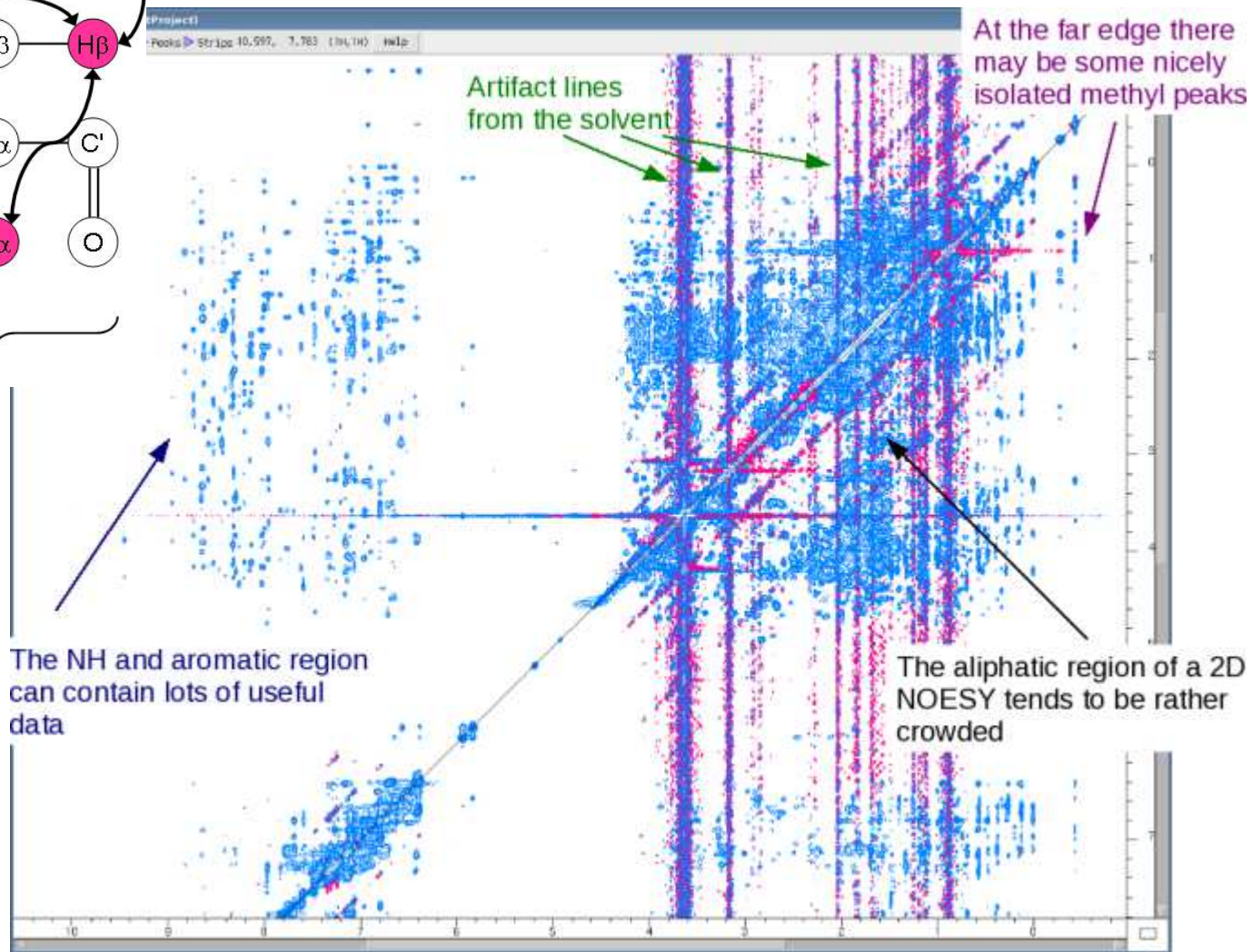
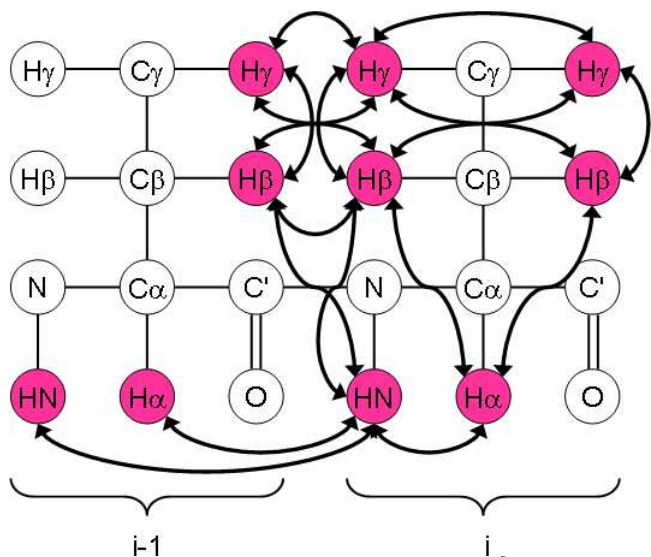


Experimentální data pro určení struktury proteinu

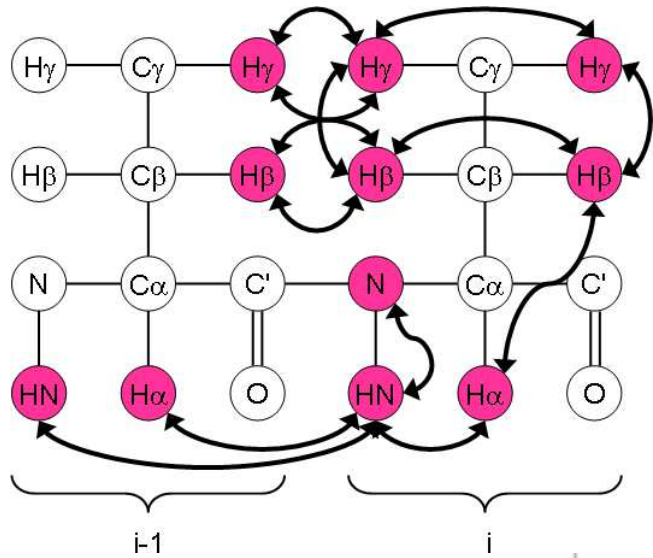
přiřazení co největšího počtu rezonancí

- intenzita NOESY krosníků
omezení vzdáleností
- chemické posuvy
indikace sekundární struktury
omezení dihedrálních úhlů
- J-vazby
omezení dihedrálních úhlů
- vodíkové můstky
omezení vzdáleností, vazebných úhlů
- zbytková dipolární interakce
vzájemná orientace částí molekuly
- ...

2D NOESY

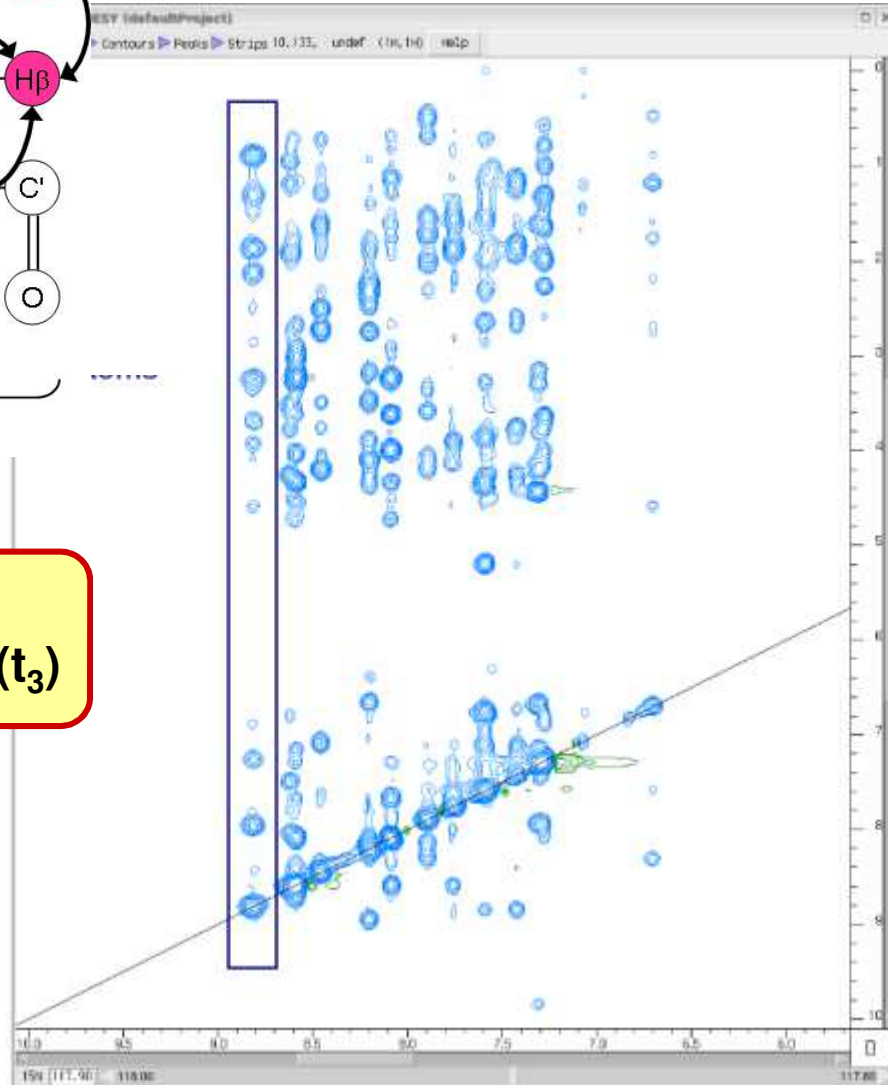


¹⁵N editované NOESY



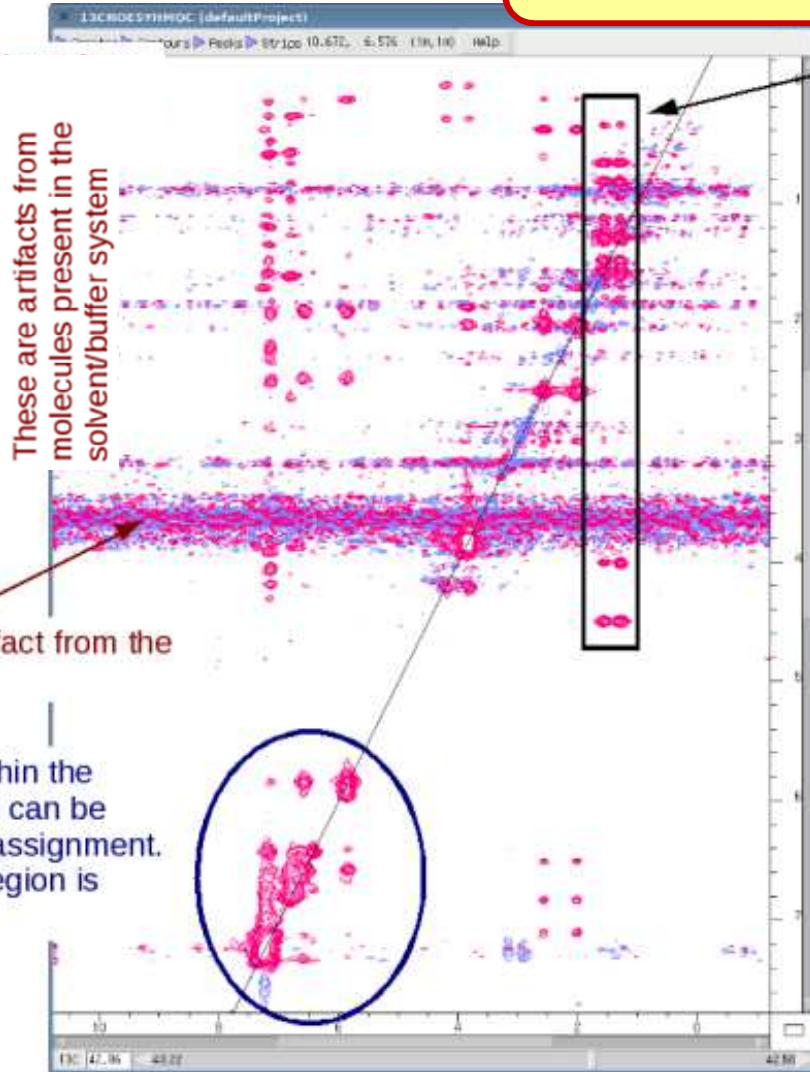
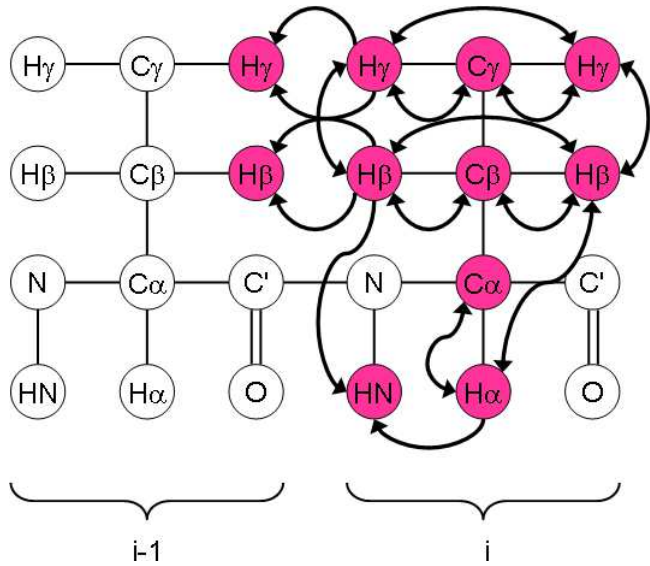
15N-NOESY-HSQC
H (t₁) → H → N(t₂) → H^N(t₃)

Each strip contains NOEs from one NH group to all other hydrogen atoms close by



¹³C editované NOESY

13C-HMQC-NOESY
 $H \rightarrow C(t_1) \rightarrow H(t_2) \rightarrow H(t_3)$



Each strip contains NOEs from one CH group to all other hydrogens nearby. A double set of peaks usually arises from a CH₂ group in which the two hydrogen atoms have different chemical shifts.

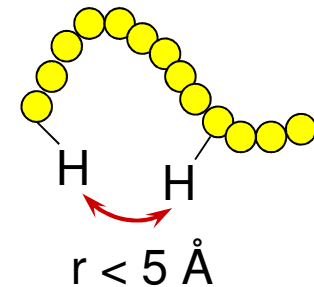
The resolution in the NOE dimension is very high, as this is the detected dimension

Interpretace NOESY

objem krosníku \longleftrightarrow vzdálenost

$$V = \left\langle \frac{1}{r^6} \right\rangle f(\tau_c)$$

- průměrování rychlými pohyby
vibrace
- ovlivnění pomalejšími pohyby
rotace molekuly a lokální flexibilita
- platí jen pro počáteční nárůst – nízká intenzita píku
delší směšovací časy – spinová difuze
- ovlivnění konformačními a chemickými výměnami
různé NOE v různých konformacích, průměrování



\longrightarrow pouze semi-kvantitativní vyhodnocení

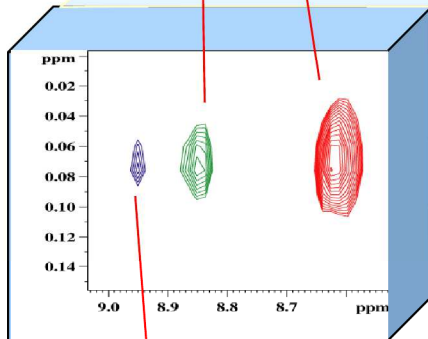
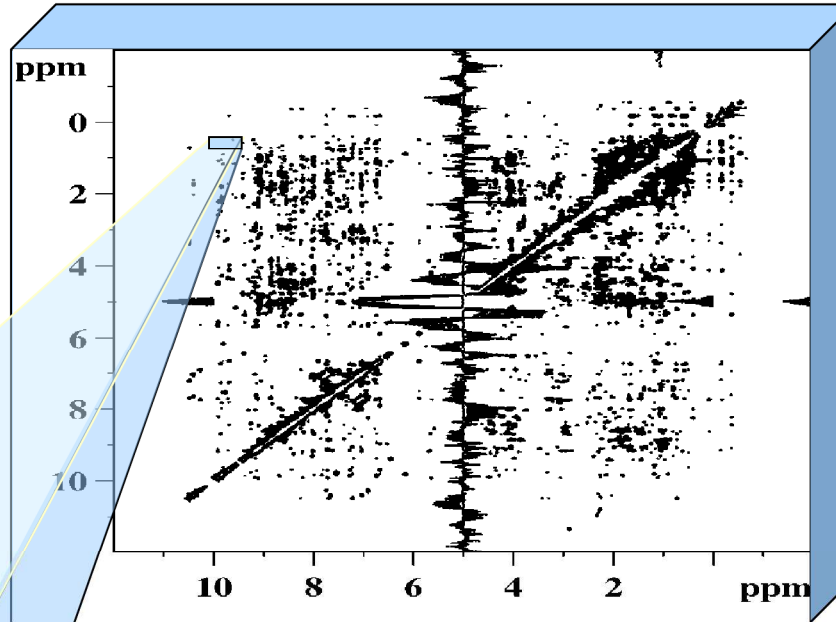
všechny efekty zmenšují NOE

