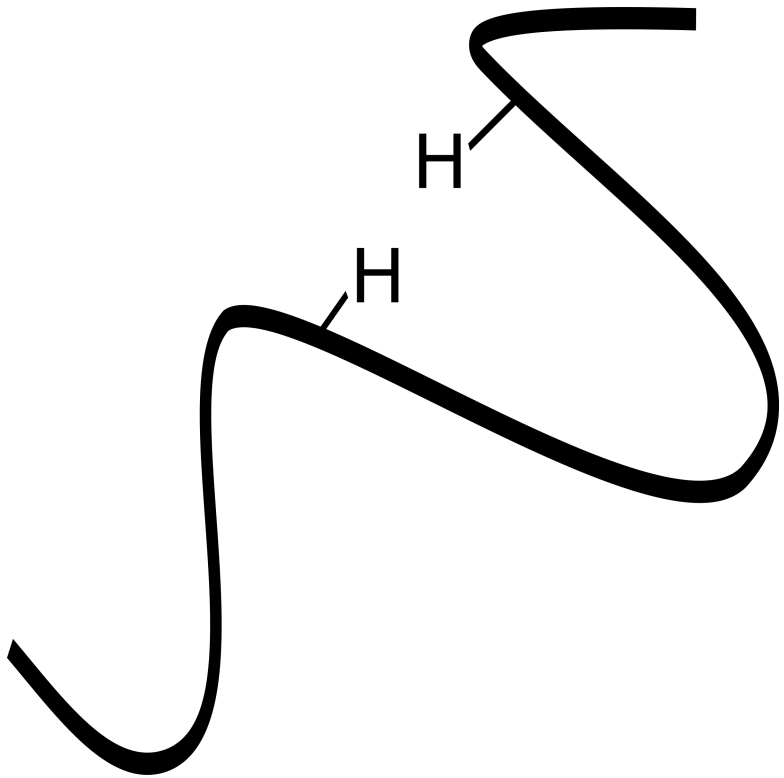
NMR proteinů



Experimenty

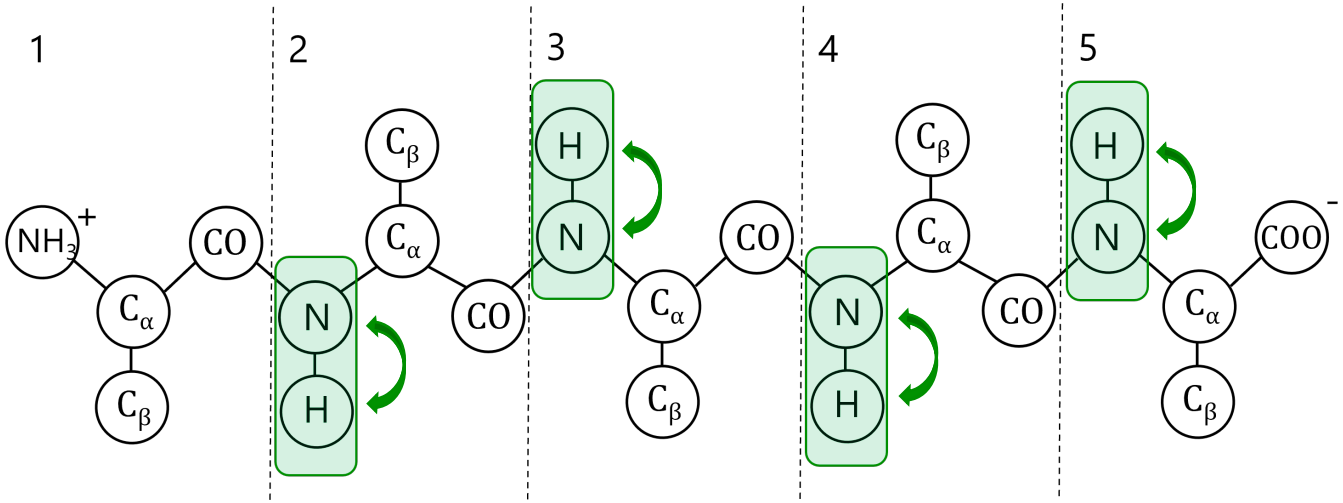
korelace přes prostor

- NOESY

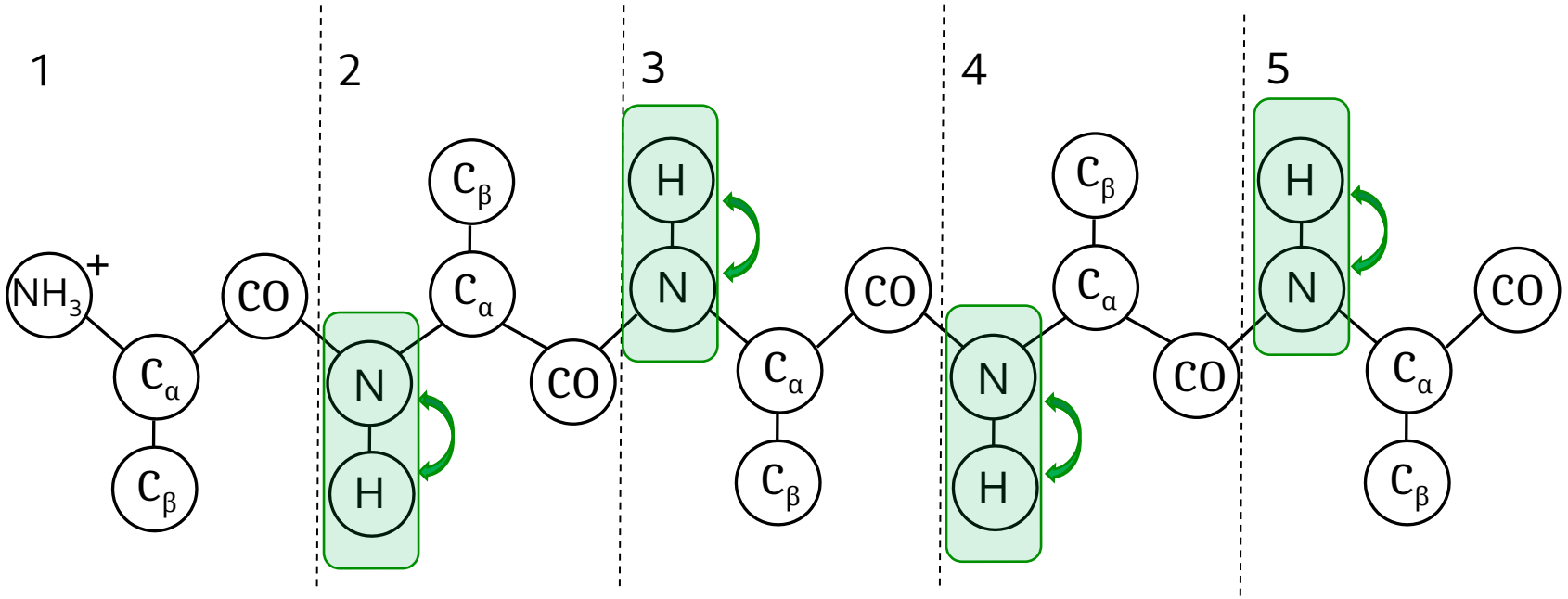


korelace přes vazby

- HSQC
- HNCACB
- HN(CO)CACB

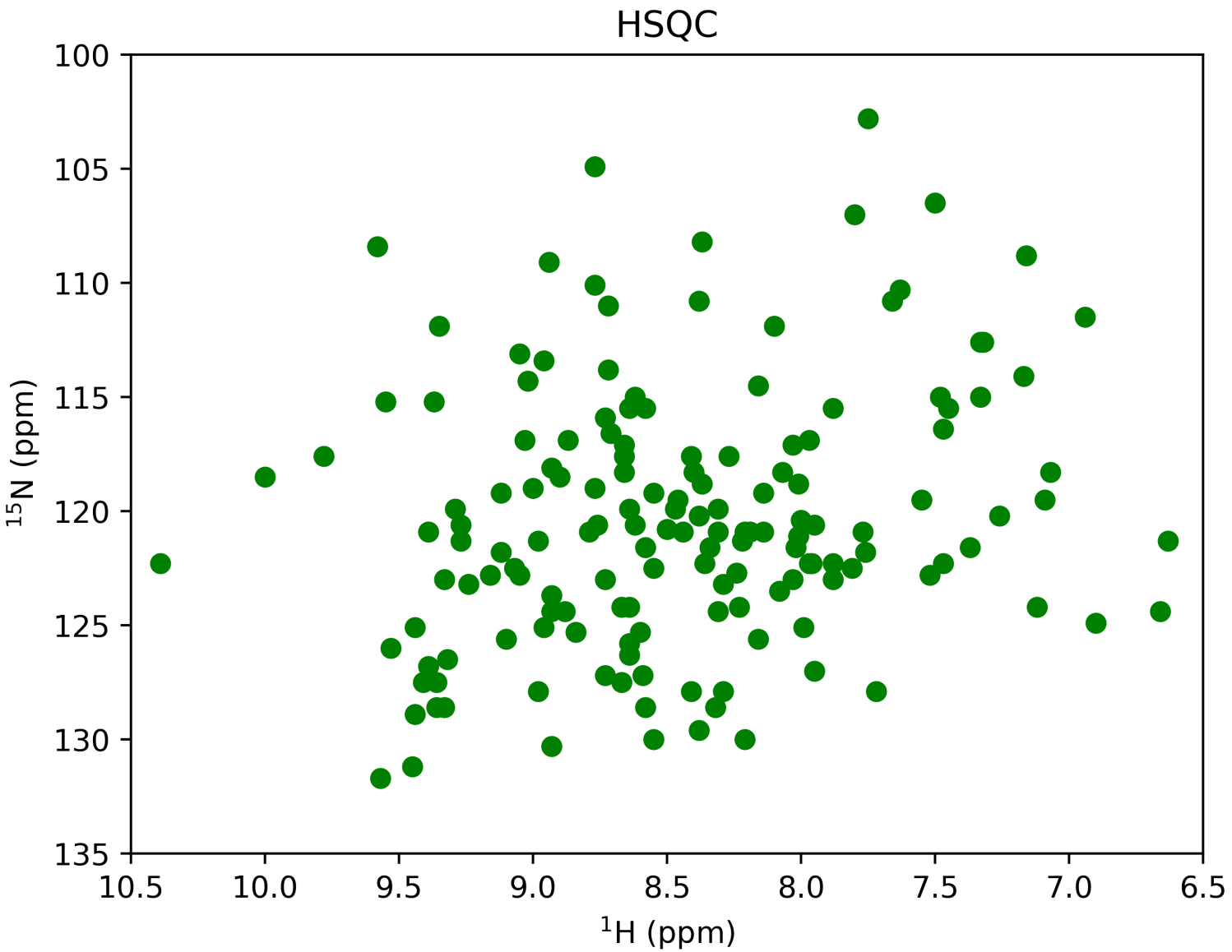


Sekvenční Přiřazení HSQC

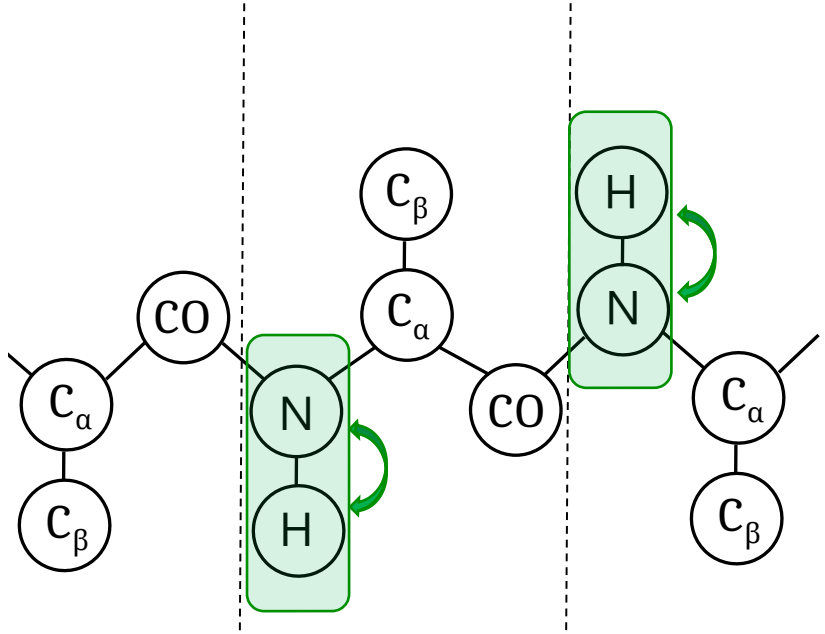


HSQC: korelace H-N vazby

2D HSQC

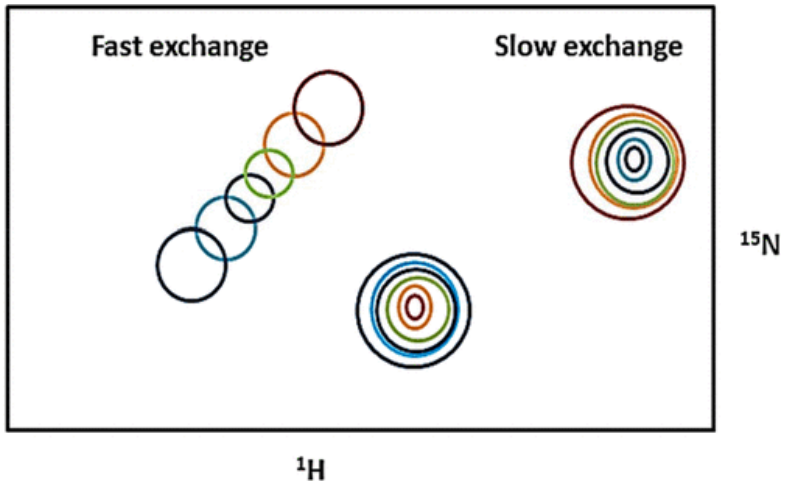


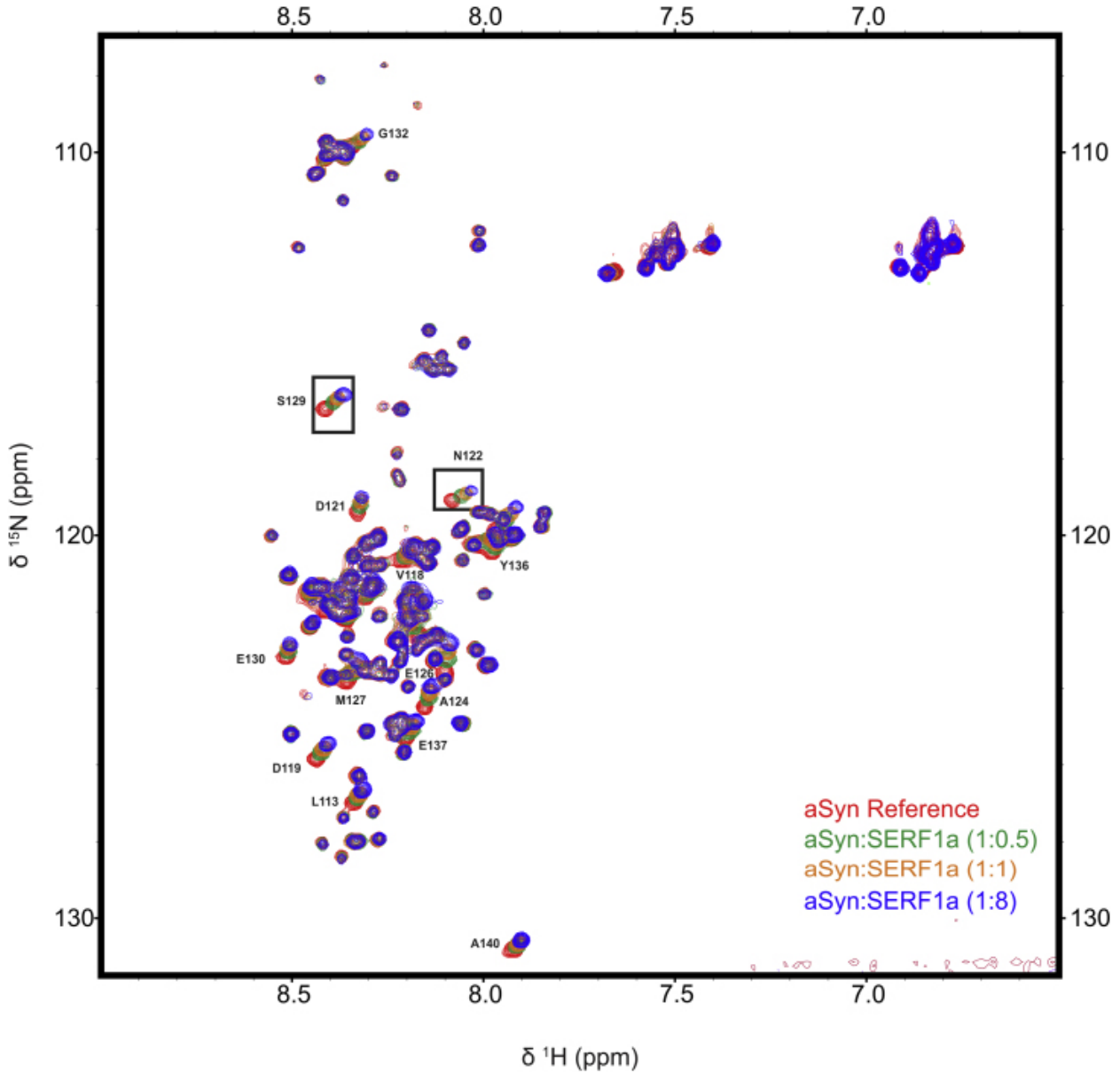
HSQC: korelace H-N vazby



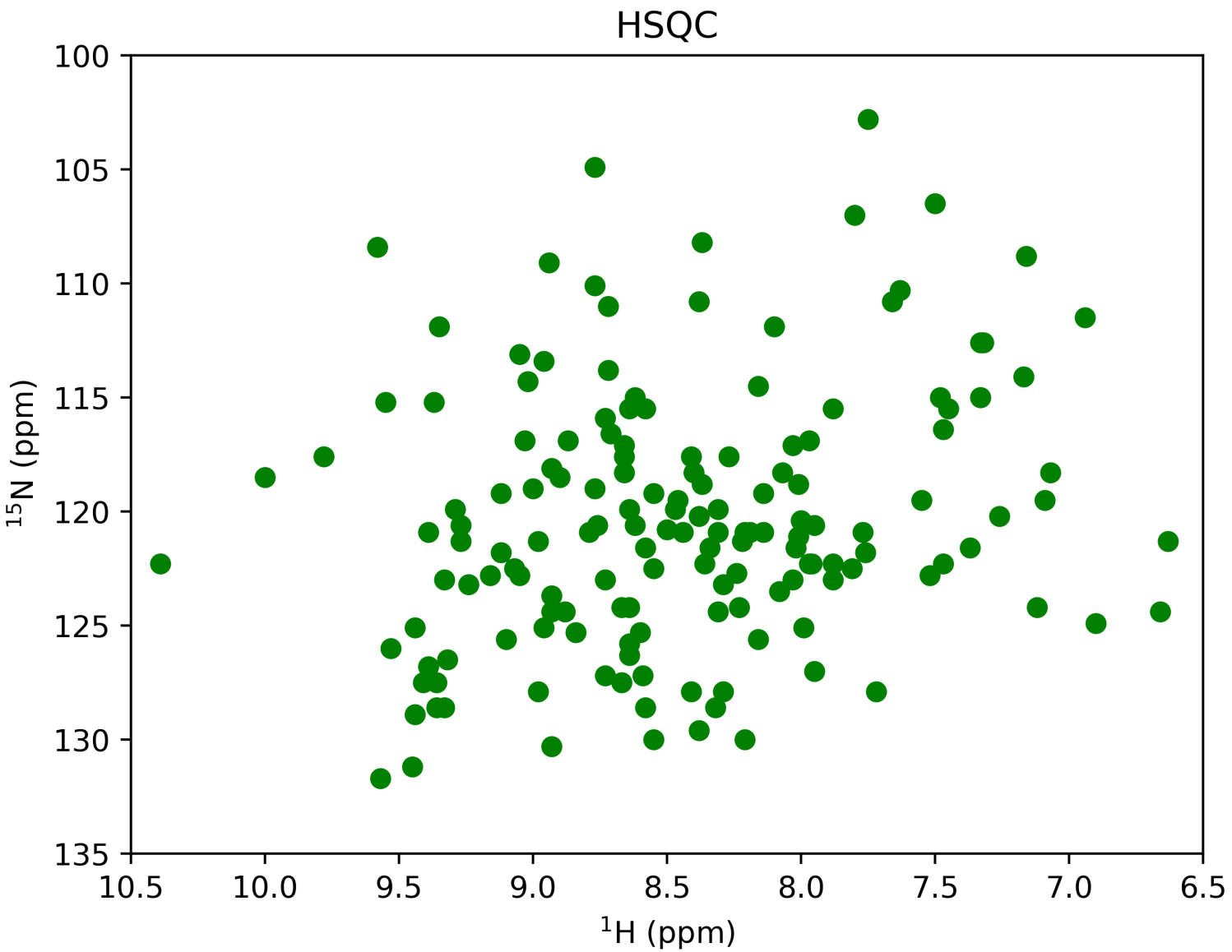
Titrační experimenty

- isotopicky značený protein titrovaný neznačeným ligandem
- posun peaků v okolí **vazebných míst** nebo **při konformačních změnách**
- určení afinity – K_d

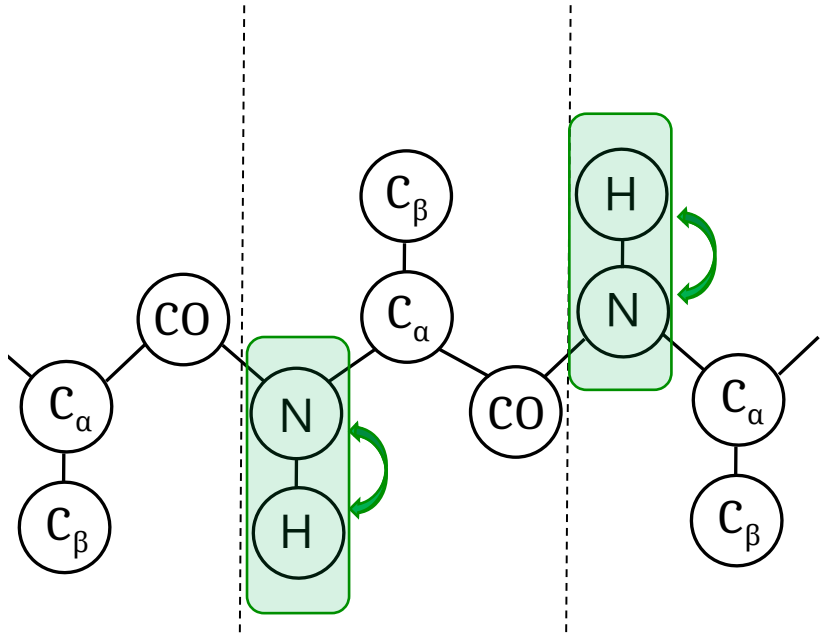




2D HSQC



HSQC: korelace H-N vazby



Kterou aminokyselinu v tomto HSQC spektru neuvidíme? Které další NH korelace naopak vidět můžeme?

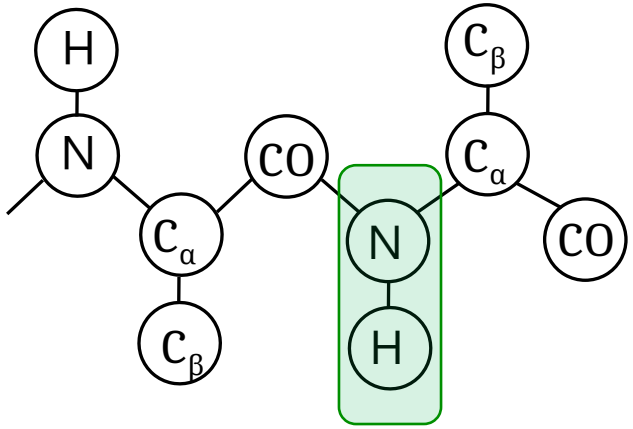
2D spektrum proteinu - HSQC

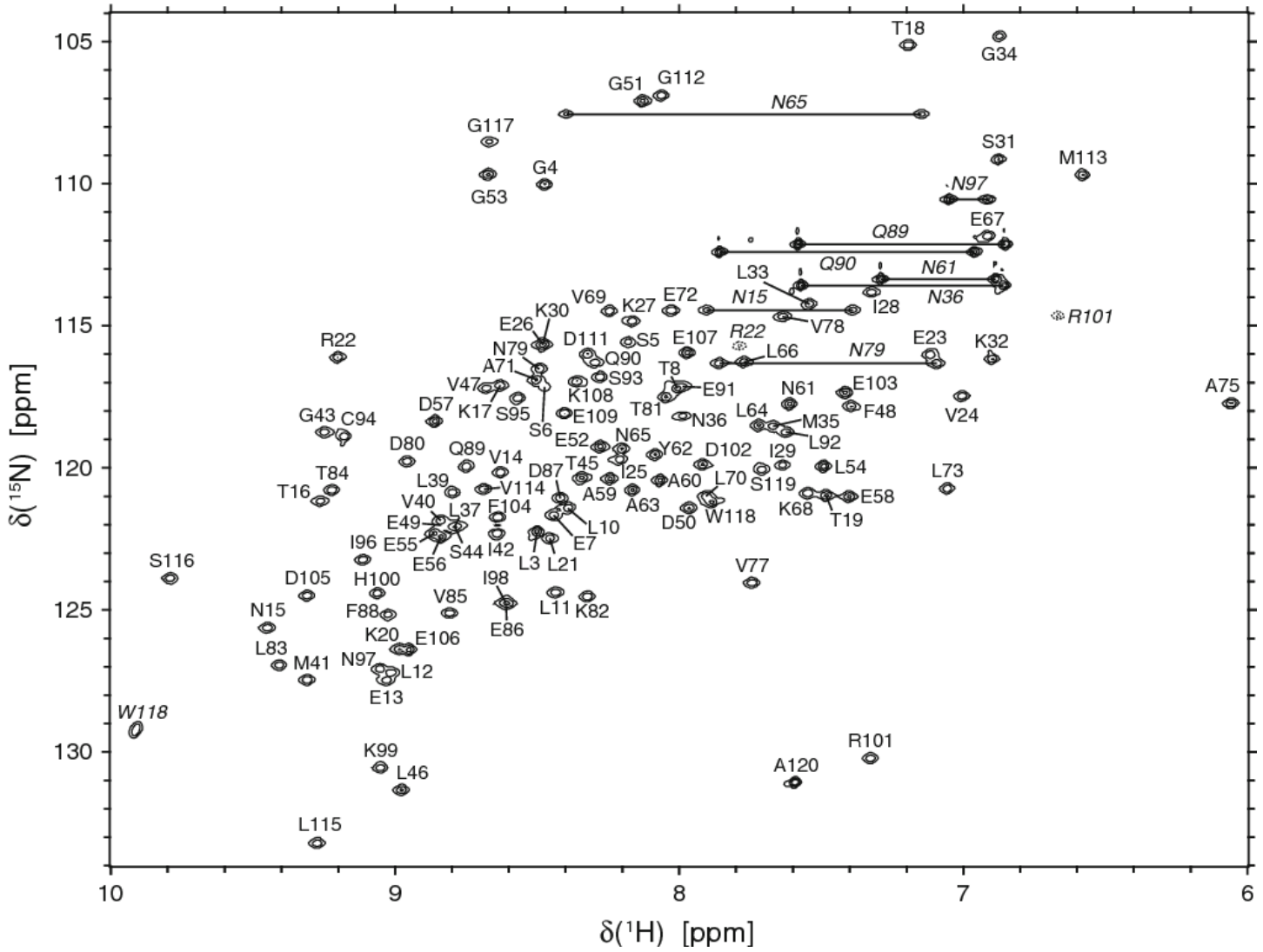
- korelace ^{15}N a ^{1}H peptidové vazby v proteinové páteři

  (který vodík se váže na který dusík)

