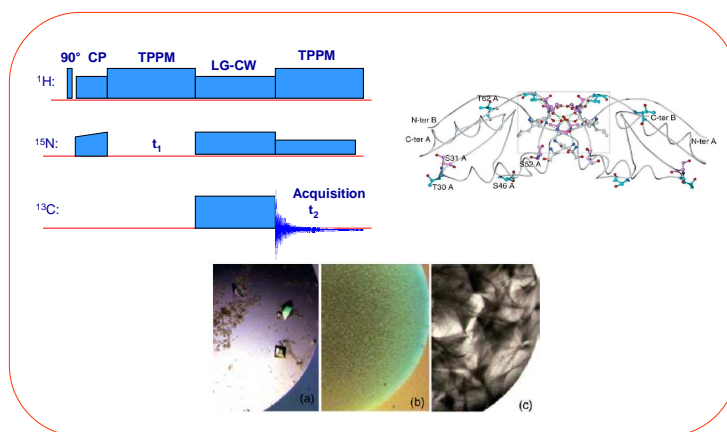


## (10) NMR pevné fáze a proteiny

Joint Laboratory of Solid State NMR  
MDC AS CR and LFPCAS CR



Stejně jako je tomu v případě NMR roztoků a kapalin, hlavní úsilí NMR spektroskopiků se soustředilo na řešení 3D struktury proteinů. Jde především o membránové a amyloidové proteiny, které jen velmi neochotně poskytují krystaly vhodné k rtg. difrakci, a pak také jde o mikrokrytalické nebo nanokrytalické proteiny. Je sice pravda, že pokročilé NMR techniky již více jak deset-dvacet let umožňují určit úplnou tří-dimenzionální strukturu proteinů v roztoku a Kurt Wüthrich za rozvoj těchto technik získal **v roce 2002 Nobelovu cenu. Na druhou stranu první solid-state NMR struktura SH3 domény a-spektrinu byla prezentována právě až v roce 2002. Avšak i přes toto zpoždění NMR spektroskopie pevného stavu překročila hranice fyziky a chemie a začala významně ovlivňovat biochemii a strukturní biologii.**

## Orientované systémy – membránové proteiny

Stabilita NMR spektrometrů – digitální technologie

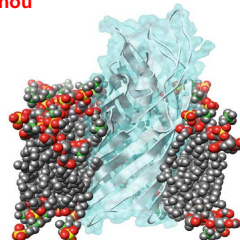
Joint Laboratory of Solid State NMR  
AMC AS CR and JRC ACIS CH



Opella S.J.

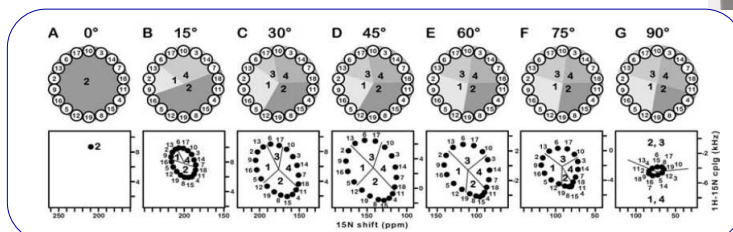
Strukturální biologie  
Membránové proteiny – orientace a geometrie proteinu který prochází membránou

Wu C.H., Ramamoorthy A., Opella S.J., *High Resolution Dipolar Solid-State NMR*, *J.Magn.Reson. A* (1994); 109: 270.



PISEMA:

Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle

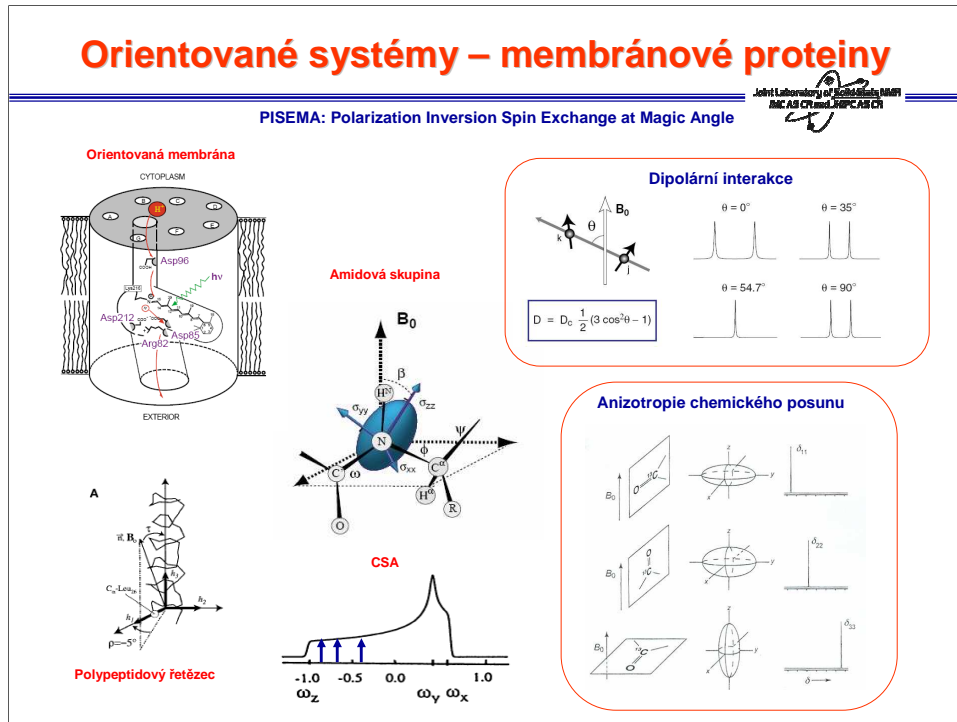


V devadesátých letech došlo k prudkému rozvoji vícedimenzionálních experimentů a to především díky digitální technologii a rostoucí stabilitě NMR spektrometrů. Již bylo jasné, že NMR spektroskopie pevného stavu je dostatečně silný nástroj k posouzení strukturálních parametrů řady biologických systémů a proto se úsilí badatelů soustředilo na řešení struktury membránových proteinů. V této souvislosti za zcela unikátní považují techniku separace lokálních polí, která je známá pod názvem PISEMA. Tato technika byla vyvinuta tak, aby umožnila určit geometrii proteinového řetězce při průchodu lipidovou membránou. Při analýze se proto pracuje s orientovaným vzorkem, který je umístěn na tenkém sklíčku. Jde tedy o experiment ve statickém uspořádání, kdy se nevyužívá rotace vzorku pod magickým úhlem. Anizotropní interakce jako je CSA nebo dipolární interakce jsou tak zcela zachovány.

