

Пространственная структура белков методами ЯМР- спектроскопии

Минеев Константин Сергеевич
д.х.н., в.н.с ИБХ РАН
+7(926)376-25-38
mineev@nmr.ru

План лекции

Немного истории

Основы метода

Как получить структуру белка?

Преимущества и недостатки ЯМР

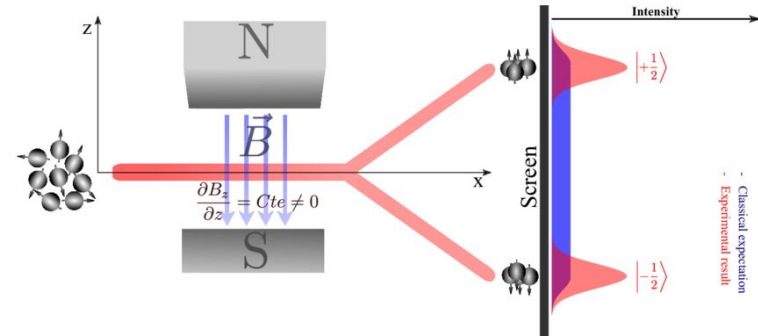
Что еще можно делать при помощи ЯМР (если успею)

Открытие спинов ядер (1920-1925)



Отто Штерн
(нобелевская премия
1943)

Вальтер Герлах



Gerlach, W. and Stern, O. Über die Richtungsquantelung im Magnetfeld. [Annalen der Physik](#), 74:673–699 (1924).

Формализм для описания спинов (1927)



Вольфганг Паули
нобелевская премия 1945

$$\begin{aligned}\sigma_1 = \sigma_x &= \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix} \\ \sigma_2 = \sigma_y &= \begin{pmatrix} 0 & -i \\ i & 0 \end{pmatrix} \\ \sigma_3 = \sigma_z &= \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix}.\end{aligned}$$

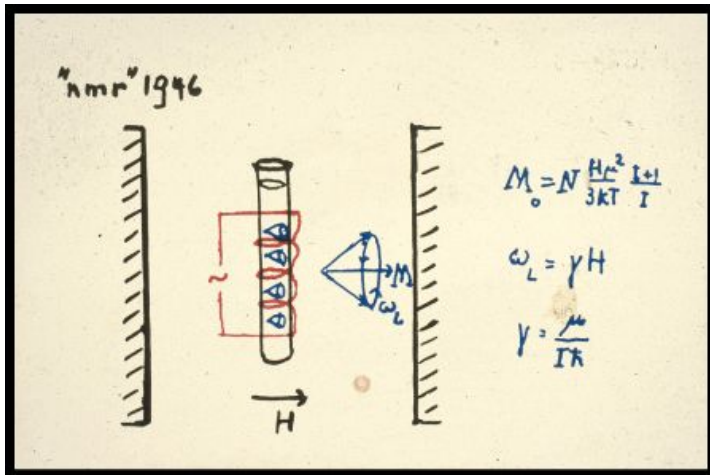
$$\left[\frac{1}{2m} (\boldsymbol{\sigma} \cdot (\mathbf{p} - q\mathbf{A}))^2 + q\phi \right] |\psi\rangle = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\psi\rangle$$

Pauli, Wolfgang (1927). "Zur Quantenmechanik des magnetischen Elektrons". *Zeitschrift für Physik* (in German). **43** (9–10): 601–623.

1946 год - первый эксперимент ЯМР

Bloch, F., Hansen, W.W., Packard, M., 1946a. **Nuclear Induction**. Phys. Rev. 69, 127–127. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.69.127>

Bloch, F., Hansen, W.W., Packard, M., 1946b. **The Nuclear Induction Experiment**. Phys. Rev. 70, 474–485. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.70.474>



8 MHz, 0.18T
(1826 gauss)

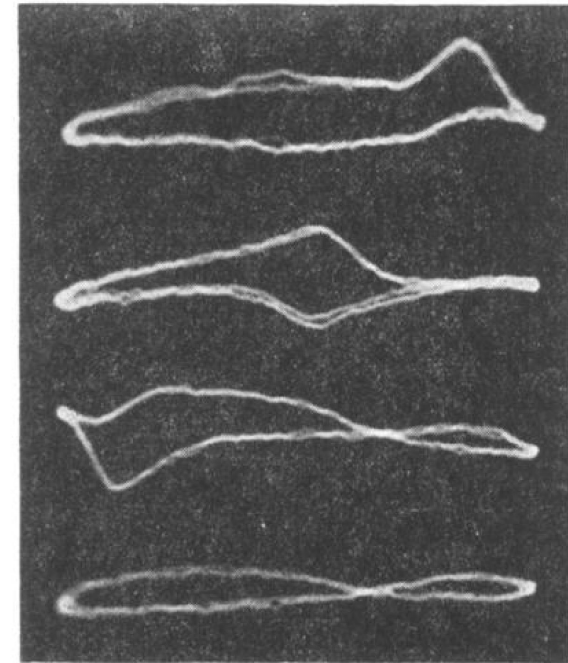


FIG. 11. Photographic record of the proton signal in paraffin. The four traces from top to bottom are in the text referred to as *a*, *b*, *c*, and *d*.

1952 - Нобелевская премия по физике



Photo from the Nobel Foundation archive.

Felix Bloch

Prize share: 1/2

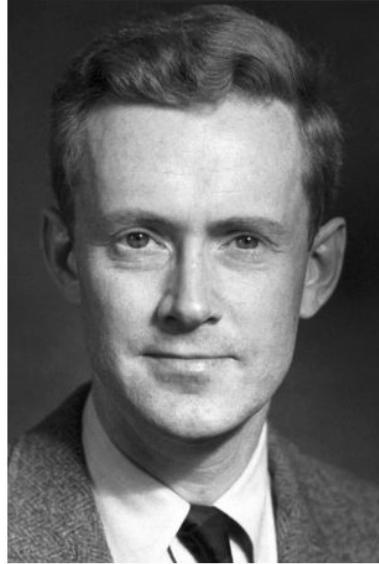


Photo from the Nobel Foundation archive.

Edward Mills Purcell

Prize share: 1/2

The Nobel Prize in Physics 1952 was awarded jointly to Felix Bloch and Edward Mills Purcell "for their development of new methods for **nuclear magnetic precision measurements** and discoveries in connection therewith."

О русских ученых



ЗАВОЙСКИЙ Евгений Константинович (1907 - 1976)

1941 г. - впервые зарегистрировал сигнал ядерного магнитного резонанса

1944 г. - открытие электронного парамагнитного резонанса

1950е - Химический сдвиг

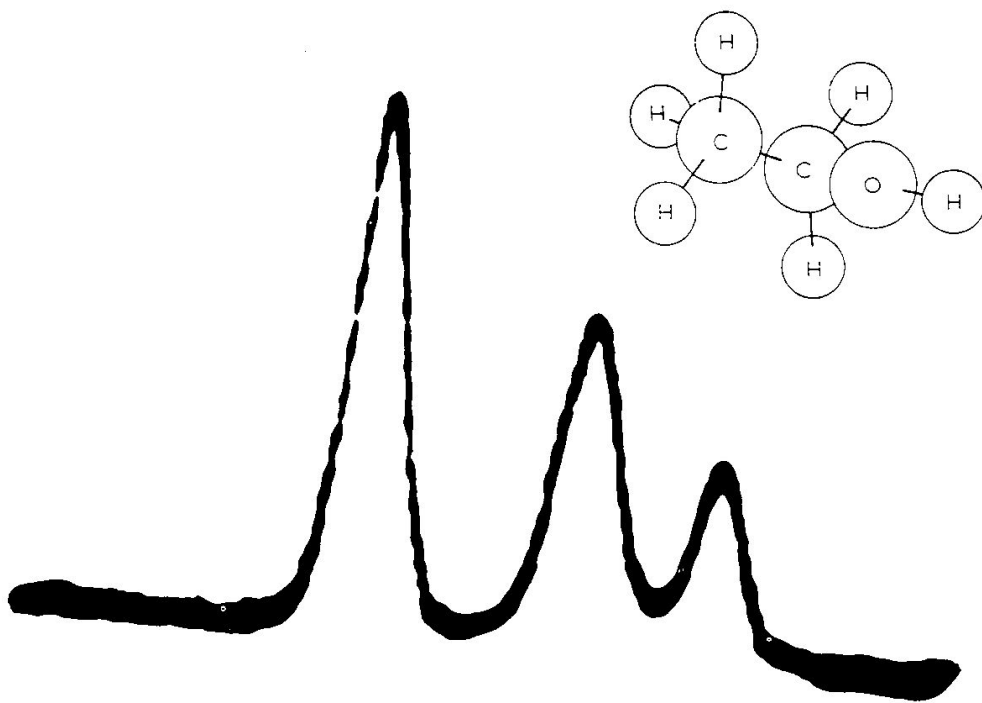


Fig. 6. The proton resonance in ethyl alcohol, observed with high resolution. The three lines arise from the CH₃ hydrogens, from the CH₂ hydrogens, and from the OH hydrogen, respectively.

Arnold, J.T., Dharmatti, S.S., Packard, M.E., 1951. Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds. *J. Chem. Phys.* 19, 507–507. <https://doi.org/10.1063/1.1748264>

Сверхпроводящие магниты

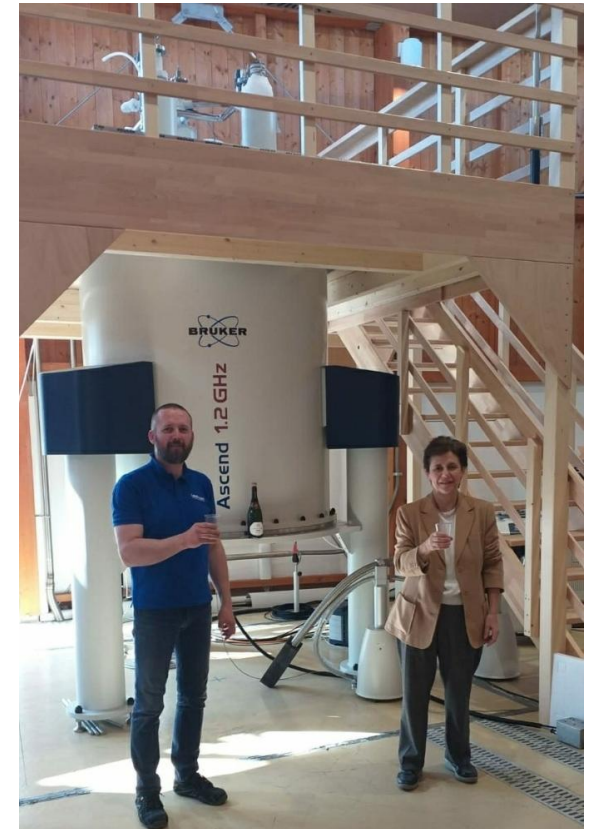
Время жизни магнита **20-35 лет**. За это время успевает смениться вся элементная база, смениться технологии, а электроника - уйти на полки музеев



Магнит спектрометра
Bruker AVANCE 600 МГц



Магнит спектрометра
Varian 900 МГц



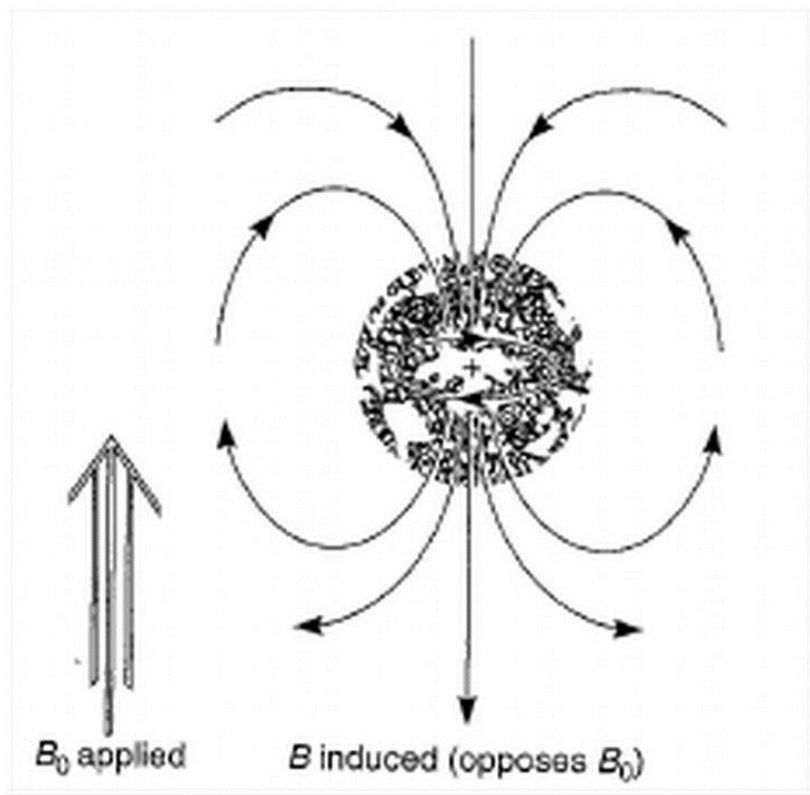
Магнит спектрометра
Bruker 1.2 GHz

Часть II

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ЯМР

ЧТО МЫ ИЗМЕРЯЕМ И КАК

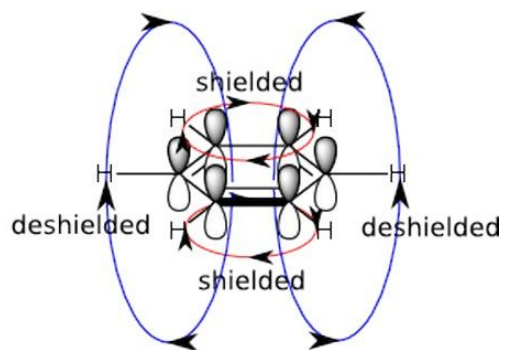
1. Химический сдвиг



$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 (1 - \sigma)$$

$$\sigma = 1 - \left(\frac{2\pi\nu}{\gamma B_0} \right)$$

$$\sigma = \frac{e^2}{3mc^2} \int \frac{\rho(r)}{r} dr$$



Химический сдвиг

less shielded



more shielded

higher B_{loc}



lower B_{loc}

*higher frequency
at constant B_0*

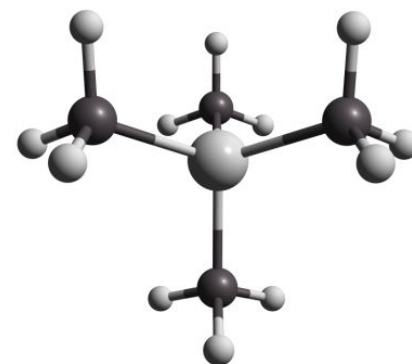
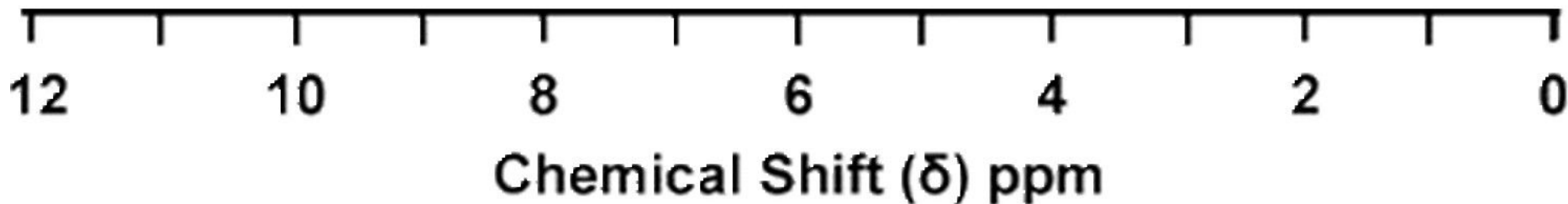


*lower frequency
at constant B_0*

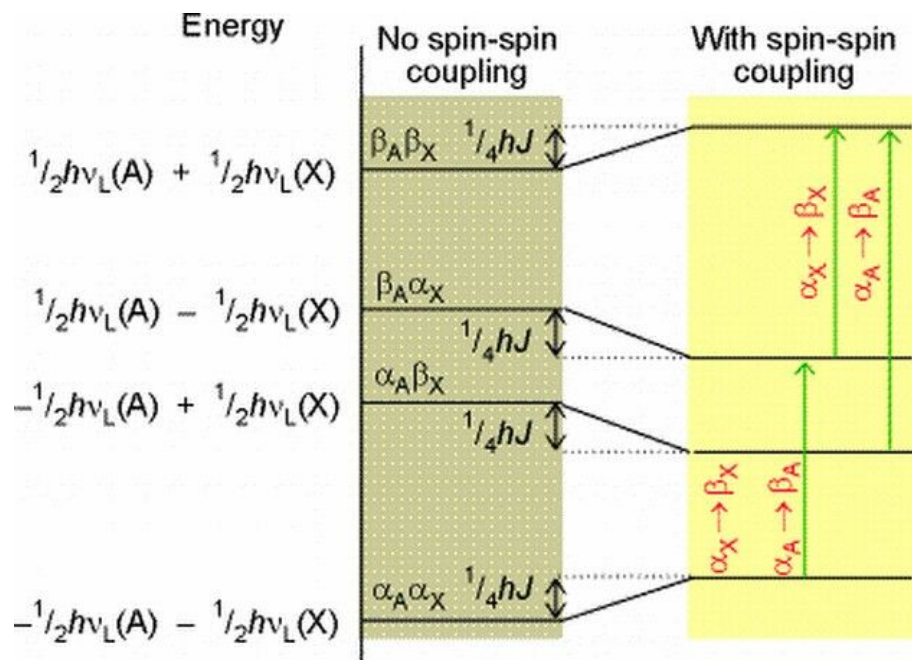
"downfield"



"upfield"



2. КОНСТАНТЫ СПИН-СПИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

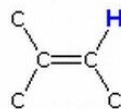


КССВ бывают не более чем через 3-4
ХИМ. СВЯЗИ

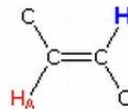
$^2J_{XX}$ – геминальные

$^3J_{XX}$ – вицинальные

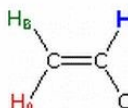
No Coupled
Hydrogens



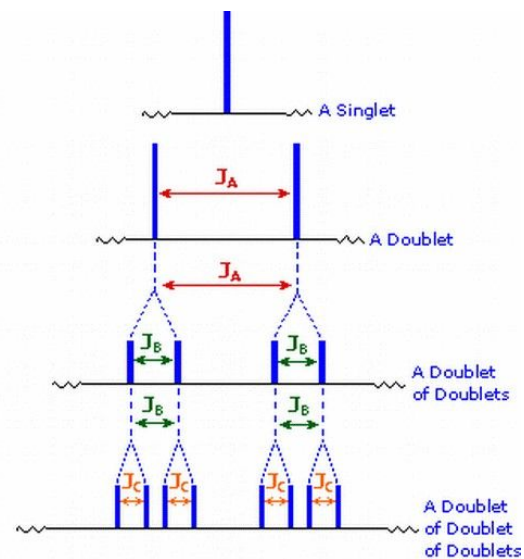
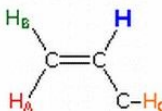
One Coupled
Hydrogen



Two Coupled
Hydrogens

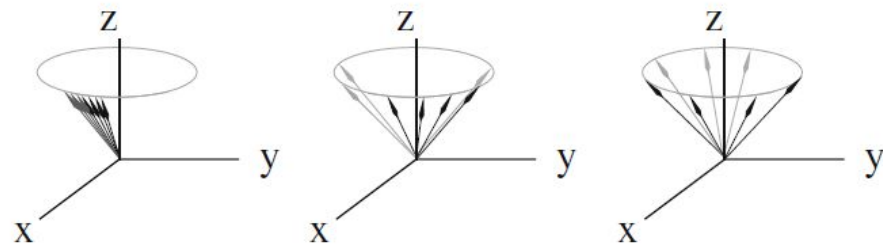
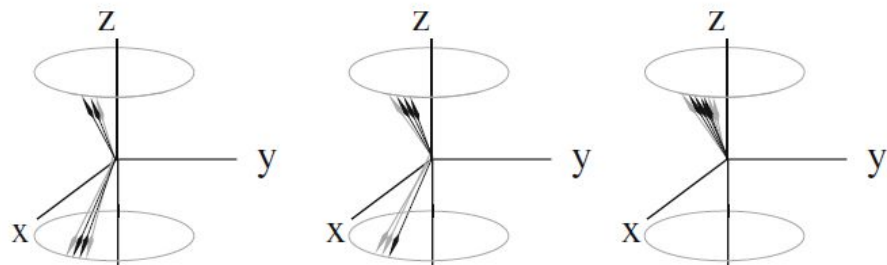