- 1 peak ≈ 1 aminokyselina

- **otisk prstu proteinu**

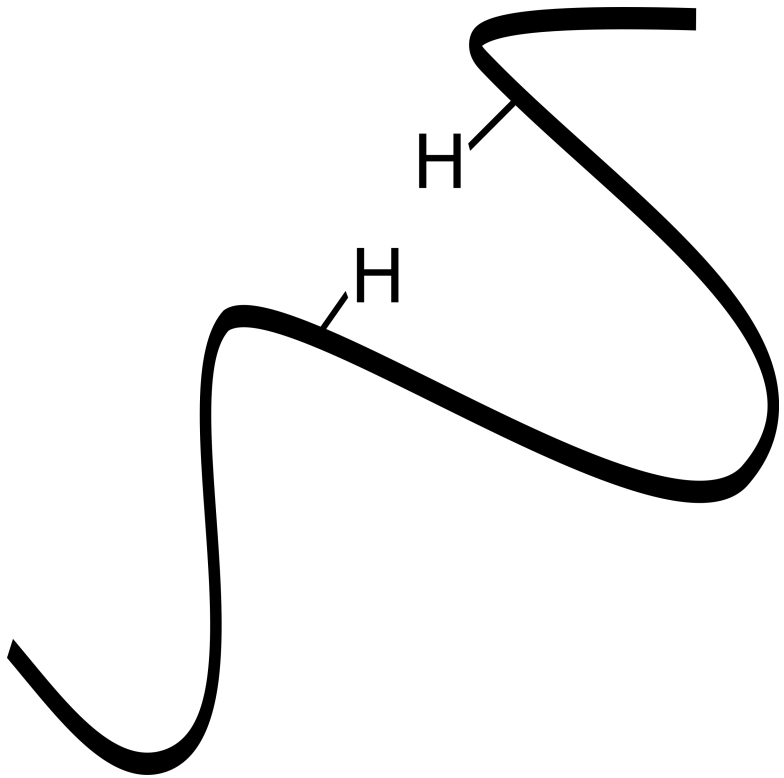




Experimenty

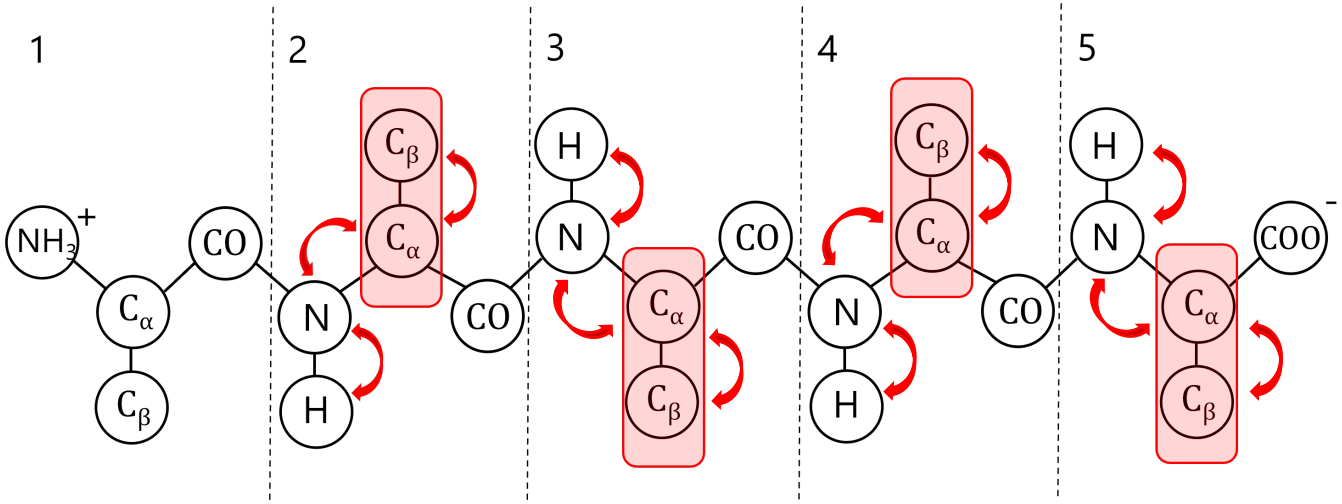
korelace přes prostor

- NOESY



korelace přes vazby

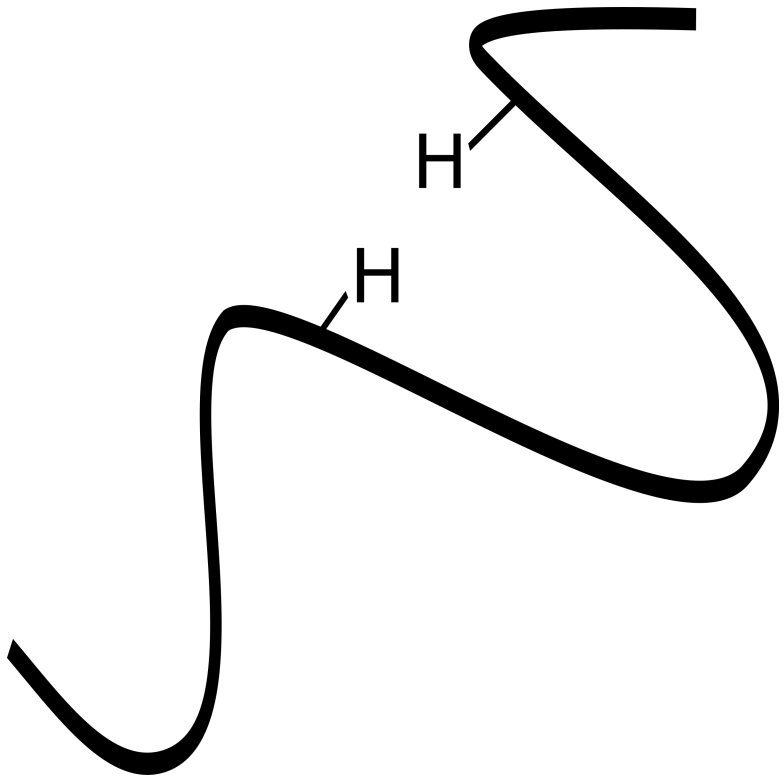
- HSQC
- HNCACB
- HN(CO)CACB



Experimenty

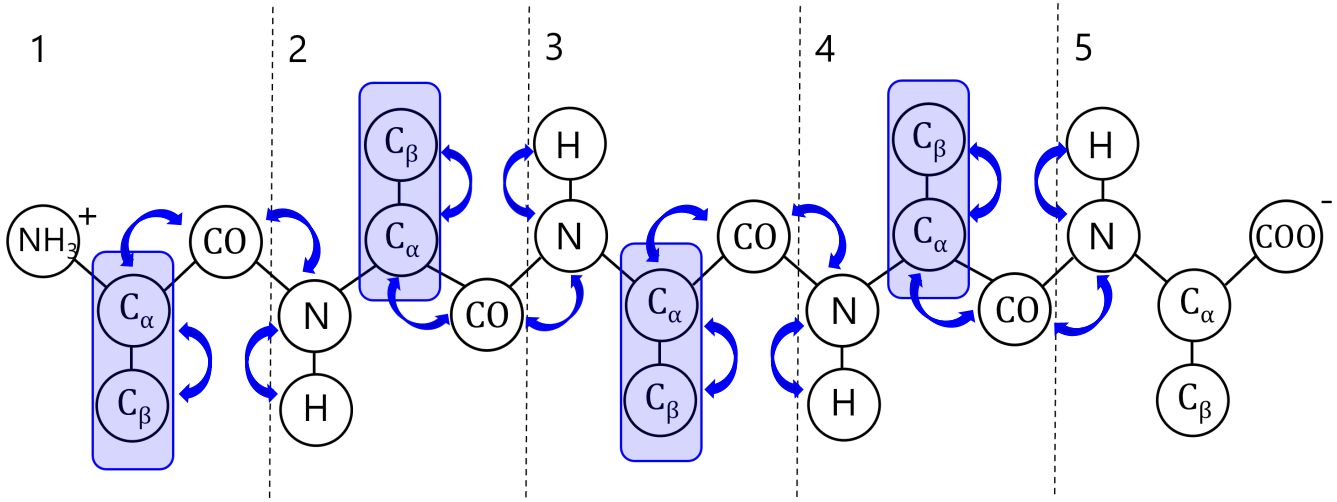
korelace přes prostor

- NOESY



korelace přes vazby

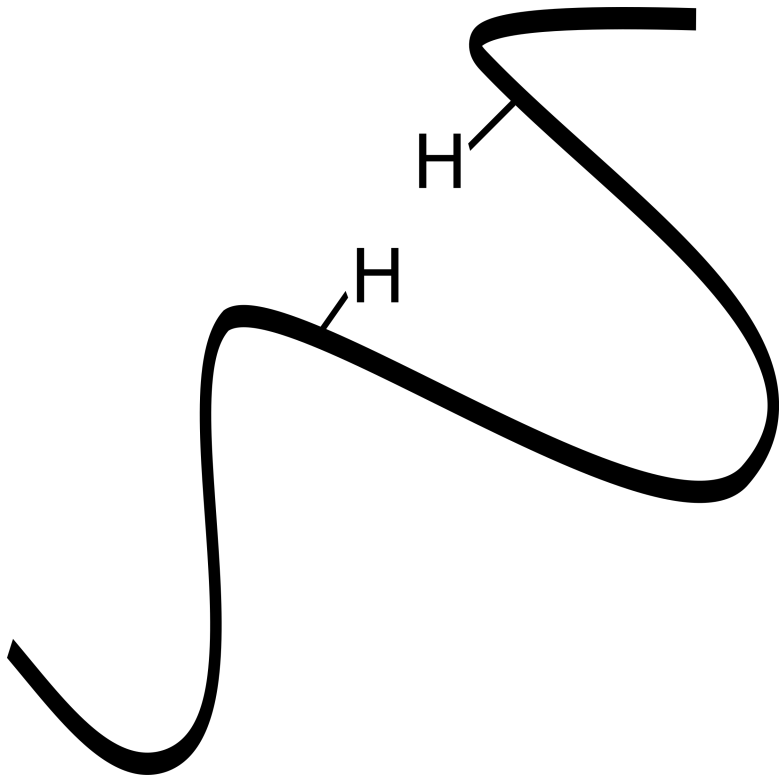
- HSQC
- HNCACB
- HN(CO)CACB



Experimenty

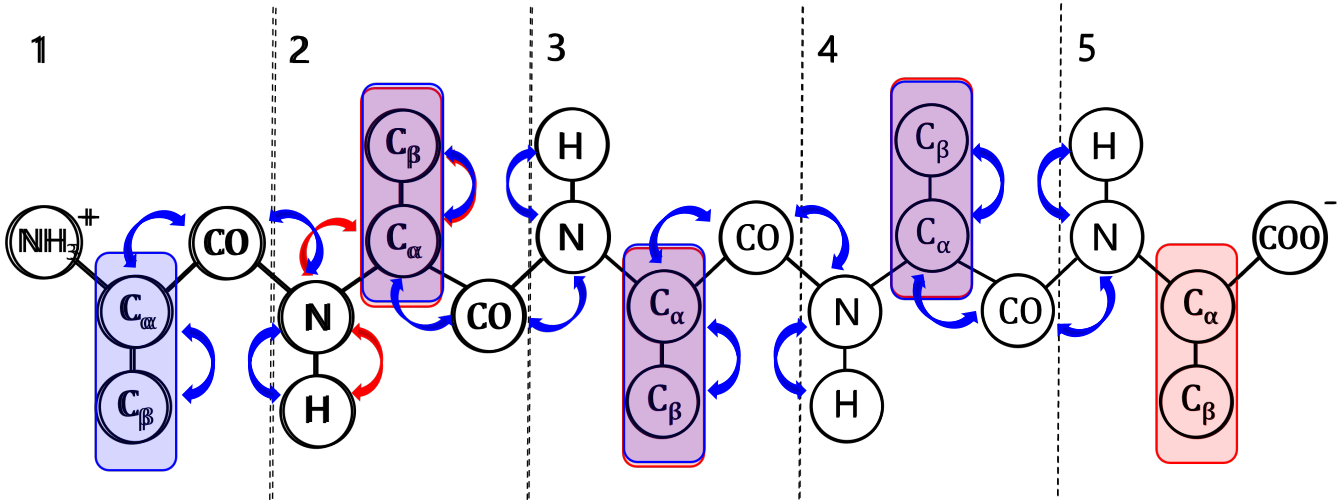
korelace přes prostor

- NOESY



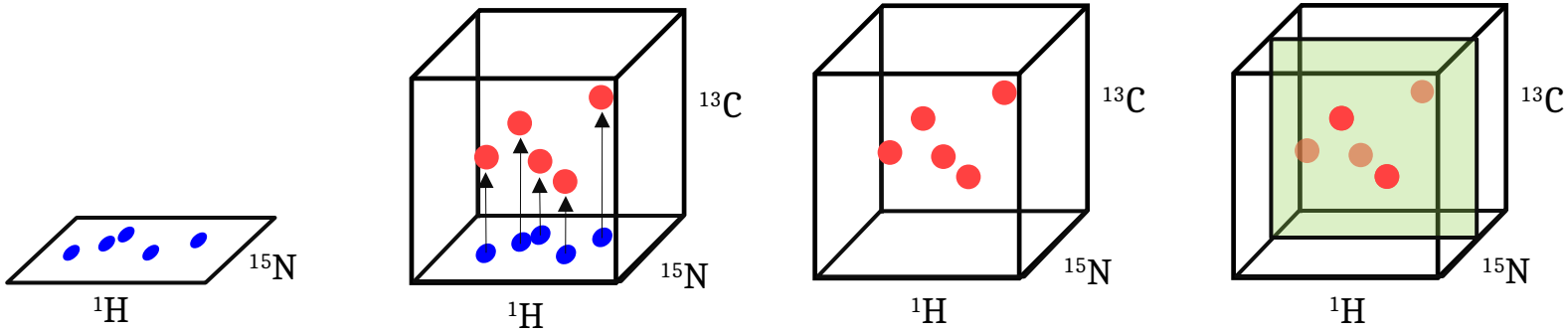
korelace přes vazby

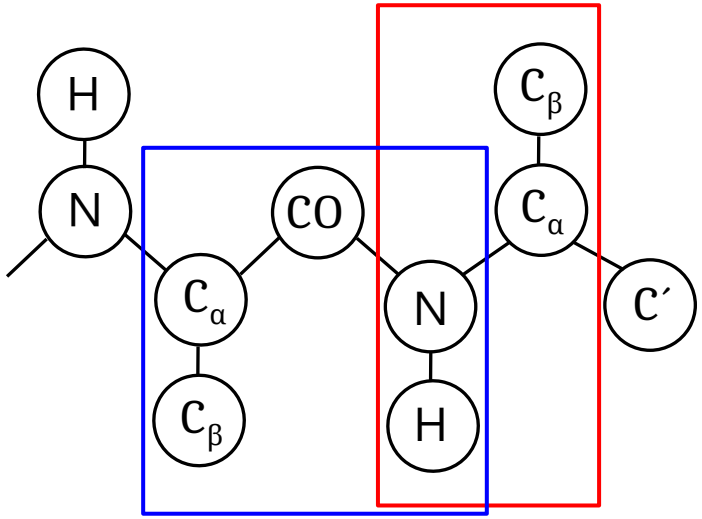
- HSQC
- HNCACB
- HN(CO)CACB



Přiřazení HSQC

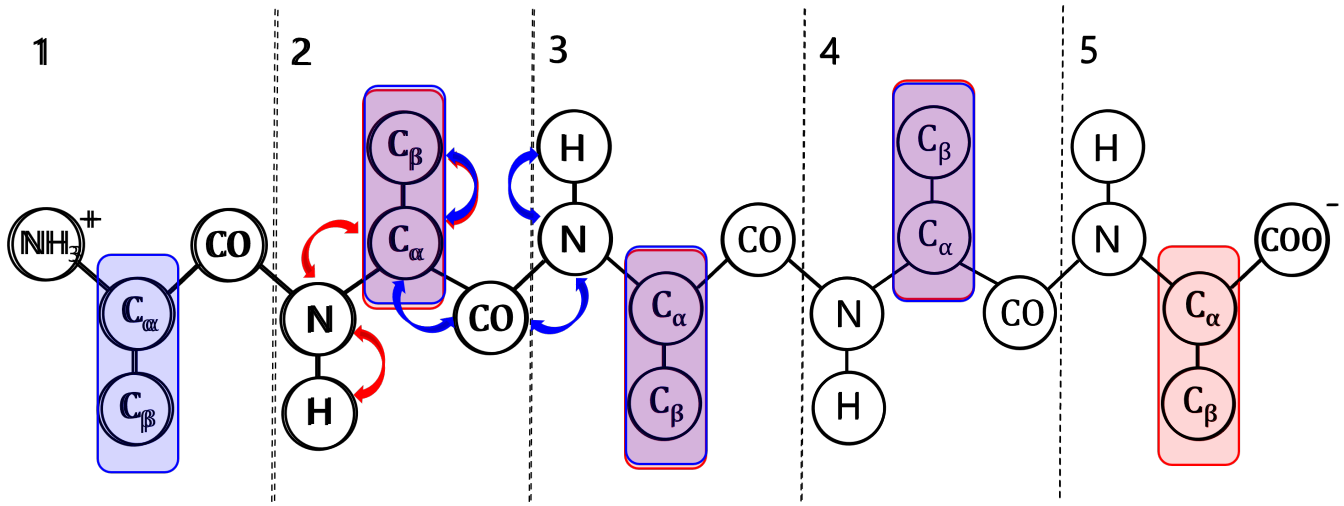
- 3D experimenty
- další zvýšení rozlišení
- přiřazení peaků aminokyselinám
- (assignment)
- série komplementárních spekter
  HNCACB, HN(CO)CACB



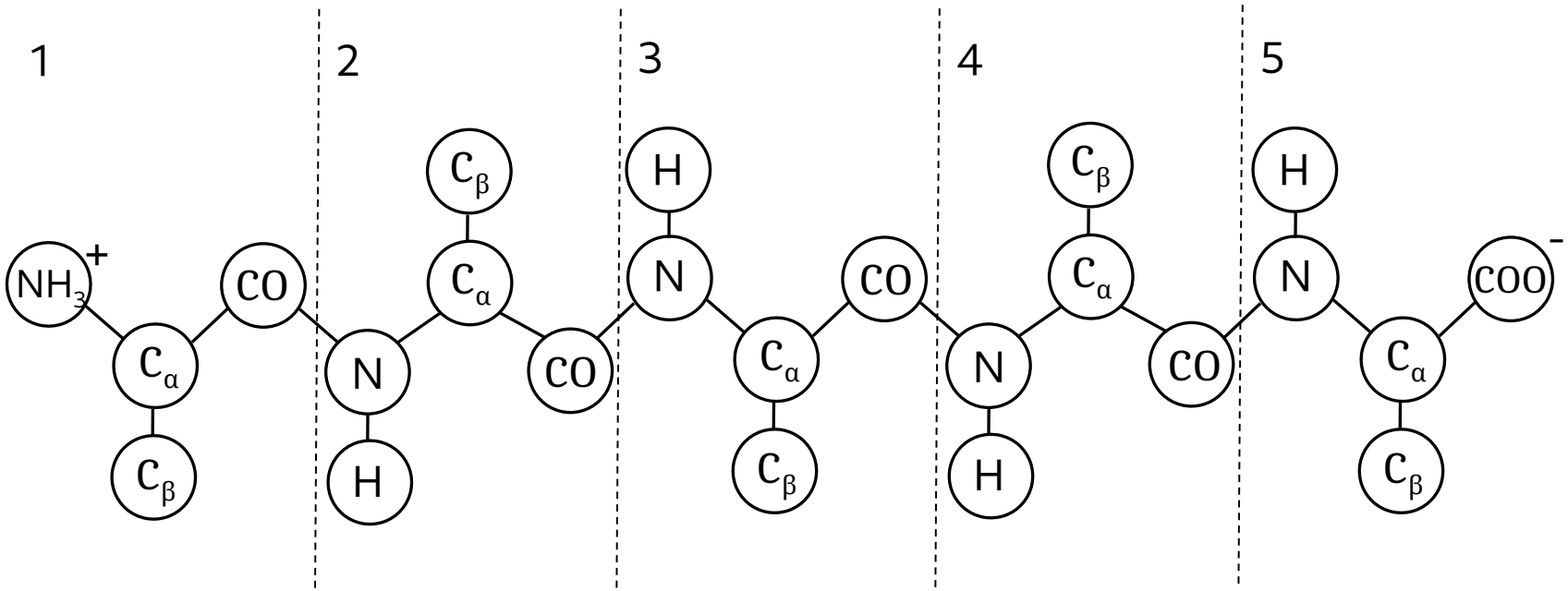


Přiřazení HSQC proteinu

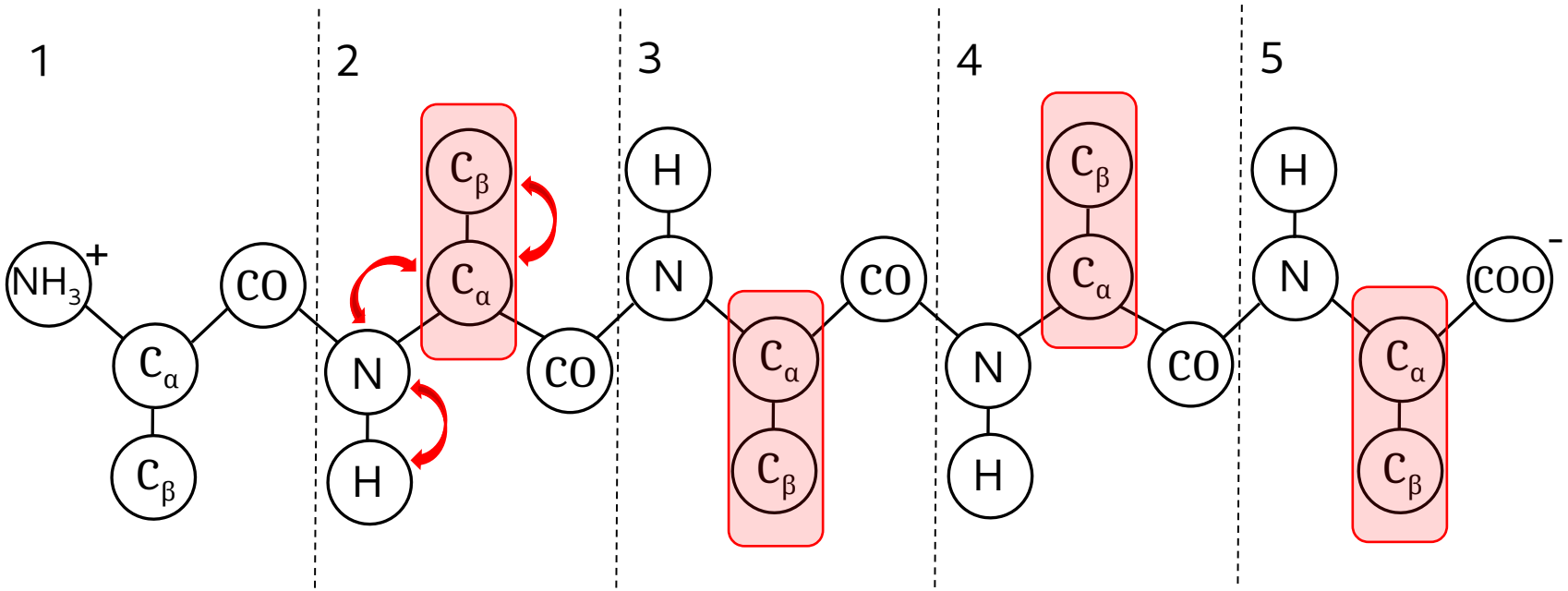
- 3D experimenty
- další zvýšení rozlišení
- přiřazení peaků aminokyselinám
- série komplementárních spekter
  HNCA (současné AMK)
  HN(CO)CA (předchozí AMK)



Sekvenční Přiřazení HSQC

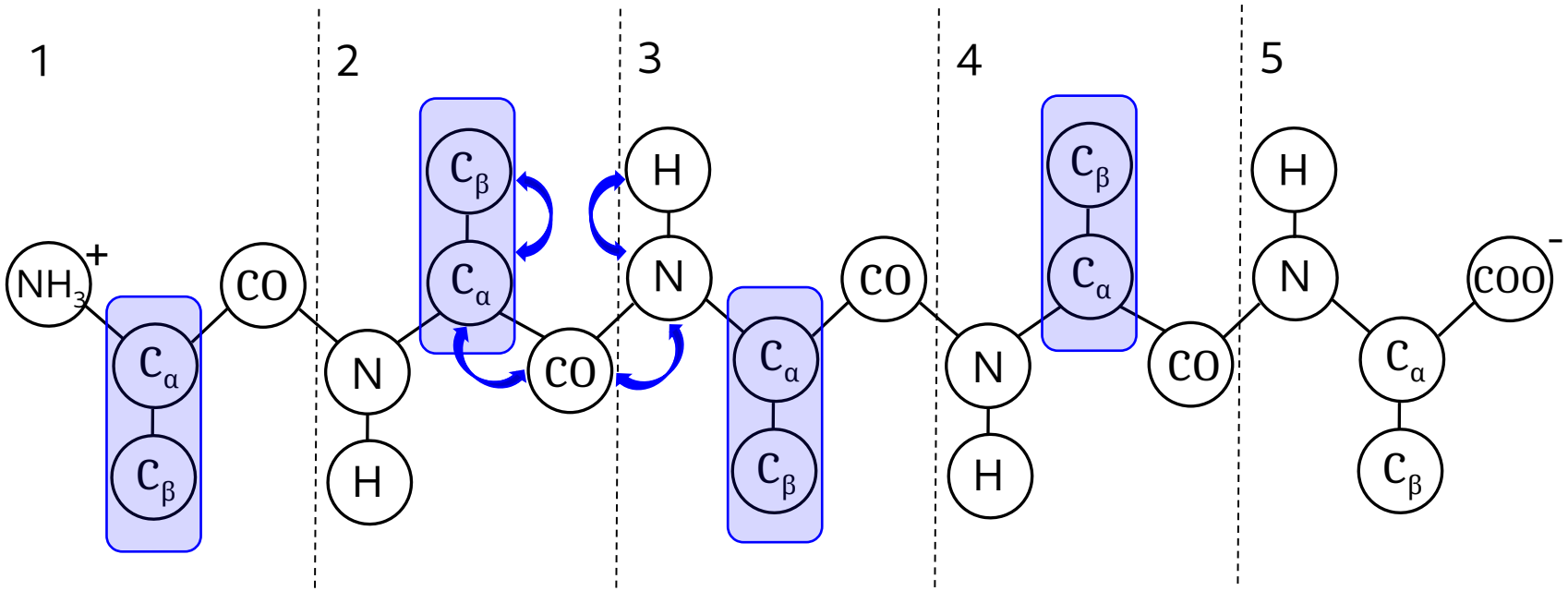


Sekvenční Přiřazení HSQC



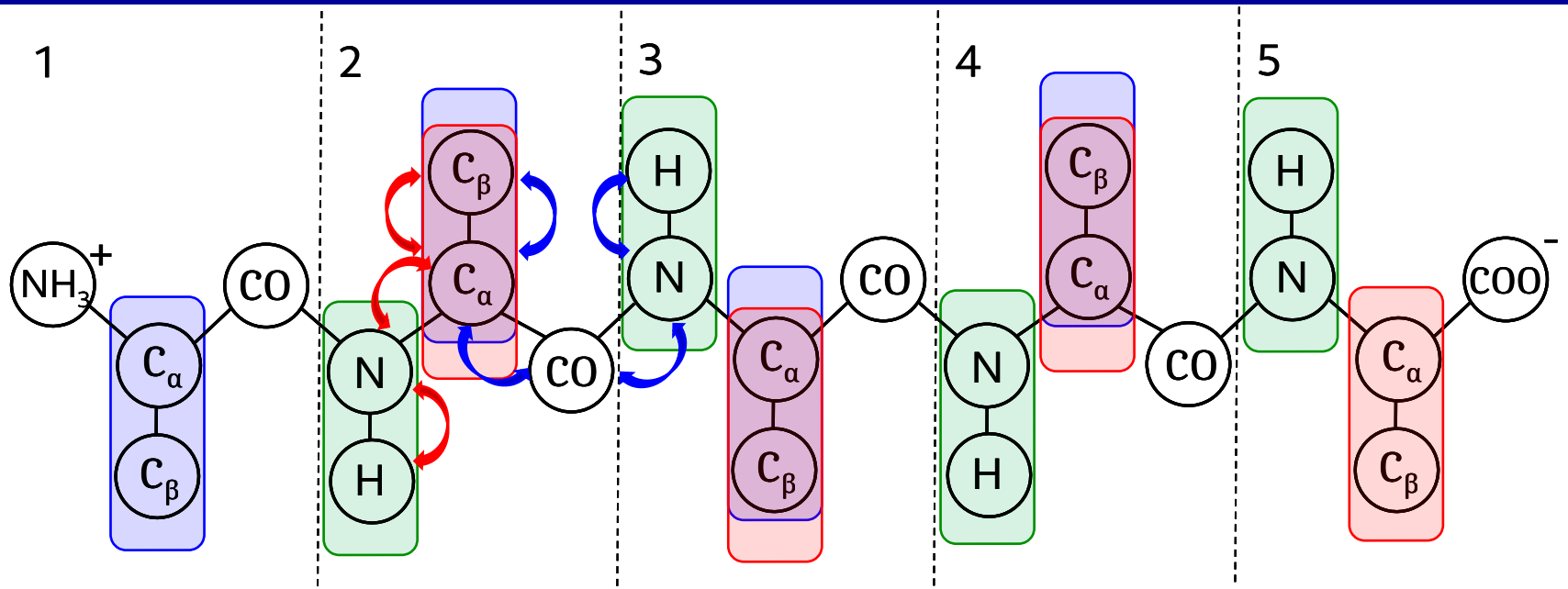
HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

Sekvenční Přiřazení HSQC



HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Sekvenční Přiřazení HSQC

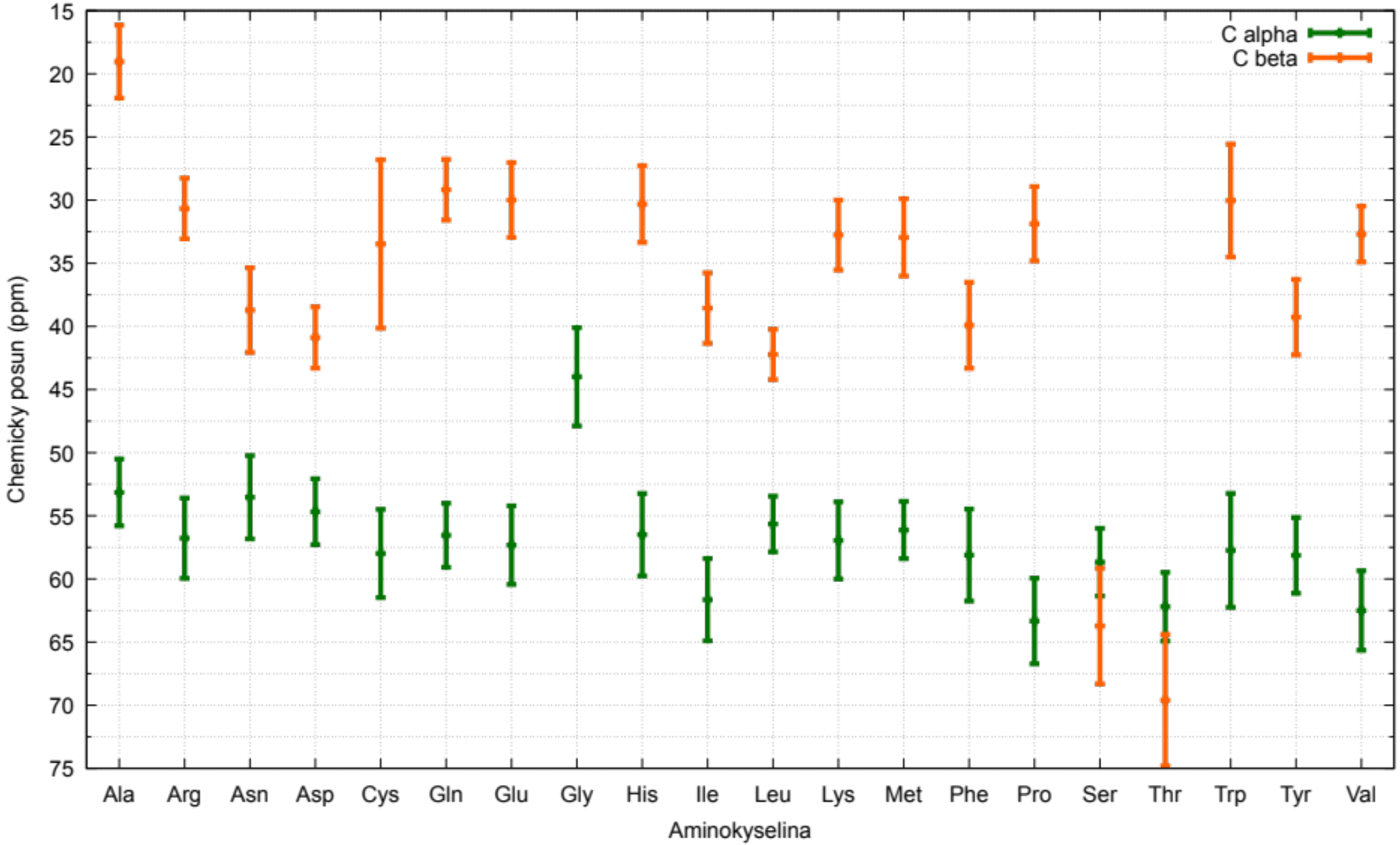


HSQC: korelace H-N vazby

HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

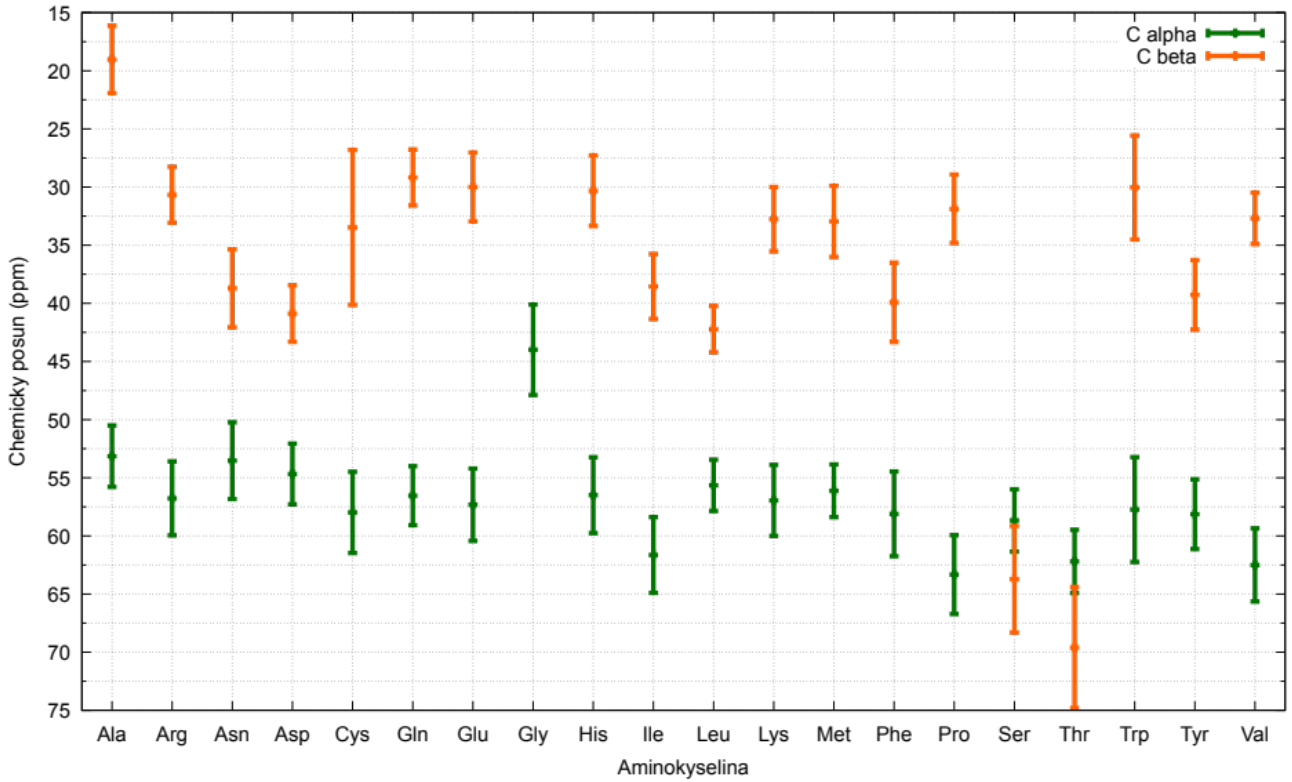
Typické chemické posuny Cα a Cβ aminokyselin



