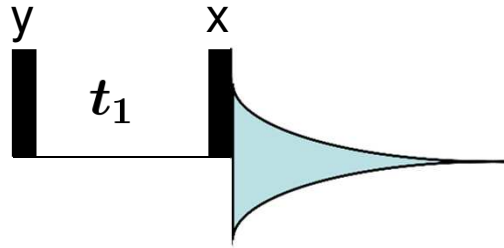


COSY



$$I_z \xrightarrow{90_y} I_x \xrightarrow{\text{chem. posuv}} I_x \cos \Omega_I t_1 + I_y \sin \Omega_I t_1 \xrightarrow{J \text{ vazba}}$$

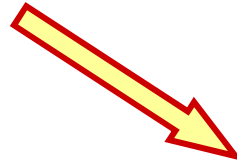
$$I_x \cos \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 + 2I_y S_z \cos \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1 + I_y \sin \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 - 2I_x S_z \sin \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1$$

$\xrightarrow{90_x}$

$$I_x \cos \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 - 2I_z S_y \cos \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1 + I_z \sin \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 + 2I_x S_y \sin \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1$$



$$I_x \frac{1}{2} [\cos(\Omega_I - \pi J)t_1 + \cos(\Omega_I + \pi J)t_1]$$



$$2I_z S_y \frac{1}{2} [\sin(\Omega_I - \pi J)t_1 - \sin(\Omega_I + \pi J)t_1]$$

F_2 : Ω_I *inphase dublet, disperzní*

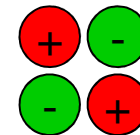
Ω_S *antiphase dublet, absorpční*

F_1 : Ω_I *inphase dublet, disperzní*

Ω_I *antiphase dublet, absorpční*

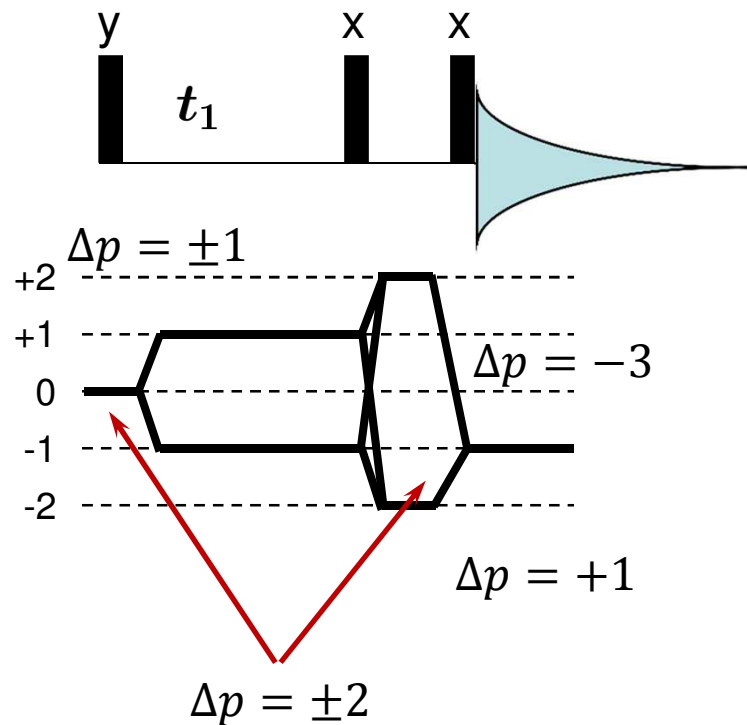
diagonální pík

krospík



podmínky měření a zpracování dat \Rightarrow ztráta rozlišení ve spektru

DQF-COSY

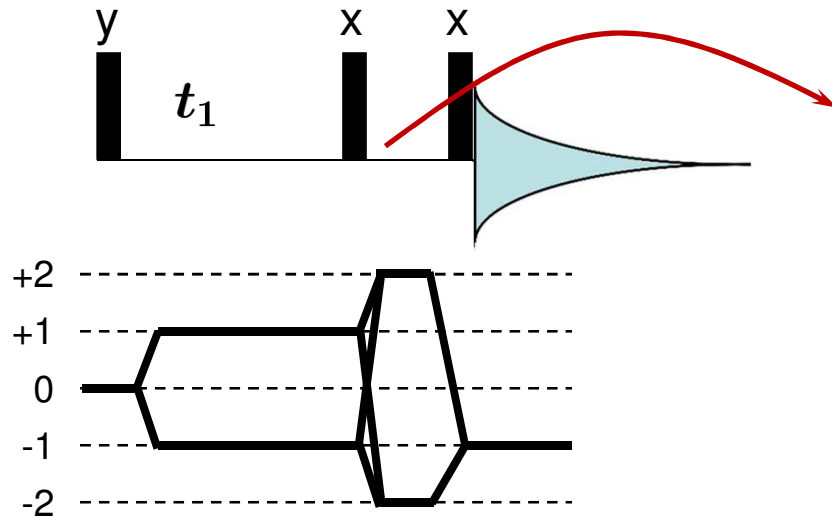


Pravidla fázových cyklů

1. Při změně fáze pulsu o ϕ získává koherenční cesta fázový posun $-\Delta p\phi$
2. Jestliže fázový cyklus používá kroky $360^\circ/N$, je spolu s cestou Δp vybrány i cesty s $\Delta p \pm nN$ ($n = 1, 2, \dots$)

step	phase of first two pulses	phase for $\Delta p = +2$	phase for $\Delta p = -2$	equivalent phase = rx. phase
1	0	0	0	0
2	90	-180	180	180
3	180	-360	360	0
4	270	-540	540	180

DQF-COSY



$$I_x \cos \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 - 2I_z S_y \cos \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1$$

$$p = \pm 1$$

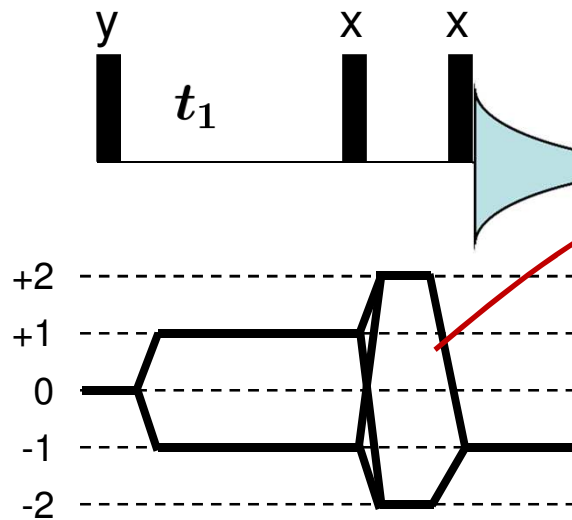
$$+I_z \sin \Omega_I t_1 \cos \pi J t_1 + 2I_x S_y \sin \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1$$

$$p = 0$$

$$p = 0 \text{ a } p = \pm 2$$

step	phase of first two pulses	phase for $\Delta p = 0$	phase for $\Delta p = \pm 1$	rx. phase
1	0	0	0	0
2	90	0	∓ 90	180
3	180	0	∓ 180	0
4	270	0	∓ 270	180

DQF-COSY



$$+ 2I_x S_y \sin \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1$$

~~$$p = 0 \text{ a } p = \pm 2$$~~

$$2I_x S_y = -\frac{i}{2} (I_+ S_+ - I_- S_- + I_- S_+ - I_+ S_-)$$

$$\frac{1}{2} (2I_y S_x + 2I_x S_y) \sin \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1$$

$$\xrightarrow{90_x} \frac{1}{2} (2I_z S_x + 2I_x S_z) \sin \Omega_I t_1 \sin \pi J t_1$$

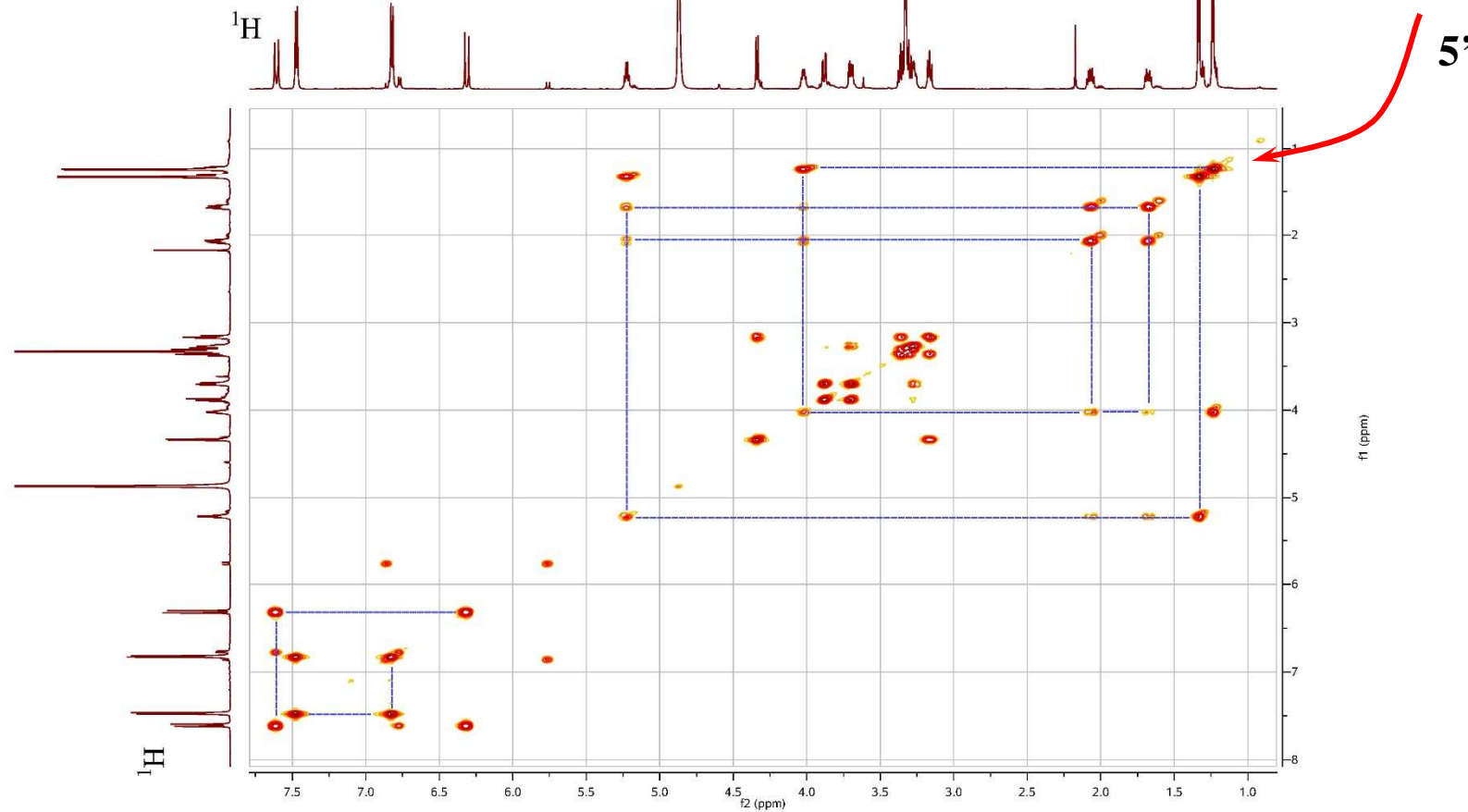
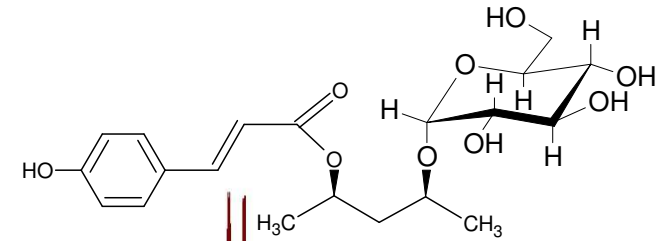
krospík