Interpretace NOESY

strong: $1.8 \text{ \AA} \leq r \leq 2.8 \text{ \AA}$

medium: $1.8 \text{ \AA} \leq r \leq 3.5 \text{ \AA}$

weak: $1.8 \text{ \AA} \leq r \leq 5.0 \text{ \AA}$



Dolní mez: 1.8 Å

součet van der Waalsovských
poloměrů atomů vodíku

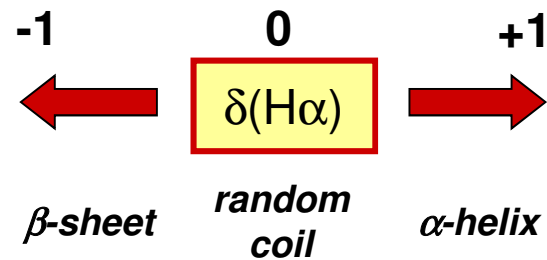
Horní mez:

podle intenzity krosníku zařazení
do 3 – 5 kategorií

Využití chemických posuvů

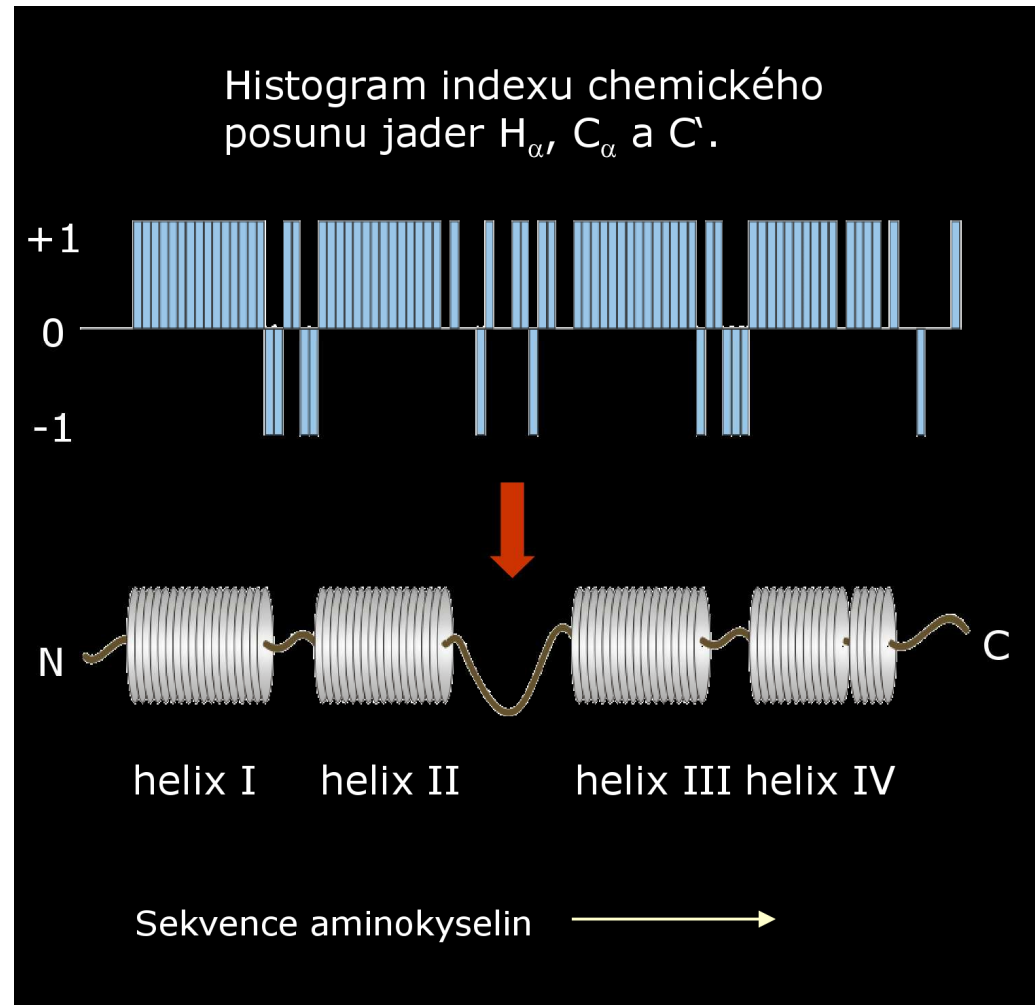
Predikce sekundární struktury – chemical shift index

statistické srovnání chemických posuvů s „random coil“ hodnotami



vyhodnocováno pro
H α , C α , C β a C'

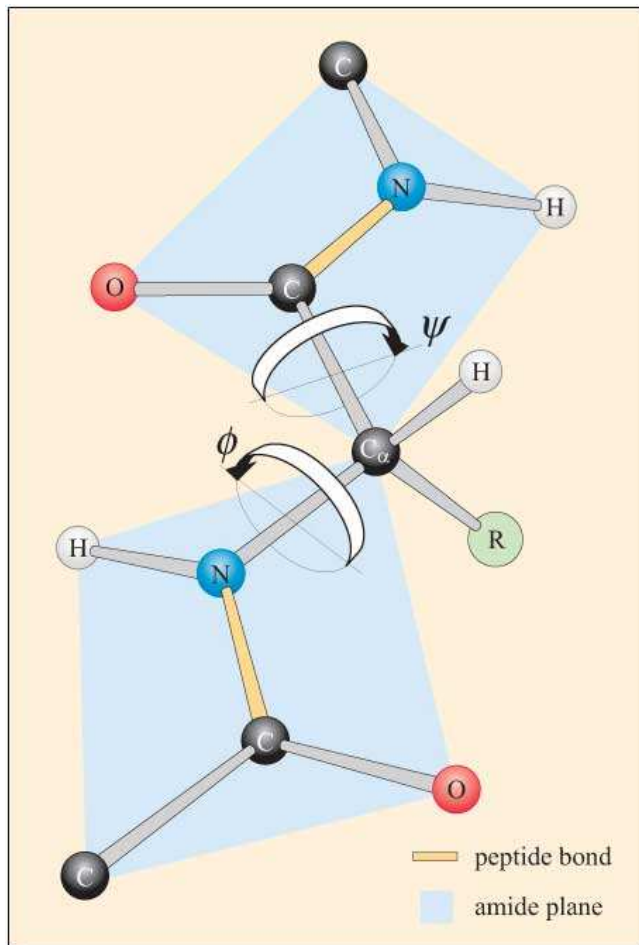
oblast shodných indexů



Využití chemických posuvů

Predikce dihedrálních úhlů – program TALOS

statistické srovnání chemických posuvů s databází známých struktur

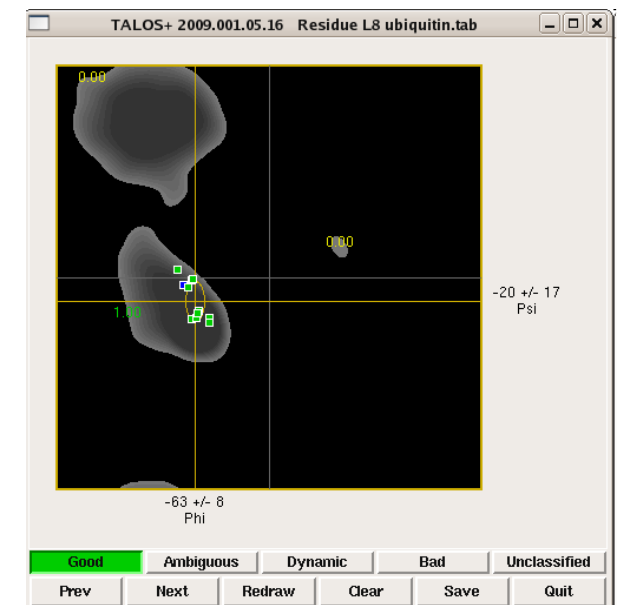
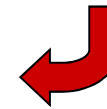


$H\alpha$, $C\alpha$, $C\beta$, C' a N
hodnoty pro 3 rezidua



vyhledání homologií

předpověď úhlů ϕ a ψ
pro neznámý protein
(uprostřed trojice)



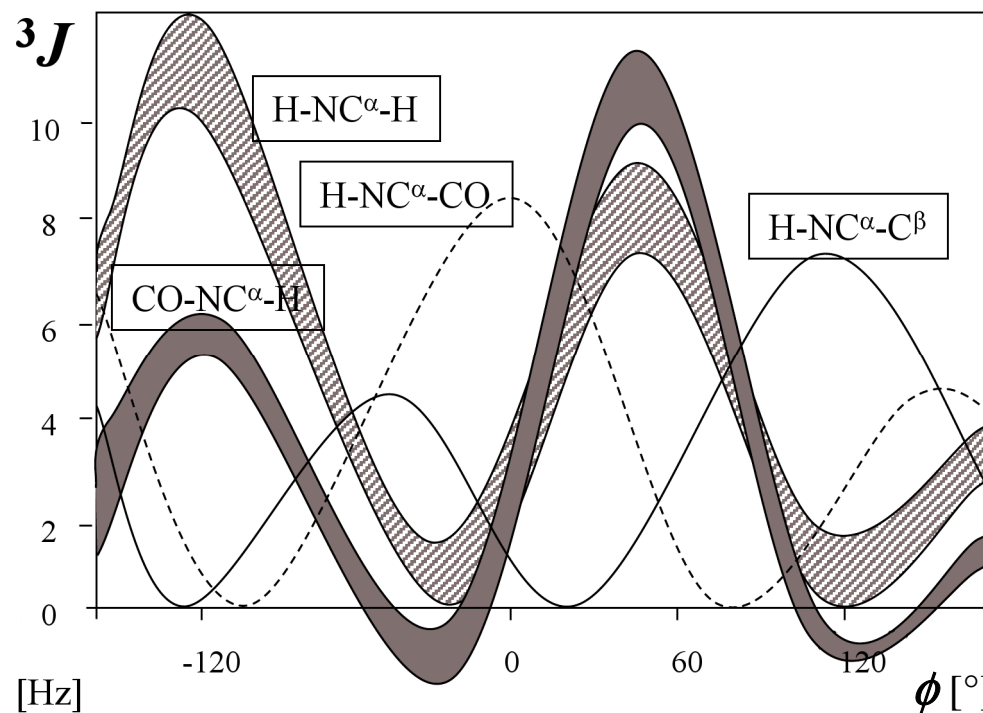
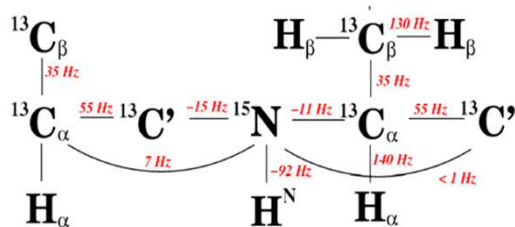
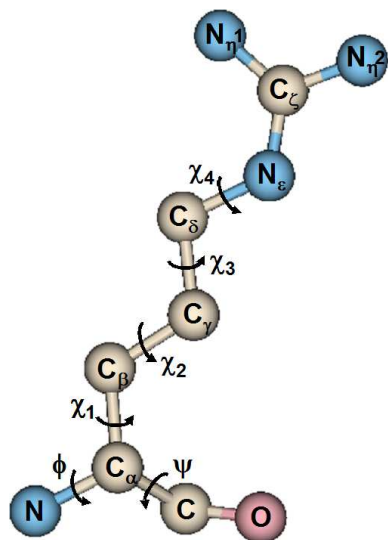
**kalibrace
chemických posuvů**

J-vazba a dihedrální úhel

Karplusova rovnice

$${}^3J = A \cos^2 \Theta + B \cos \Theta + C$$

parametrizace srovnáním známých struktur



více řešení, kombinace různých 3J

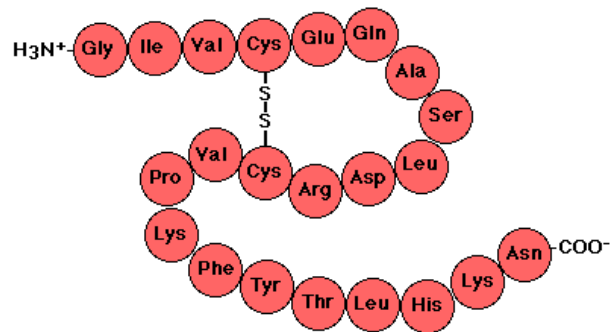
průměrování lokálním pohybem

analogické závislosti pro další torzní úhly

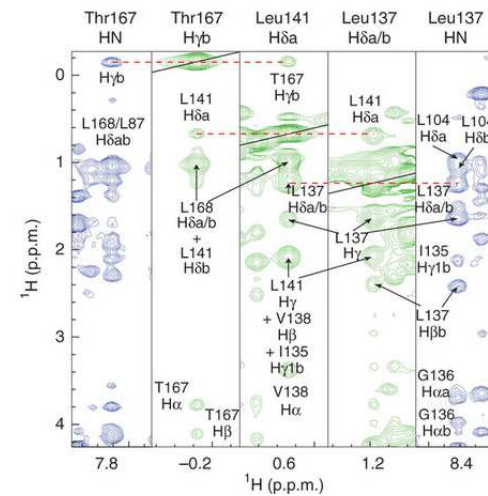
Výpočet struktury

informace o kovalentních vazbách

primární struktura, S-S můstky,...



omezení vzdáleností, dihedrálních úhlů,...



Molekulární dynamika



- experimentální data zavedena pomocí pseudopotenciálů
- minimalizace celkové energie
- simulované žíhání

Metodika výpočtu

$$E_{\text{TOT}} = E_{\text{kin}} + E_{\text{pot}}$$

teplota

překonávání E bariér

$$E_{\text{pot}} = \sum_{\text{bonds}} k_b \Delta_b^2 + \sum_{\text{angles}} k_a \Delta_a^2 + \sum_{\text{dihedrals}} k_d \Delta_d^2$$

kovalentní struktura

$$+ \sum_{\substack{\text{distance} \\ \text{constraints}}} k_{d.c.} \Delta_{d.c.}^2 + \sum_{\substack{\text{angle} \\ \text{constraints}}} k_{a.c.} \Delta_{a.c.}^2 + \dots$$

experimentální omezení

$$\Delta_i = x_i - x_i^0$$

Molekulární dynamika

snaha o co nejpřesnější popis pohybu molekul

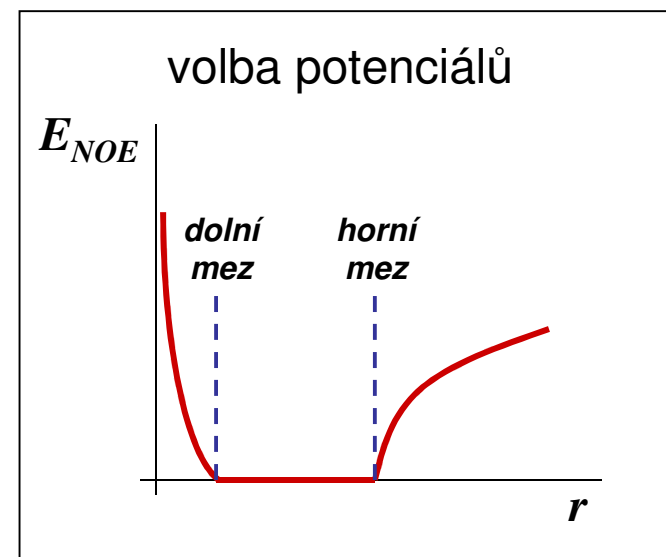
trajektorie

NMR struktury

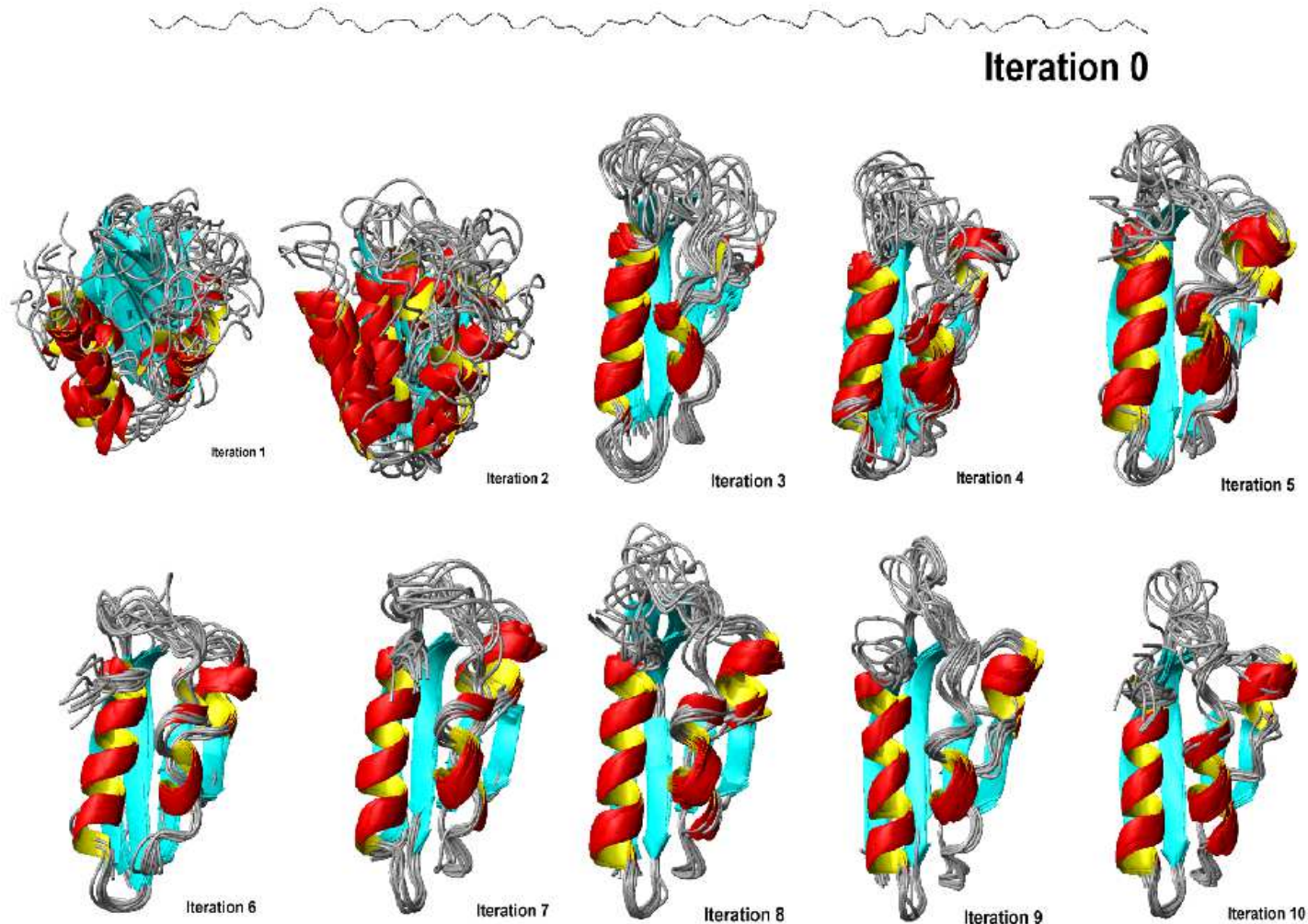
snaha o co nejrychlejší přechod do E minima