Three Coupled
Hydrogens

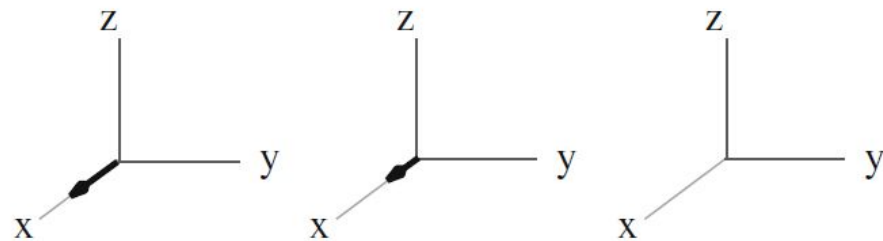
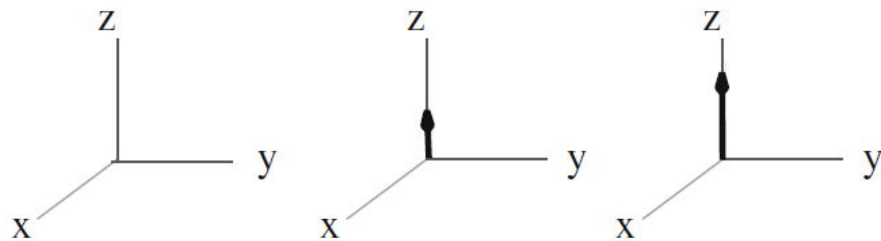


3. релаксация

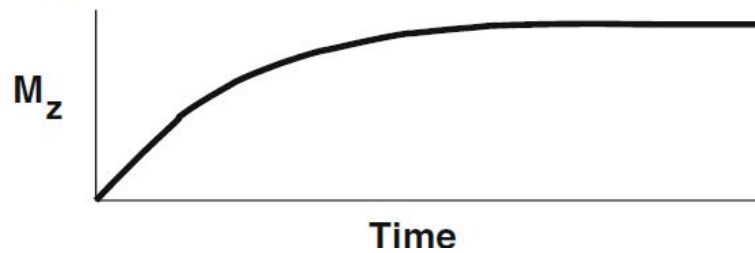
Magnetic Dipoles



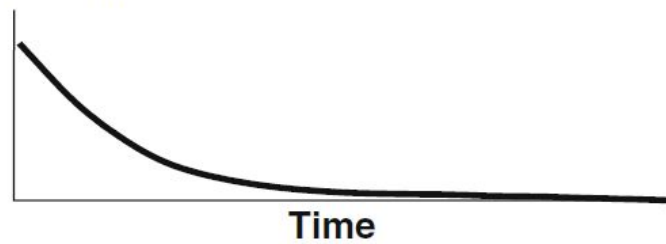
Bulk Magnetic Moment



Z-Magnetization



Observed Signal

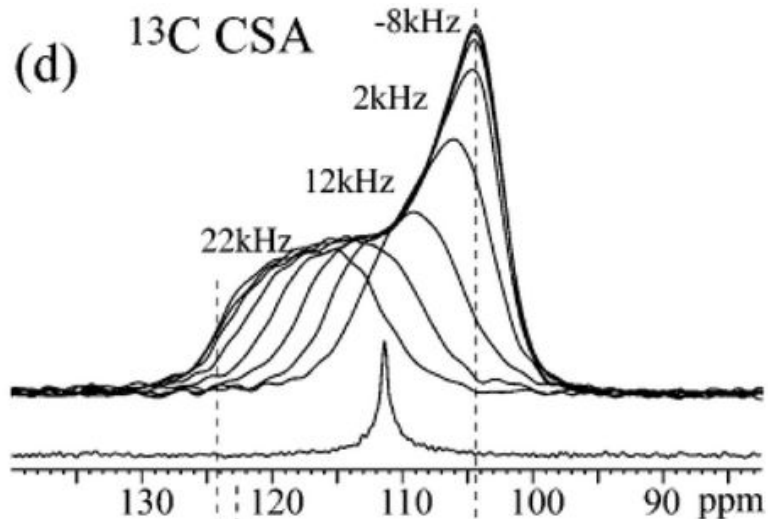


Причины релаксации

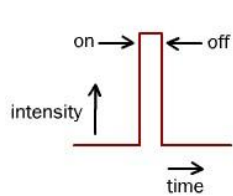
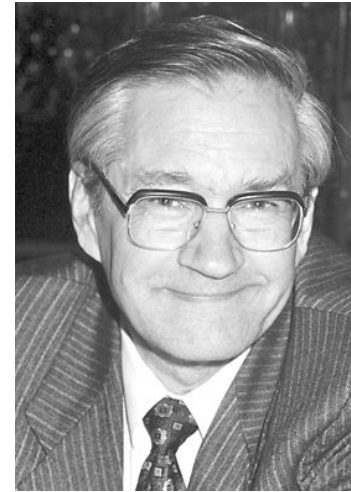
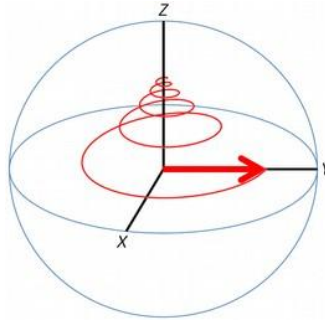
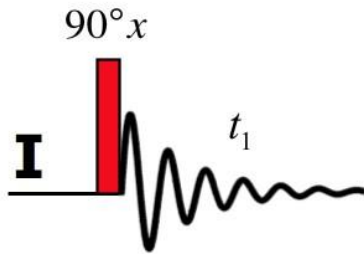
К ЯМР-релаксации приводит взаимодействие ядерного спина с окружением по одному из следующих механизмов:

- Диполь-дипольное взаимодействие
- Анизотропия химического сдвига
- Химический обмен
- Квадрупольное взаимодействие
- Скалярное взаимодействие
- Парамагнитное взаимодействие

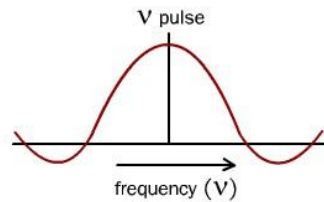
Релаксация зависит от скорости движений в молекуле !!!



Фурье ЯМР



a) The original pulse



b) The frequency content of the same pulse

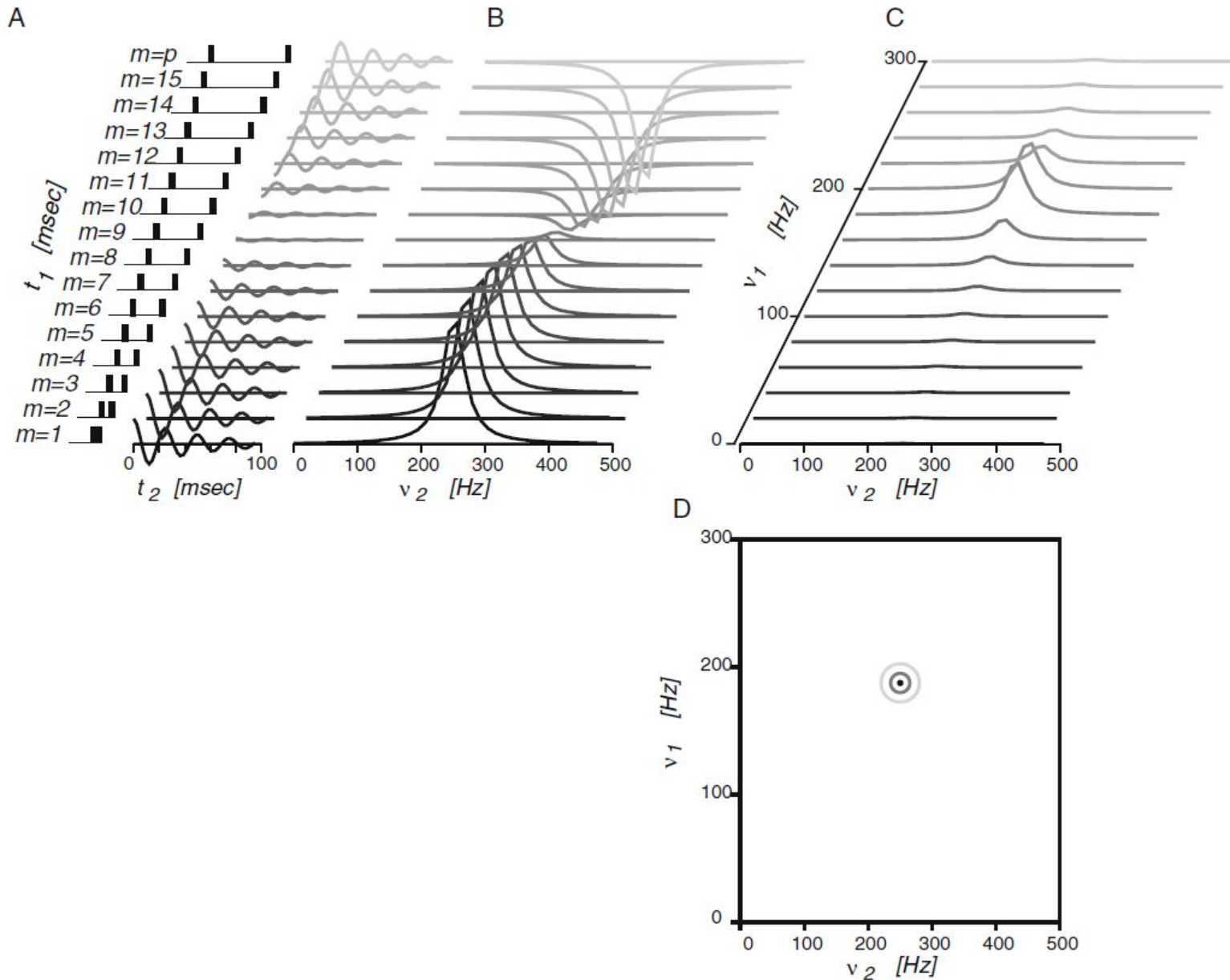
$$\Delta E \Delta t \geq \frac{\hbar}{2}$$

Ричард Эрнст

Нобелевская премия (1991)

“За вклад в развитие
Методов ЯМР-спектроскопии
высокого разрешения”

2D ЯМР - это много 1D, потом Фурье

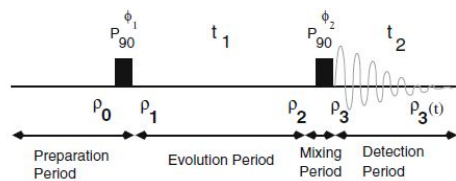
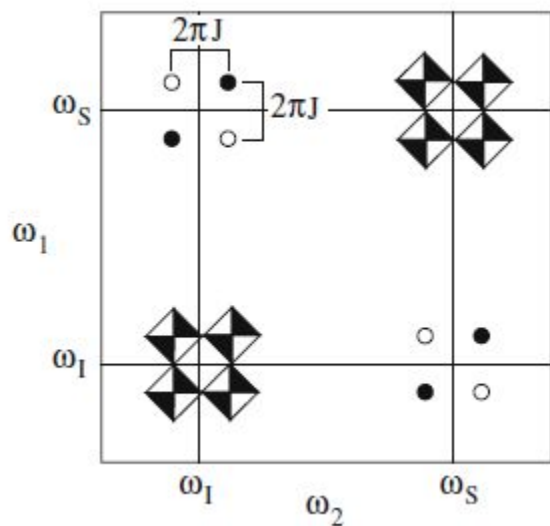


Типы 2Д спектров:

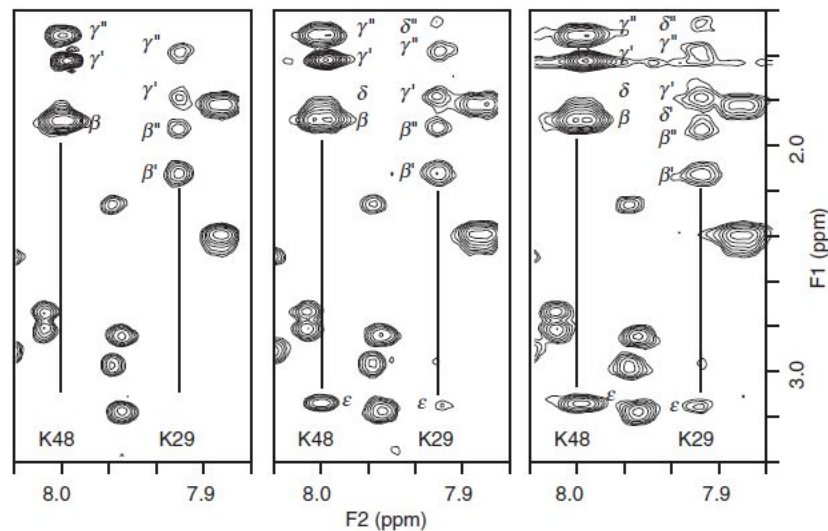
- Through-bond correlation
 - COSY (кросс-пики между ядрами, связанными КССВ)
 - TOCSY (цепочка спинов, соединенных КССВ)
 - HSQC (Гетероядерная корреляция через одну хим. Связь)
- Through-space correlation
 - NOESY (кросс-пики между ядрами, которые пространственно сближены)

2D спектры

COSY



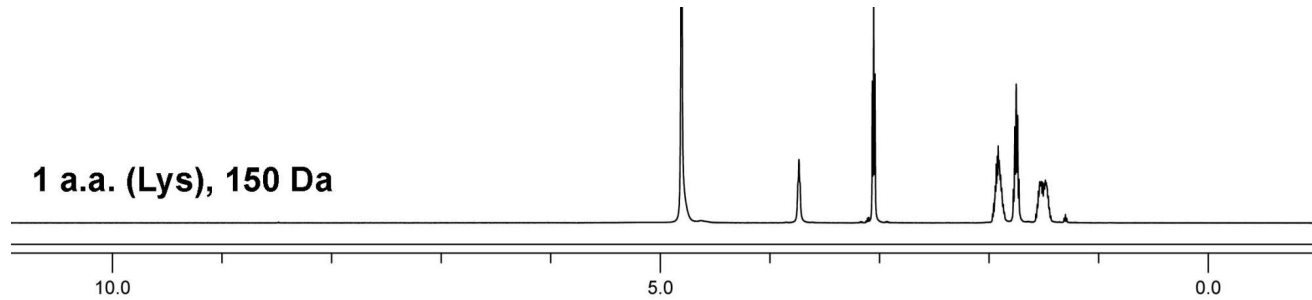
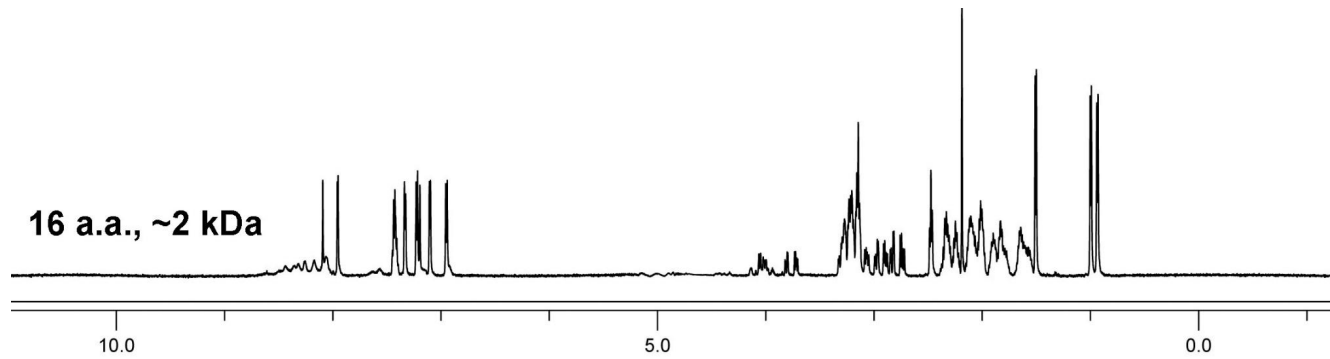
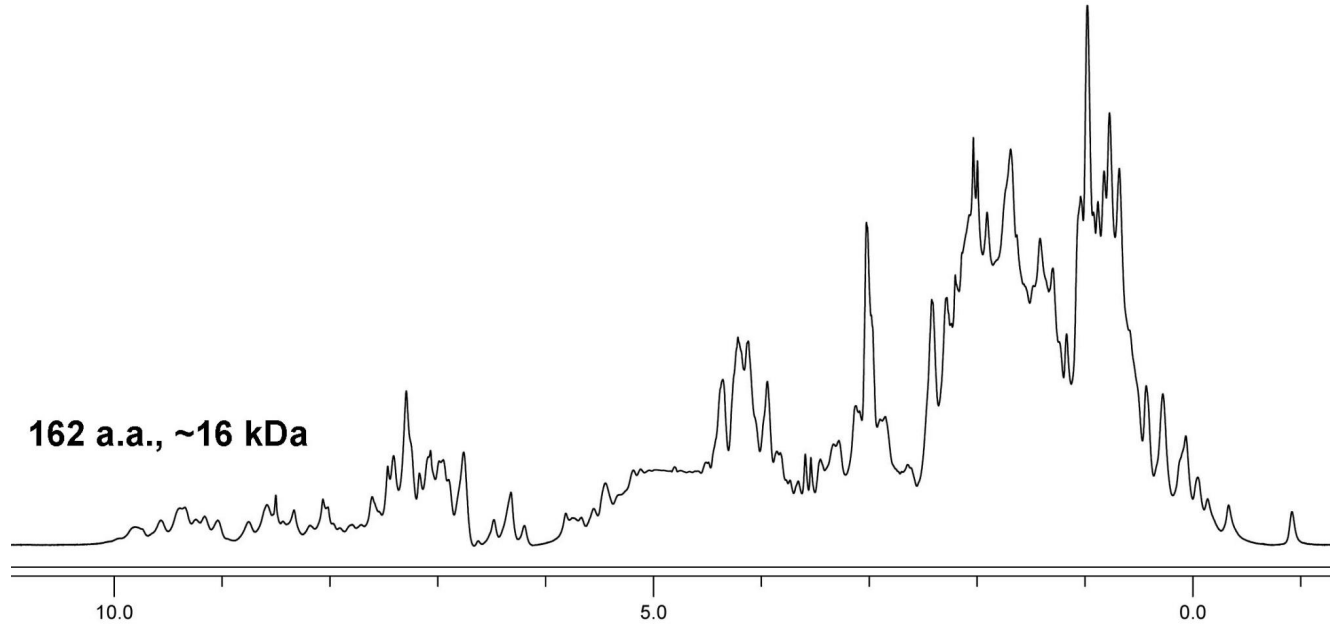
TOCSY



Часть III

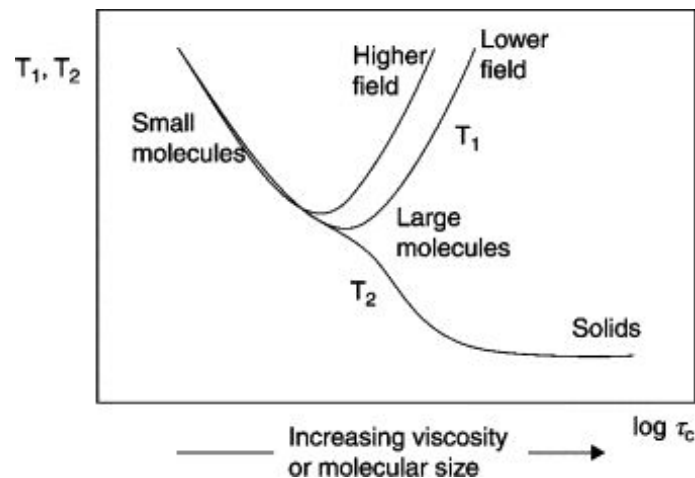
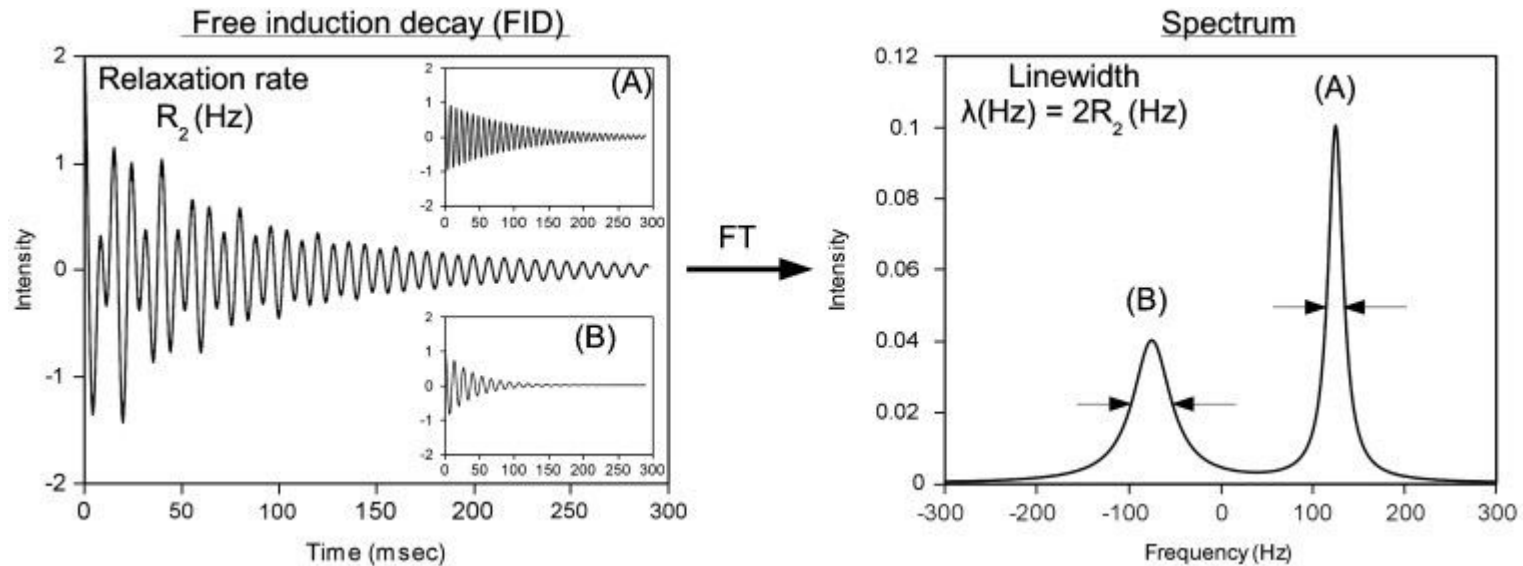
Как получить структуру белка?