# Orientované systémy – membránové proteiny

PISEMA: Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle

Joint Laboratory of Biophysics and  
 NMR  
 AMB, AS CR and JRC, AS CR



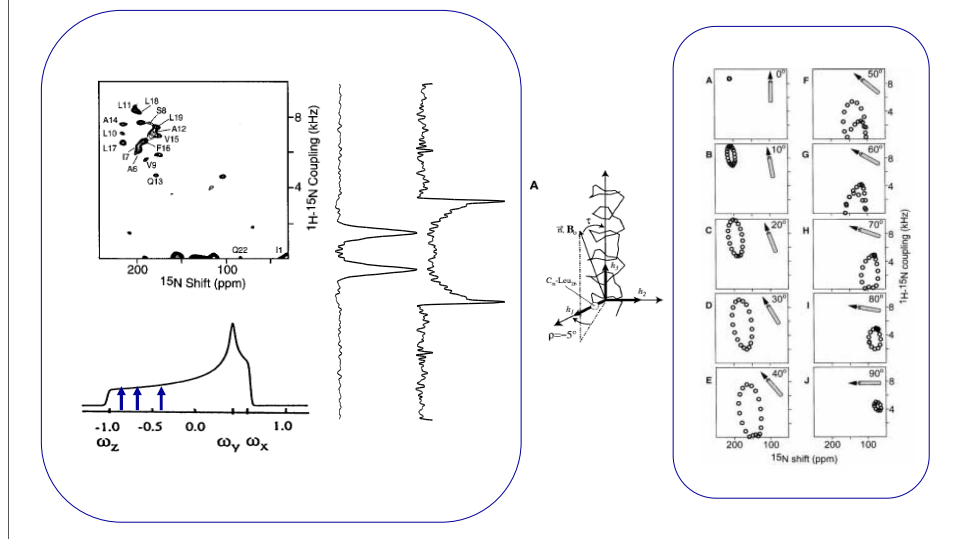
PISEMA experiment je navržen tak aby koreloval velikost anizotropie chemického posunu a velikost 1H-15N dipolární interakce a to pro každý amidový dusík podél peptidového řetězce. Membránový protein, proto musí být selektivně obohacen dusíkem 15N v místě amidových skupin hlavního řetězce. Představme si amidovou jednotku a tedy i „izolovaný“ N-H spinový pár. Víme, že každá různá orientace tohoto páru vzhledem ke směru vnějšího magnetického pole produkuje jinou velikost dipolární interakce. Je-li meziatomová vzdálenost konstantní a to v jednoduchém přiblížení můžeme předpokládat, pak velikost dipolární interakce odráží pouze orientaci NH vektoru. Stejně tak víme, že díky CSA produkuje každá různá orientace tenzoru chemického posunu vzhledem ke směru magnetického pole jiný chemický posun. Kdybychom měli neorientovaný systém tak díky CSA získáme práškové spektrum, ale v případě orientovaného vzorku, kde každý řetězec má stejnou orientaci, detekujeme jeden jediný a úzký signál pro každou specifickou amidovou skupinu.

## Orientované systémy – membránové proteiny

Joint Laboratory of **Biotechnology** and **Chemistry**  
**AMC AS CR and JRC ACB CH**

PISEMA:

Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle



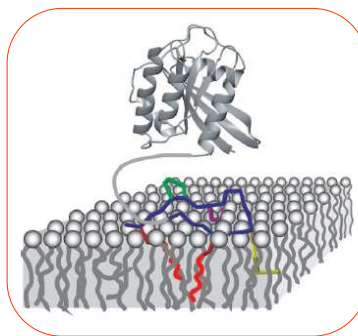
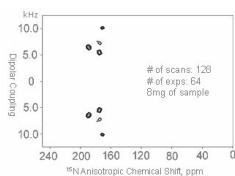
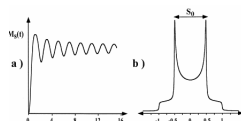
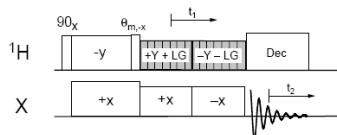
Díky tomu pak ve spektrech lze korelovat pro každou amidovou skupinu anizotropní chemický posun a k tomu příslušnou velikost dipolární interakce. Obvykle se spektra snímají pouze v jedné polovině dipolárního spektra, protože druhá část je přesný zrcadlový obraz. Zajímavé na tom je to, že membránový protein izotopicky obohacený  $^{15}\text{N}$  na hlavním řetězci díky této technice produkuje poměrně specifická spektra. Proměnlivá orientace NH skupin peptidových řetězců procházejících membránou totiž vede ke vzniku kružnic a elips, které přímo odrážejí úhel sklonu průchodu peptidového barelu lipidovou membránou.

## Orientované systémy – membránové proteiny

Joint Laboratory of Biomolecular NMR  
 AMC AS CR and JRC ACB CH

### PISEMA:

Polarization Inversion Spin Exchange at Magic Angle

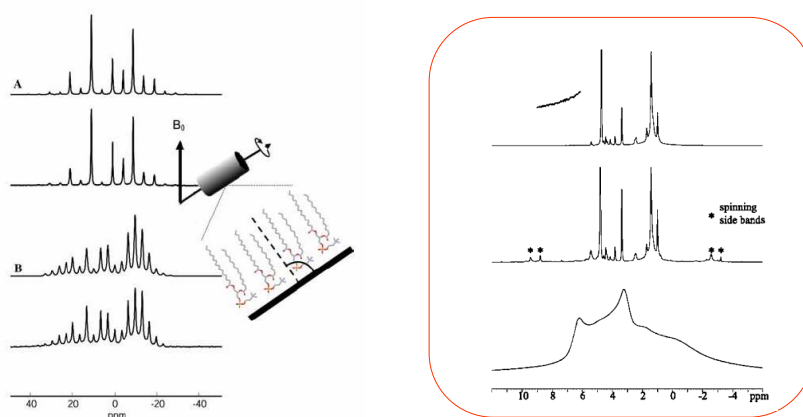


Vlastní technika je v podstatě velmi jednoduchá. Nejprve se během cross-polarizace vytvoří uhlíková transverzální magnetizace, ta se během následující periody vyvíjí pouze pod vlivem heteronukleární dipolární interakce. Následné a opakující se bloky vlastně reprezentují LG-cross-polarizaci, o které víme, že vyvolá oscilační chování <sup>13</sup>C magnetizace a velmi účinně potlačí vliv homonukleárních <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H dipolárních interakcí. Po této periodě pak následuje perioda během níž se snímá uhlíkový chemický posun. Výsledkem je 2D spektrum, které koreluje CSA a dipolární interakce. Zde je uvedeno celé spektrum, ale obvykle se snímá pouze jedna polovina, která je dostatečná k popisu systému. Analýza a následná simulace rozložení korelačních signálů pak vede ke stanovení úhlu průchodu peptidu membránou a umožní stanovit geometrii zkoumaného systému.

