

„Molekulare Biophysik“

NMR-Spektroskopie

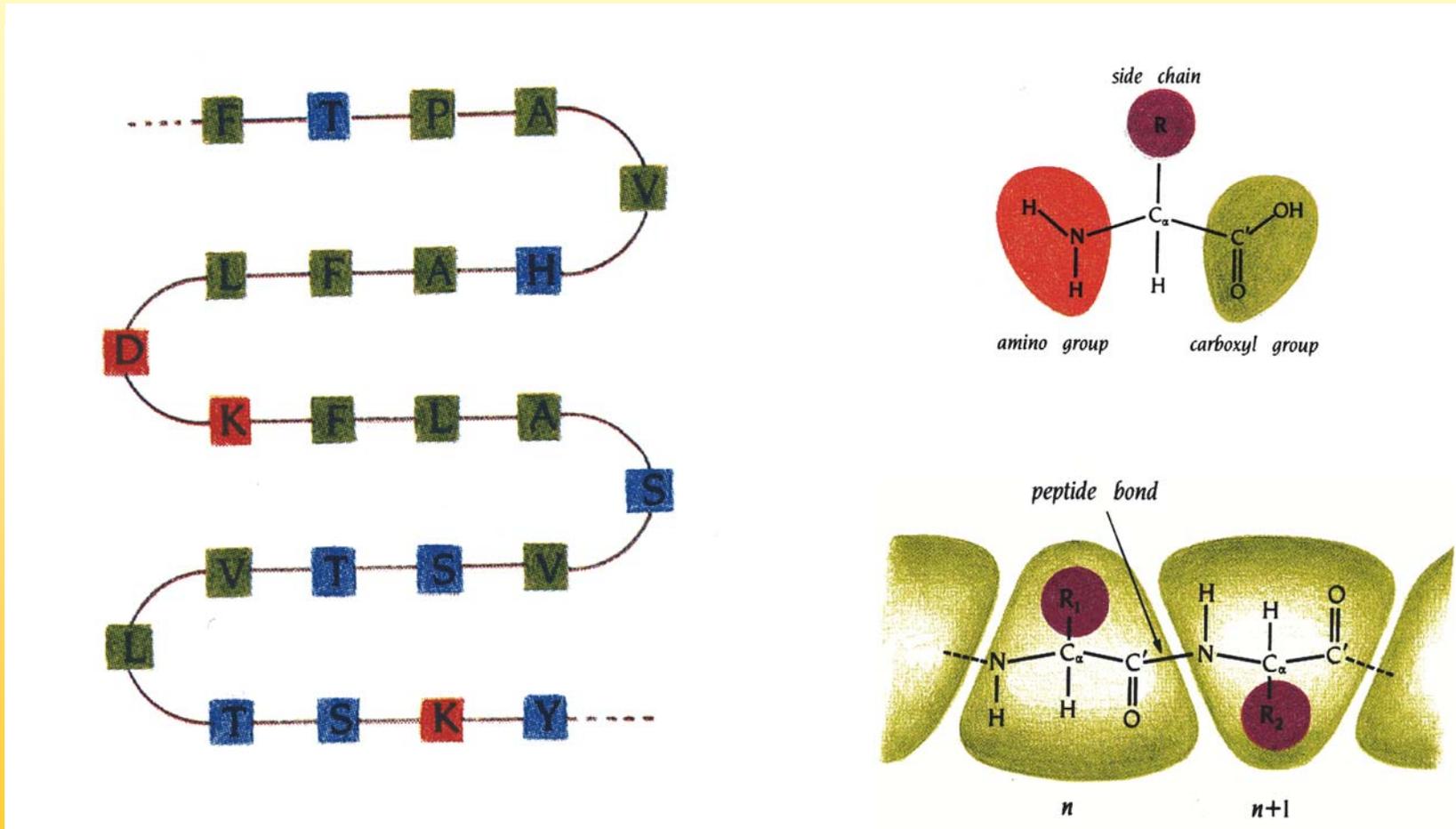
(Teil 4)



Peptide

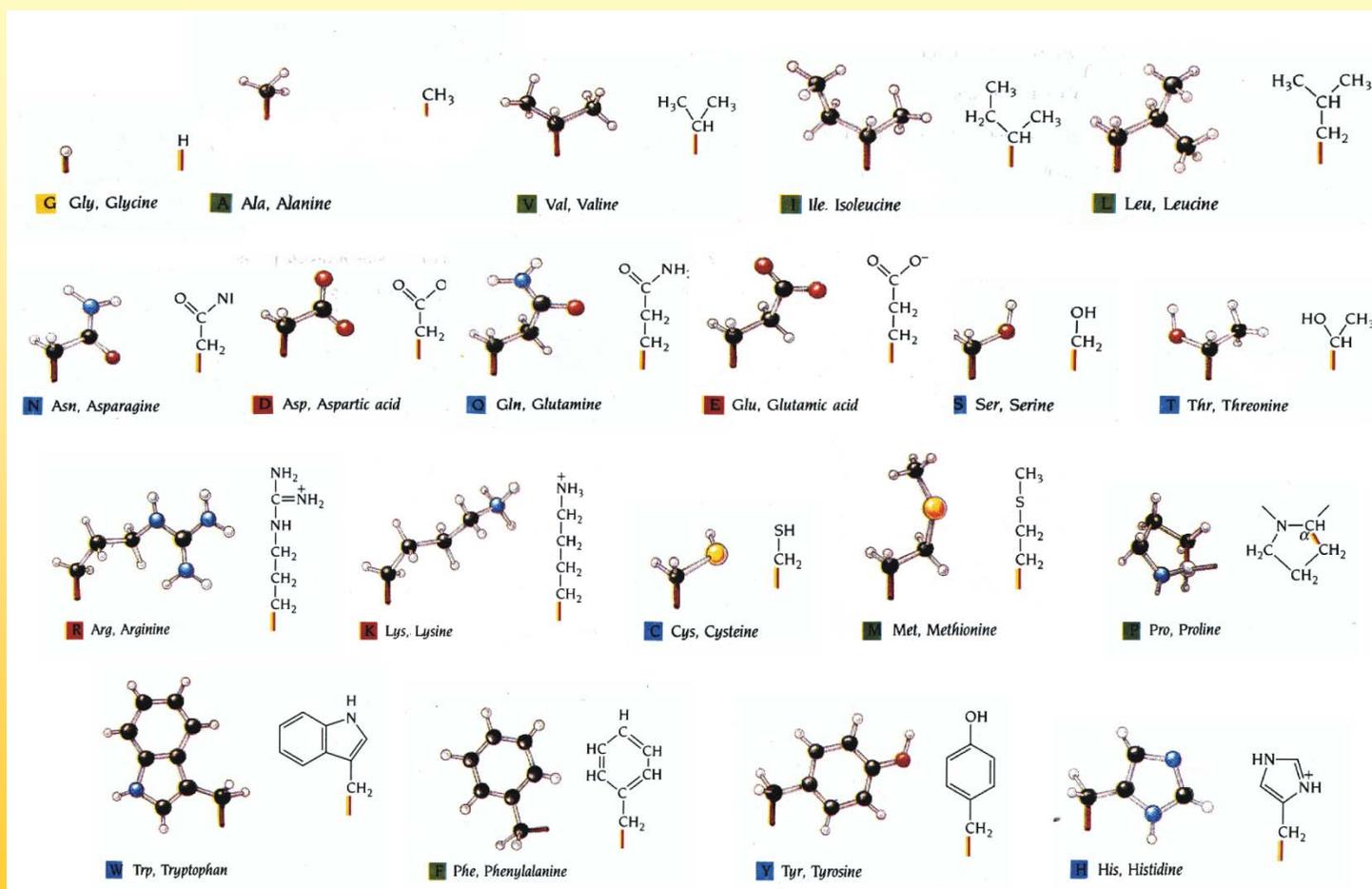
Peptide

Die Primärstruktur



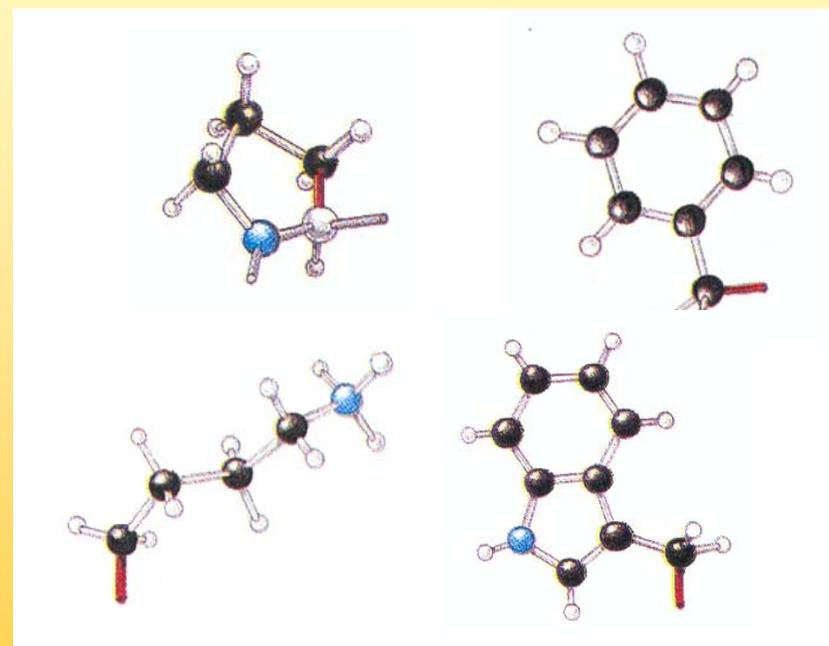
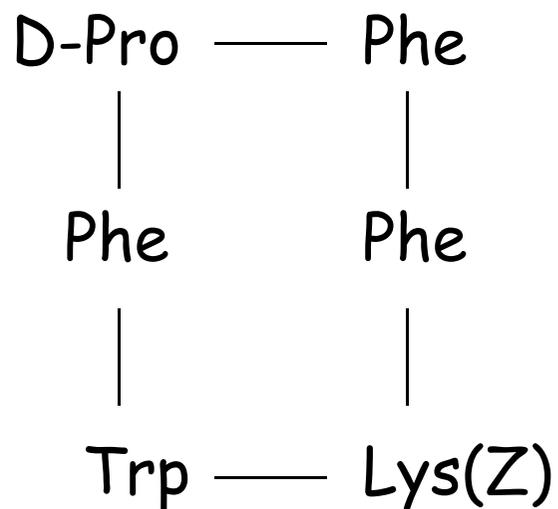
Peptide

20 „natürliche“ Aminosäuren

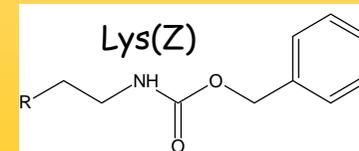


Peptide

Cyclische Peptide sind kleine Peptide mit fixierter Konformation.

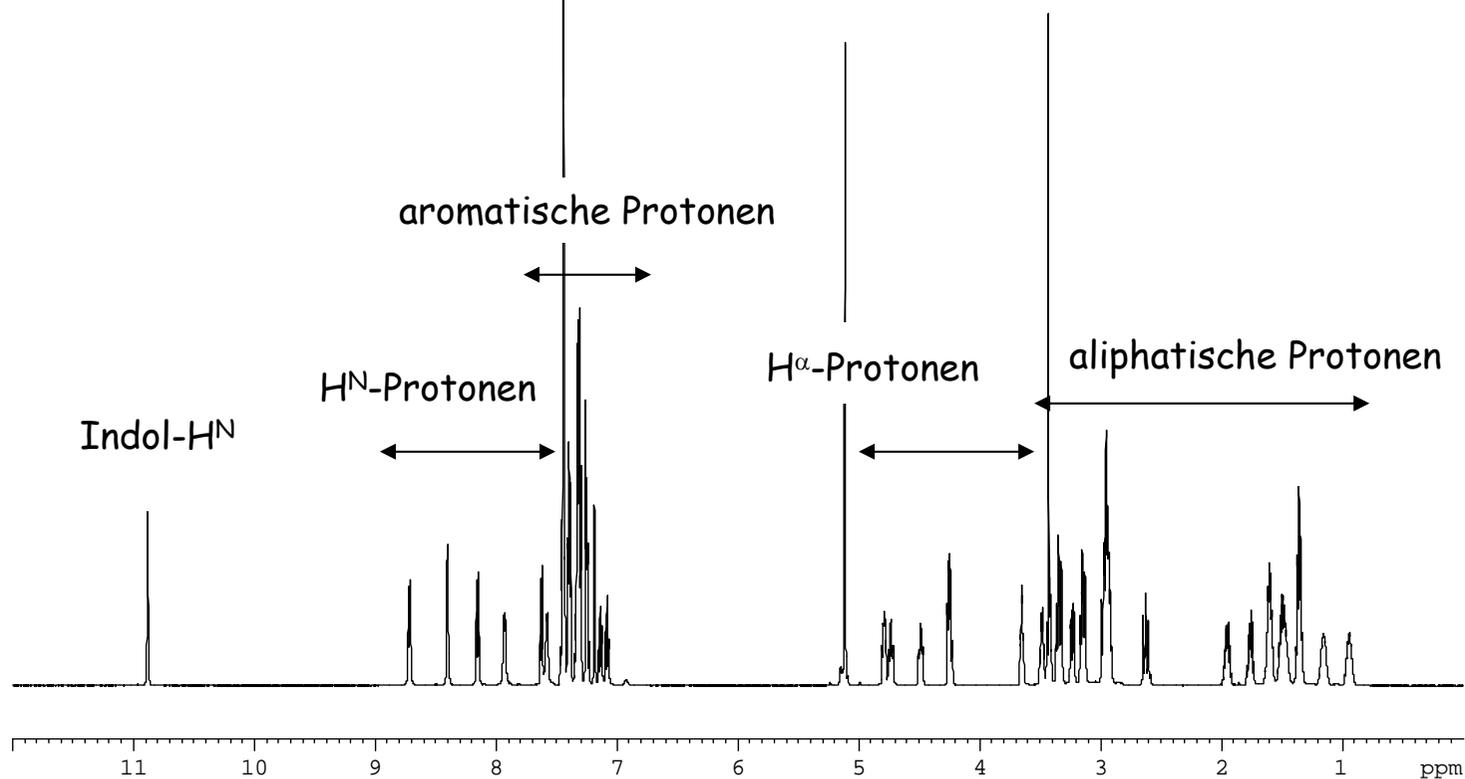


F3-008: *cyc*-(dP-F-F-K(Z)-W-F)



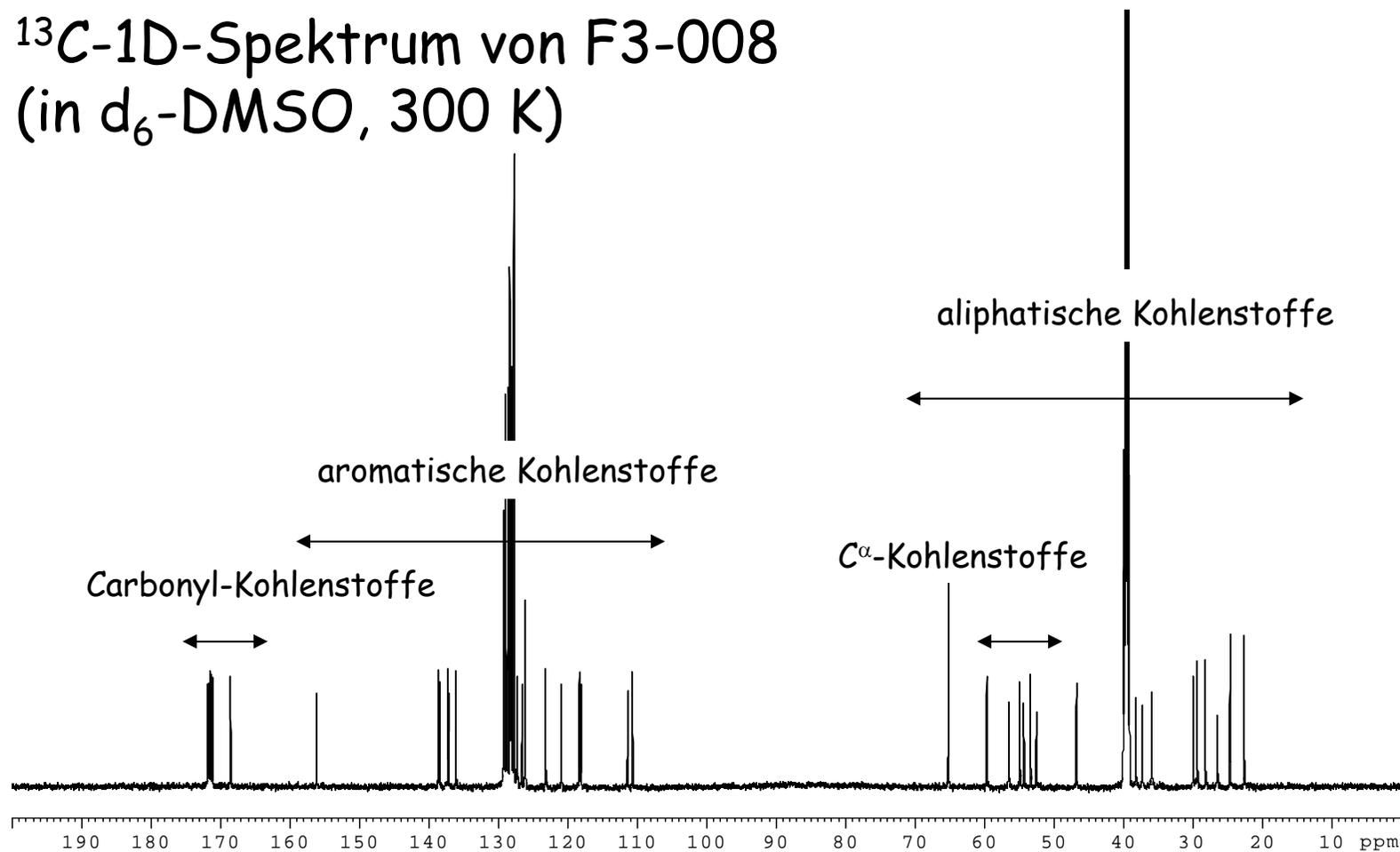
Peptide

^1H -1D-Spektrum von F3-008
(in d_6 -DMSO, 300 K)



Peptide

^{13}C -1D-Spektrum von F3-008
(in d_6 -DMSO, 300 K)



Peptide

Peptide sind Polymere, daraus es ergeben sich
zwei Überlegungen:

Eindimensionale Spektren sind von nur sehr
begrenztem Wert, man wird immer
zweidimensionale Spektren aufnehmen müssen.

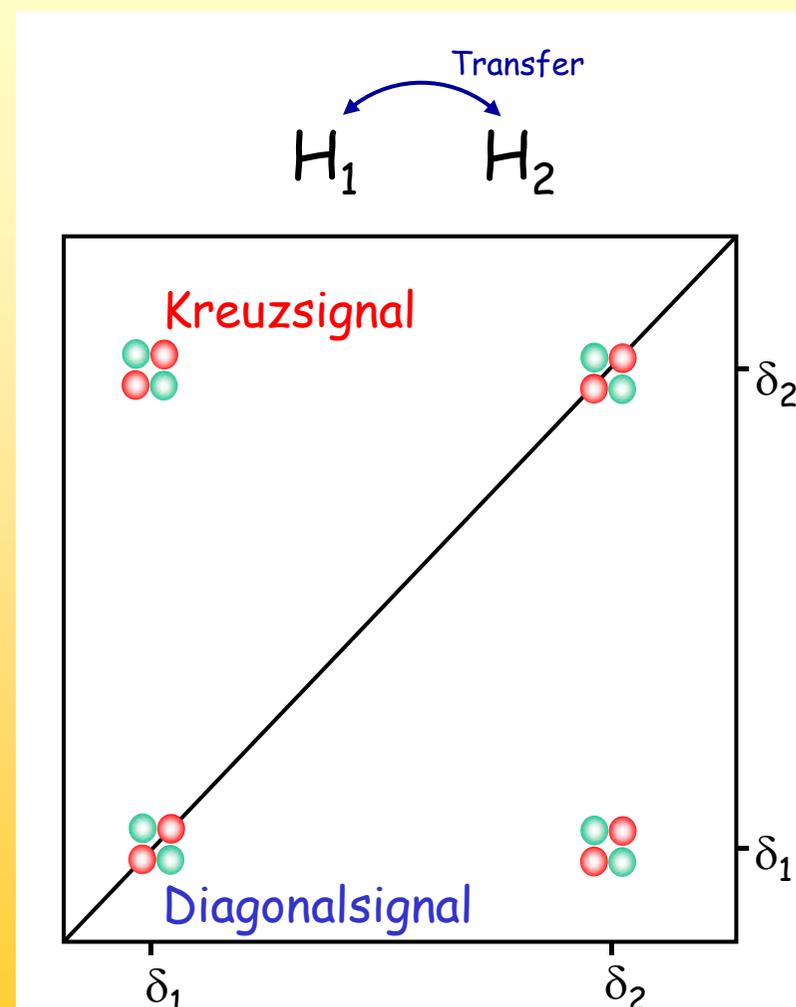
Und man braucht gute Auflösung in den
Spektren um Signale trennen zu können.