Спектры ЯМР- ^1H белков



Почему спектры ЯМР белков такие?

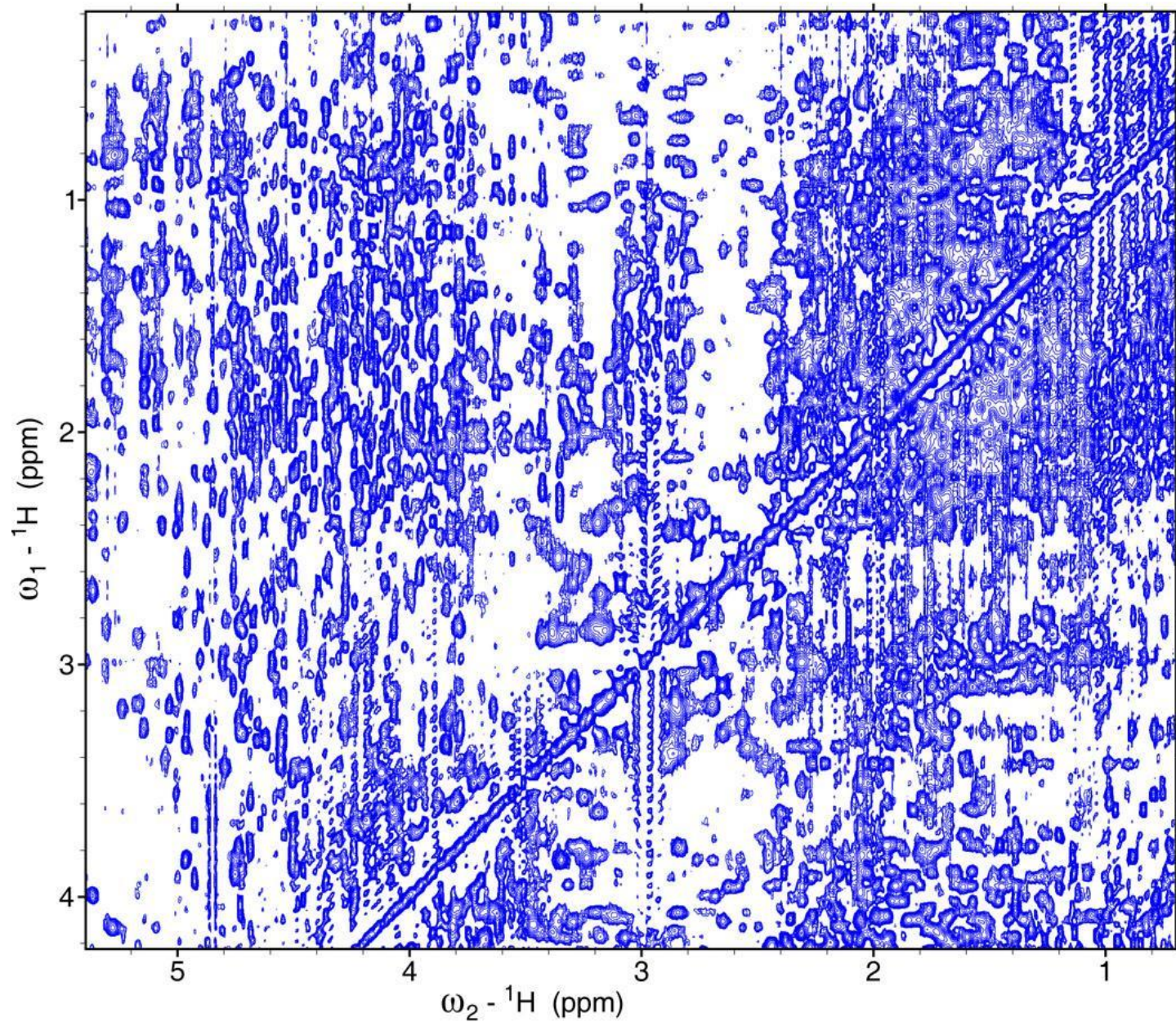
Ширина сигнала в спектре зависит от поперечной релаксации



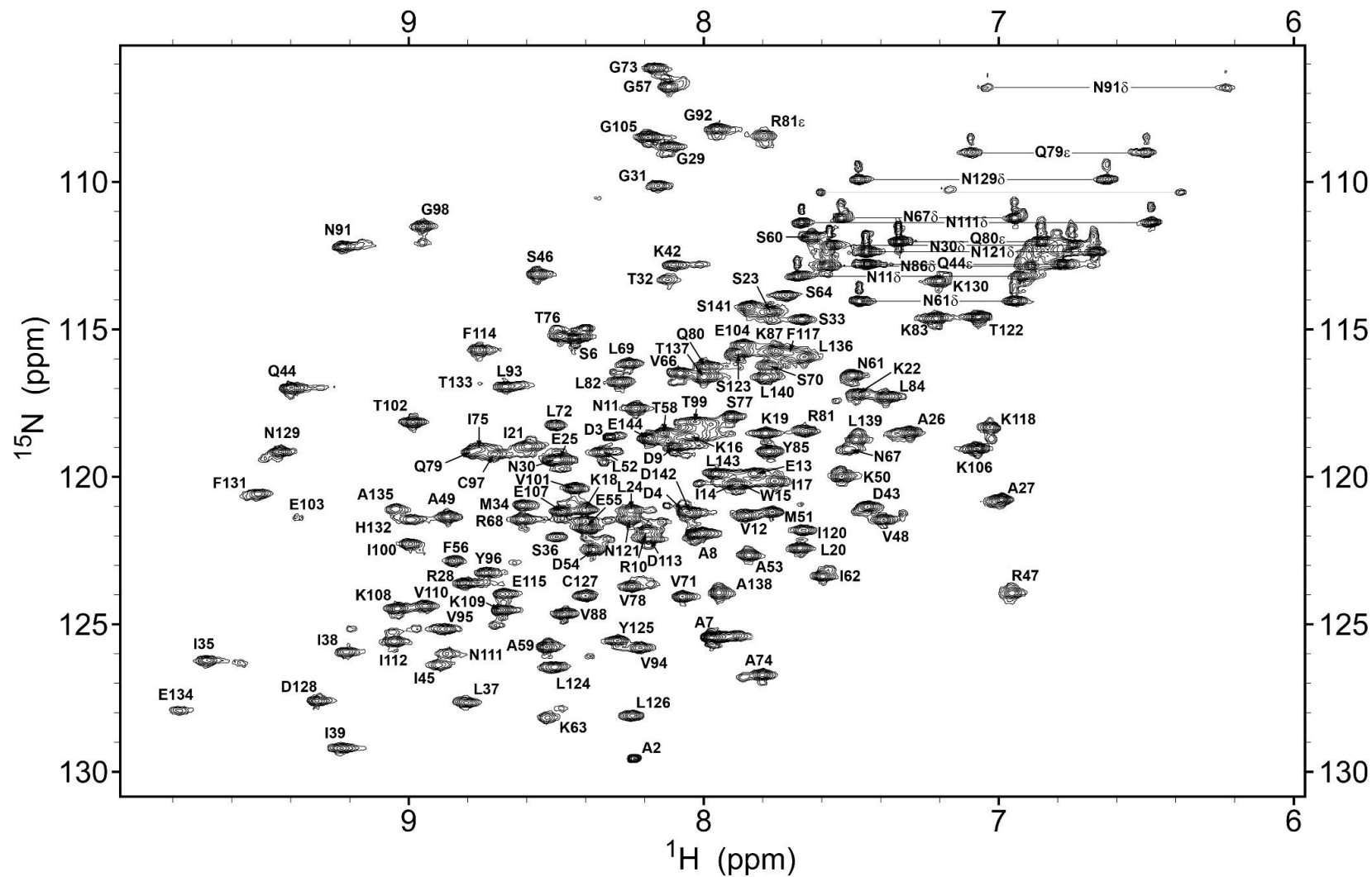
Особенности ЯМР-спектров белков

- Много сигналов – перекрытие
- Большой размер – широкие линии
- Многоконформационность – широкие линии+перекрытие

Фрагмент 2D спектра NOESY белка 18 кДа

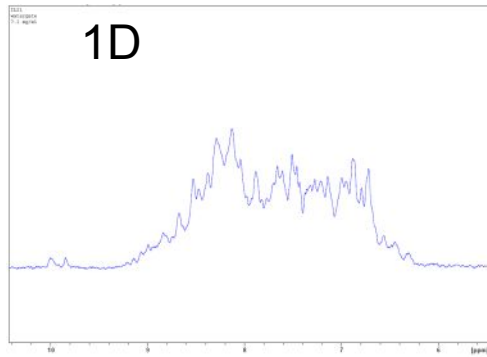


Чтобы решить проблему перекрытия сигналов применяют изотопное мечение и трехмерные эксперименты

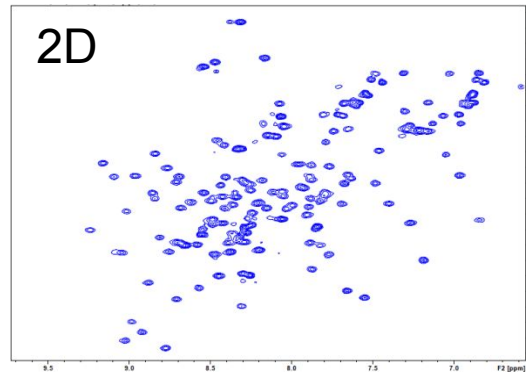


3D спектры

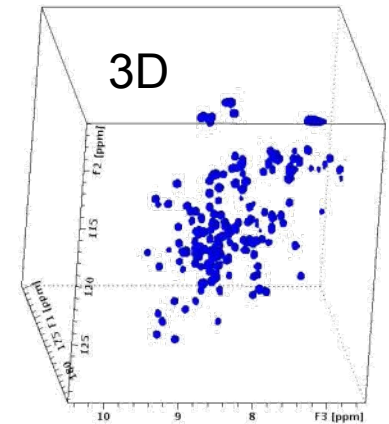
watergate



2D 1H,15N-HSQC



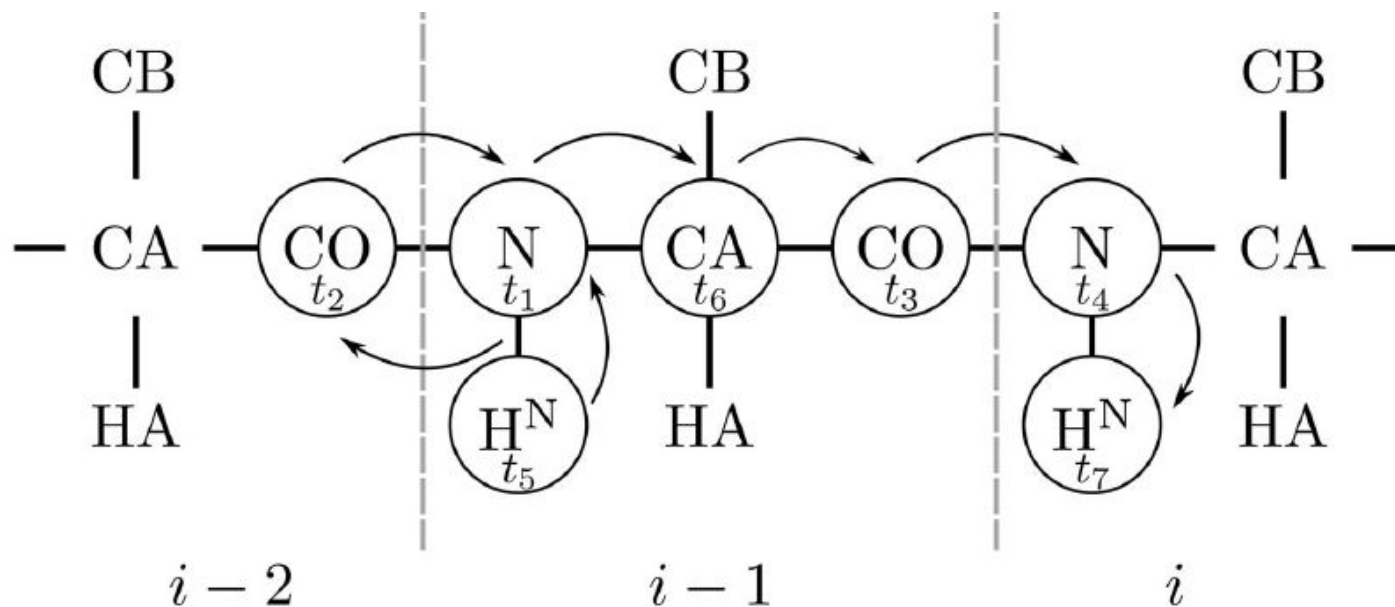
3D HNCα



Human IL-25 (15kDa, 200 μ M)

Six- and seven-dimensional experiments by combination of sparse random sampling and projection spectroscopy dedicated for backbone resonance assignment of intrinsically disordered proteins

Szymon Żerko¹ · Wiktor Koźmiński¹



Изотопное мечение

Ligand	Isotope	Spin (abundance)
H	1, 2	1/2 + 1 (0.015%)
C	12, 13	0 + 1/2 (1.1%)
N	14, 15	1 + 1/2 (0.4%)
O	16, 17, 18	0 + 5/2 (0.04%)
F	19	1/2
P	31	1/2
S	32, 33, 34	0 + 3/2 (0.8%)
Cl	35, 37	3/2
As	75	3/2
Se	76, 77, 78, 80, 82	0 + 1/2 (7.6%)
Br	79, 81	3/2
I	127	5/2

Размер белка	Схема мечения
<5 kDa	^1H
5-10 kDa	^{15}N
11-30 kDa	$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$
>30 kDa	$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^2\text{H}$
>50 kDa	$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}, ^2\text{H}$ + селективное

- ^{15}N и ^{13}C – дополнительное измерение спектра ЯМР, дополнительная информация, ^2H – улучшает вид спектра
- Дейтерирование уменьшает количество информации
- Изотопное мечение производится средствами генной инженерии

Как метить белки изотопами?

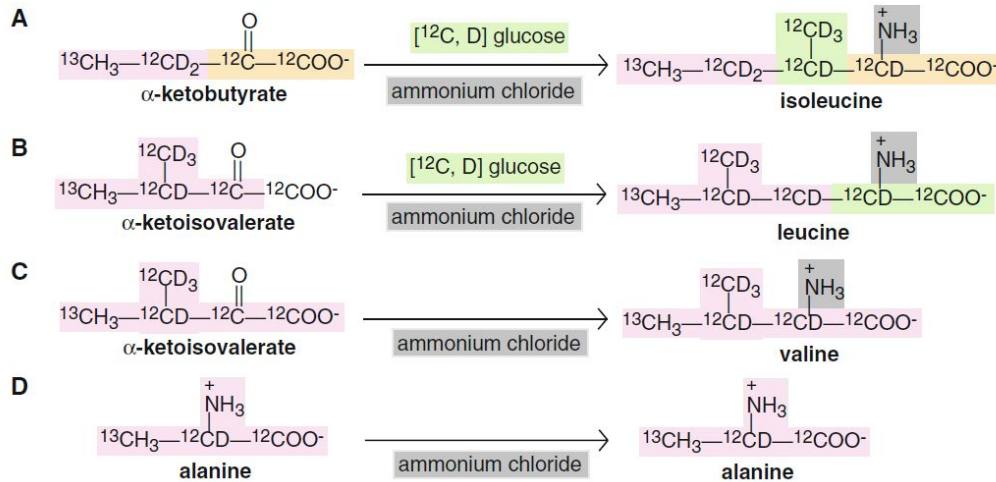
ИСТОЧНИКИ ИЗОТОПОВ:

- $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$
- ^{13}C -глюкоза
- другие метаболиты
- аминокислоты
- D_2O

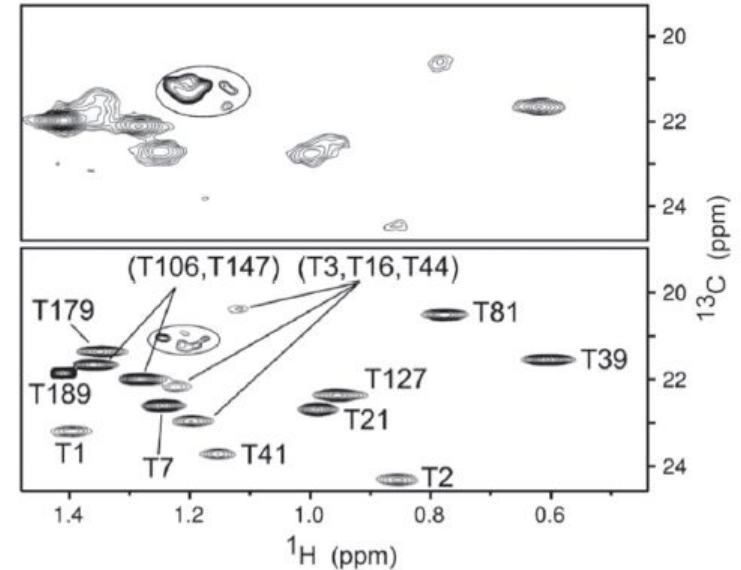
ХОСТЫ:

- бактерии
- дрожжи
- клетки насекомых
- клетки млекопитающих

Селективное протонирование метильных групп

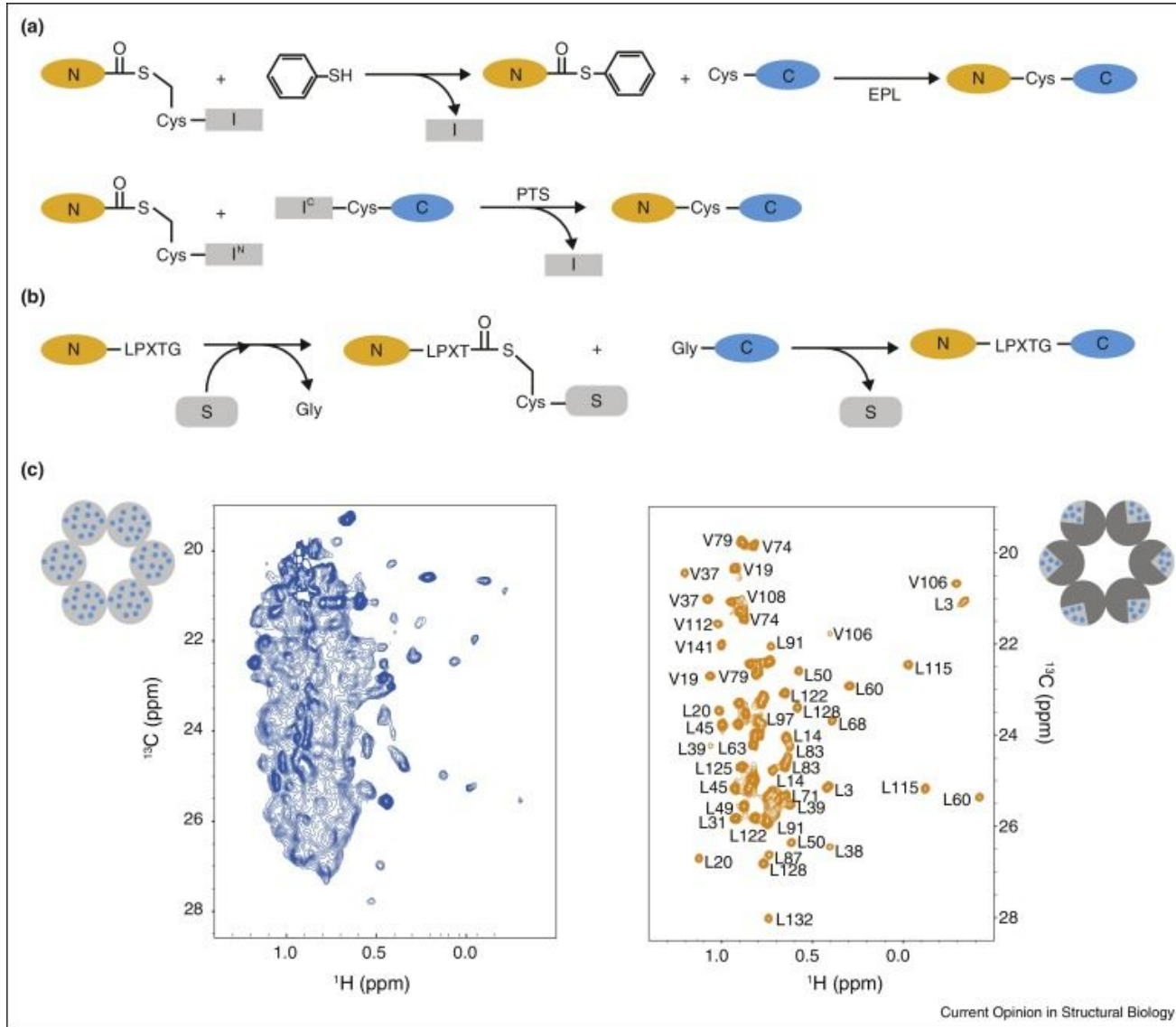


Протеасома (1 Мда)



- Выигрыш в чувствительности за счет замедления релаксации
- Упрощение спектров
- доступно только в бактериях и дрожжах

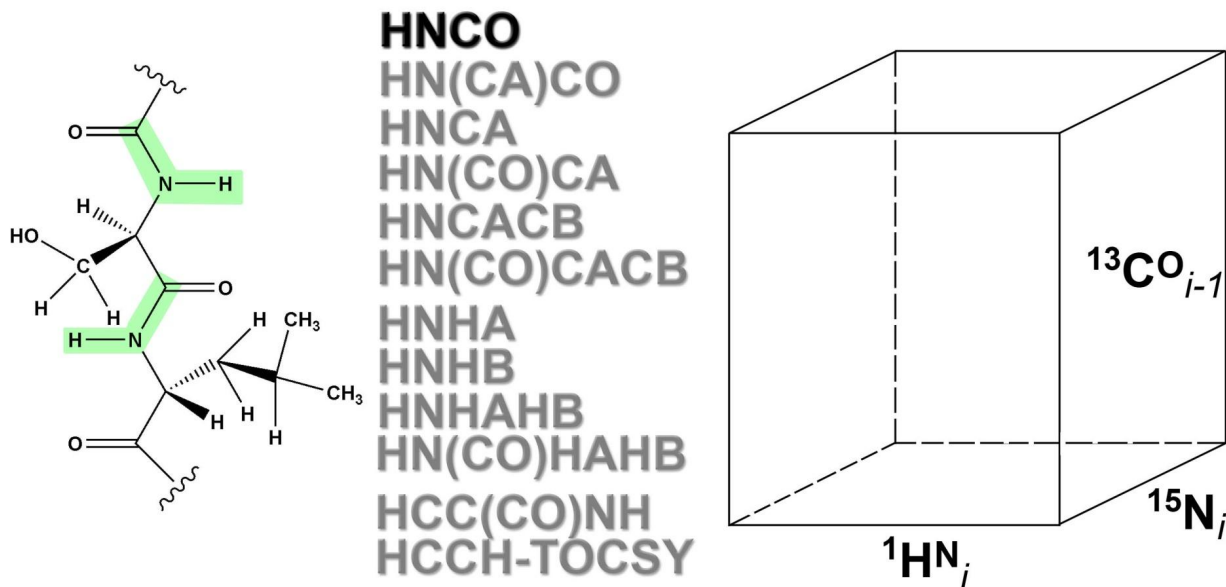
Сегментное мечение



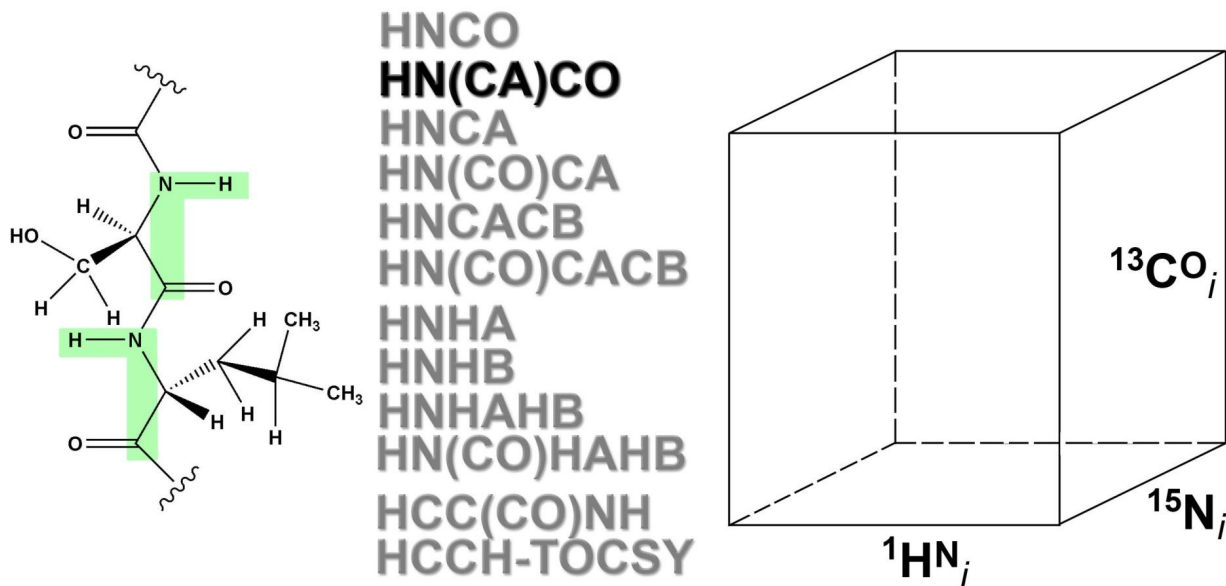
Алгоритм определения структуры белка

- Выбор оптимальной схемы изотопного мечения
- Отнесение сигналов в спектрах
- Сбор экспериментальных данных
- Расчет структуры

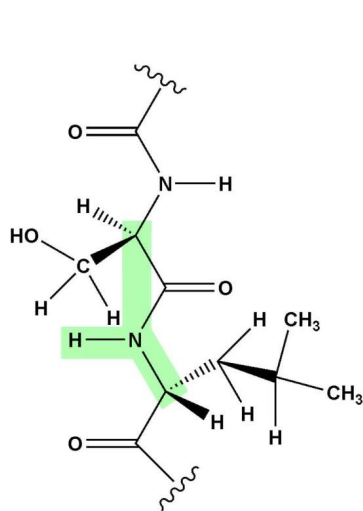
Отнесение сигналов - определение химических сдвигов всех ЯМР-активных ядер молекулы



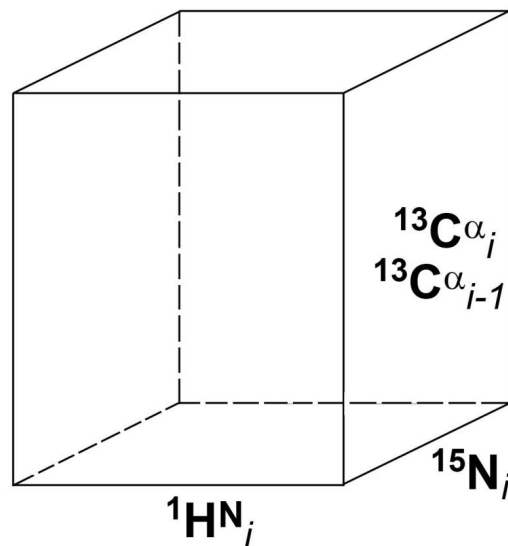
Отнесение сигналов - определение химических сдвигов всех ЯМР-активных ядер молекулы



Отнесение сигналов - определение химических сдвигов всех ЯМР-активных ядер молекулы



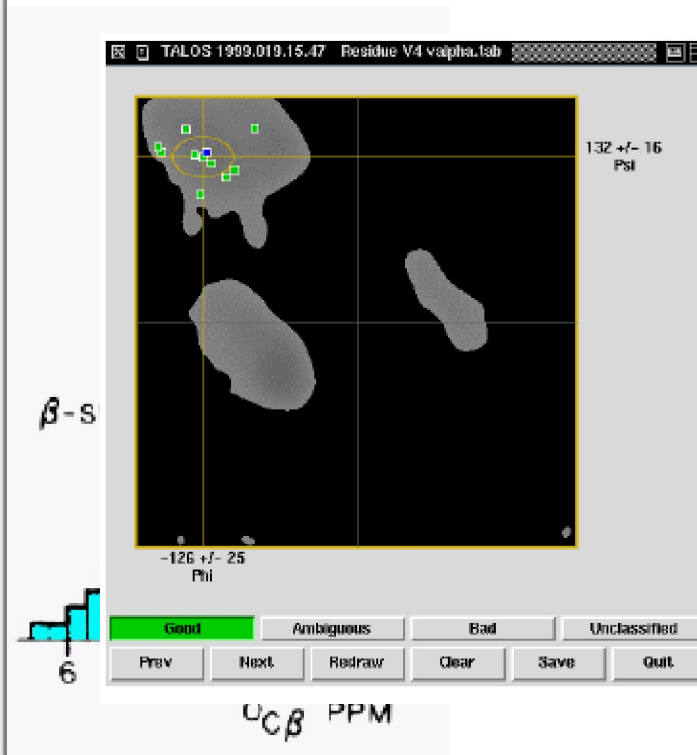
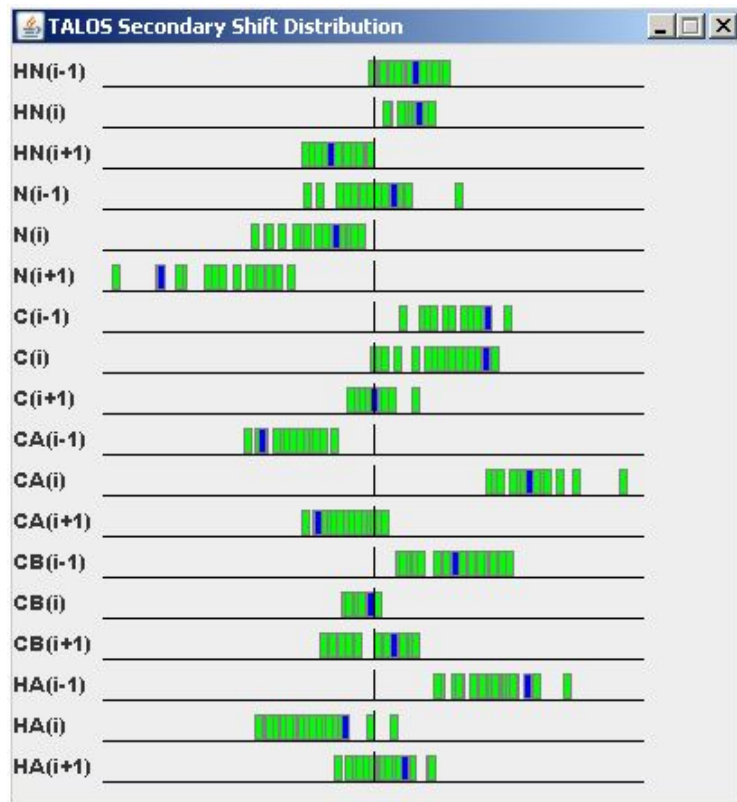
HNCO
HN(CA)CO
HNCA
HN(CO)CA
HNCACB
HN(CO)CACB
HNHA
HNHB
HNHANB
HN(CO)HANB
HCC(CO)NH
HCCH-TOCSY



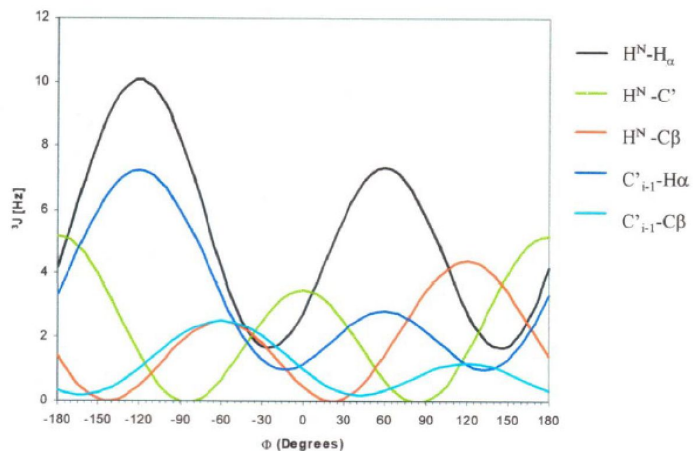
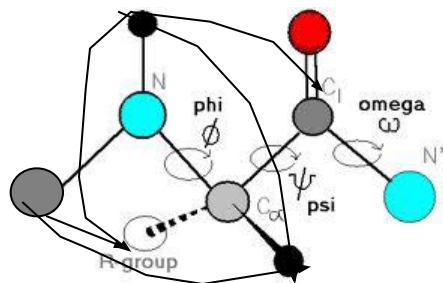
ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ О СТРУКТУРЕ БЕЛКА В СПЕКТРАХ ЯМР

1. Химический сдвиг

- **CSI** – индекс вторичного химического сдвига (хим. сдвиг по сравнению с известным значением для random coil конформации) – индикатор вторичной структуры белка.
- TALOS-N, PREDITOR программы для предсказания двугранных углов основной цепи по химическим сдвигам (по аналогии с известными структурами) Точность предсказания 99% (**эффективность 88%**).

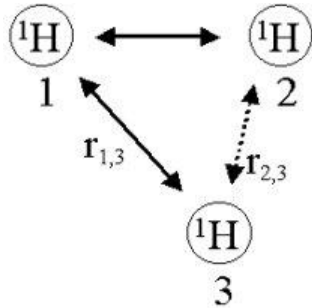


2. Константы спин-спинового взаимодействия



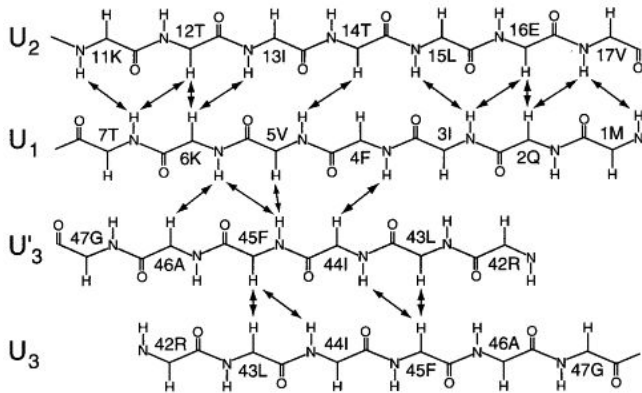
Angle	Atoms Involved	3J [Hz]
PHI	HN-HA	1.7 – 10.1
	HN-C	0.0 – 5.2
	HN-CB	0.0 – 4.4
	$C_{(i-1)}$ -HA	1.0 – 7.2
	$C_{(i-1)}$ -CB	0.2 – 2.5
PSI	HA- $N_{(i+1)}$	-1.8 – -0.2
CHI	HA-HB	1.8 – 12.9
	N-HB	-5.5 – 0.2
	C-HB	0.5 – 9.8

3. Ядерный эффект Оверхаузера

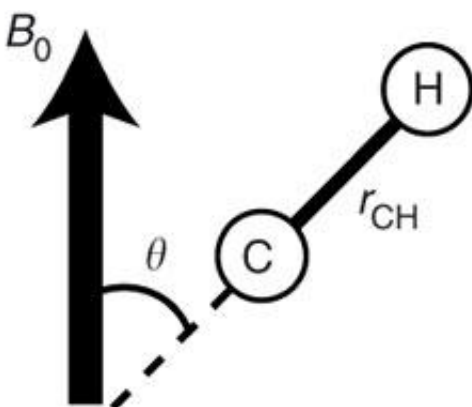


$$NOE \sim \frac{1}{r_{ij}^6}$$

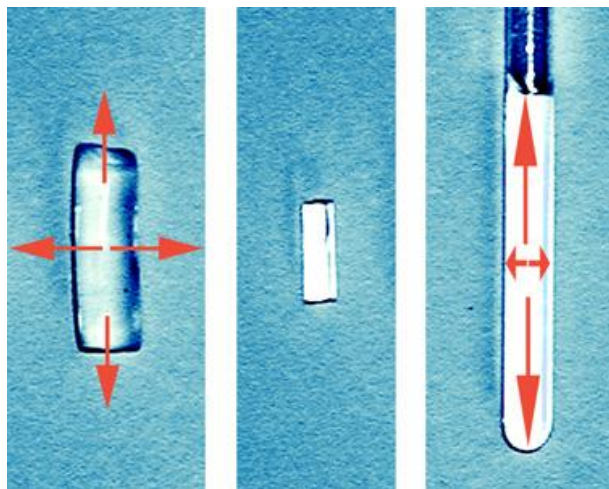
- NOE – основной источник информации о структуре белка, если нет дейтерирования
- Если размер белка большой и необходимо его дейтерировать, нужны другие источники информации



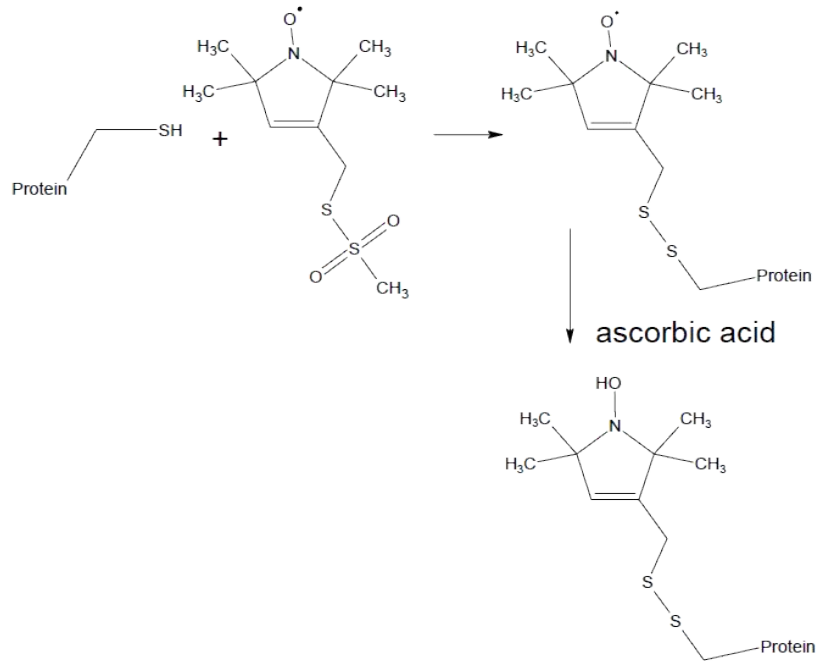
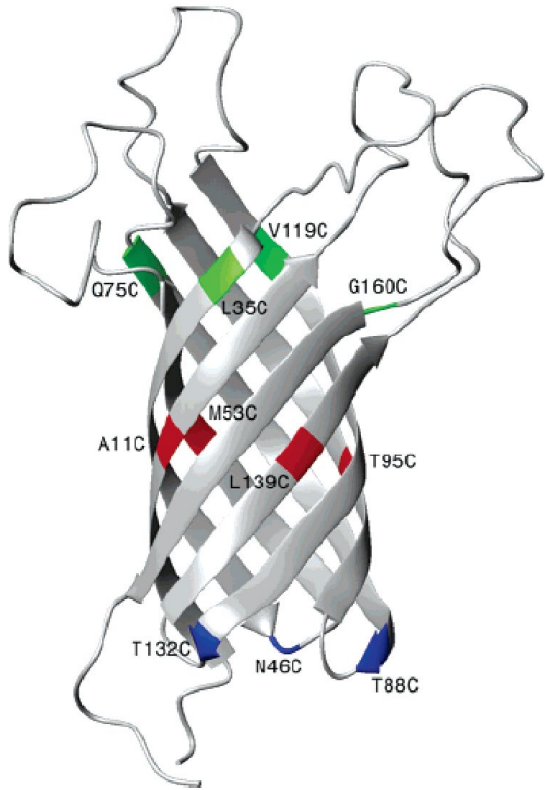
4. Остаточные дипольные константы


$$D_{CH} = -\frac{\gamma_C \gamma_H \mu_0 h}{(2\pi)^3 r_{CH}^3} \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle$$