soubor struktur

kartézské souřadnice × prostor dihedrálních úhlů



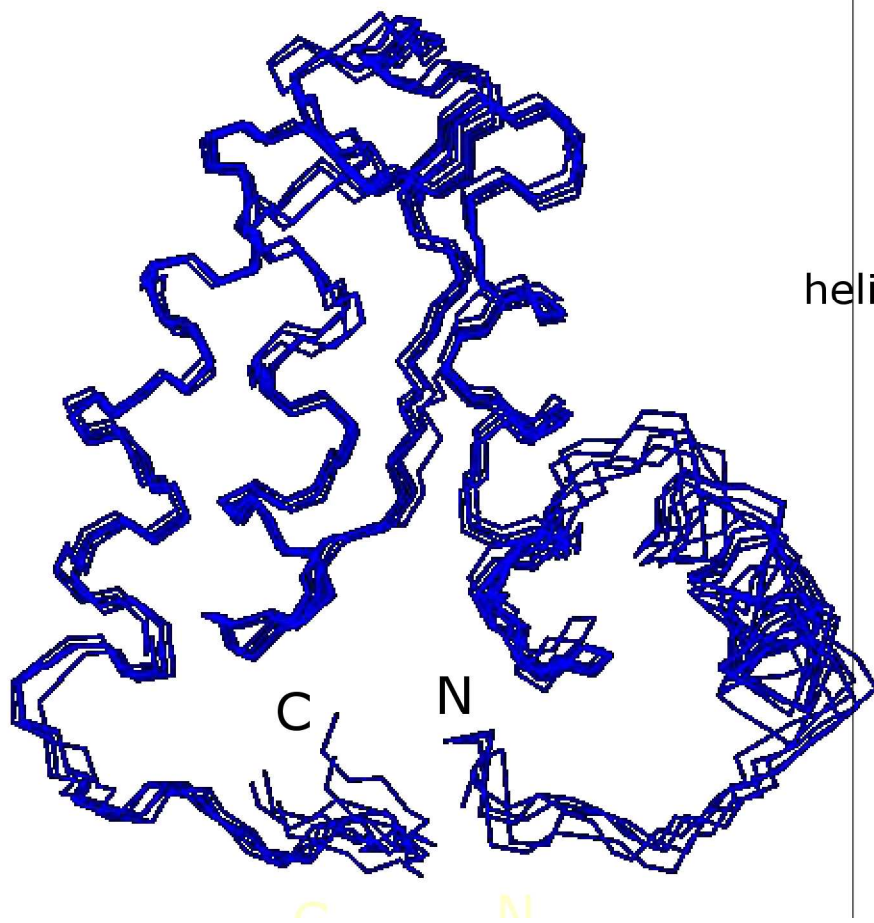
Ukázka postupujícího výpočtu



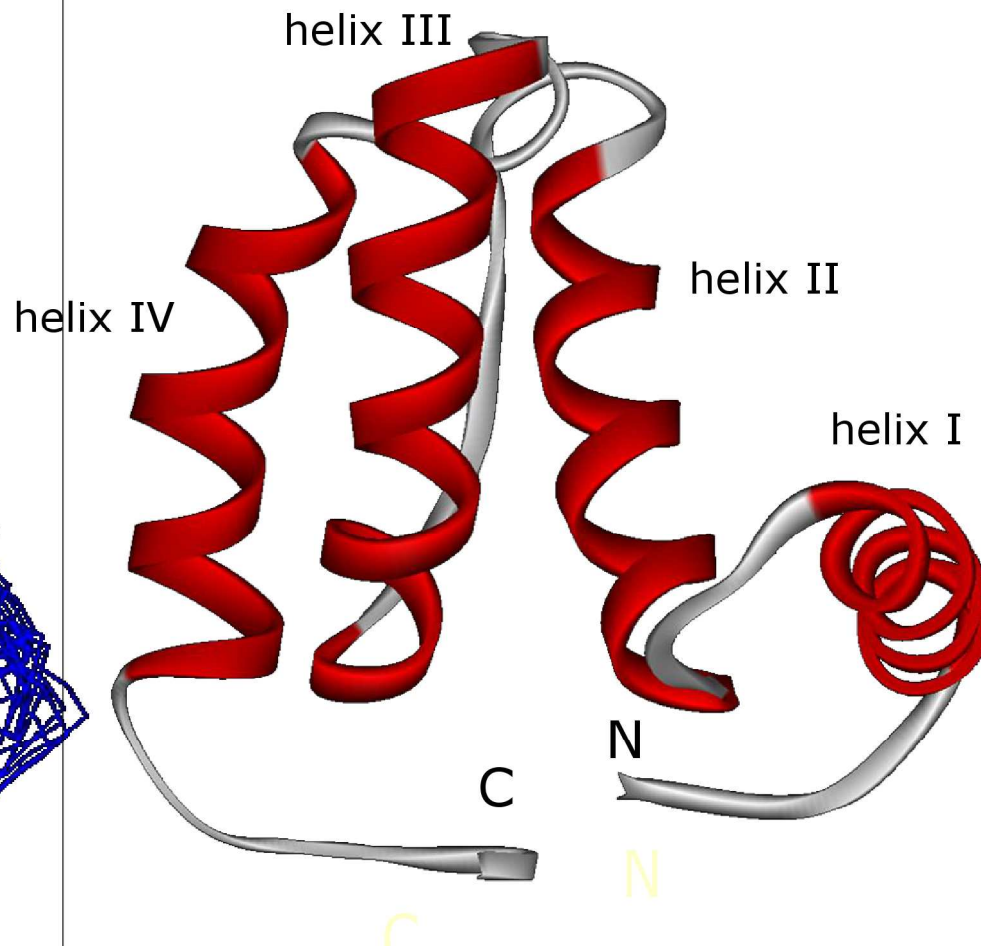
Xplor-NIH: nmr.cit.nih.gov/xplor-nih/

CNS: cns-online.org/v1.3

Prezentace struktur



soubor



„průměrná“ struktura

Validace struktury

1. Shoda vypočtených struktur s experimentálními daty

- velikost E_{pot}
- počet a velikost porušení experimentálních omezení
- výskyt sterických kolizí
- neshody s informacemi o kovalentních vazbách
- validace proti nepoužitým experimentálním datům

2. Rozptyl struktur v souboru

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i - \bar{r})^2}$$

- všechny atomy
- jen rigidní struktury

3. Porovnání strukturních parametrů s již známými proteiny

Ramachandranův diagram, ...

Validace struktury

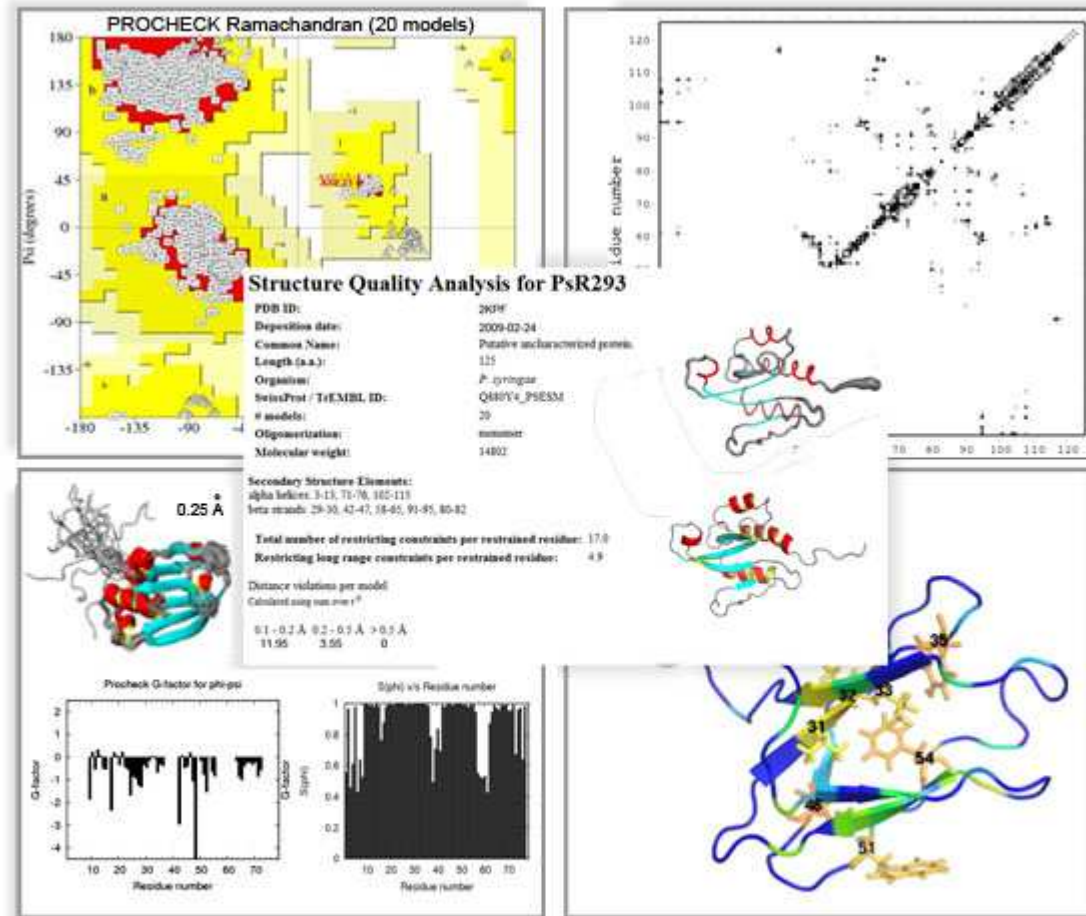
PSVS

Protein Structure Validation Software suite

One structure, rich report

psvs-1_4-dev.nesg.org

*web-server spojující
dostupné testy*



PDB validation
PROCHECK
Verify3D

MolProbity
Prosa II
RPF

Zveřejnění výsledků

BioMagResBank

www.bmrbl.wisc.edu

Biological Magnetic Resonance Data Bank

Google Search

Search Archive | Validation Tools | Deposit Data | NMR Statistics | Spectroscopists' Corner | Programmers' Corner | Home

Site Map | FTP Access | Structural Genomics and other "omics" | Metabolomics | Educational Outreach | NMR Data Formats | Useful NMR Links

Home

News
About BMRB
Feedback
FTP Access
BMRB List

BMRB
BioMagResBank

A Repository for Data from NMR Spectroscopy on Proteins, Peptides, and Nucleic Acids

Department of Biochemistry
University of Wisconsin–Madison

BMRB Data Listed By:

- Macromolecular types
- NMR spectral parameters
- Kinetics
- Thermodynamics
- Restraints
- Structure
- Time-domain sets
- Solid-state NMR
- Unfolded proteins
- Binding Data

RCSB PDB
PROTEIN DATA BANK

A MEMBER OF THE PDB

An Information Portal to Biological Macromolecular Structures

As of Tuesday Nov 23, 2010 at 4 PM PST there are 69510 Structures | PDB Statistics

Contact Us | Print | PDB ID or Text | Search | Advanced Search

MyPDB Hide
Login to your Account
Register a New Account

Home Hide
News & Publications
Usage/Reference Policies
Deposition Policies
Website FAQ
Deposition FAQ
Contact Us
About Us
Careers
External Links
Sitemap
New Website Features

Deposition Hide
All Deposit Services
Electron Microscopy
X-ray | NMR
Validation Server
BioSync Beamline
Related Tools

Search Hide

A Resource for Studying Biological Macromolecules

The PDB archive contains information about experimentally-determined structures of proteins, nucleic acids, and complex assemblies. As a member of the wwPDB, the RCSB PDB curates and annotates PDB data according to agreed upon standards.

The RCSB PDB also provides a variety of tools and resources. Users can perform simple and advanced searches based on annotations relating to sequence, structure and function. These molecules are visualized, downloaded, and analyzed by users who range from students to specialized scientists.

[Hide Welcome Message](#)

Featured Molecules (MotM Category View / Previous Features: Hide)
MotM | PSI

Structural View of Biology

Protein Synthesis

Molecule of the Month: Inteins

In most cases, each gene encodes a single protein, but cells have found ways around this

Customize This Page

New Features Hide
Top-Bar Search Improvements
Latest features released:
Website Release Archive: [v]

RCSB PDB News Hide
Weekly | Quarterly | Yearly
2010-11-23
New Ligand Summary Pages

Ligand Image

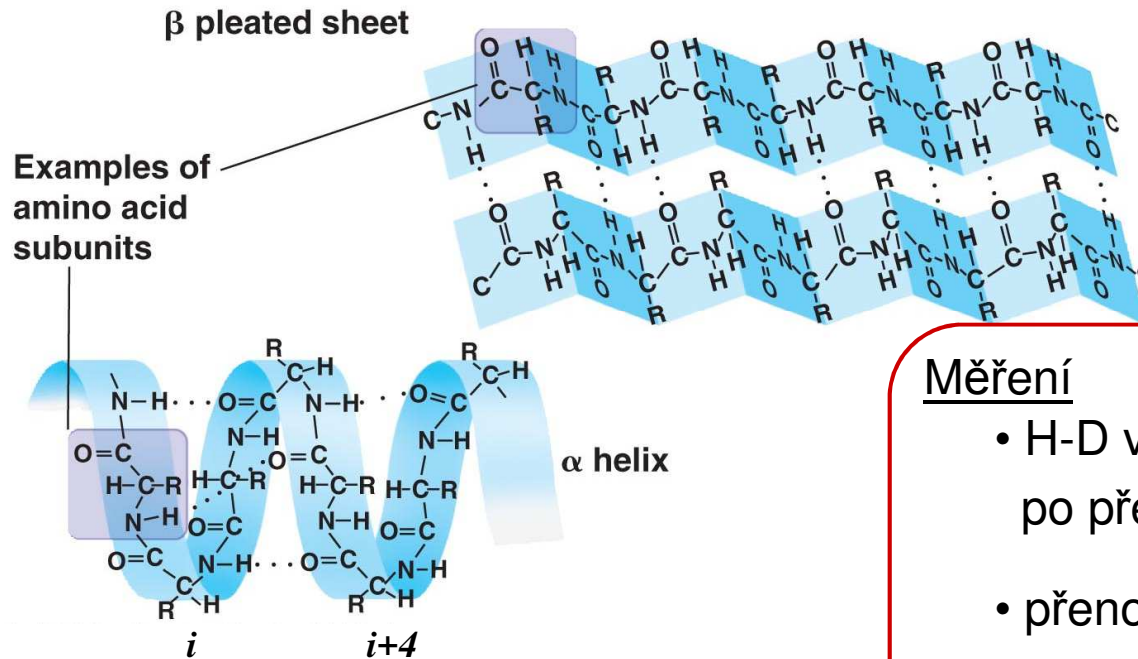
[View in Jmol](#)

Explore chemical details.