diagonální pík

Oba se stejnou fází

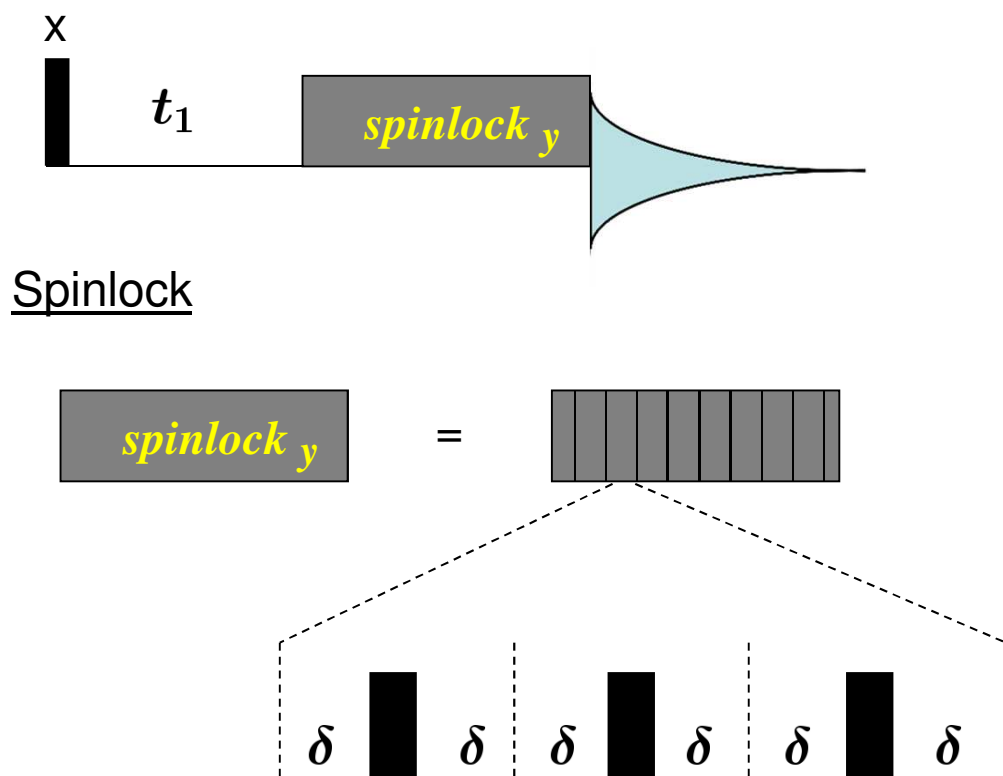
COSY

korelace vodíkových signálů po vazbách

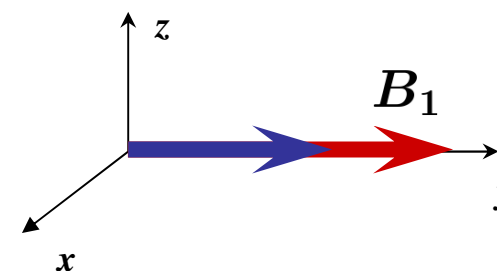


krospík = existuje J vazba mezi danými vodíky, vidíme jen „přímé sousedy“

TOCSY



- *chemický posuv se nevyvíjí*
- *J vazba zůstává aktivní*

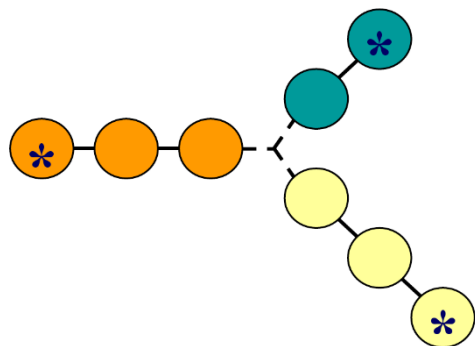


magnetizace „uzamčena“ v ose y

všechny spiny efektivně cítí stejné magnetické pole B_1 a mají vyrovnané energetické hladiny