- Для измерения ОДК нужно создать анизотропную среду:
 - Сжатый полиакриламидный гель
 - Частицы бактериофагов или бицелл, которые ориентируются в магнитном поле
 - Упорядоченные структуры полинуклеотидов



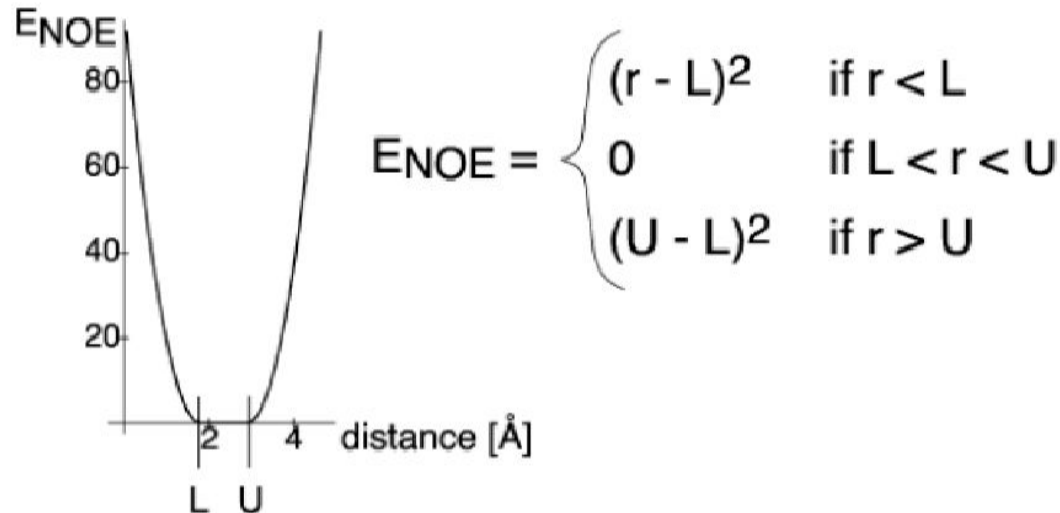
5. Парамагнитные (спиновые) зонды



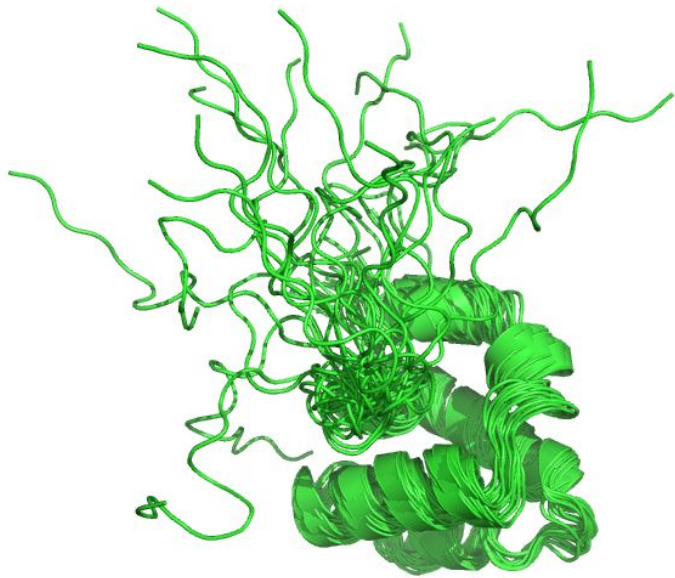
$$r = \left[\frac{K}{R_2^{sp}} \left(4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_H^2 \tau_c^2} \right) \right]^{\frac{1}{6}}$$

Расчет пространственной структуры

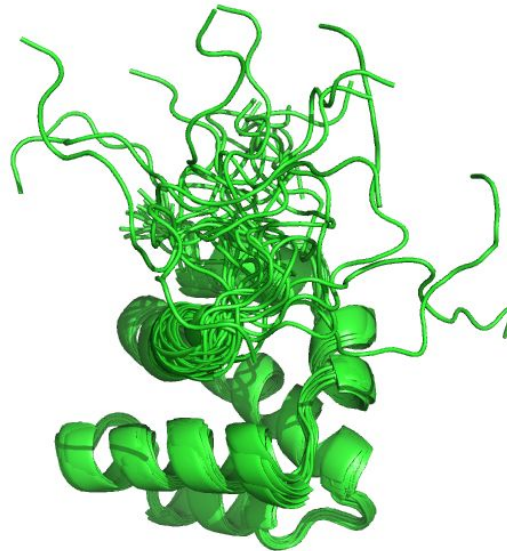
- Ограничения на углы (KCCB)
- Ограничения на водородные связи (H-D exchange, T-Grad)
- Ограничения на расстояния (NOE, PRE)
- Ограничения на ориентацию (RDC)
- Ограничения на S-S связи
- Топология (валентные углы)
- Ван-дер-Ваальс
- Расчет ведется методом молекулярной динамики в пространстве торсионных углов (CYANA) или в декартовых координатах (X-PLOR, CNS, ARIA)
- **Рассчитывают набор конформаций, который удовлетворяет ограничениям**



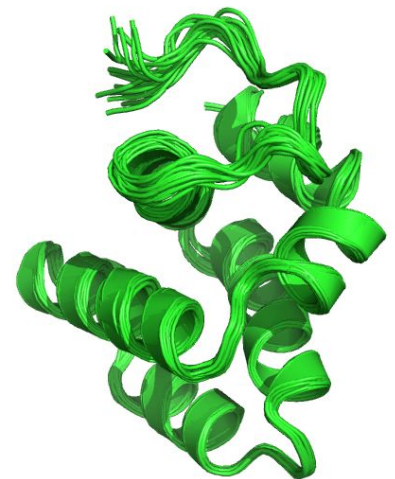
Сходимость структуры - критерий качества



плохая
сходимость



средняя
сходимость

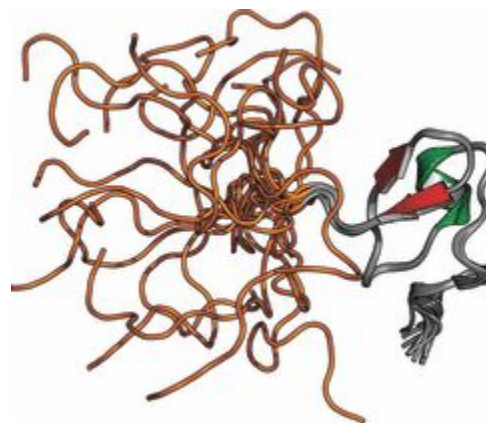
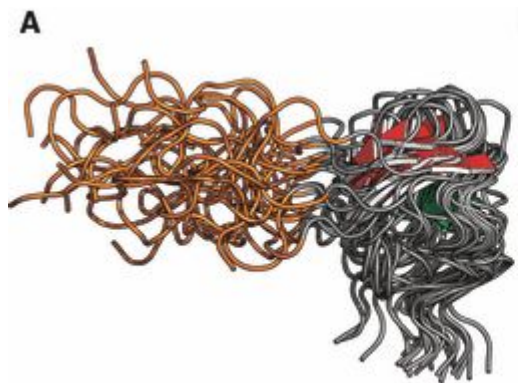


хорошая сходимость

RIP2-CARD домен, 10 кДа

Особенности структуры ЯМР

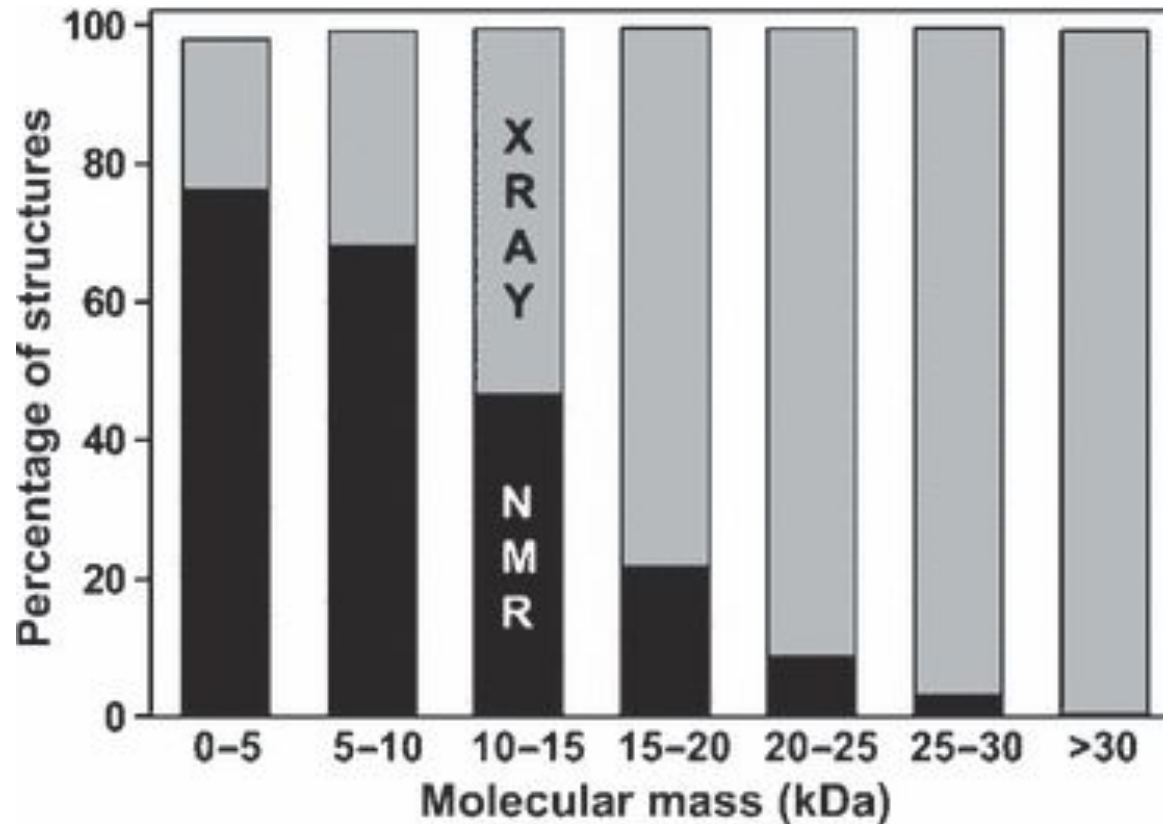
- ЯМР-спектроскопия дает структуру, **усредненную по ансамблю молекул.**
- Нужно с осторожностью относиться к полученным данным, **на участках с подвижностью.**
- **У структуры ЯМР нет параметра «разрешение».**
- Набор конформеров в PDB **не описывает динамику белка**, а характеризует качество структуры



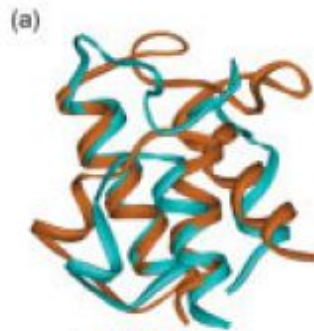
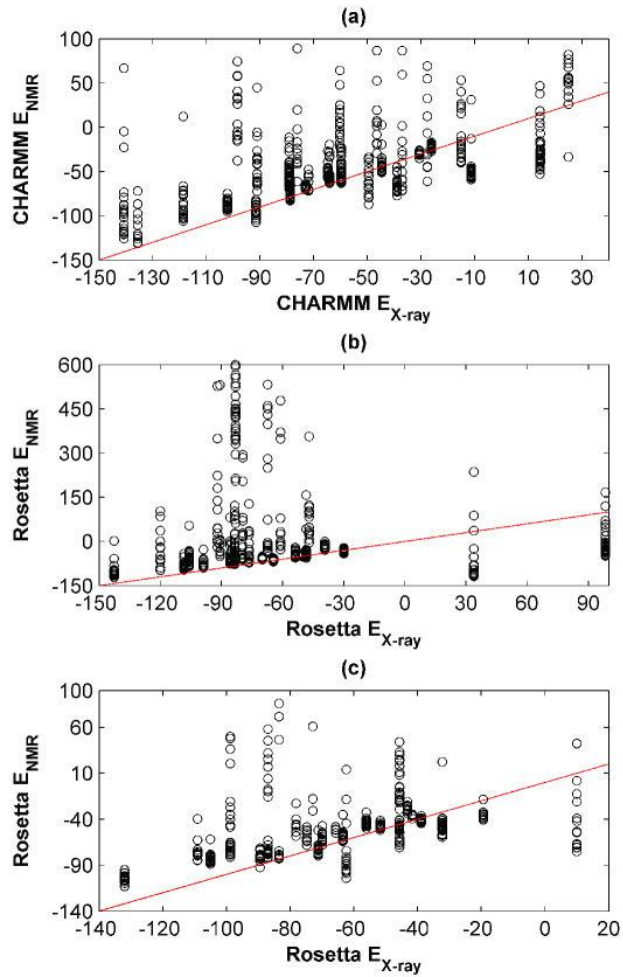
Экономика ЯМР

- Для белка ~10 кДа:
 - Более 1 мг белка (меченого изотопами, выращенного на бедной среде)
 - 14 дней (как минимум) на приборе, оснащённом криодатчиком
 - 3 дня на отнесение
 - 2-5 дней расчет структуры
 - Или автоматическое отнесение и расчет за 1 день, потом 5 дней на проверку ошибок

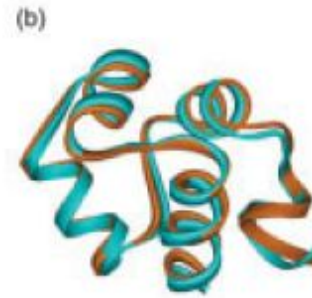
Ограничение по размеру



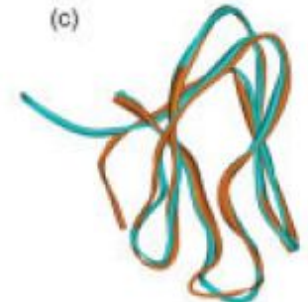
RMP vs PCA



Acyl carrier protein
110h (X-ray) – 1acp (NMR)

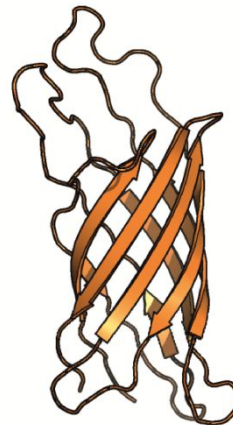


Phage 434 repressor
1r69 (X-ray) – 1r63 (NMR)



Tendamistat
1hoe (X-ray) – 2ait (NMR)

B



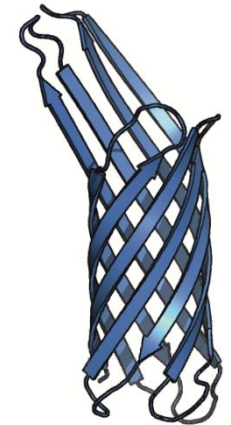
By NMR
in DHPC micelles
(PDB code: 1q9f)



By NMR
in DPC micelles
(PDB code: 1m07)



By NMR
in LPNs
(PDB code: 2m06)



By X-ray
(PDB code: 1qj9)

История одной группы:

- 263 белка и на рентген и на ЯМР
- Всего **51%** дали хорошие спектры, при этом 13% - несвернуты
- Из 64 белков с очень хорошими ЯМР спектрами **только для 21** удалось **подобрать условия кристаллизации**
- Из белков с плохими спектрами для **25%** удалось получить кристаллы.
- Резюме: [методы взаимодополняющие](#)

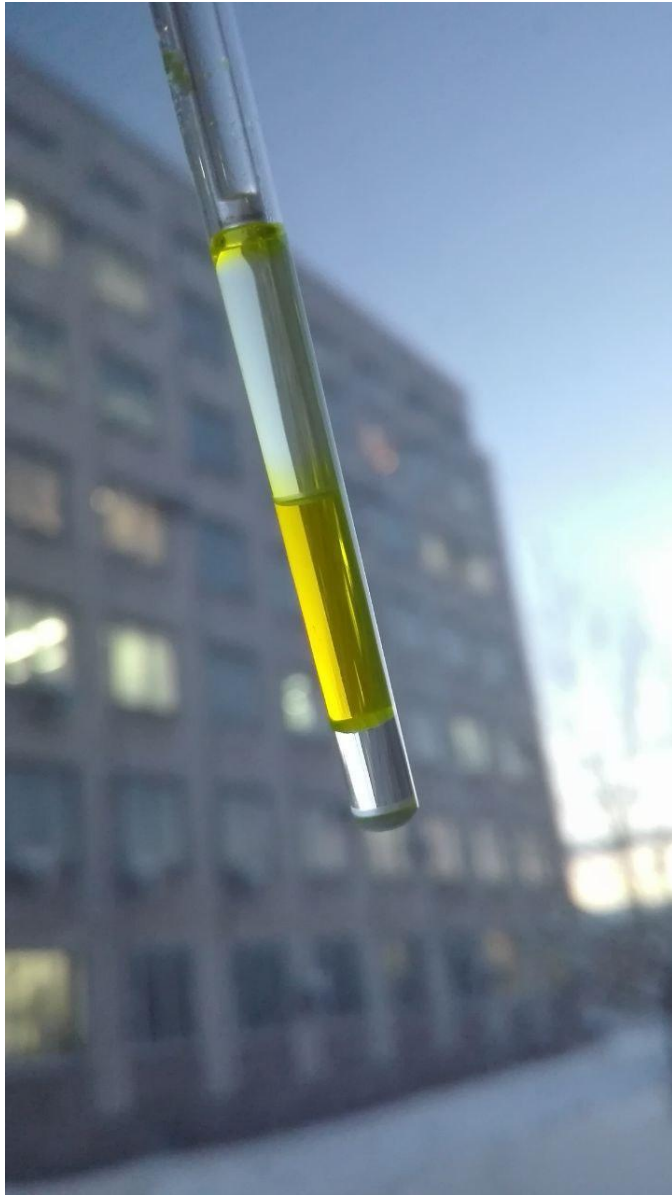
Для каких белков используется ЯМР

- Небольшие белки до 15-25 кДа
- Белки, которые не кристаллизуются
- Мембранные белки
- IDP – несвернутые белки
- Любые белки, если важна не структура, а конформационные перестройки в ответ на стимул

Часть IV

Преимущества и недостатки ЯМР

Сила: ЯМР работает с “нативным” окружением



- Водный раствор
- Комнатная температура
- Атмосферное давление
- В живой клетке
- Подвижность - “как в жизни”
- Любая активность - прямо в ЯМР спектрометре

Другие методы:

- Кристалл
- Вакуум
- Криогенный холод

Слабость: Требуется обогащение магнитными изотопами

Для обогащения нужен профессиональный **wet lab**



Highly Efficient NMR Assignment of Intrinsically Disordered Proteins: Application to B- and T Cell Receptor Domains

Linnéa Isaksson¹, Maxim Mayzel¹, Maria Saline¹, Anders Pedersen¹, Joakim Rosenlöv¹, Bernhard Brutscher², B. Göran Karlsson¹, Vladislav Y. Orekhov^{1*}

¹ Swedish NMR Centre, University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden, ² Institut de Biologie Structurale, Université Grenoble CEA CNRS, Grenoble, France

Abstract

We present an integrated approach for efficient characterization of intrinsically disordered proteins. Batch cell-free expression, fast data acquisition, automated analysis, and statistical validation with data resampling have been combined for achieving cost-effective protein expression, and rapid automated backbone assignment. The new methodology is applied for characterization of five cytosolic domains from T- and B-cell receptors in solution.

Другие структурные методы ничего не могут сделать с неупорядоченными белками. Просто совсем ничего.