Protein Data Bank

www.pdb.org/pdb/home/home.do

Vodíkové vazby



Měření

- H-D výměna – série ^{15}N , ^1H korelací po přenesení proteinu do D_2O
- přenos saturace – ze signálu vody
- teplotní závislost signálů

pomalá výměna \rightarrow zapojení ve vodíkové vazbě
sterická ochrana před solventem

info pouze o donorech, nikoli akceptorech

lze použít pro zpřesnění struktury a mapování povrchu proteinu (komplexu)

J-interakce přes vodíkovou vazbu – 0-1 Hz, jasně definovaný donor i akceptor

Zbytková dipolární interakce

Residual Dipolar Coupling

omezení izotropního pohybu molekul

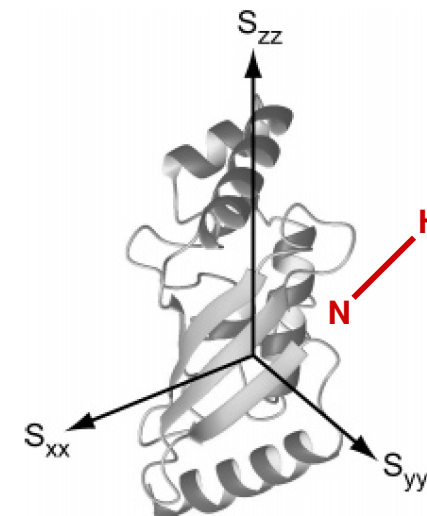
→ DD interakce **nezprůměrována** k nule

$$D_{IS} = D_{IS}^{max} \left\{ S_{zz} \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) + (S_{xx} - S_{yy}) \frac{1}{2} \sin^2 \theta \cos 2\phi \right\}$$

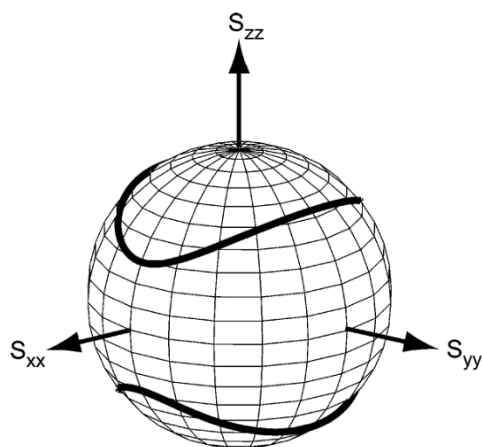
$$H_{RDC} = 2\pi D_{IS} I_z S_z$$

stejná forma jako J-vazba

$$J_{IS} + D_{IS}$$



alignment tensor **S**



Využití

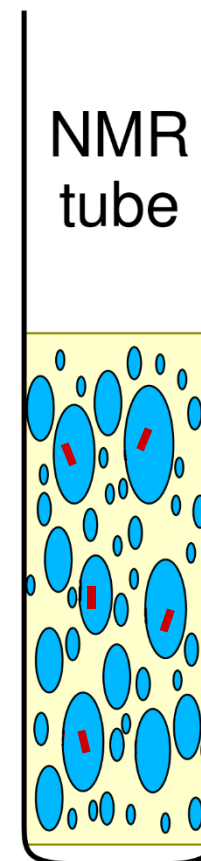
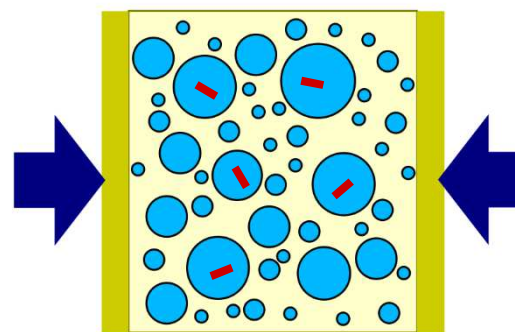
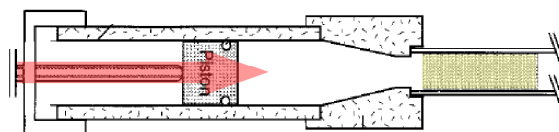
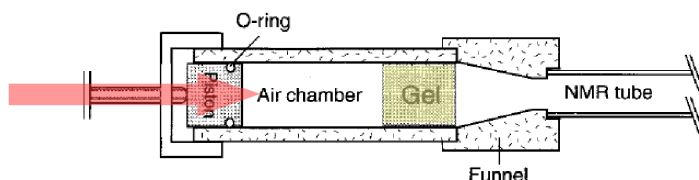
- zpřesnění struktur nebo jejich validace
- odhad struktury páteře bez NOE (homologie bez AA)
- vzájemná orientace domén
- skládání struktury po částech
- informace o lokální/segmentální dynamice

Zbytková dipolární interakce

Metody částečného orientování molekul

Stlačený gel

- ~ 6% polyakrylamidový gel (zesíťovaný)
- protein difunduje do suchého gelu
- natáhnutí gelu do kyvety



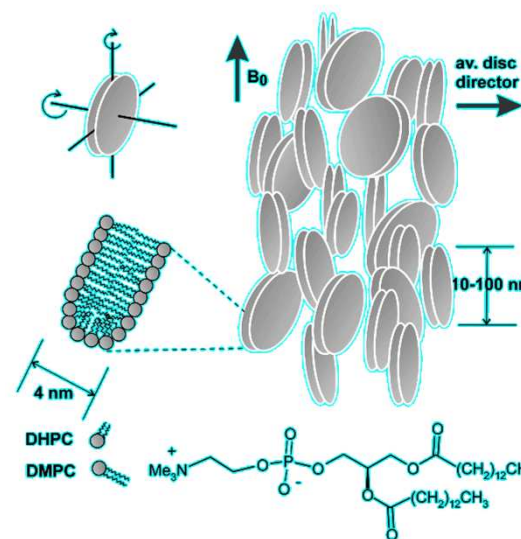
Bicely, virové částice

omezení pohybu většími částicemi

Kapalný krystal

Anizotropie susceptibility

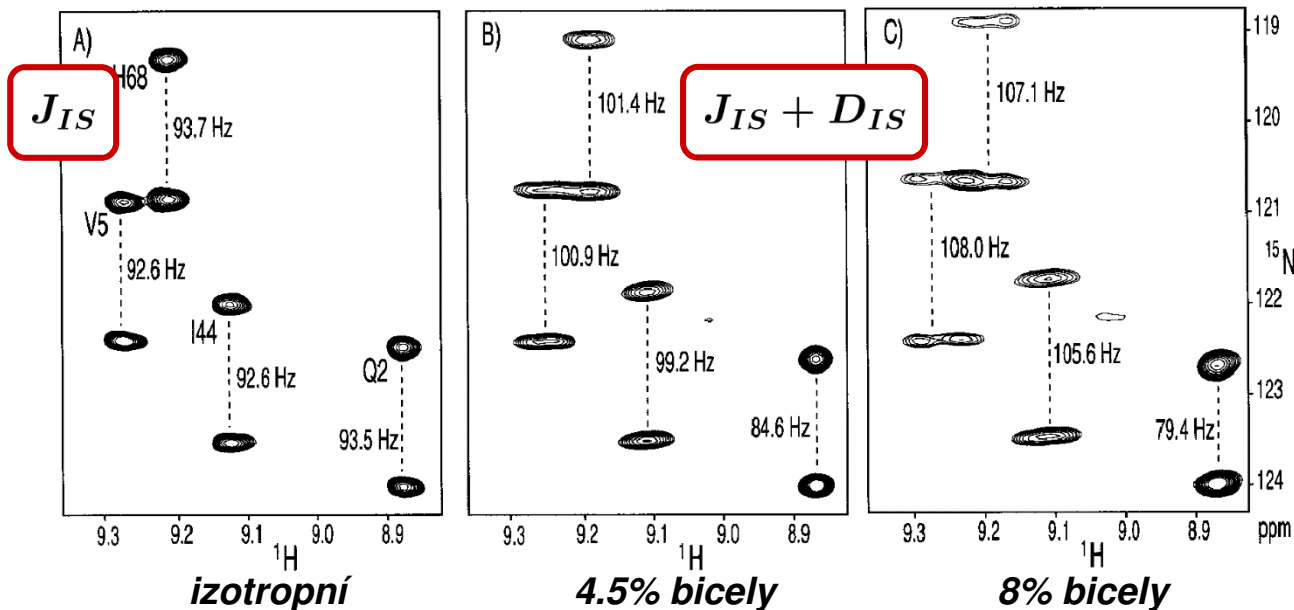
samovolná orientace paramagnetických molekul ve vysokém magnetickém poli



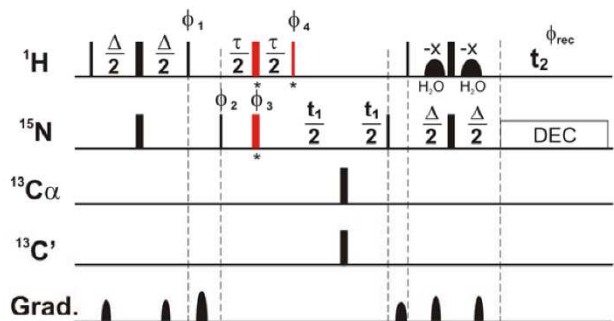
Zbytková dipolární interakce

Metody měření

coupled
HSQC



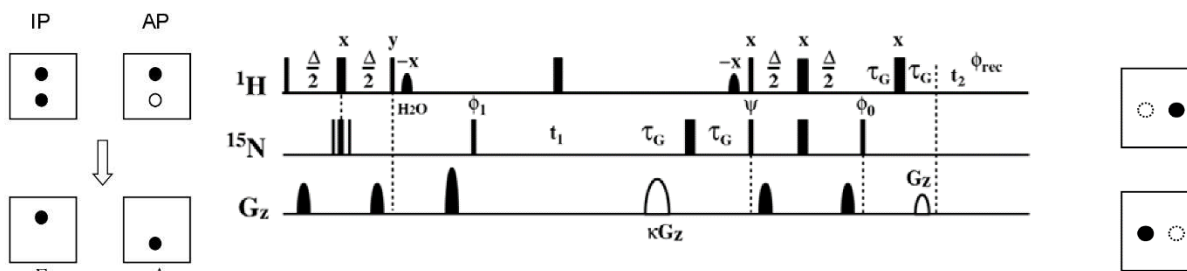
IPAP HSQC



Pulses marked * are applied for the antiphase expt (AP) only.

$\phi_1 = -y/y$; $\phi_2 = 2(x), 2(-x)$ (IP); $2(-y), 2(y)$ (AP) + TPPI(t_1);
 $\phi_3 = 4(x), 4(y), 4(-x), 4(-y)$ + TPPI(t_1) (AP); $\phi_4 = 8(x), 8(-x)$.
 $\phi_{rec} = x, 2(-x), x, -x, 2(x), -x$.

spin state selective transfer



$\phi_1 = x, -x$; $\phi_{rec} = x, -x$. $\phi_0 = \pm y$ (to select $\Gamma S^{\alpha\beta}$). E/AE selection: $\psi = x/-x$; $\kappa = +10/-10$.

detekuje se $I_y S_\alpha$ nebo $I_y S_\beta$

Zbytková dipolární interakce

Structure of natural products

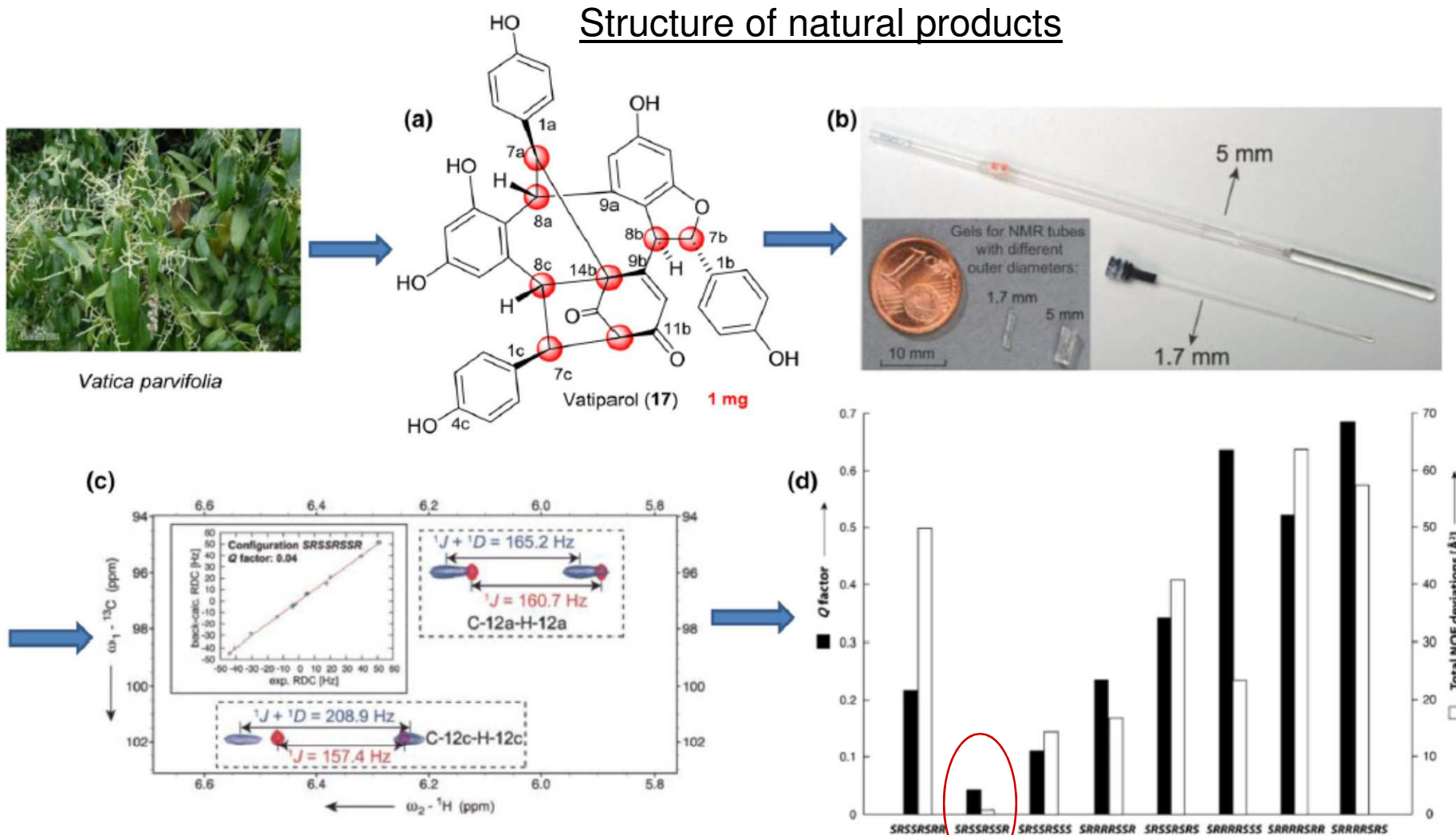
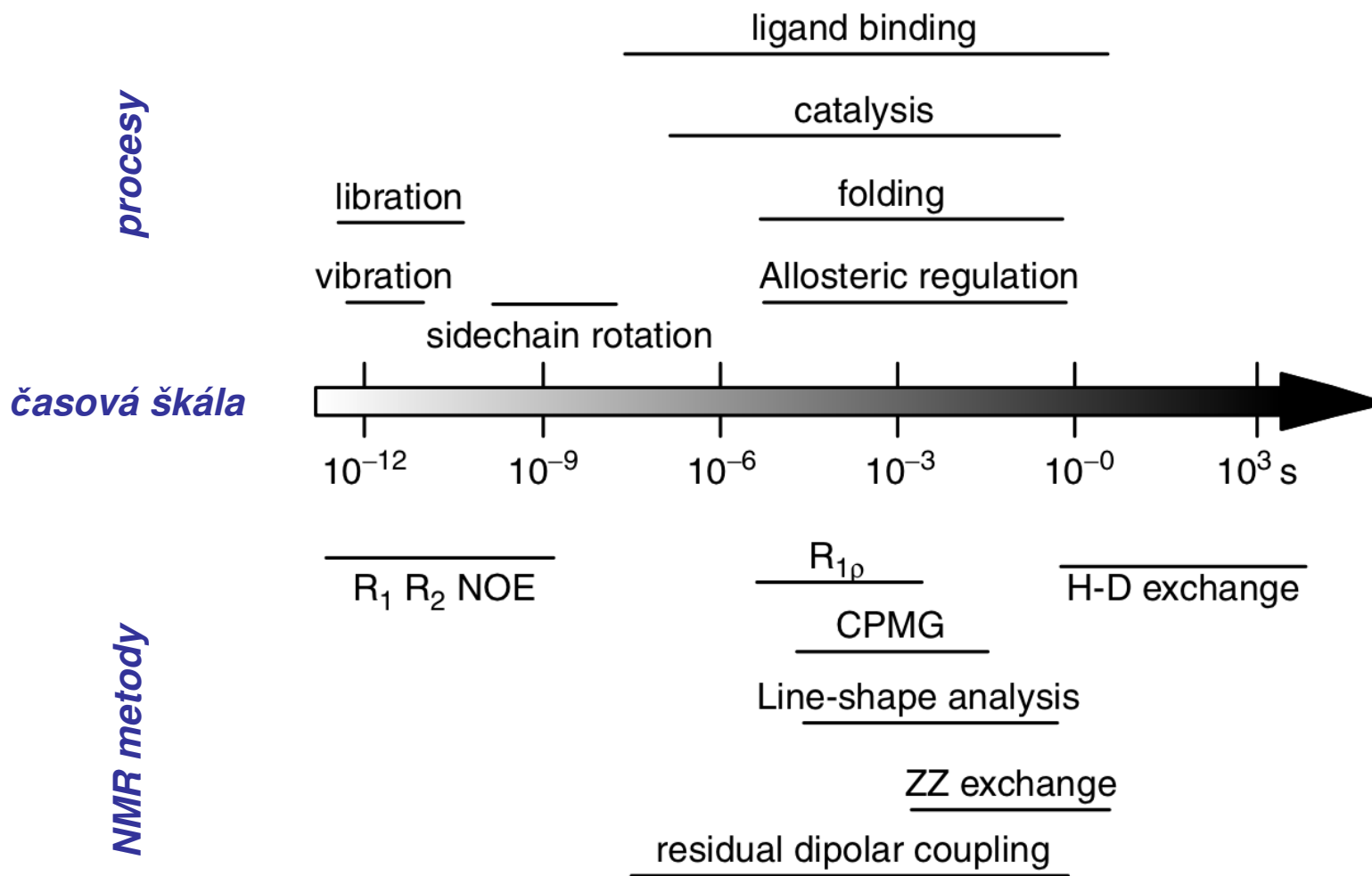