## Orientované systémy – membránové proteiny

Joint Laboratory of Biomembranes  
AMC AS CR and JRC AS CR

### Magic Angle-Oriented Sample Spinning (MAOSS)



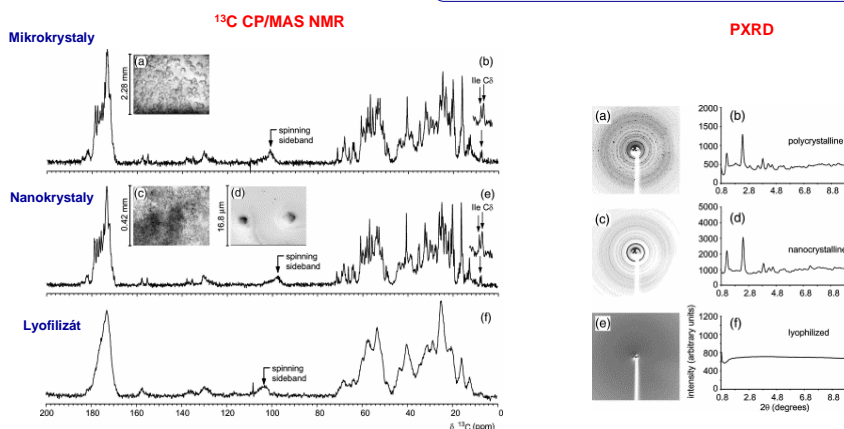
V některých případech může být u těchto systémů zajímavé i uspořádání vlastních molekul lipidů. Pro tyto účely se začaly používat metody, které jsou založené na simulaci intenzit rotačních signálů. Opět se pracuje s orientovaným materiálem. V tomto případě však nejde o uspořádání statické, ale celý orientovaný vzorek rotuje pod magickým úhlem. Obvyklé frekvence rotace jsou ale velmi pomalé do 5 kHz a přednostně se měří spektra  $^{31}\text{P}$  a  $^1\text{H}$ . Je to ovšem technika dost náročná na přípravu vzorku, jednotlivé orientované vrstvy se na sebe musí opatrně skládat. Výsledkem těchto experimentů a simulací pak jsou informace o uspořádání a orientaci lipidů v membráně.

## Nanokrystalické proteiny – příprava vzorku

Joint Laboratory of Solid State NMR  
AMC AS CR and JRC EC

Ubiquitin

Martin R.W., Zilm K.W., Preparation of protein nanocrystals and their characterization by solid state NMR, *J.Magn.Reson.* (2003); 165: 162.



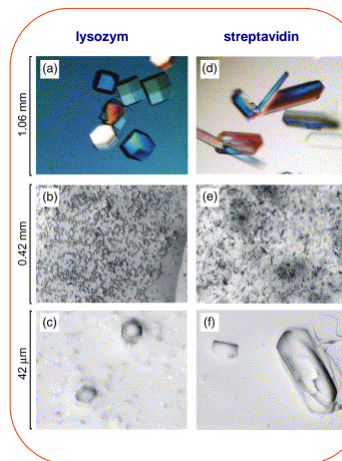
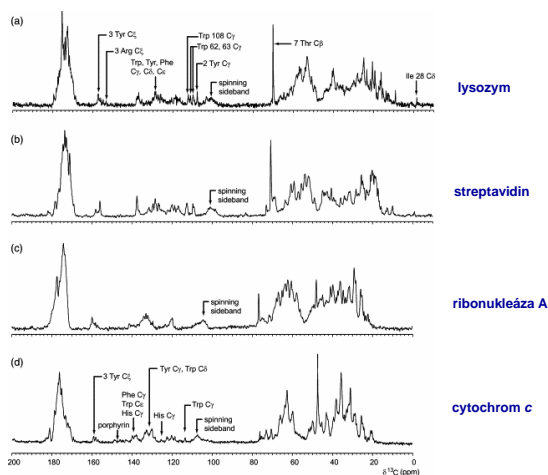
Ovšem nezůstalo jen u membránových a orientovaných systémů. Zájem se v současné době soustřeďuje i na nanokrystalické či mikrokrystalické systémy, které nelze jednoduše podrobit rtg. analýze. Pro strukturální analýzu těchto materiálů je zásadním problémem získání kvalitního vzorku. Každý student ví že krystalizace je velmi jednoduchá metoda užívaná k čištění a izolaci organických sloučenin. Krystalizace proteinů je však zásadně odlišná, velmi komplikovaná a mnohdy neúspěšná. Přitom kvalita krystalizace určuje jak úspěšná bude následná NMR analýza. Zde jsou uvedeny rozdíly ve vzhledu  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spekter v závislosti na kvalitě krystalizace a velikosti krystalů. Je zřejmé že nanokrystaly o velikosti cca 100 nm (obsahují několik tisíc krystalových buněk) i řádově větší mikrokrystaly produkují stejná a velmi dobře rozlišená NMR spektra. Ztráta jednotné konformace v lyofilizovaném vzorku se však promítne do značného rozšíření NMR signálů. A tak  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektra mohou jednoduše poskytnout informace o kvalitě vzorku a jeho přípravě. Doba měření jen pár hodin.

## Nanokrystalické proteiny – příprava vzorku

Joint Laboratory of Solid State NMR  
AMC AS CR and JRC AC CH

$^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR  
(800 MHz  $^1\text{H}$ )  
Nanokrystaly

Martin R.W., Zilm K.W., Preparation of protein nanocrystals and their characterization by solid state NMR, *J.Magn.Reson.* (2003); 165: 162.

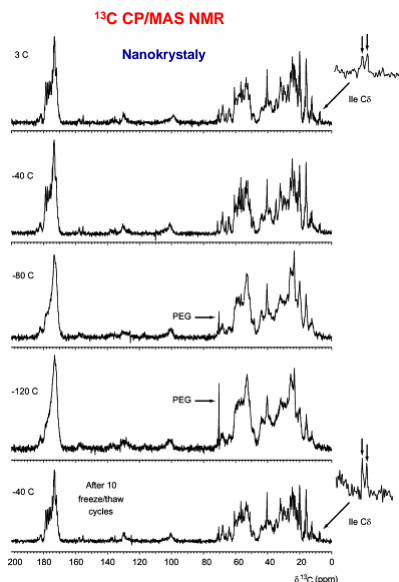


Zde jsou uvedena  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektra nanokrystalických proteinů: lysozym, streptavidin, ribonukleázy A a cytochromu c. Ve všech případech je uvedeno částečné přiřazení málo intenzivních signálů, jejichž rozlišení je vždy důkazem toho, že se jedná o velmi dobře připravený nanokrystalický materiál. Ze štěpení některých specifických signálů lze již rovnou tvrdit, že v případě streptavidinu se jedná o tetramer.