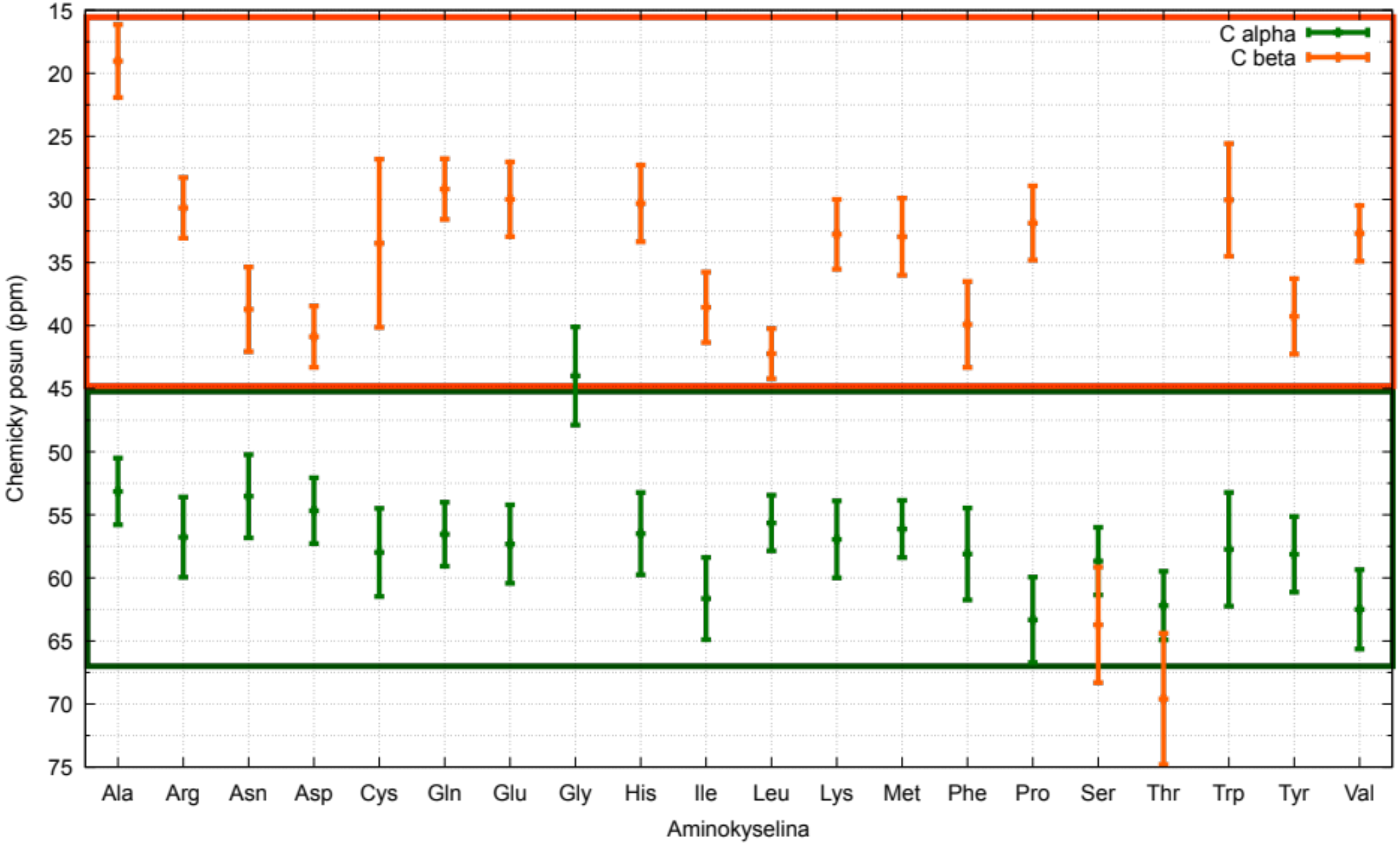
Typické chemické posuny Cα a Cβ aminokyselin

průměrné hodnoty z BMRB
(Biological Magnetic Resonance Databank)

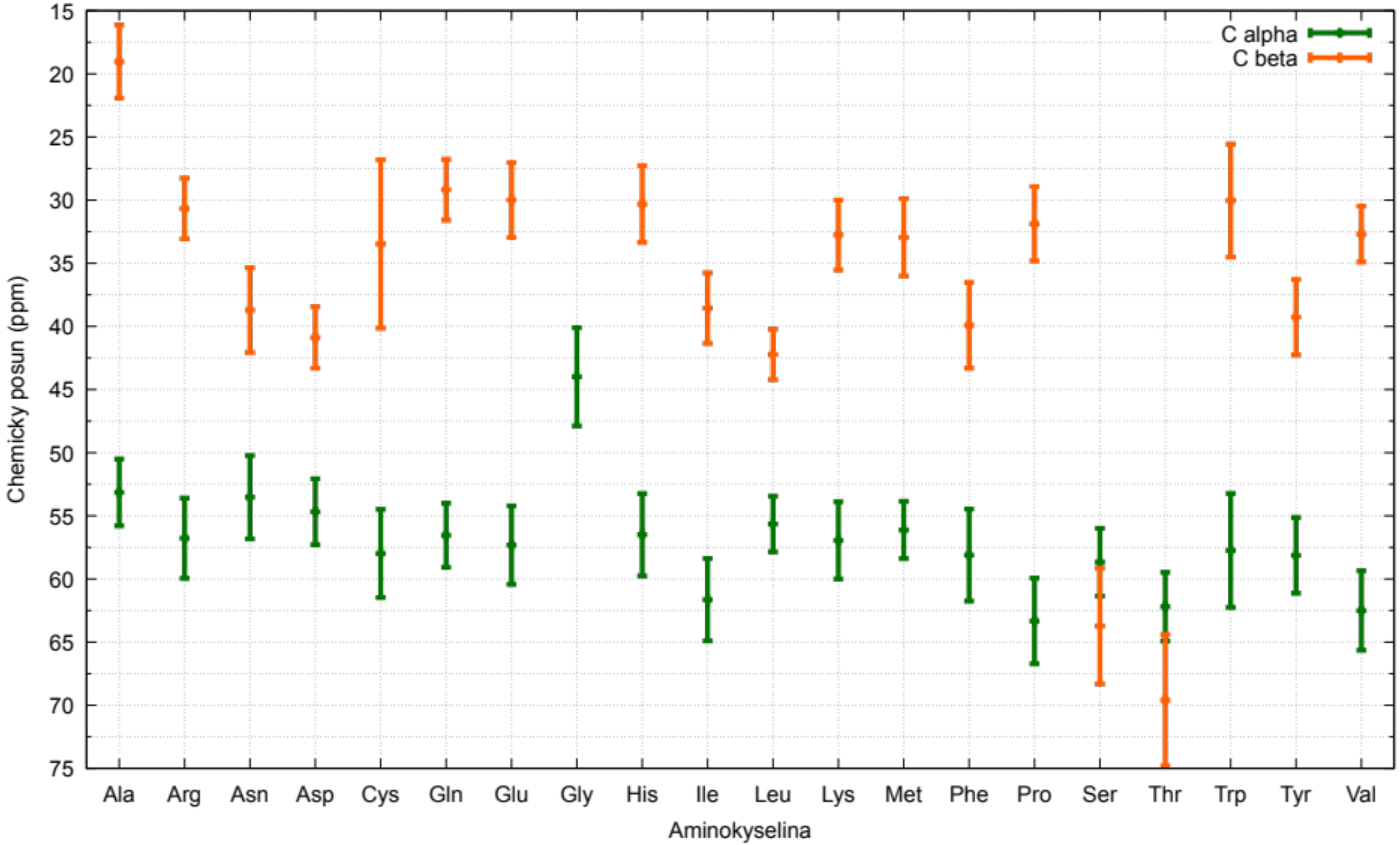
https://bmrb.io/

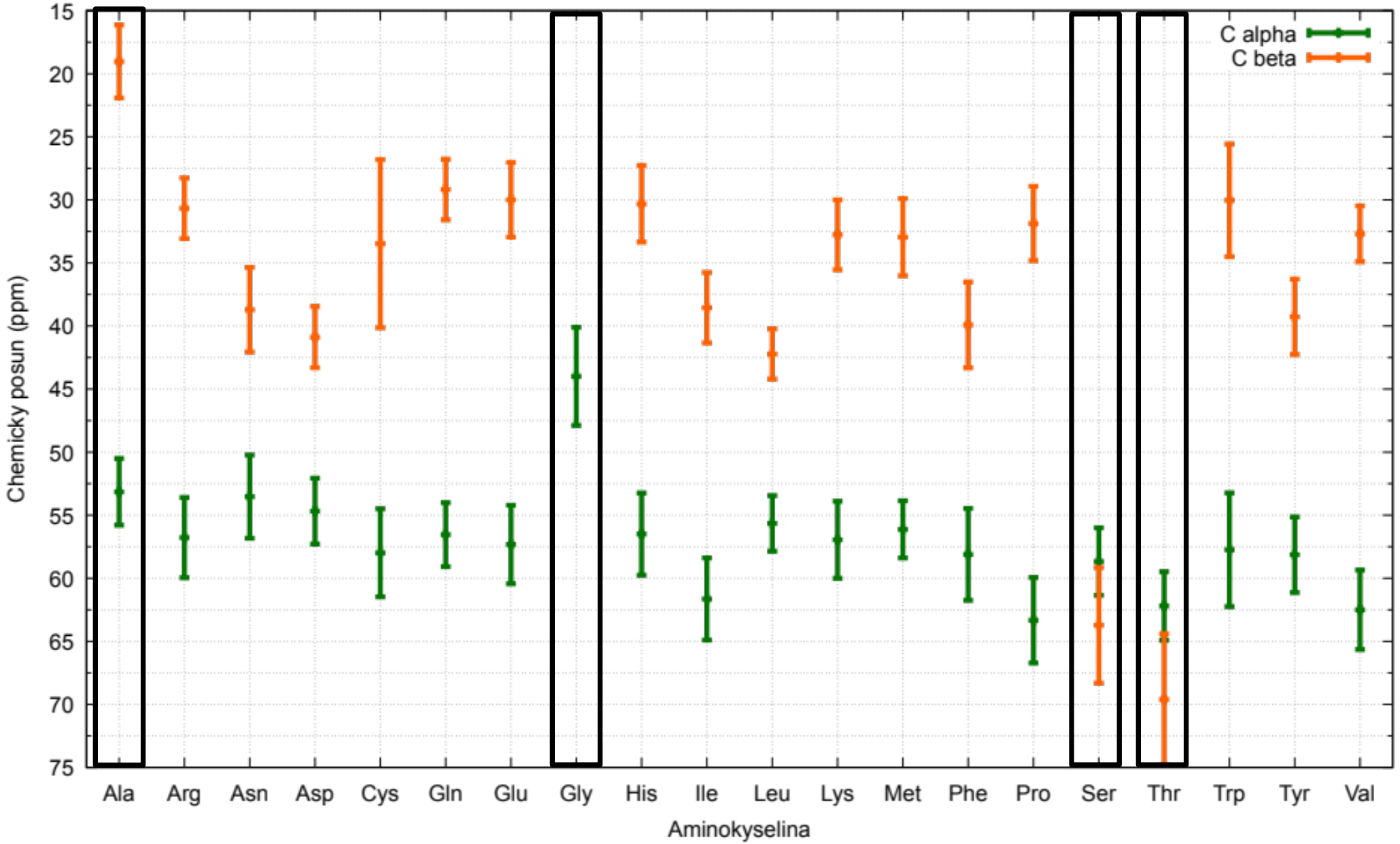


Typické chemické posuny Cα a Cβ aminokyselin

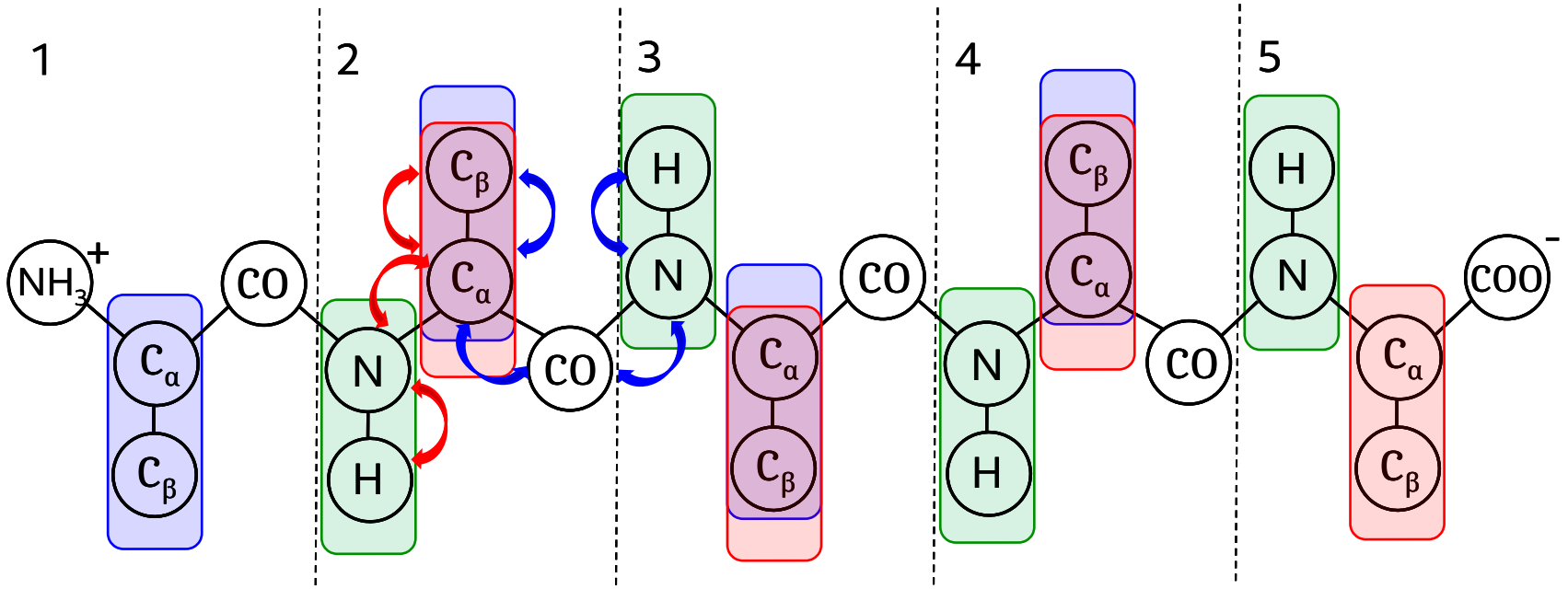


Které aminokyseliny mají specifickou pozici Cα a Cβ?




C alpha
C beta
Chemicky posun (ppm)
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
Ala
Arg
Asn
Asp
Cys
Gln
Glu
Gly
His
Ile
Leu
Lys
Met
Phe
Pro
Ser
Thr
Trp
Tyr
Val
Aminokyselina

Sekvenční Přiřazení HSQC

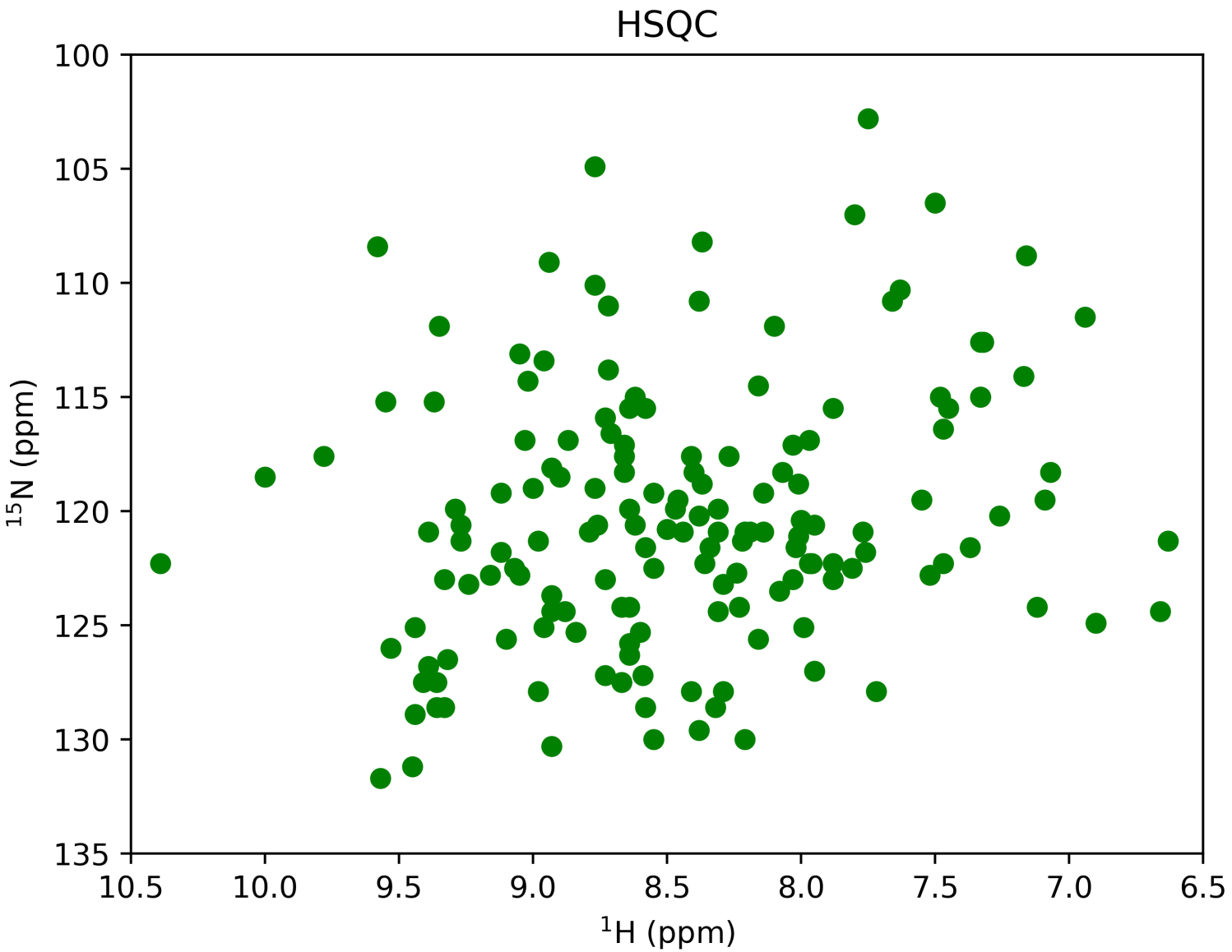


HSQC: korelace H-N vazby

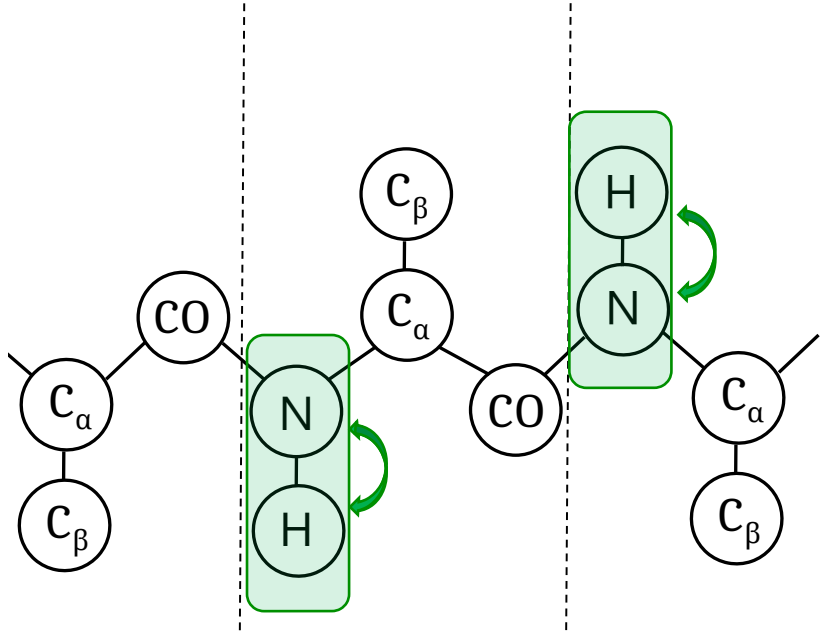
HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