DQF-COSY

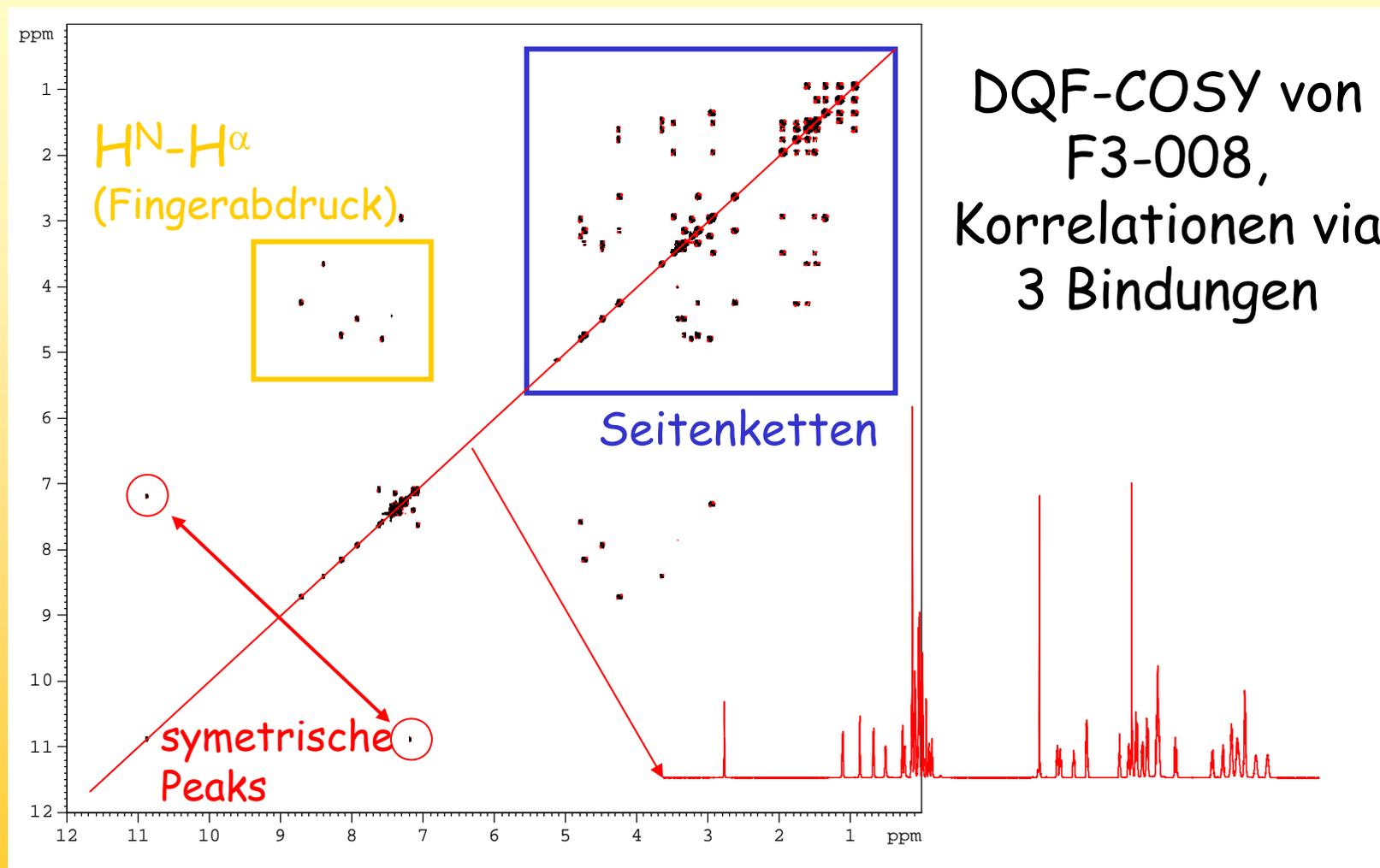
DQF-COSY

Auf der Diagonale befinden sich die Signale mit der gleichen Frequenz in t_1 und t_2 , die Kreuzsignale befinden sich am Schnittpunkt unterschiedlicher Frequenzen in t_1 und t_2

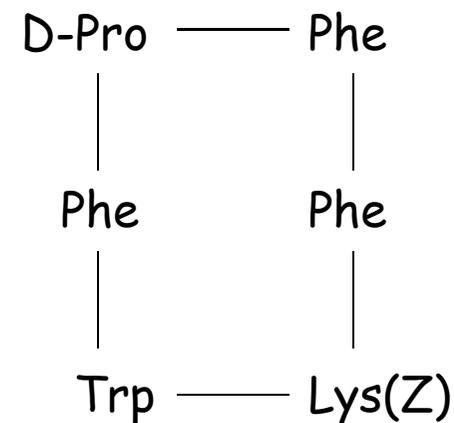
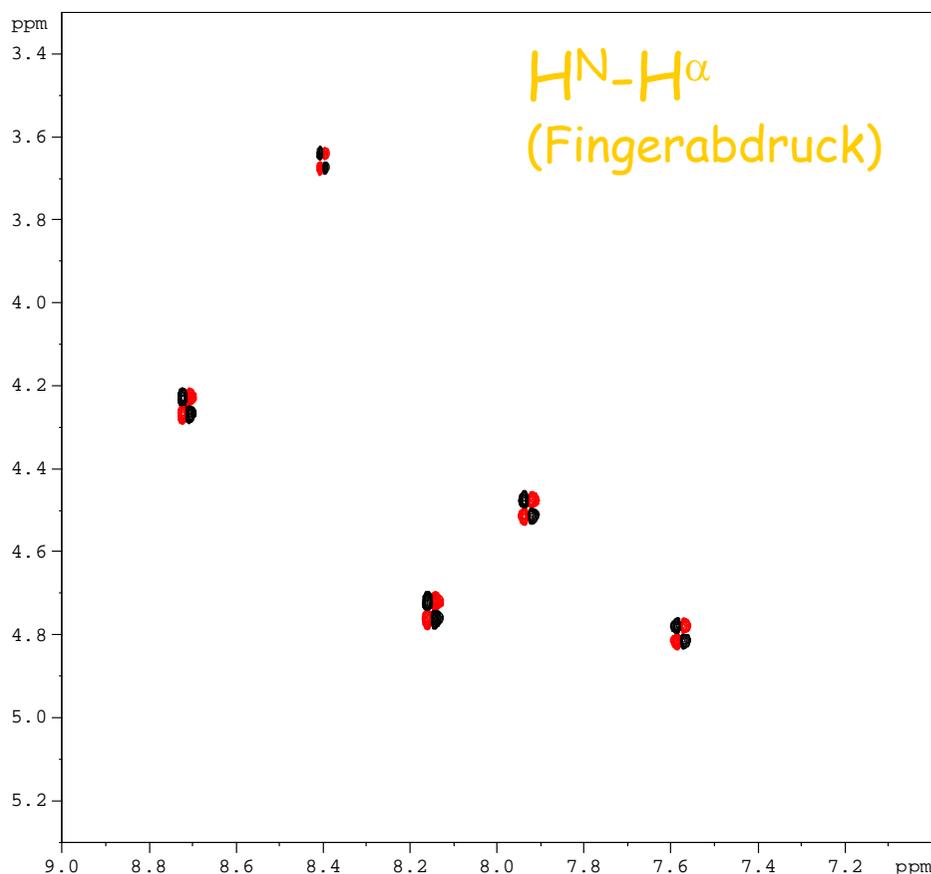
Sie zeigen eine Kopplung zwischen den H_1 und H_2 an.



DQF-COSY

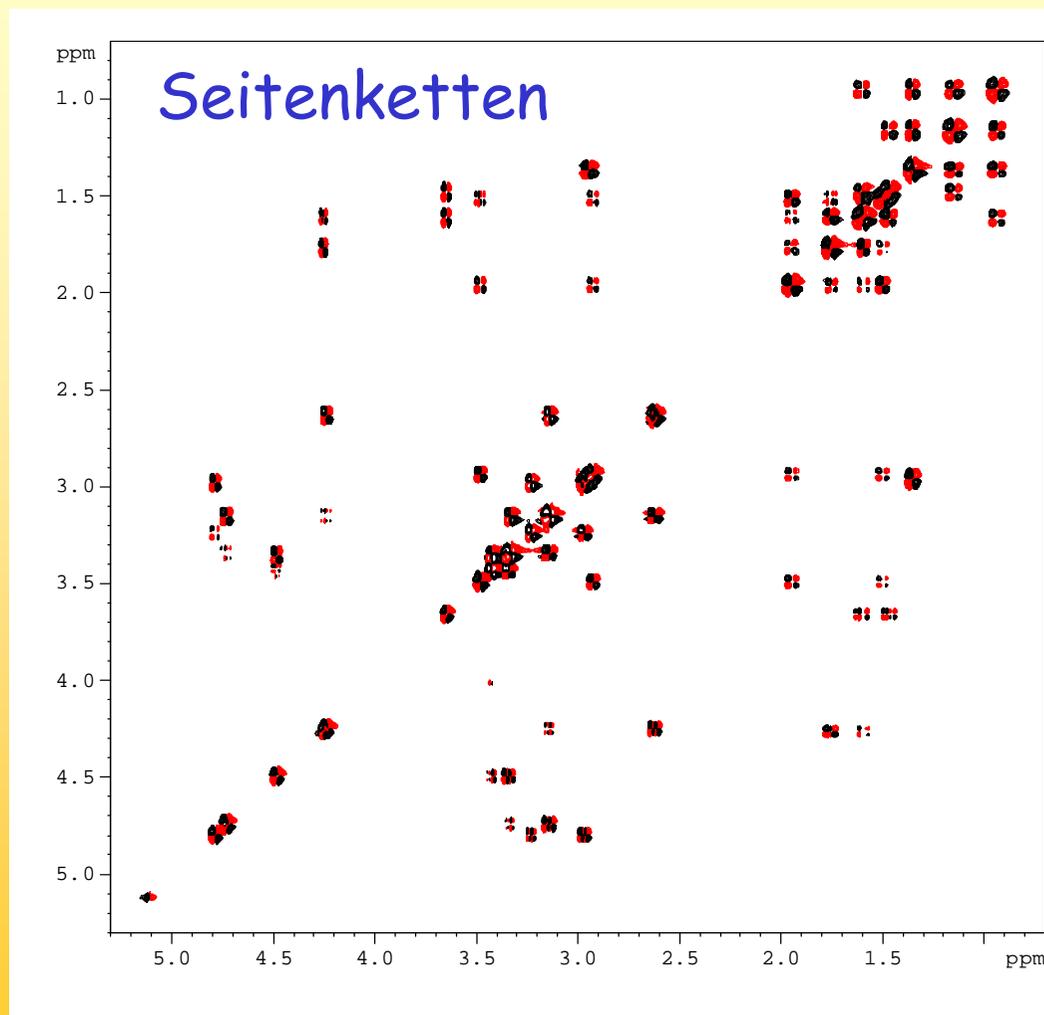


DQF-COSY



5 HN-H α peaks sind zu erwarten, da Prolin kein H N hat. Eine Zuordnung ist erstmal nicht möglich.

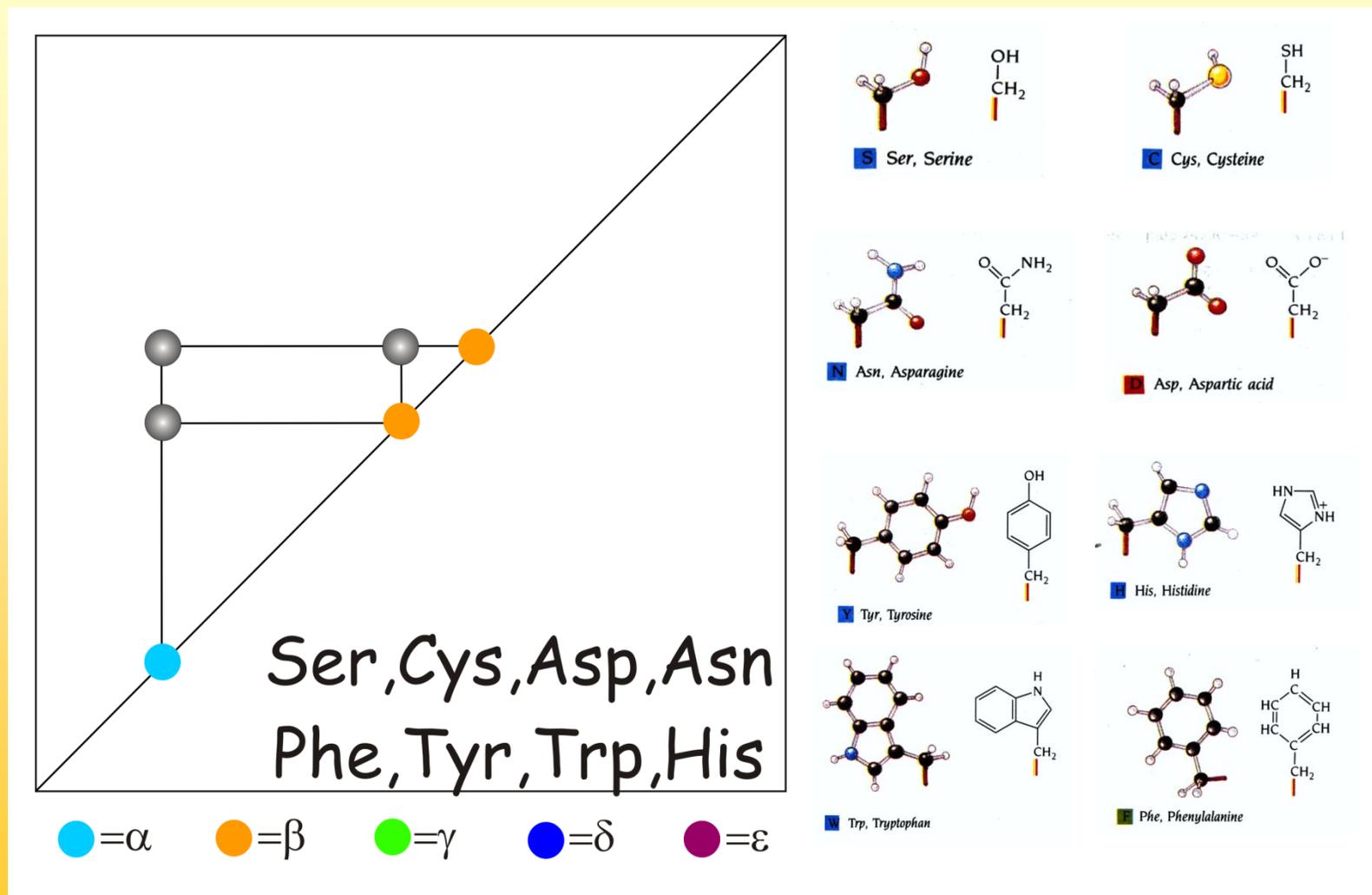
DQF-COSY



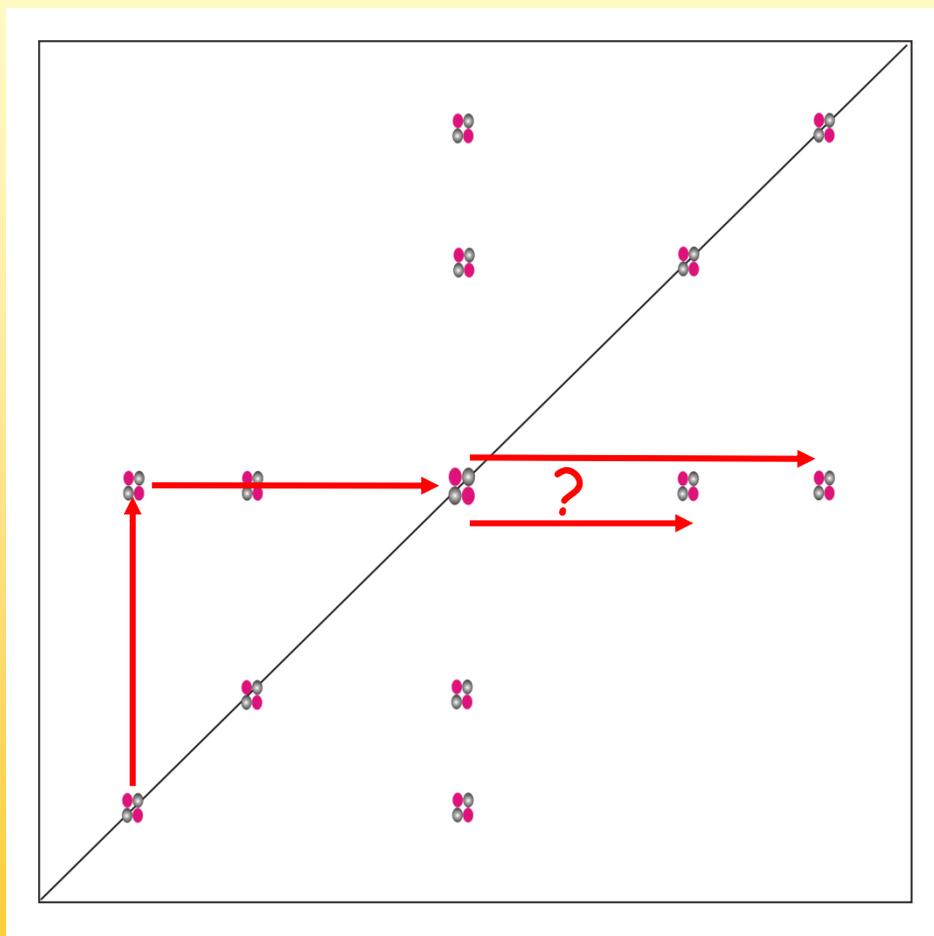
D-Pro — Phe
 | |
 Phe Phe
 | |
 Trp — Lys(Z)

Hier liegen alle
 Korrelationen der
 Seitenketten-
 protonen.

DQF-COSY

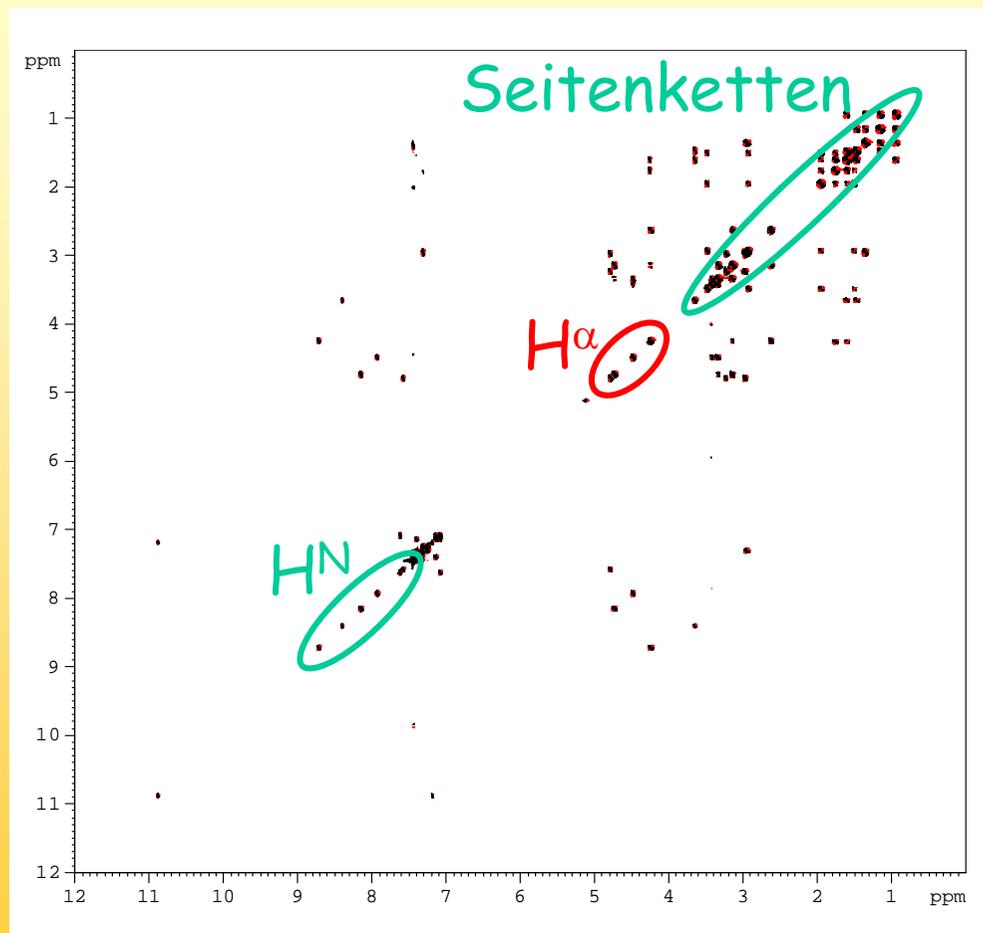


DQF-COSY



Da im DQF-COSY nur Korrelationen über 3 Bindungen zu sehen sind, gibt es bei der Überlagerung von einem Signalpaar Mehrdeutigkeiten.

DQF-COSY

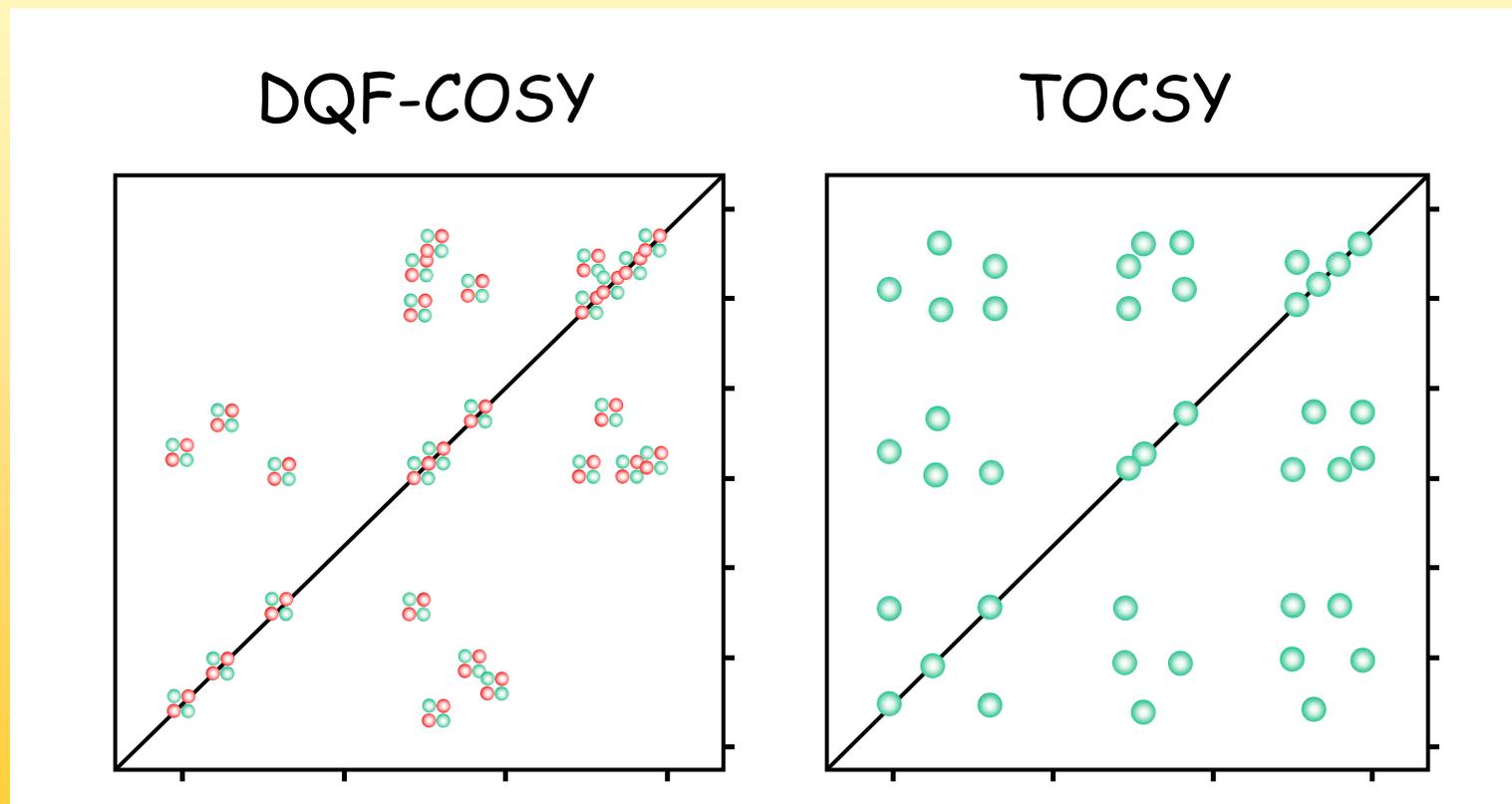


Bei Peptiden gibt es wegen des engen Bereichs der H^{α} -Verschiebungen dieses Problem, man braucht ein Experiment, dass Korrelationen über mehrere Bindungen herstellt.