Fig. 7 Schematic representation of the steps involved in determination of natural product stereochemistry by RDC analysis. (a) Structure of vatiparol (17). (b) Comparison between the gels for 1.7 and 5 mm NMR tubes. (c) The ${}^1D_{\text{C-H}}$ values are extracted as the difference of

the splitting between isotopic and anisotropic signals. (d) Comparison of Q factors of eight possible diastereomers by NOE deviations and RDC fitting

Studium dynamických procesů



Blochovy rovnice

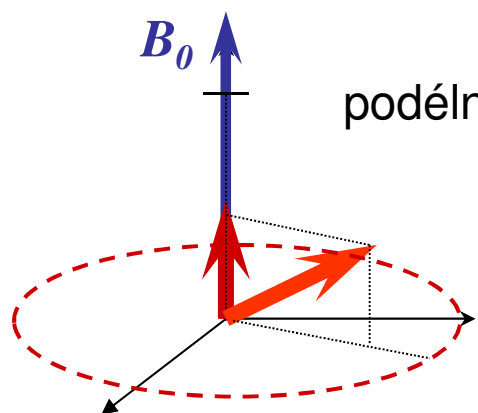
chování vektoru magnetizace v magnetickém poli (včetně rf pole)

$$\frac{d}{dt}M_z(t) = \gamma \left[\vec{M}(t) \times \vec{B}(t) \right]_z - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1}$$

precese

relaxace

$$\frac{d}{dt}M_{x,y}(t) = \gamma \left[\vec{M}(t) \times \vec{B}(t) \right]_{x,y} - \frac{M_{x,y}(t)}{T_2}$$

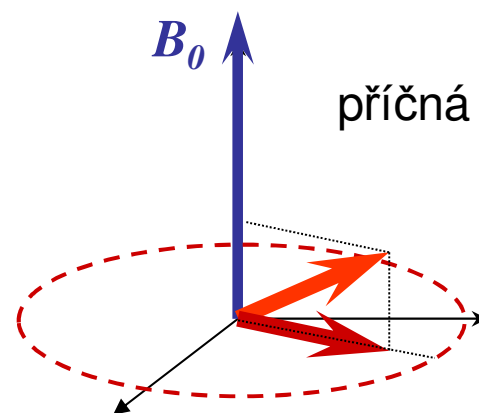


podélná (spin-mřížková)

T_1

obnovení **z**-ové složky

změna energie



příčná (spin-spinová)

T_2

vymizení **x,y** složek

ztráta koherence

Příčina relaxace

interakce s okolím

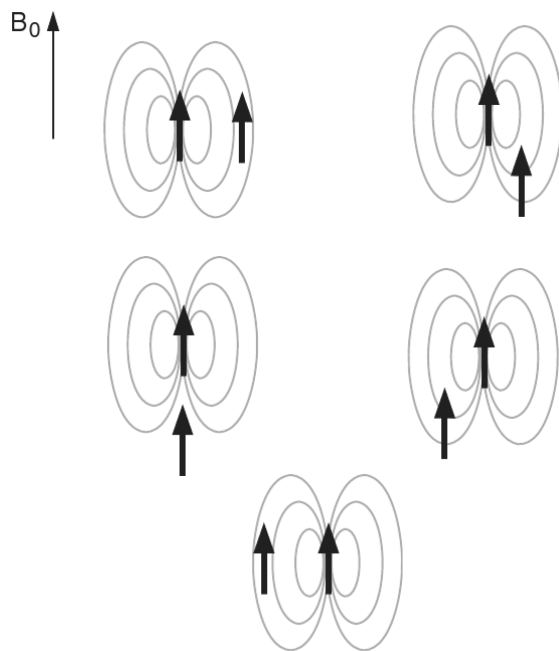
fluktuující lokální magnetické pole

$$B_{loc} = B_{\perp} + B_{\parallel}$$

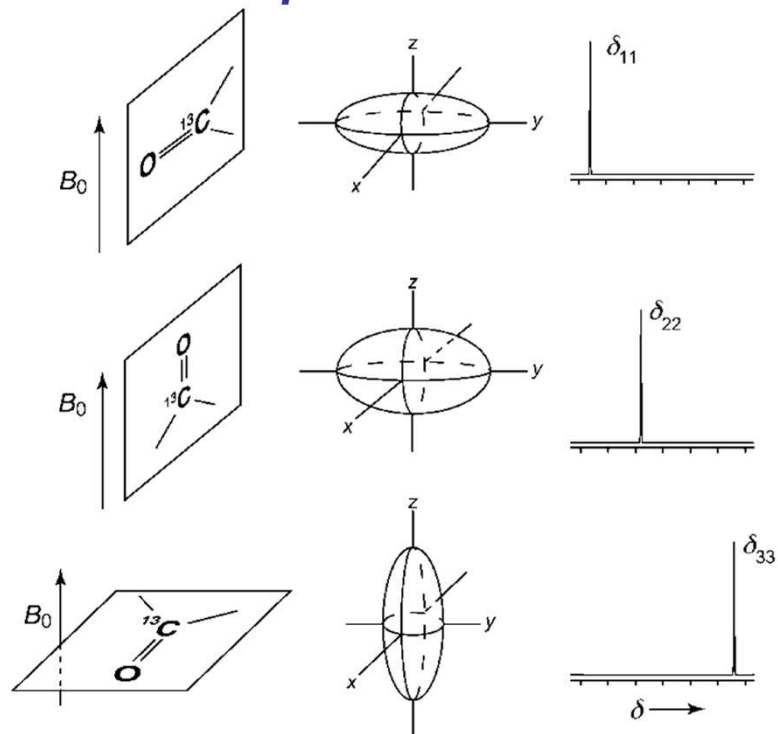
přeskoky mezi E hladinami

různé Larmorovy frekvence

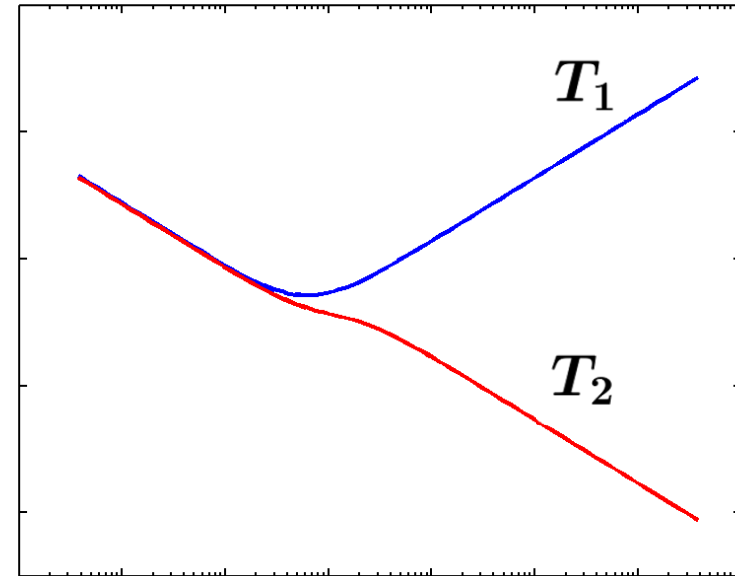
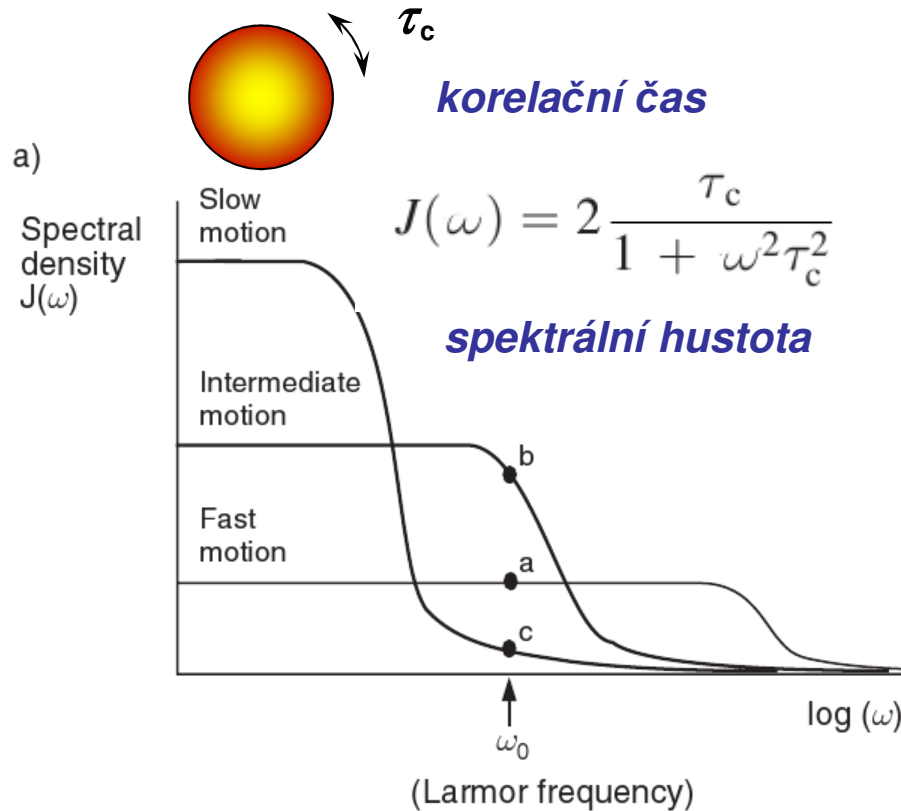
přímá dipól-dipólová interakce



anizotropie chemického stínění



Pohyb molekuly a relaxace



rychlé → **pohyby** ← **pomalé**
malé → **molekuly** ← **velké**
vysoké → **teploty** ← **nízké**

Dipól-dipólová relaxace

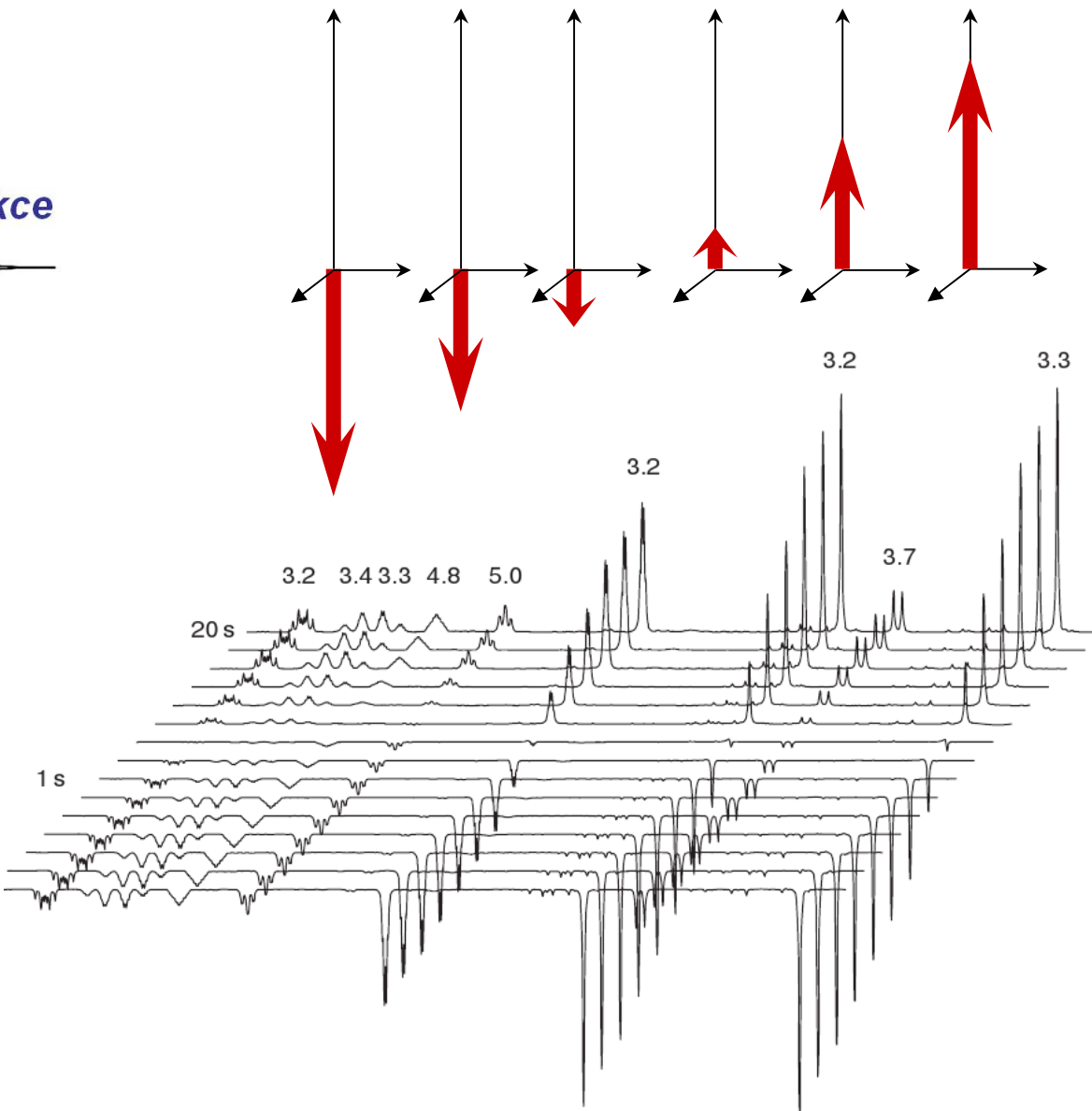
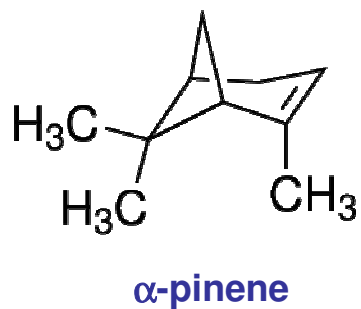
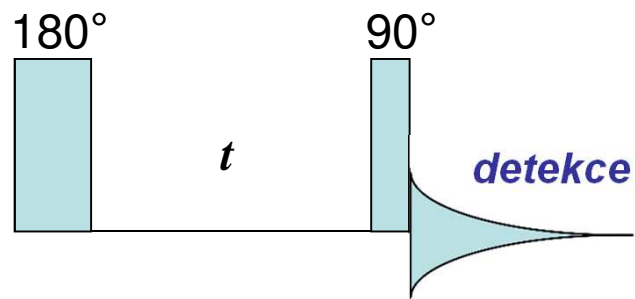
$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{4} b_{IS}^2 [J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_S) + 6J(\omega_I + \omega_S)]$$

$$b_{IS} = -\frac{\mu}{4\pi} \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{r_{IS}^3}$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{4} b_{IS}^2 \left[2J(0) + \frac{1}{2}J(\omega_I - \omega_S) + \frac{3}{2}J(\omega_S) + 3J(\omega_I) + 3J(\omega_I + \omega_S) \right]$$