CACB(CO)NH: Cα a Cβ předchozí AMK

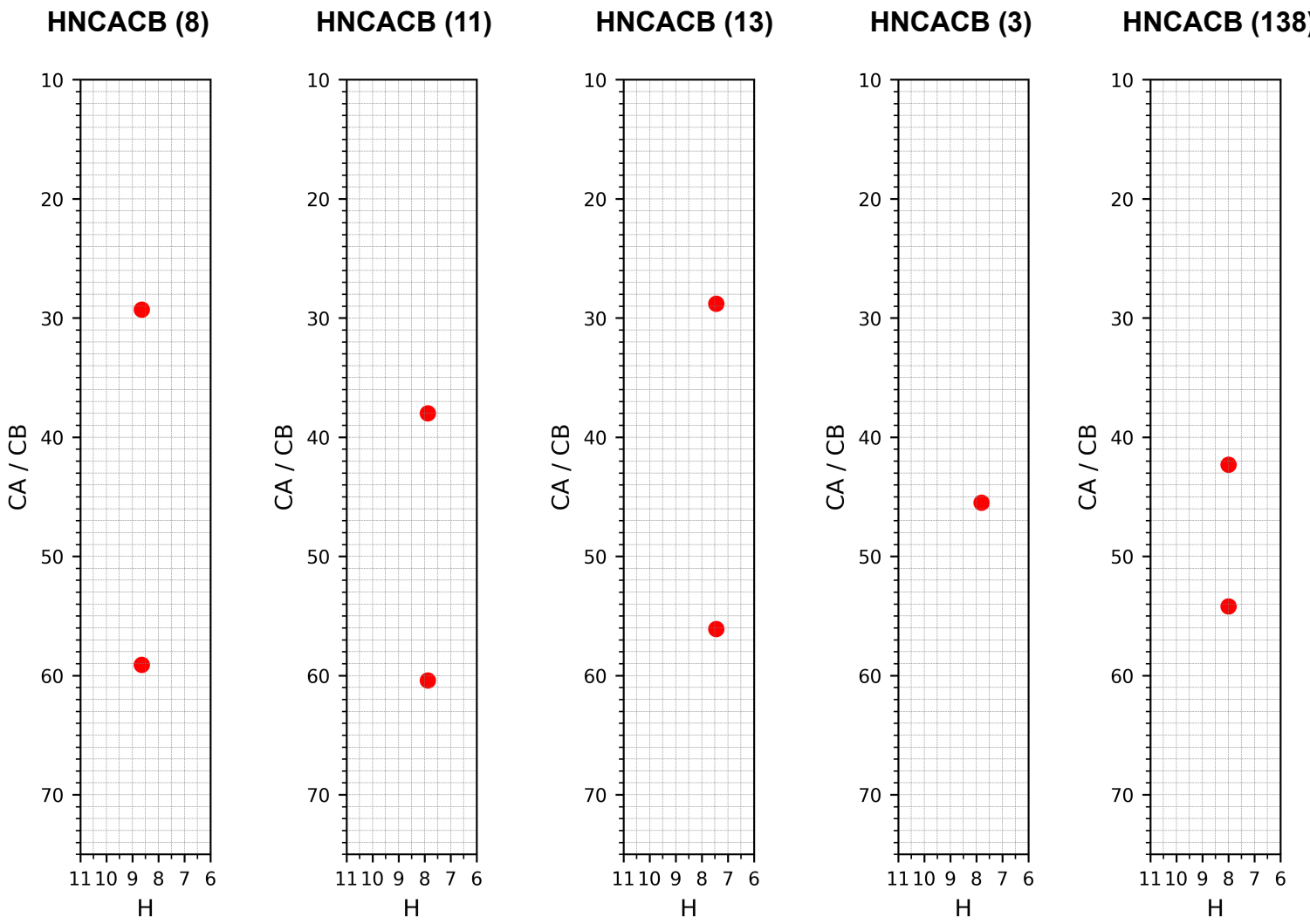
2D HSQC

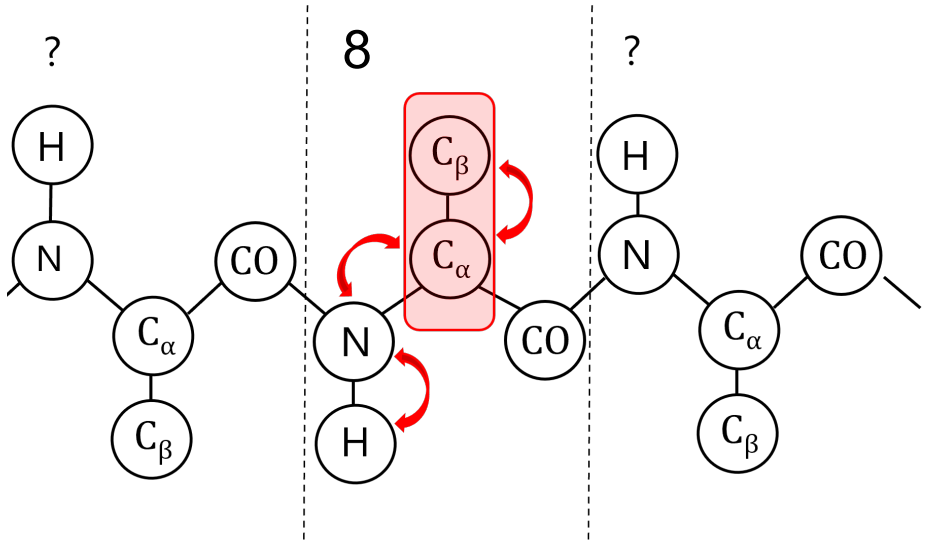


HSQC: korelace H-N vazby



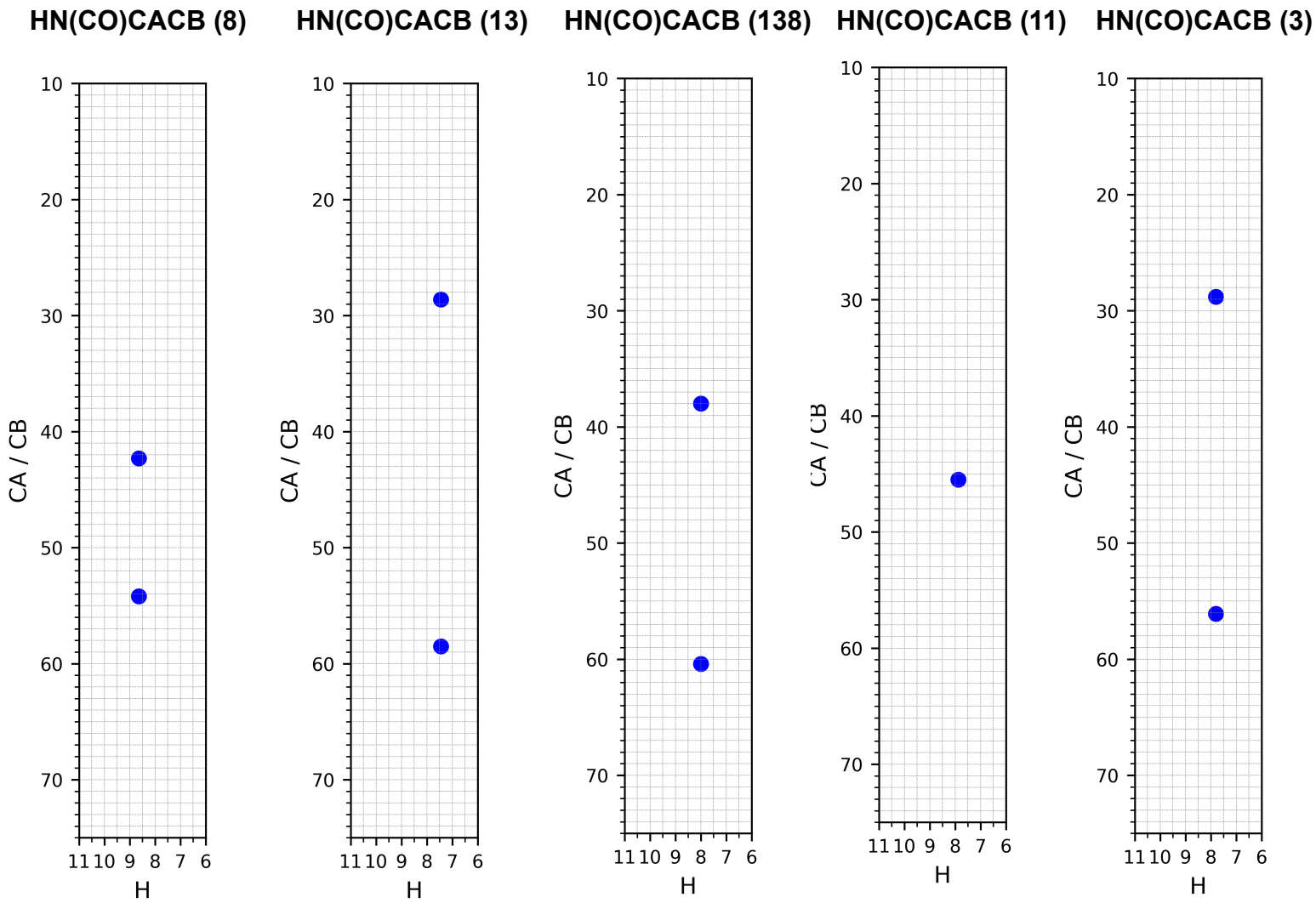
Postup při přiřazování - HNCACB

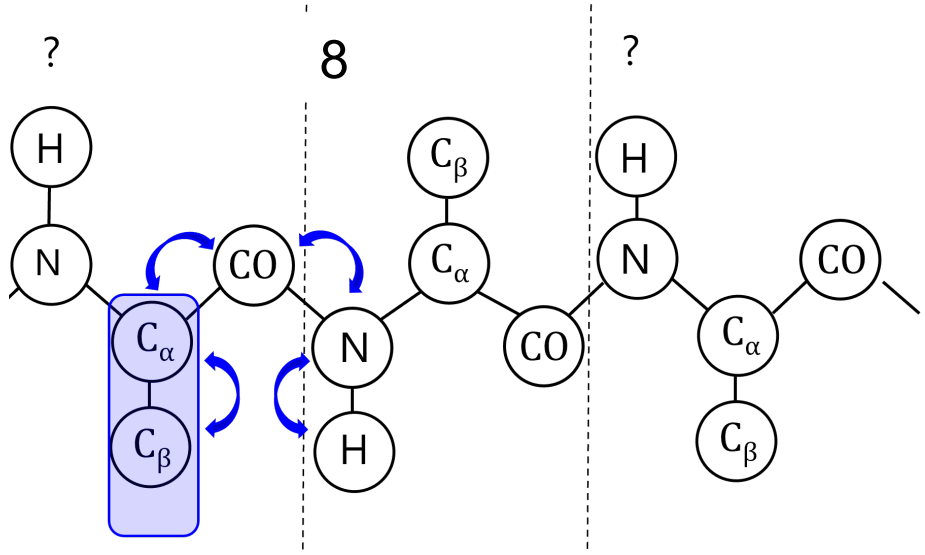




HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

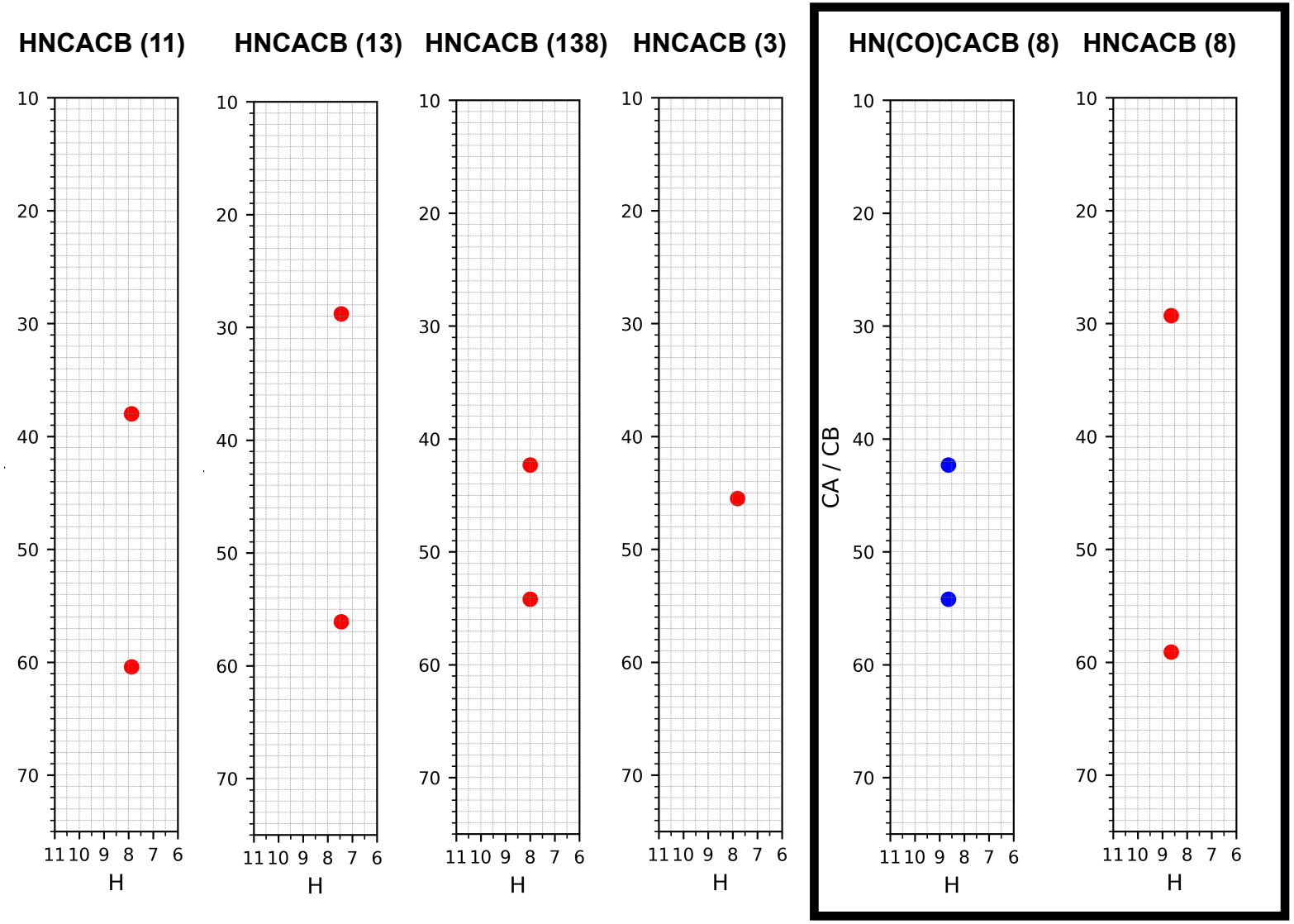
Postup při přiřazování – HN(CO)CACB

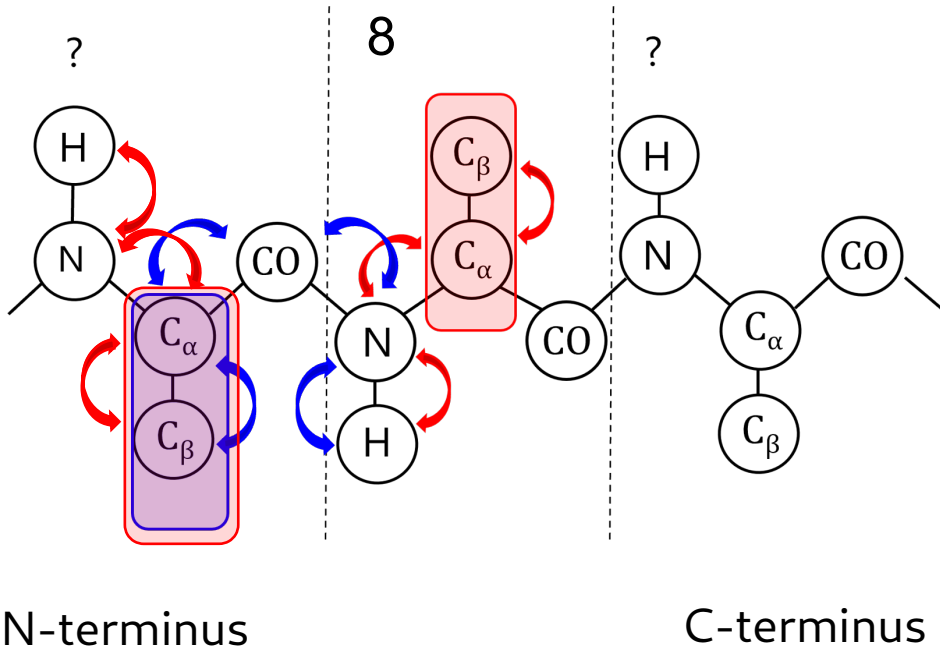




HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování -138-8

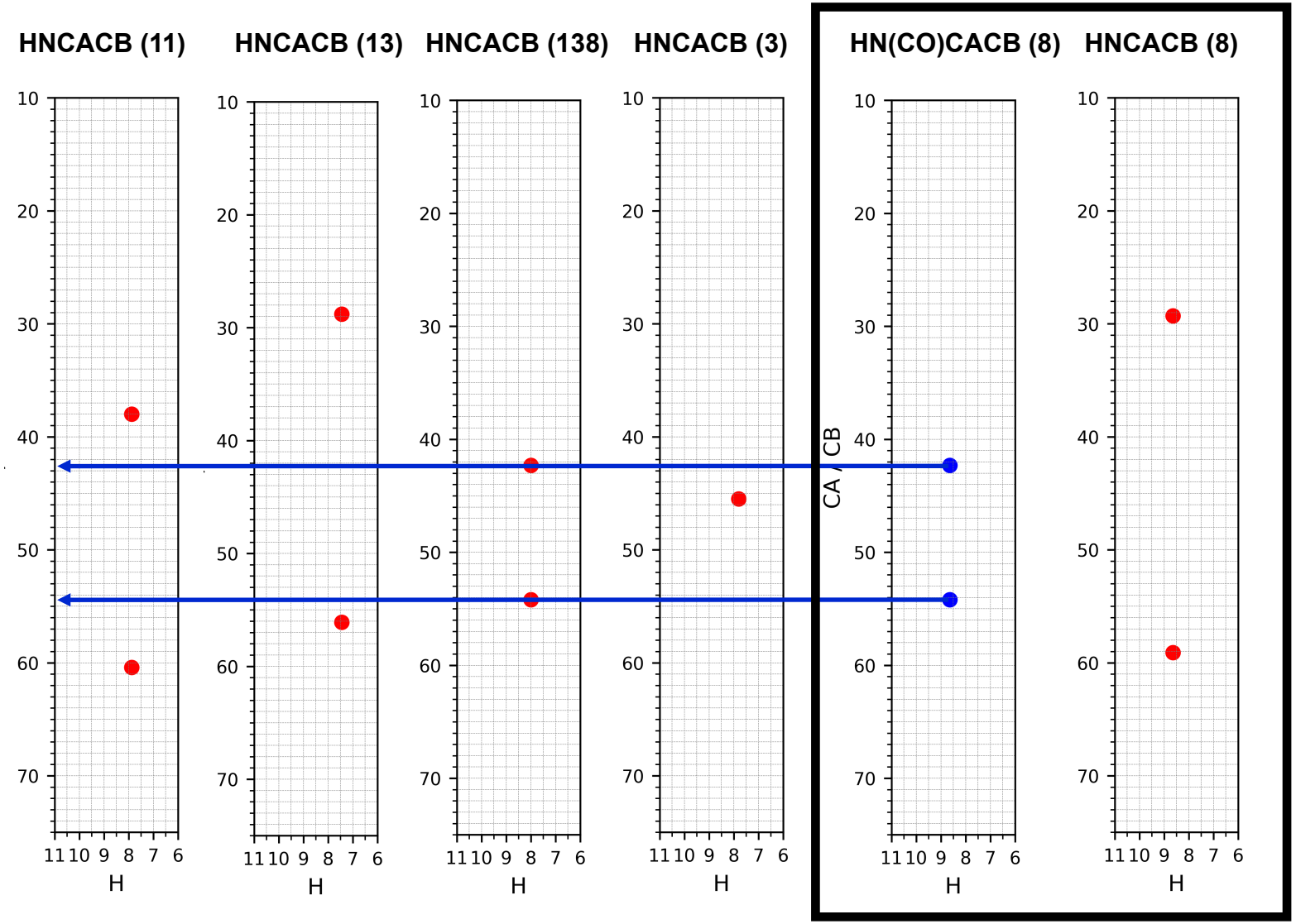


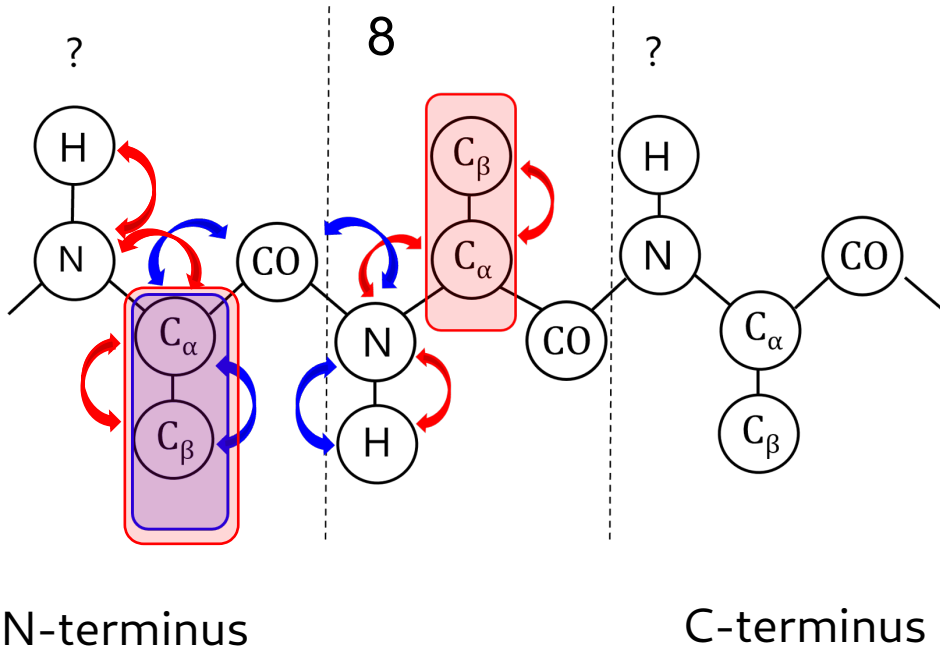


HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování -138-8

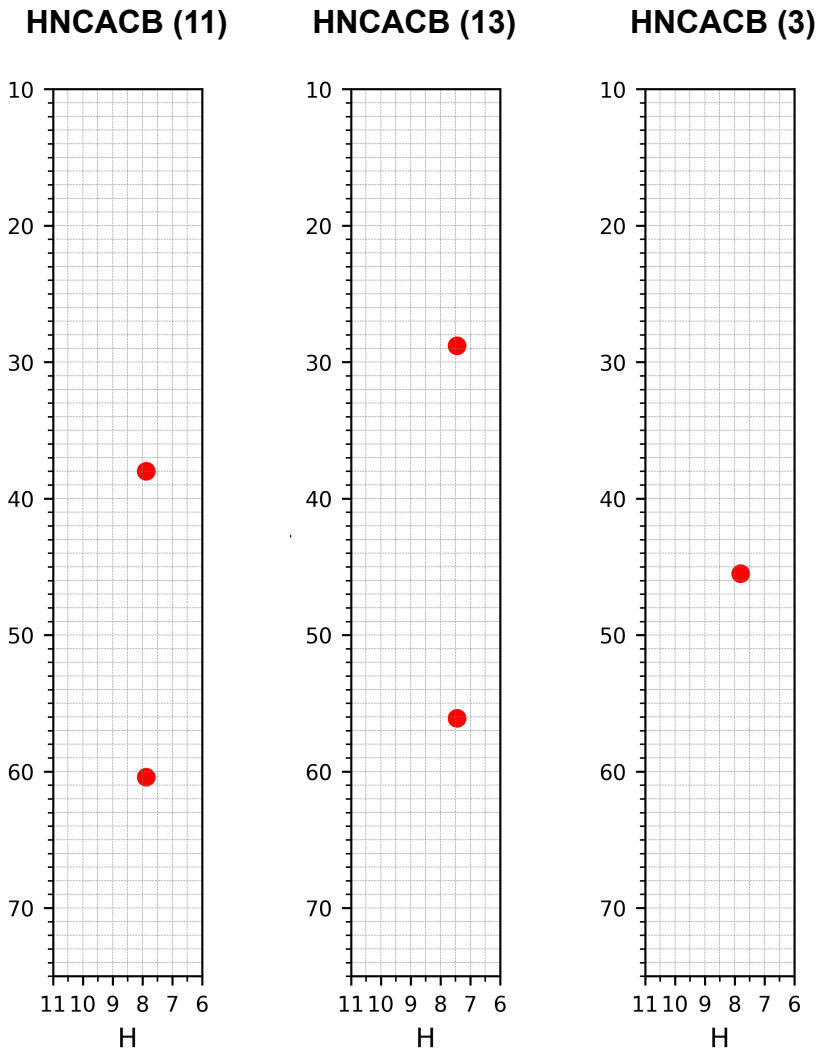


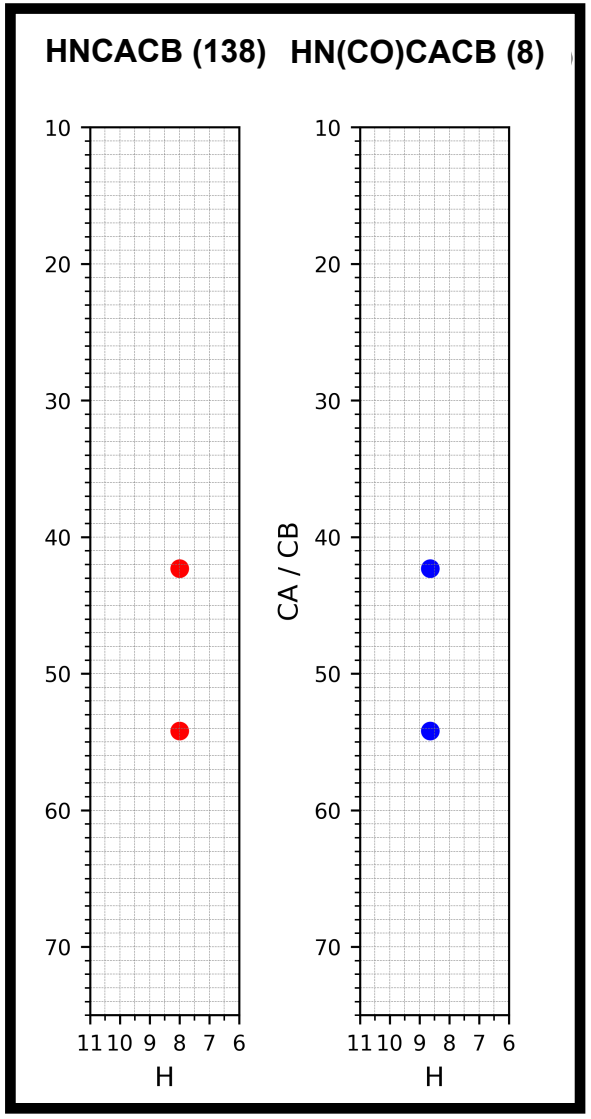


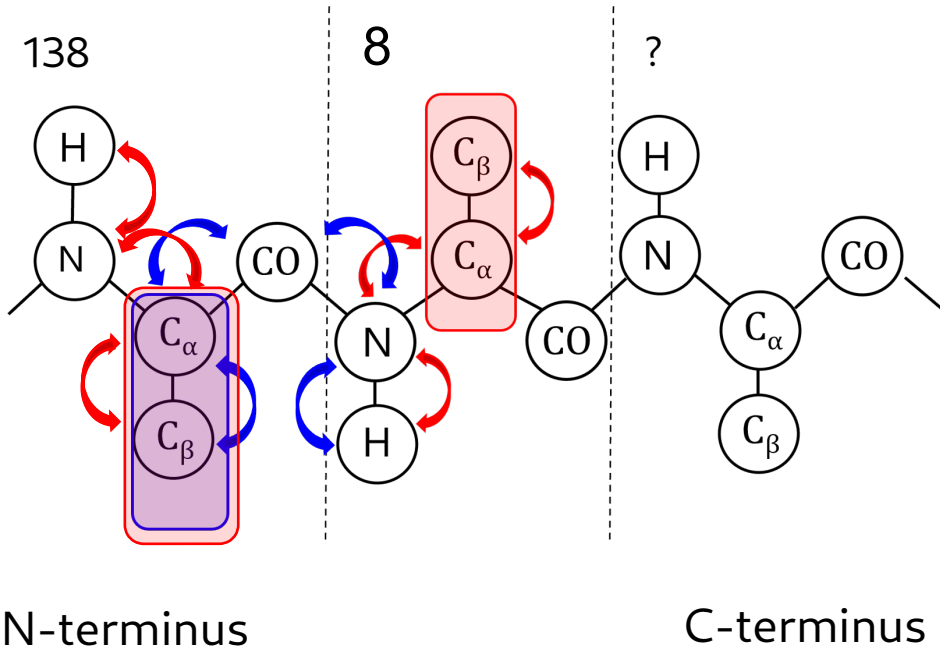
HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 138-8



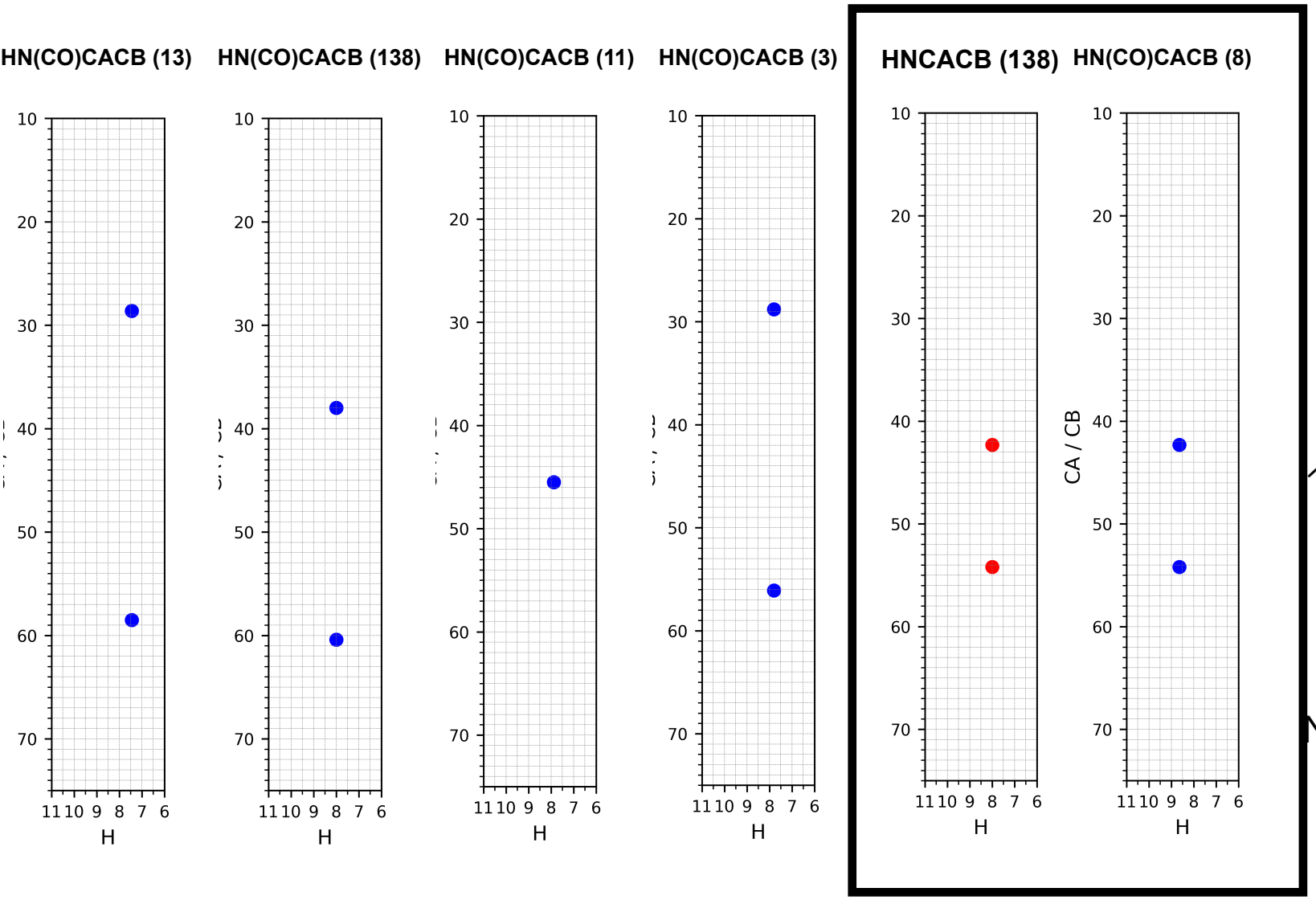


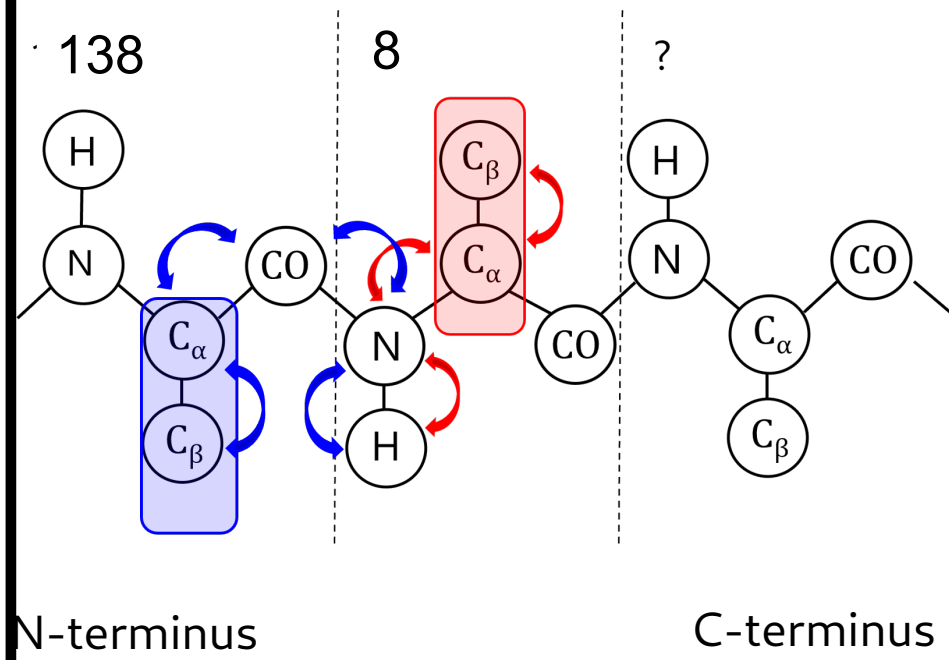


HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 138-8

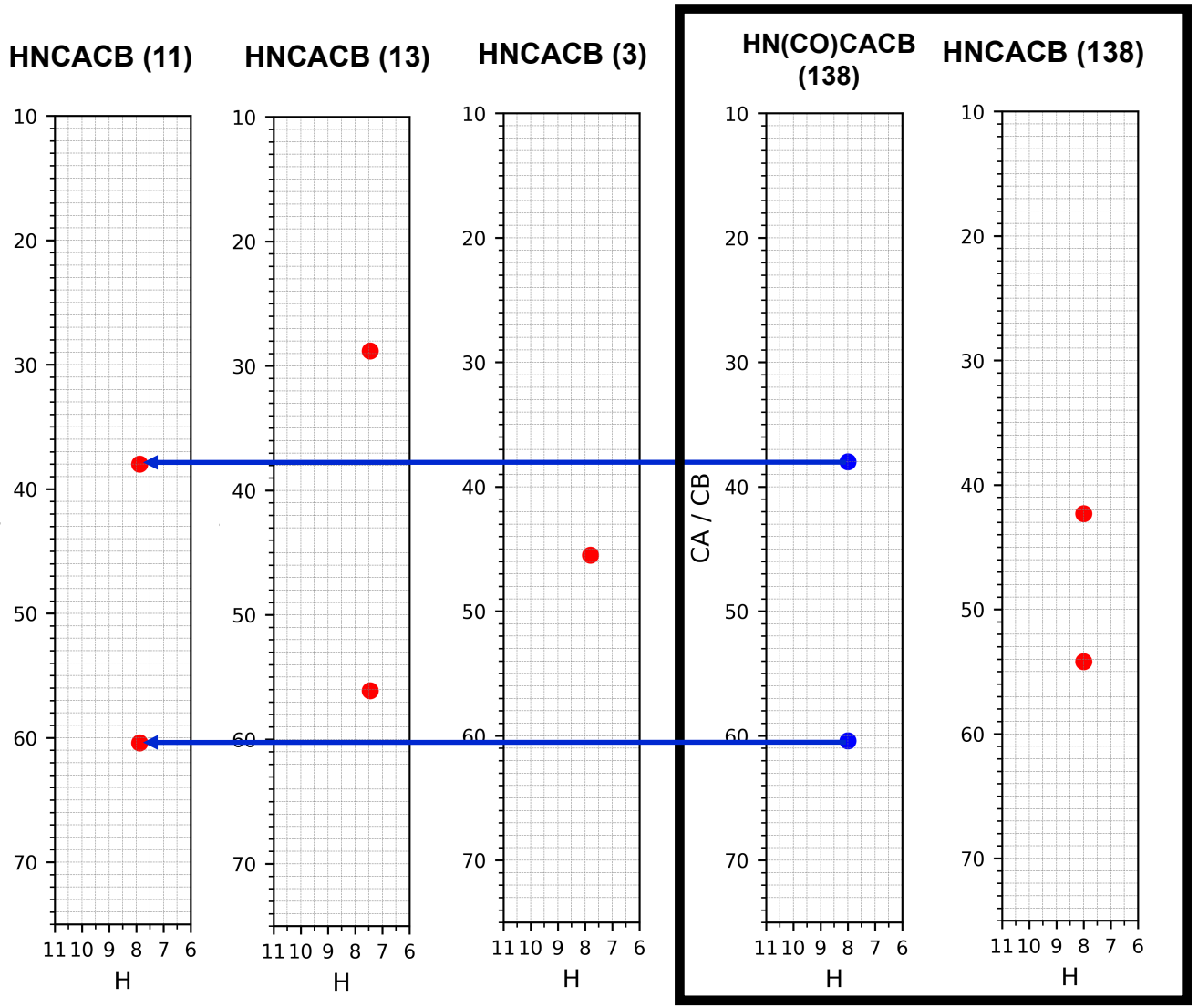


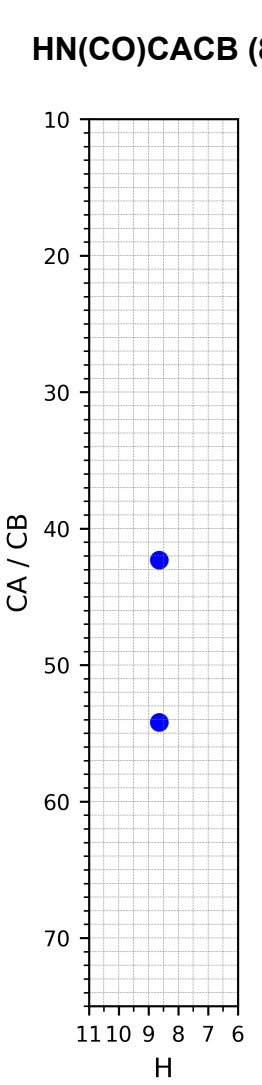


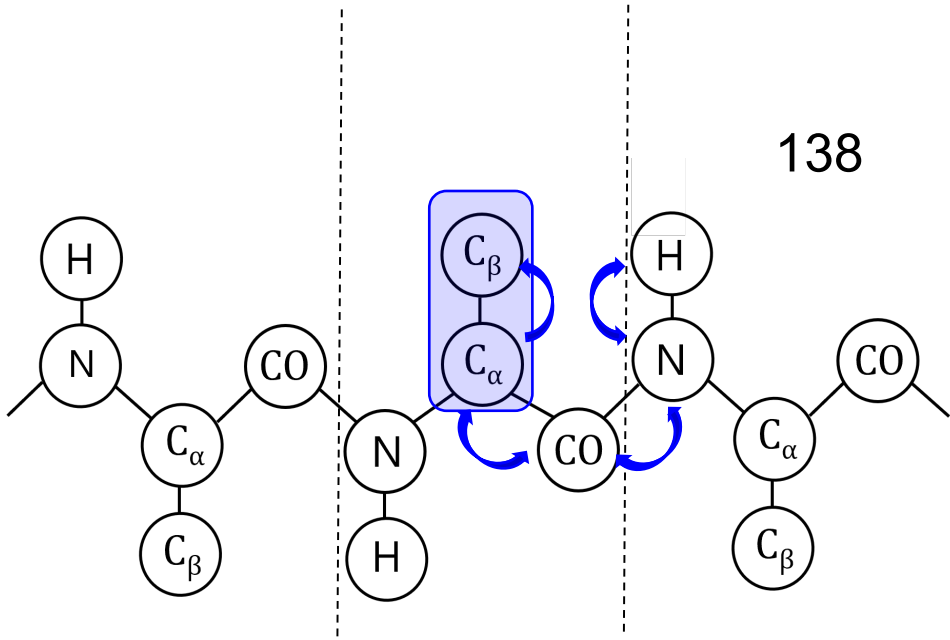
HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování -11-138-8