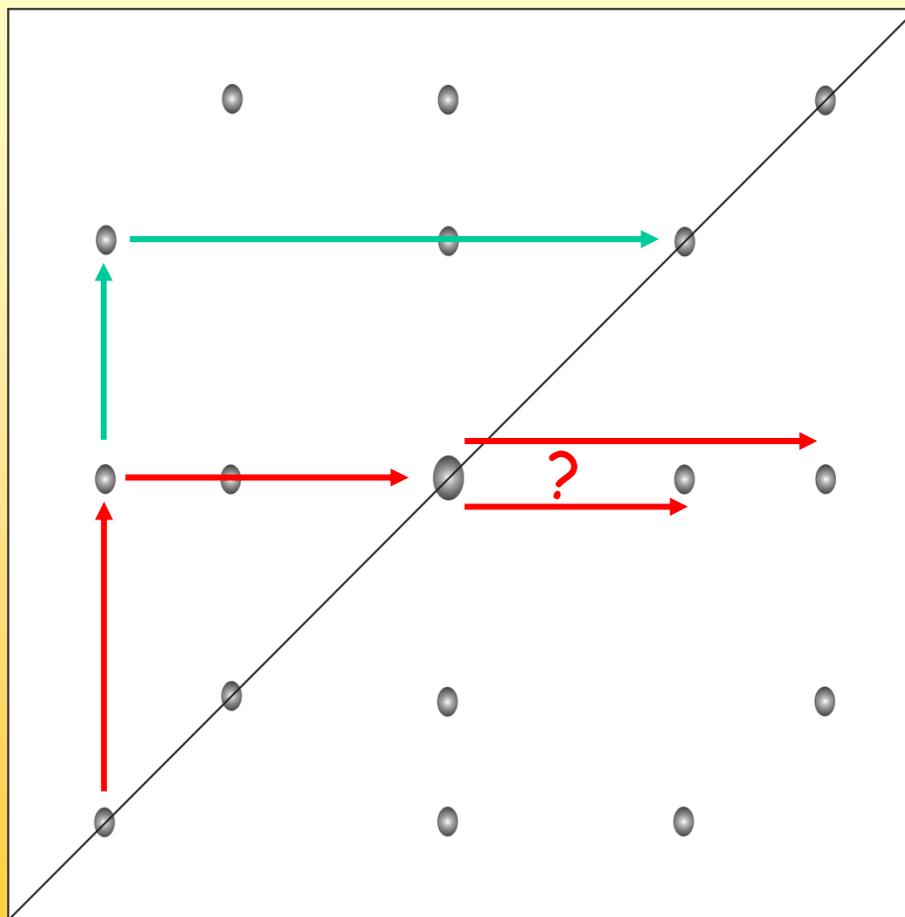
TOCSY / CLIP-COSY

TOCSY / CLIP-COSY

Im TOCSY geht man mehrere Schritte über skalare Kopplungen und erhält ganze Spinsysteme.

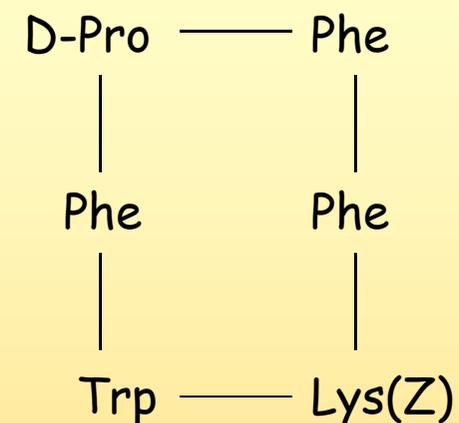
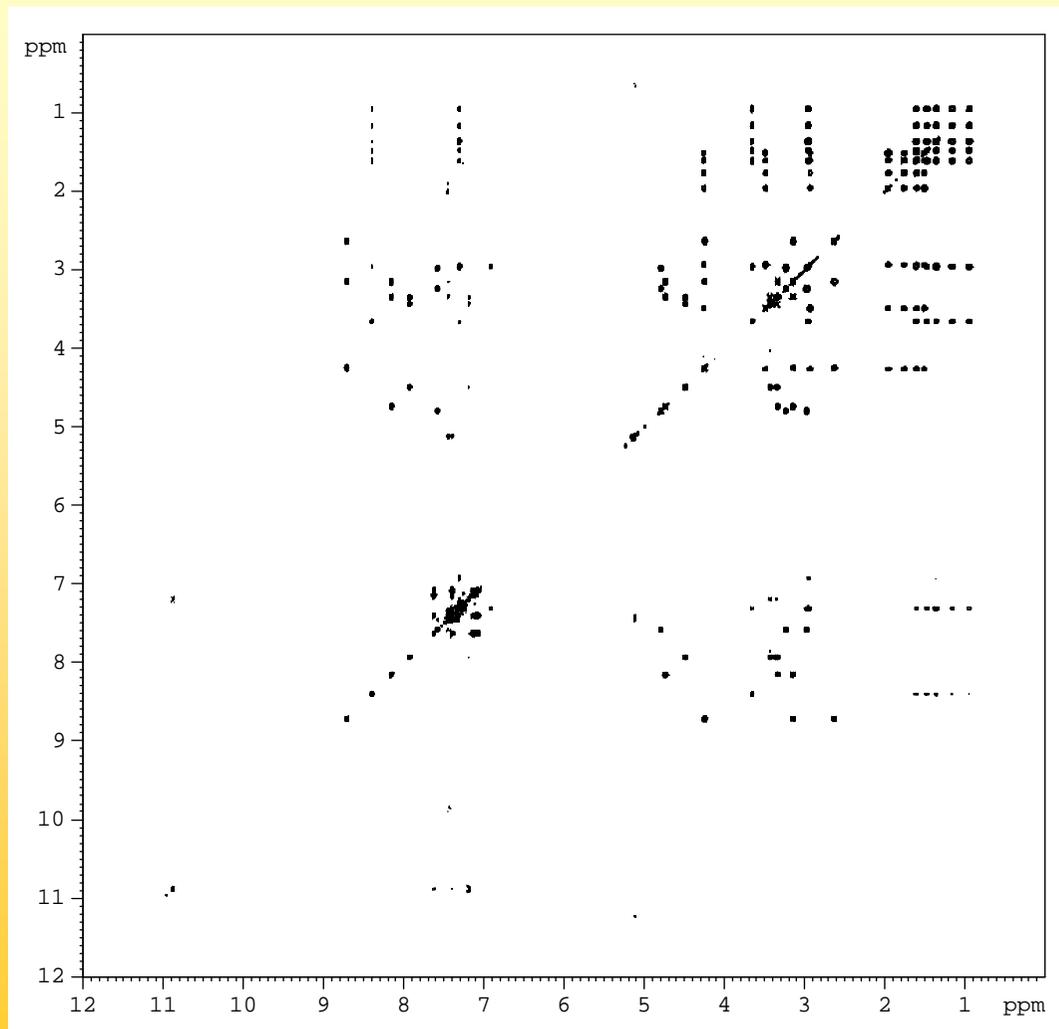


TOCSY / CLIP-COSY



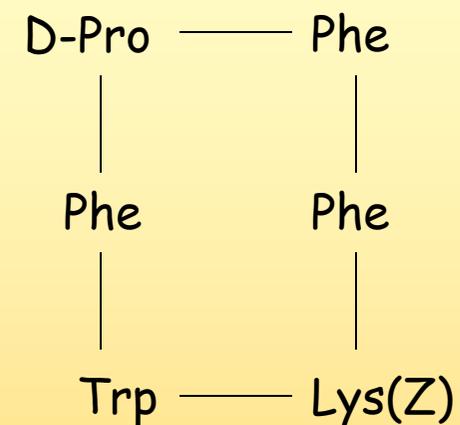
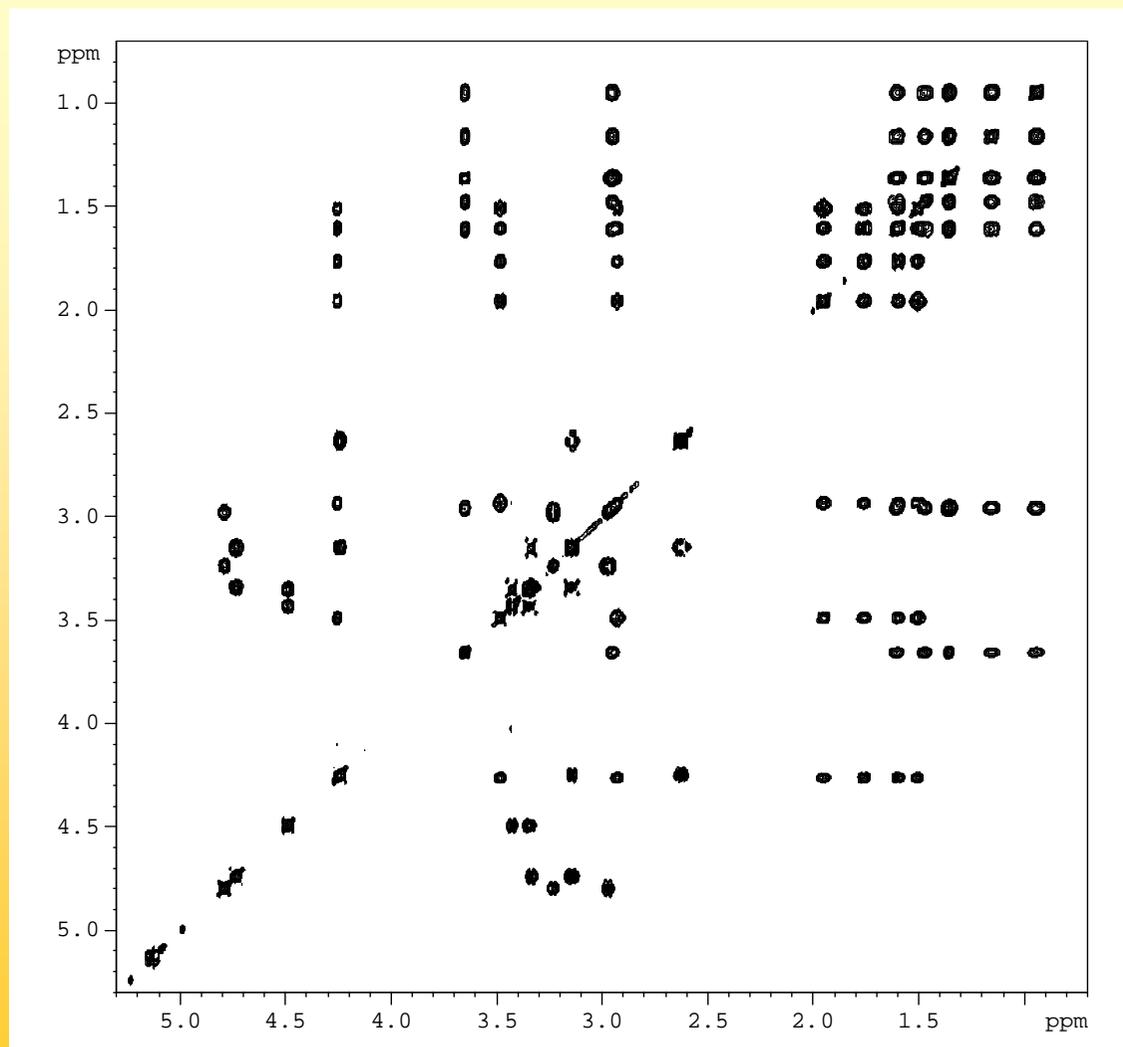
Im TOCSY ist die Mehrdeutigkeit aufzulösen, da eben mehrere Korrelationen zu sehen sind.

TOCSY / CLIP-COSY



In einem TOCSY mit langer Mischzeit sind bei jedem Signal das ganze Spinsystem zu sehen.

TOCSY / CLIP-COSY

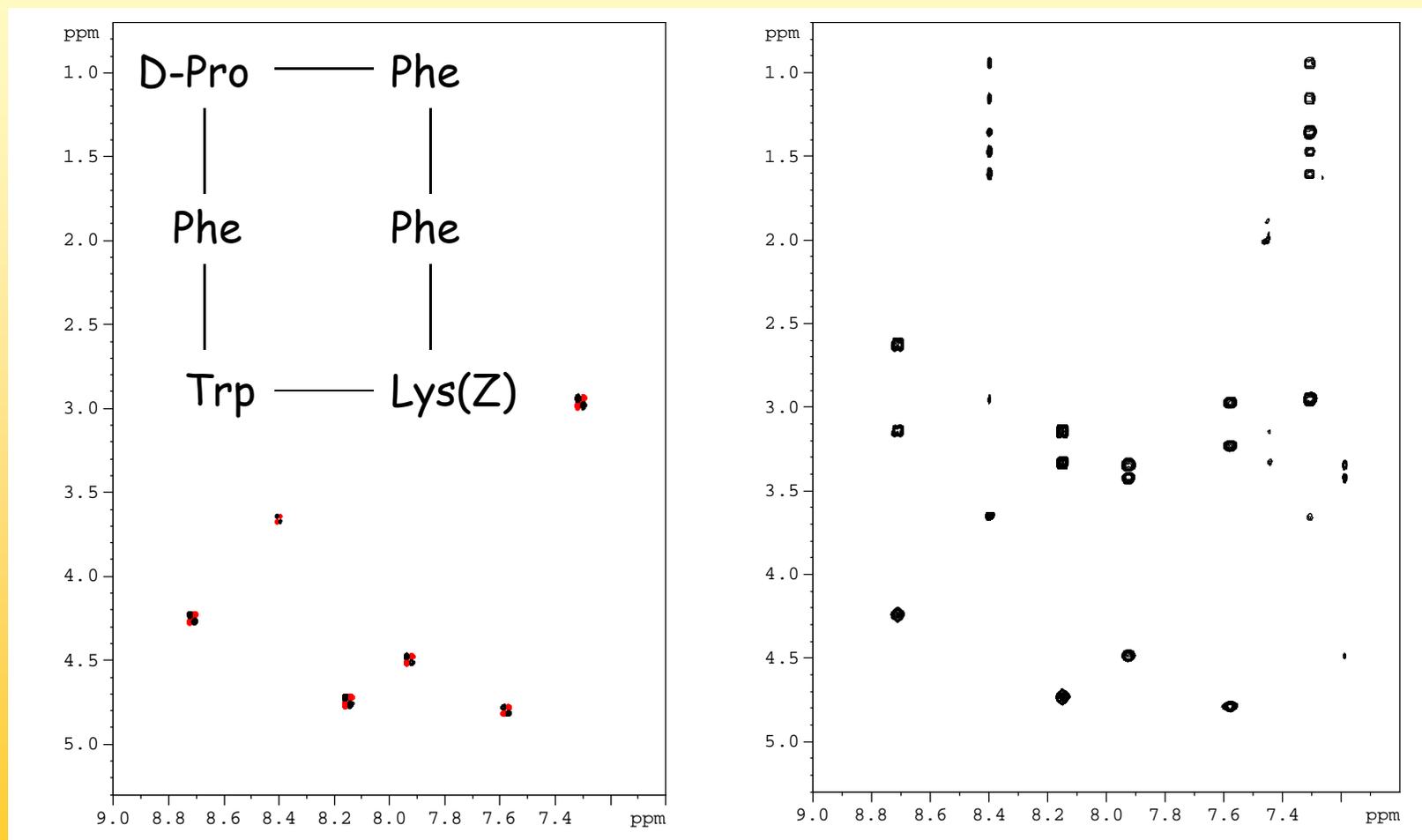


Im Seitenkettenbereich

.....

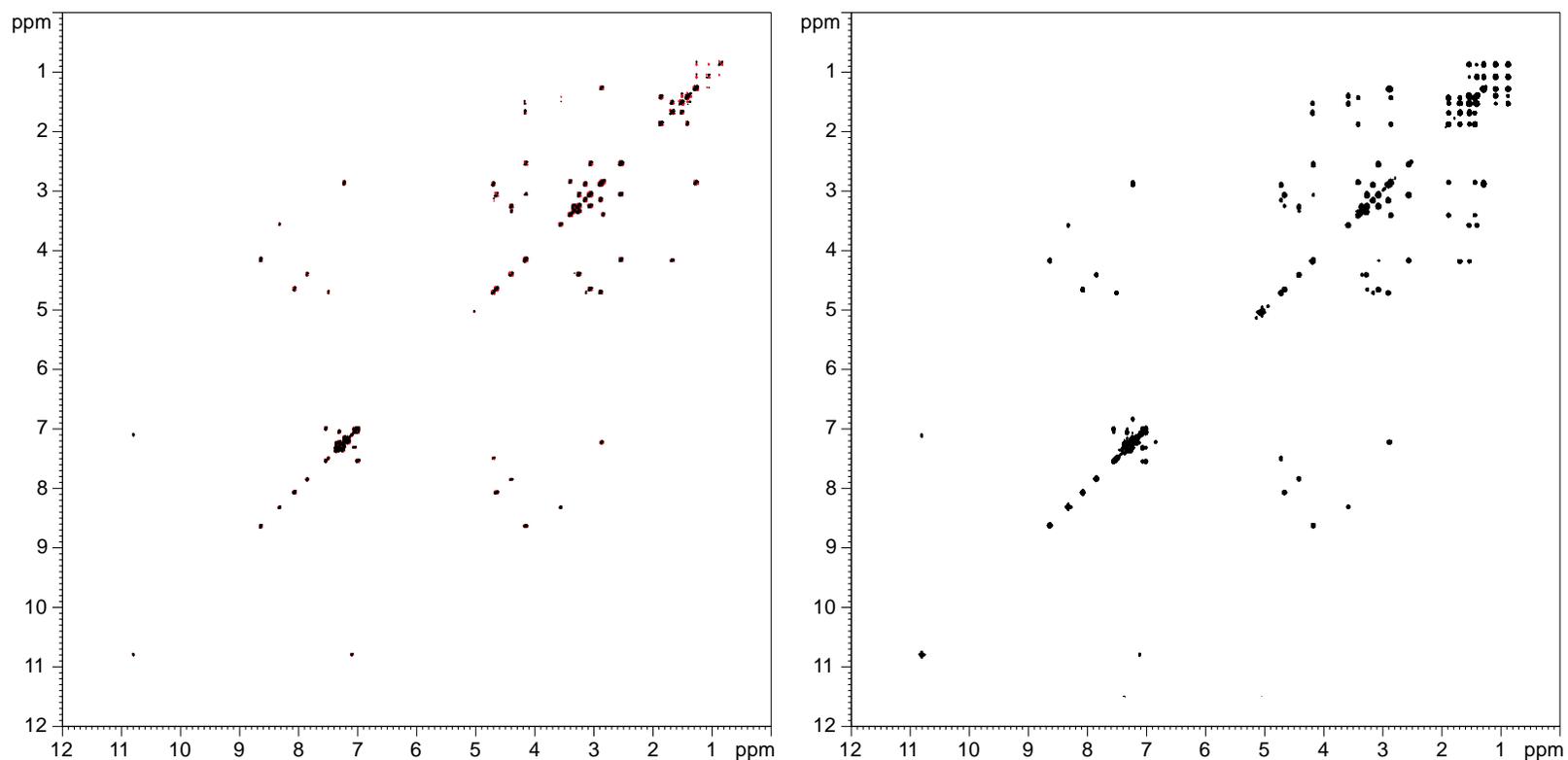
TOCSY / CLIP-COSY

.....wie im H^N -Bereich.



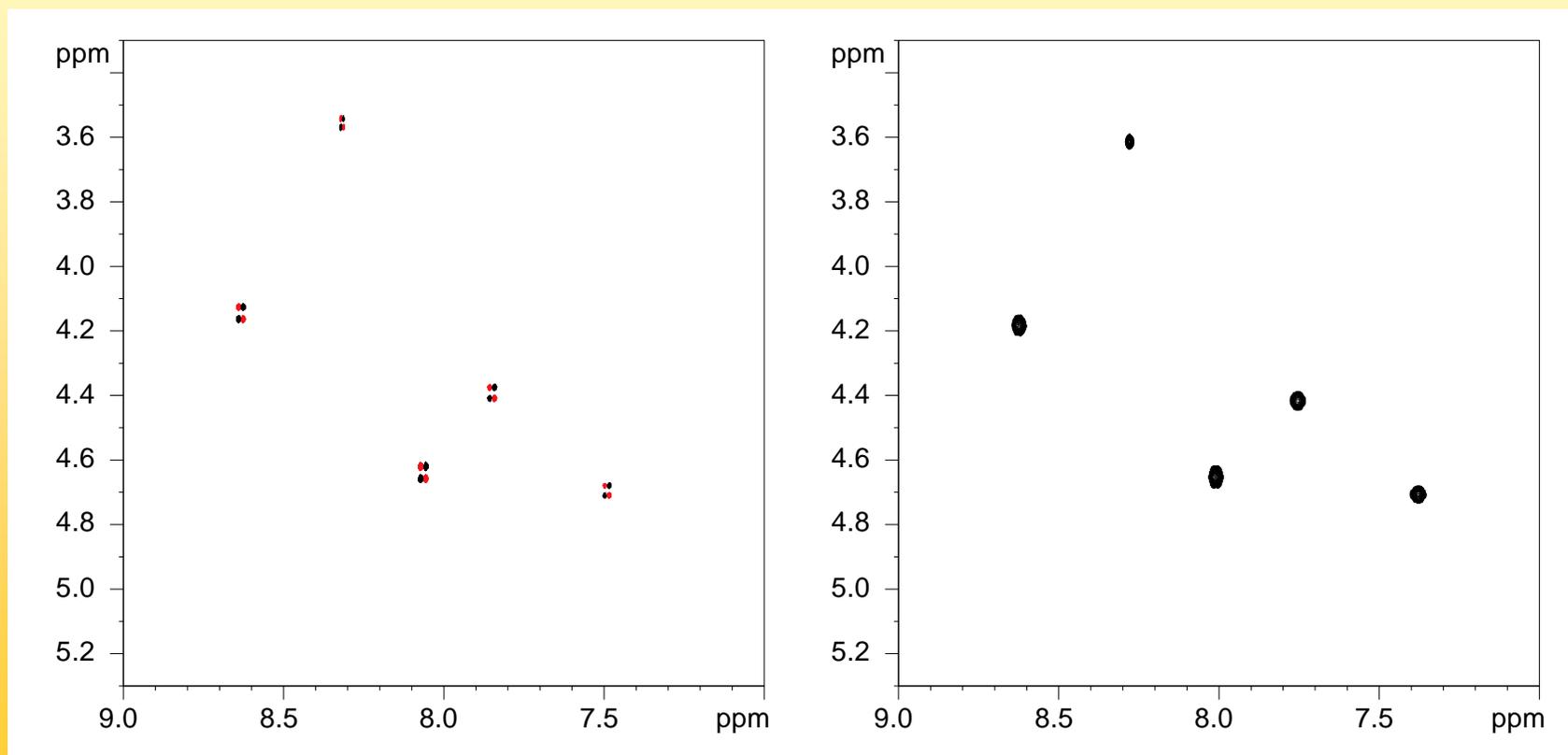
TOCSY / CLIP-COSY

Das CLIP-COSY wurde als Alternative zum DQF-COSY entwickelt, es zeigt im Prinzip die gleichen Signale



TOCSY / CLIP-COSY

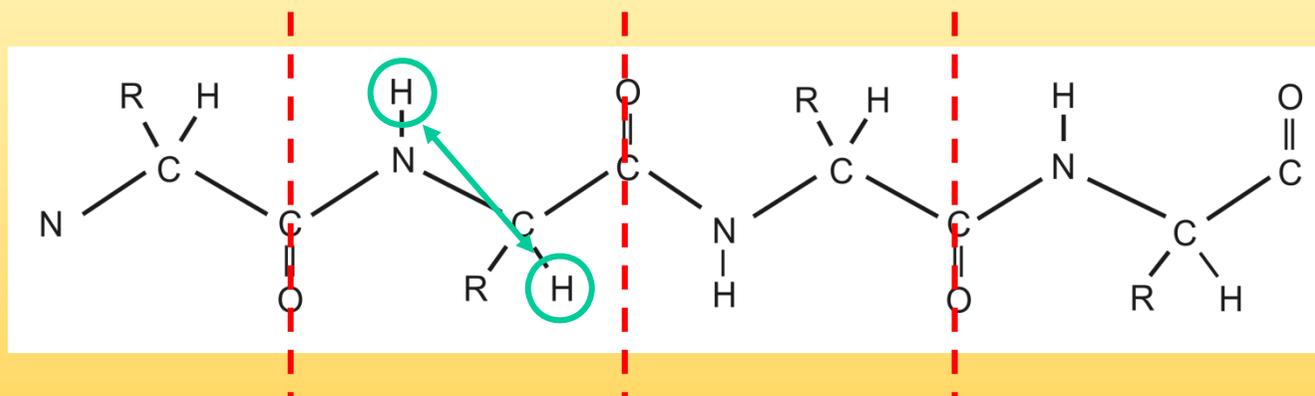
Ein Vorteil der „in-phase“ Signale ist das Signal bei kleiner Kopplung nicht schwächer werden



Spinsysteme

Spinsysteme

Jede Aminosäure bildet ein separates Spinsystem, da über den Carbonyl-Kohlenstoff keine signifikante skalare Kopplung reicht.