Měření T_1

Inversion recovery

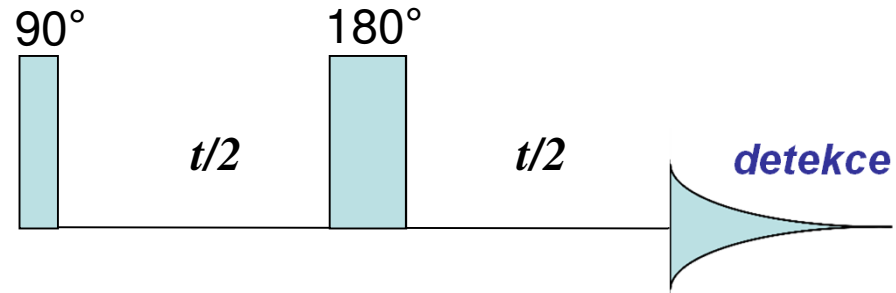


$$M(t) = M_0 (1 - 2 e^{-t/T_1})$$

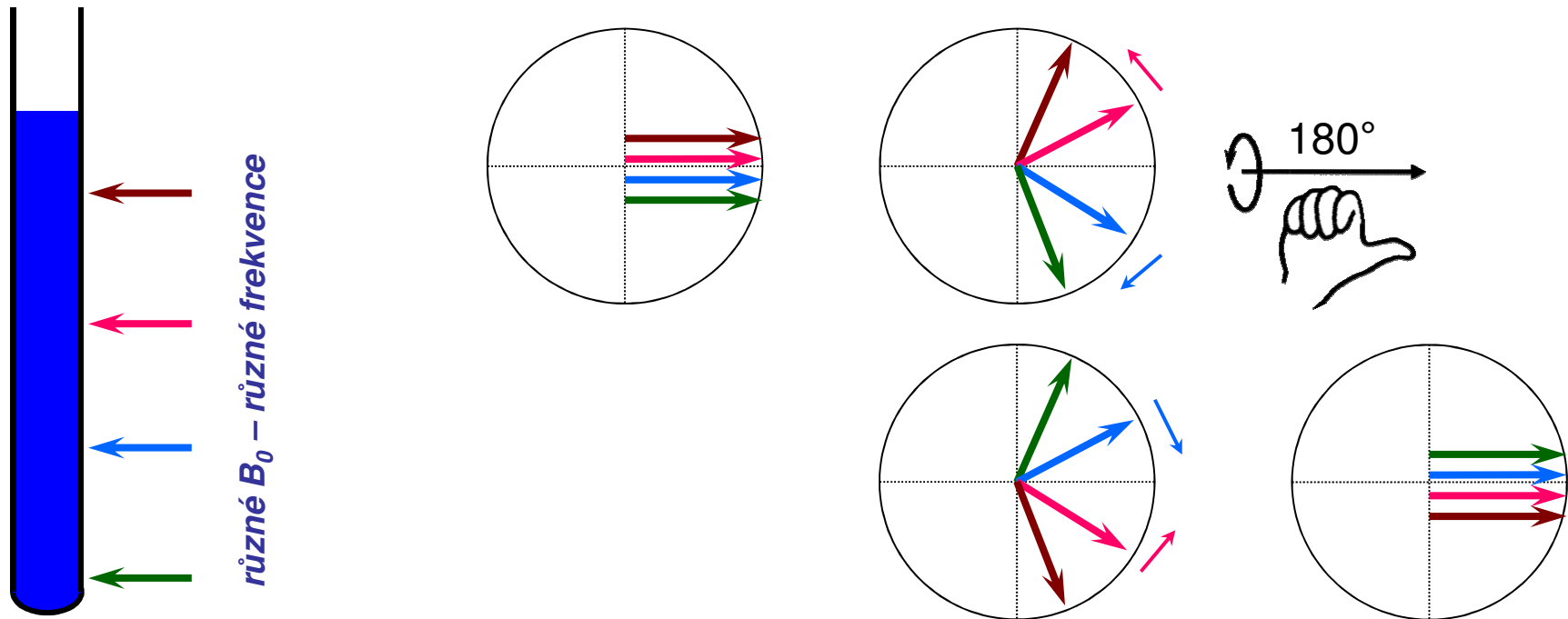
$$I(t) = A - B e^{-t/T_1}$$

Měření T_2

Spinové echo

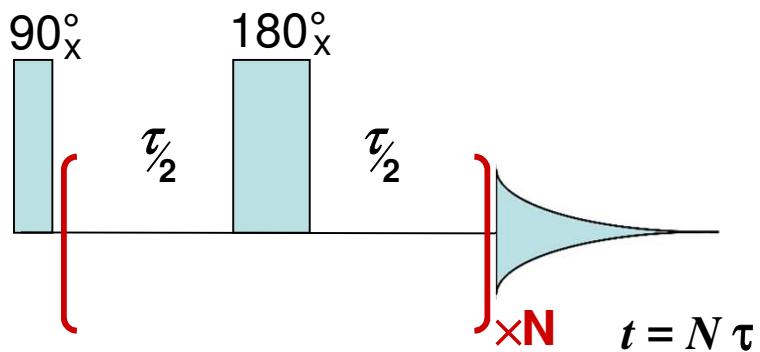


očistí pokles signálu od vlivu nehomogenit statického magnetického pole



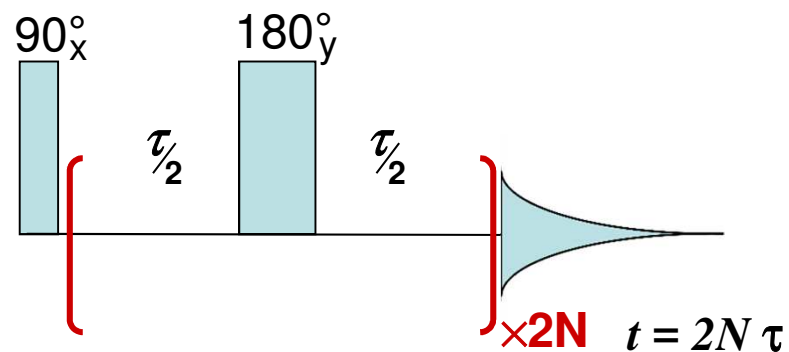
Měření T_2

Carr-Purcell

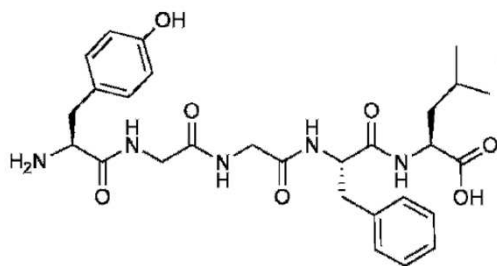


Potlačení vlivu difuze

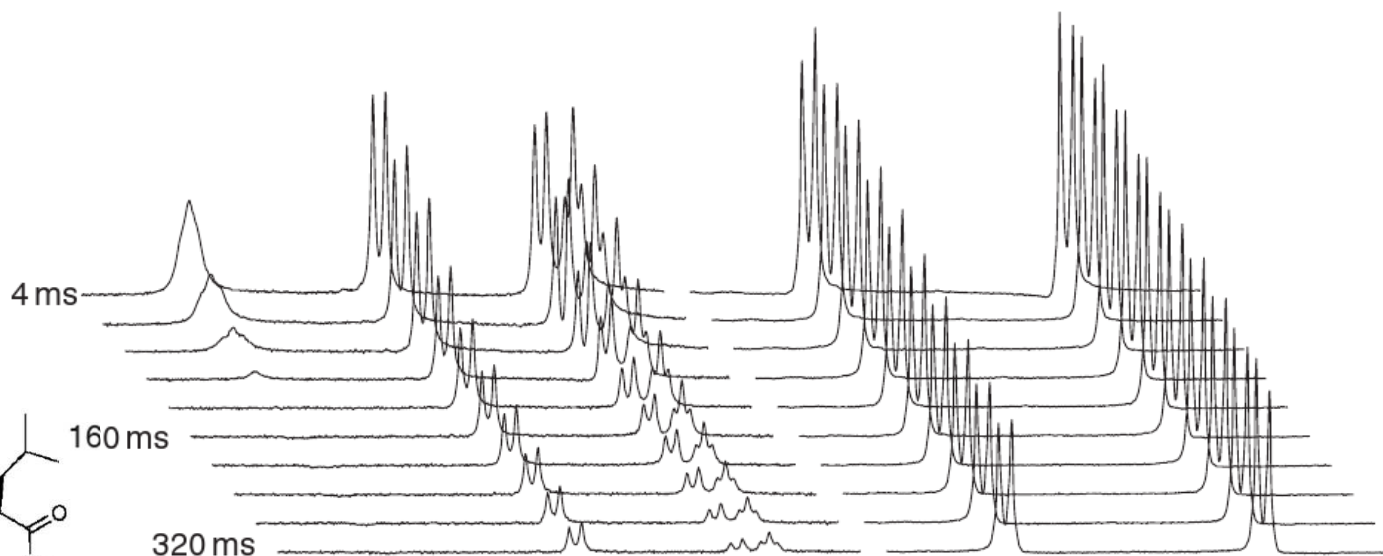
Carr-Purcell-Meiboom-Gill



Potlačení vlivu chyb 180°-pulsů



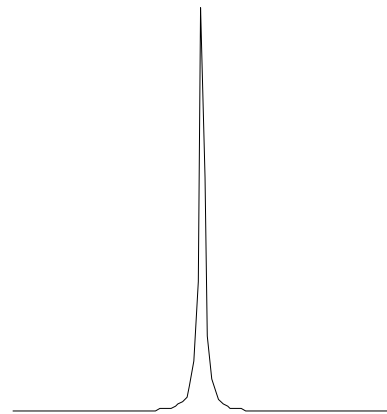
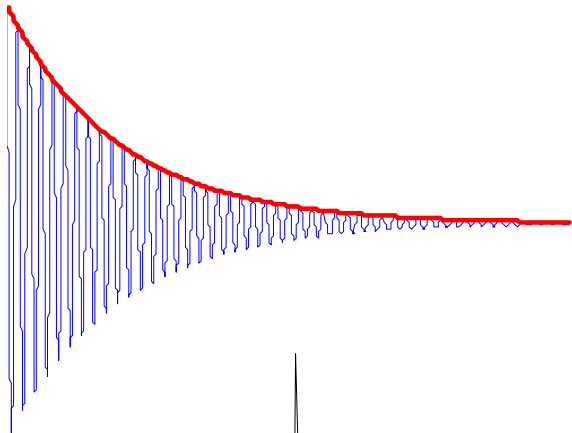
Tyr—Gly—Gly—Phe—Leu



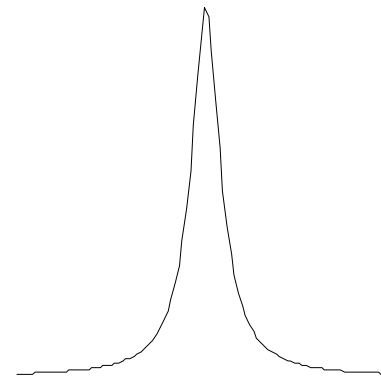
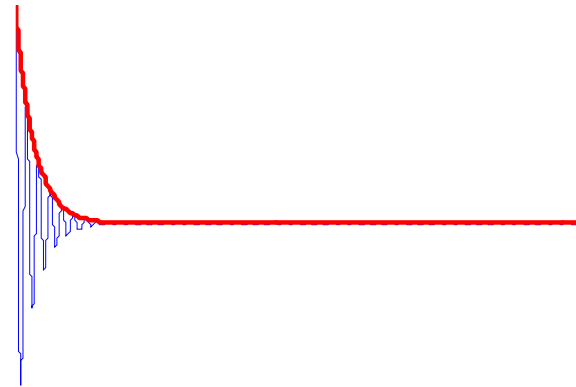
$$M(t) = M_0 e^{-t/T_2}$$

Tvar signálu a T_2

$$M_x(t) = M_o * \cos(\omega_{\text{eff}}t) * e^{-t/T_2}$$



dlouhá $T_2 \Rightarrow$ úzký pík

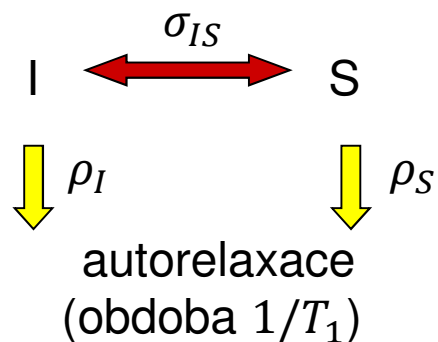


krátká $T_2 \Rightarrow$ široký pík

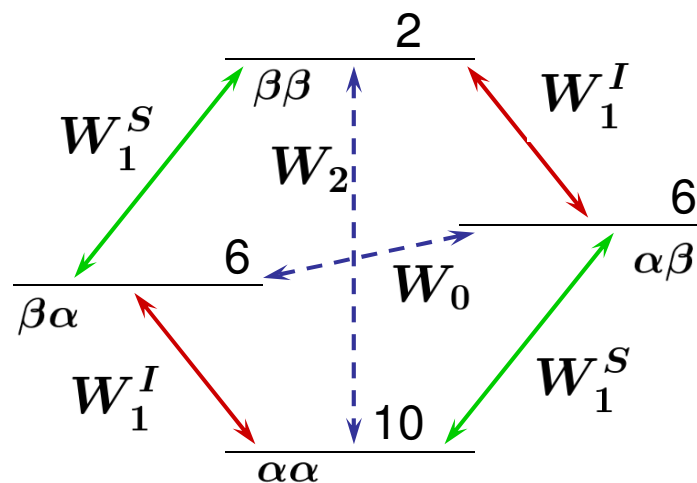
Nukleární Overhauserův efekt

Relaxace vícejaderných systémů je většinou složitě provázaná

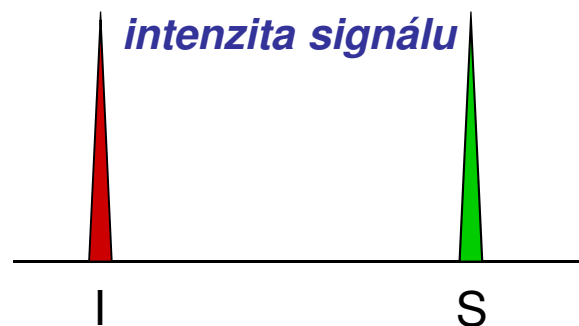
krosrelaxace \Rightarrow NOE



dipól-dipólová interakce



rozdíl obsazení hladin
 $=$
intenzita signálu

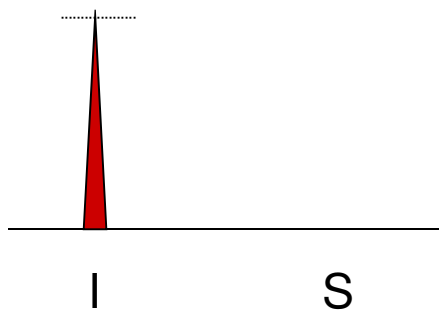
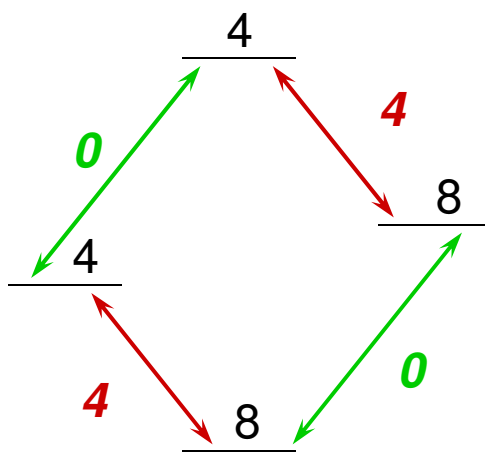


Solomonovy rovnice

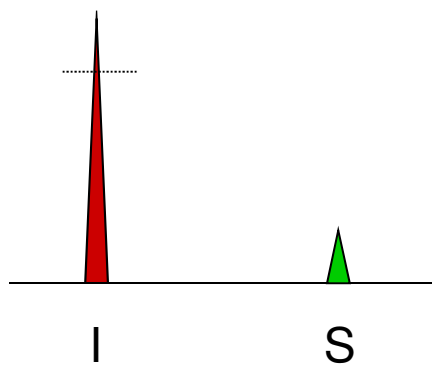
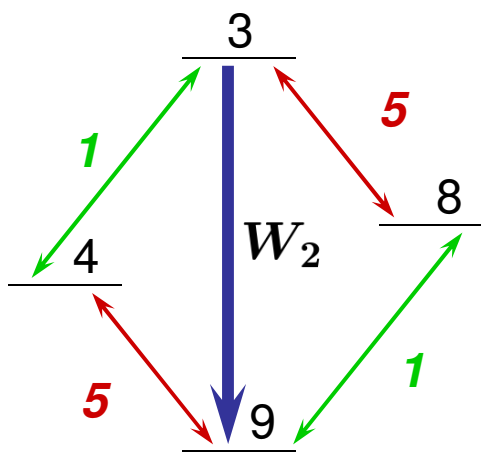
$$\frac{d}{dt} \langle I_z \rangle = -\rho_I (\langle I_z \rangle - I_z^{eq}) - \sigma_{IS} (\langle S_z \rangle - S_z^{eq})$$

$$\frac{d}{dt} \langle S_z \rangle = -\rho_S (\langle S_z \rangle - S_z^{eq}) - \sigma_{IS} (\langle I_z \rangle - I_z^{eq})$$