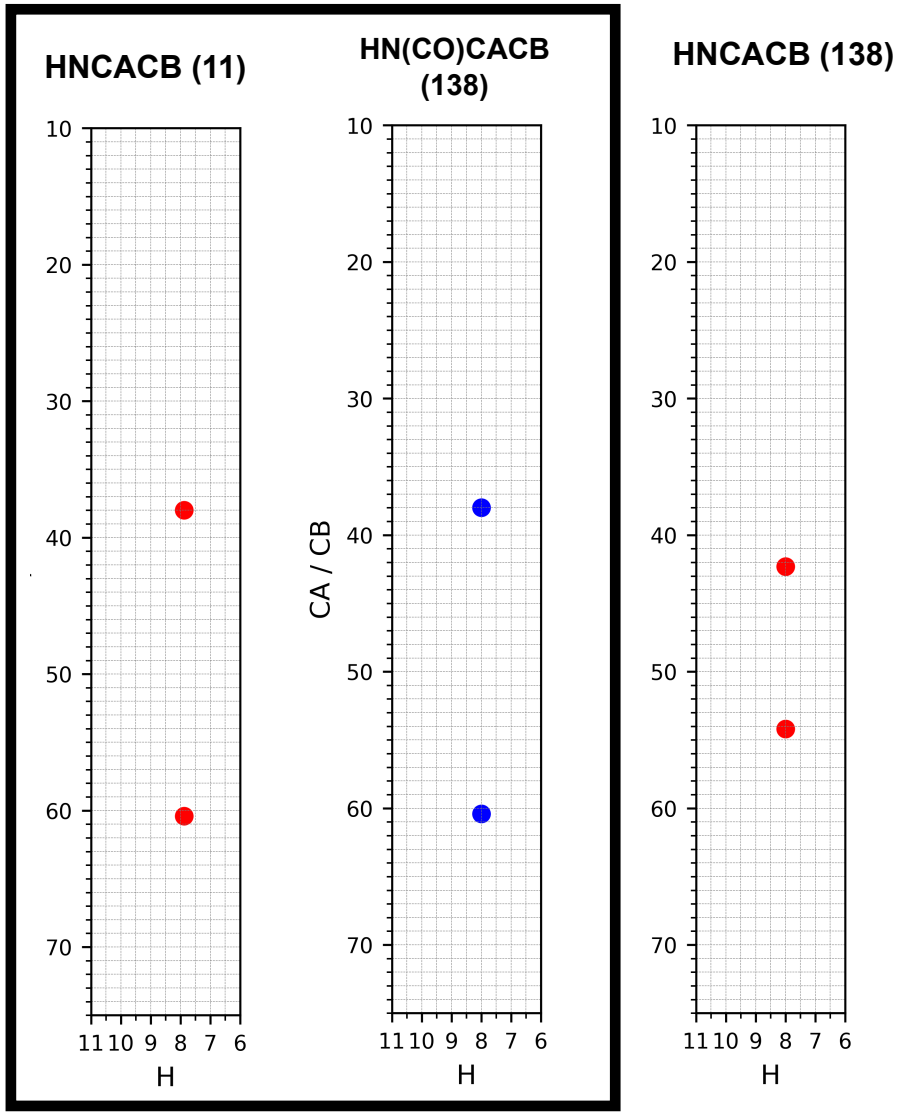


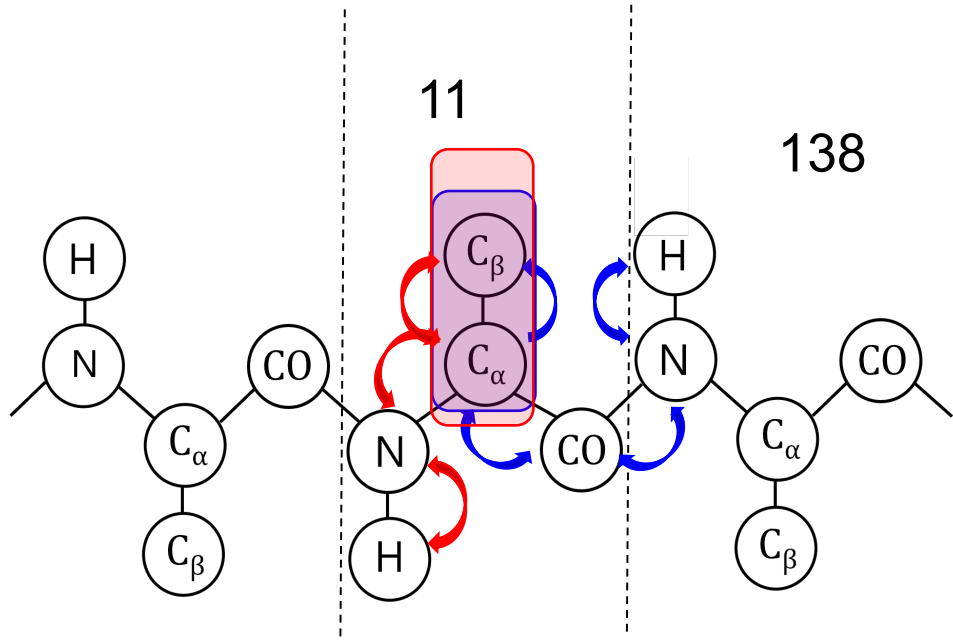


HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 11-138-8



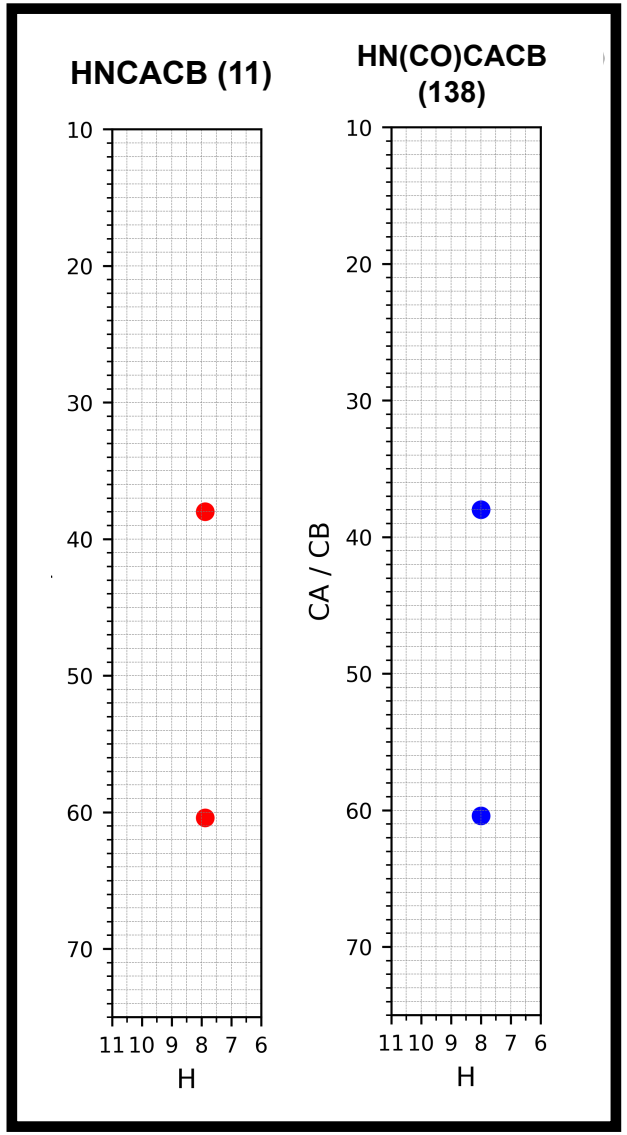


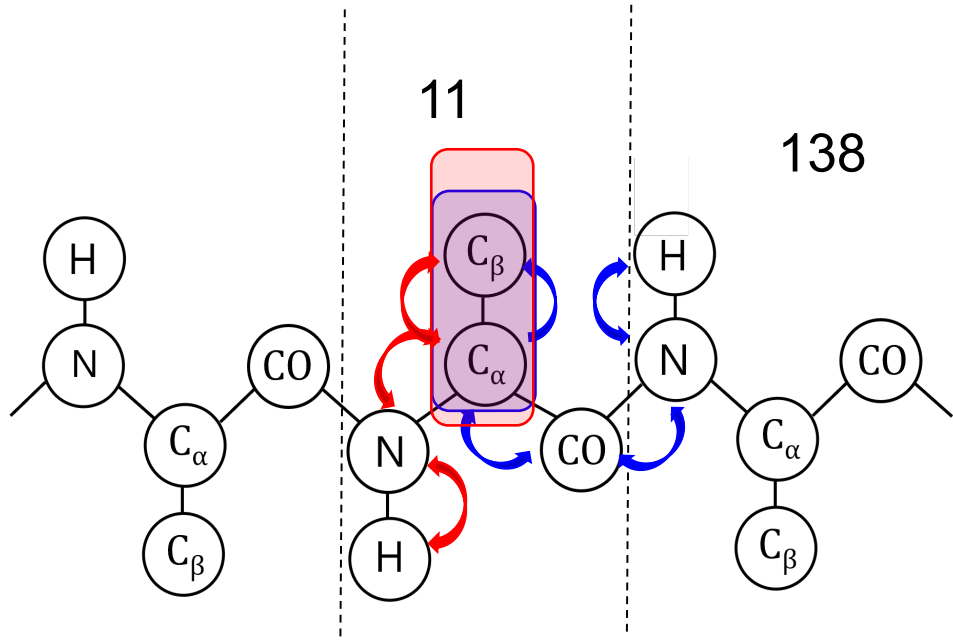
N-terminus C-terminus

HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 11-138-8



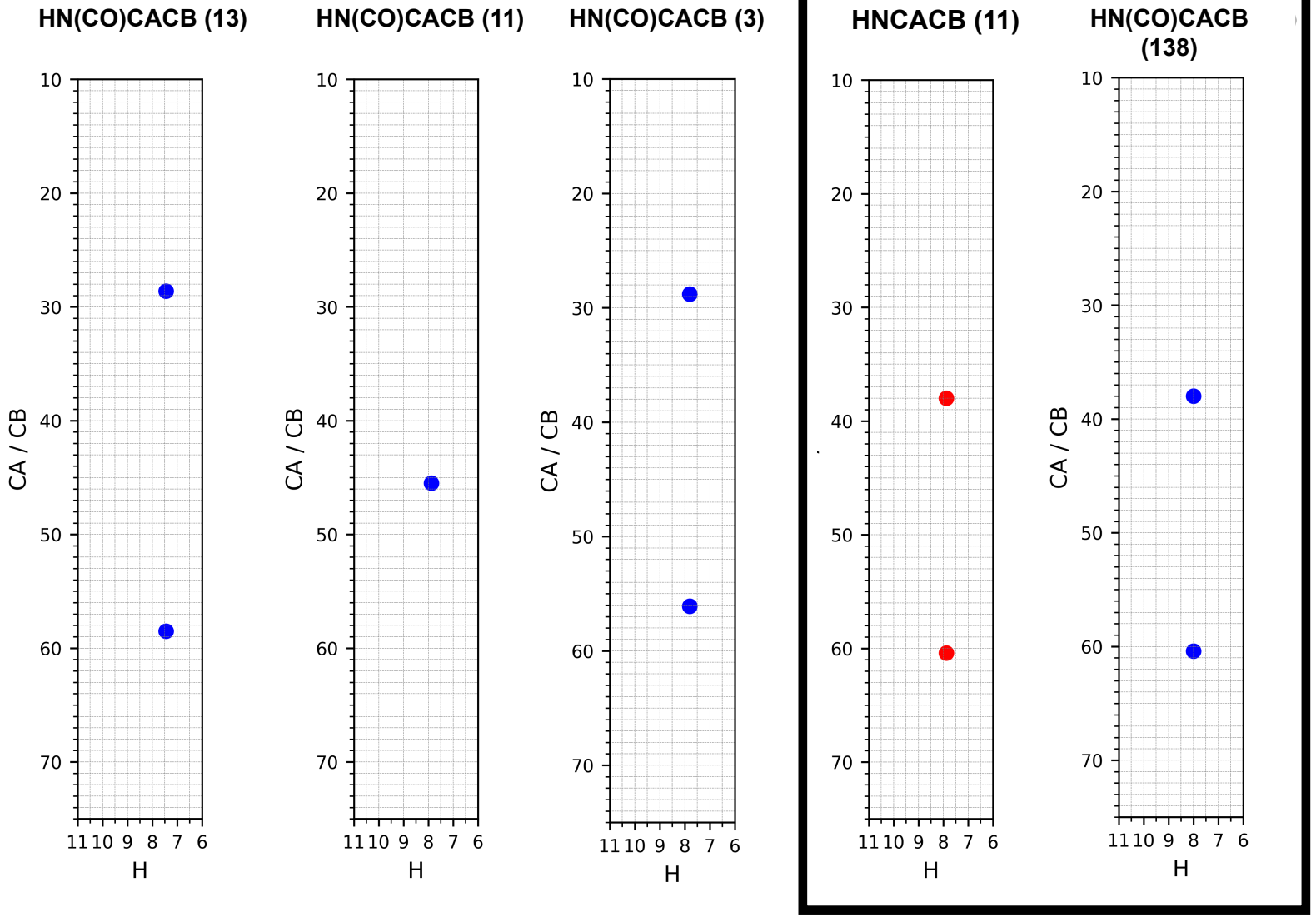


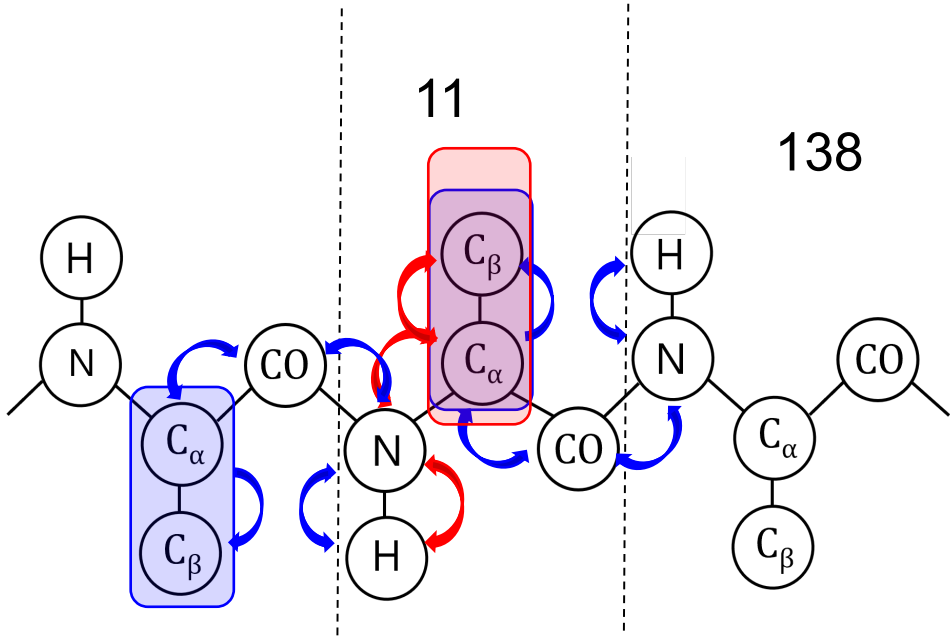
N-terminus C-terminus

HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 11-138-8

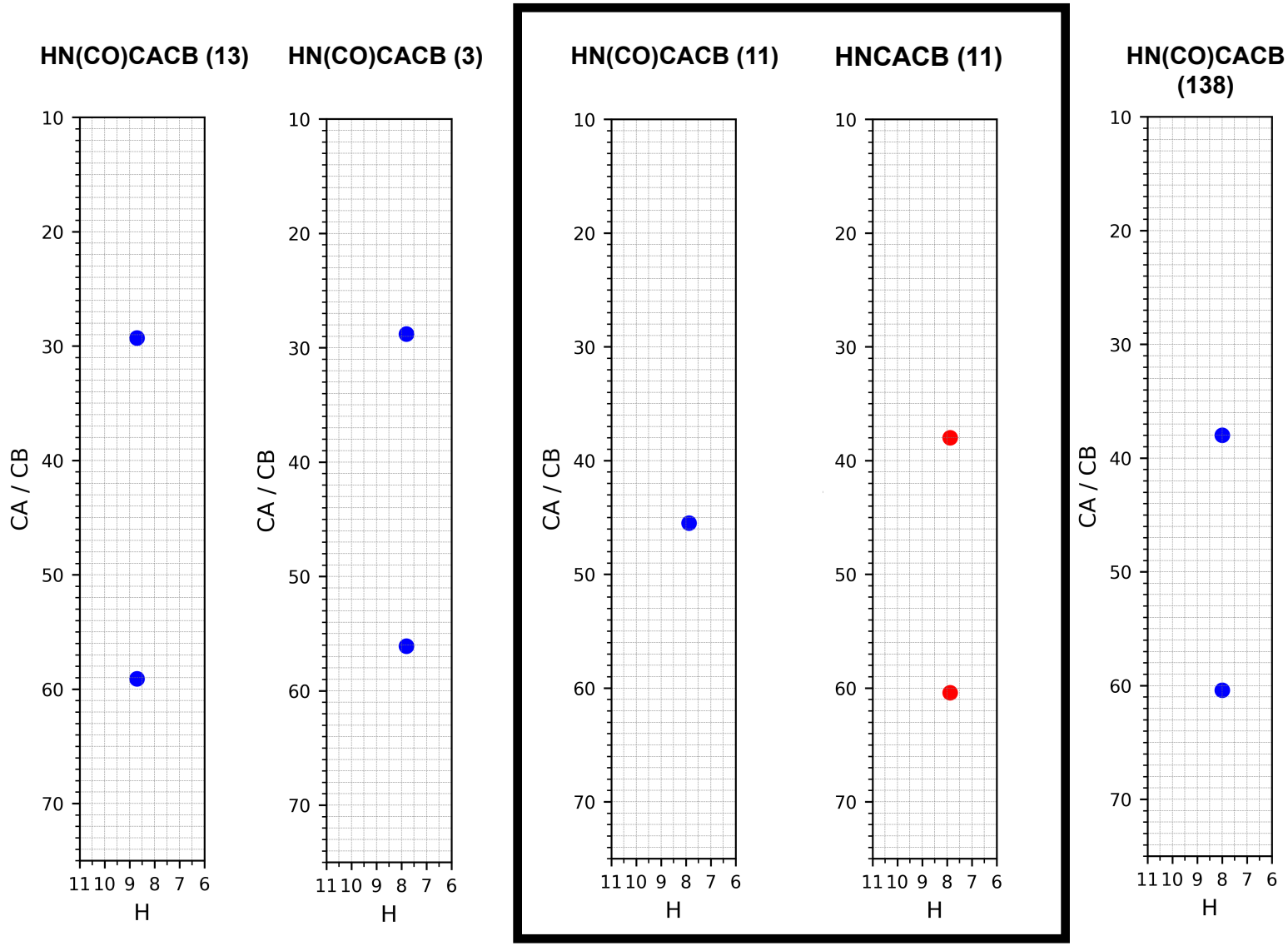


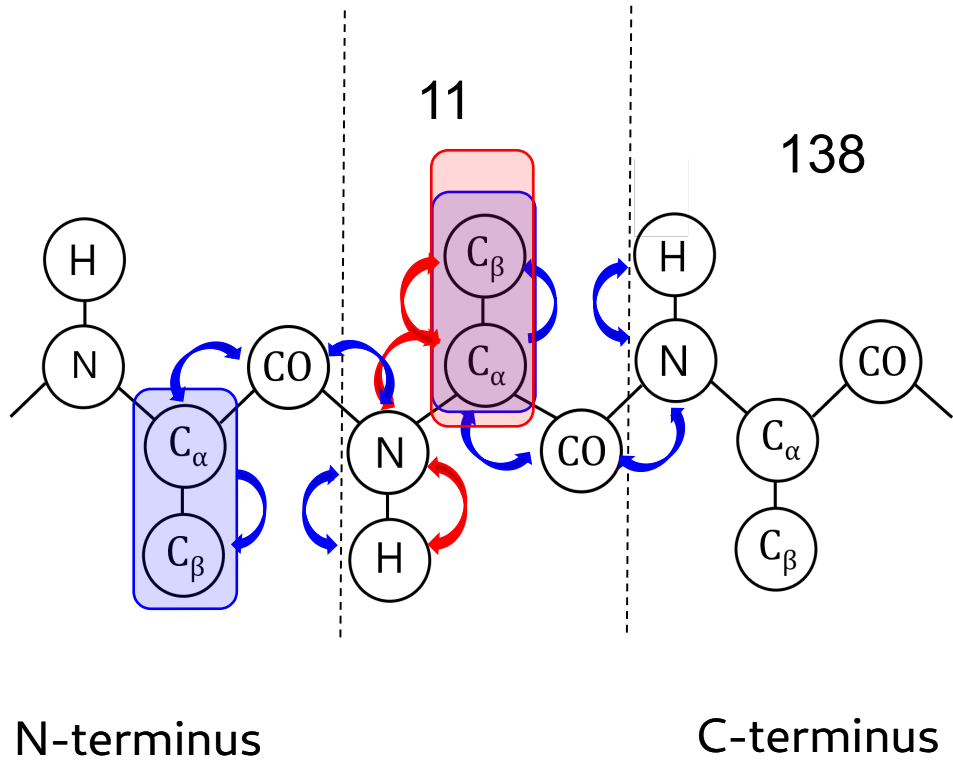


HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 11-138-8

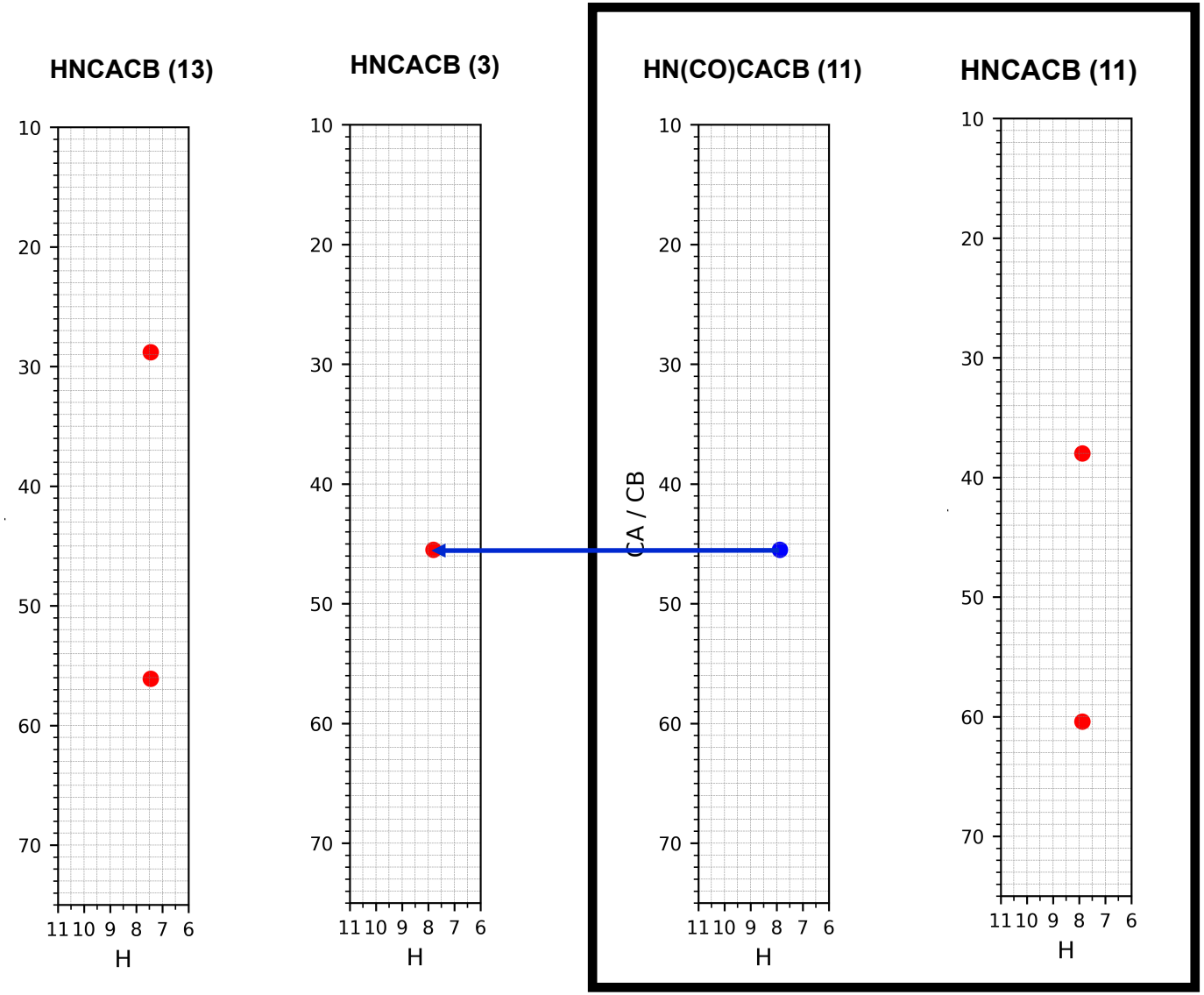


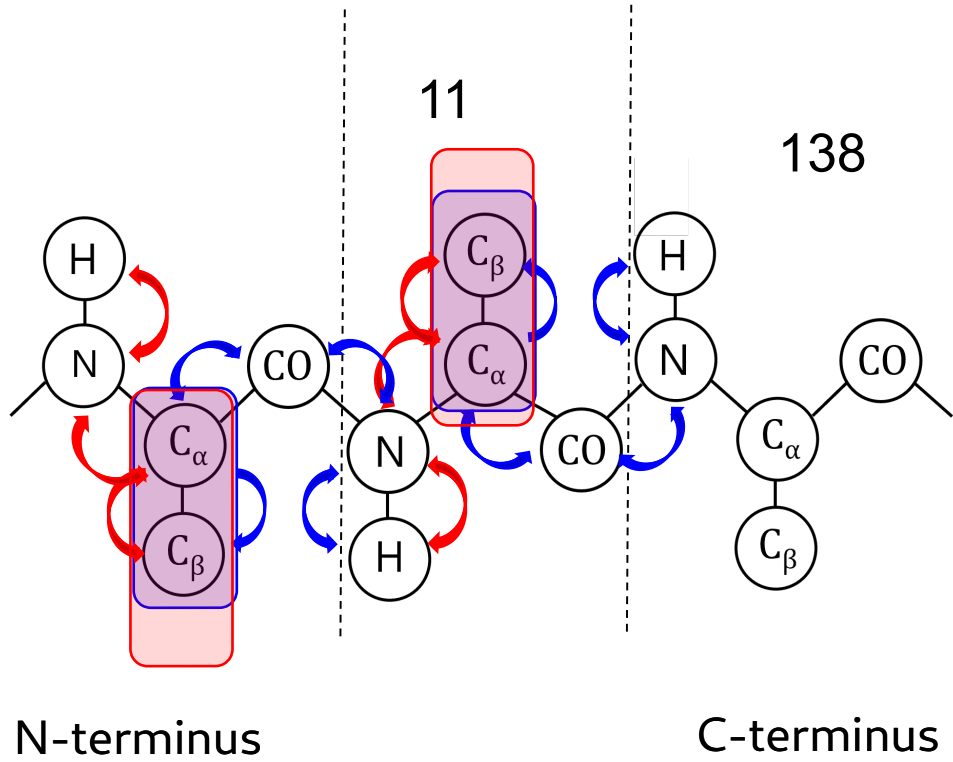


HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování – 3-11-138-8

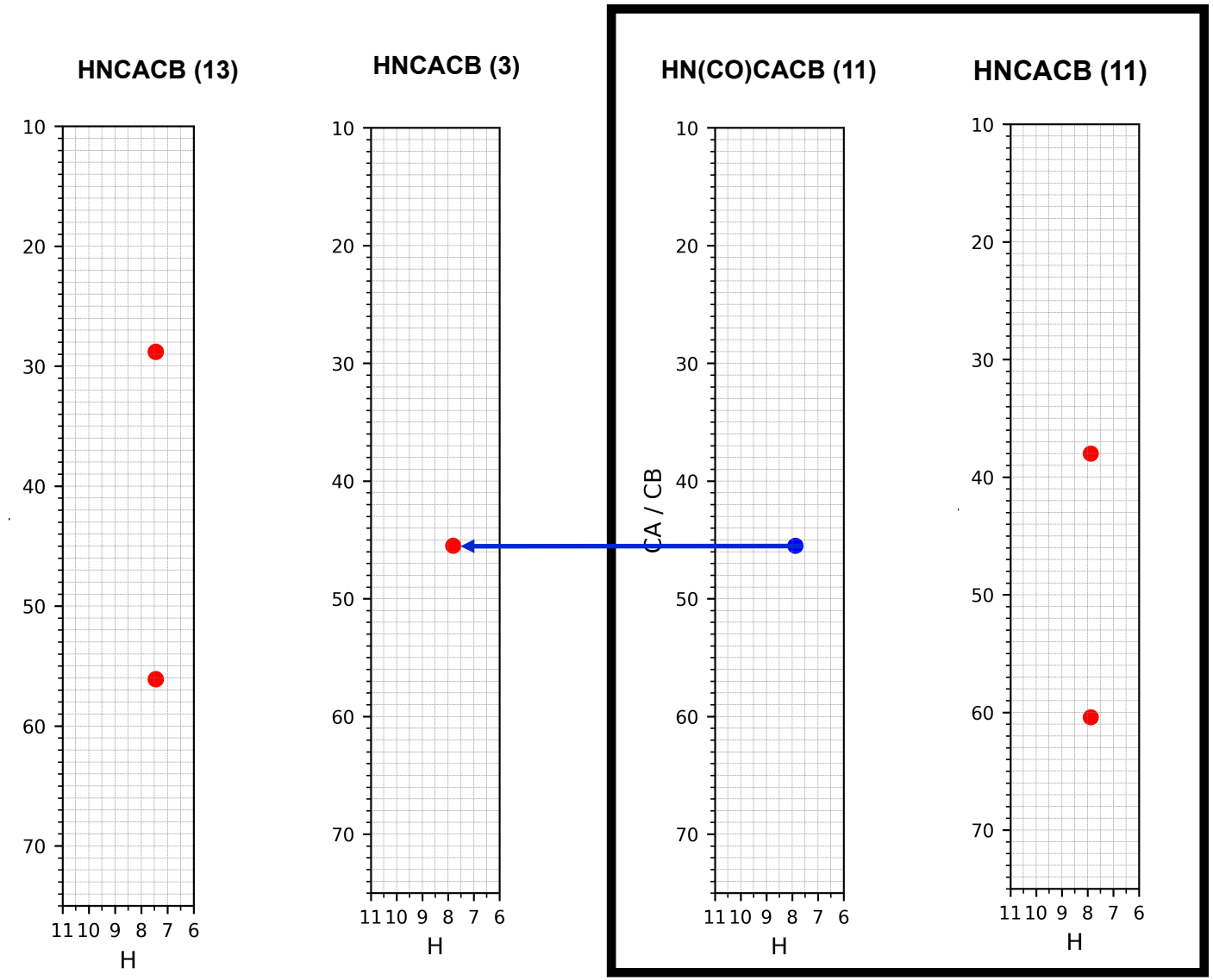


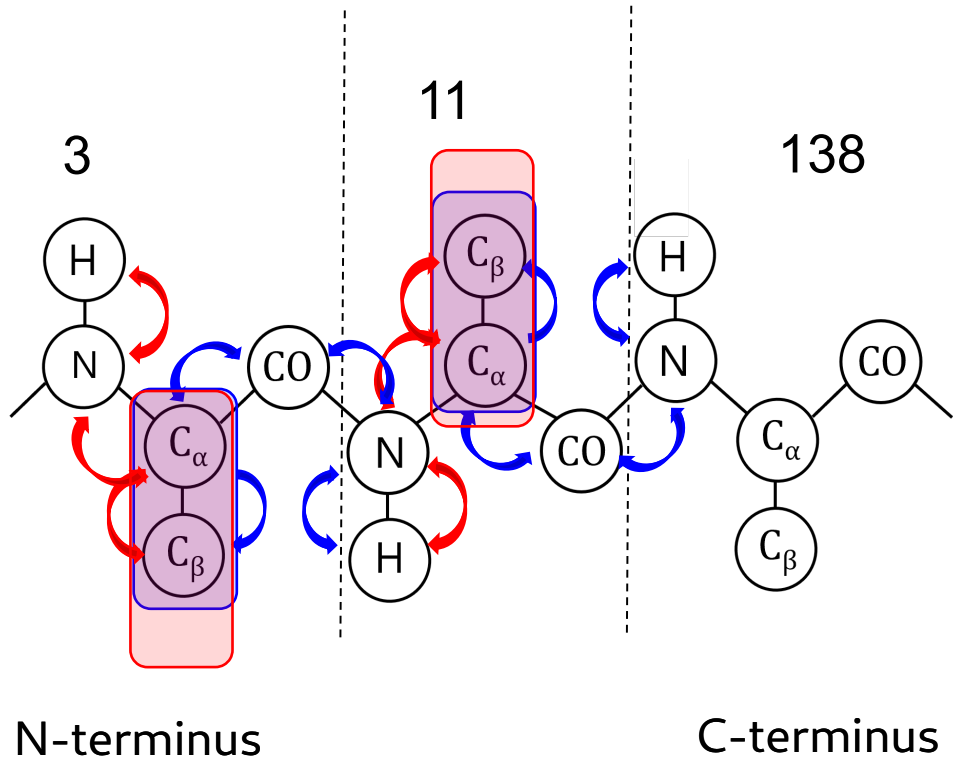


HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 3-11-138-8

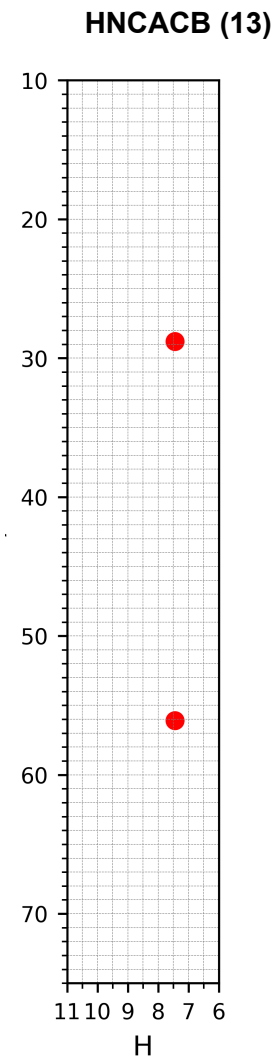