Слабость: Ограничение на размер молекулы <30кДа для стандартных подходов

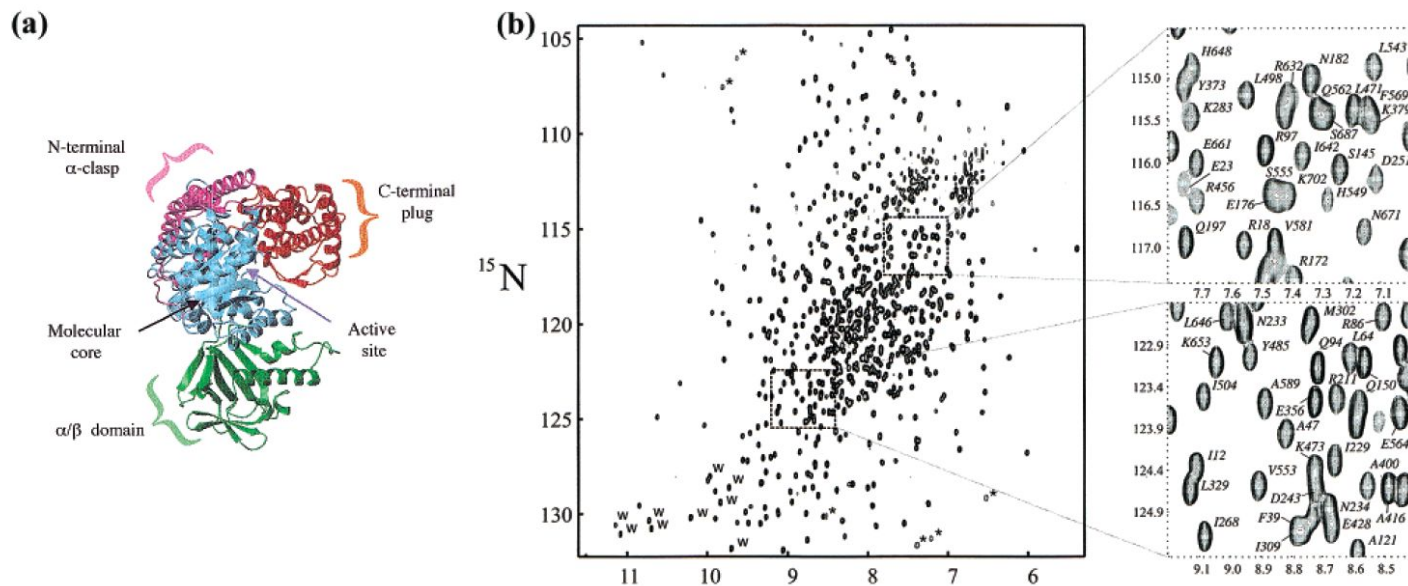
J|A|C|S

A R T I C L E S

Published on Web 08/01/2002

Four-Dimensional NMR Spectroscopy of a 723-Residue Protein: Chemical Shift Assignments and Secondary Structure of Malate Synthase G

Vitali Tugarinov,[†] Ranjith Muhandiram,[†] Ayeda Ayed,[‡] and Lewis E. Kay^{*,†}



Сила: Мембранные белки.

Science. 2008 August 29; 321(5893): 1206–1210. doi:10.1126/science.1161302.

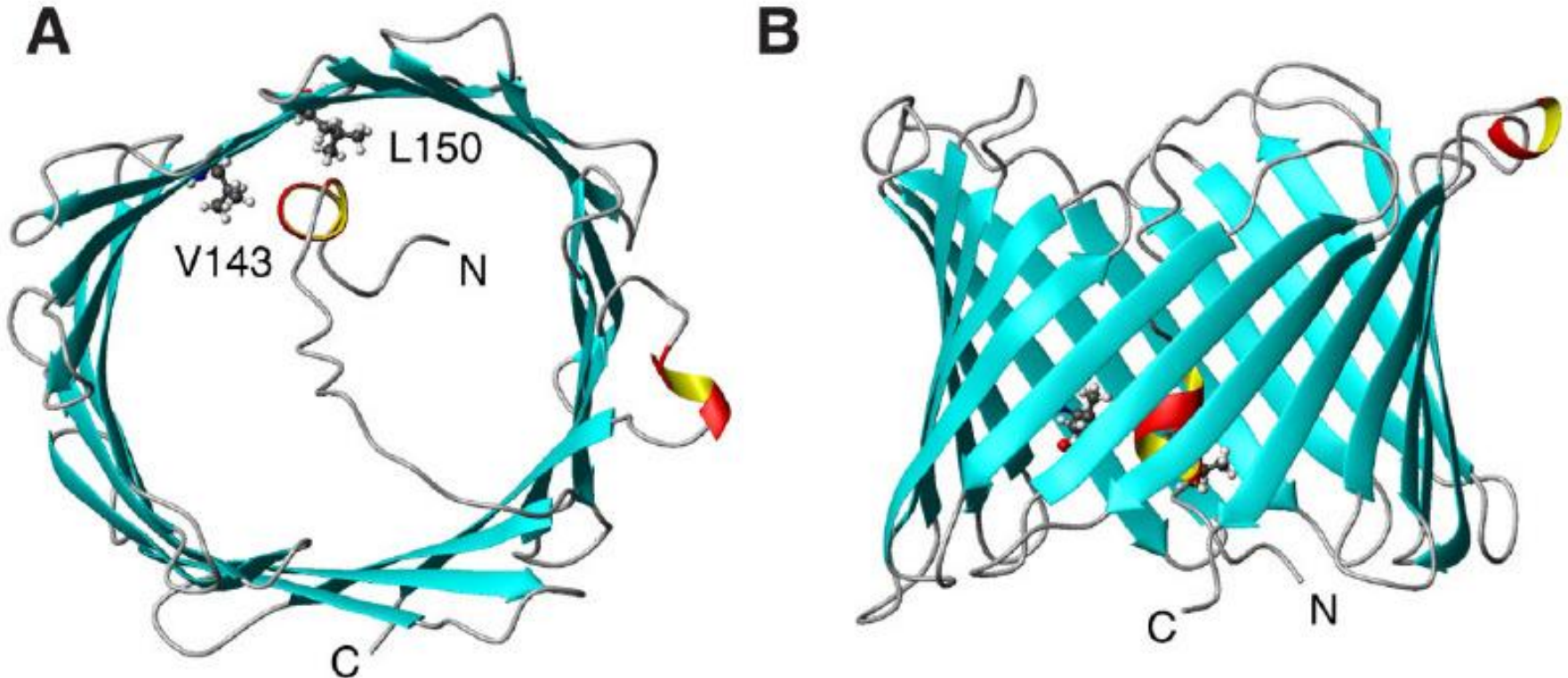
Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles**

Sebastian Hiller¹, Robert G. Garces^{1,†}, Thomas J. Malia^{1,†,‡}, Vladislav Y. Orekhov^{1,3}, Marco Colombini², and Gerhard Wagner^{1,*}

¹Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, Harvard Medical School, Boston MA 02115, USA

²Department of Biology, University of Maryland, College Park MD 20742, USA

³Swedish NMR Centre, University of Gothenburg, Box 465, Gothenburg 40530, Sweden



Сила: Динамика, подвижность, термодинамика, кинетика



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

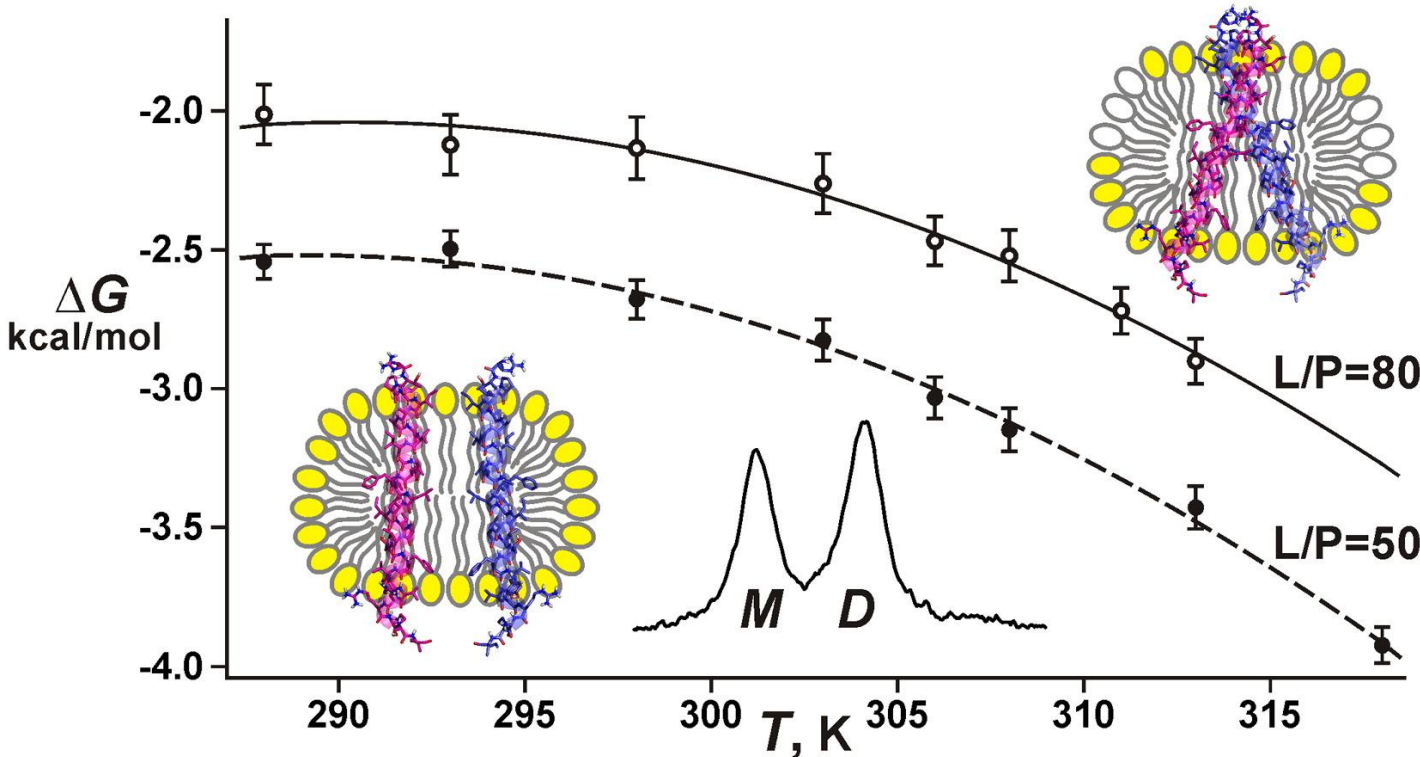
Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem



Structural and thermodynamic insight into the process of “weak” dimerization of the ErbB4 transmembrane domain by solution NMR

Eduard V. Bocharov ^{a,*}, Konstantin S. Mineev ^{a,1}, Marina V. Goncharuk ^{a,b}, Alexander S. Arseniev ^a



Слабость: Дорого. Очень дорого.

Купить ЯМР спектрометр:

300 MHz - 300 тыс евро

600 MHz - 3 млн евро

700 MHz - 5 млн евро

800 MHz - 7 млн евро

1.2 GHz - 50 млн евро

Содержать парк ЯМР:

Жидкий гелий (600+700+800):

5 млн руб/год - цены растут

Криосервис (600 + 800):

4 млн руб/год - цены растут

Размер гранта РФФ:

6 млн руб

ВЫКЛЮЧИТЬ НЕЛЬЗЯ!

Сравнение методов структурной биологии

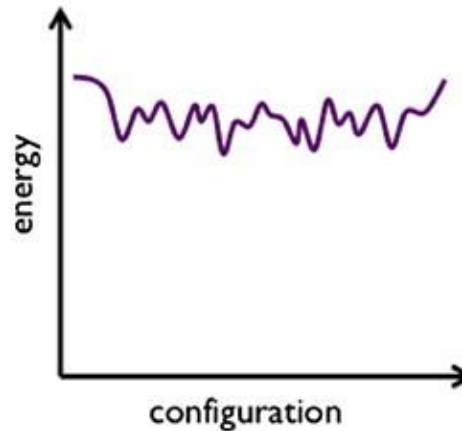
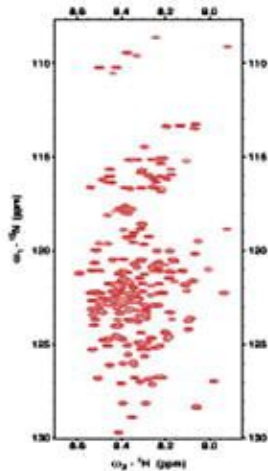
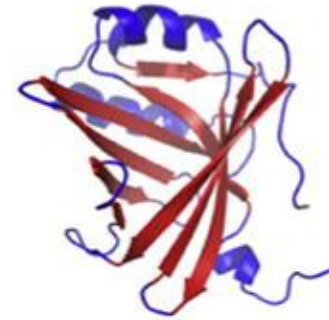
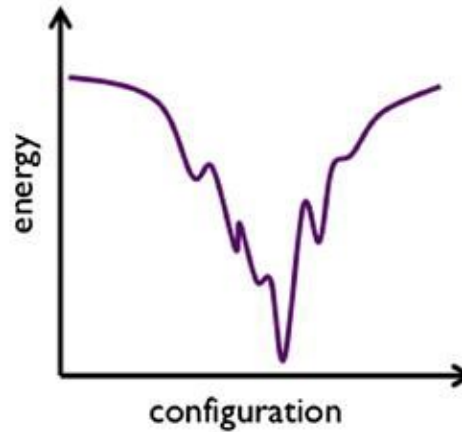
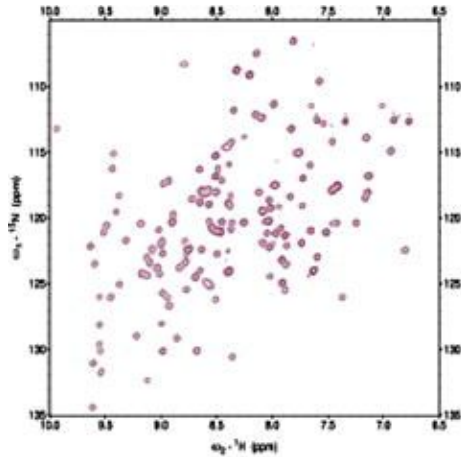
	ЯМР	РСА	Cryo-EM	FRET	ЭПР	AFM
Чувствительность	-	+	+	+++	+	+++
Дороговизна	++	++	++	-	-	+
Информация	Структура, подвижность, кинетика, термодинамика	структура	структура	Отдельные расстояния, термодинамика, single-molecule	Отдельные расстояния	Движения отдельных молекул, низкое разрешение
Ограничения	Масса <100 кДа	кристаллизация	Масса >100 кДа, заморозка	метка	метка	Плоская картинка
Подбор условий	++	+++	+	-	-	-

Часть V (опциональная)

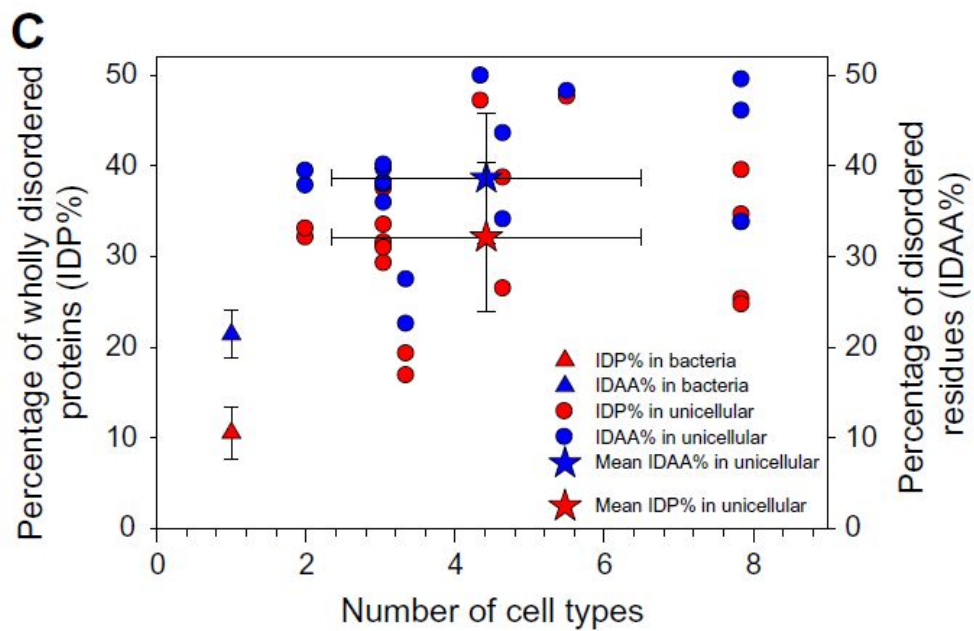
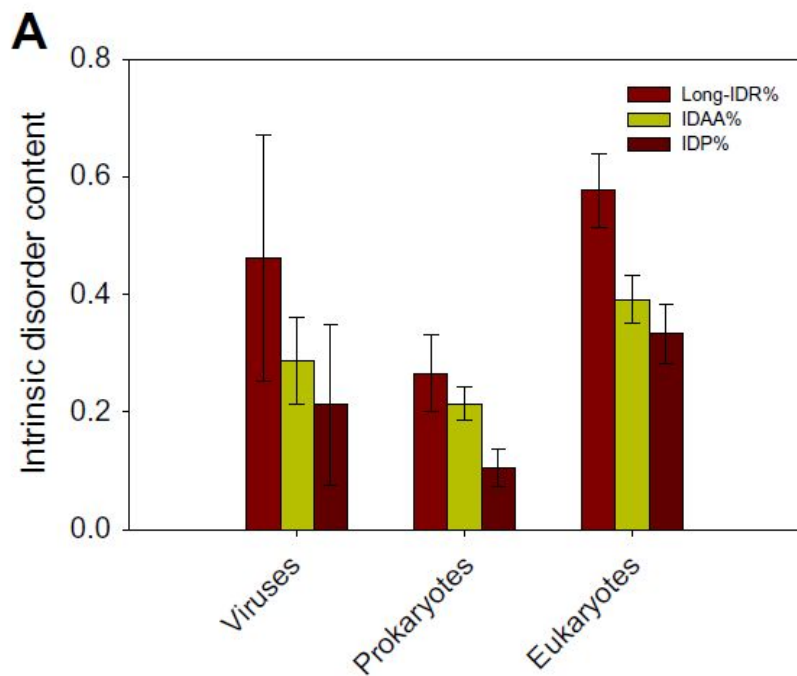
Что еще можно делать при помощи ЯМР?

Спасибо за внимание?