## Nanokrystalické proteiny – příprava vzorku

Joint Laboratory of Solid State NMR  
AMC AS CR and JRC ACB CH



Martin R.W., Zilm K.W., Preparation of protein nanocrystals and their characterization by solid state NMR, *J.Magn.Reson.* (2003); 165: 162.

### Příprava nanokrystalických vzorků

1. Proteiny dodala firma Sigma
2. Směs proteinového roztoku a krystalizačního roztoku 1:1 (P.C.Weber, Overview of Protein Crystallization Methods, vol. 276, San Diego, 1997, 13-21).
3. Roztok obsahuje asi 100 mg proteinu.
4. Roztok byl pomalu koncentrován na cca. polovinu počátečního objemu (centrifugační odparka).
5. Teplota 25C a doba zahušťování byla 15-40 min.
6. Inkubace probíhala při 4C.
7. Jako srážecí činidlo byl použit PEG.

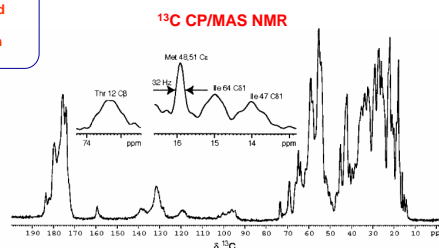
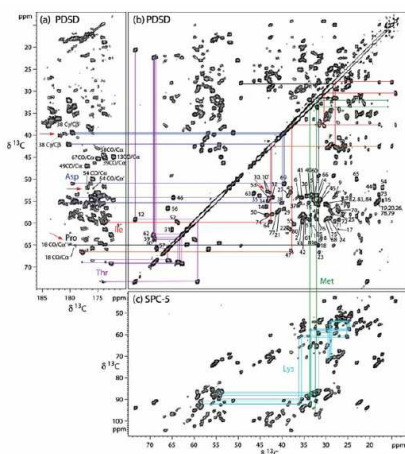
Krystaly biologických systémů jsou velmi často velice citlivé na změny teploty a cyklické tepelné namáhání. To je obzvláště zásadní problém pro NMR spektroskopii, kde vzorek je velmi často podrobován řadě analýz a opakovaných měření. V případě ubiquitinu, který byl cyklicky tepelně namáhán se ukázalo, že mezi 3 a -40 C dochází jen k nepatrným změnám v NMR spektru a že je vzorek tedy stabilní. Ovšem pod touto teplotou se jasně projeví efekt zmrznutí a signály se dramaticky rozšiřují. Zároveň je jasně patrný nárůst intenzity signálu PEG, který začíná být značně imobilizovaný. Tato změna je však vratná, protože ohřátí vzorku vede k opětovnému zúžení NMR signálů. Ukazuje se, že protein je odolný i vzhledem k několikanásobným cyklickým tepelným změnám.

Jak byly tedy dané vzorky připraveny? Jednoduše.

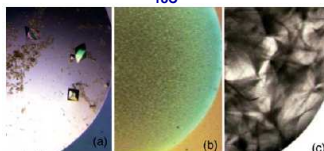
## Bacillus subtilis protein Crh



Anja Böckmann, Adam Lange, Anne Galinier, Sorin Luca, Nicolas Giraud, Michel Juy, Henrike Heise, Roland Montserret, François Penin, Marc Baldus. **Solid state NMR sequential resonance assignments and conformational analysis of the 2 x 10.4 kDa dimeric form of the *Bacillus subtilis* protein Crh**, *J. Biomol. NMR* 27, 323 (2003).



2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>    10-30% PEG  
 1,000-10,000  
 pH 6-8, 20mM  
 (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>  
 nad roztokem NaCl  
 18C



(catabolite repression histidine containing phosphocarrier protein)  
 2x85 rezidui

Jedním z prvních proteinů, které byly úspěšně zkoumány ssNMR, je Crh protein, který v mikrokrytalickém stavu tvoří dimer na rozdíl od roztoku, kde je pouze monomerní forma. V citované práci je velmi dobře popsána příprava a krystalizace a autoři tvrdí, že stejný postup lze použít i pro ostatní globulární proteiny. Ačkoli je vzorek stabilní až do 30°C tak autoři sledovali, že během experimentu zvláště při náročném dekaplinku na několika kanálech najednou se některé signály ztrácejí. Vznik teploty zřejmě způsobil vznik pohyblivosti a tím i malou efektivitu CP.

Vlastní řešení struktury je založeno na vyhodnocování série 13C-13C korelačních spekter (PDSD). Jde o přímou výměnu polarizace mezi uhlíkovými jádry, která je urychlena interakcí s vodíky. (Nejde o 1H-1H spinovou difuzi). Z uvedených spekter je zřejmé, že 2D spektrum poskytne velmi dobré rozlišení i když rozlišení 1D spektra je relativně slabé. Vedle spin-difuzních experimentů se také používají experimenty dvou-quantové (podobné INADEQUATE experimentu), ovšem s touto modifikací, že korelace je zprostředkována dipolárními interakcemi a ne skalárními.

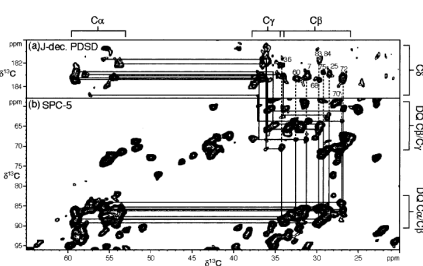
## Bacillus subtilis protein Crh



Anja Böckmann, Adam Lange, Anne Galinier, Sorin Luca, Nicolas Giraud, Michel Juy, Henrike Heise, Roland Montserret, François Penin, Marc Baldus. **Solid state NMR sequential resonance assignments and conformational analysis of the 2 x 10.4 kDa dimeric form of the Bacillus subtilis protein Crh.** *J. Biomol. NMR* 27, 323 (2003).