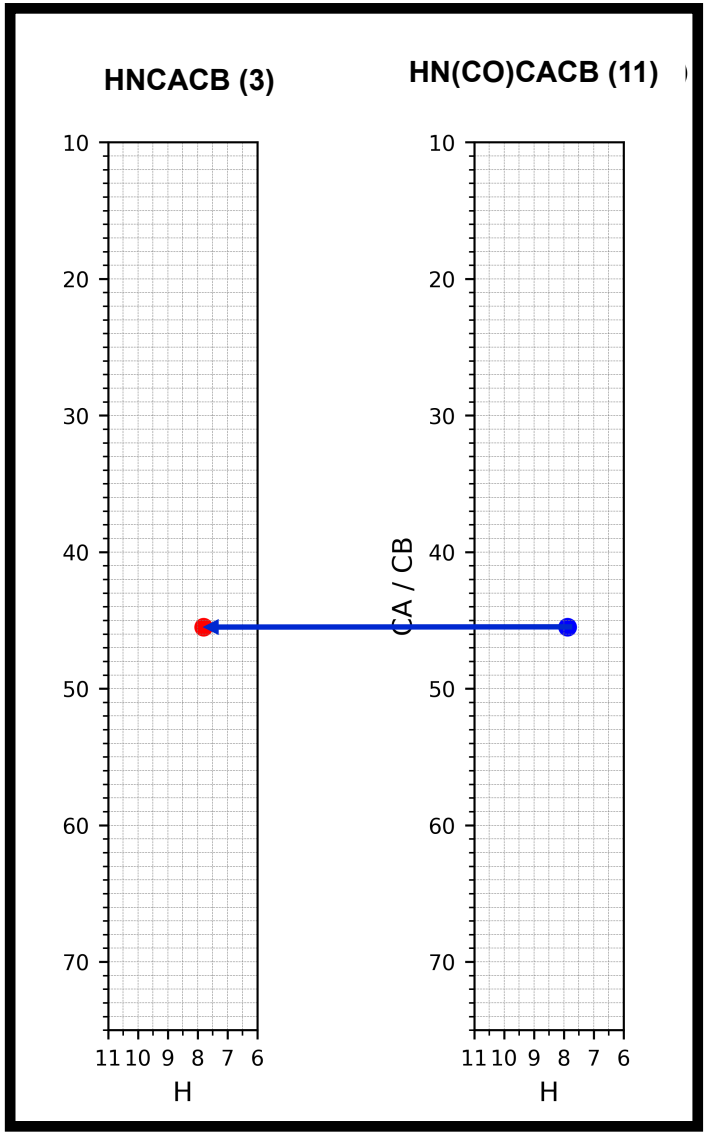


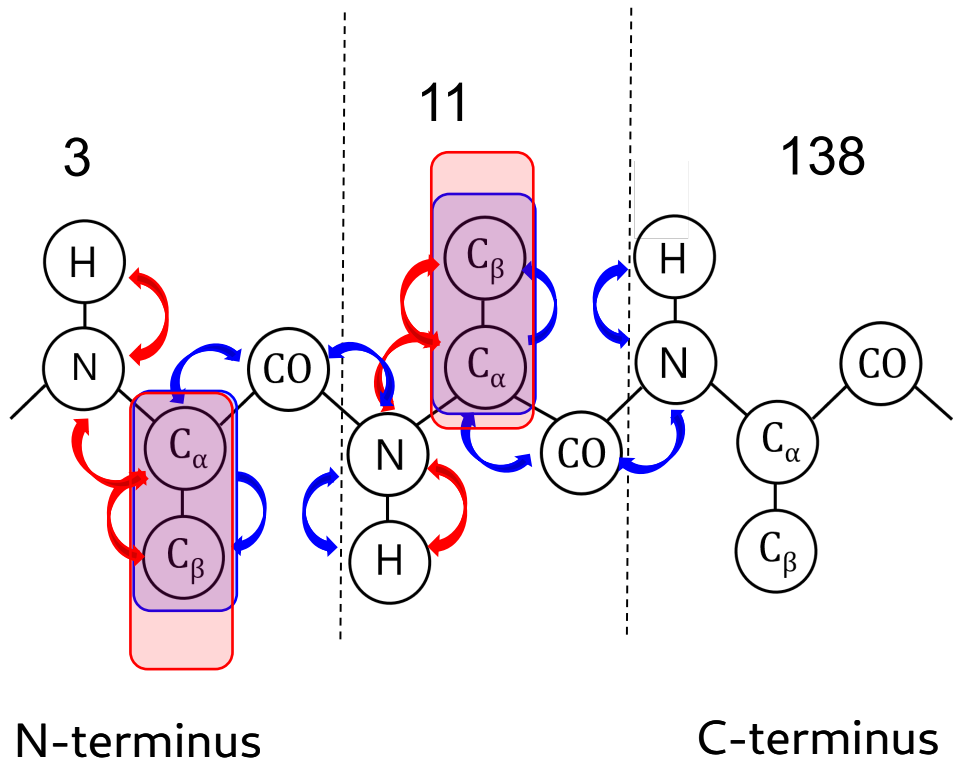
HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 3-11-138-8



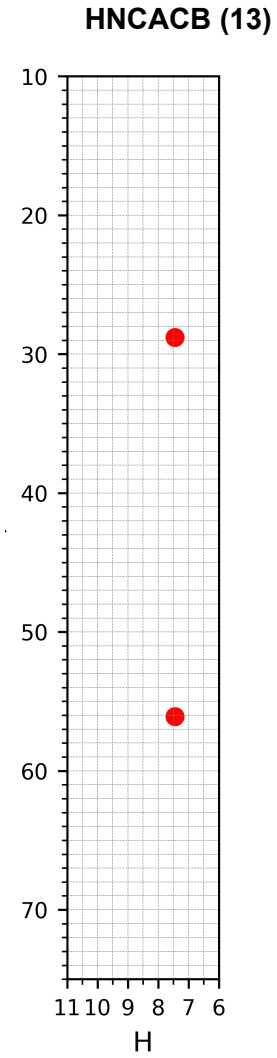


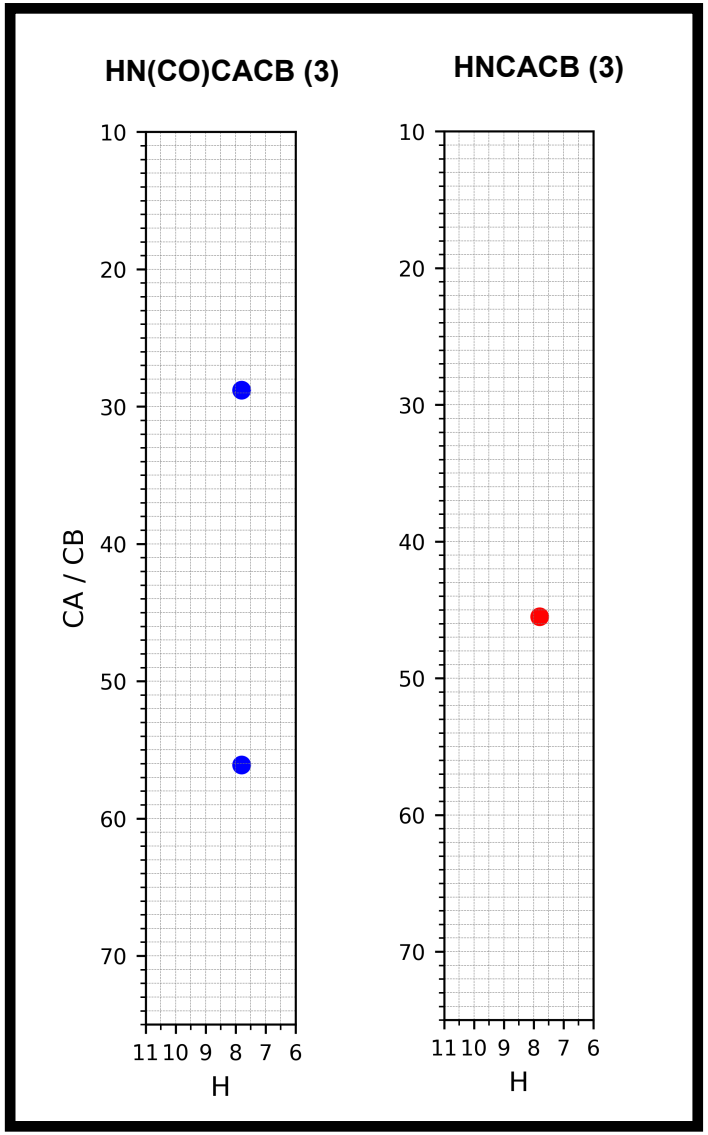


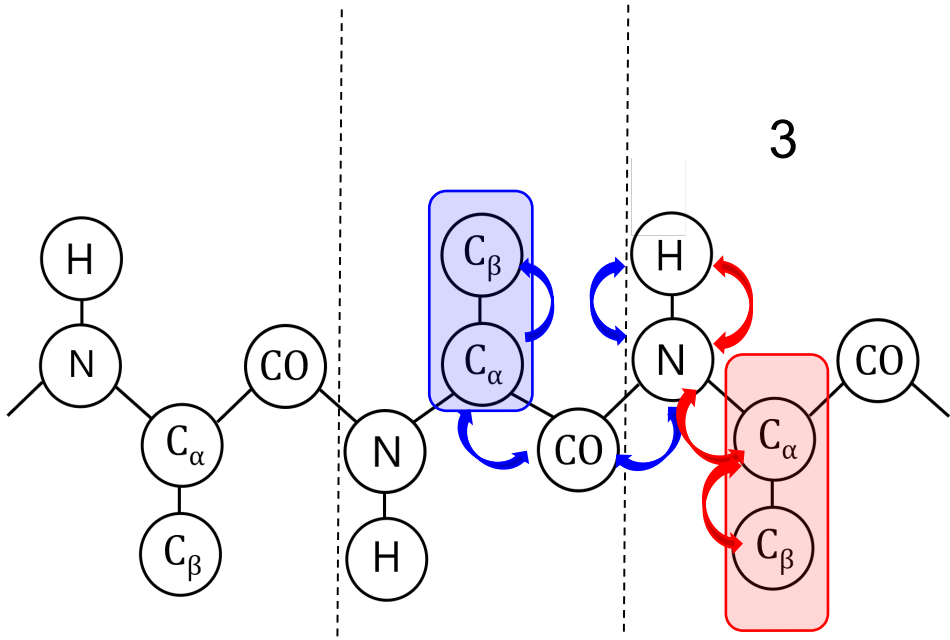
HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 3-11-138-8



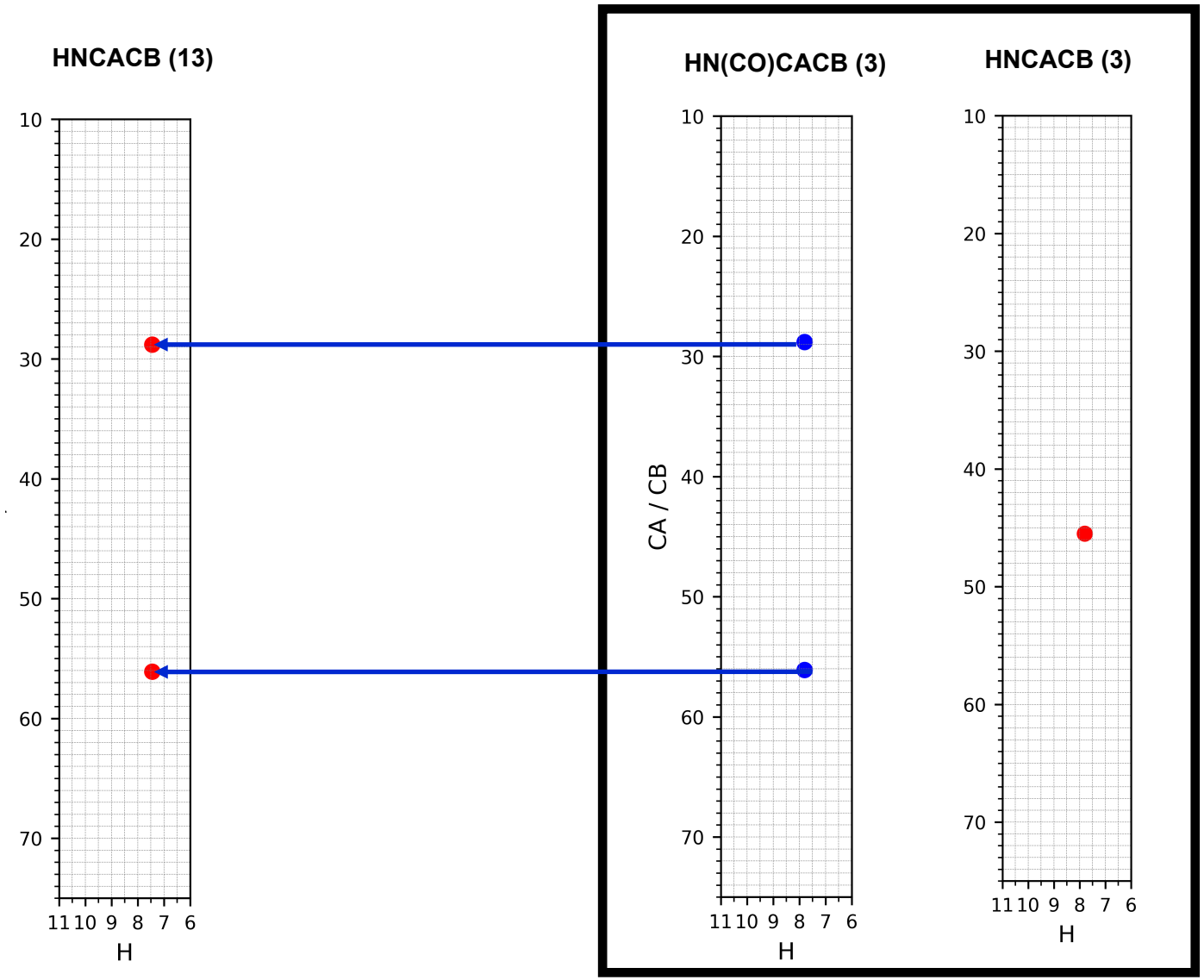


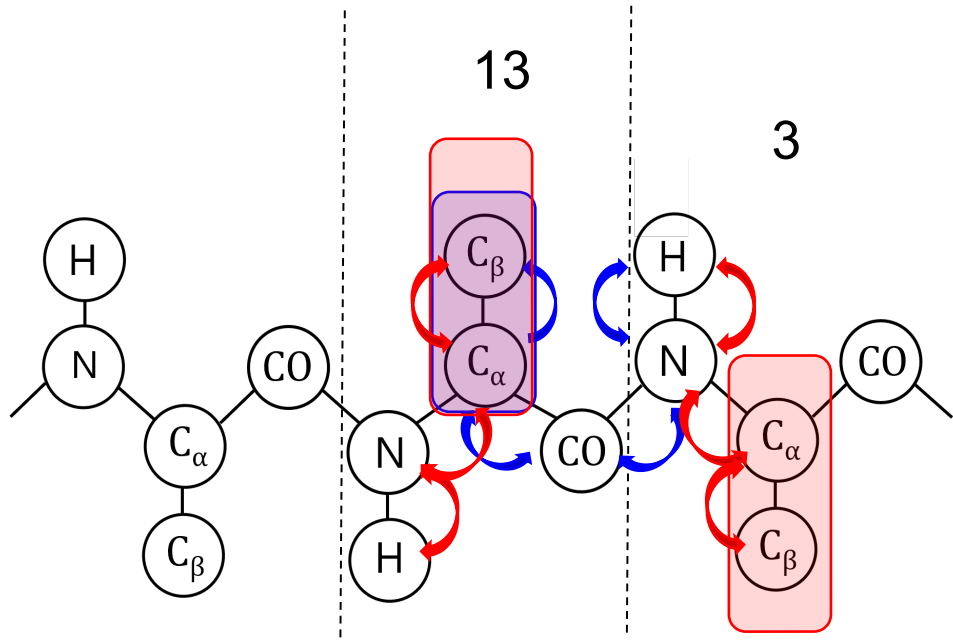


HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování – 13-3-11-138-8

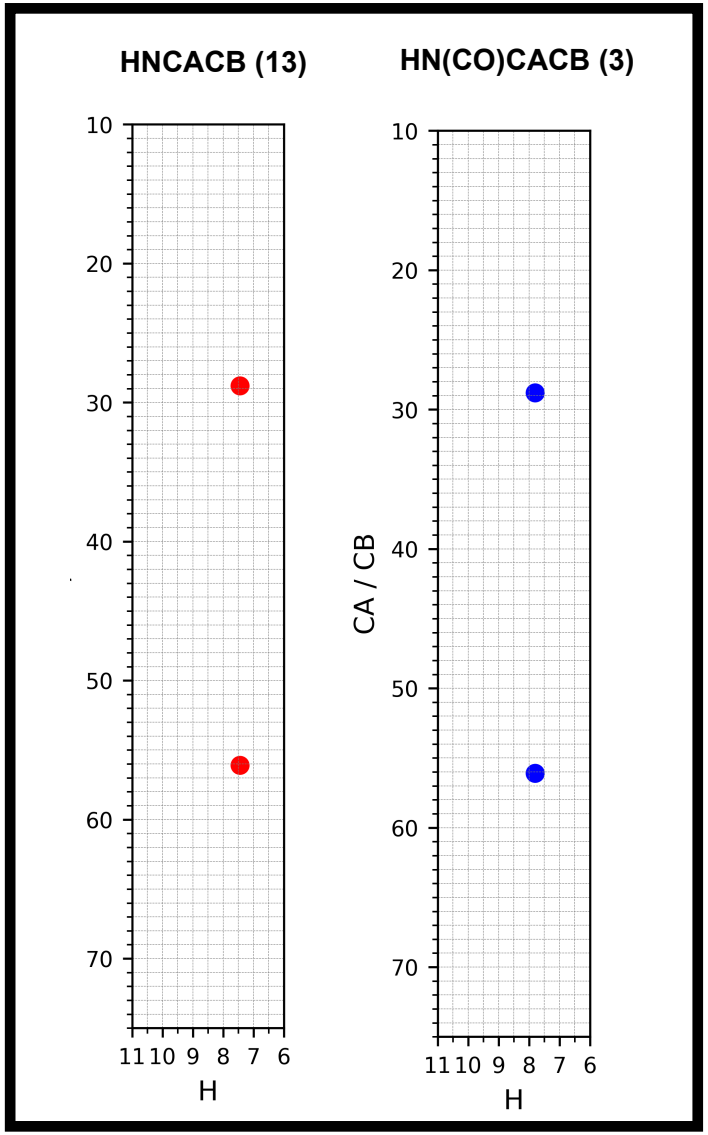


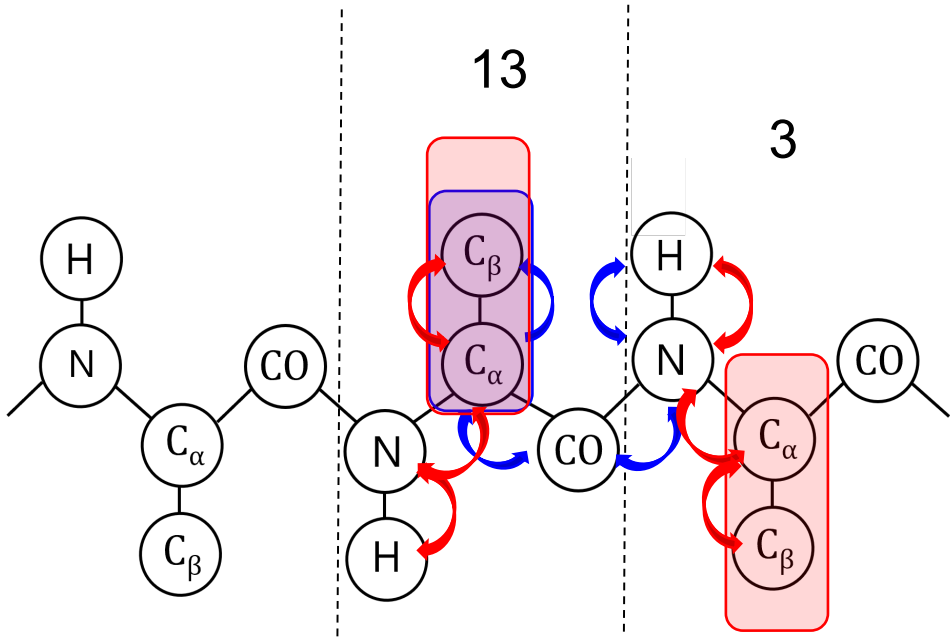


N-terminus C-terminus

HNCACB: Cα a Cβ současné AMK **HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK**

Postup při přiřazování - 13-3-11-138-8





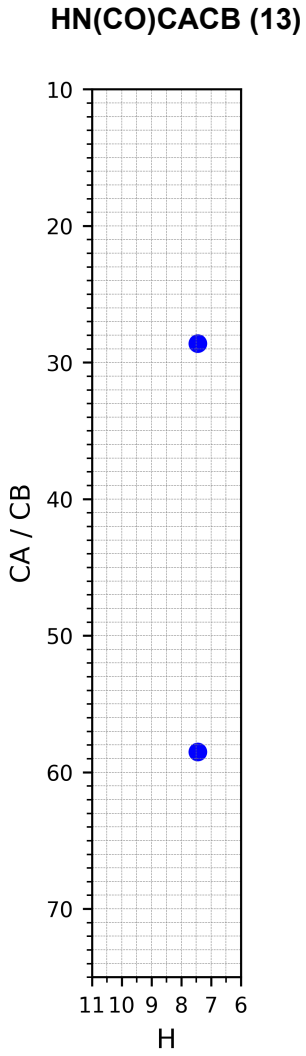
N-terminus

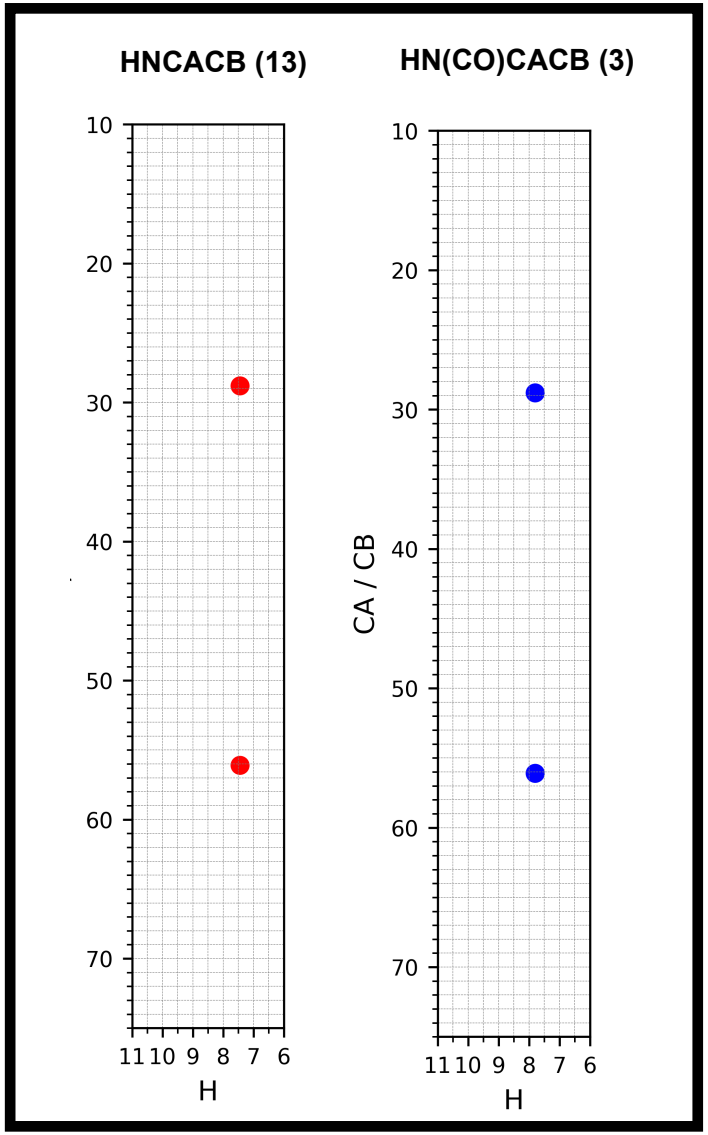
C-terminus

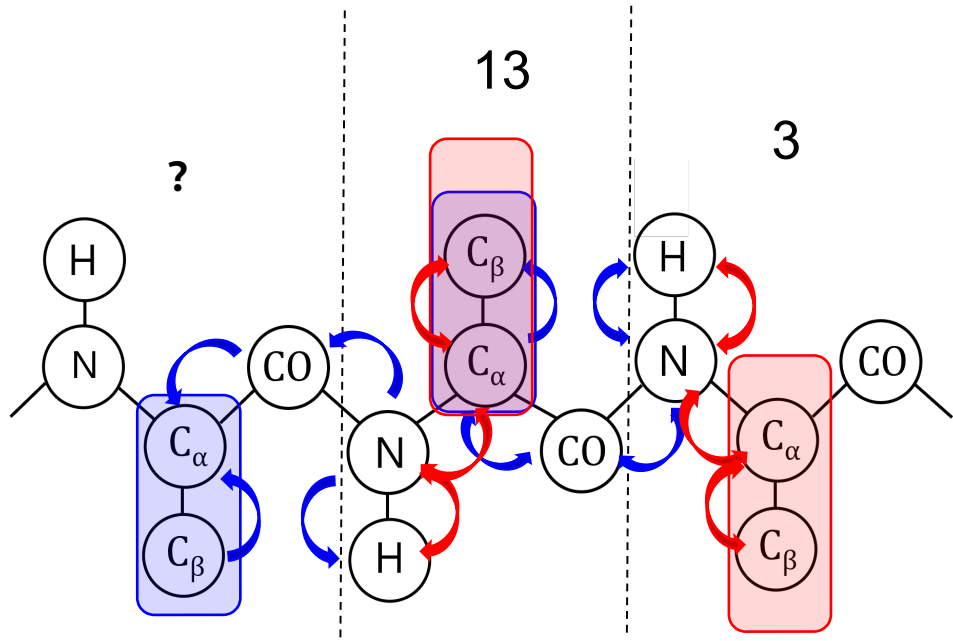
HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Postup při přiřazování - 13-3-11-138-8