ЯМР неупорядоченных белков



До половины белков неструктурированы

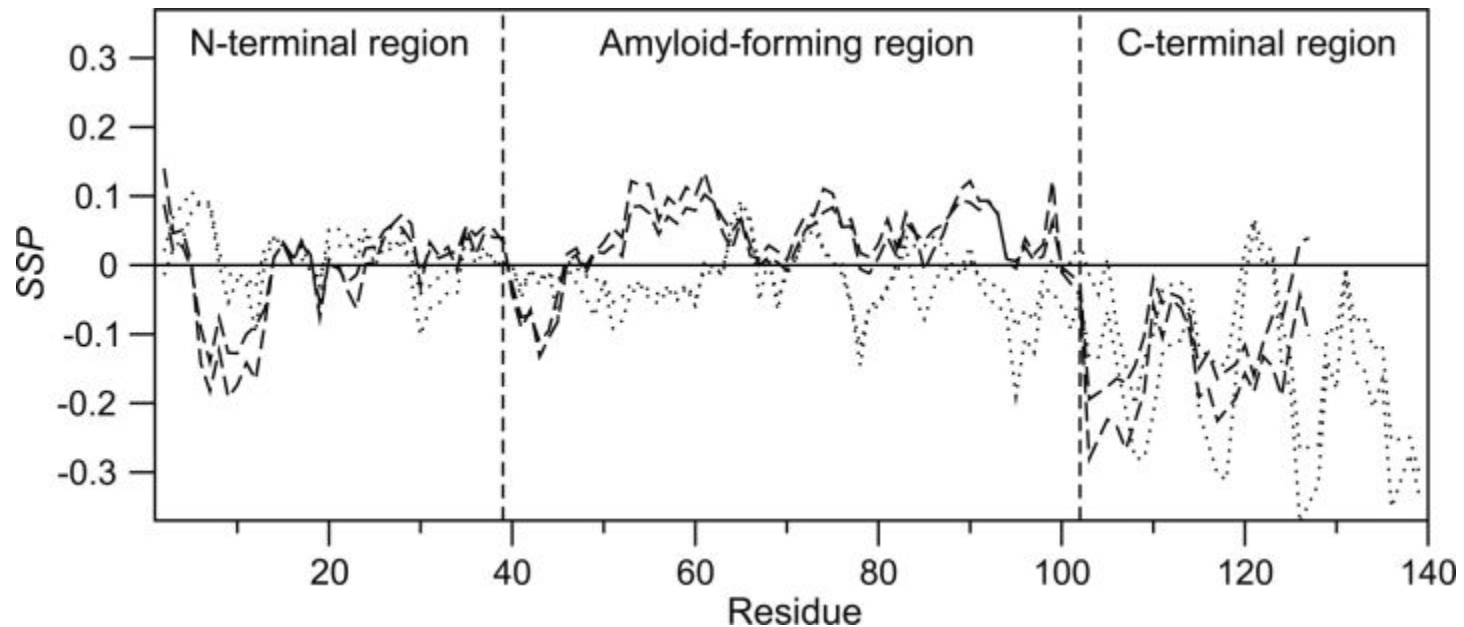


Примеры IDP

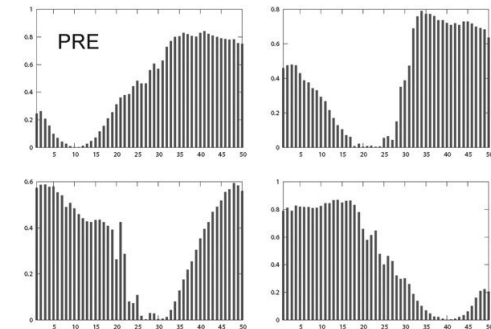
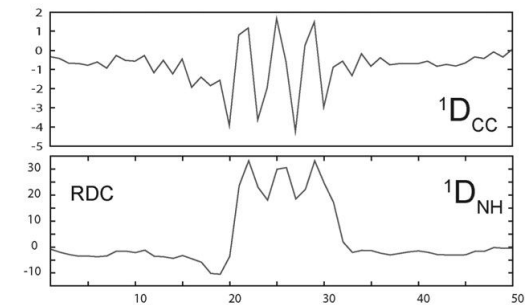
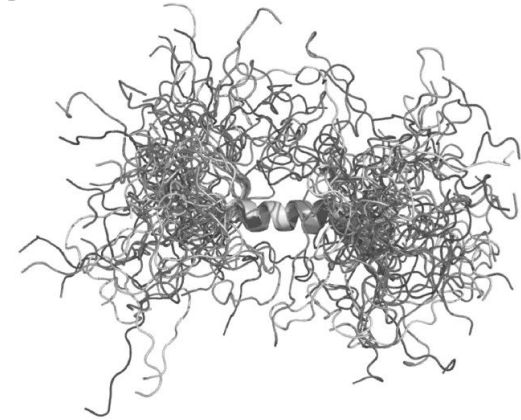
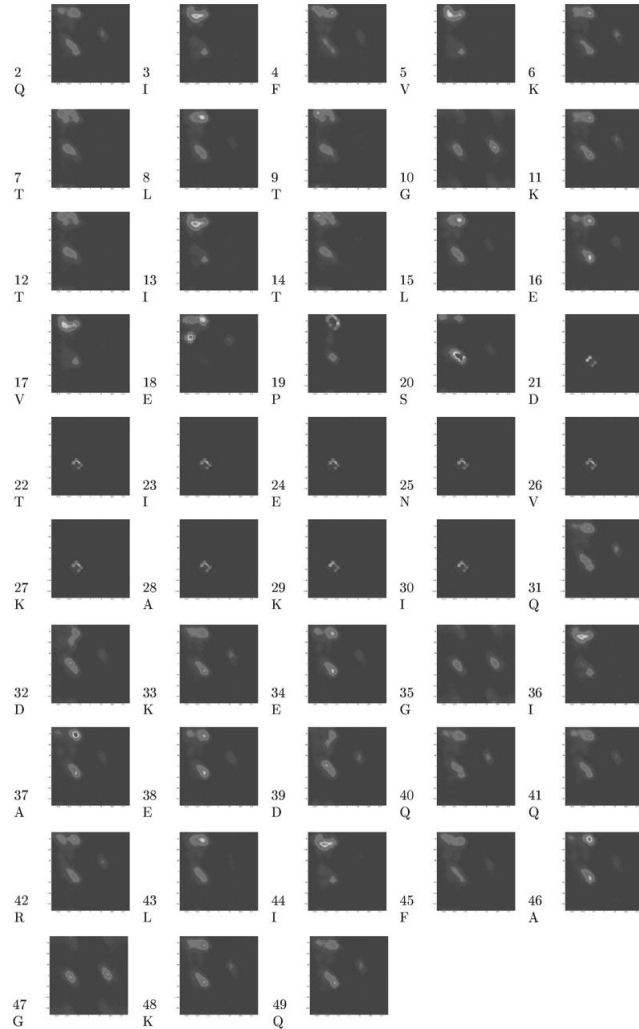
- alpha-synuclein (болезнь Паркинсона)
- beta-amyloid (болезнь Альцгеймера)
- Tau protein (болезнь Альцгеймера)
- внутриклеточные домены TCR/BCR (иммунная система)

Анализ IDP: SSP, secondary structure propensity

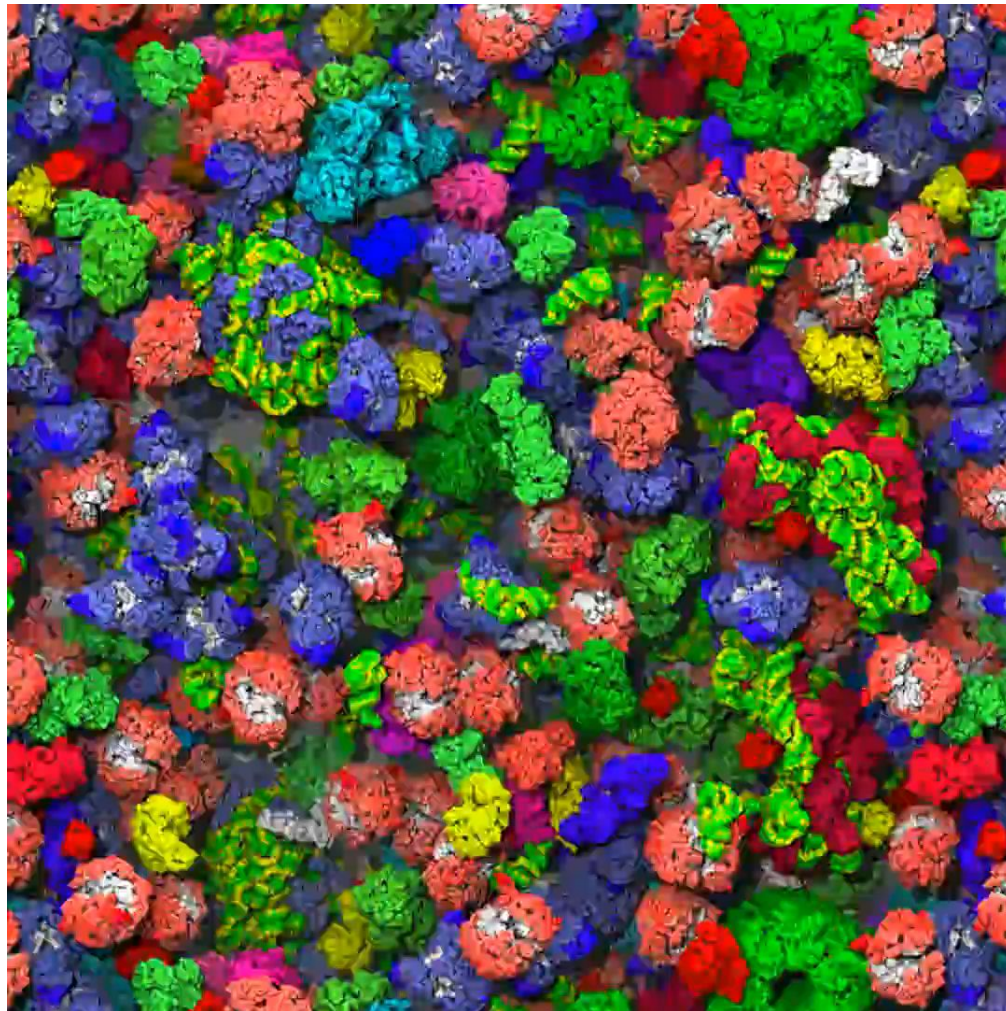
$$SSP_i = \frac{\sum_{j=i-2}^{i+2} \sum_X \begin{cases} \frac{|\Delta\delta X_{j \text{ obs}}|}{\sigma_j \alpha} \text{ if } (\Delta\delta X_{j \text{ obs}})(\Delta\delta X_{j \alpha}) > 0 \\ -\frac{|\Delta\delta X_{j \text{ obs}}|}{\sigma_j \beta} \text{ if } (\Delta\delta X_{j \text{ obs}})(\Delta\delta X_{j \beta}) > 0 \end{cases}}{\sum_{j=i-2}^{i+2} \sum_X \begin{cases} \frac{|\Delta\delta X_{j \alpha}|}{\sigma_j \alpha} \text{ if } (\Delta\delta X_{j \text{ obs}})(\Delta\delta X_{j \alpha}) > 0 \\ +\frac{|\Delta\delta X_{j \beta}|}{\sigma_j \beta} \text{ if } (\Delta\delta X_{j \text{ obs}})(\Delta\delta X_{j \beta}) > 0 \end{cases}} \quad (2)$$



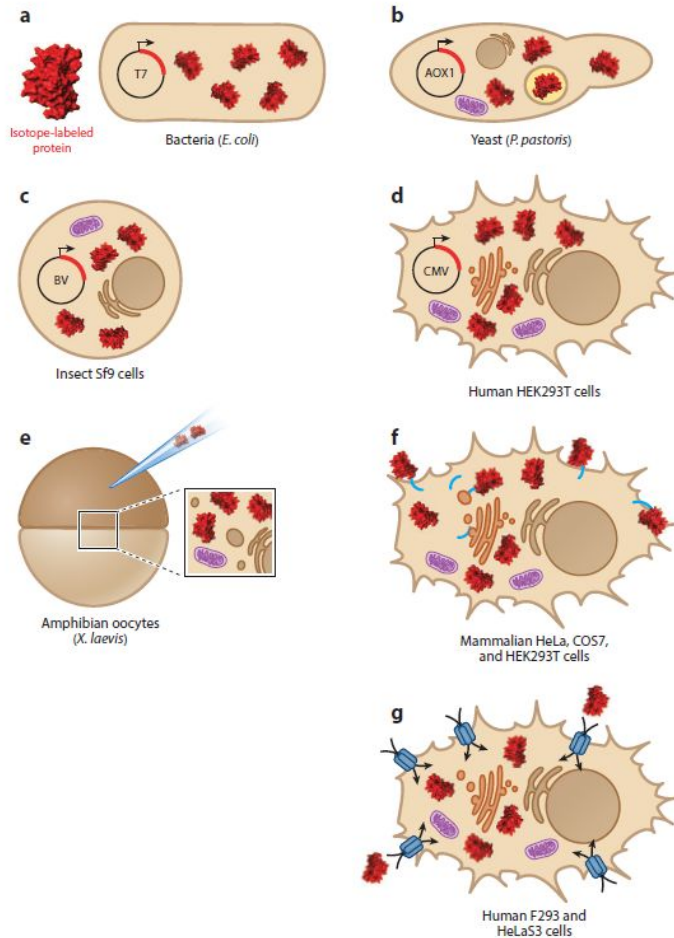
Анализ IDP: генерация ансамблей



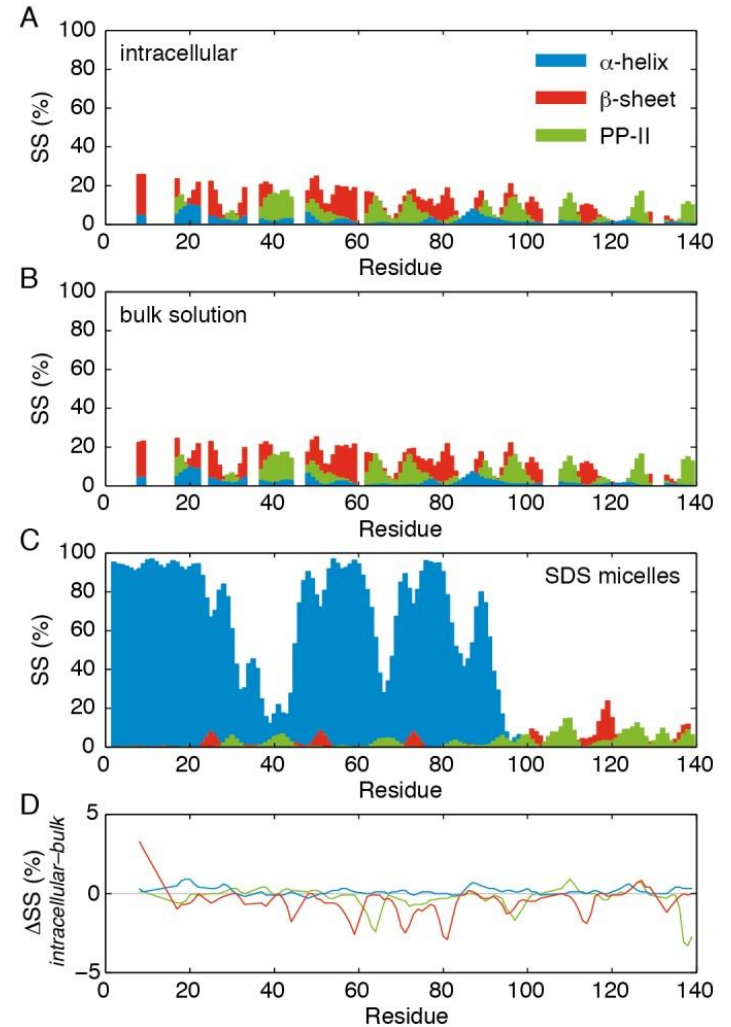
Что это?



In-Cell NMR

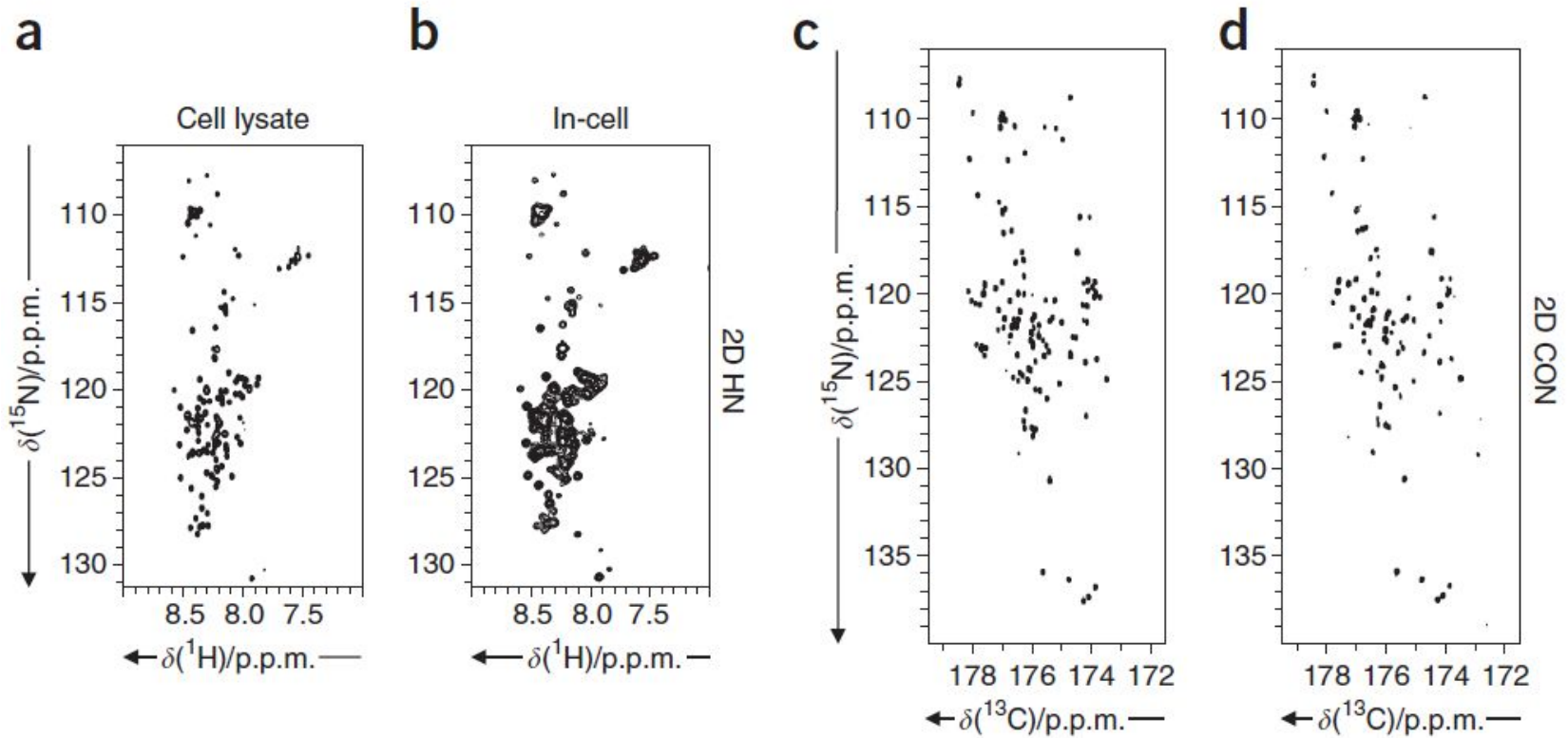


Selenko et al., Ann Rev Biophys, 2014



Waudby et al., PLOS One, 2013

In-Cell NMR



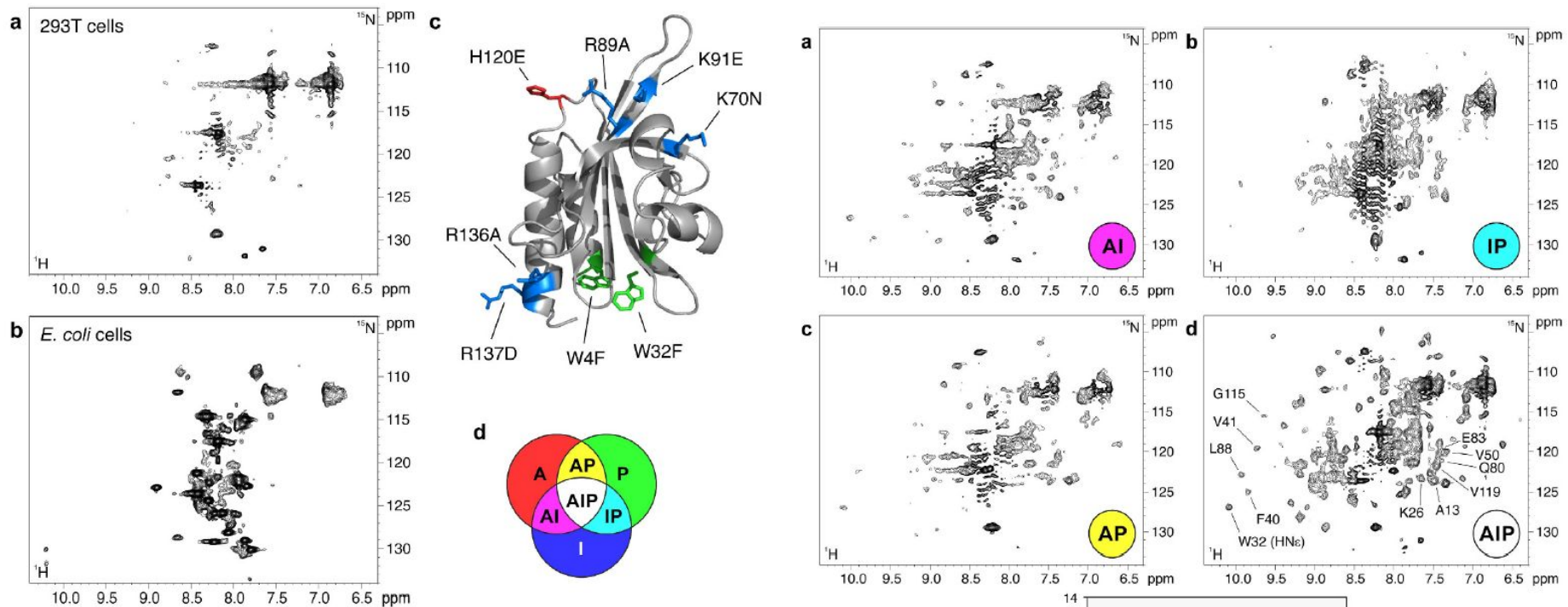
OPEN Protein interaction patterns in different cellular environments are revealed by in-cell NMR