polarizace se volně přelévá mezi **všemi** spiny spojenými J vazbou

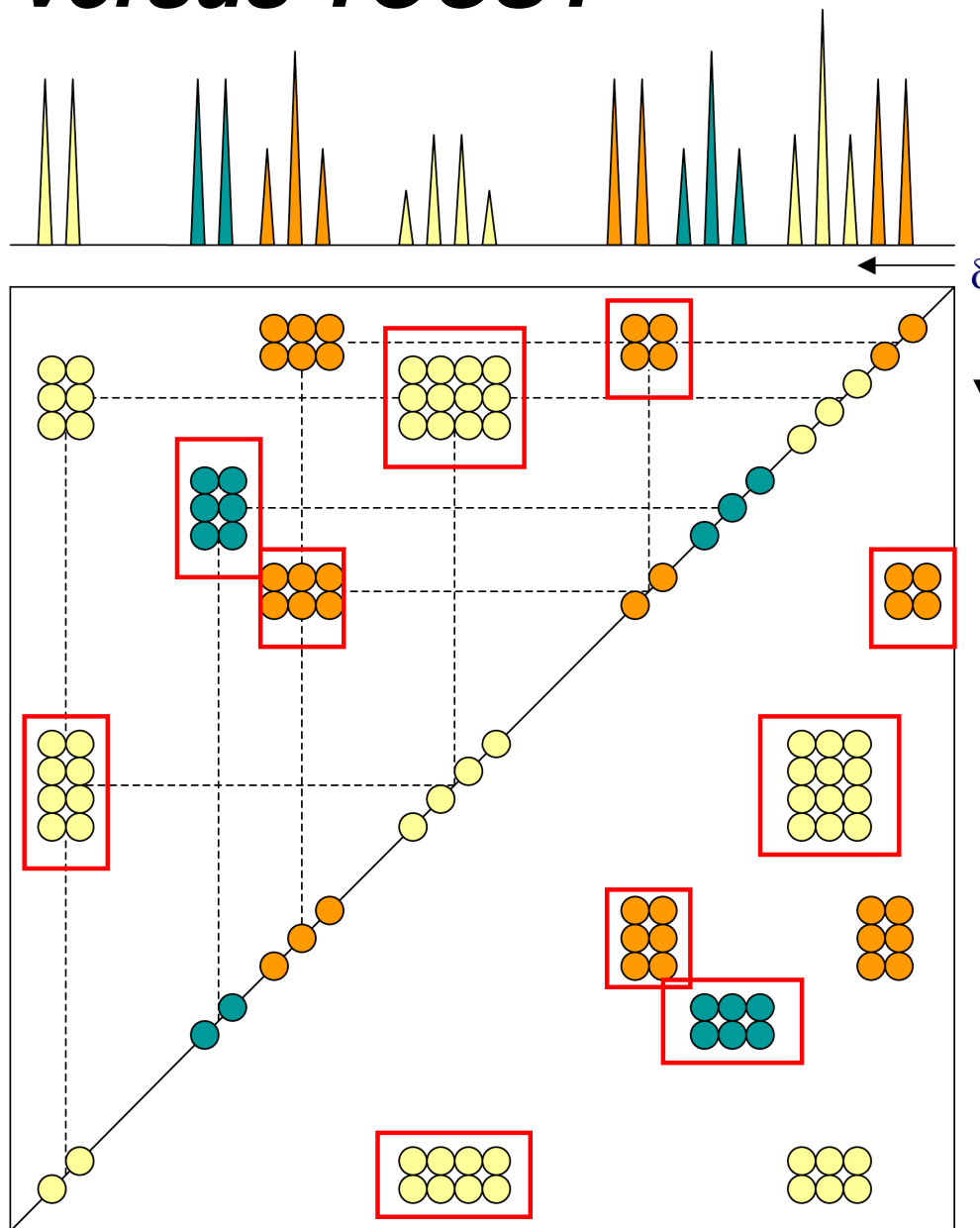
COSY versus TOCSY



identifikace spinových systémů

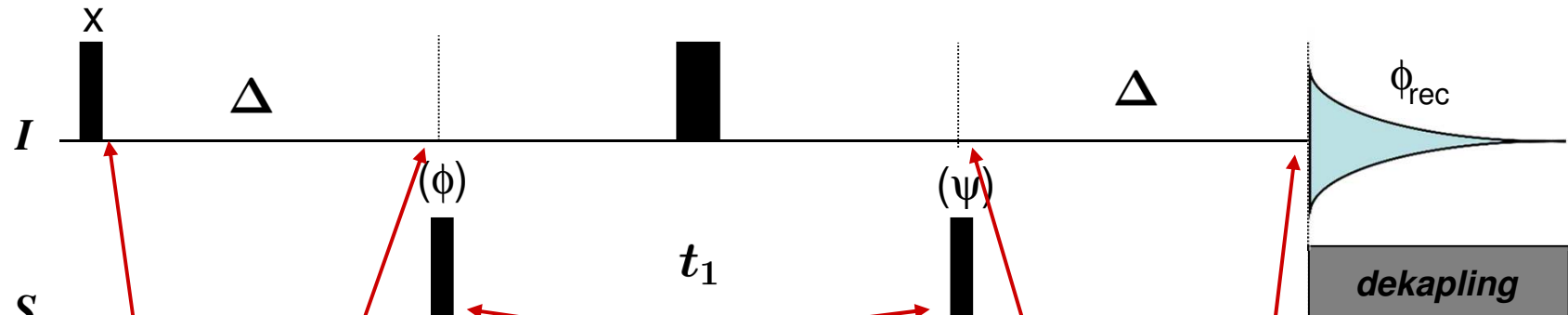
postranní řetězce

krospík = vodík patří do daného spinového systému, nepřerušené sítě J vazeb

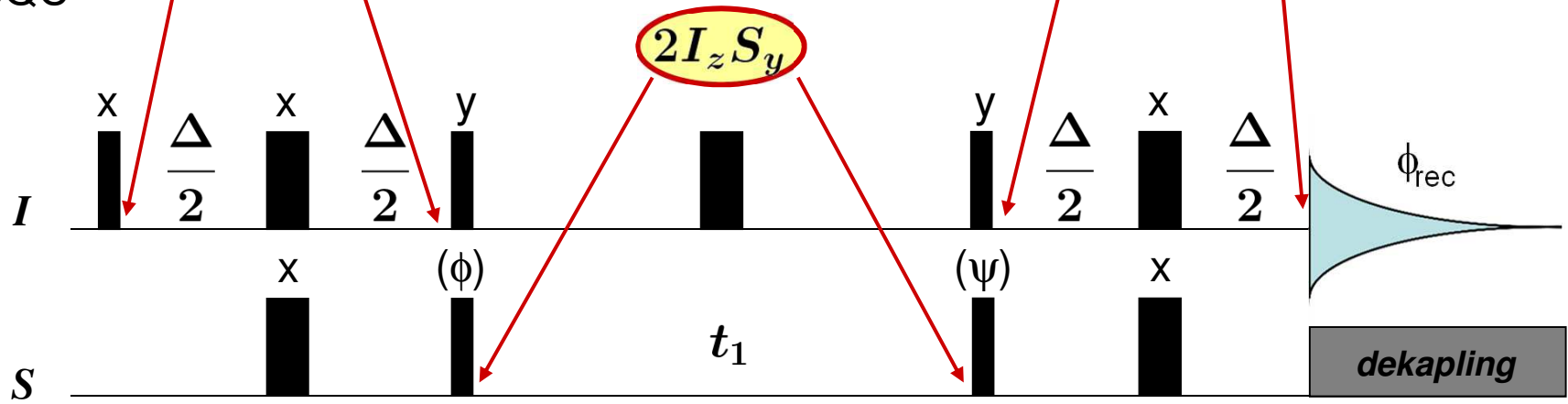


Heteronukleární korelace

HMQC

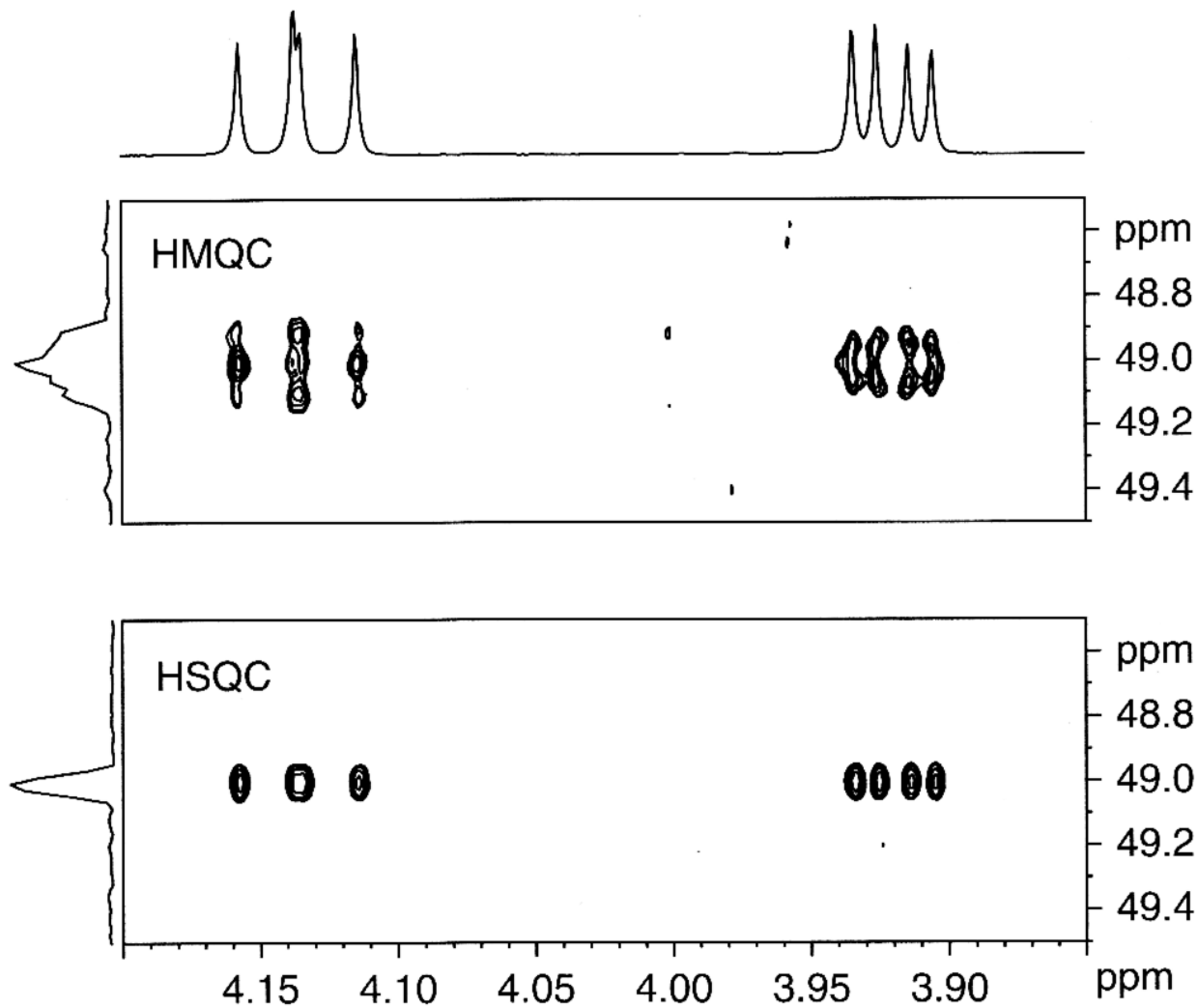


HSQC



$$\phi = X, -X; \psi = X, X, -X, -X; \phi_{\text{rec}} = X, -X, -X, X$$

HMQC versus HSQC



*vývoj v nepřímé doméně
ovlivněn J vazbami
mezi vodíky*

NMR biomolekul

- vysoce selektivní odezva, rozlišení jednotlivých atomů
- široký rozsah fyzikálně-chemických vlastností
- molekuly v roztoku, blíže fyziologickému prostředí

peptidy a proteiny

nukleové kyseliny

oligosacharidy

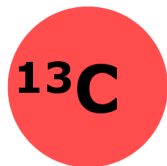
Dostupné informace

- identifikace substrátu
- prostorová struktura molekuly
- dynamické chování molekuly
- komplexační rovnováhy
- identifikace místa interakce ligand - substrát
- struktura komplexu
- ...

Měřená jádra



- ✓ vysoké přirozené zastoupení (99.98%)
- ✓ vysoká citlivost (1.00)
- ✓ malá disperze chemických posunů NMR signálů (~15.0 ppm)



- ✓ velká disperze chemických posunů NMR signálů (~200.0 ppm)
- ✓ nízké přirozené zastoupení (1.108%), možné uměle navýšit až na 100%
- ✓ nízká citlivost (1.76×10^{-4}), po 100%ním izotopovém obohacení (1.59×10^{-2})



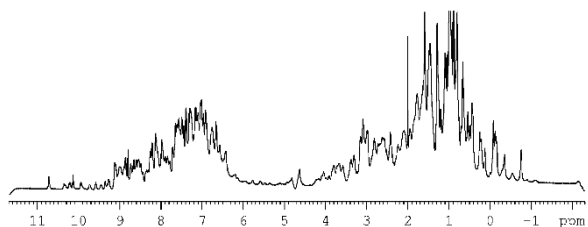
- ✓ střední disperze chemických posunů NMR signálů (~30.0 ppm) (oproti ^{13}C nezávislost na typu aminokyseliny)
- ✓ nízké přirozené zastoupení (0.37%), možné uměle navýšit až na 100%
- ✓ velmi nízká citlivost (3.85×10^{-6}), po 100%ním izotopovém obohacení (1.04×10^{-3})

Řešení prostorové struktury

NMR vzorek
(izotopové obohacení)



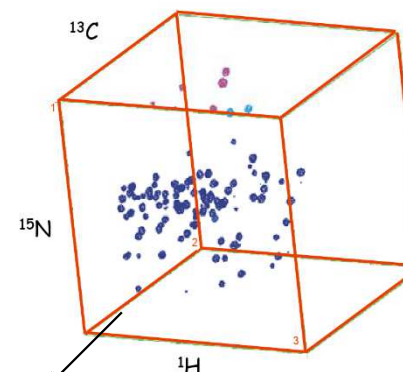
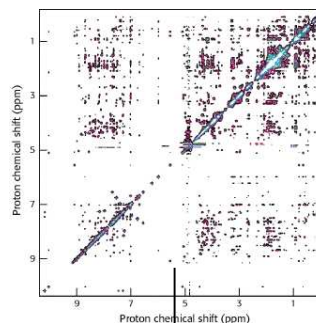
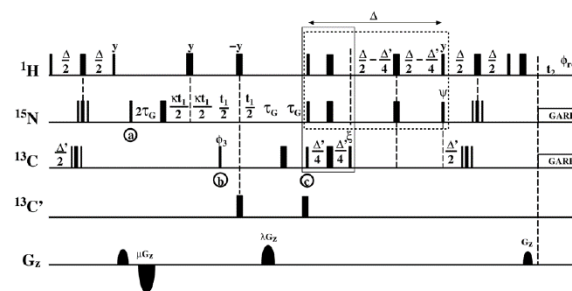
NMR spektra



NMR spektrometr



pulsní sekvence



obecné informace o molekule
(primární struktura,
koval. vazby, ...)

extrahování experimentálních dat

zpracování všech informací
a predikce struktury



validace konečného
souboru struktur

Příprava vzorku proteinu

Neznačený vzorek o příslušné koncentraci

- *kontrola správného sbalení proteinu*
- *kontrola dostatečně vysoké koncentrace*
- *sledování dlouhodobé stability*

^{15}N obohacený vzorek

- *kontrola čistoty proteinu*
- *kontrola správného sbalení proteinu*
- *kontrola dostatečně vysoké koncentrace*
- *některé komplexační studie (např. titrace ligandem)*

$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$) obohacený vzorek

- *strukturní studie*

Koncentrace a objem 0.5 – 1.0 mM / 0.1 – 0.5 mM
 250 – 500 μl

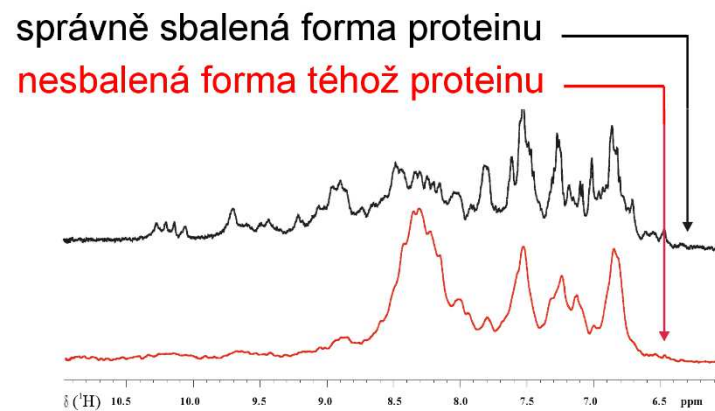
Expres proteinů

- v minimálním médiu ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, $^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$ – jediný zdroj dusíku, ^{13}C -glukoza, ^{13}C -glycerol – jediný zdroj uhlíku)
- izotopově obohacené růstové médium