H^N-H^α gibt es in jeder Aminosäure (außer Prolin), die Seitenketten sind unterschiedlich

Spinsysteme

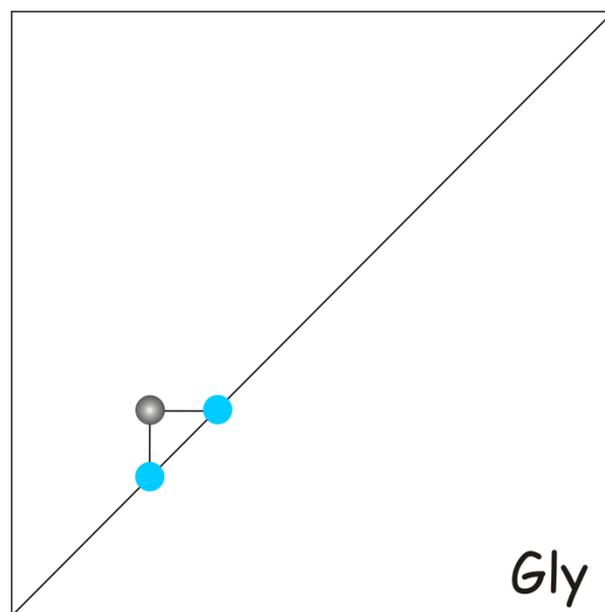
● COSY
★ TOCSY

Ser, Cys, Asp, Asn
Phe, Tyr, Trp, His

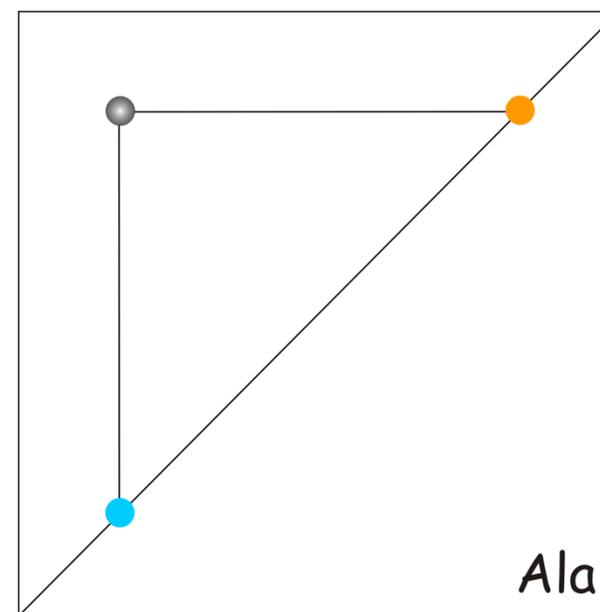
● = α ● = β ● = γ ● = δ ● = ϵ

 <chem>OC(C)C(=O)O</chem> S Ser, Serine	 <chem>OC(C)C(=O)O</chem> S Ser, Serine	 <chem>SC(C)C(=O)O</chem> C Cys, Cysteine	 <chem>SC(C)C(=O)O</chem> C Cys, Cysteine
 <chem>NC(C)C(=O)O</chem> N Asn, Asparagine	 <chem>NC(C)C(=O)O</chem> N Asn, Asparagine	 <chem>OC(C)C(=O)O</chem> D Asp, Aspartic acid	 <chem>OC(C)C(=O)O</chem> D Asp, Aspartic acid
 <chem>OC1=CC=C(C=C1)C(C)C(=O)O</chem> Y Tyr, Tyrosine	 <chem>OC1=CC=C(C=C1)C(C)C(=O)O</chem> Y Tyr, Tyrosine	 <chem>NC1=CN=C(C=C1)C(C)C(=O)O</chem> H His, Histidine	 <chem>NC1=CN=C(C=C1)C(C)C(=O)O</chem> H His, Histidine
 <chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)C(C)C(=O)O</chem> W Trp, Tryptophan	 <chem>C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)C(C)C(=O)O</chem> W Trp, Tryptophan	 <chem>C1=CC=C(C=C1)C(C)C(=O)O</chem> F Phe, Phenylalanine	 <chem>C1=CC=C(C=C1)C(C)C(=O)O</chem> F Phe, Phenylalanine

Spinsysteme



● = α ● = β ● = γ ● = δ ● = ϵ



● = α ● = β ● = γ ● = δ ● = ϵ



H



COSY



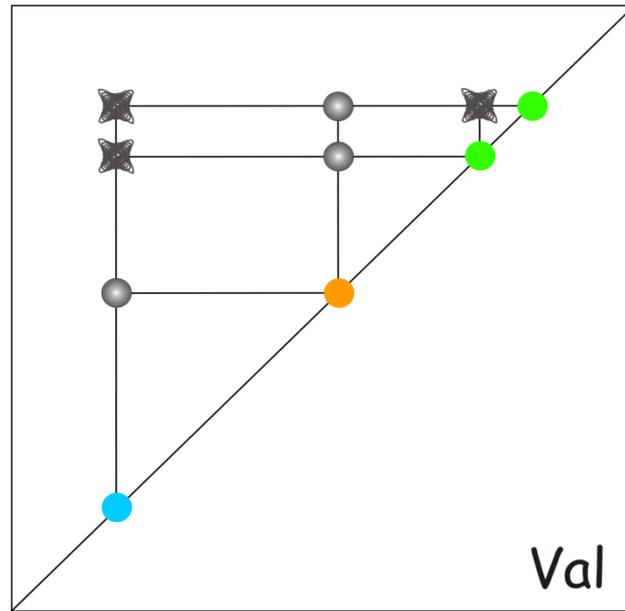
CH₃



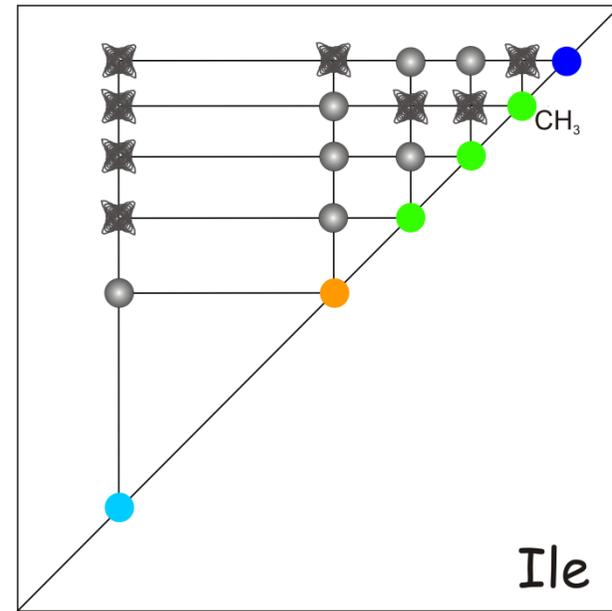
TOCSY

A Ala, Alanine

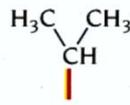
Spinsysteme



● = α ● = β ● = γ ● = δ ● = ϵ



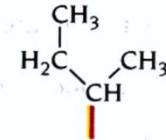
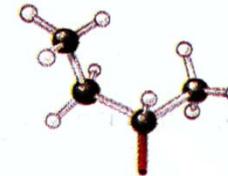
● = α ● = β ● = γ ● = δ ● = ϵ



V Val, Valine

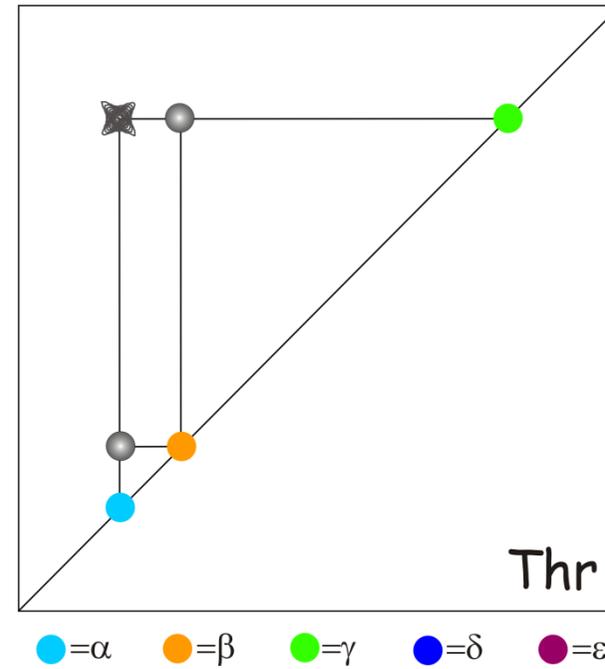
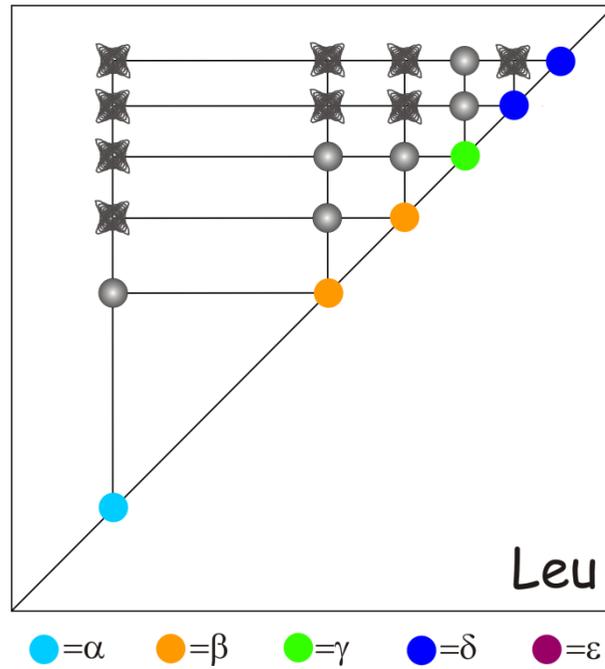


COSY
TOCSY

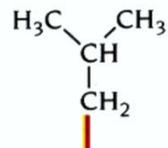


I Ile, Isoleucine

Spinsysteme

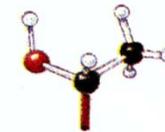


L Leu, Leucine

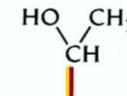


COSY

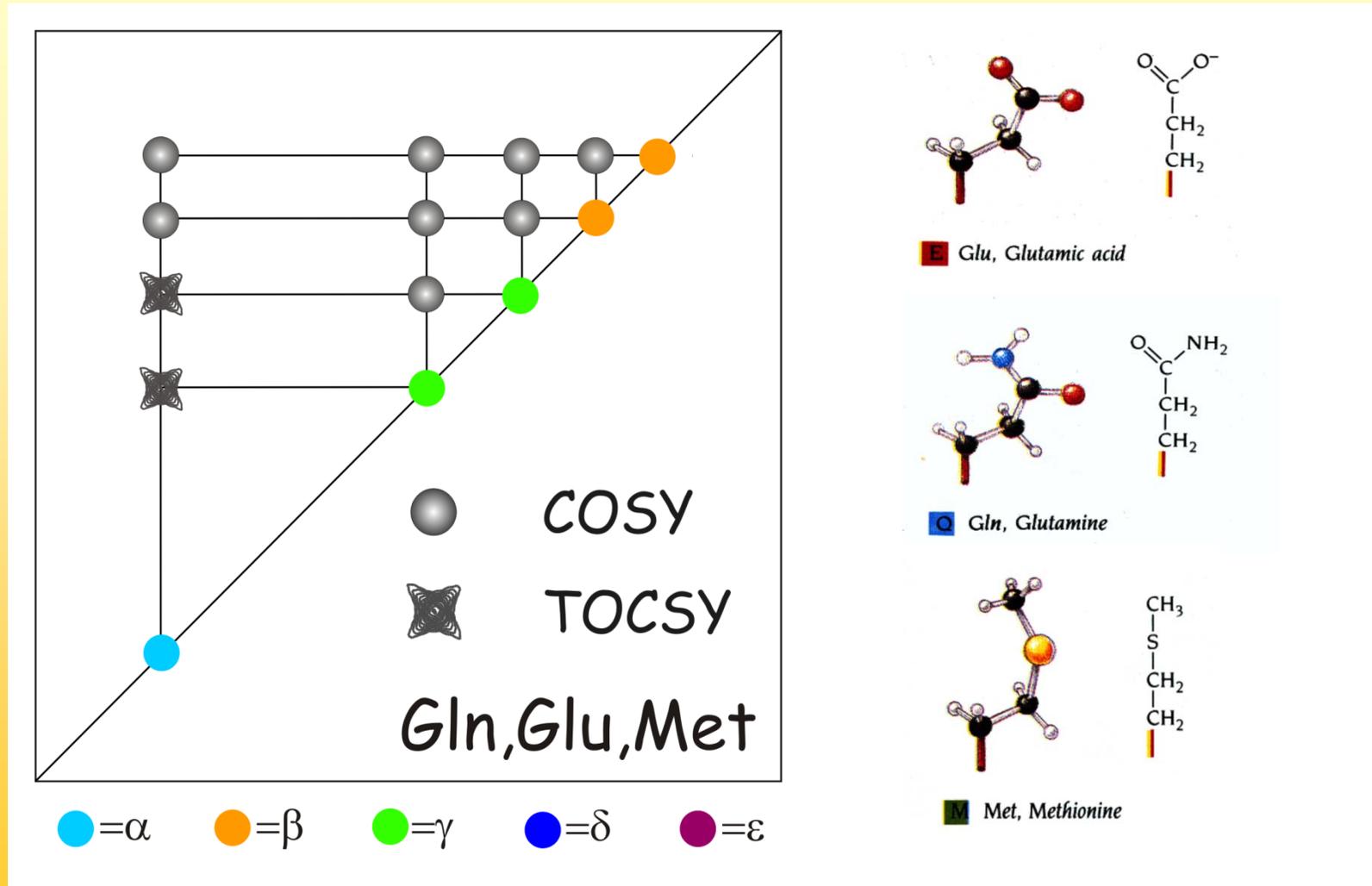
TOCSY



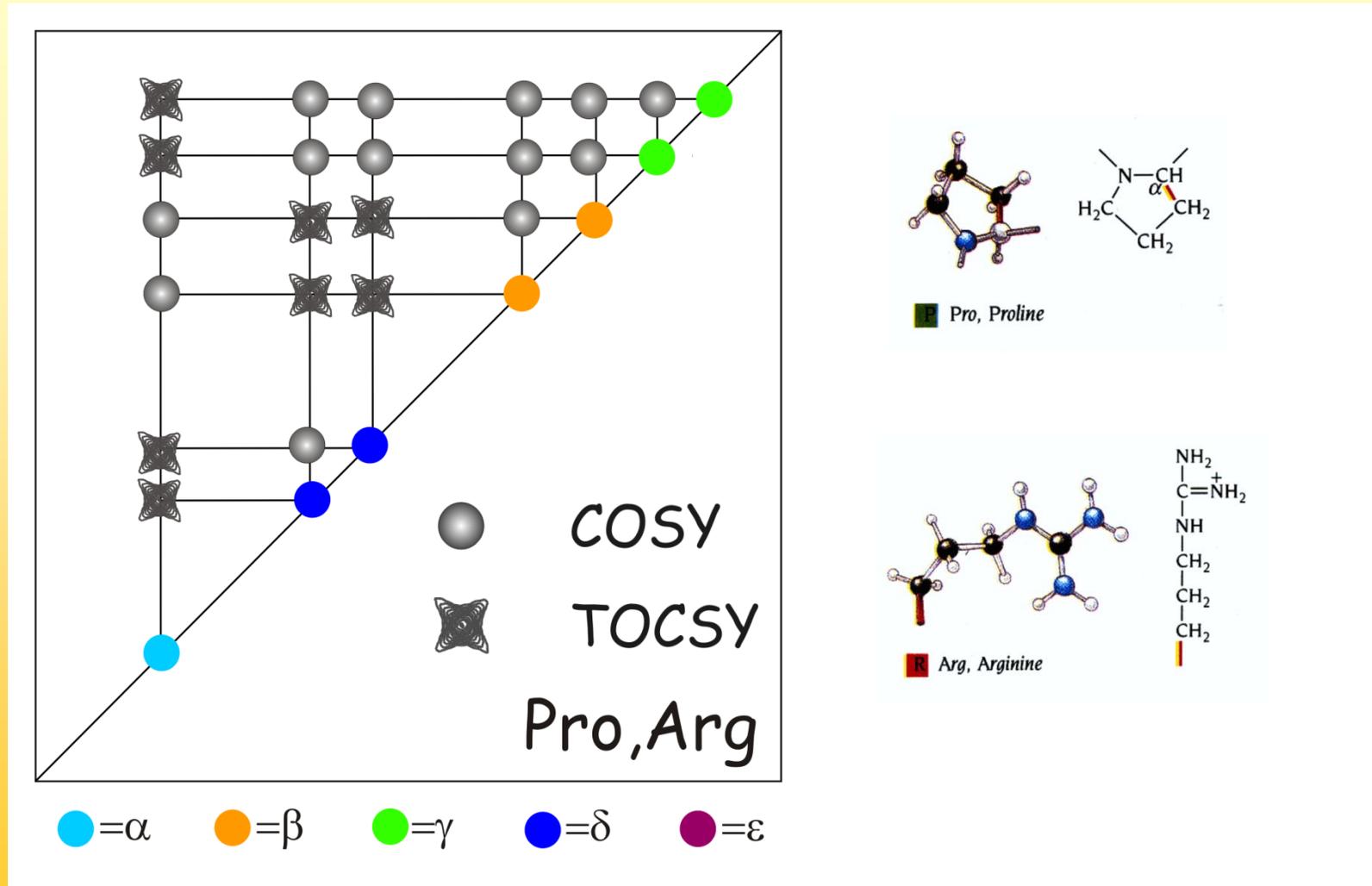
T Thr, Threonine



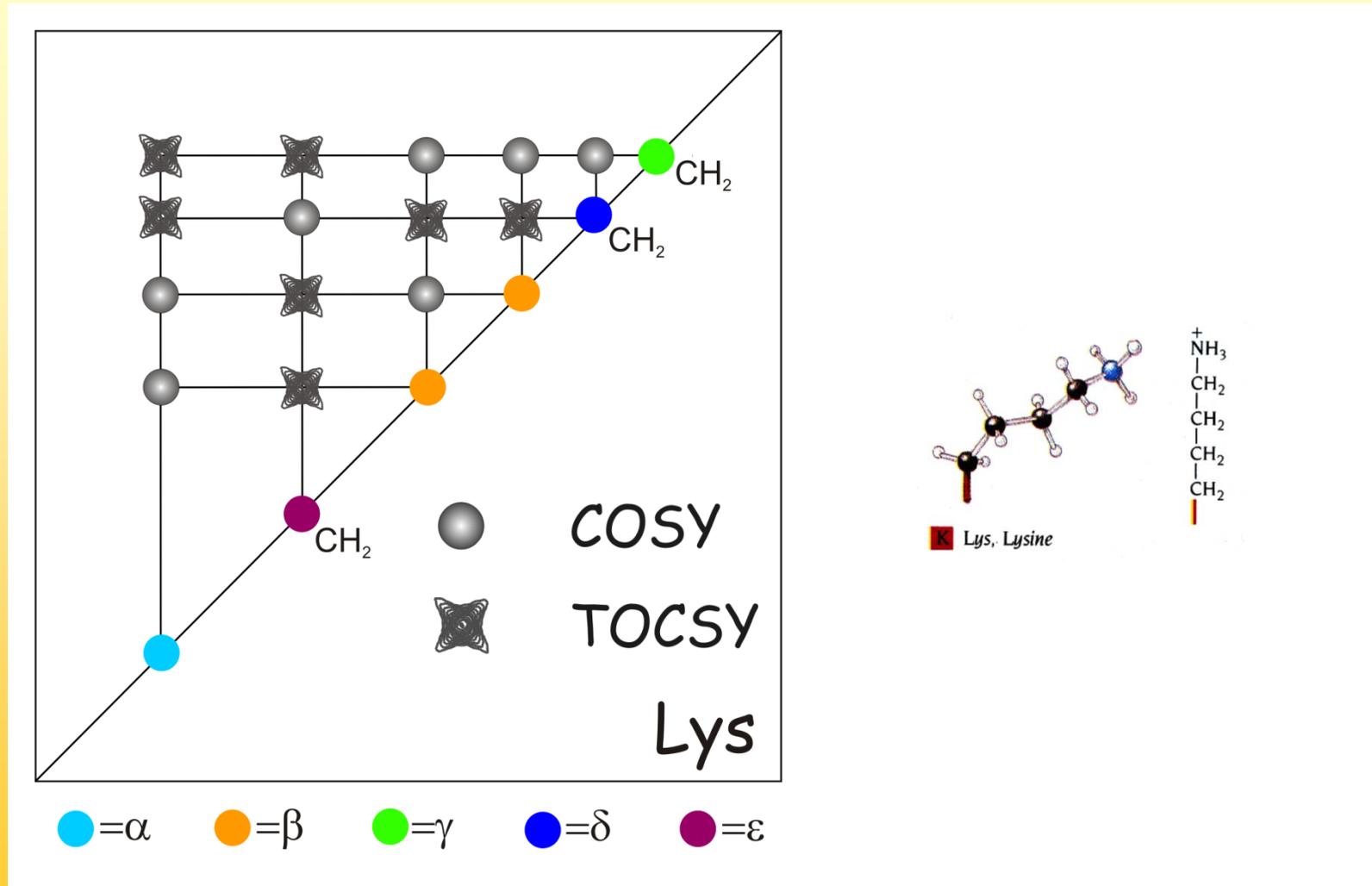
Spinsysteme



Spinsysteme



Spinsysteme

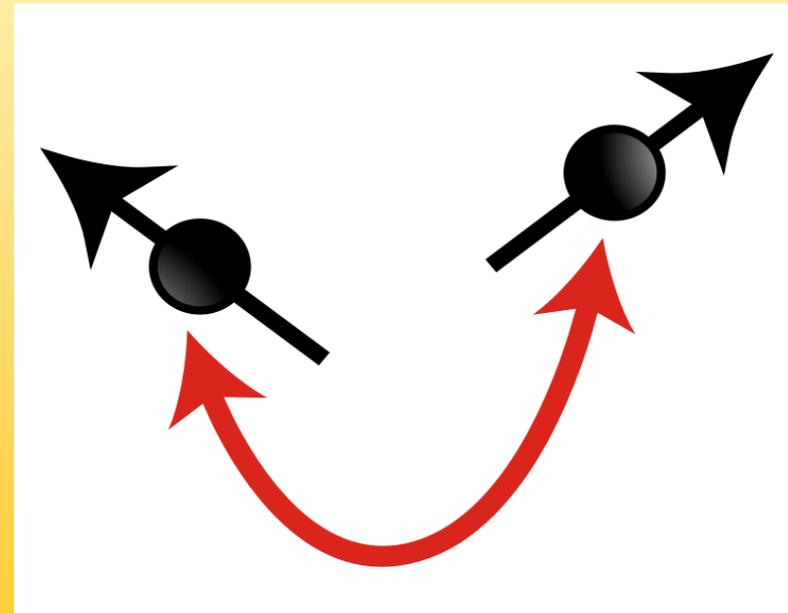


NOE, NOESY und ROESY

NOE, NOESY und ROESY

Bislang basieren alle 2D-Experimente auf skalarer Kopplung, also einer Wechselwirkung durch die Bindung.