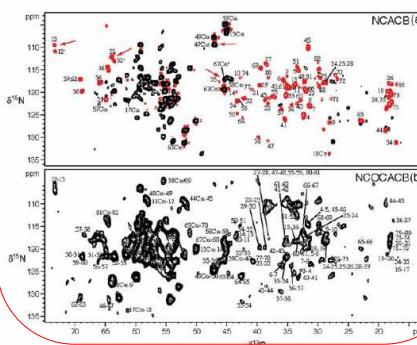
### Intra-reziduální korelace:

1. 2D (1Q-1Q) PDSD – krátká spin difusní perioda (jedno- až tří-vazebné interakce)
2. 2D (2Q-1Q) – krátká excitační perioda pro DQC (identifikace jedno-vazebné interakce)
3. 2QF experimenty – rozlišit a identifikovat spinový systém blízko diagonály



### Inter-reziduální korelace:

1. Kombinace NCACB a NCOACB experimentů umožňuje sekvenční přiřazení
2. Dvojitá cross-polarizace – frekvenčně selektivní experimenty SPECIFIC CP
3. DQC



Přiřazení signálů je první krok a stejně jako v případě roztoků je založeno na homonukleárních ( $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ ) a heteronukleárních ( $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ ) korelacích uvnitř aminokyselinových zbytků. Pro intrareziduální korelace se nejčastěji používá  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  korelační experiment s velmi krátkou spin-difusní periodou, kterou lze zvolit tak, aby vznikly korelační signály postupně pro jedno-vazebnou, dvou-vazebnou a tří-vazebnou interakci. Pak se také používají dvou-quantové  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  korelační experimenty, které dokážou velmi dobře identifikovat jedno-vazebné páry. No a v neposlední řadě DQF experimenty jsou vhodné k identifikaci spinových párů, jejichž korelační signály se nachází velmi blízko diagonále.

Pro inter-reziduální korelace je nutné využít heteronukleárních korelačních experimentů založených na frekvenčně selektivních dvojitých cross-polarizacích kombinovaných s excitací více-quantových koherencí. Heteronukleární korelační experimenty lze také uspořádat tak, že jedno-vazebný a tří-vazebný přenos polarizace je určen pozitivním signálem, zatímco dvou-vazebný přenos signálem negativním. Každý protein má specifickou část, která je vhodná k začátku sekvenčního přiřazení. Obecně to jsou rezidua s výrazným chemickým posunem nebo rezidua, kterých je v molekule velmi málo.

## Bacillus subtilis protein Crh

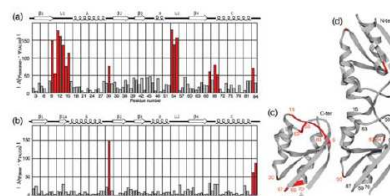
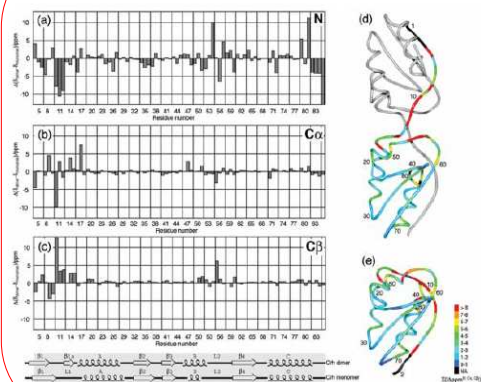


Anja Böckmann, Adam Lange, Anne Galinier, Sorin Luca, Nicolas Giraud, Michel Juy, Henrike Heise, Roland Montserret, François Penin, Marc Baldus. **Solid state NMR sequential resonance assignments and conformational analysis of the 2 x 10.4 kDa dimeric form of the Bacillus subtilis protein Crh**, *J. Biomol. NMR* 27, 323 (2003).

Porovnání chemických posunů s monomerní strukturou v roztoku

TALOS

Porovnání chemických posunů s monomerní strukturou v roztoku



Zdvojení některých signálů:

N – Gly 49 a 67  
CO – Pro 18, Ala 45...

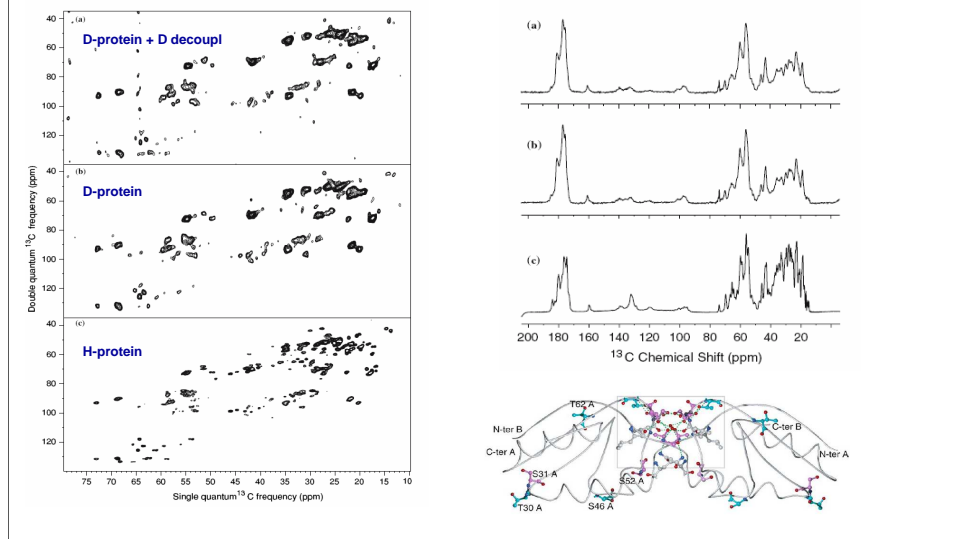
1. Konformační rozdíly monomerů v dimeru.
2. Rozdílné konformace dimeru v krystalové jednotce.
3. Dynamický disorder – pomalá výměna.

Jako obvykle výsledkem NMR experimentů jsou především hodnoty chemických posunů a velikosti meziatomových vzdáleností, které odrážejí zkoumanou strukturu. Např. v případě Crh proteinu největší rozdíly v chemických posunech signálů v pevné fázi a v roztoku vykazují dusíky  $^{15}\text{N}$ , kde zjištěná střední odchylka je kolem 2ppm. U uhlíku  $^{13}\text{C}$  je to jen 1 ppm. Celkem byly nalezeny tři oblasti, kde jsou odchylky největší. Bylo zjištěno, že právě tyto části proteinu jsou zapojeny do tvorby dimeru. Nejdrastičtější změna konformace zřejmě proběhne kolem Lys 11 a Glutaminu 15. Zde dochází ke křížení polypeptidových řetězců a spojování mezifáze a jádra proteinu. V případě monomeru tato část proteinového řetězce tvoří smyčku. Kolem N-konce dojde dimerizací ke změně partnerů pro tvorbu vodíkových vazeb. Shodné oblasti též vykazují maximální změny dihedrálních úhlů. Ty se určují pomocí programu TALOS. Některá rezidua jako Gly 49 a 67 mají zdvojenou dusíkovou rezonanci zatímco karbonylový signál je zdvojený u Pro 18 a Ala 54 atp. Existují tři možná vysvětlení:

## Bacillus subtilis protein Crh

Joint Laboratory of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR  
AMC AB CPmad, JRCF AB CH

Mikrokrystalický protein Crh  
(catabolite repression histidine containing phosphocarrier protein)



U proteinů v pevné fázi se také studuje hydratační slupka nebo interakce molekul vody s proteinovým řetězcem. Pro tyto účely je vhodné protein deuterovat a následně deuterium vyměnit za vodík <sup>1</sup>H na místech která jsou k chemické výměně náchylná. Deuterace v mnoha případech vede k rozšíření rezonancí a to je způsobeno, jak již víme, neúplnou deuterací. Molekuly nejsou vzhledem k zastoupení deuteria zcela jednotné. To prokázaly INADEQUATE experimenty (lekce 9).