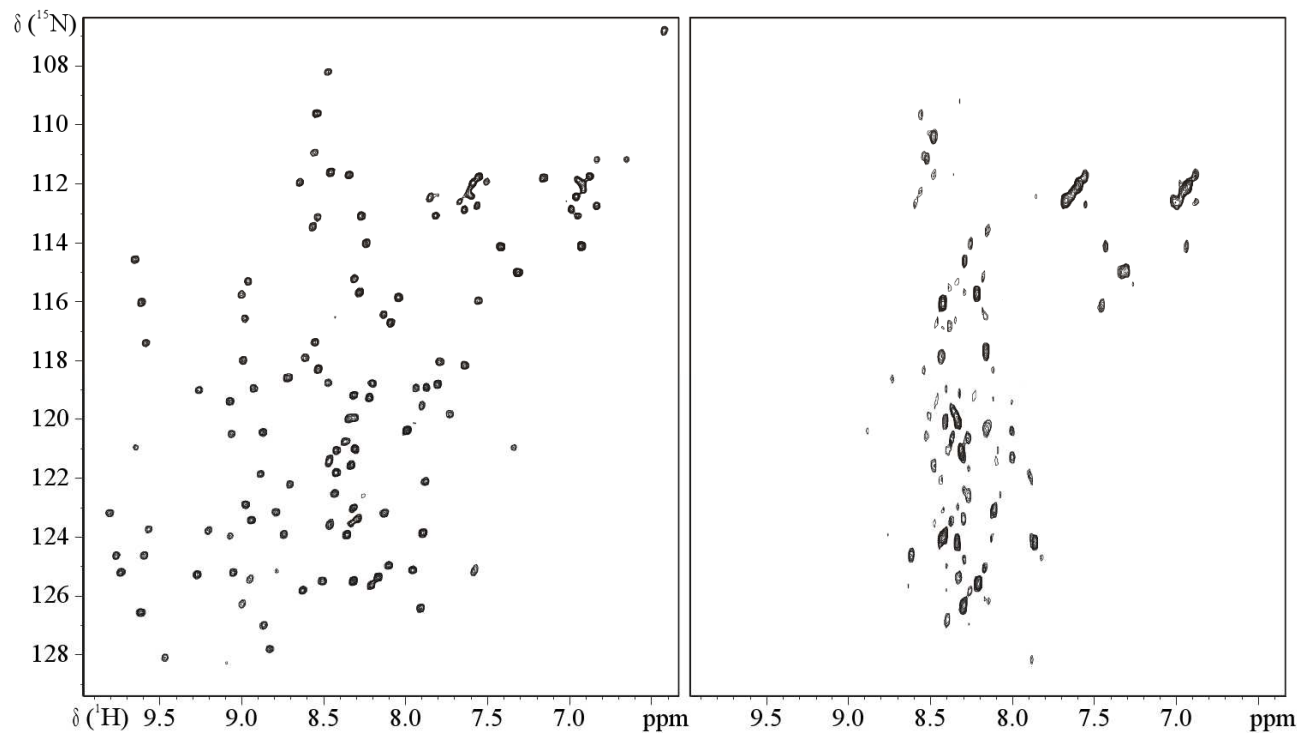
Kontrola správného sbalení proteinu

^1H spektrum



^{15}N - ^1H korelace, HSQC

čerstvý vzorek



vzorek po 5 dnech

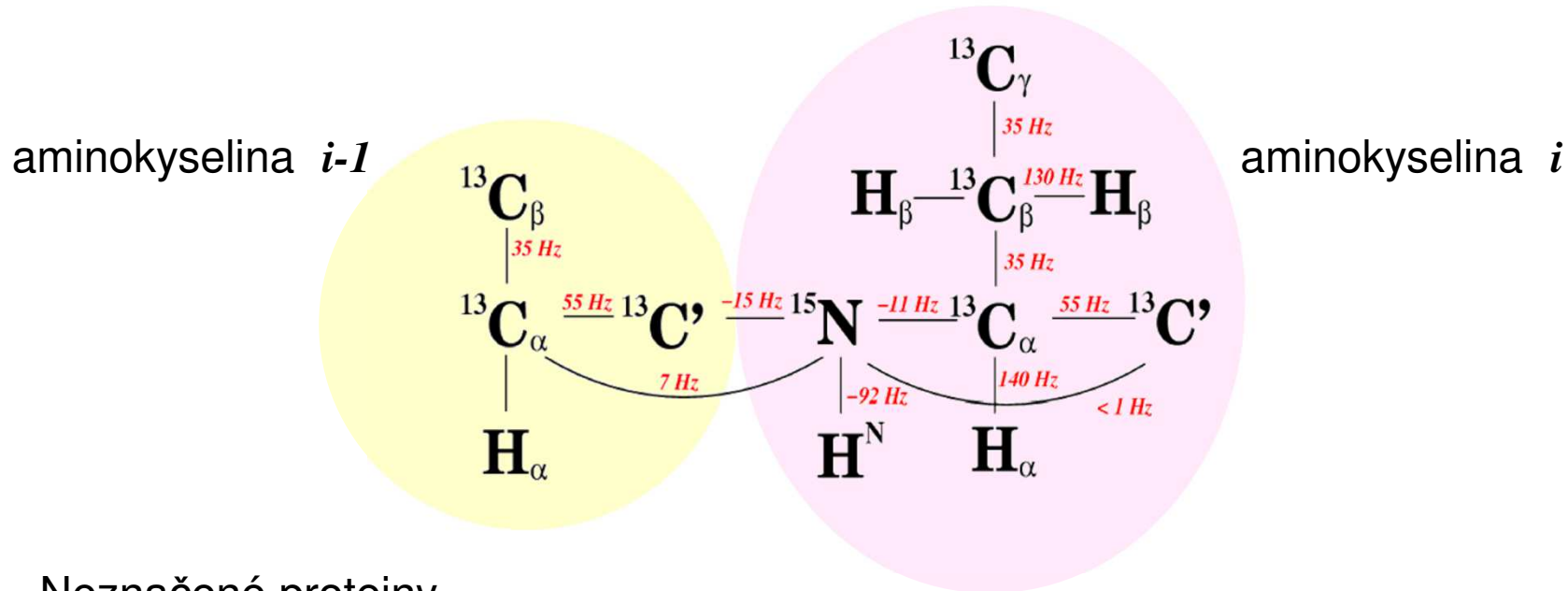
(R. Hrabal)

Další požadavky na vzorek

vzorek musí zůstat aktivní a nedenaturovaný po celou dobu NMR experimentů

rozpouštědlo	H ₂ O
pH	kompromis mezi minimalizací chemické výměny labilních vodíků s vodou a optimem pro studovaný protein (4-7)
pufr	fosfátový pufr neobsahuje žádné vodíky acetátový pufr nutno připravit deuterovaný
teplota	podle požadavků studovaného materiálu (5 – 40°C)
aditiva	nutno připravit deuterovaná, vyvarovat se vysokých koncentrací, omezit soli
koncentrace	0.1 – 1.0 mM vzorek nesmí podléhat agregaci, koagulaci, sebezničení,...
stabilita	alespoň několik týdnů (1 týden a opakovaná příprava)

Přiřazování signálů proteinu



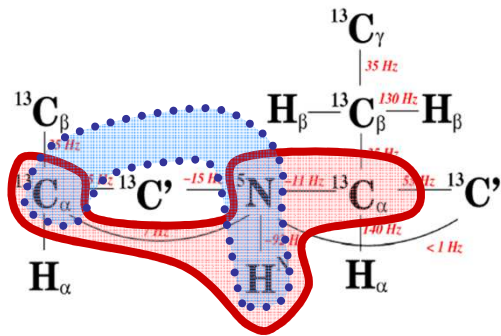
Neznačené proteiny

- pouze ^1H experimenty (COSY, TOCSY, NOESY)
- pouze malé proteiny, pracné

^{13}C a ^{15}N obohacené proteiny

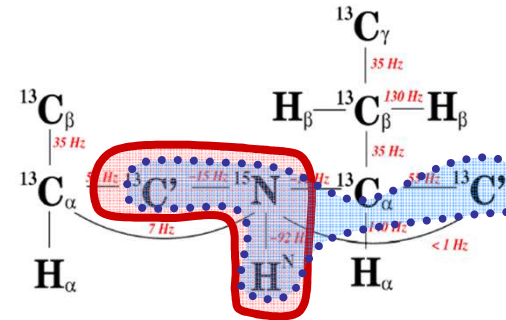
- série 3D experimentů (HNCA, HN(CO)CA, CBCANH,...)
- názvy podle korelovaných jader, přenos polarizace *out-and-back*, *out-and-stay*
- větší molekuly, snadněji interpretovatelná spektra