Es gibt aber auch eine Wechselwirkung durch den Raum, die dipolare Kopplung.



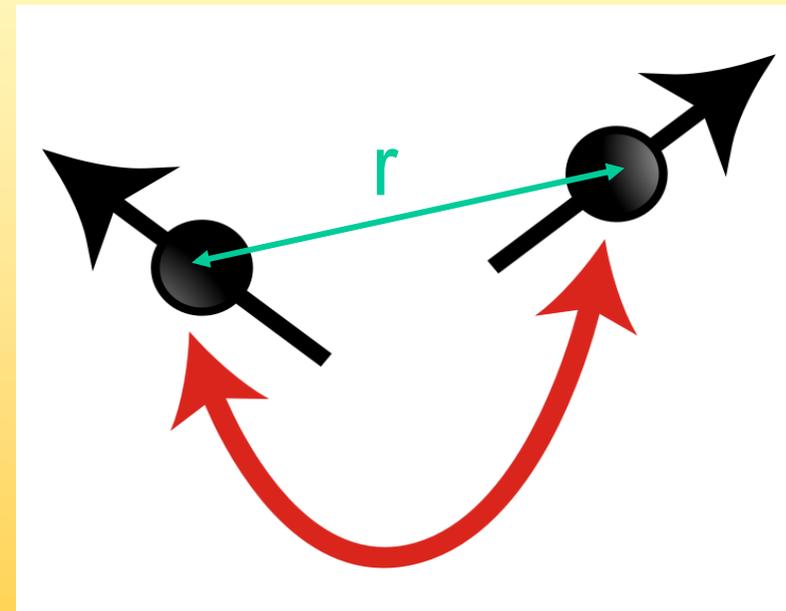
NOE, NOESY und ROESY

Auf ihr basiert der NOE-Effekt:

Nuclear Overhauser Enhancement Effekt

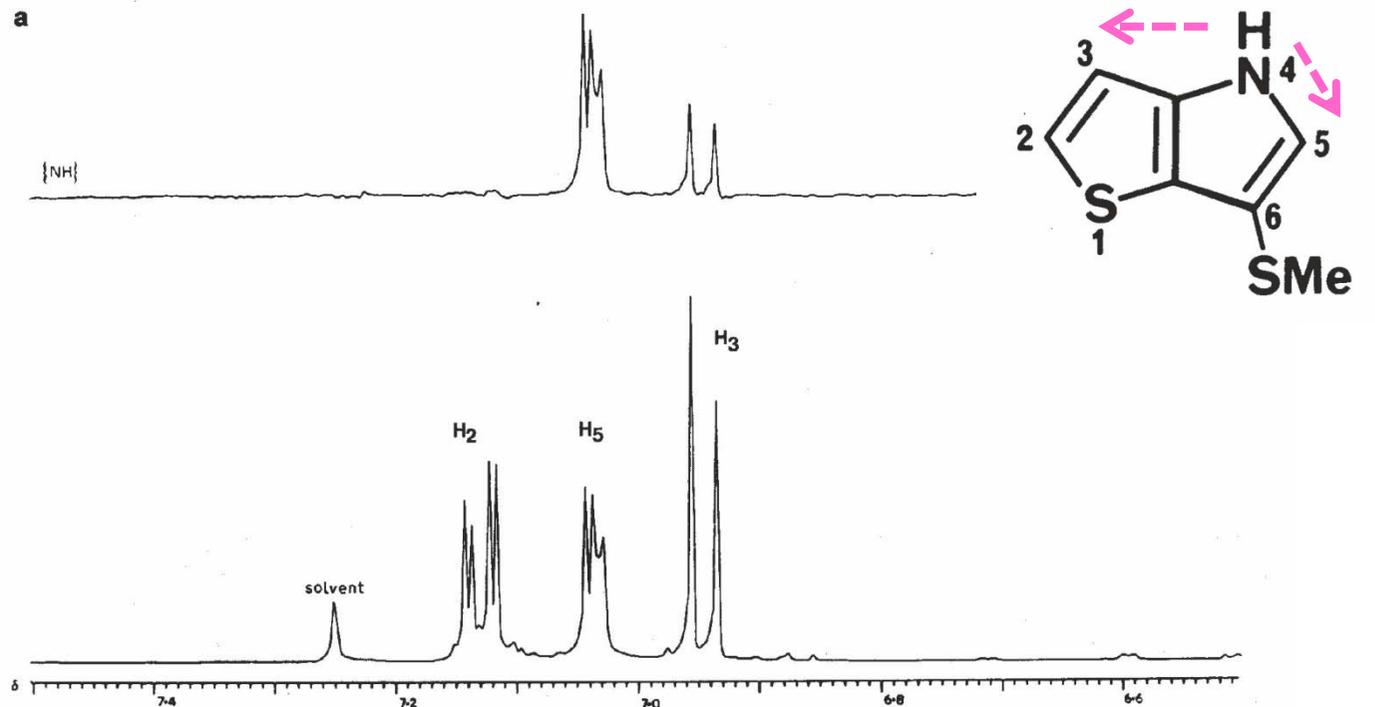
$$I(\text{NOE}) \sim 1/r^6$$

Wegen des schnelle
Abfalls mit r^6 können nur
Abstände bis 400 pm,
manchmal 500 pm
bestimmt werden.



NOE, NOESY und ROESY

Der NOE kann im NOE-Differenz Experiment gemessen werden.



NOE, NOESY und ROESY

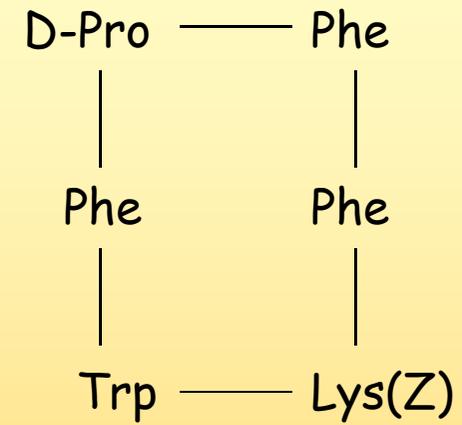
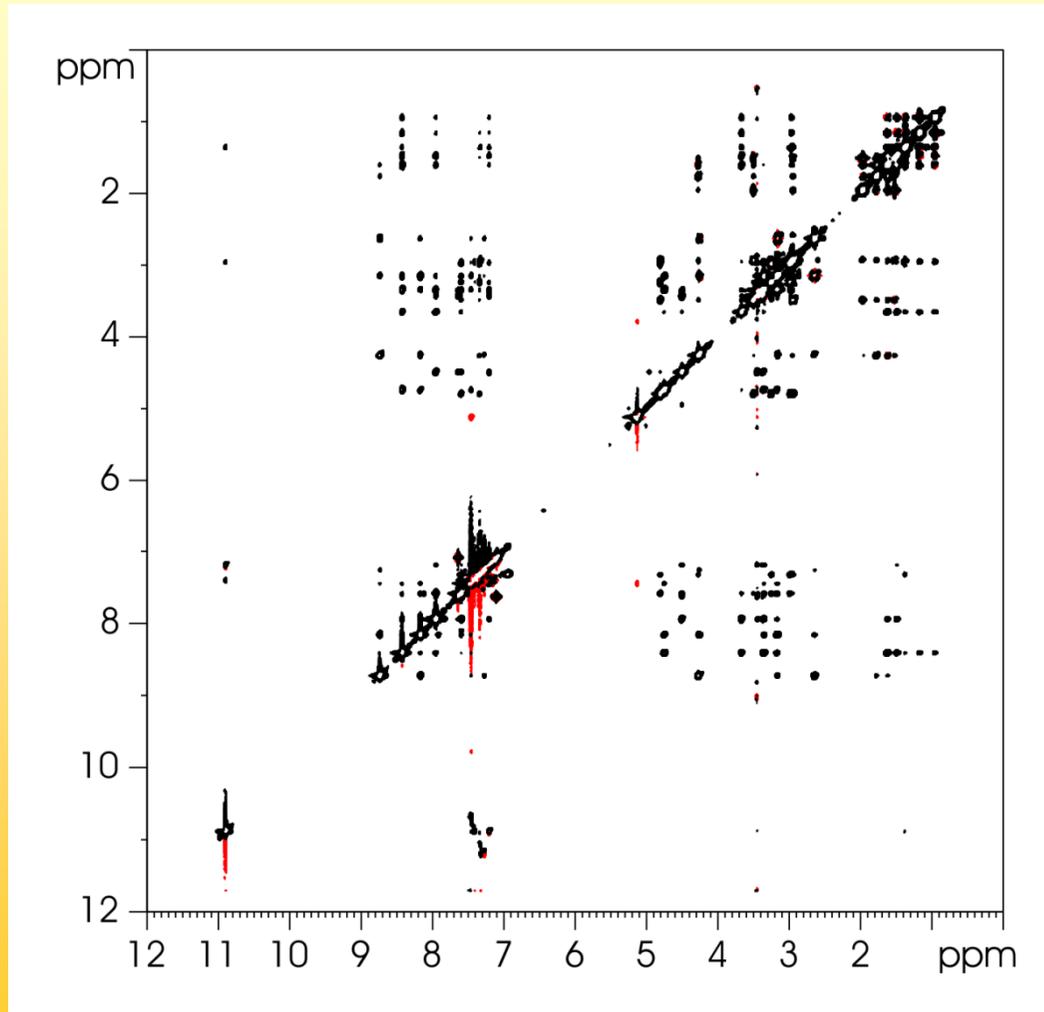
Im Falle von Biomolekülen sind aber mehrdimensionale Experimente notwendig.

Das zweidimensionale Experiment um den NOE zu messen ist die Nuclear Overhauser Effekt Spectroscopy

NOESY

Da man mit dem NOESY Abstände bestimmen kann, ist es das zentrale Experiment für die Strukturbestimmung von Biomolekülen.

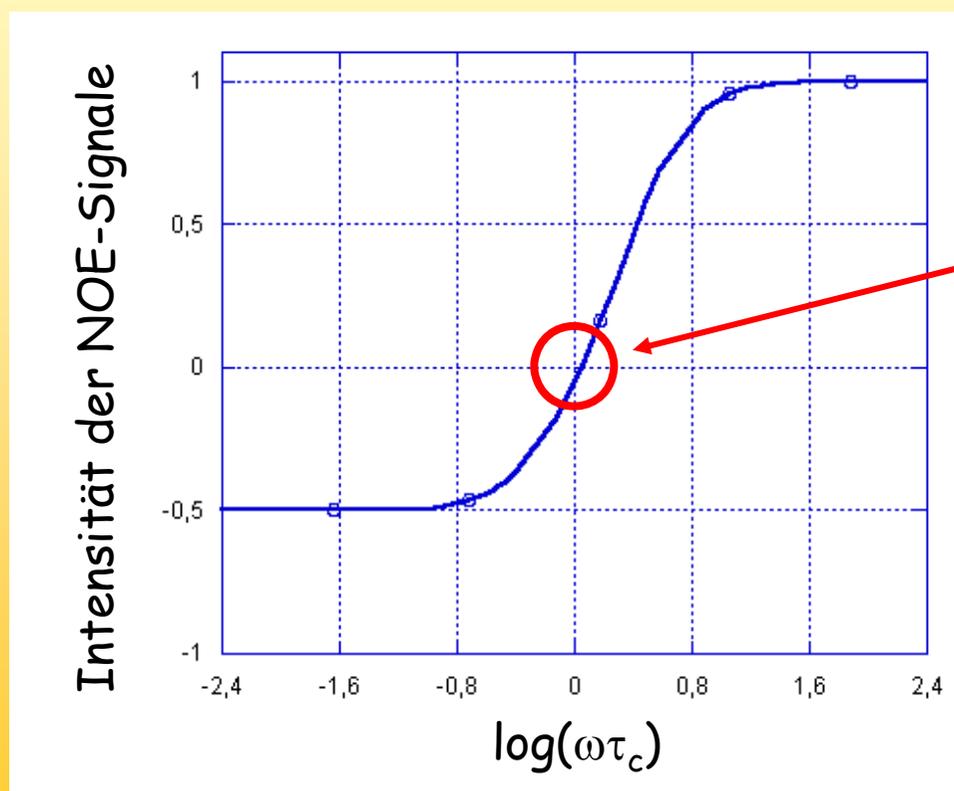
NOE, NOESY und ROESY



Jedes Kreuzsignal
weist auf einen
Abstand von
weniger als 500 pm
hin.

NOE, NOESY und ROESY

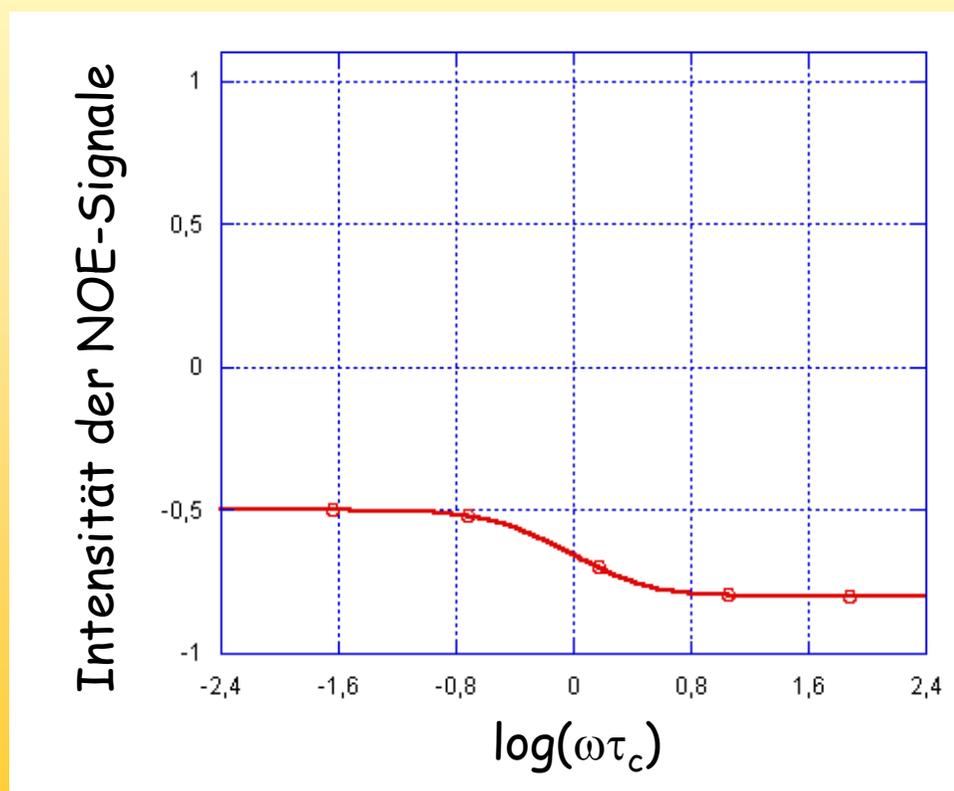
Es gibt aber beim NOESY ein Problem, das mit der Beweglichkeit der Moleküle zusammenhängt.



Die Intensität der NOE-Signale ist bei einer bestimmten Beweglichkeit und Feldstärke null !!

NOE, NOESY und ROESY

Einen Ausweg bietet das ROESY Experiment

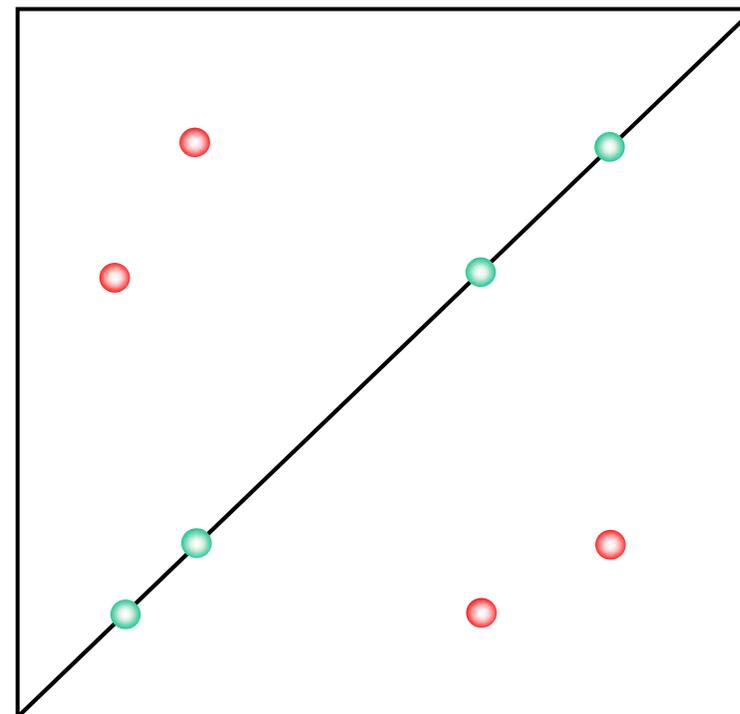
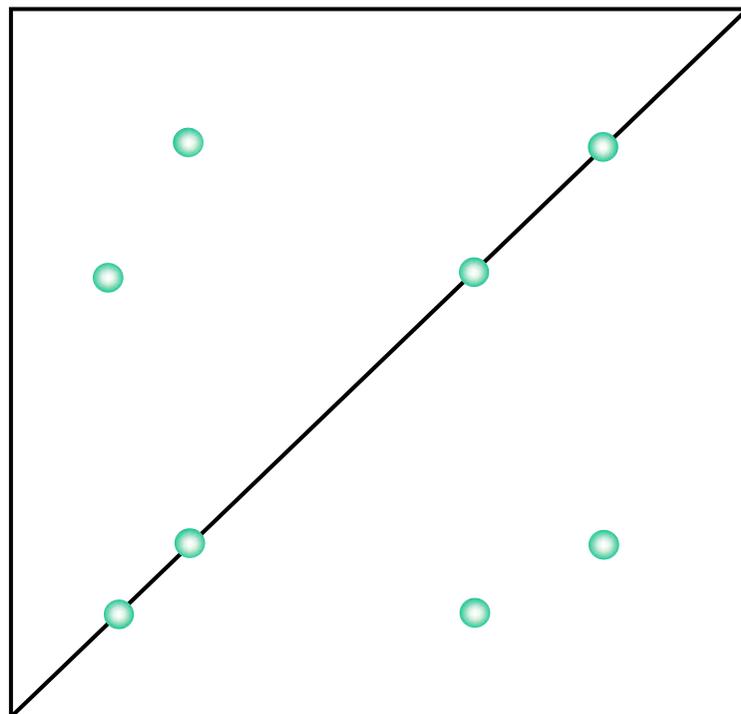


Hier gibt es keinen
Nulldurchgang.