Received: 16 June 2015

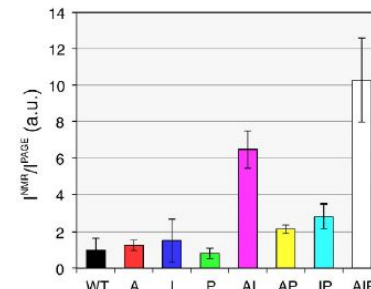
Accepted: 20 August 2015

Published: 24 September 2015

Letizia Barbieri^{1,2}, Enrico Luchinat^{1,3} & Lucia Banci^{1,4}

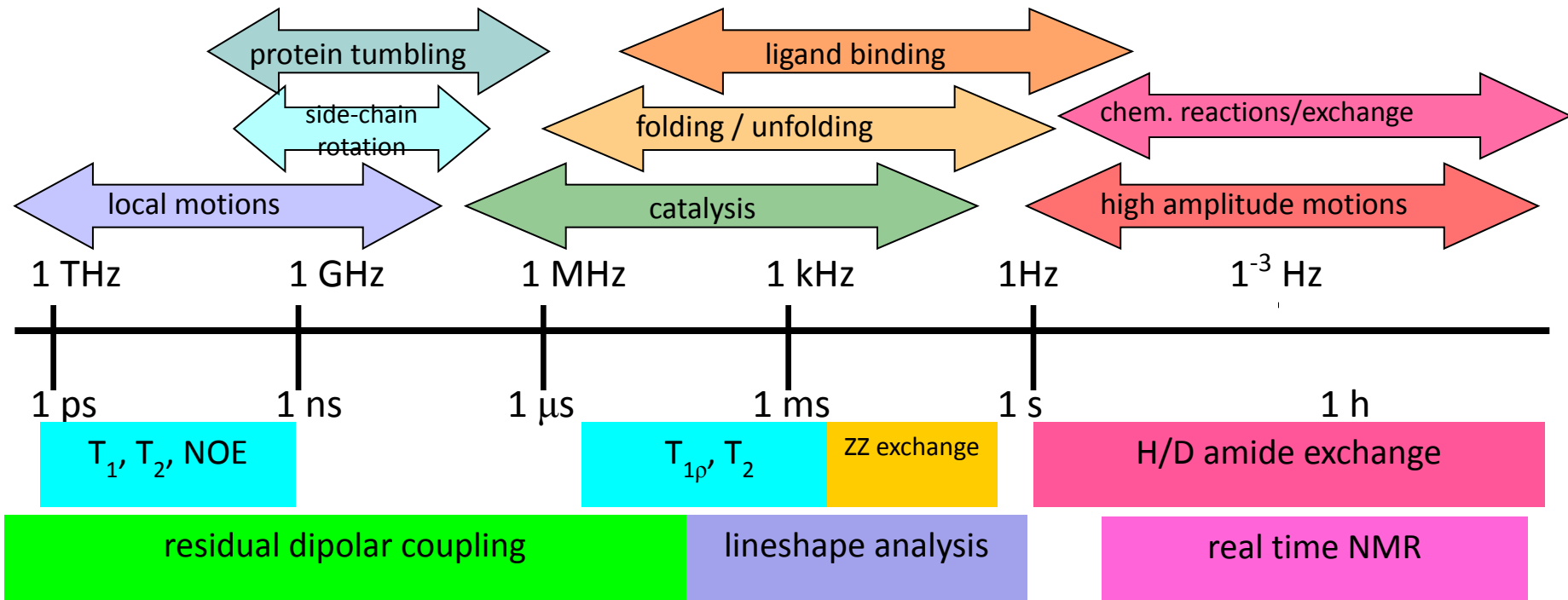


A - actin, P - PLP, I - PtdInsP2, PFN1 - profilin1, белок цитоскелета



ЯМР в изучении динамических свойств биомолекул

Динамические процессы



Методы и измеряемые параметры ЯМР

Функция спектральной плотности $J(\omega)$

- Все скорости ЯМР релаксации выражаются через значения функции спектральной плотности $J(\omega)$ для некоторых значений частоты ω
- Функция спектральной плотности $J(\omega)$ связана с функцией корреляции $G(\tau)$ преобразованием Фурье:

$$J(\omega) = 2 \int_0^{\infty} \cos(\omega\tau) G(\tau) d\tau$$

- Функция корреляции $G(\tau)$ определяет скоррелированность радиус-вектора в моменты времени, отстоящие друг от друга на время τ :

$$G(\tau) = \frac{1}{5} \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta(\tau) - 1}{2} \right\rangle$$

- $\theta(\tau)$ – угол между направлением радиус-вектора в момент времени t и в момент времени $t + \tau$. Угловые скобки означают усреднение по времени t .

Скорости релаксации

$$R_{1I} = \frac{1}{T_{1I}} = \frac{d}{4} [J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_I + \omega_S)]$$

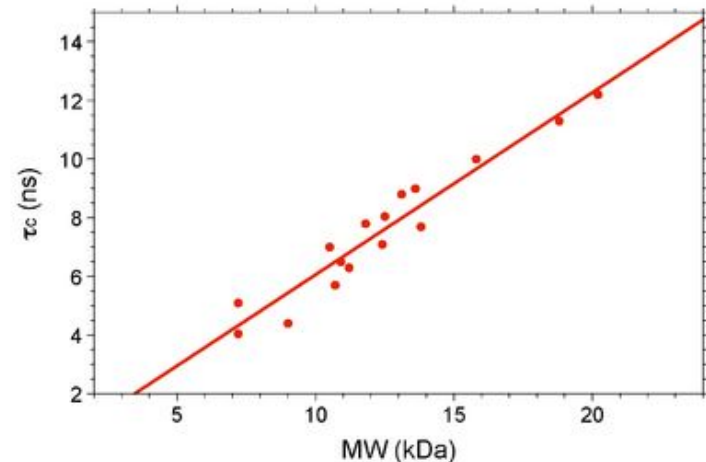
$$R_{2I} = \frac{1}{T_{2I}} = \frac{d}{8} [4J(0) + J(\omega_I - \omega_S) + 3J(\omega_I) + 6J(\omega_S) + 6J(\omega_I + \omega_S)]$$

$$R_{NOE(I,S)} = \frac{d}{4} [-J(\omega_I - \omega_S) + 6J(\omega_I + \omega_S)]$$

Параметры подвижности молекулы как целого

- Время корреляции вращательной диффузии τ_c .
Среднее время, за которое молекула повернется на 1 радиан.
- Уравнение Стокса-Эйнштейна для вращательной диффузии

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r^3}{3kT}$$



Параметры внутренних движений

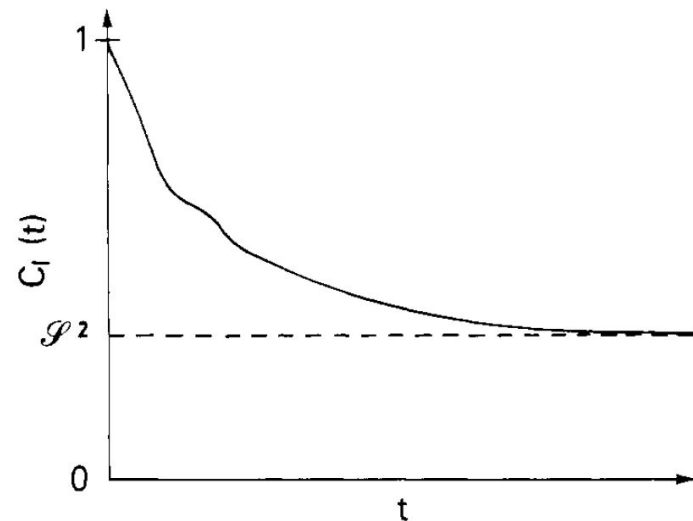
- параметр порядка S^2 - корреляция между начальным и конечным направлением вектора в молекулярной системе координат (связанной с движениями молекулы)

$$C_I(t) = \langle P_2(\hat{\mu}(0) \cdot \hat{\mu}(t)) \rangle$$

$$C_I(\infty) = S^2$$

- время корреляции движения τ_i

$$C_I^A(t) = S^2 + (1 - S^2)e^{-t/\tau_e}$$



Модель-независимый подход

Измеряются три параметра ЯМР-релаксации, которые зависят от значения функции спектральной плотности в пяти точках

Нужно параметризовать функцию спектральной плотности!

Простая модель: вращение молекулы (нс) и очень быстрые движения (пс):

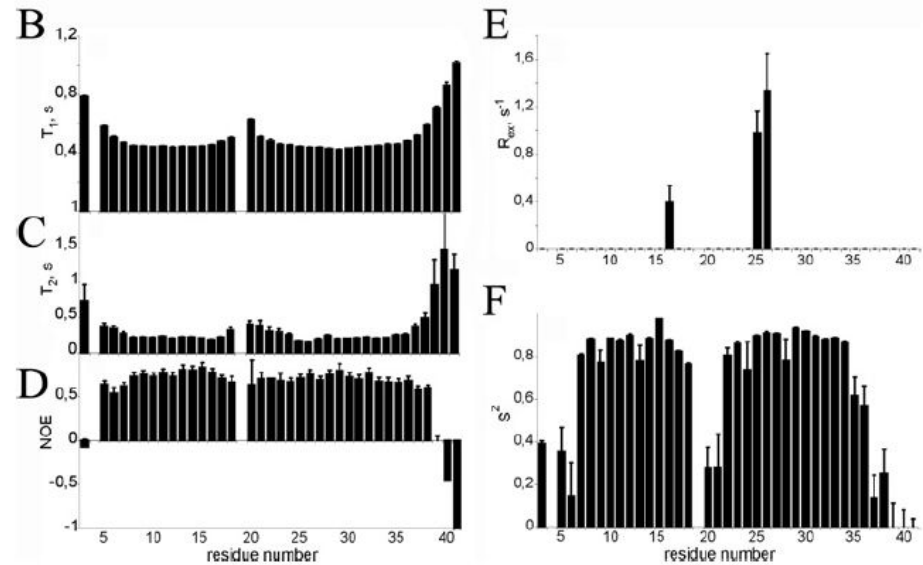
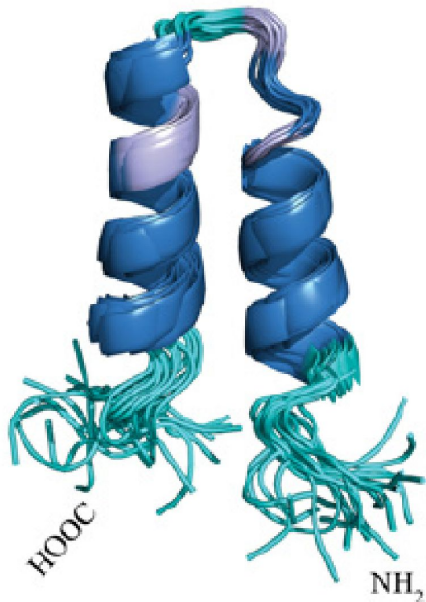
$$J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{S^2 \tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

Сложная модель: вращение молекулы (нс), быстрые движения (пс):

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + (1 - S^2) \frac{\tau_e}{1 + \omega^2 \tau_e^2} \right]$$
$$\tau_e^{-1} = \tau_c^{-1} + \tau_i^{-1}$$

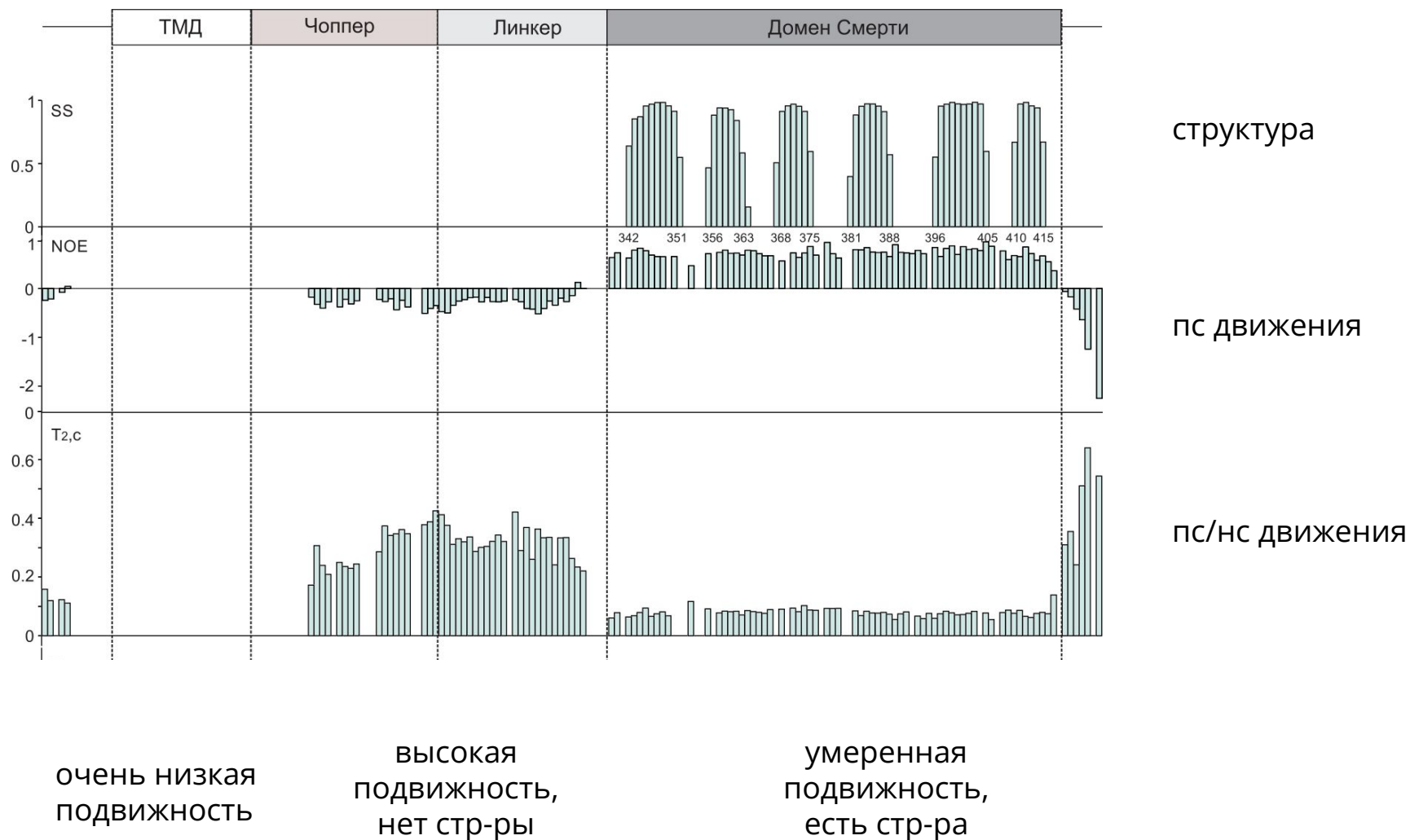
Результат анализа

Oparin et al., Biochem J, 2012



- анализ релаксации позволяет получать корректную структуру

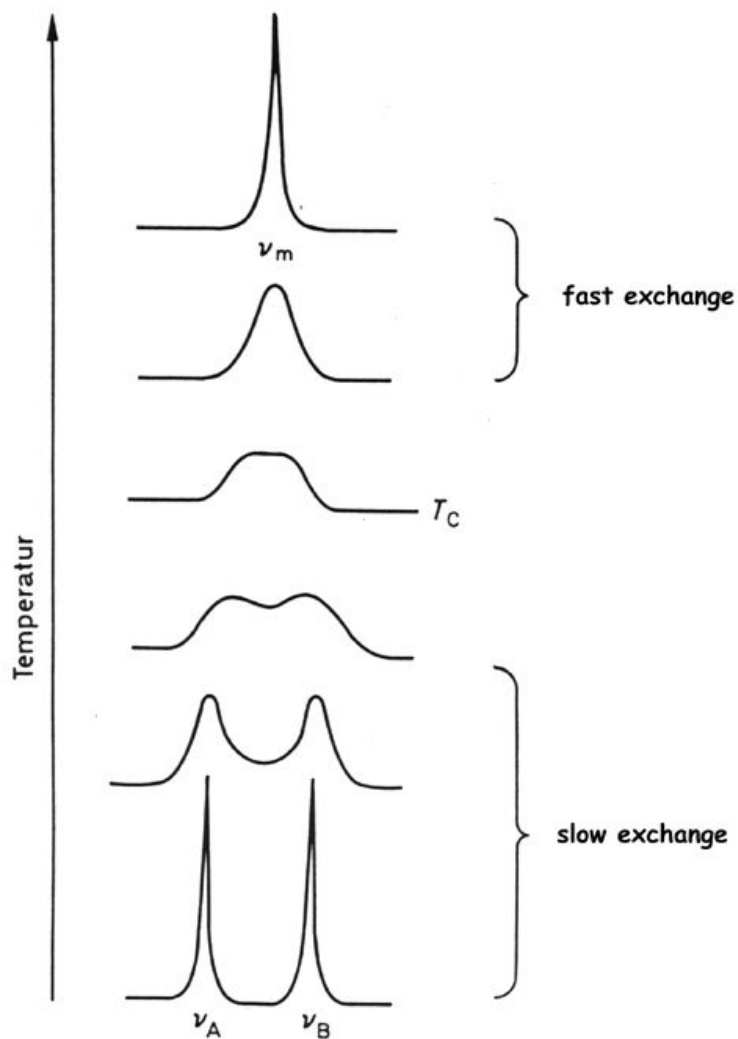
конформация ЦПД не зависит от состояния ТМД р75NTR



Обменные процессы/медленные движения

шкала химического сдвига

шкала параметров релаксации



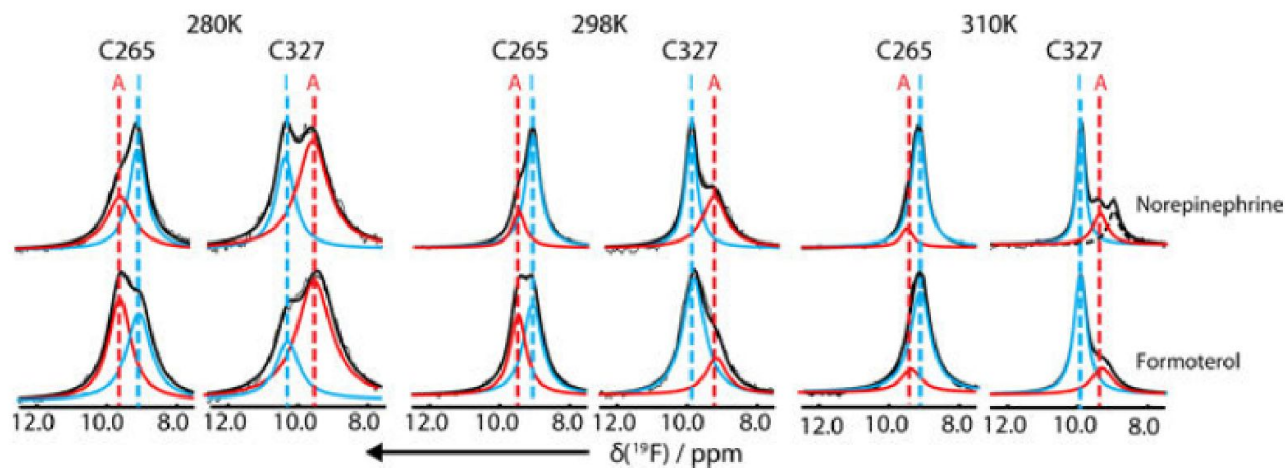
пс - быстрые движения

нс - вращение молекулы

мкс-мс - медленные движения

β_2 -adrenergic receptor activation by agonists studied with ^{19}F -NMR

Reto Horst^{a,§}, Jeffrey J. Liu^a, Raymond C. Stevens^a, and Kurt Wüthrich^{a,b,*}



β_2 AR complex	ΔH_0 [kJ/mol]	ΔS_0 [kJ/mol·K]
265/formoterol	40 ± 11	0.141 ± 0.40
265/norepinephrine	44 ± 1	0.159 ± 0.40
327/formoterol	38 ± 2	0.130 ± 0.10
327/norepinephrine	35 ± 3	0.117 ± 0.10

A_{2A} adenosine receptor functional states characterized by ¹⁹F-NMR

Lukas Sušac^a, Matthew T. Eddy^{a,b}, Tatiana Didenko^a, Raymond C. Stevens^b, and Kurt Wüthrich^{a,c,1}

^aDepartment of Integrative Structural and Computational Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037; ^bThe Bridge Institute, Department of Biological Sciences, University of Southern California, Los Angeles, CA 90089; and ^cSkaggs Institute for Chemical Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA 92037