Strategie založené na J-vazbách



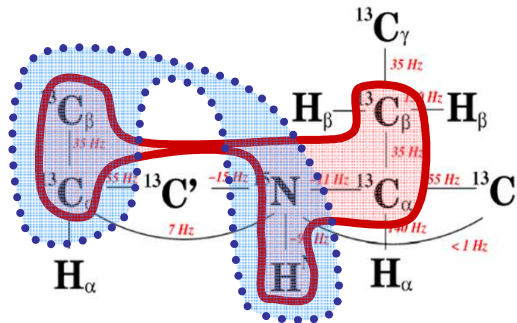
HNCA

HN(CO)CA



HNCO

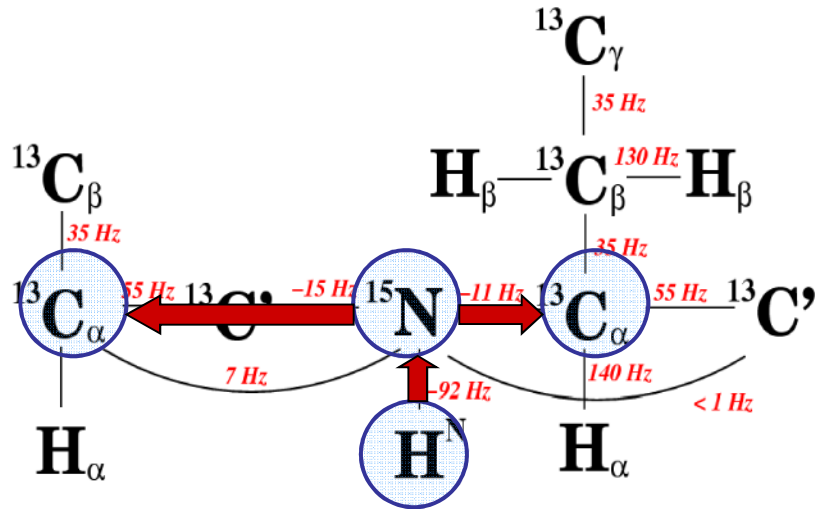
HN(CA)CO



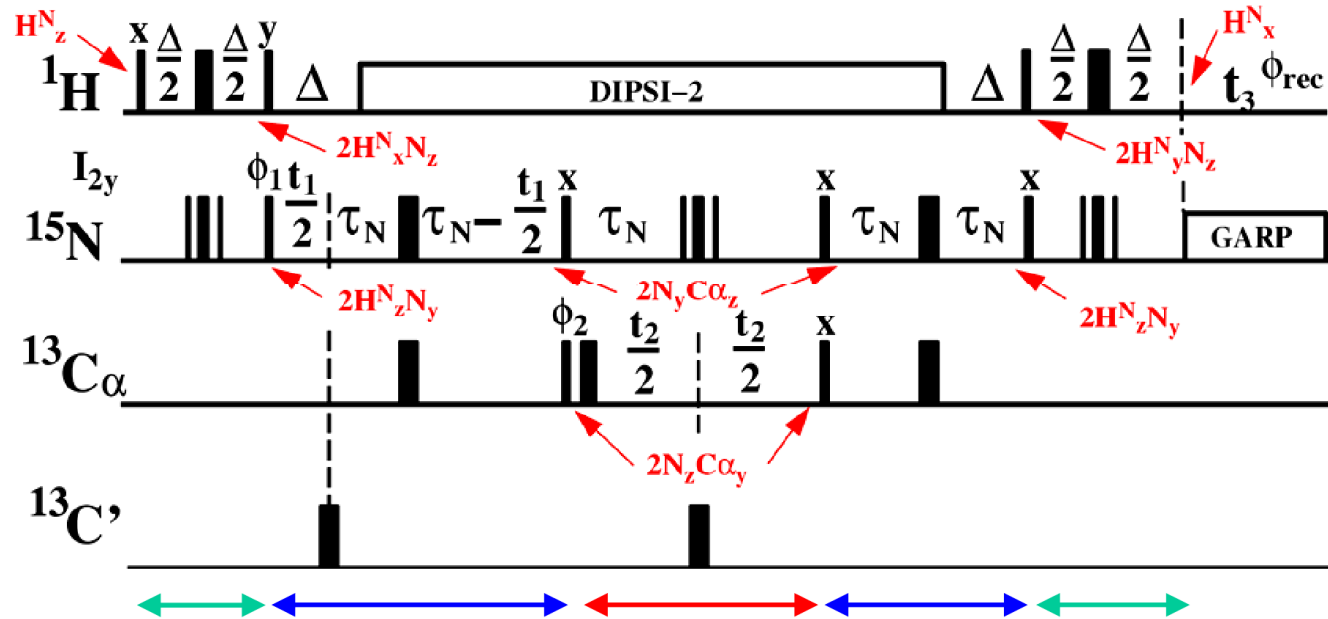
CBCANH / HNCACB

CBCA(CO)NH

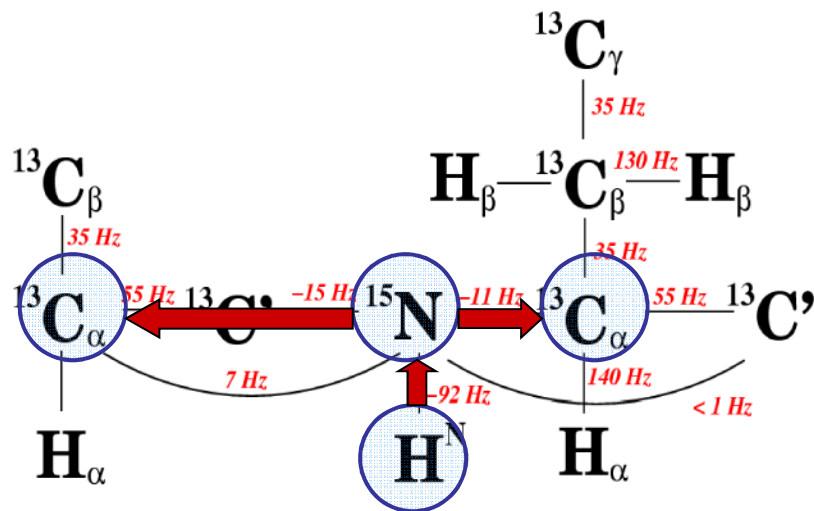
HNCA experiment



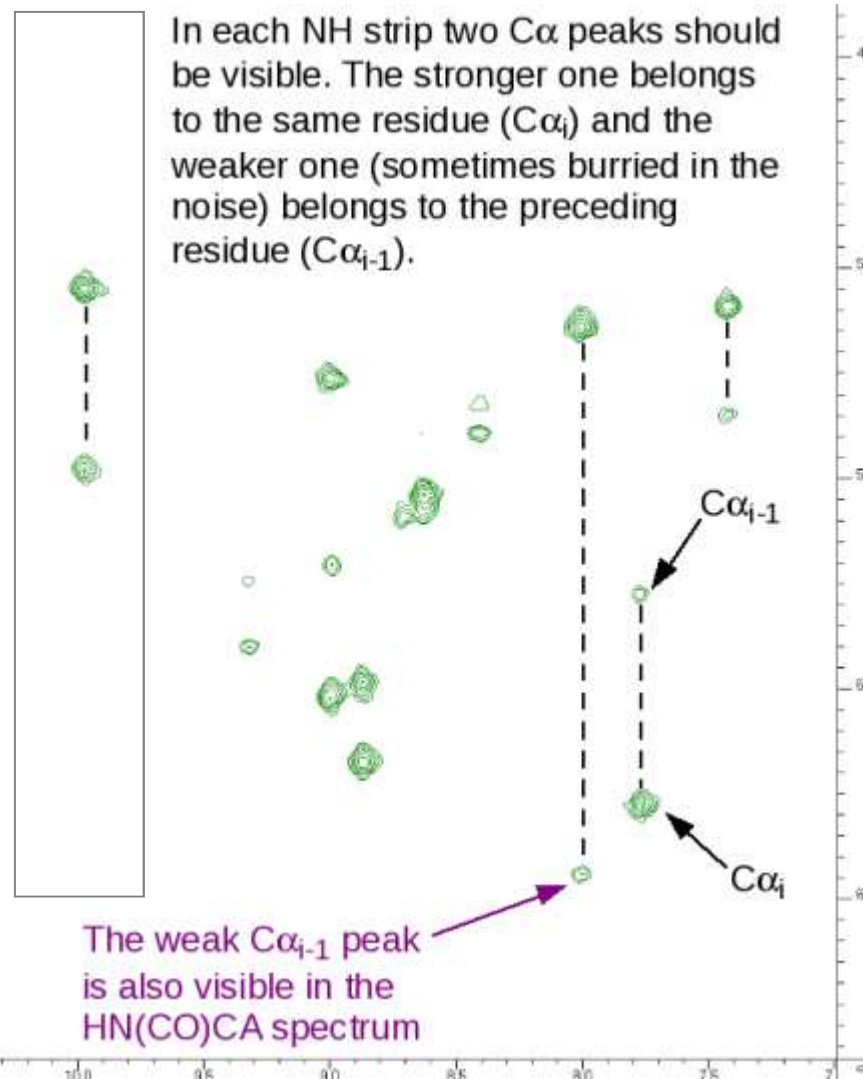
out-and-back
 $\text{H}^N \rightarrow \text{N}(t_1) \rightarrow \text{C}\alpha(t_2) \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{H}^N(t_3)$



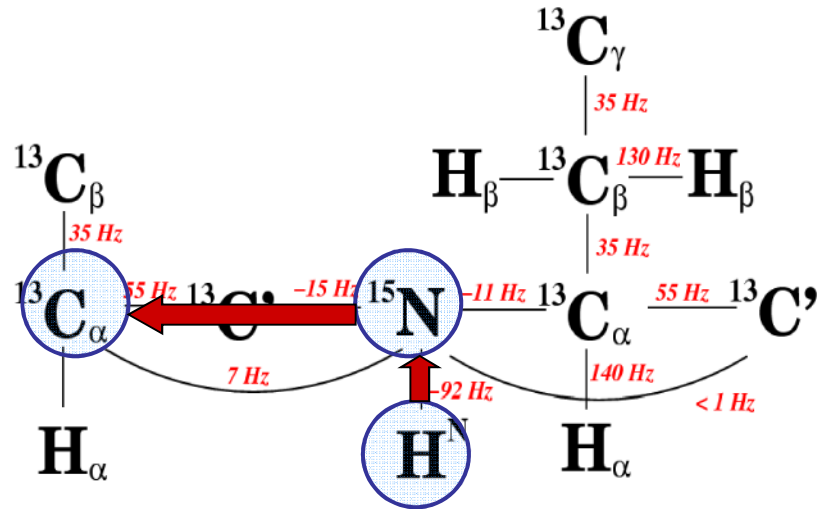
HNCA experiment



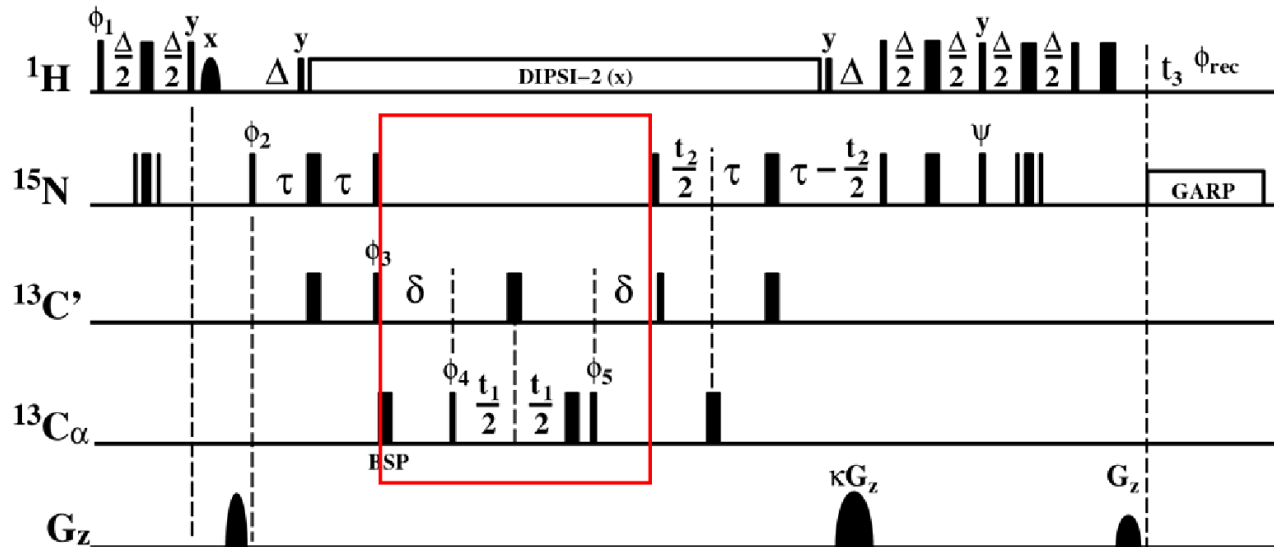
krospík na vlastní
a předchozí reziduum



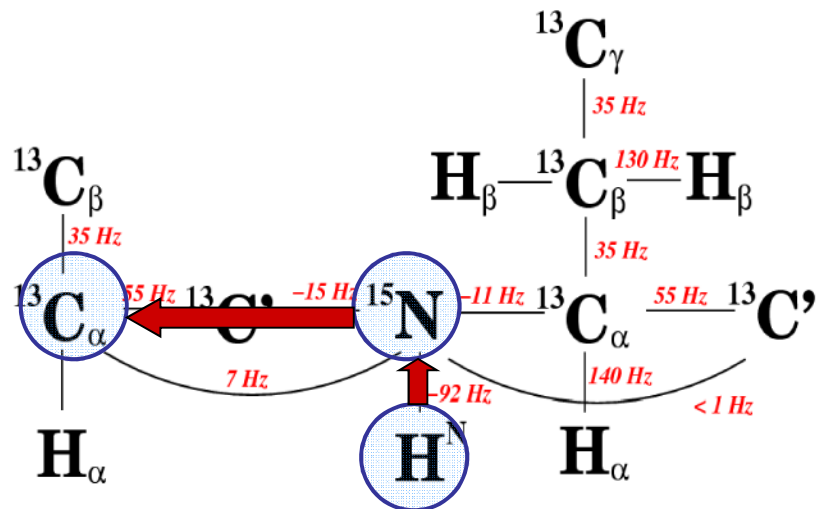
HN(CO)CA experiment



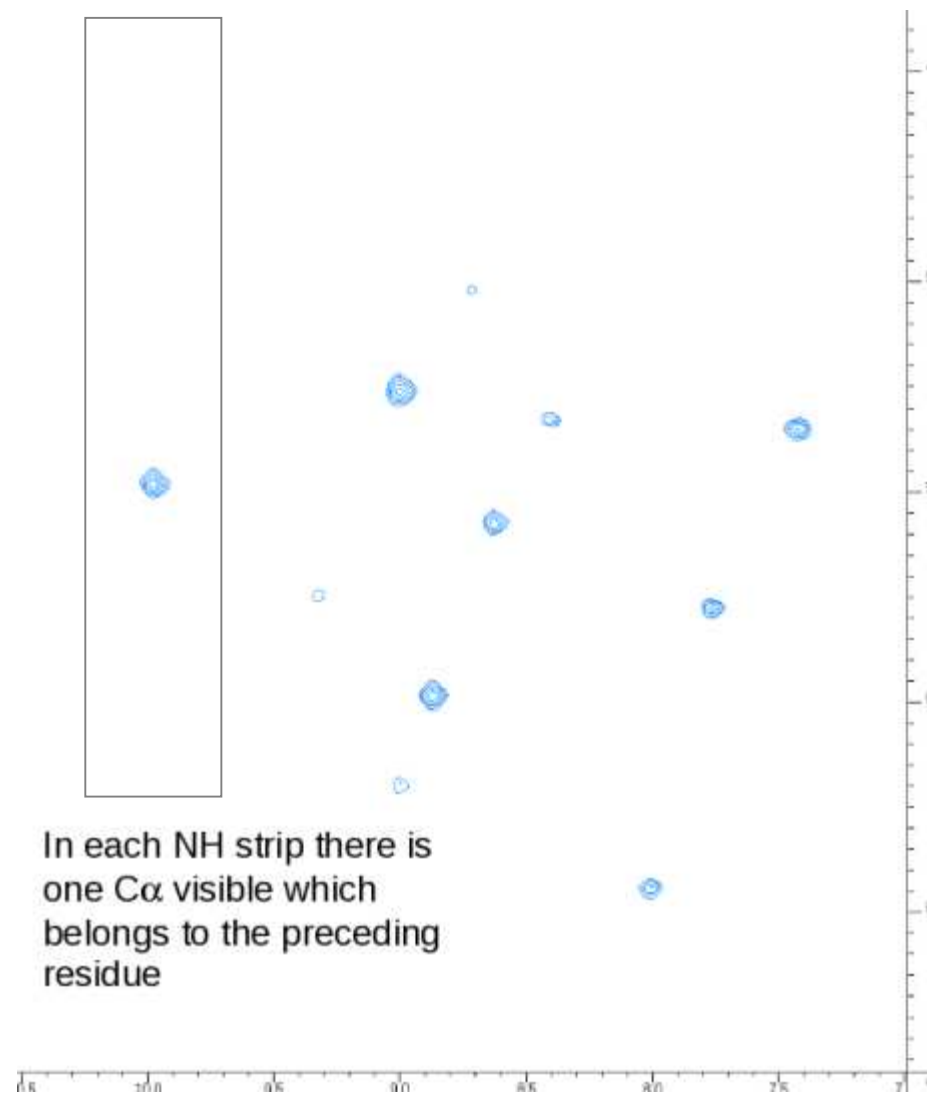
out-and-back
 $\text{H}^{\text{N}} \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{C}' \rightarrow \text{C}\alpha(t_1) \rightarrow$
 $\rightarrow \text{C}' \rightarrow \text{N}(t_2) \rightarrow \text{H}^{\text{N}}(t_3)$