# Bacillus subtilis protein Crh

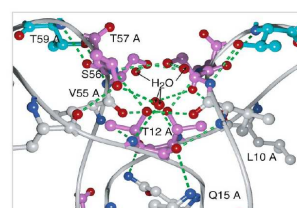
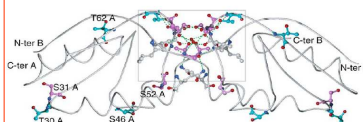


Hydratace proteinu – Stabilita, správná konformace, vodíkové vazby...

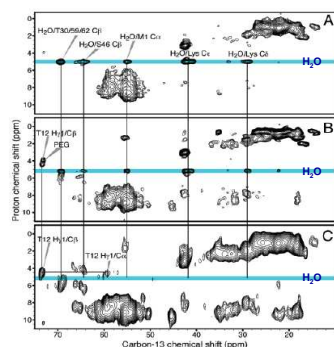
A. Böckmann, M. Juy, E. Bettler, L. Emsley, A. Galinier, F. Penin, A. Lesage, **Water-Protein Hydrogen Exchange in the Micro-Crystalline Protein Crh as Observed by Solid State NMR Spectroscopy**, *Journal of Biomolecular NMR*, 32 195 (2005).

Anne Lesage, Lyndon Emsley, Francois Penin, and Anja Bockmann, **Investigation of Dipolar-Mediated Water-Protein Interactions in Microcrystalline Crh by Solid-State NMR Spectroscopy**, *J Am Chem Soc* 128, 8246 (2006).

**Mikrokrystalický protein Crh**  
(catabolite repression histidine containing phosphocarryer protein)



**2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HETCOR – mikrokrystalický systém**



Detekce imobilizovaných i pohyblivých molekul (rezidenční čas – jednotky ns)

Přímá chemická výměna H<sub>2</sub>O-OH

Detekce zcela imobilizovaných a fixovaných molekul (rezidenční čas – jednotky μs)

Strukturované molekuly vody zřejmě hrají nějakou roli při vytváření správné terciální struktury proteinu. Pomocí 1H-13C korelačních spekter byla nalezena místa kolem proteinu, která jsou snadno dostupná z roztoku a kde dochází k chemické výměně s vyměnitelnými vodíky Lys, Tyr, Hpro atp. Doba setrvání molekul vody na daném místě je však maximálně několik set ns. Vůbec se ale nepodařilo prokázat existenci takových molekul vody, které by vykazovaly specifickou interakci s proteinem a na daném místě setrvali déle než zmiňovaných pár desítek ns.

Crh protein studuje několik předních evropských skupin kontinuálně od roku 2002 a poslední práce jsou z letošního roku.

# $\alpha$ -Spectrin Sh3 Domain

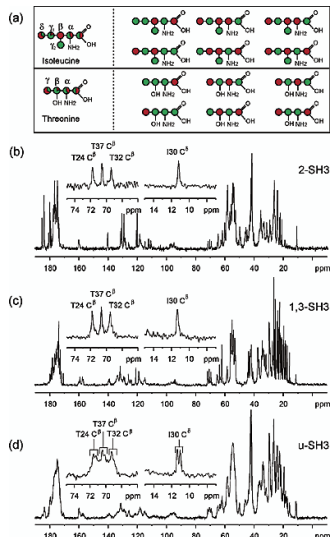
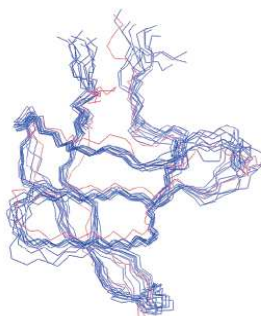
Izotopicky obohacené systémy – 2D a 3D experimenty NCC



Castellani, F., van Rossum, B.J., Diehl, A., Schubert, M., Rehbein, K., and Oschkinat, H. **Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy**, *Nature* 420, 98-102 (2002).

Castellani, F., van Rossum, B.J., Diehl, A., Rehbein, K., and Oschkinat, H. **Determination of Solid-State NMR Structures of Proteins by Means of Three-Dimensional  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  Dipolar Correlation Spectroscopy and Chemical Shift Analysis**, *Biochemistry* 42, 11476 (2003).

$\alpha$ -Spectrin Sh3 Domain



První protein, jehož struktura byla úspěšně vyřešena pomocí principů NMR spektroskopie pevného stavu však byla SH3 doména  $\alpha$ -spektrinu, která má jen 64 aminokyselinových zbytků.

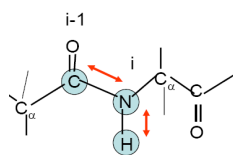
Obecně platí, že pro určení sekundární struktury polypeptidového řetězce je nutno změřit vzdálenosti mezi  $\alpha$ -uhlíky nebo karbonylovými uhlíky. Ovšem pro určení celkové struktury se musí měřit uhlík-uhlíkové vzdálenosti s dlouhým dosahem. To je ale možné pouze tehdy pokud tyto relativně slabé nebo velmi slabé interakce nejsou potlačeny interakcemi silnějšími. Aby k tomuto procesu, který je znám jako „dipolar truncation“ nedošlo, je často nutné naředit obsah aktivních izotopů  $^{13}\text{C}$ . Biologický materiál lze částečně obohatit poměrně snadno. Pro bakteriální expresi proteinů se k tomuto účelu s velkou výhodou využívá jako růstového média 2- $^{13}\text{C}$  glycerol nebo 1,3- $^{13}\text{C}$  glycerol. Již zúžení  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spekter je velmi slibné a na základě provedení několika NCOCX a NCACX 3D experimentů bylo díky tomuto izotopovému zředění identifikováno nově 374 inter-reziduálních korelací, v porovnání s uniformně obohaceným materiálem. (Pro tato měření bylo použito 10-12 mg vzorku ve 4 mm kyvetě.)