NOE, NOESY und ROESY

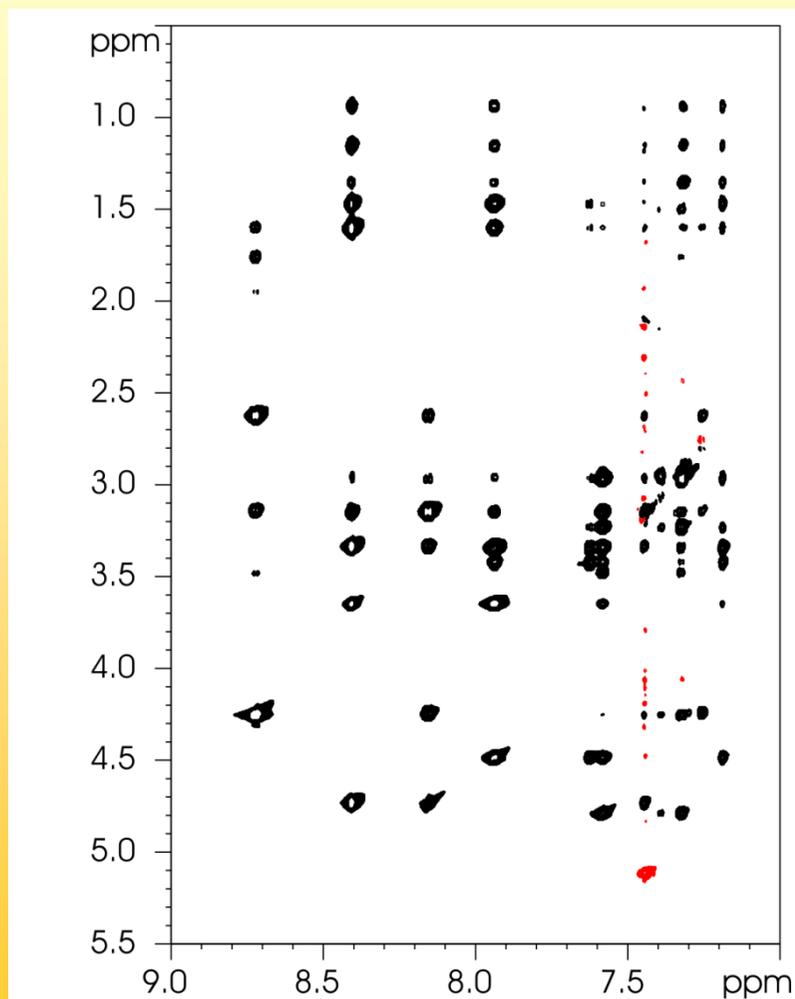
NOESY mit $\omega\tau_c > 1$

ROESY, NOESY mit $\omega\tau_c < 1$

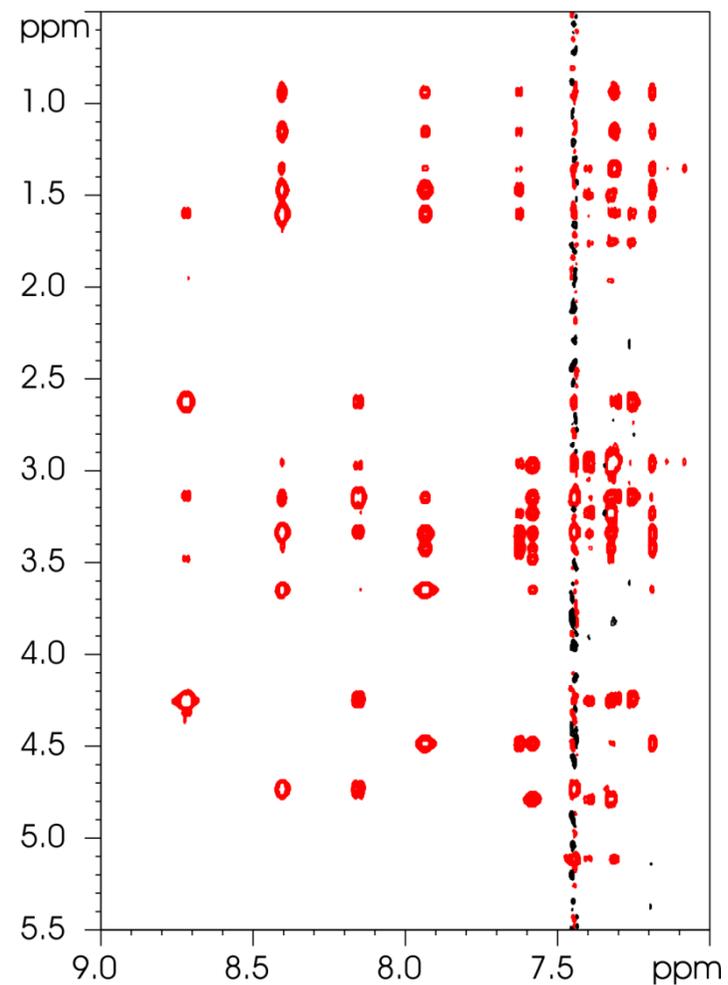


NOE, NOESY und ROESY

NOESY

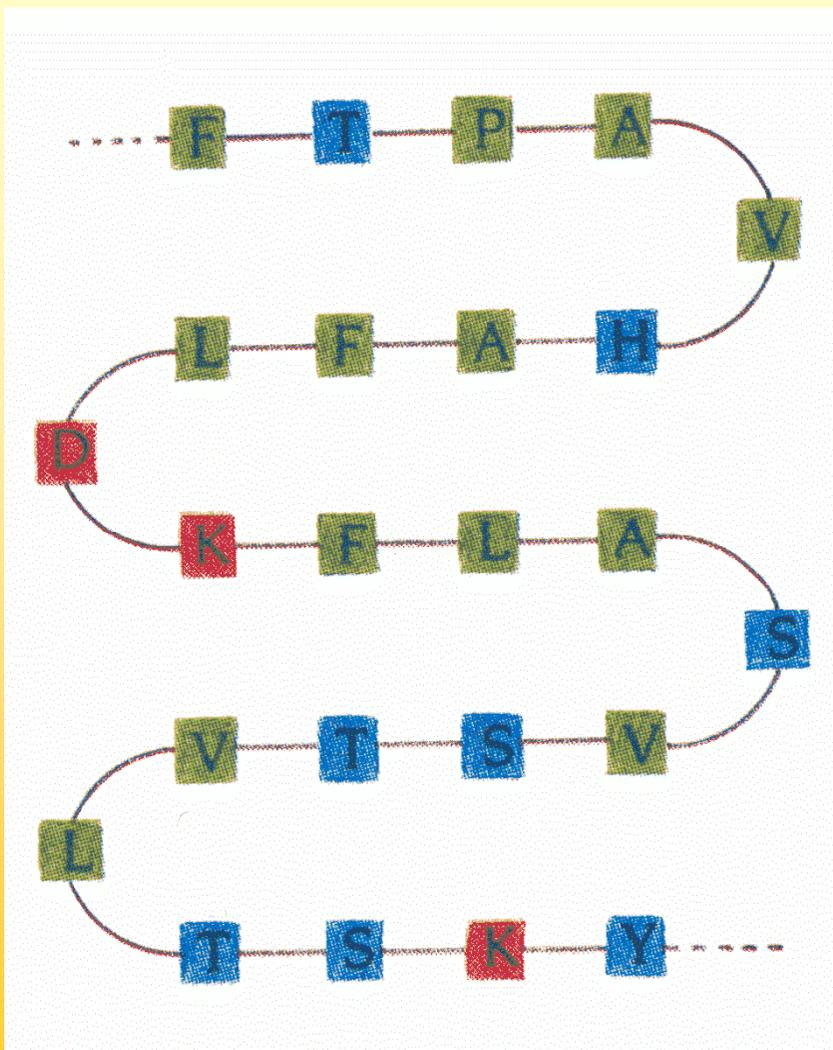


ROESY



Sequenzspezifische Zuordnung von Peptiden

Sequenzspezifische Zuordnung

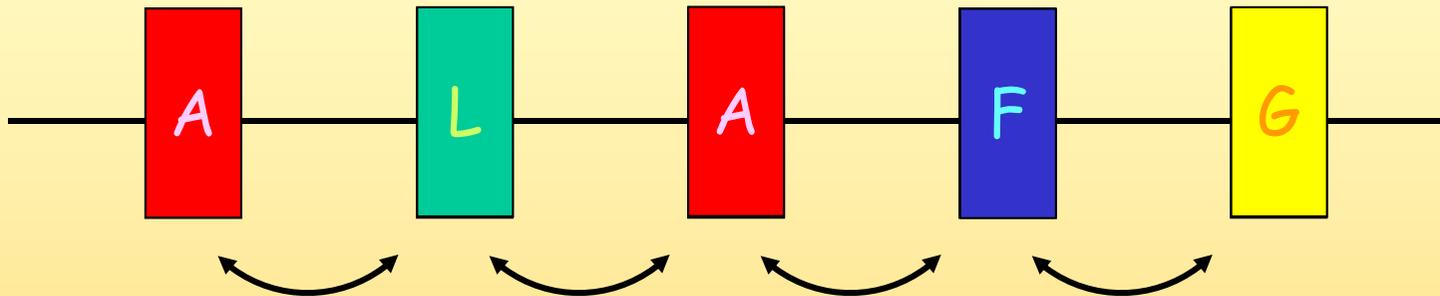


Ein Peptid ist ein Polymer.
Die Kenntnis der Sequenz
ist unbedingt erforderlich.

Man führt eine
sequenzspezifische
Zuordnung durch.

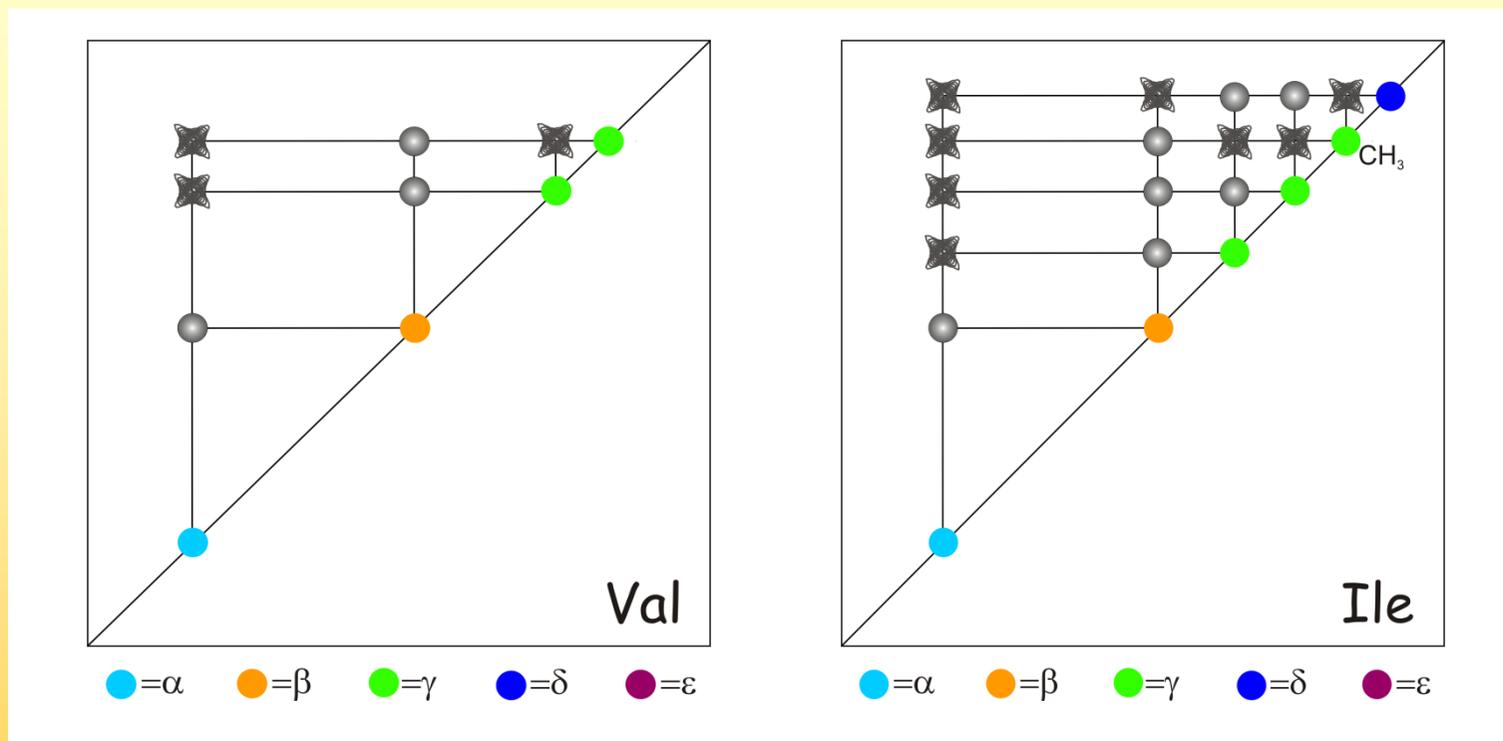
Sequenzspezifische Zuordnung

Sequenz-spezifische Zuordnung



1. Welcher Aminosäuretyp liegt vor ? (welche Farbe)
2. Welche Aminosäure liegt neben welcher ?
(Nachbarschaft)
3. Abgleich mit der Proteinsequenz
4. Die Reihenfolge von (1) und (2) ist egal.

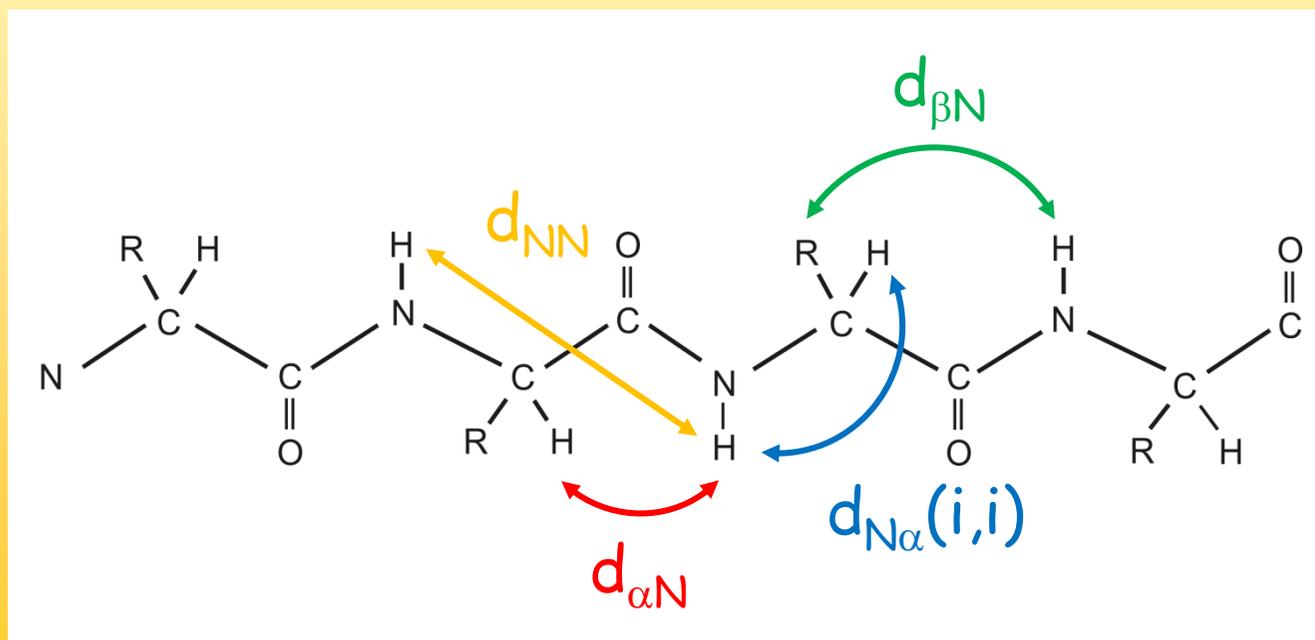
Sequenzspezifische Zuordnung



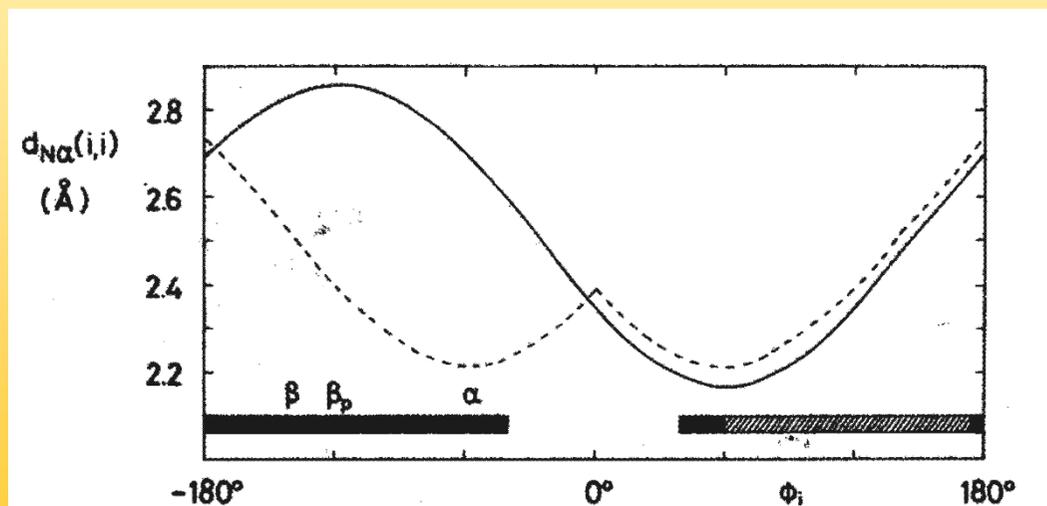
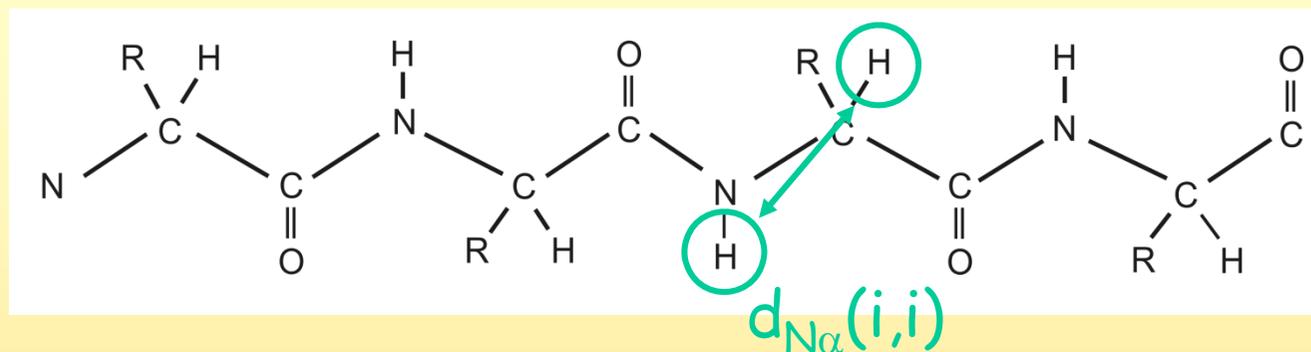
Der Aminosäuretyp wird über *COSY* und *TOCSY* bestimmt

Sequenzspezifische Zuordnung

Für die Methode der sequenzspezifischen Zuordnung sind Abstände entlang des Peptid-"backbone" von Bedeutung.

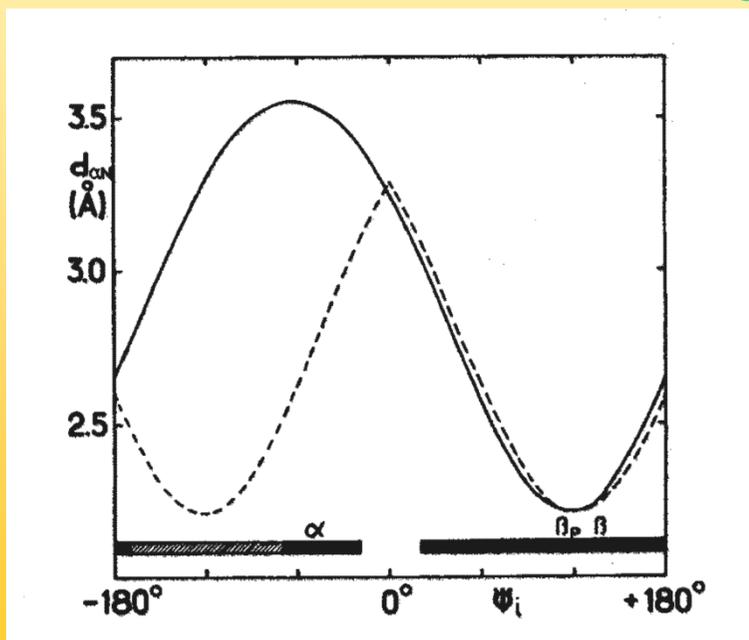
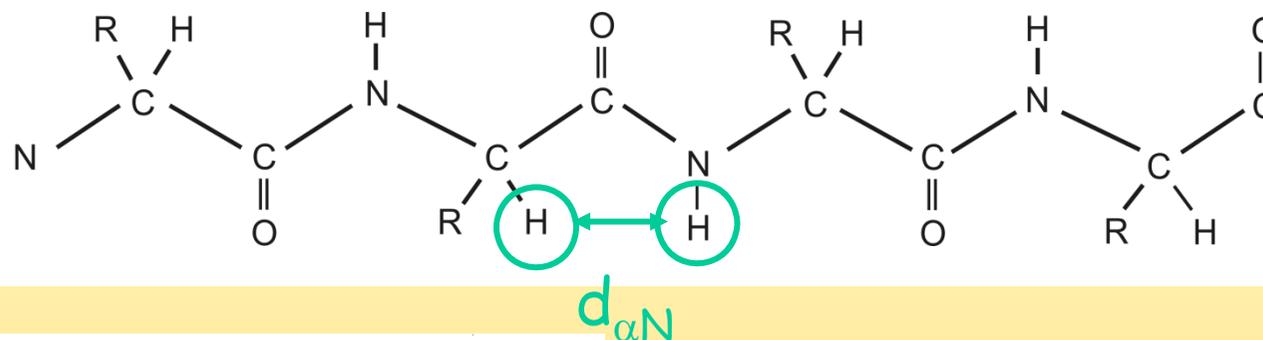


Sequenzspezifische Zuordnung



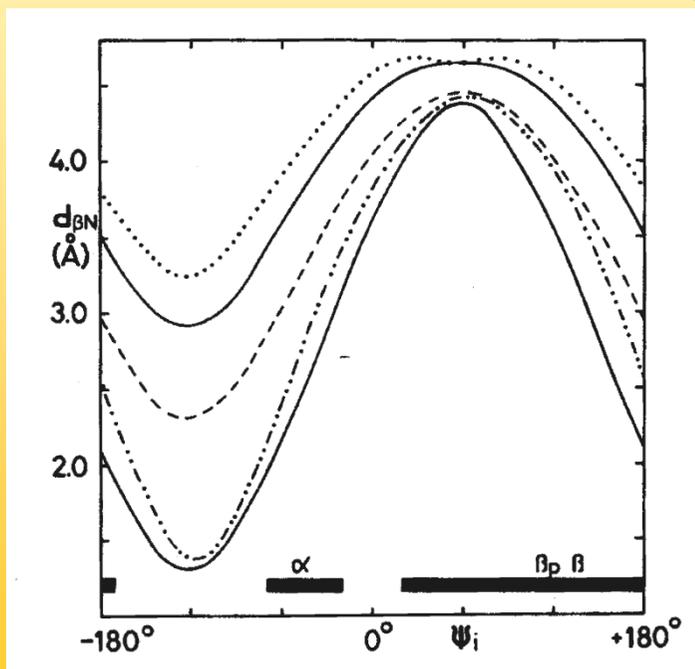
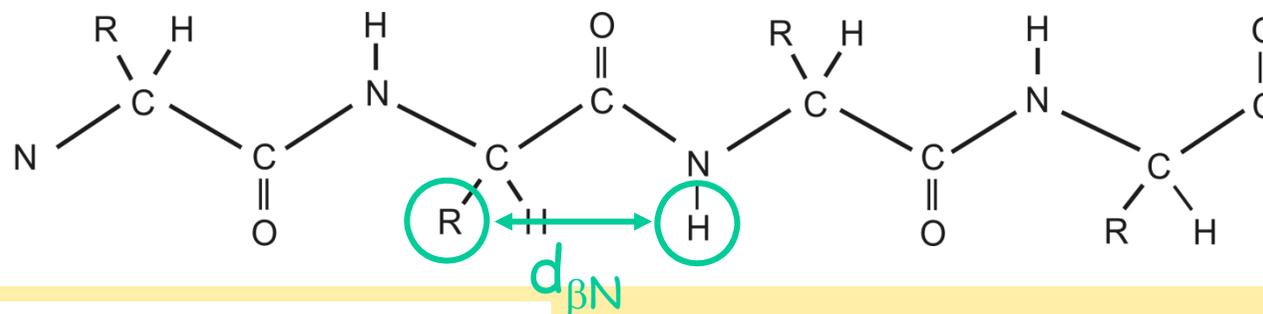
Der Abstand vom H^{N} zum H^{α} , $d_{N\alpha}(i,i)$ innerhalb einer Aminosäure ist immer kurz genug für einen NOE.

Sequenzspezifische Zuordnung



Das gleiche gilt für den Abstand vom H^N zum H^α der Aminosäure (i-1), $d_{\alpha N}$.