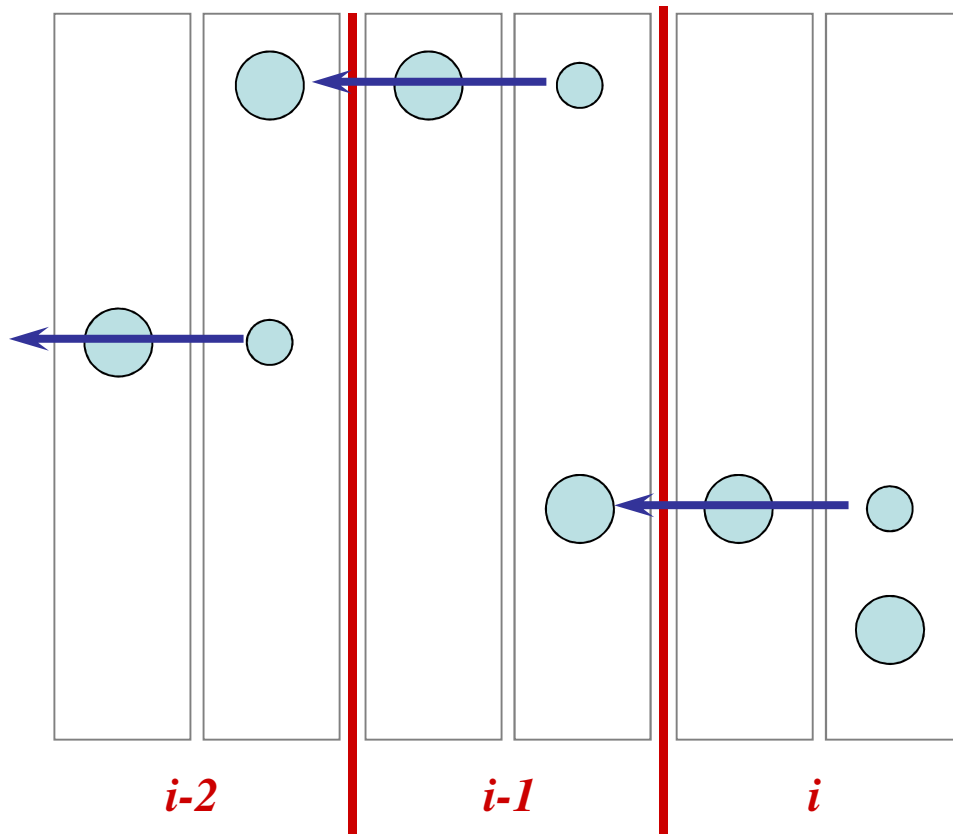
HN(CO)CA experiment



krospík pouze
na předchozí reziduum

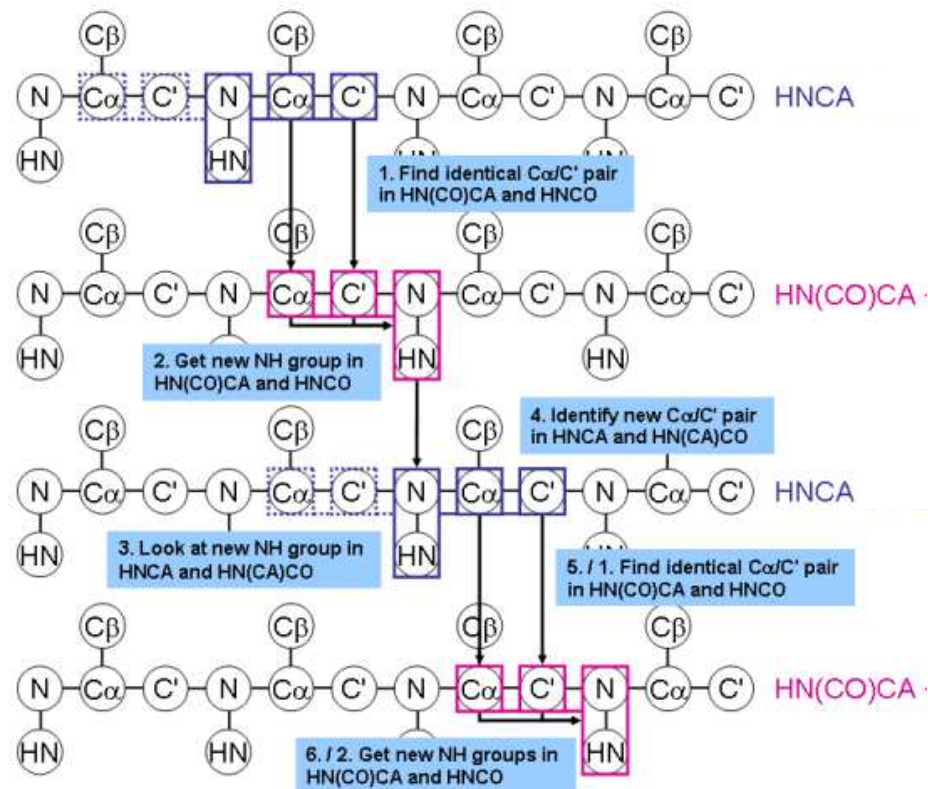


Postup přiřazení signálů páteře

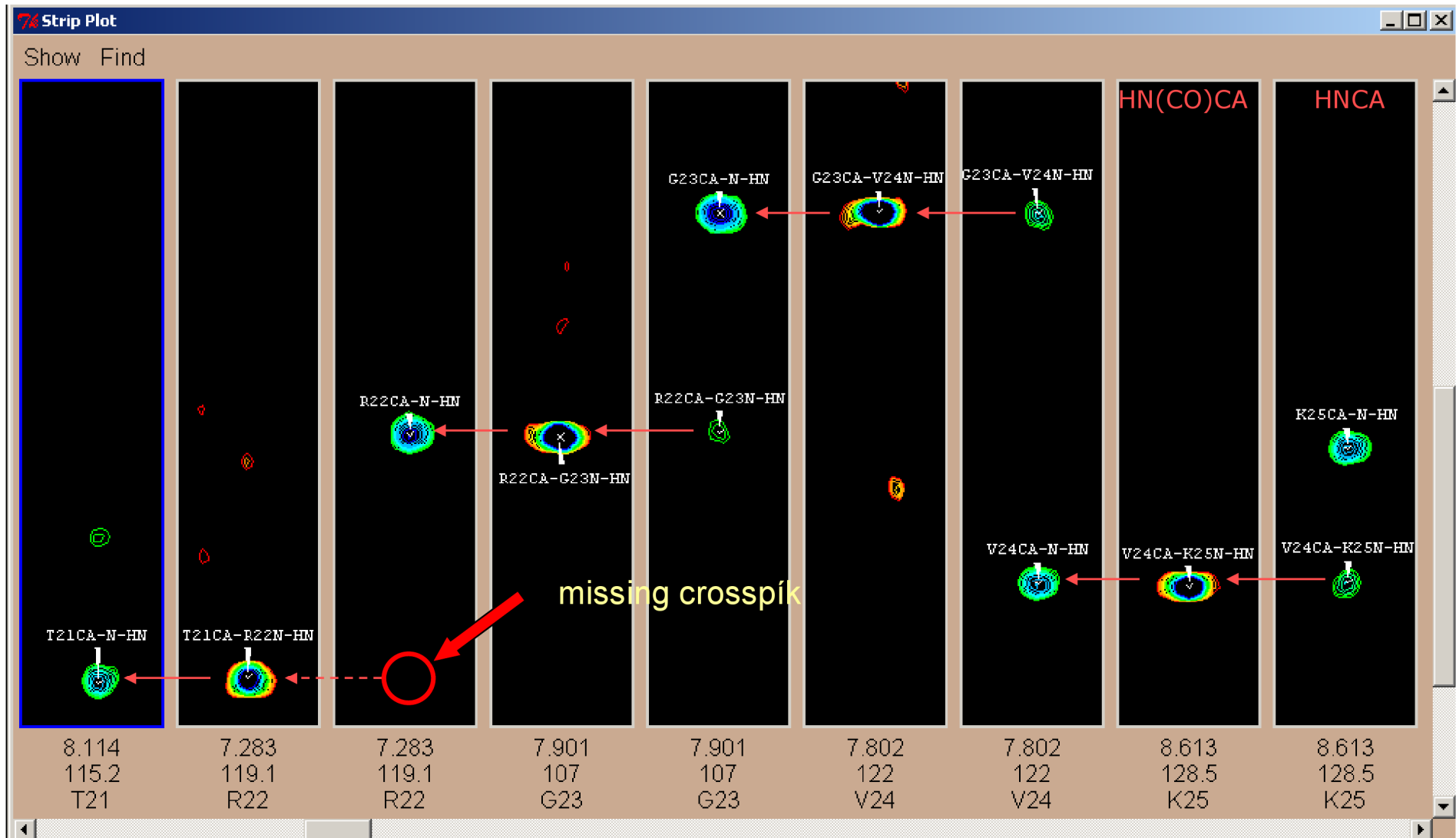


Začátek:

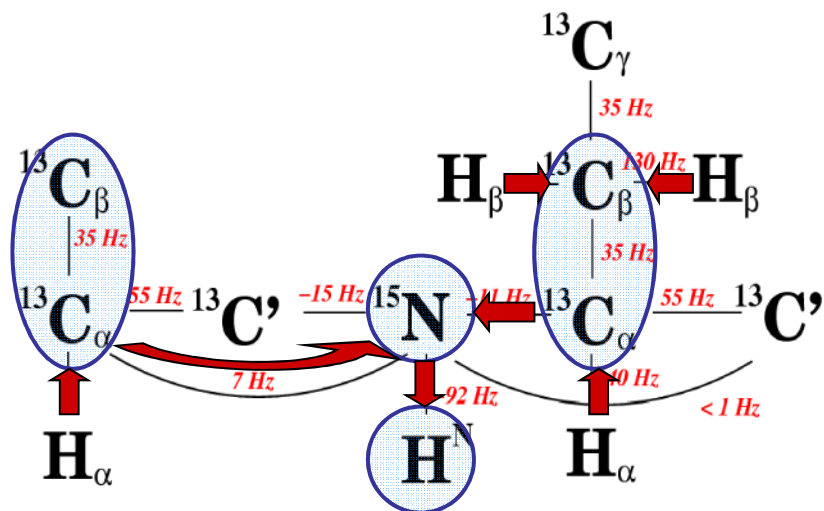
N-H souřadnice z $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC



Postup přiřazení signálů páteře



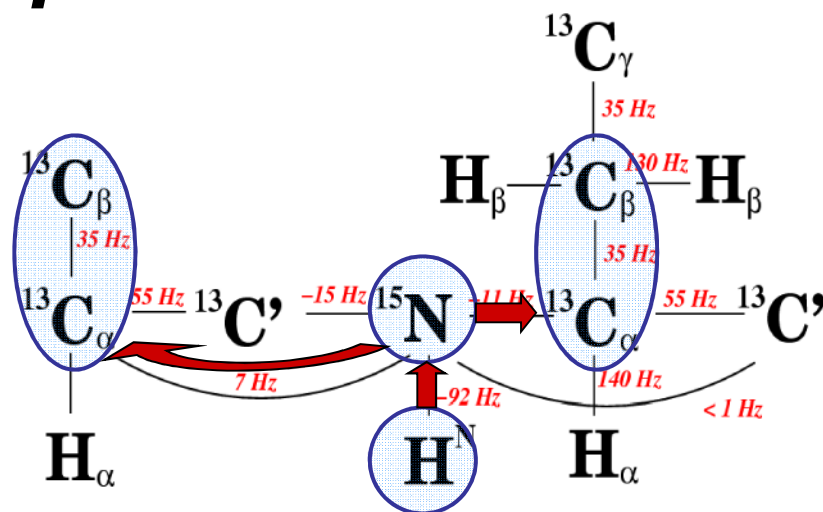
CBCANH experiment



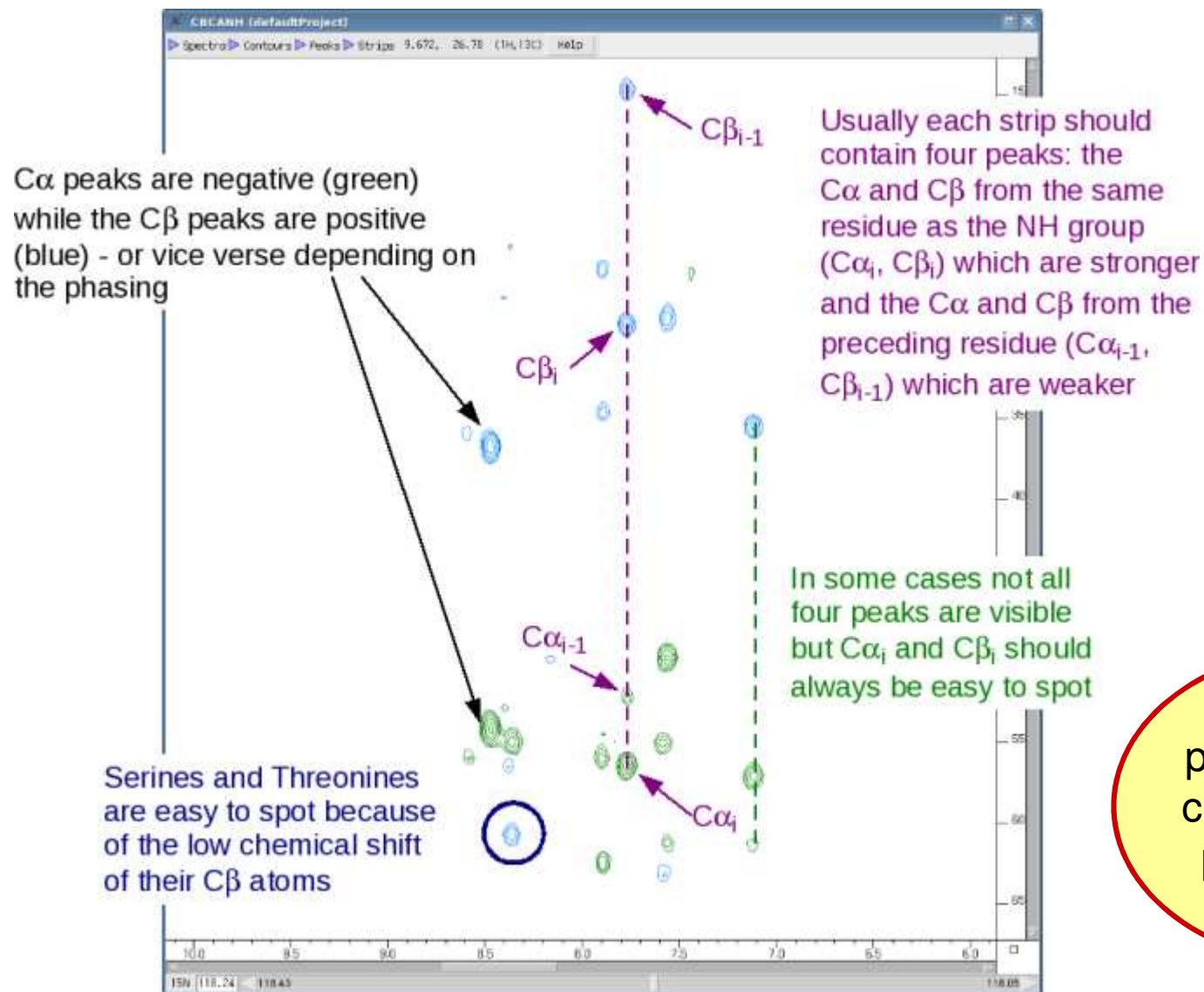
out-and-stay
 $\text{H}_{\alpha,\beta} \rightarrow \text{C}_{\alpha,\beta} (t_1) \rightarrow \text{N}(t_2) \rightarrow \text{H}^{\text{N}}(t_3)$

HNCACB experiment

out-and-back
 $\text{H}^{\text{N}} \rightarrow \text{N} \rightarrow \text{C}_{\alpha,\beta} (t_1) \rightarrow \text{N}(t_2) \rightarrow \text{H}^{\text{N}}(t_3)$

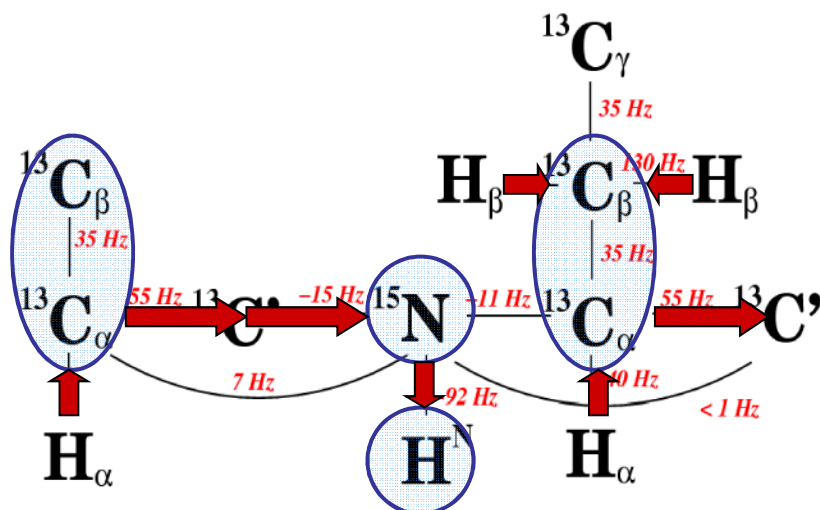


CBCANH / HNCACB



pozice $C\beta$ bývá charakteristická pro danou AA

CBCA(CO)NH experiment



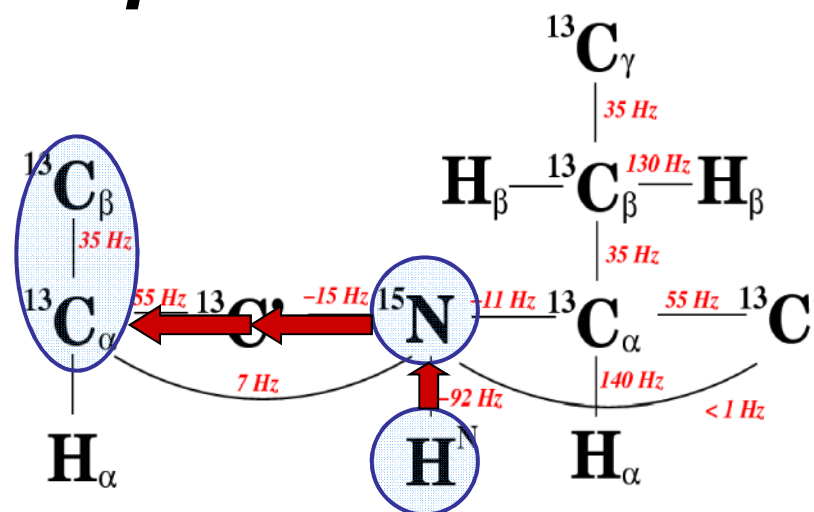
out-and-stay

$H_{\alpha,\beta} \rightarrow C_{\alpha,\beta} (t_1) \rightarrow C' \rightarrow N(t_2) \rightarrow H^N(t_3)$

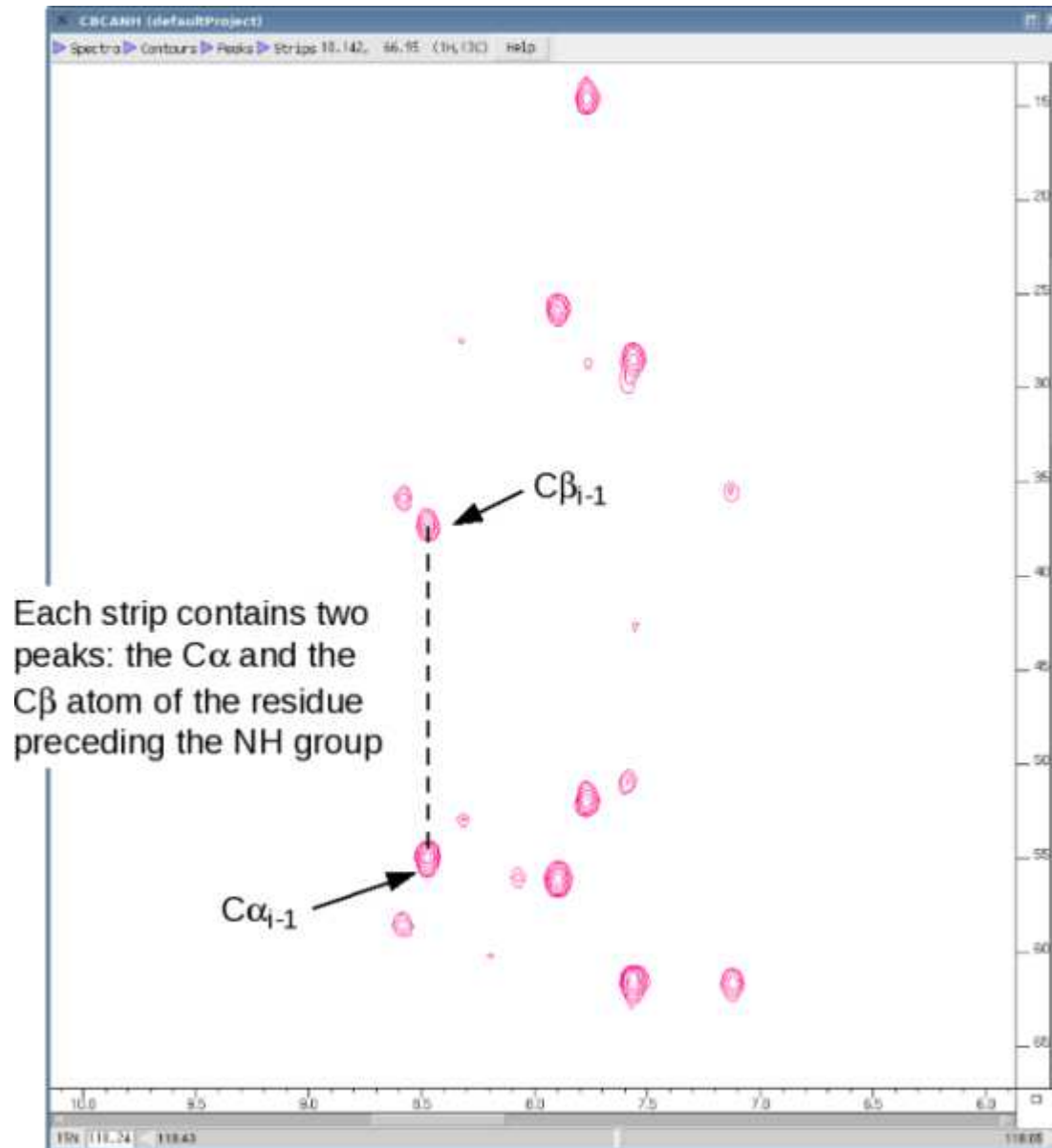
HN(CO)CACB experiment

out-and-back

$H^N \rightarrow N \rightarrow C' \rightarrow C_{\alpha,\beta} (t_1) \rightarrow$
 $\rightarrow C' \rightarrow N(t_2) \rightarrow H^N(t_3)$