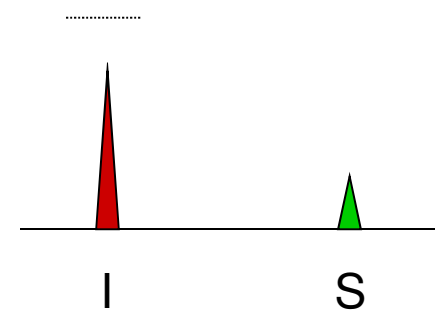
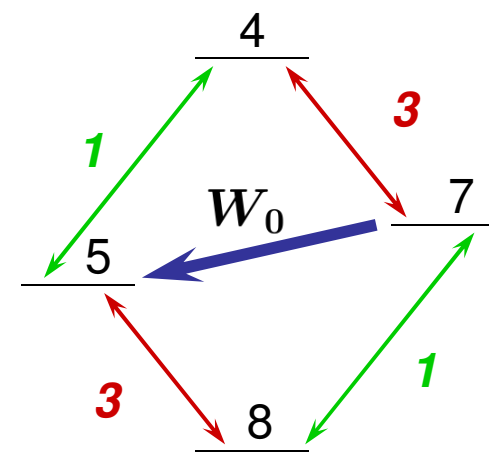
Nukleární Overhauserův efekt



saturace spinů S
(vyrovnání populací)



pozitivní NOE



negativní NOE

záleží, který efekt převažuje

Řešení Solomonových rovnic

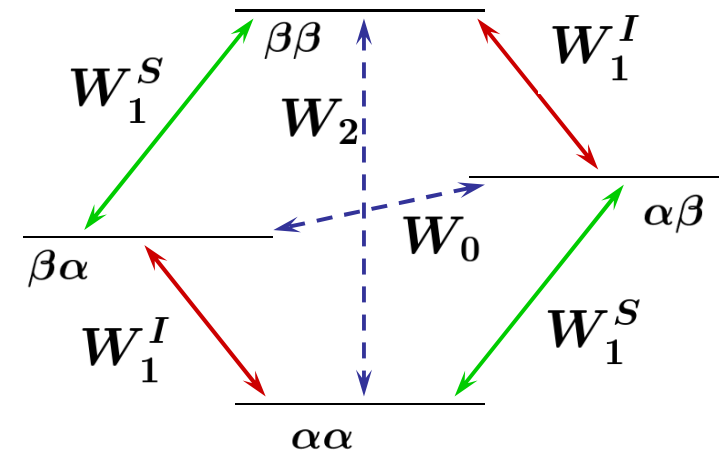
$$\frac{d}{dt} \langle I_z \rangle = -\rho_I (\langle I_z \rangle - I_z^{eq}) - \sigma_{IS} (\langle S_z \rangle - S_z^{eq})$$

$$\frac{d}{dt} \langle S_z \rangle = -\rho_S (\langle S_z \rangle - S_z^{eq}) - \sigma_{IS} (\langle I_z \rangle - I_z^{eq})$$

$$\rho_I = W_0 + 2W_1^I + W_2$$

$$\sigma_{IS} = W_2 - W_0$$

$$\rho_S = W_0 + 2W_1^S + W_2$$



Identické spiny

$$\frac{d}{dt} (\langle I_z \rangle + \langle S_z \rangle) = -2(W_1 - W_2) (\langle I_z \rangle + \langle S_z \rangle)$$

S relaxuje mnohem rychleji (elektron)

$$\langle S_z \rangle = S_z^{eq}$$

$$\frac{d}{dt} \langle I_z \rangle = -\rho_I (\langle I_z \rangle - I_z^{eq})$$

Řešení Solomonových rovnic

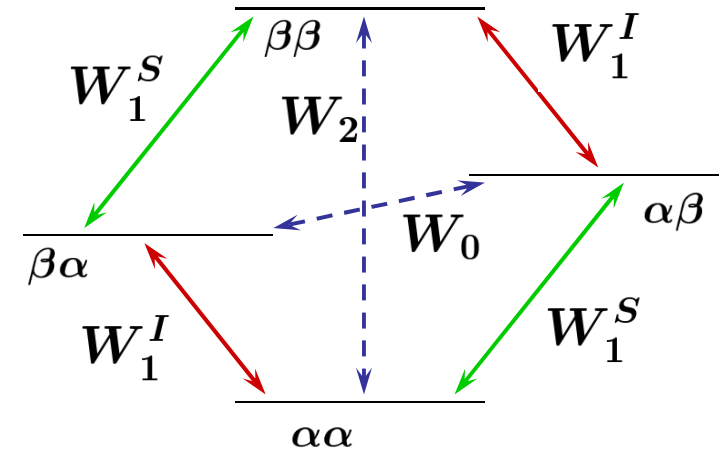
$$\frac{d}{dt} \langle I_z \rangle = -\rho_I (\langle I_z \rangle - I_z^{eq}) - \sigma_{IS} (\langle S_z \rangle - S_z^{eq})$$

$$\frac{d}{dt} \langle S_z \rangle = -\rho_S (\langle S_z \rangle - S_z^{eq}) - \sigma_{IS} (\langle I_z \rangle - I_z^{eq})$$

$$\rho_I = W_0 + 2W_1^I + W_2$$

$$\sigma_{IS} = W_2 - W_0$$

$$\rho_S = W_0 + 2W_1^S + W_2$$



S je saturován RF ozařováním

$$\langle S_z \rangle = 0$$

$$\frac{d}{dt} \langle I_z \rangle = -\rho_I (\langle I_z \rangle - I_z^{eq}) + \sigma_{IS} S_z^{eq}$$

$$S_z^{eq} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} I_z^{eq}$$

$$= -\rho_I \left[\langle I_z \rangle - I_z^{eq} \left(1 + \frac{\gamma_S \sigma_{IS}}{\gamma_I \rho_I} \right) \right]$$

NOE = nuclear Overhauser enhancement

Nukleární Overhauserův efekt

$$\eta_I\{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \frac{\sigma_{IS}}{R_1^{\text{TOT}}(I)}$$

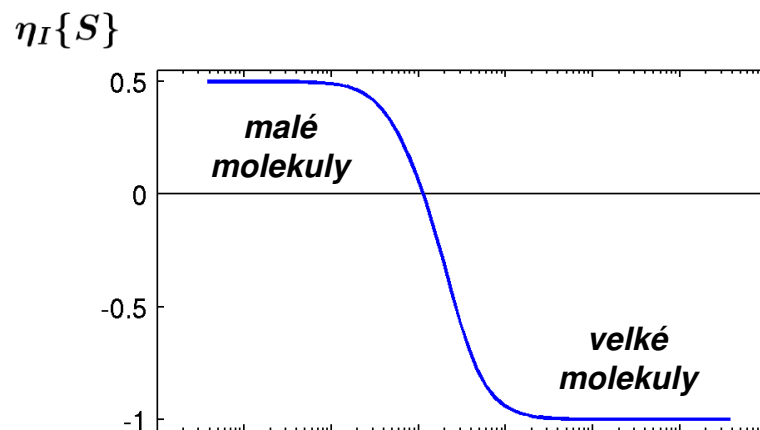
Heteronukleární NOE

- *navýšení intenzity signálu uhlíků saturací vodíků až o 199%*
- *ovlivnění intenzity signálu dusíků saturací vodíků až o -494%*

$$\sigma_{IS} = W_2 - W_0 \quad \sigma_{IS} \propto \frac{1}{r^6}$$

Homonukleární NOE

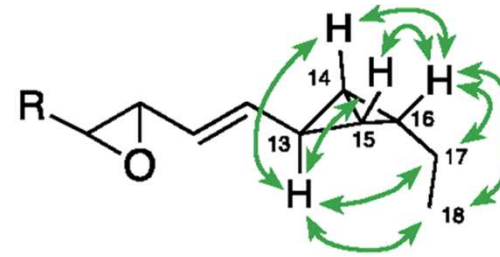
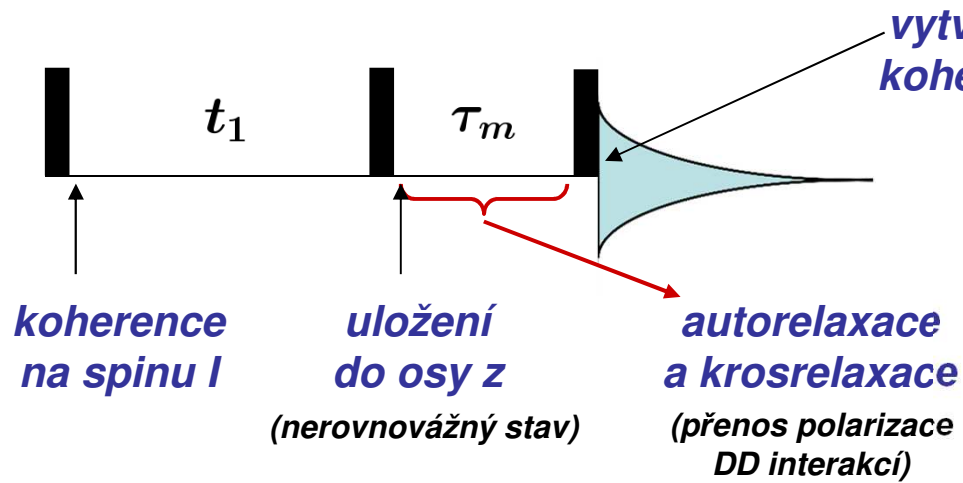
- *základ řešení prostorové struktury*



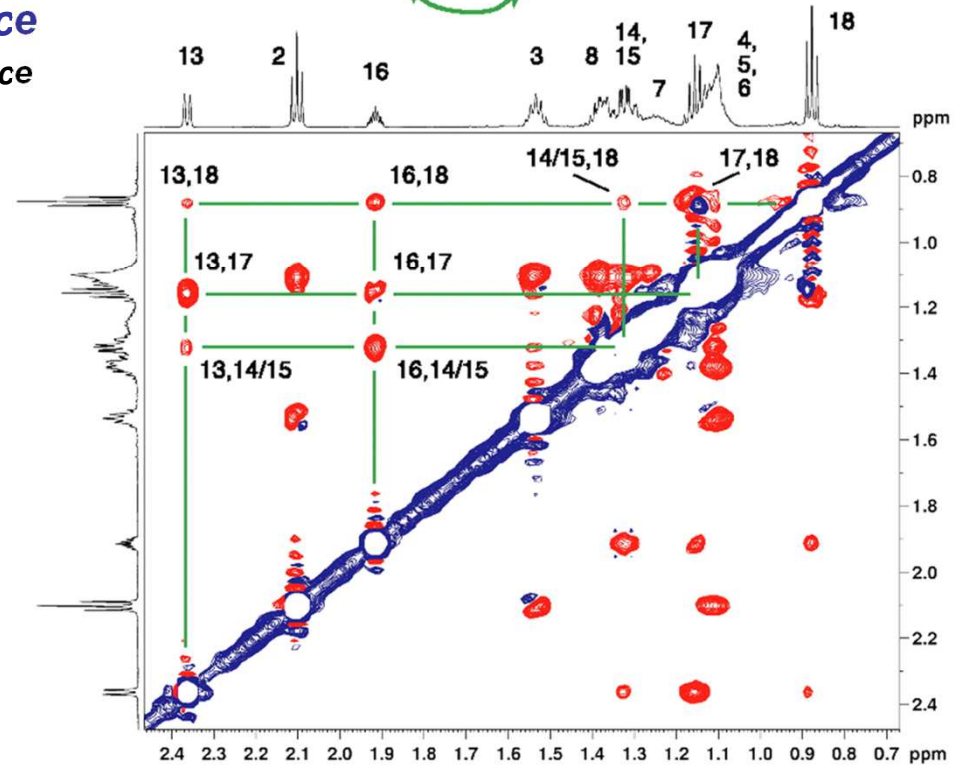
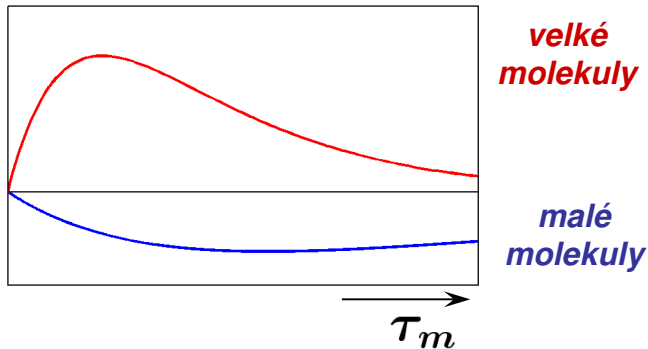
efekt ovlivněn pohybem a relaxačními vlastnostmi „příjemce“
obtížné přesně kvantifikovat

NOESY

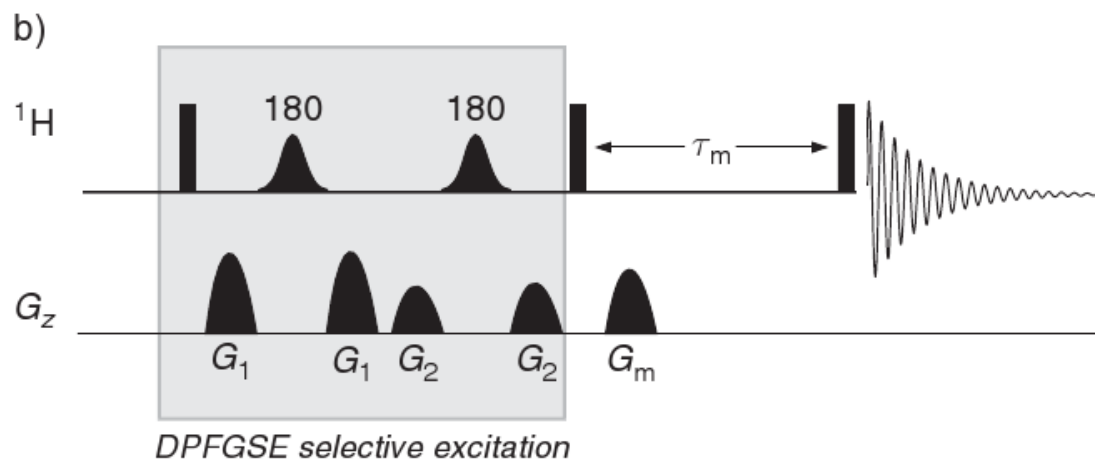
^1H - ^1H korelace vyjadřující prostorovou blízkost



dynamika intenzity krospíku

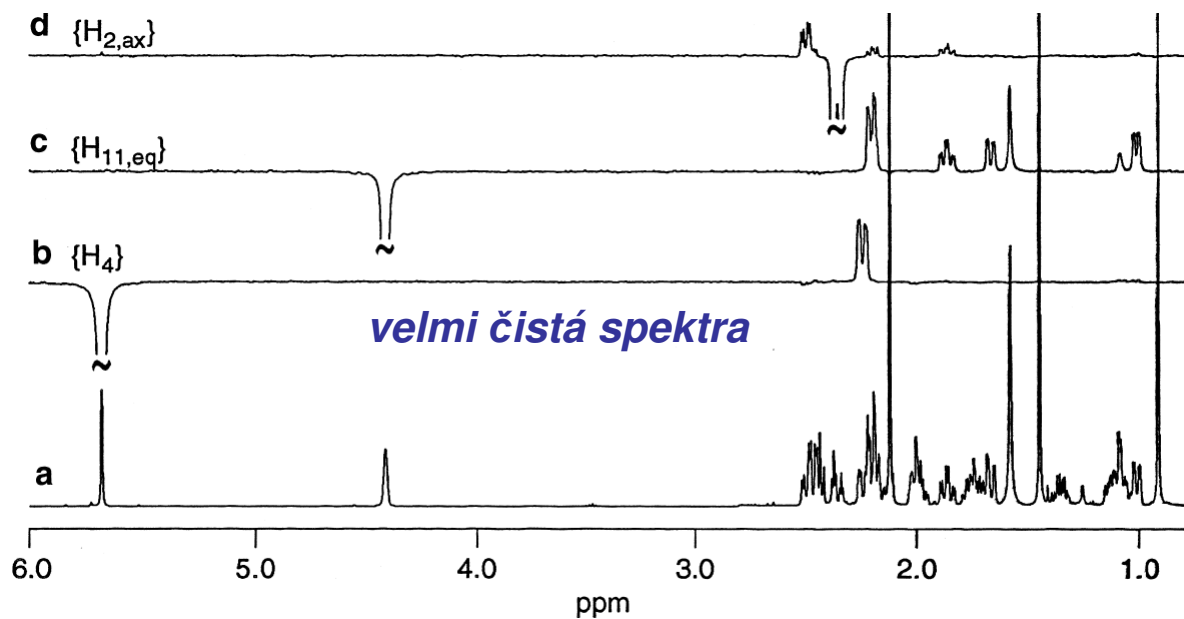
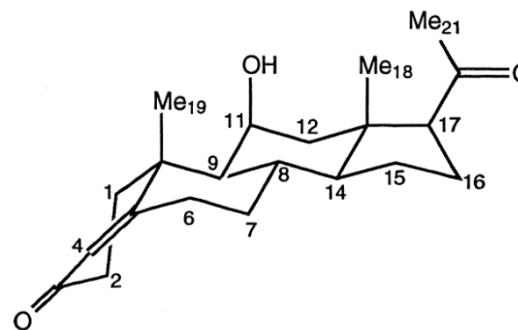