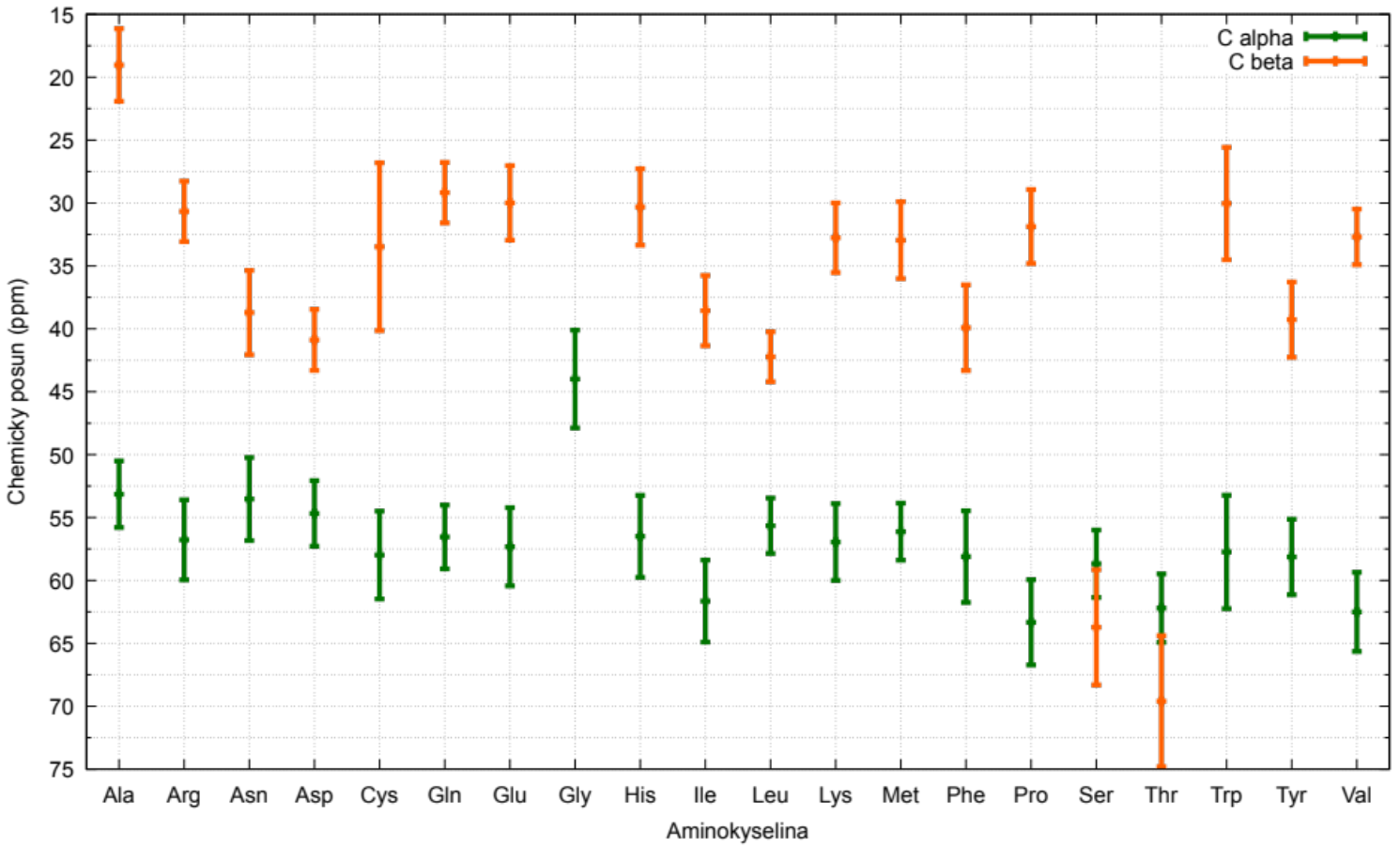




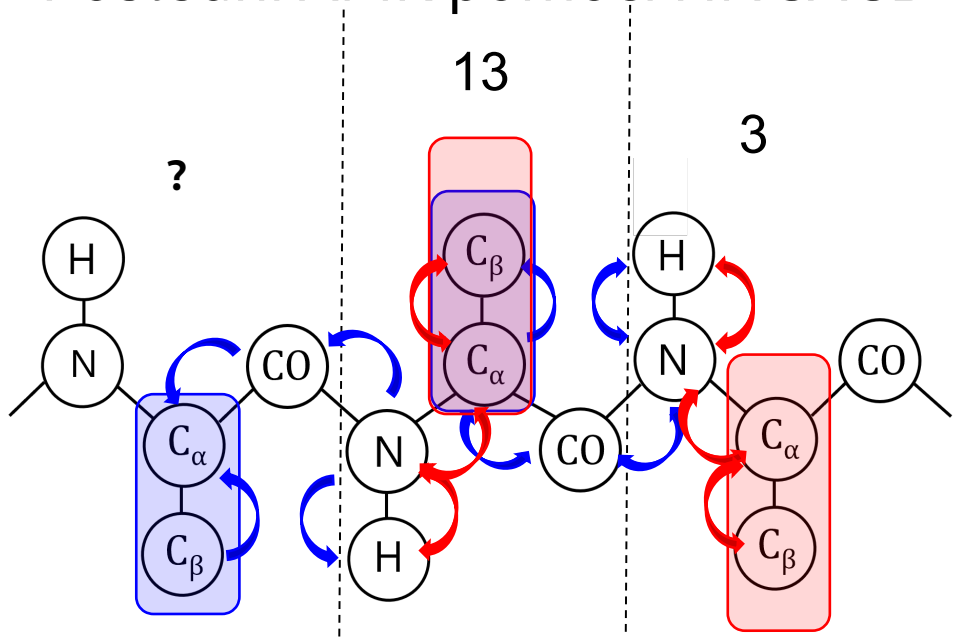
HNCACB: Cα a Cβ současné AMK

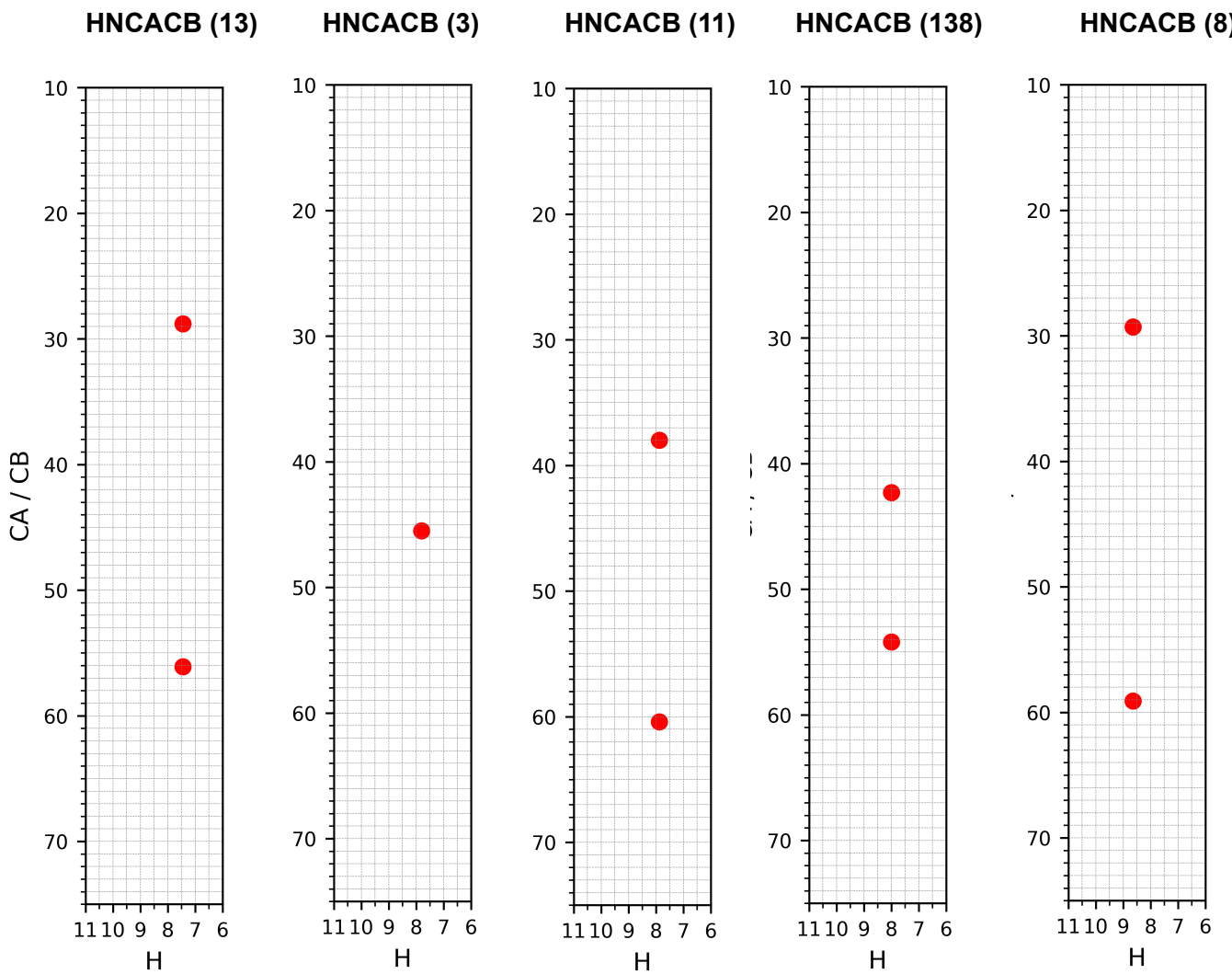
HN(CO)CACB: Cα a Cβ předchozí AMK

Úkol č. 2 – určit o jaké aminokyseliny se jedná na základě chemického posunu CA a CB

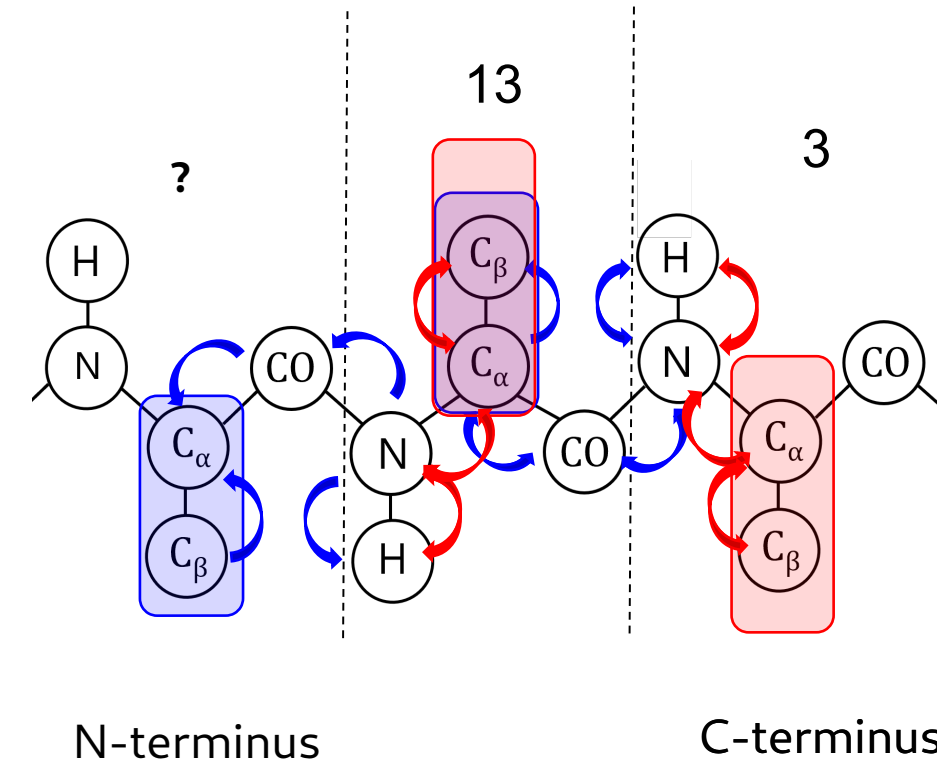


- První AMK na N-terminu – pomocí HN(CO)CACB
- Poslední AMK pomocí HNCACB





A, K, R | A, G, L | F, L, D | D, I, V | W, T, D

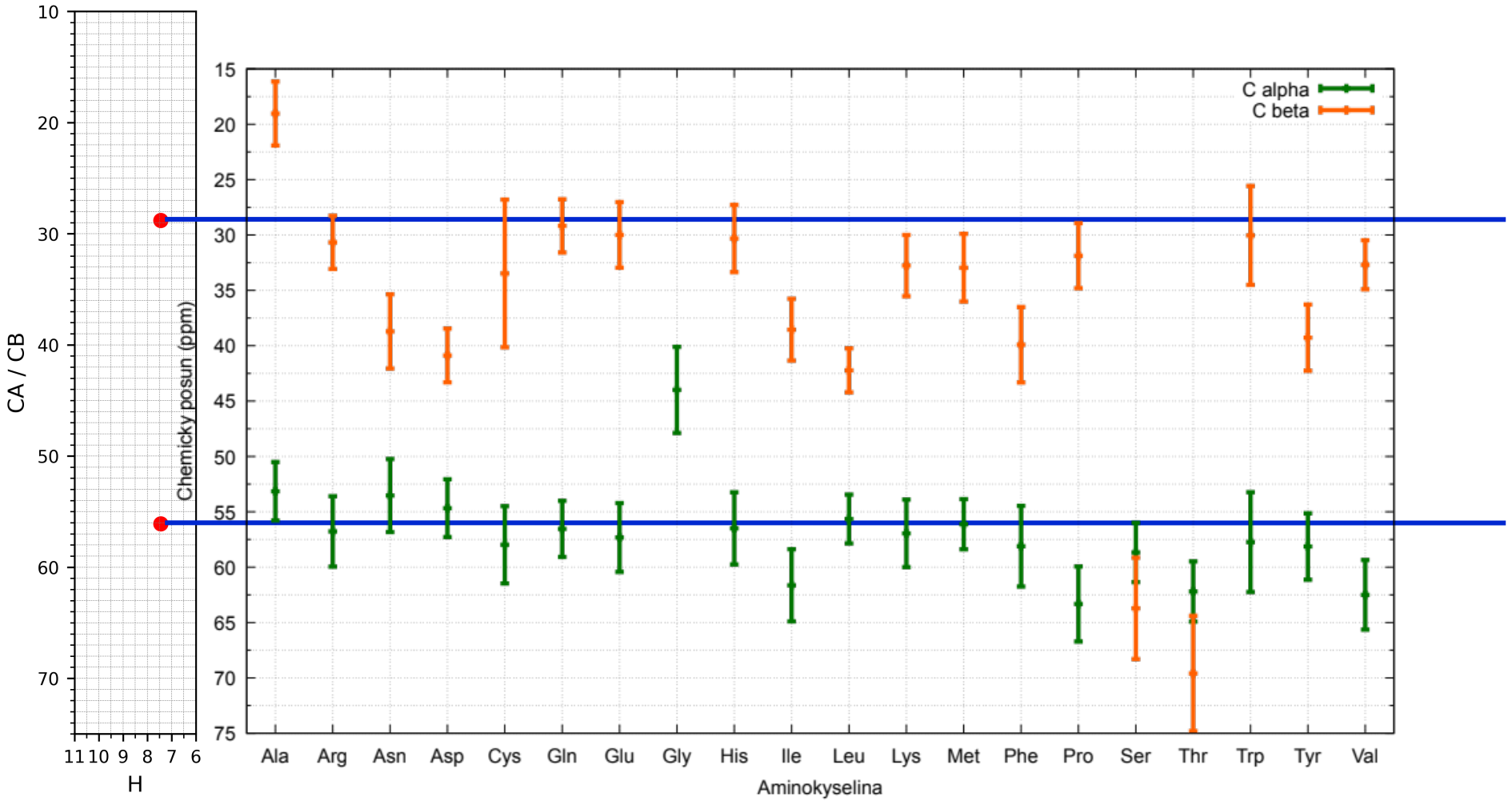


N-terminus

C-terminus

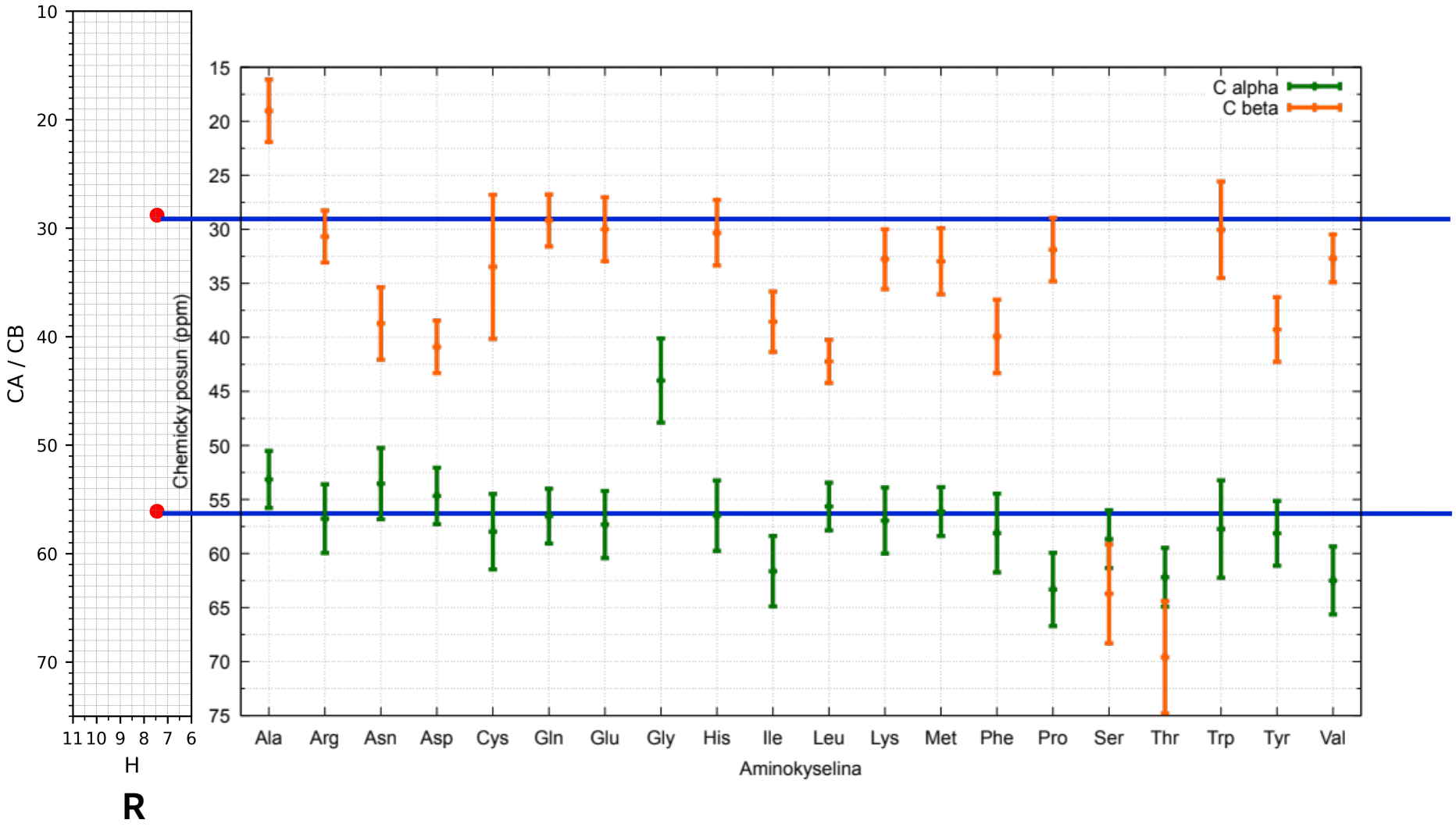
44

HNCACB (13)

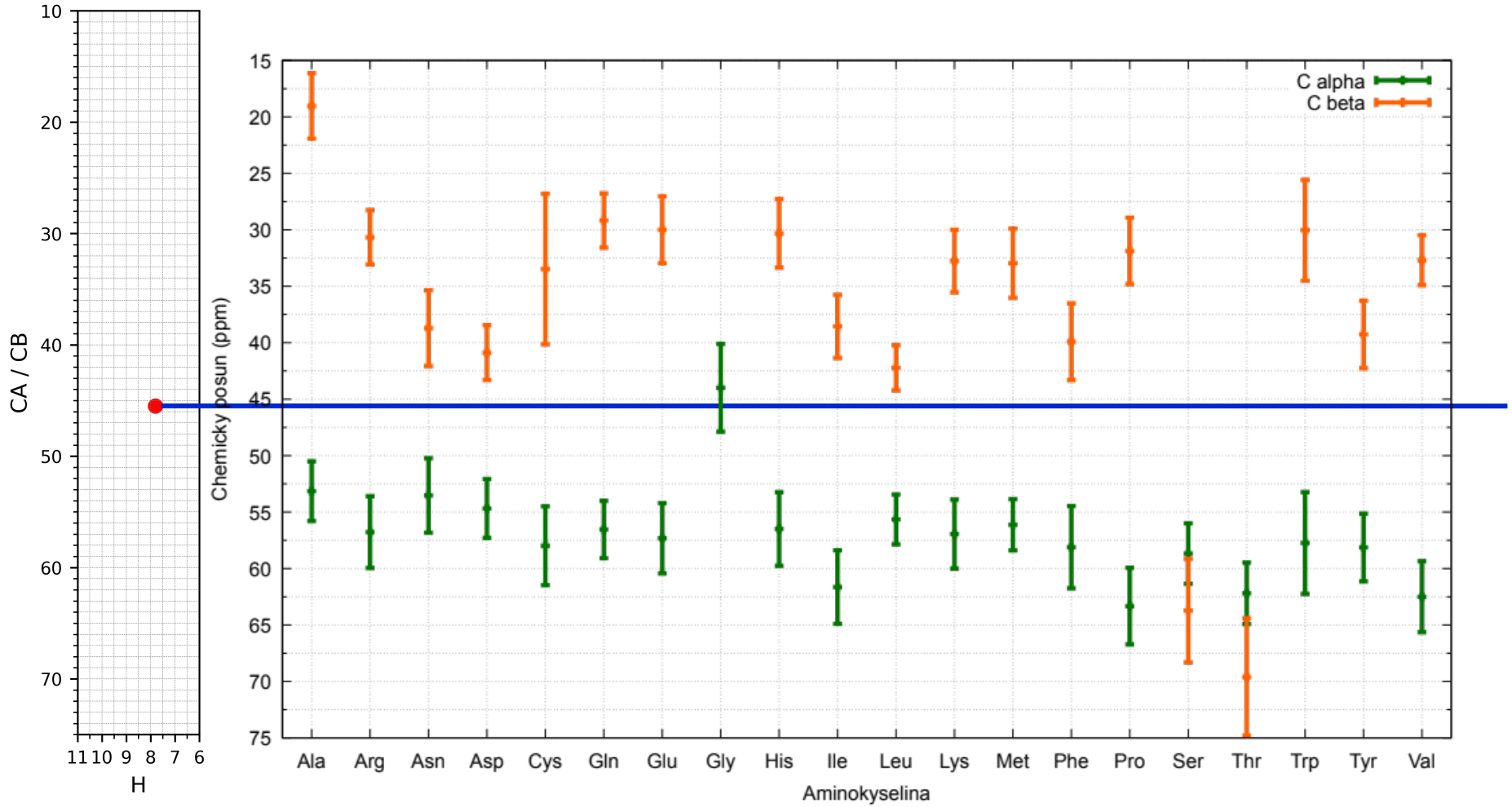


A, K, R

HNCACB (13)

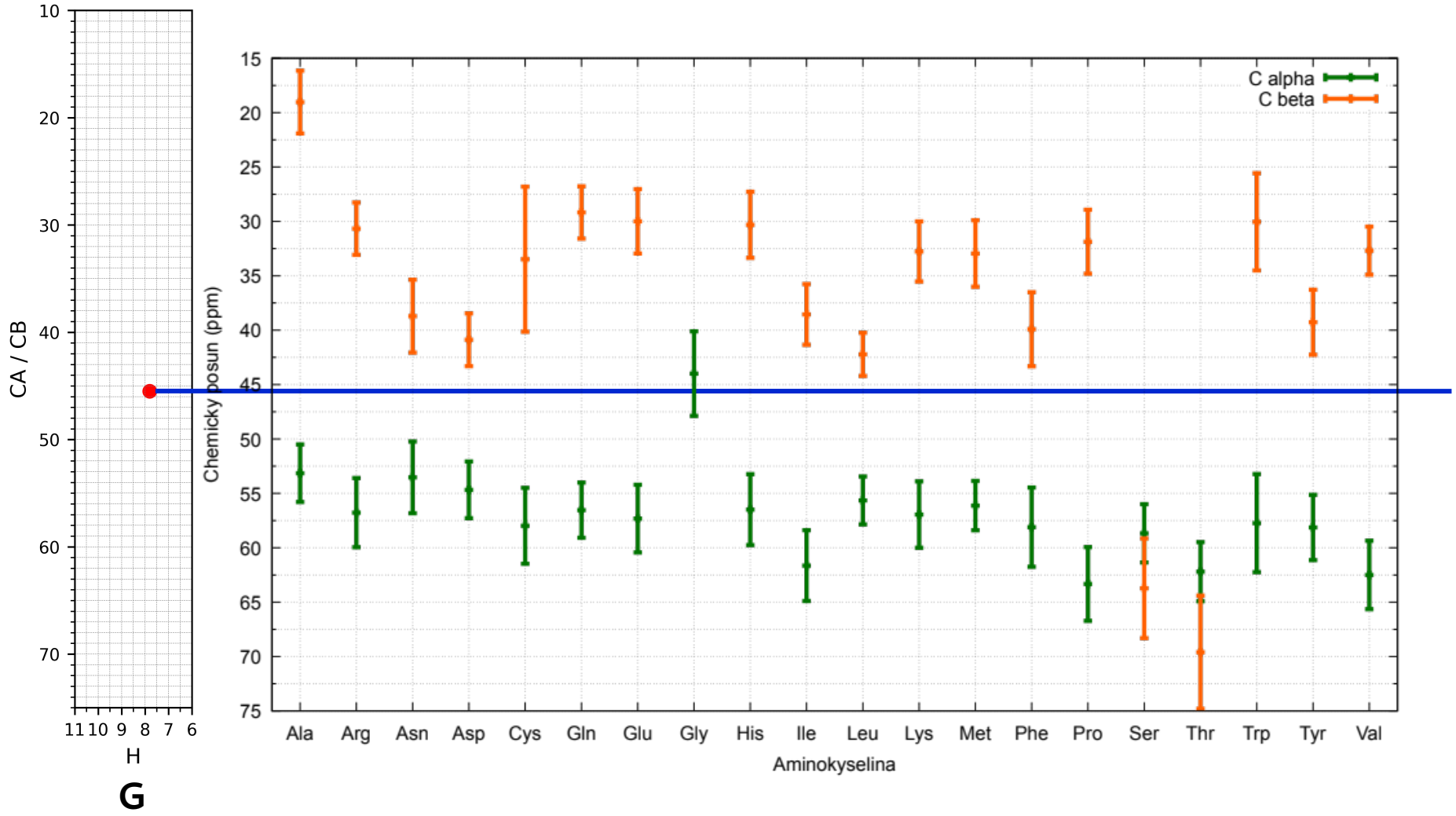

CA / CB
Chemický posun (ppm)
C alpha
C beta
Ala Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp Tyr Val
Aminokyselina
H
R

HNCACB (3)


CA / CB
H
Chemicky posun (ppm)
C alpha
C beta
Ala
Arg
Asn
Asp
Cys
Gln
Glu
Gly
His
Ile
Leu
Lys
Met
Phe
Pro
Ser
Thr
Trp
Tyr
Val
Aminokyselina

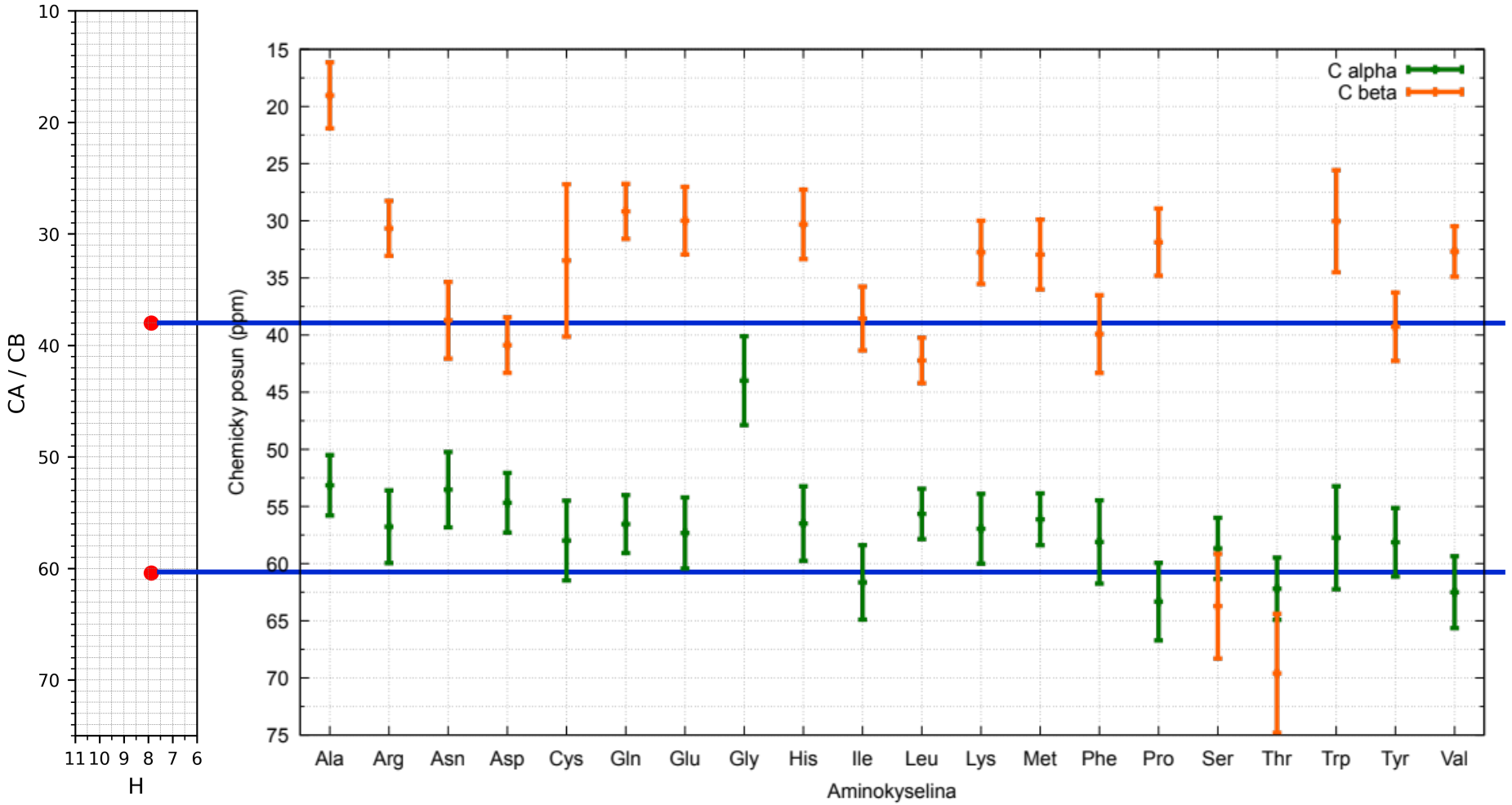
A, G, L

HNCACB (3)


CA / CB
H
Chemicky posun (ppm)
C alpha
C beta
Ala
Arg
Asn
Asp
Cys
Gln
Glu
Gly
His
Ile
Leu
Lys
Met
Phe
Pro
Ser
Thr
Trp
Tyr
Val
Aminokyselina