# $\alpha$ -Spectrin Sh3 Domain

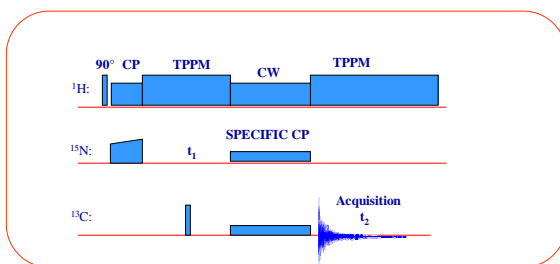
Izotopicky obohacené systémy – 2D experimenty NC



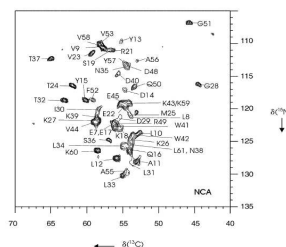
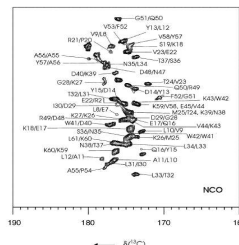
Castellani, F., van Rossum, B.J., Diehl, A., Schubert, M., Rehbein, K., and Oshikiri, H. **Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy**, *Nature* 420, 98-102 (2002).



$$\sqrt{\omega_1^2 + \Omega_1^2} + \sqrt{\omega_2^2 + \Omega_2^2} = n\omega_r$$



$\alpha$ -Spectrin Sh3 Domain



Přesná identifikace a kvantitativní interpretace long-range korelací obvykle vyžaduje provedení 3D experimentů, které jsou založeny na kombinaci dvojitě cross-polarizace, které umožní přenos magnetizace mezi heterojádry, a které jsou následovány homonukleární  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  korelací. Tato kombinace je navíc mnohdy spojená se selektivní excitací. Je samozřejmě jasné, že specifický přenos polarizace z amidového dusíku specificky buď na CO nebo CA uhlíky významně zvýší spektrální rozlišení a tedy i šance na správnou interpretaci dat. Tato selektivita je zařízena tzv. SPECIFIC-CP, která využívá toho faktu, že jsou-li dipolární interakce relativně slabé, je Hartmann-Hahnova podmínka modulována frekvencí rotace. Je-li navíc použito i nízké intenzity spin-lockovacích polí kolem 15 kHz, pak do hry vstupuje i vliv chemických posunů. A tak nastavením správného rezonančního offsetu lze určit zda dojde k přenosu polarizace z dusíku na CO nebo na Ca.

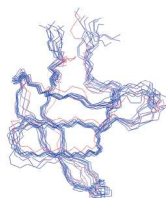


# $\alpha$ -Spectrin Sh3 Domain

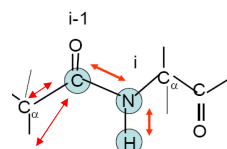
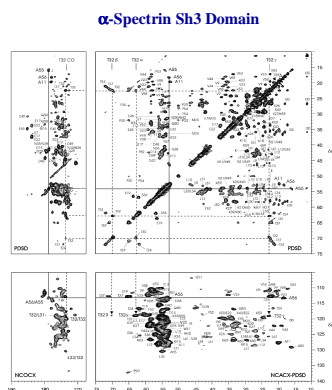
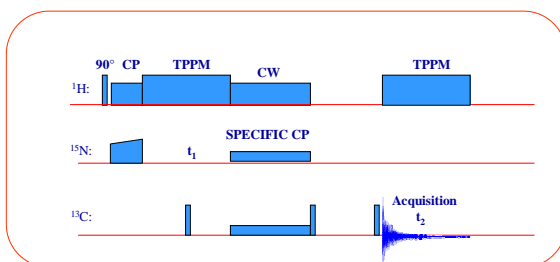


Izotopicky obohacené systémy – 2D experimenty NCC

Castellani, F., van Rossum, B.J., Diehl, A., Schubert, M., Rehbein, K., and Oshikiri, H. **Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy**, *Nature* 420, 98-102 (2002).



$$\sqrt{\omega_1^2 + \Omega_1^2} + \sqrt{\omega_2^2 + \Omega_2^2} = n\omega_r$$

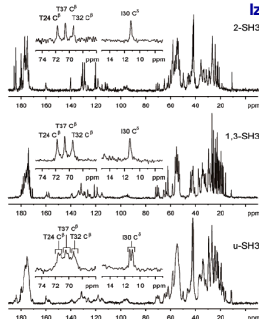


Ale toto je jen první krok k detekci a interpretaci slabých dipolárních interakcí a tedy k identifikaci vzdálených spinových párů. V druhém kroku je nutno experiment založený na dvojité cross-polarizaci rozšířit o periodu s  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  spinovou difusí. Ve 2D heteronukleárním korelačním spektru se vedle přímých korelačních signálů objevují i další, které korespondují se slabšími interakcemi mezi vzdálenými spinovými páry. Tyto experimenty mají ale jednu zásadní výhodu, jsou relativně krátké 10-15 hodin. Proto můžeme provést řadu těchto experimentů s proměnlivou dobou přenosu polarizace a tak dobře klasifikovat interakce a dipolární kontakty podle jejich intenzity. Přesto je někdy nutné experiment rozšířit do dalších rozměrů.

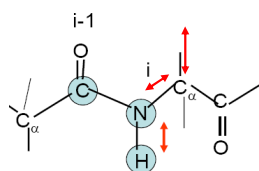
# $\alpha$ -Spectrin Sh3 Domain

Joint Laboratory of **Bohemia MRI**  
**AMC AB CY and JRC AB CH**

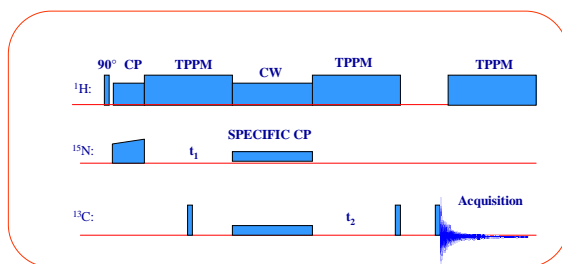
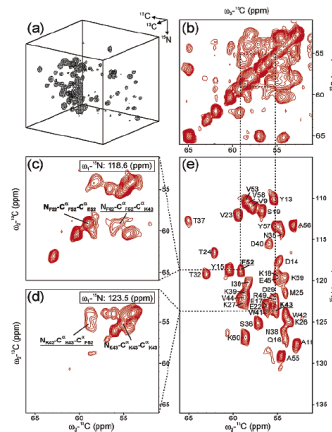
Izotopicky obohacené systémy – 3D experimenty NCC