DPFGSE-NOE

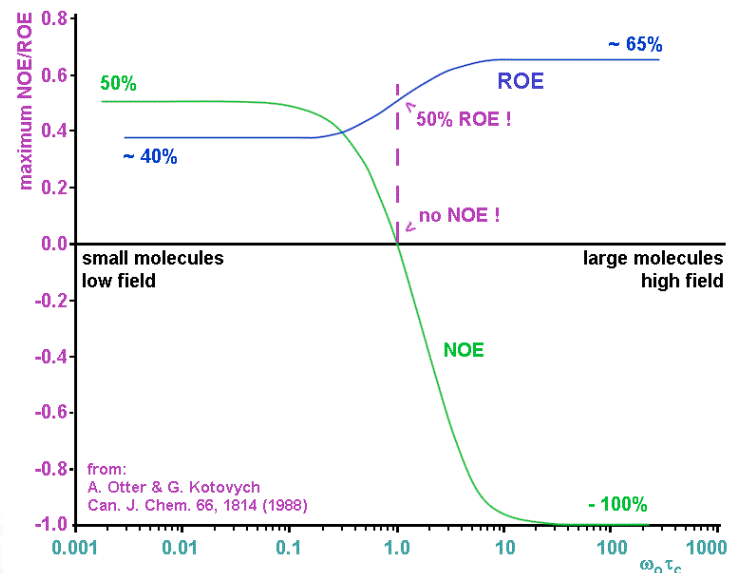
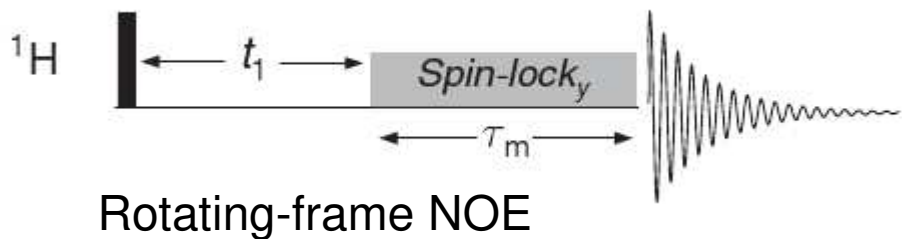


selektivní excitace

přímě viditelné NOE

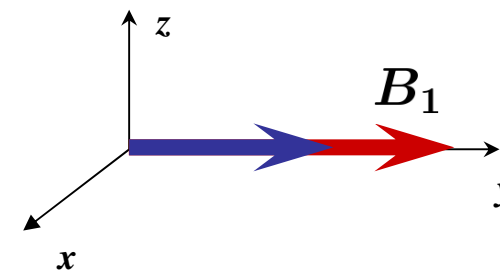
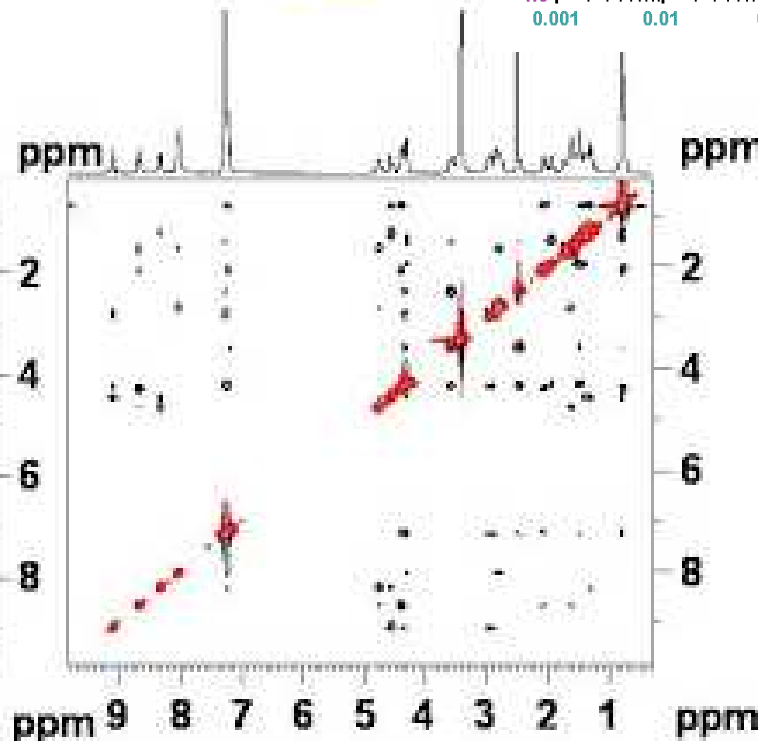
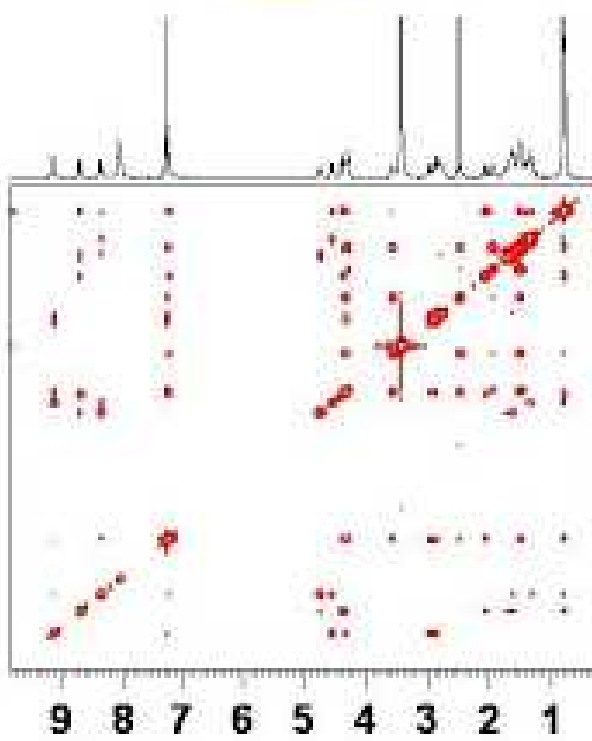


ROESY



NOESY

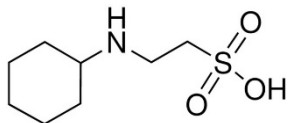
ROESY



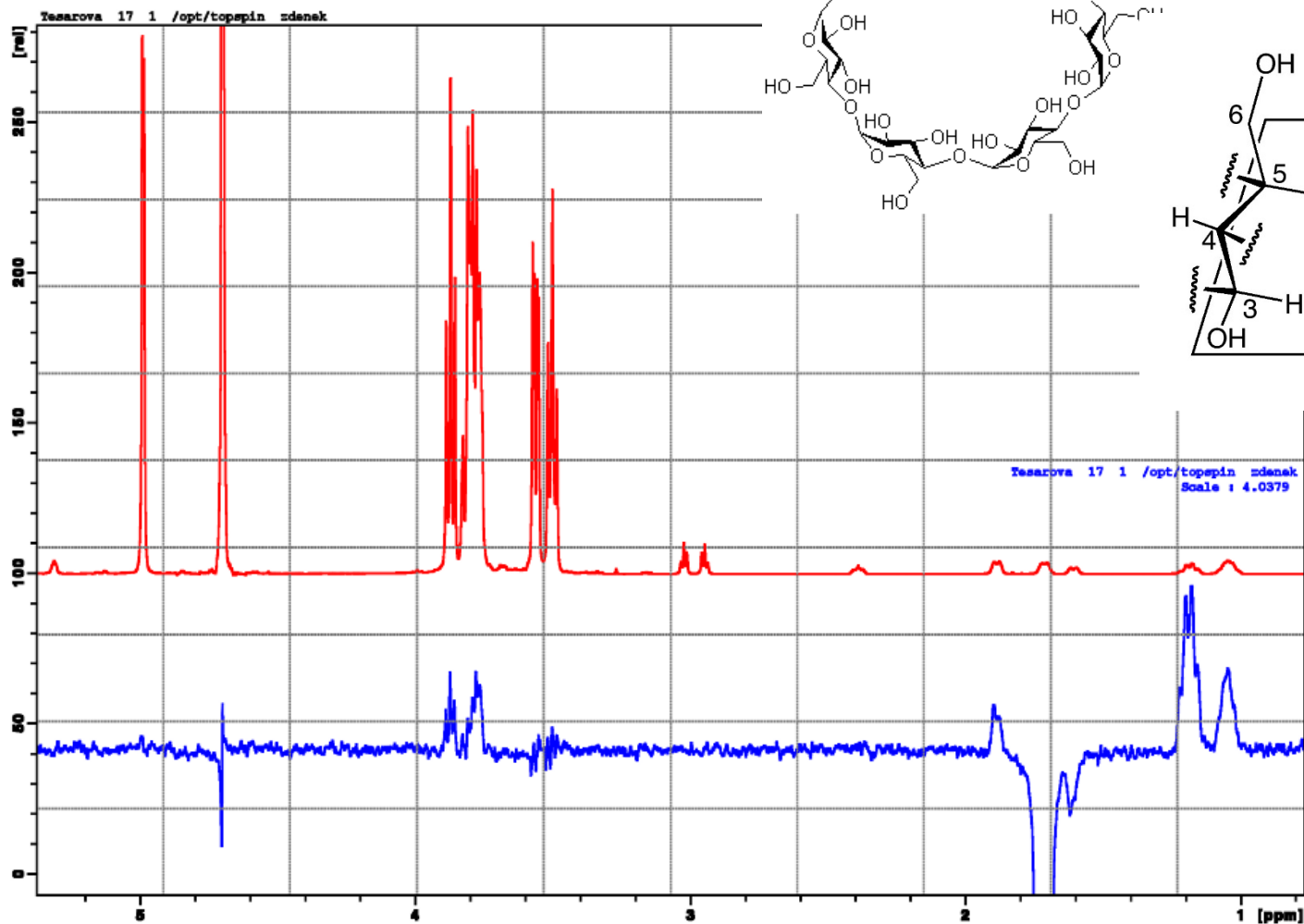
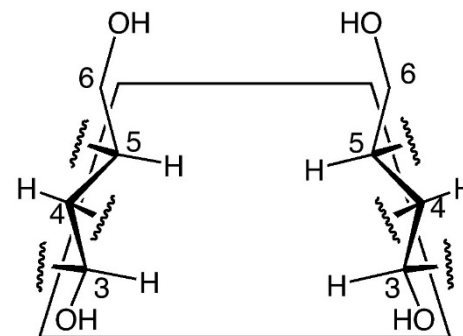
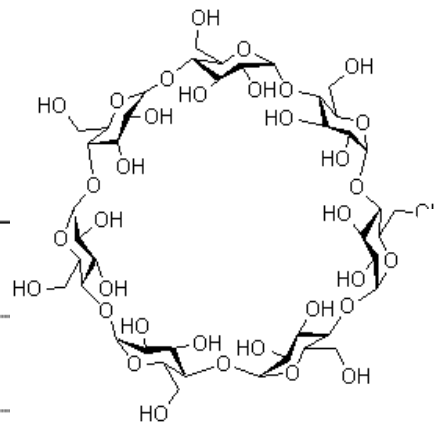
gramicidin

Selektivní ROE

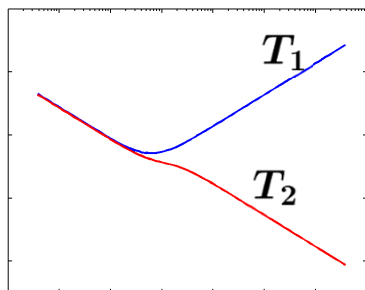
CHES



β -CD



Využití relaxačních vlastností



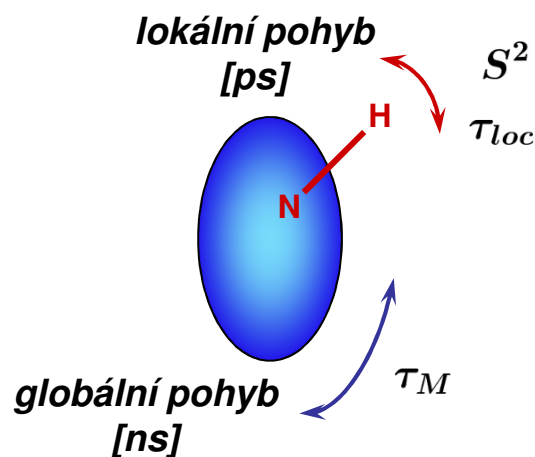
T_1 , heteronukleární NOE, T_2

piko- až nano-sekundová dynamika

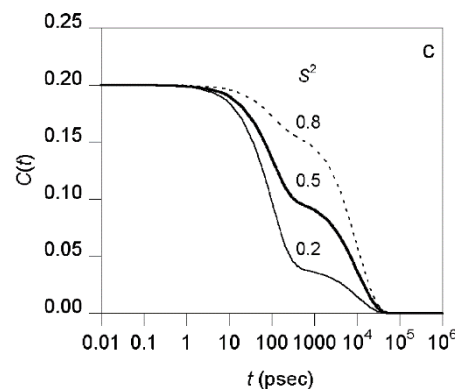
Relaxační mechanismy

- přímá dipól-dipólová interakce
*hustá síť interací $^1\text{H} - ^1\text{H}$
relativně izolované $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$, $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$*
- anizotropie chemického posuvu
karbonyl ^{13}C , ^{15}N v peptidické vazbě

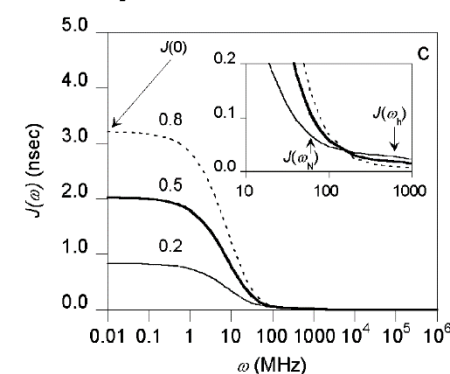
„model-free“ analýza
(Lipari-Szabó)



korelační funkce



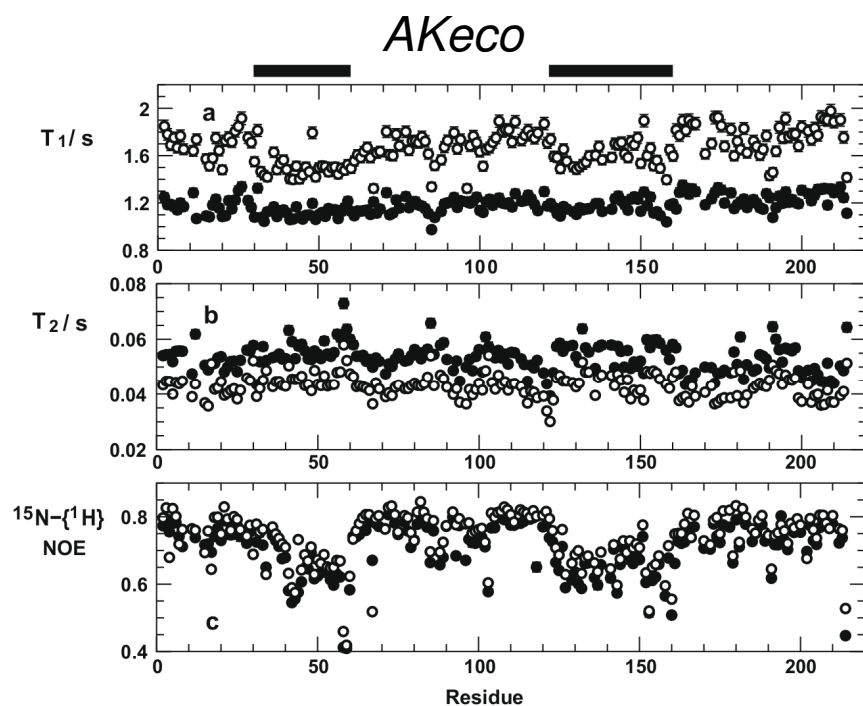
spektrální hustota



relaxační rychlost je lineární kombinací spektrálních hustot při různých frekvencích

Využití relaxačních vlastností

Dynamika – flexibilita proteinové páteře



flexibilní část

(neuspořádanost je proteinu vlastní)

vazebné místo pro Ca^{2+}

(stane se rigidní při vazbě vápníku)

relaxace páteřních ^{15}N

*sada HSQC experimentů
vyhodnocování intenzit*

optimálně měřit ve více magnetických polích

calbindin D_{9k}