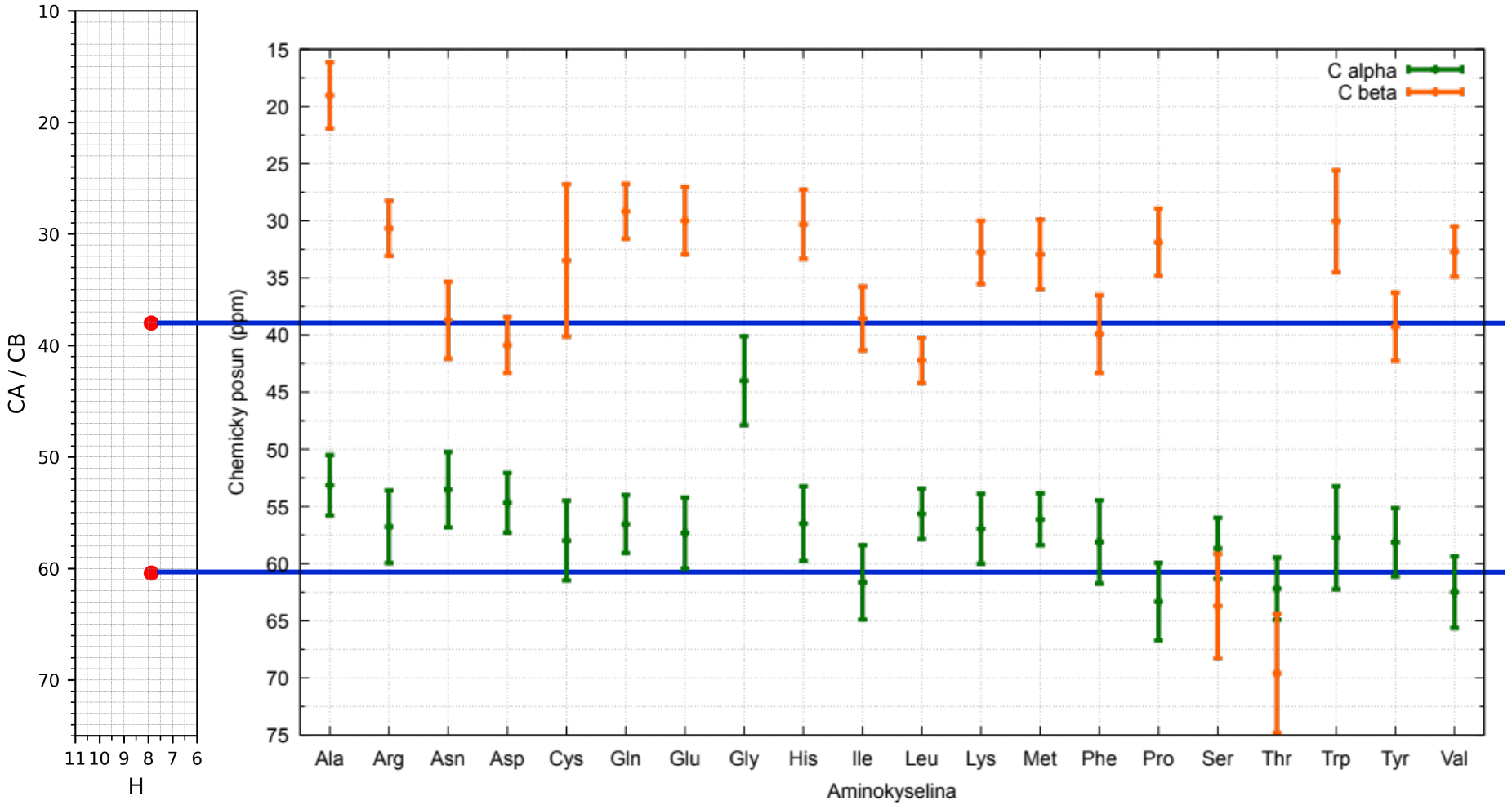
G

HNCACB (11)



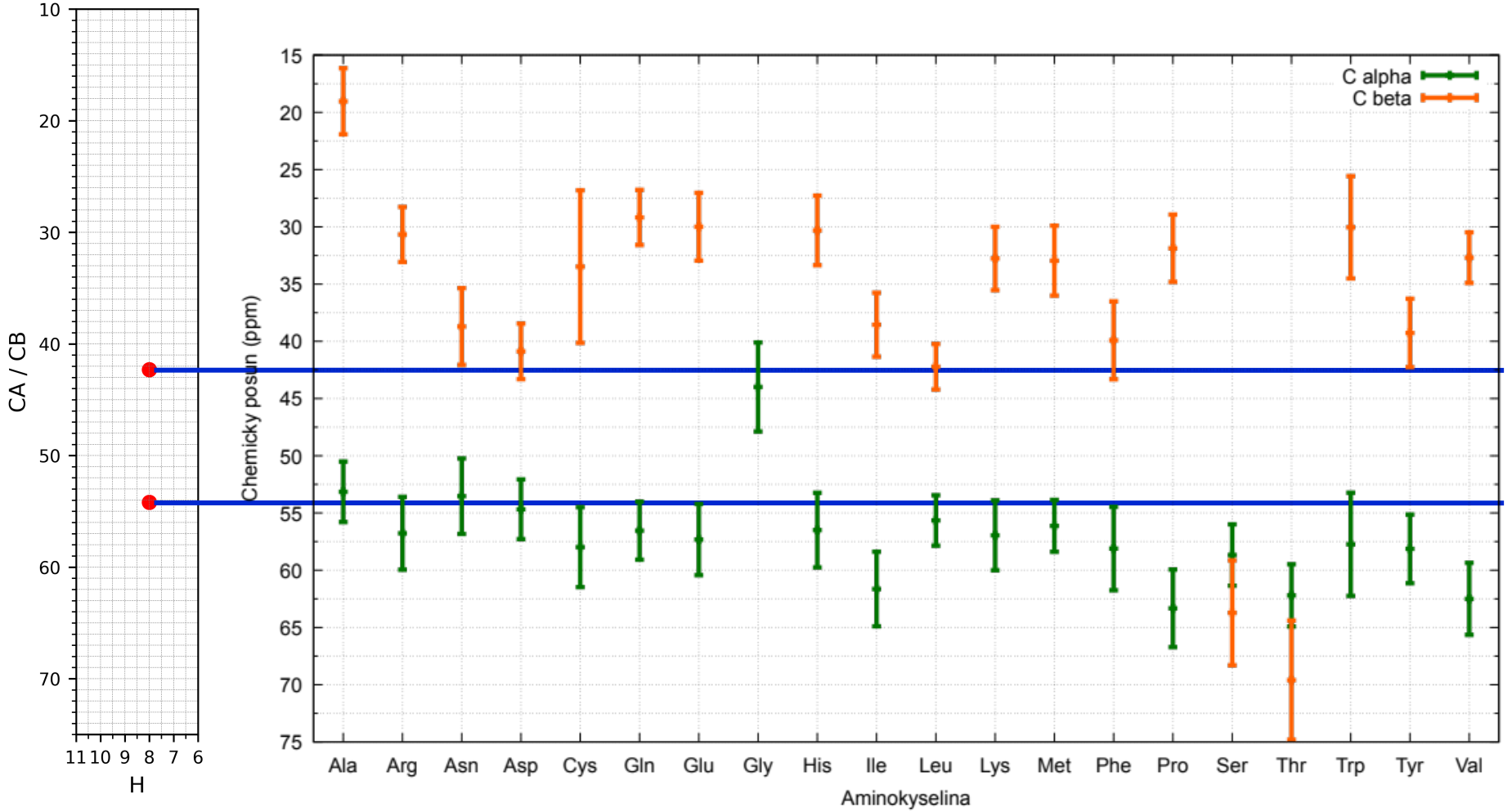
F, L, D

HNCACB (11)


CA / CB
H
Chemicky posun (ppm)
Aminokyselina
C alpha
C beta
Ala
Arg
Asn
Asp
Cys
Gln
Glu
Gly
His
Ile
Leu
Lys
Met
Phe
Pro
Ser
Thr
Trp
Tyr
Val

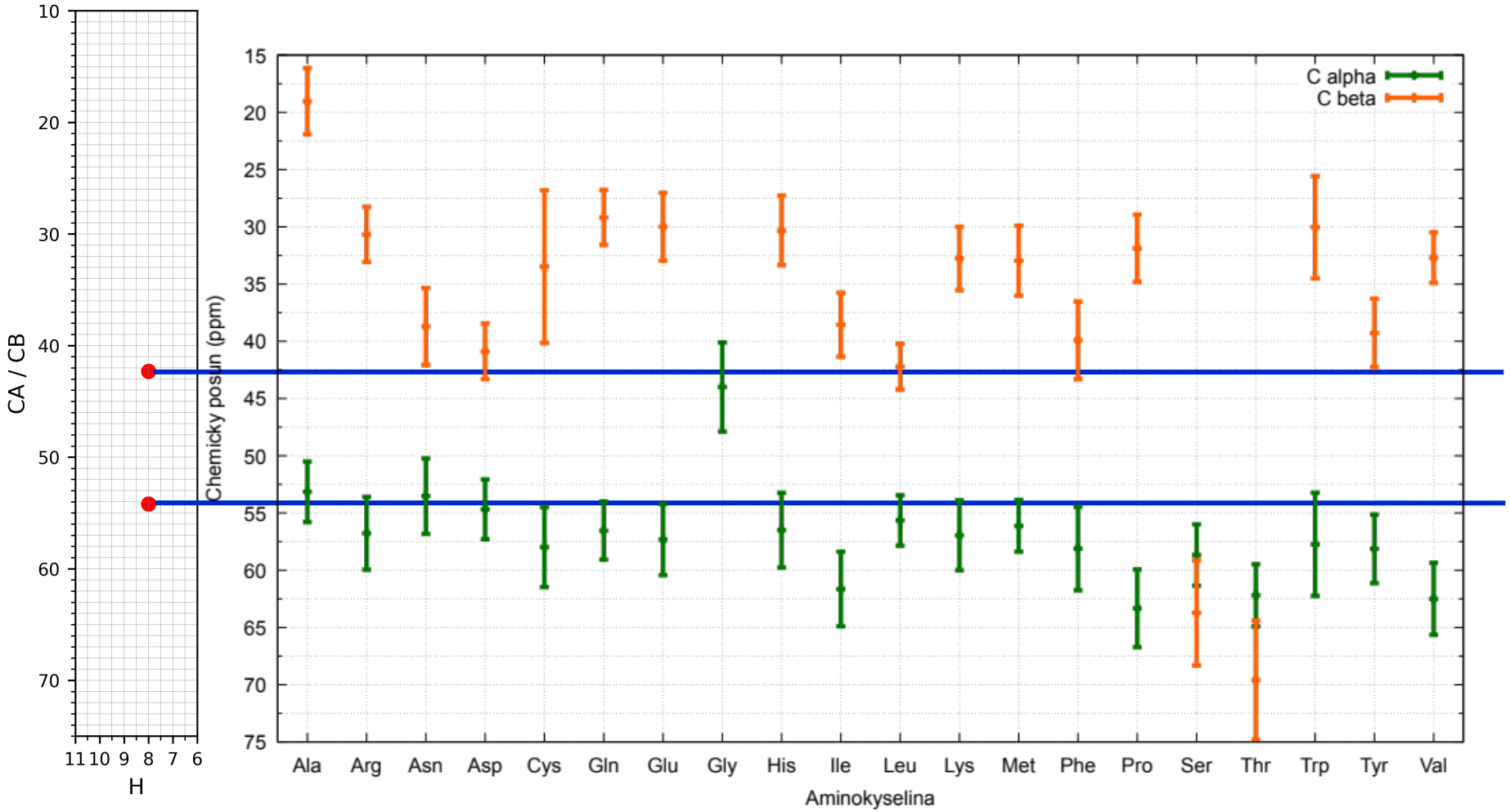
F

HNCACB (138)



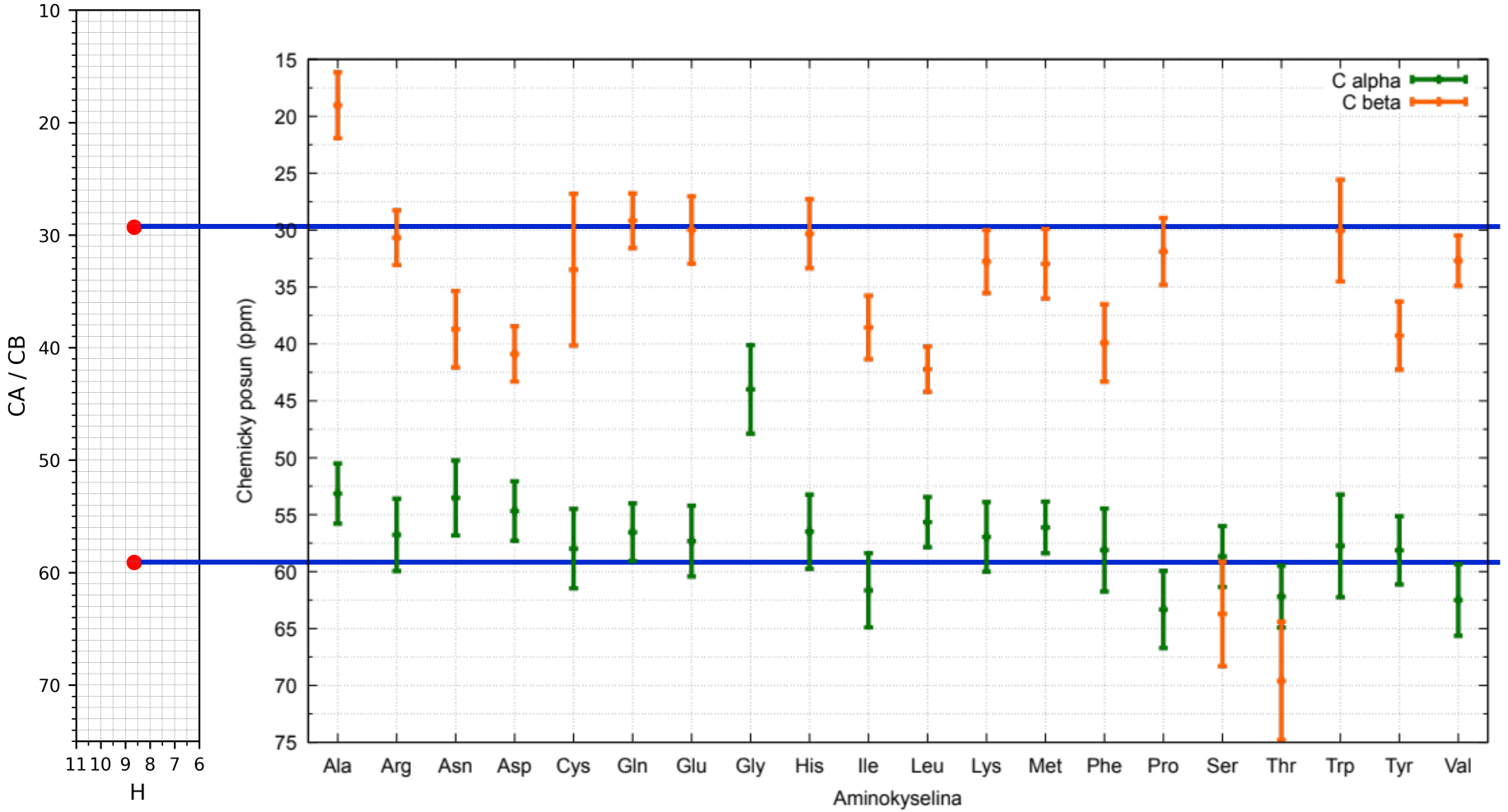
D, I, V

HNCACB (138)


CA / CB
H
Chemicky posun (ppm)
C alpha
C beta
Ala
Arg
Asn
Asp
Cys
Gln
Glu
Gly
His
Ile
Leu
Lys
Met
Phe
Pro
Ser
Thr
Trp
Tyr
Val
Aminokyselina

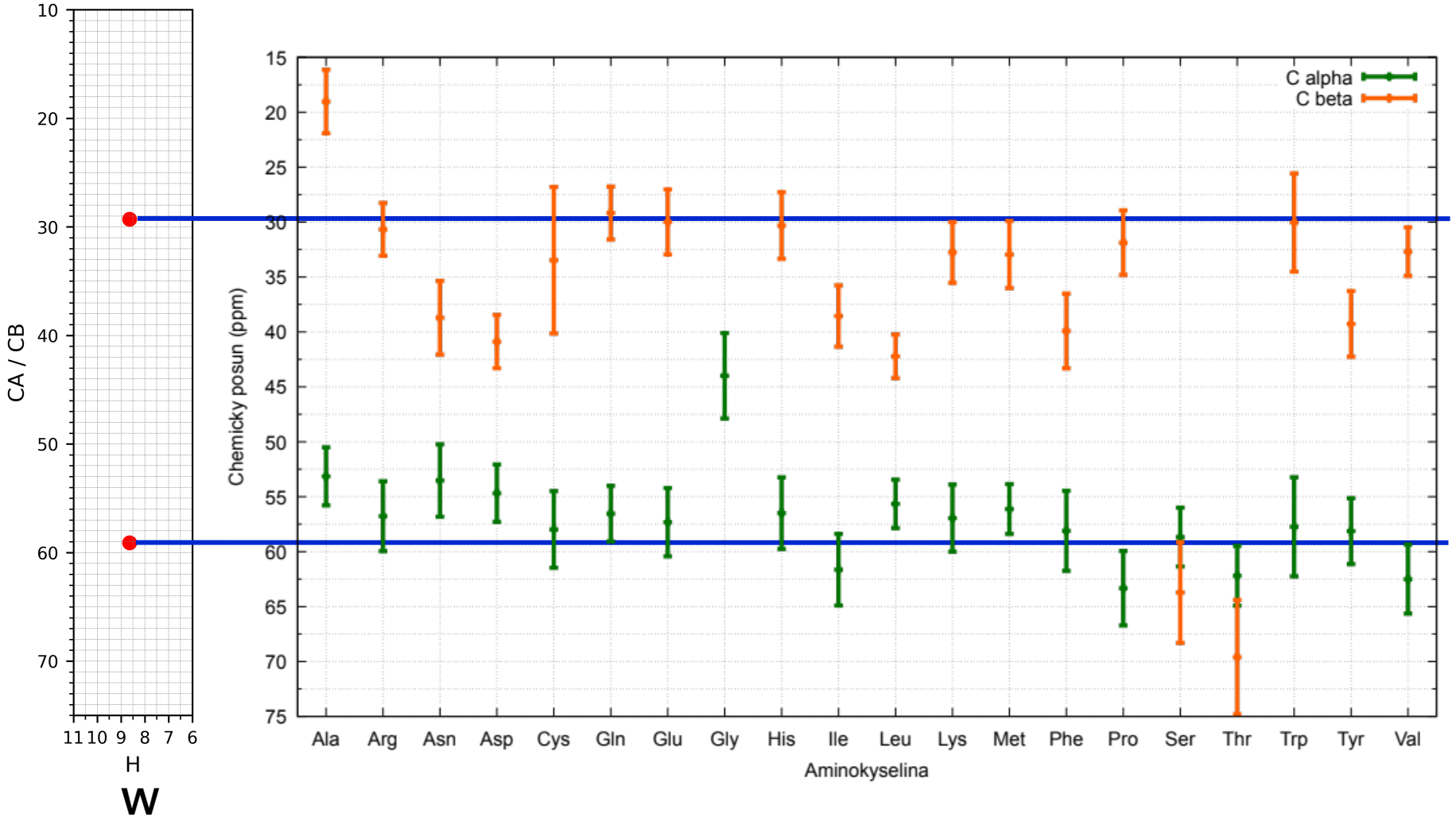
D

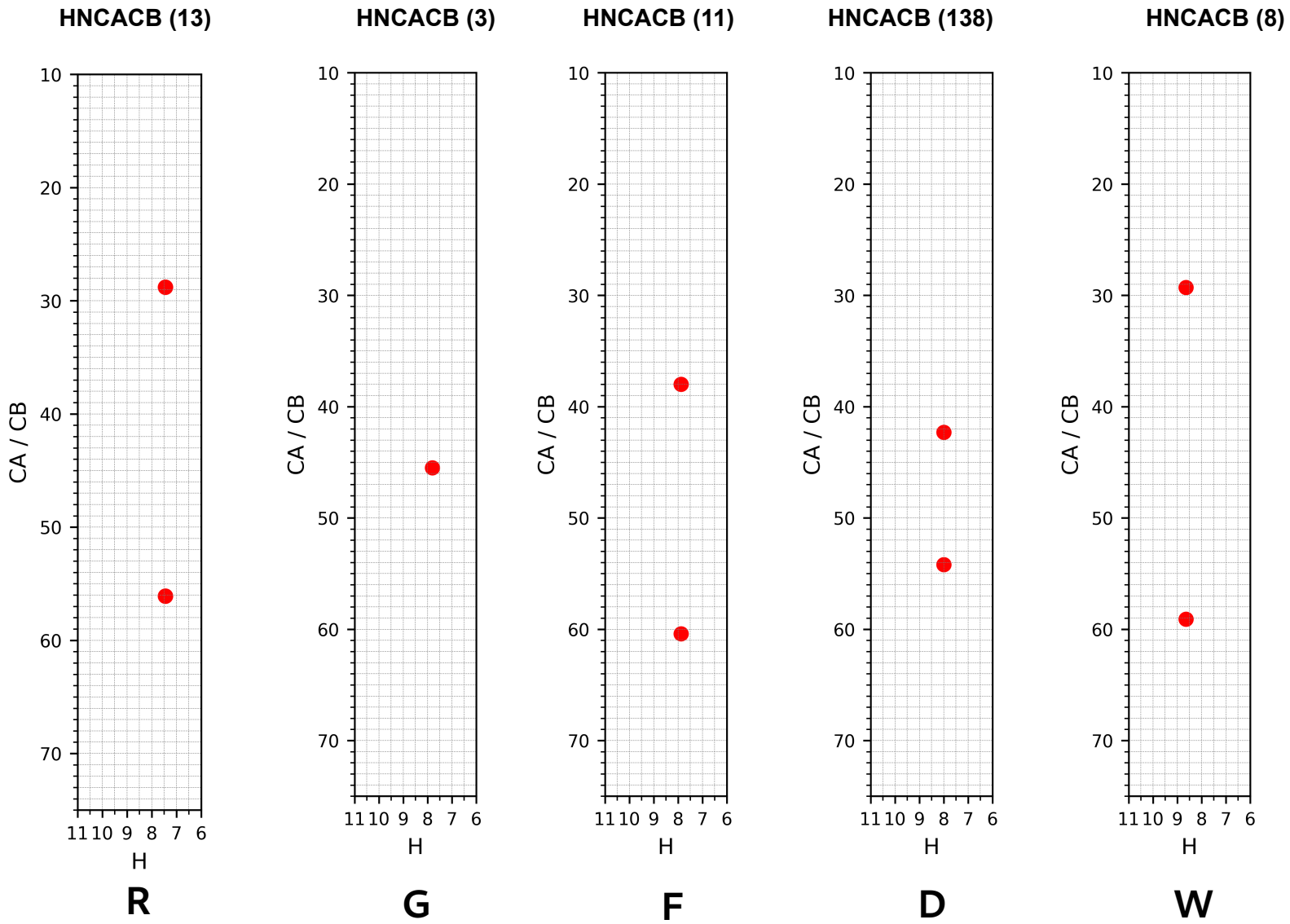
HNCACB (8)


CA / CB
H
Chemicky posun (ppm)
C alpha
C beta
Ala
Arg
Asn
Asp
Cys
Gln
Glu
Gly
His
Ile
Leu
Lys
Met
Phe
Pro
Ser
Thr
Trp
Tyr
Val
Aminokyselina

W, T, D

HNCACB (8)


CA / CB
H
W
Chemicky posun (ppm)
Aminokyselina
C alpha
C beta
Ala
Arg
Asn
Asp
Cys
Gln
Glu
Gly
His
Ile
Leu
Lys
Met
Phe
Pro
Ser
Thr
Trp
Tyr
Val


HNCACB (13)
HNCACB (3)
HNCACB (11)
HNCACB (138)
HNCACB (8)
CA / CB
H
10
20
30
40
50
60
70
11 10 9 8 7 6
R
G
F
D
W

Úkol č. 3 – najdi přiřazení v sekvenci proteinu

```
        10         20         30         40         50         60
MSHHWGYGKH NGPEHWHKDF PIAKGERQSP VDIDTHTAKY DPSLKPLSVS YDQATSLRIL

        70         80         90        100        110        120
NNGHAFNVEF DDSQDKAVLK GGPLDGTYRL IQFHFHWGSL DGQGSEHTVD KKKYAAELHL

       130        140        150        160        170        180
VHWNTKYGDF GKAVQQPDGL AVLGIFLKVG SAKPGLQKVV DVLDSIKTKG KSADFTNFDP

       190        200        210        220        230        240
RGLLPESLDY WTYPGSLTTP PLLECVTWIV LKEPISVSSE QVLKFRKLNF NGEGEPEELM

       250        260
VDNWRPAQPC RGFDWLKNRQ IKASFK
```

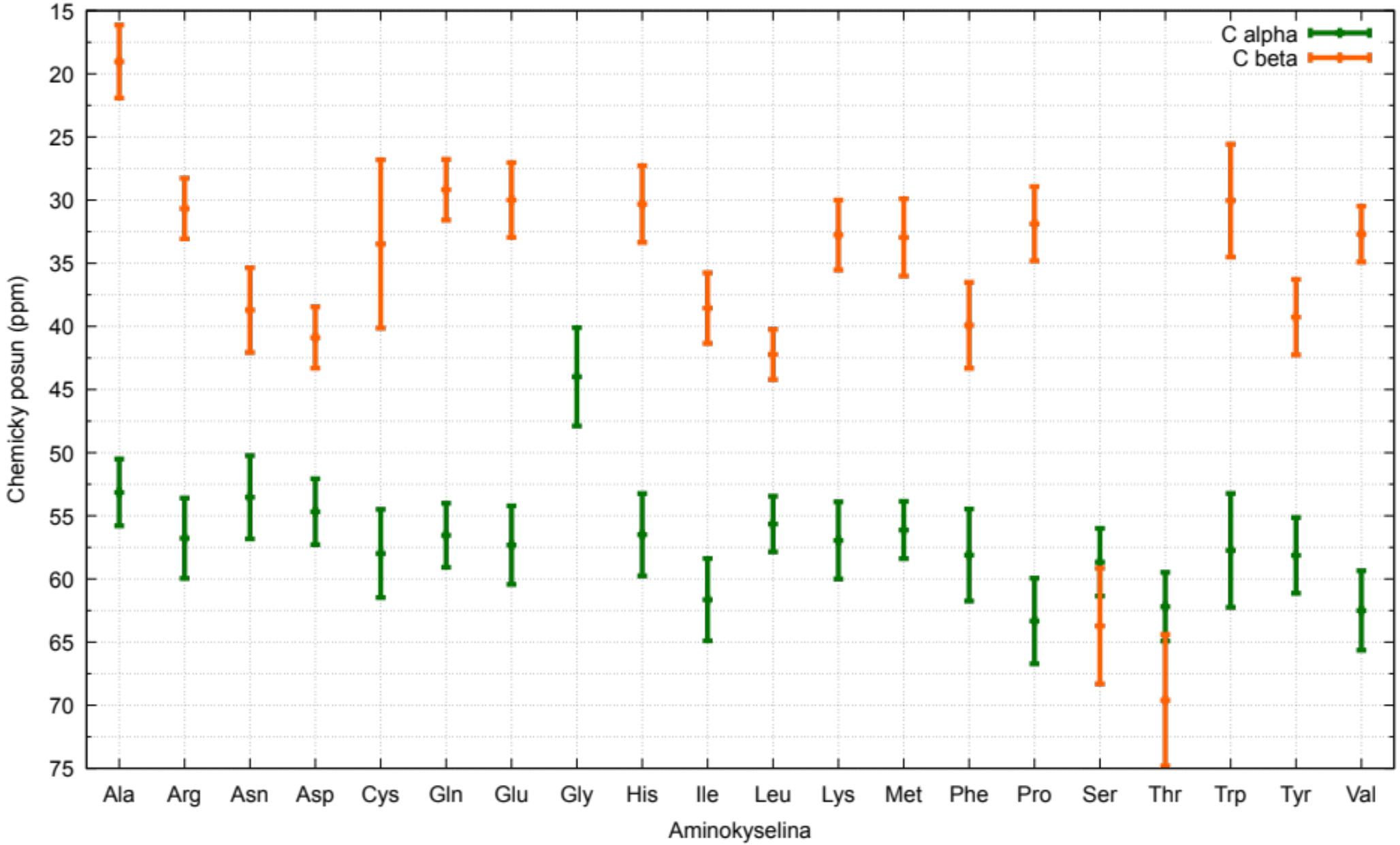
R G F D W

Úkol č. 3 – najdi přiřazení v sekvenci proteinu

```
        10         20         30         40         50         60
MSHHWGYGKH NGPEHWHKDF PIAKGERQSP VDIDTHTAKY DPSLKPLSVS YDQATSLRIL

        70         80         90        100        110        120
NNGHAFNVEF DDSQDKAVLK GGPLDGTYRL IQFHFHWGSL DGQGSEHTVD KKKYAAELHL

       130        140        150        160        170        180
VHWNTKYGDF GKAVQQPDGL AVLGIFLKVG SAKPGLQKVV DVLDSIKTKG KSADFTNFDP

       190        200        210        220        230        240
RGLLPESLDY WTYPGSLTTP PLLECVTWIV LKEPISVSSE QVLKFRKLNF NGEGEPEELM

       250        260
VDNWRPAQPC RGFDW KNRQ IKASFK
```

R G F D W

Typické chemické posuny Cα a Cβ aminokyselin

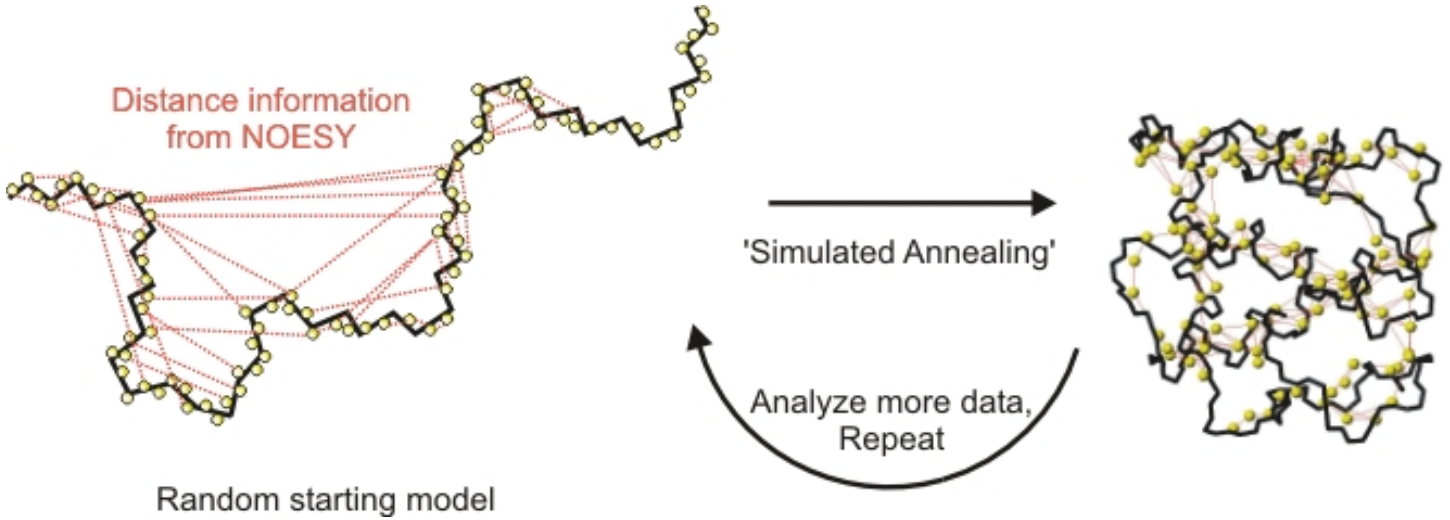


Struktura

- **sekvenční přiřazení** –interakce přes vazbu přes skalární J-coupling
- **určení vzdáleností mezi atomy ^{1}H** – interakce přes prostor NOESY
  - intenzita klesá s r^6 vzdálenosti
- při řešení struktury **molekulová dynamika** omezená experimentálními daty

Molekulární dynamika

- získané vzdálenosti z NOESY experimentu
- další experimentální data (torzní úhly z chemických posunů)
- simulované žíhání (zahřívání a ochlazení)
- opakujeme (např. 8x)
- vybereme struktury s nejnižší energií (20/100)



Výsledná struktura

- překryv několika (např. 10, 20) energeticky nejvýhodnějších struktur