$N, Ca, CX$



2 SH3 Domain

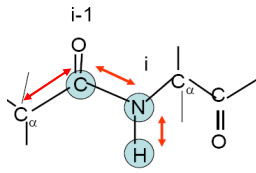
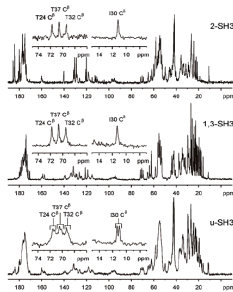


Strategie přiřazení signálů pomocí 3D NCACX experimentů je následující. Např. ve 3D spektru je zobrazena alifatická oblast  $^{13}C$  NMR spektra změřená pro 2-SH3 doménu alfa-spektrinu. V klasickém 2D  $^{13}C$ - $^{13}C$  korelačním spektru nejsou například korelace mezi CaK43 a CaF52 vůbec rozlišitelné. Ovšem obě tato rezidua se odlišují v chemickém posunu amidového dusíku  $^{15}N$ . To je jasně patrné v NCA 2D korelačním spektru. Potom řezy provedené v těchto frekvenčních hladinách umožní rozlišení a kvantitativní interpretaci těchto slabých korelací.

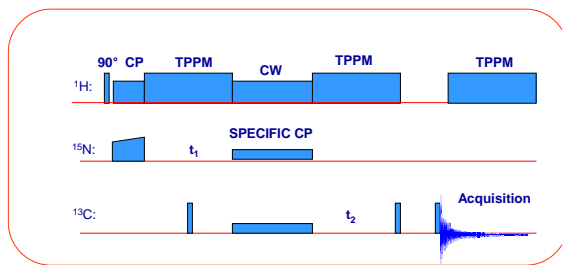
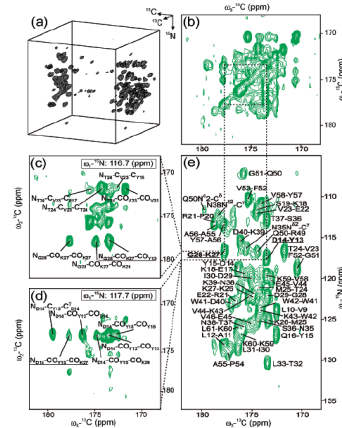
# $\alpha$ -Spectrin Sh3 Domain



Izotopicky obohacené systémy – 3D experimenty NCC



1,3-Spectrin Sh3 Domain



Zcela obdobná je i strategie přiřazení signálů pomocí 3D NCOCCX experimentů. Tentokrát je v 3D spektru je zobrazena karboxylová a alifatická oblast  $^{13}\text{C}$  NMR spektra změřená pro 1,3-SH3 doménu alfa-spektrinu. V klasickém 2D  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  korelačním spektru ani v tomto případě nejsou například korelace mezi COY13 a COK27 vůbec rozlišitelné. Ovšem obě tato rezidua se odlišují v chemickém posunu amidového dusíku  $^{15}\text{N}$  následujících aminokyselinových zbytků Gly28 a Asp14. To je jasně patrné v NCO 2D korelačním spektru. Potom řezy provedené v těchto frekvenčních hladinách, které se liší o 1ppm umožní rozlišení a kvantitativní interpretaci těchto slabých korelací. Tyto 3D experimenty trvají cca. Deset dní a tak je možné je provádět pouze při jedn=é směšovací periodě.

# Prionové proteiny

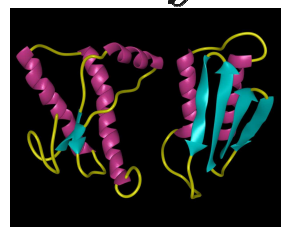
Joint Laboratory of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR  
AMC AB CPmad JRCPC AB CH



Meier Beat.H.  
\*1954

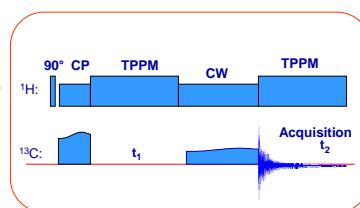
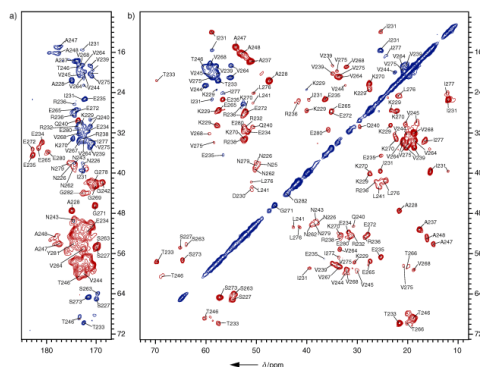
Meier B.H. et al., **Correlation of Structural Elements and Infectivity of the HET-s prion**, *Nature* (2005); 435(9): 844.

Dipolar Recoupling Enhancement through Amplitude Modulation



Zdravý PrPC

Poškozený PrPSc



2D 13C-13C DREAM NMR

Samozřejmě, že nezůstává jen u dobře rozpustných proteinů. Naopak snaha je popsat proteiny nerozpustné jako jsou jsou především *b*-amyloidová vlákna prionových proteinů způsobující Alzheimerovu nebo Creutzfeldt-Jakobovu chorobu. Nerozpustné priony jsou vlastně defektní proteiny, které změnou struktury a konformace mění sebe sama a pak také sousední proteiny z normální rozpustné formy na nebezpečnou nerozpustnou formu. Najít zákonitosti mezi strukturálními změnami a infekčním chováním prionů je jednou z výzev právě pro moderní NMR spektroskopii pevného stavu. Faktem je, že první výsledky na sebe nenechaly dlouho čekat a 9. června tohoto roku vyšla v prestižním časopise *Nature* (435, 844, 2005) práce, jež poodhaluje některá tajemství.

# Shrnutí



- a. Membránové systémy: orientované vzorky – statické uspořádání
- b. PISEMA: korelace  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  dipolární interakce s  $^{13}\text{C}$  CSA.
- c. Orientace proteinu v membráně
- d. MAOSS – rotace orientovaných vzorků pod MA.
- e. Uspořádání molekul lipidů:  $^1\text{H}$  a  $^{31}\text{P}$  MAS.
- f. Příprava mikrokrytalických a nanokrytalických proteinů.
- g. Teplotní stabilita – rotace, dekaplink
- h. 2D PDSD:  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  korelace – spinová difuze mezi jádry  $^{13}\text{C}$ .
- i. 2D  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  korelace – dvojitá cross-polarizace – SPECIFIC-CP.
- j. 3D experimenty NCACX a NCOCX: kombinace SPECIFIC s PDSD.
- k. Dvoukvantové procesy.