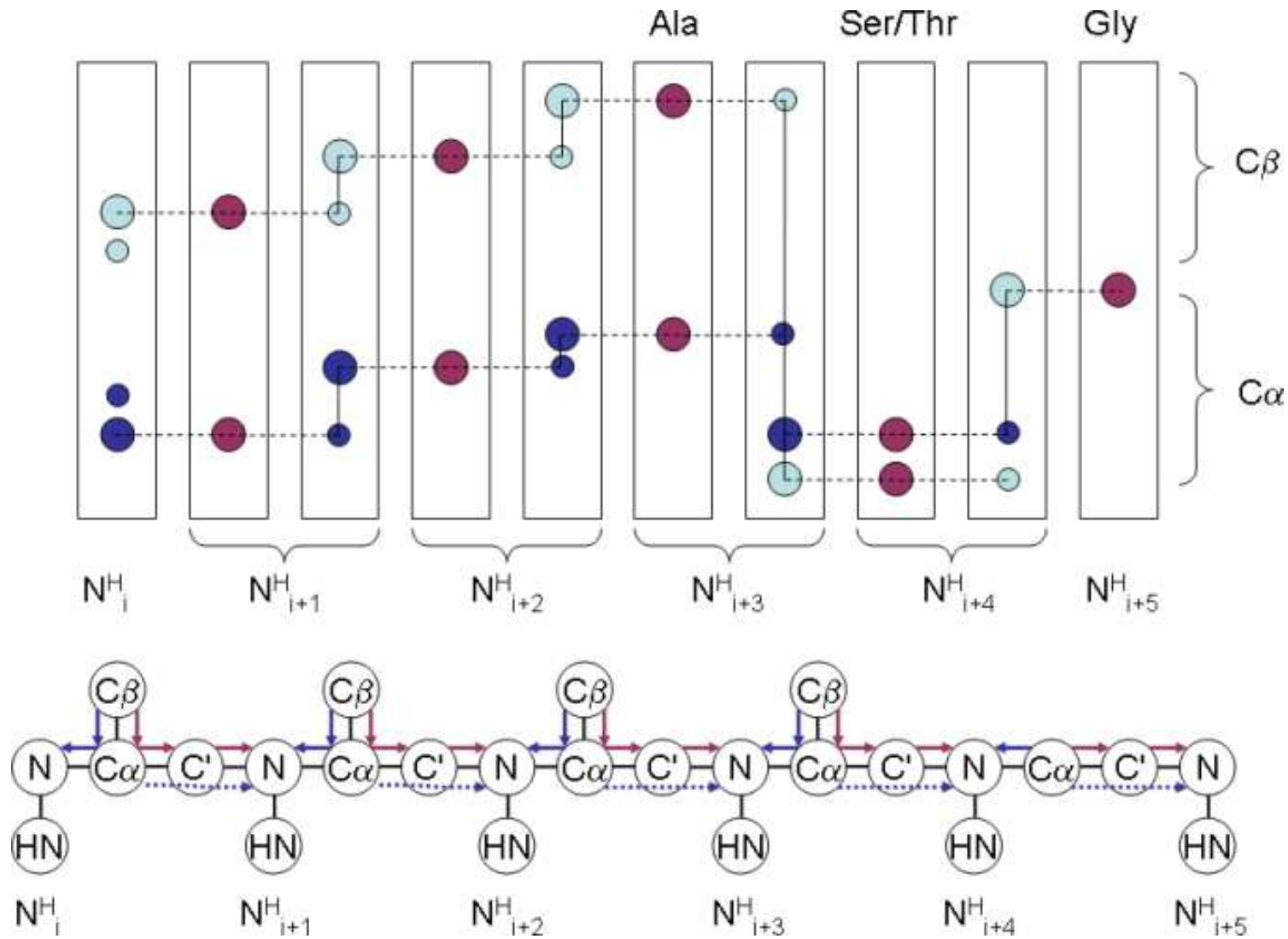


CBCA(CO)NH / HN(CO)CACB

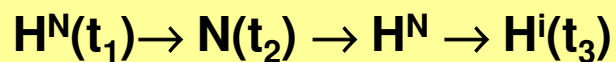
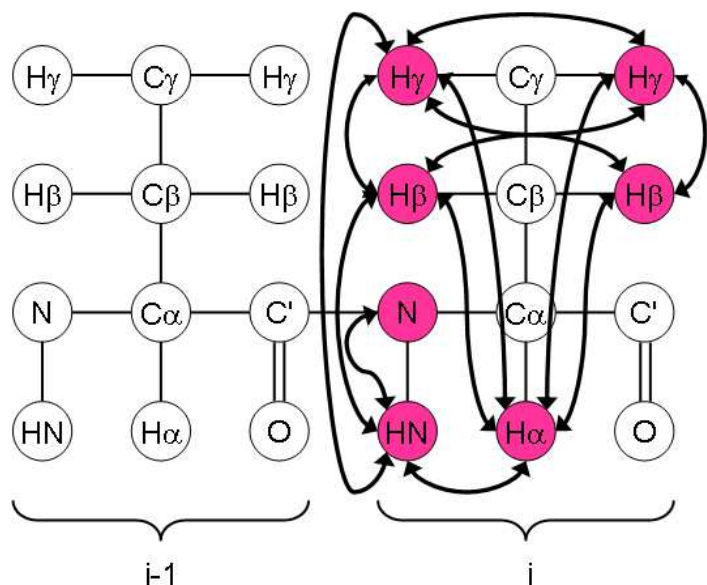


pozice $C\beta$ bývá
charakteristická
pro danou AA

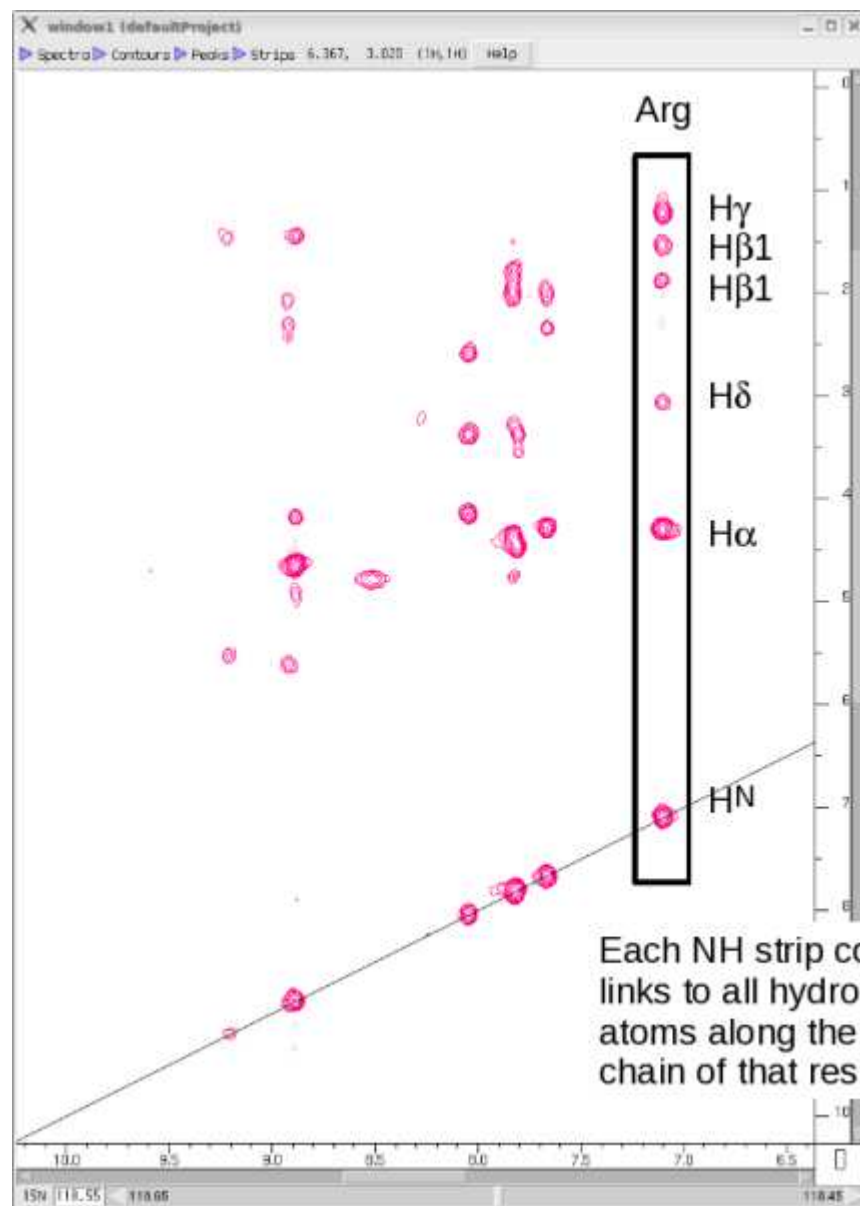
Postup přiřazení signálů páteře



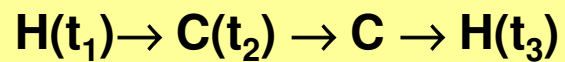
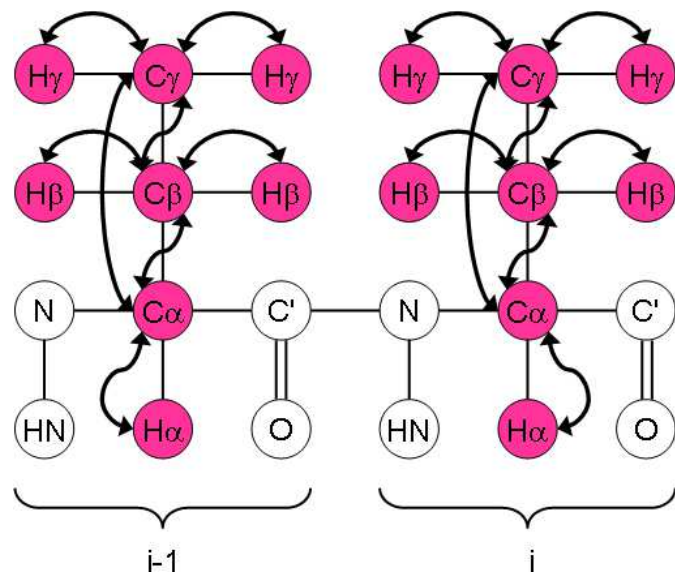
Postranní řetězce – $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-TOCSY



relativně dlouhý mixing time

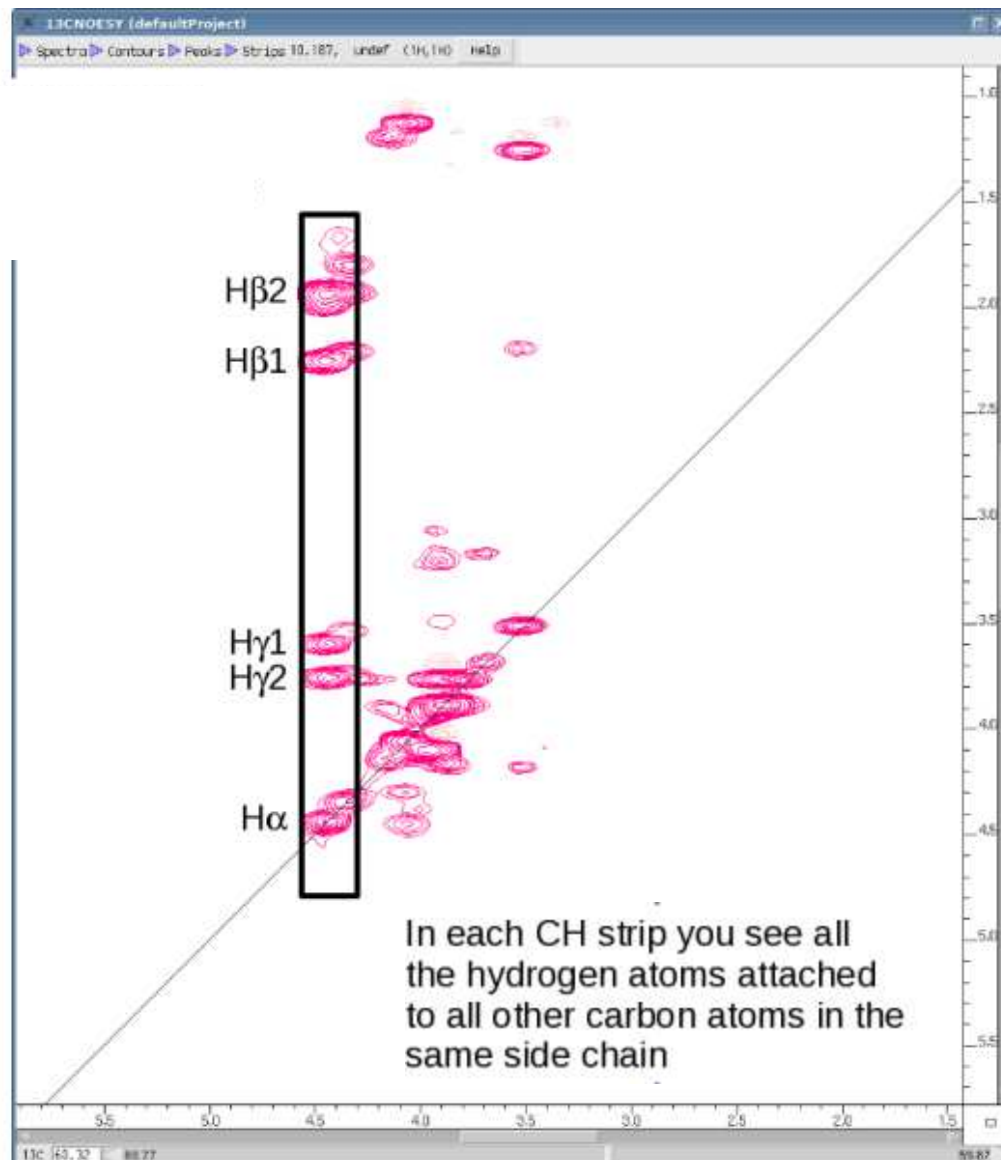


Postranní řetězce – HCCH-TOCSY



kratší mixing time

HCCH-COSY *méně signálů*



Experimentální protokol

Rozhoduje:

- velikost proteinu
- stabilita proteinu
- požadované experimentální informace
- dostupnost experimentálního času
- ...

Příklad 1

HNCA, HN(CO)CA
HCCH-TOCSY
editované NOESY

Příklad 2

HNCACB, CBCA(CO)NH
 ^{15}N , ^1H -HSQC-NOESY, ^{13}C , ^1H -HMBC-NOESY

a další kombinace...