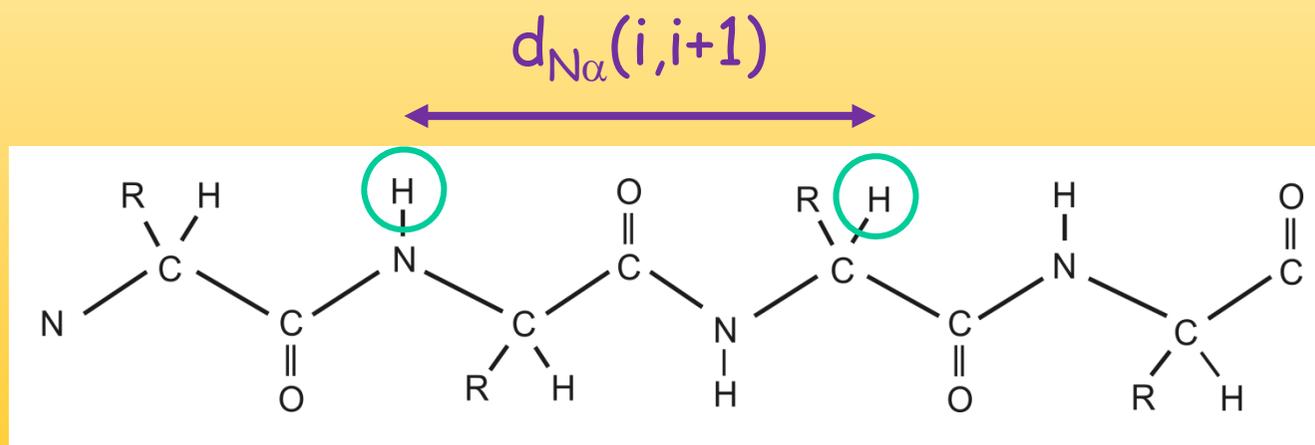
Sequenzspezifische Zuordnung



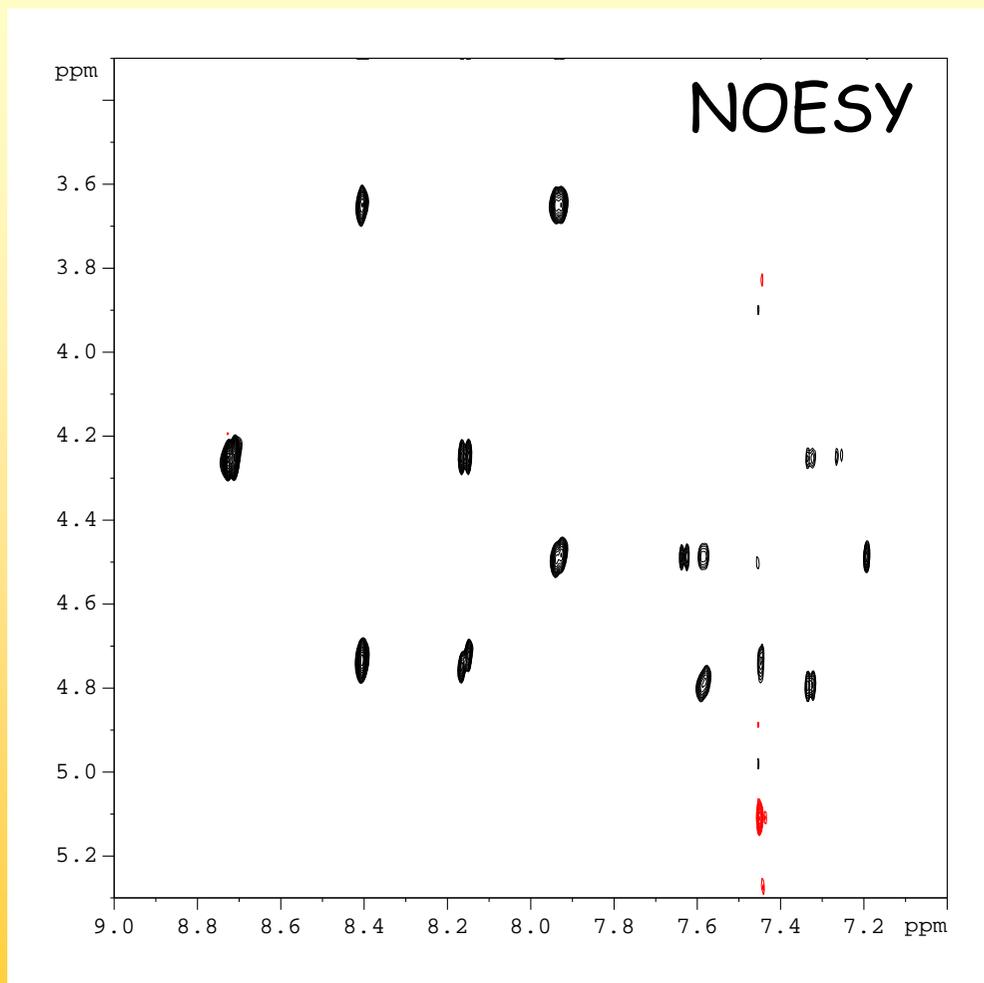
und auch - mit Einschränkungen
 - für den Abstand vom H^N zum
 H^β der Aminosäure $(i-1)$, $d_{\beta\text{N}}$.

Sequenzspezifische Zuordnung

Ein Abstand entlang des Peptid-Rückrats ist allerdings zu lang für einen NOE, $d_{N\alpha}(i,i+1)$! Das gibt den NOEs eine Richtung, denn von einem H^α kann man nur das „eigene“ und „folgende“ H^N sehen, vom H^N aus nur das „eigene“ und „vorangegangene“ H^α !



Sequenzspezifische Zuordnung

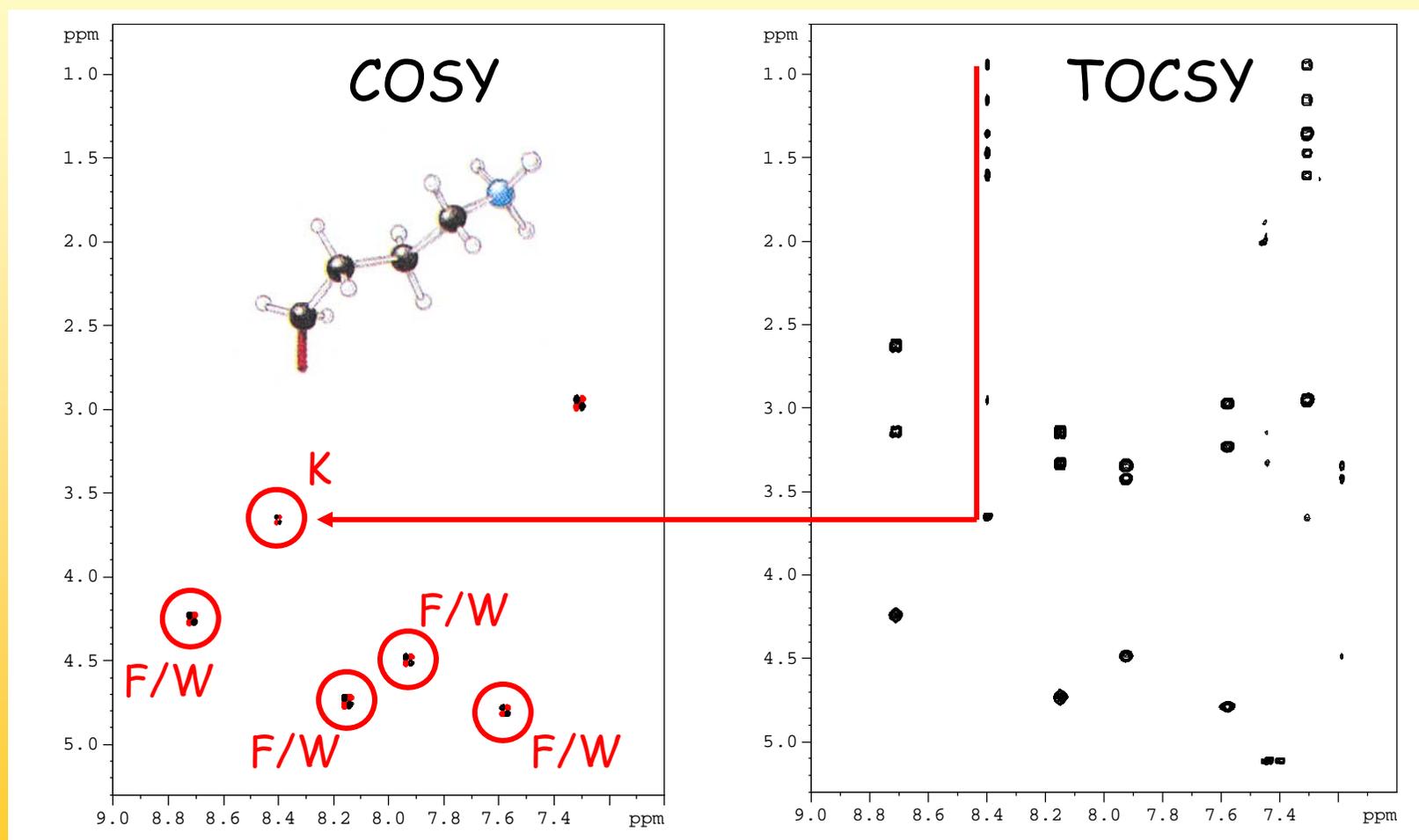


Es sollten also für jedes H^N mindestens zwei Signale im Bereich des „Fingerabdrucks“ vorliegen:
 Eines zum H^α der gleichen Aminosäure, eines zum H^α der in der Sequenz vorangehenden.

Daneben gibt es aber noch andere Signale von H^N zu Seitenketten und Aromaten zu Seitenketten.

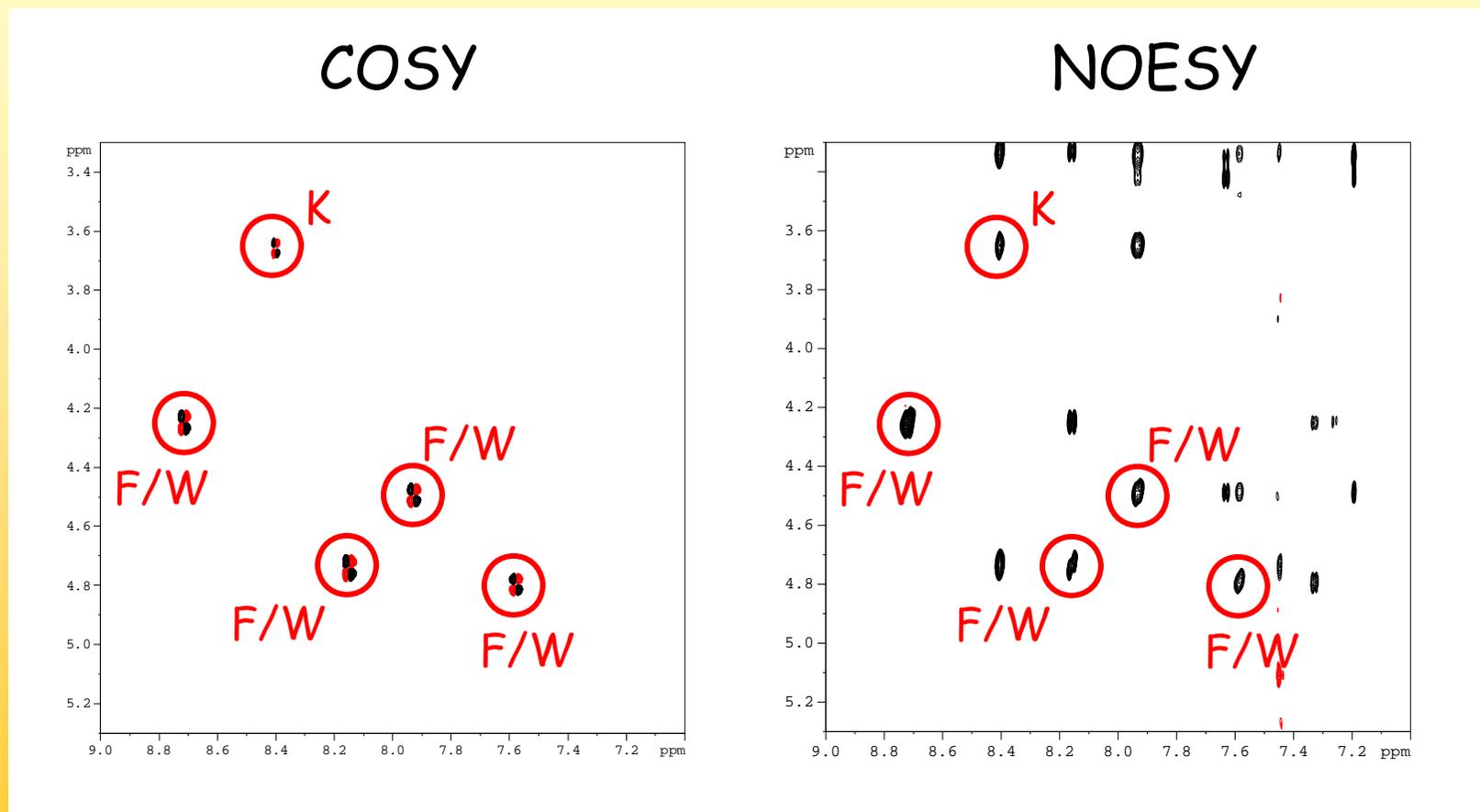
Sequenzspezifische Zuordnung

1. Identifizierung der Aminosäuretypen



Sequenzspezifische Zuordnung

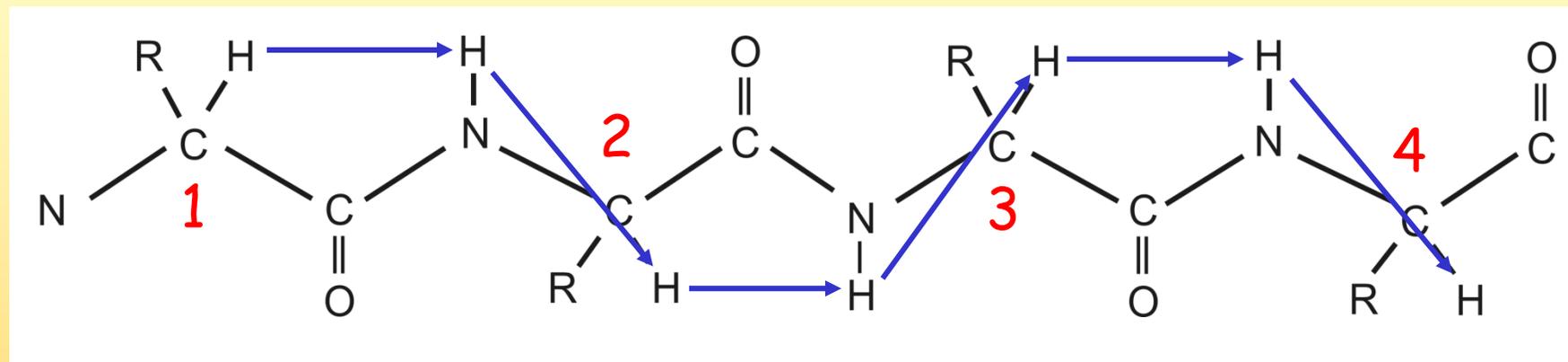
2. Übertragung der COSY-Peaks ins NOESY



Sequenzspezifische Zuordnung

3. Dann kommt der „sequential walk“

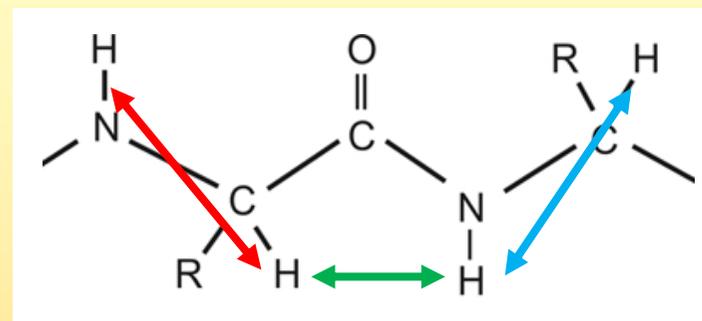
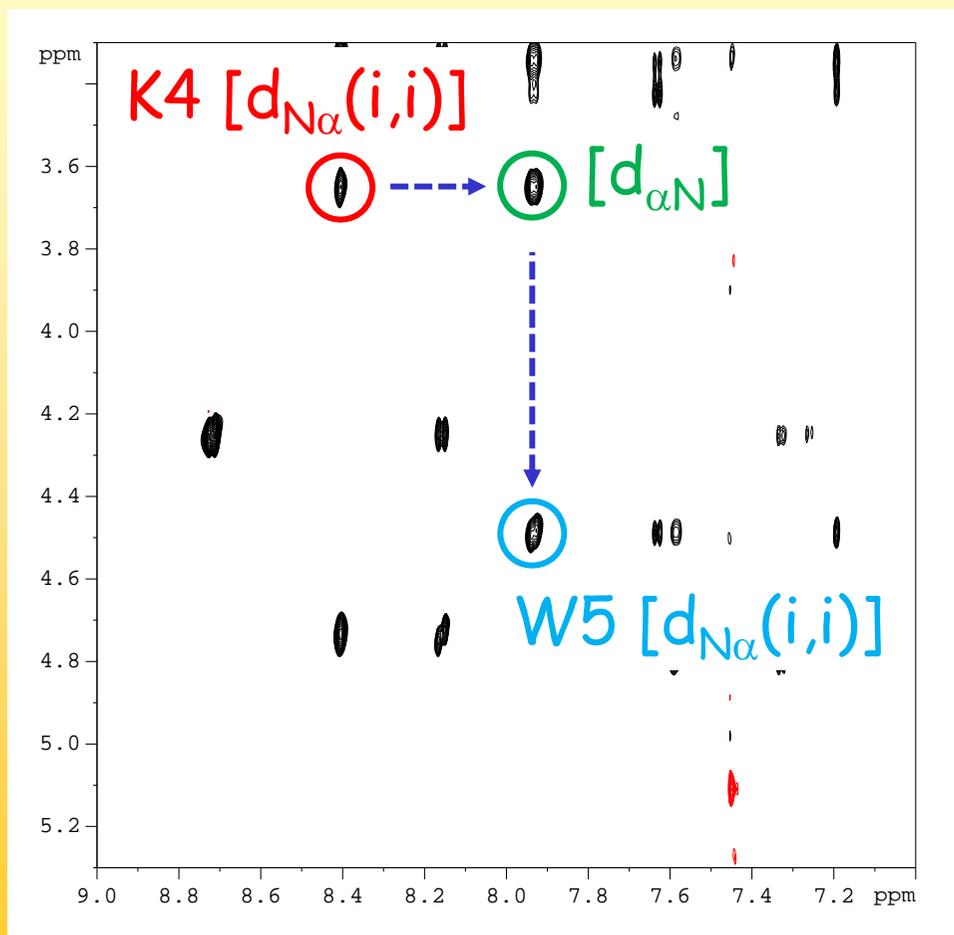
Erst in der Theorie....



Jedes Proton entspricht einer Frequenz, jeder Pfeil einem Peak im NOESY

Sequenzspezifische Zuordnung

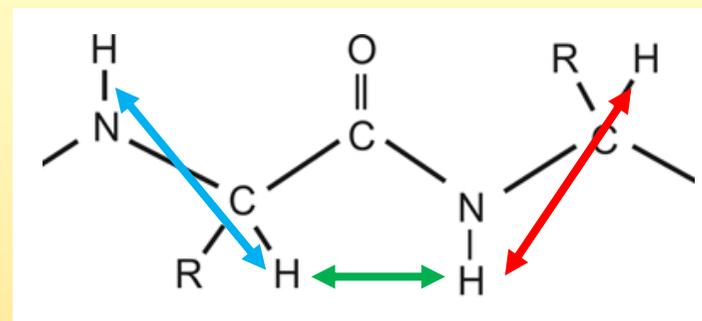
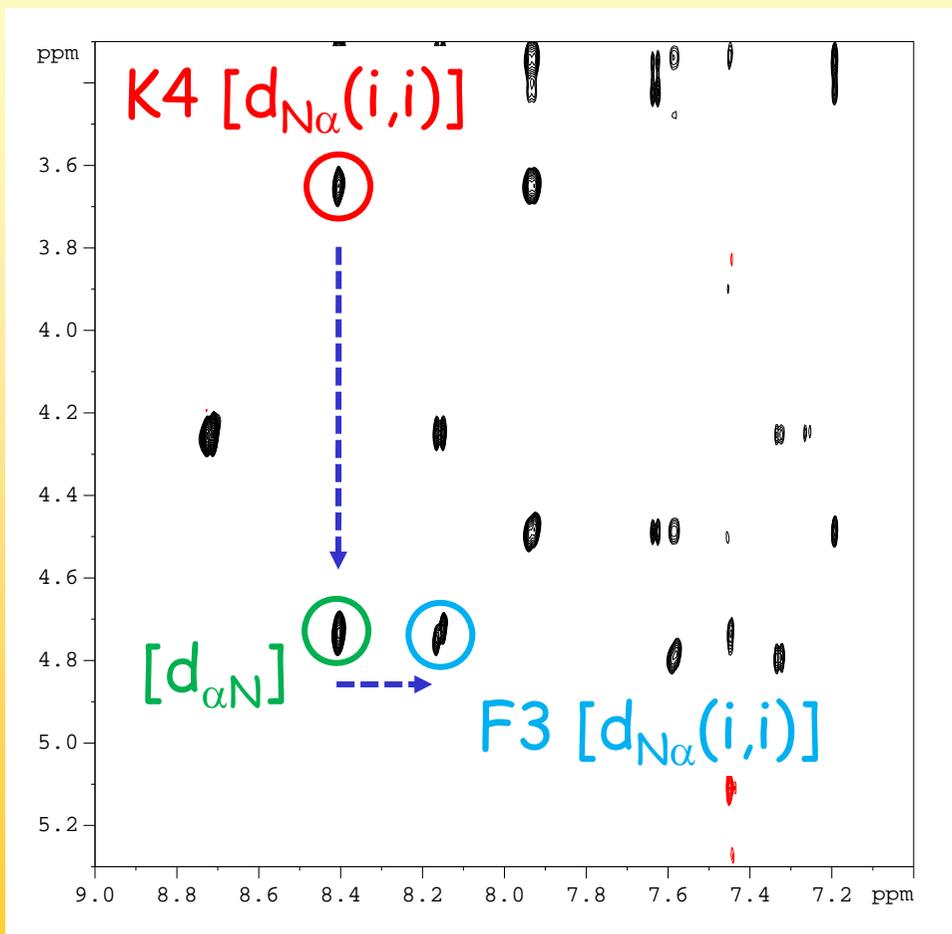
Im Spektrum geht man dann so „vorwärts“:



Durch die Korrelation von Peaks korreliert man auch Frequenzen und damit Protonen miteinander

Sequenzspezifische Zuordnung

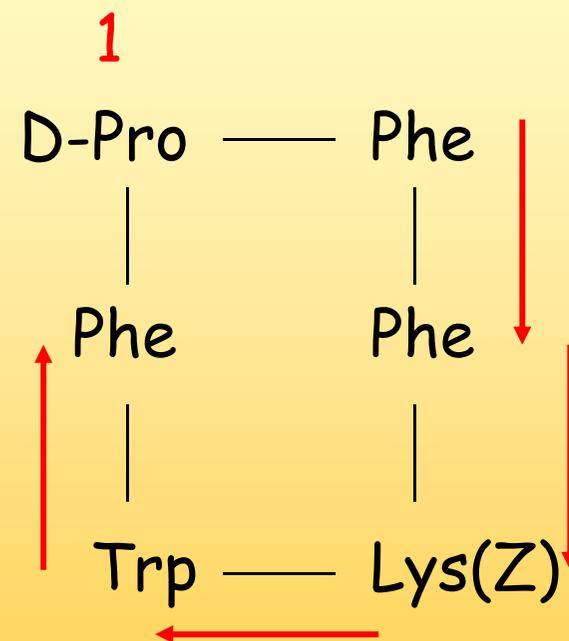
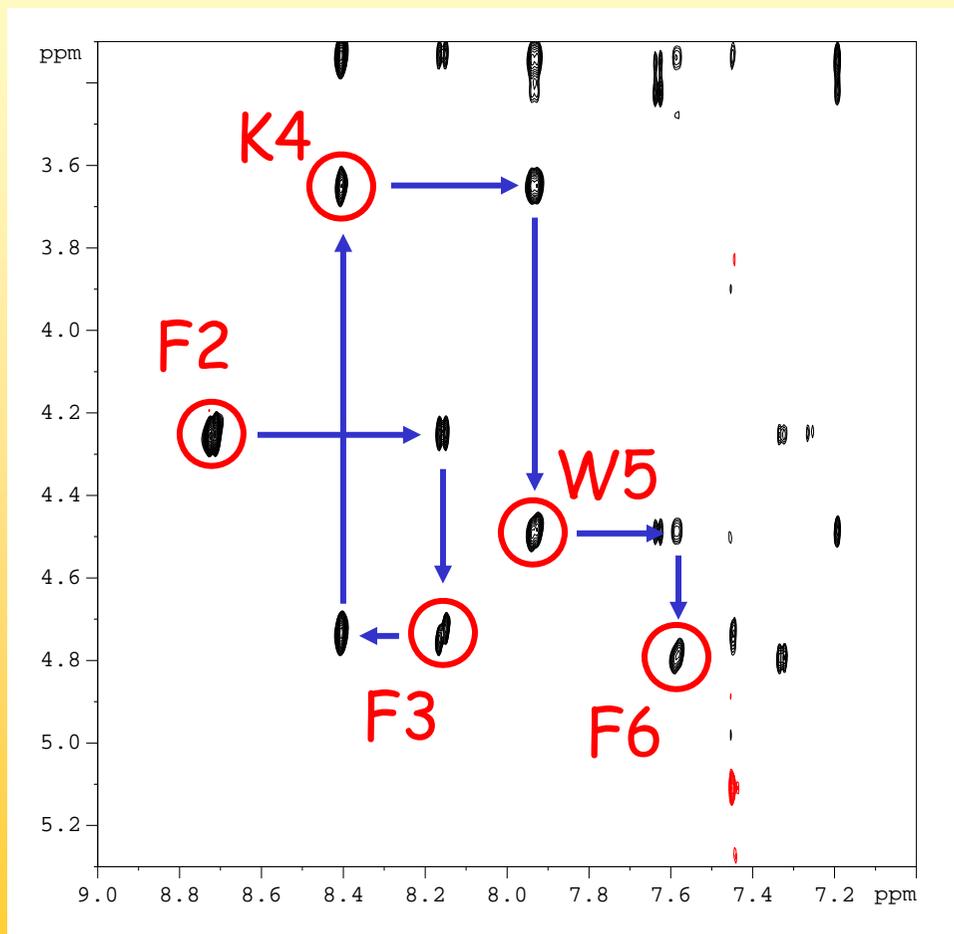
Und so „rückwärts“:



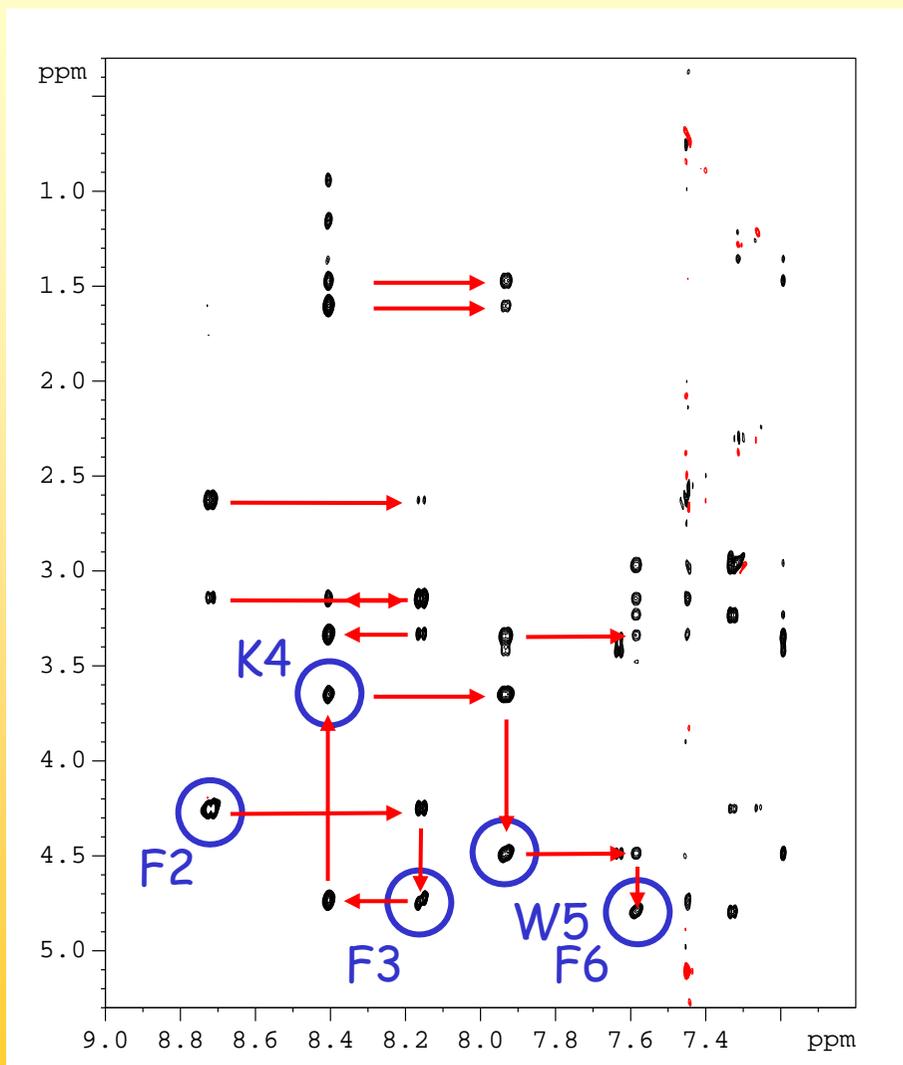
Durch die Korrelation von Peaks korreliert man auch Frequenzen und damit Protonen miteinander

Sequenzspezifische Zuordnung

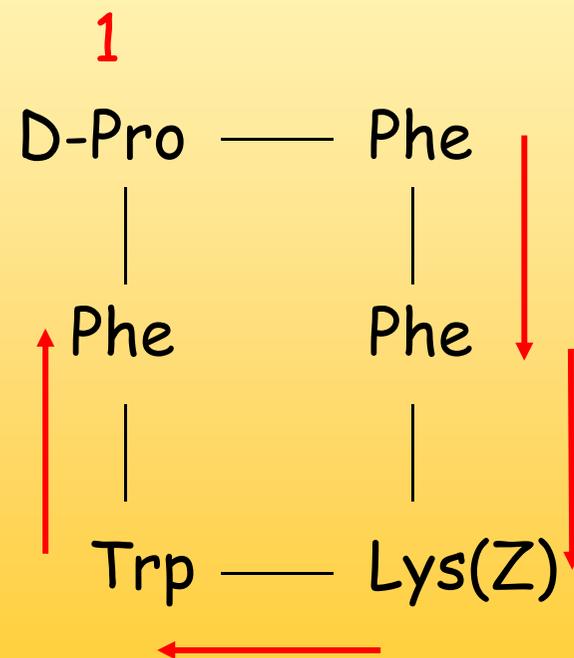
4. Der volle „sequential walk“ im Spektrum



Sequenzspezifische Zuordnung

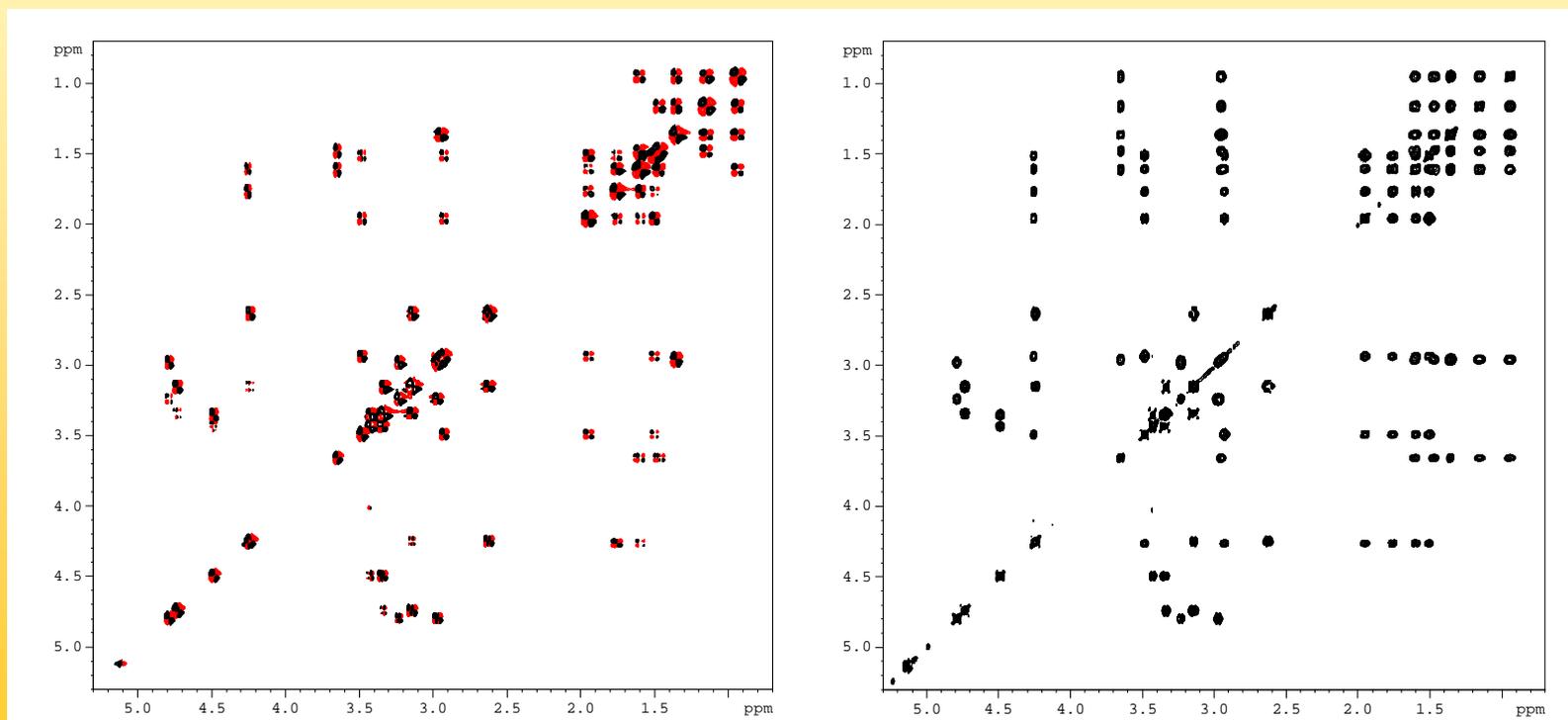


nimmt man die H^β mit
dazu wird es noch
etwas sicherer.



Sequenzspezifische Zuordnung

Die Zuordnung der Seitenketten kann man mit dem *COSY* oder dem *TOCSY* aus den sequenzspezifischen Zuordnung der Hauptkette ableiten.

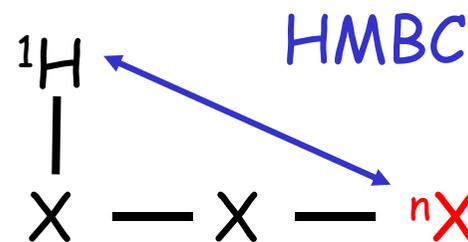
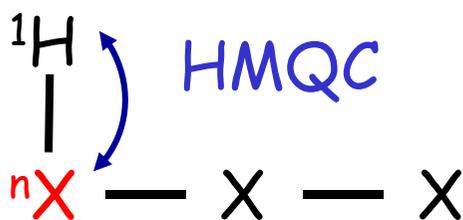


Heteronukleare NMR an Peptiden

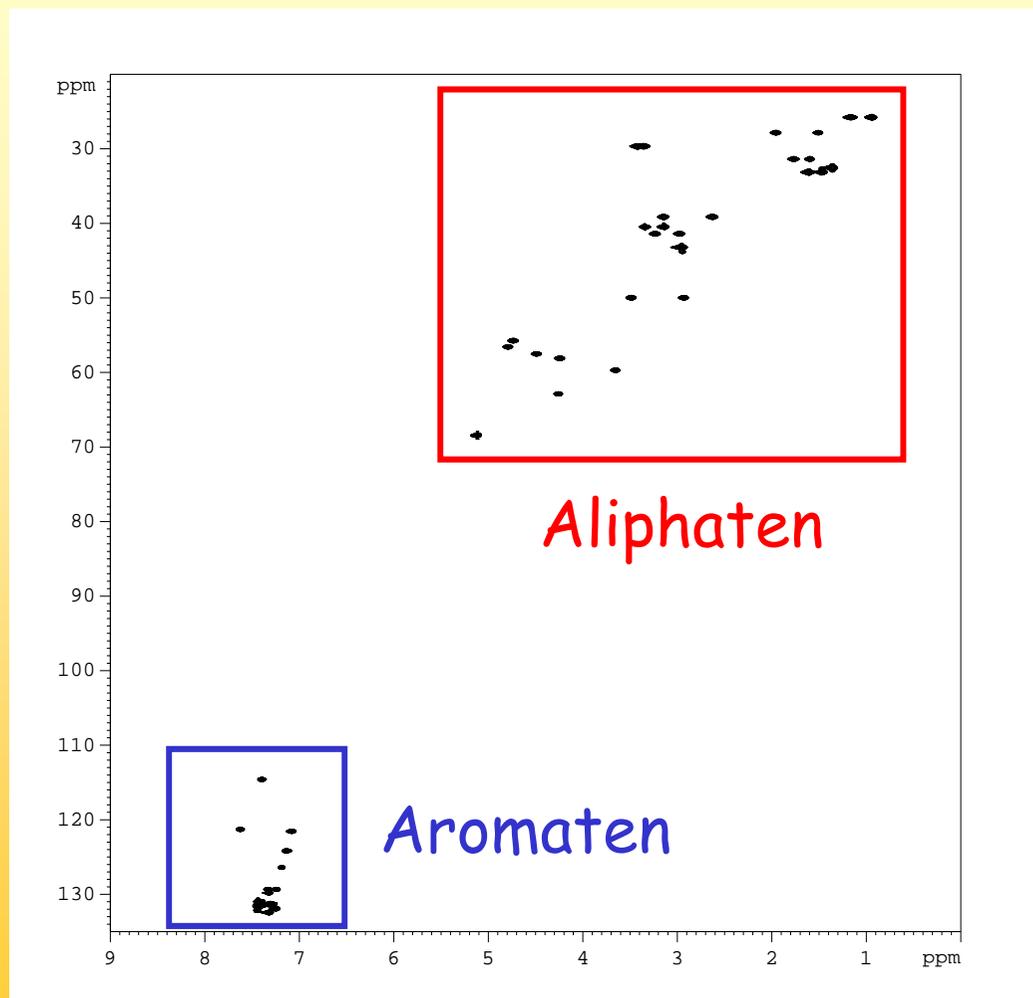
HMQC-artige Experimente

Heteronukleare NMR von Peptiden

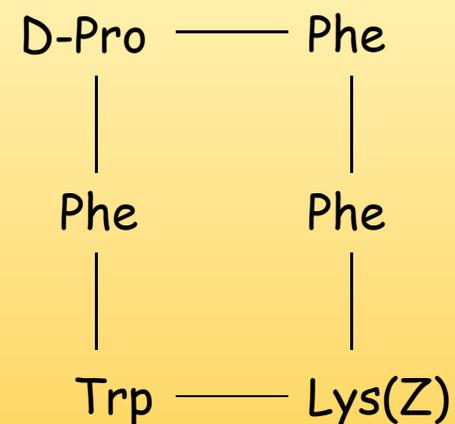
Bislang haben wir nur homonukleare Experimente betrachtet, man kann bei Peptiden aber auch in natürlicher Häufigkeit heteronuklearen Experimente machen, entweder basierend auf der direkten ^1H -X-Kopplung (HMQC) oder der Weitbereichskopplungen (HMBC).



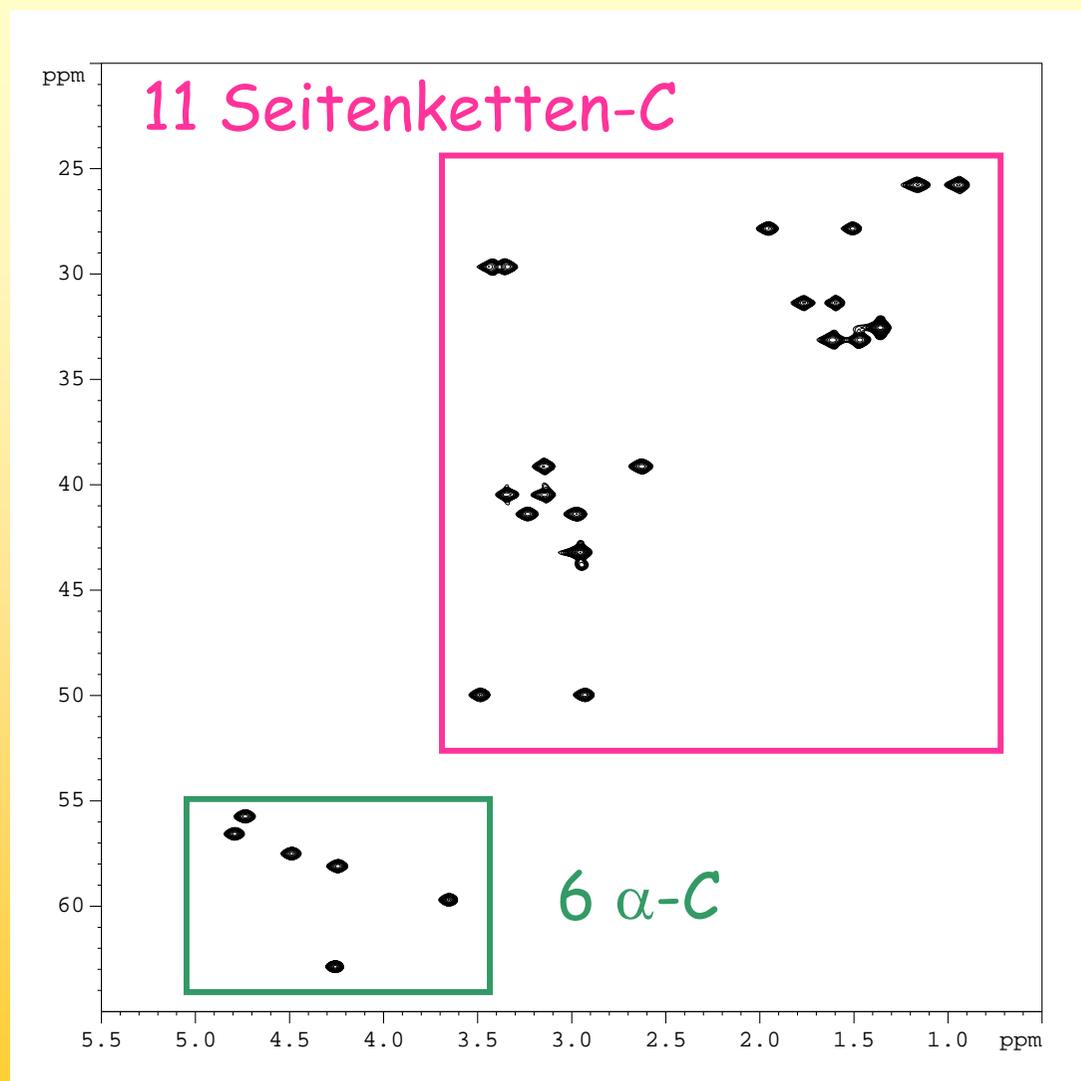
Heteronukleare NMR von Peptiden



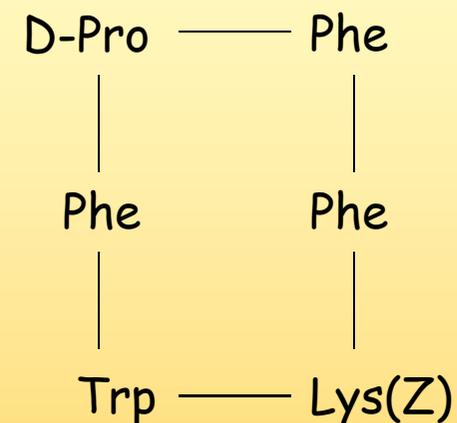
^{13}C -HMQC von F3-008



Heteronukleare NMR von Peptiden

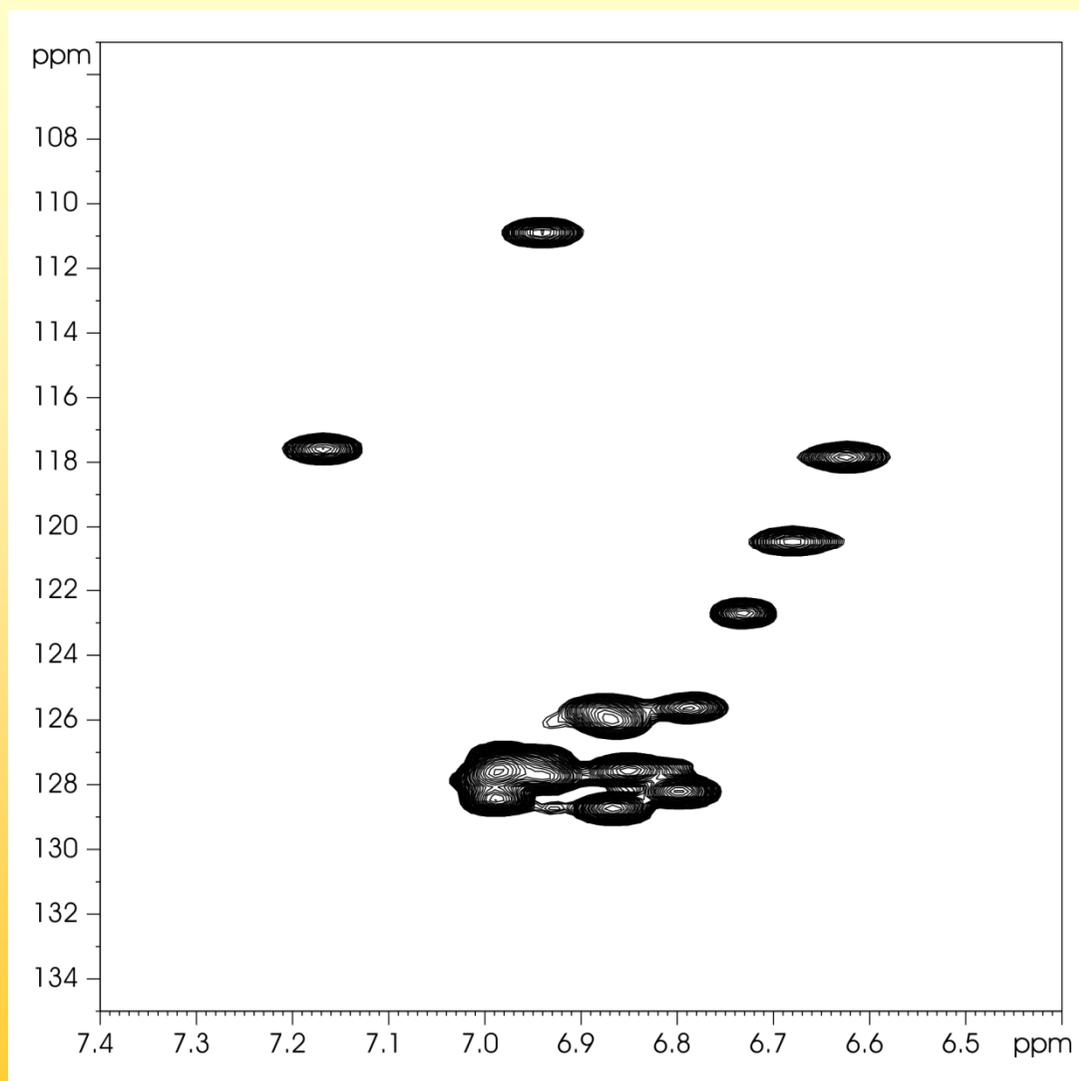


F3-008

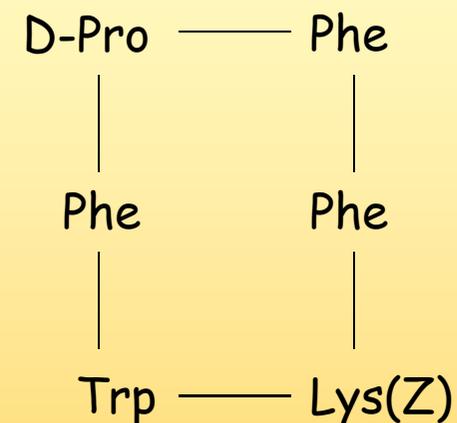


Überlagerung
wird weitgehend
aufgelöst.

Heteronukleare NMR von Peptiden



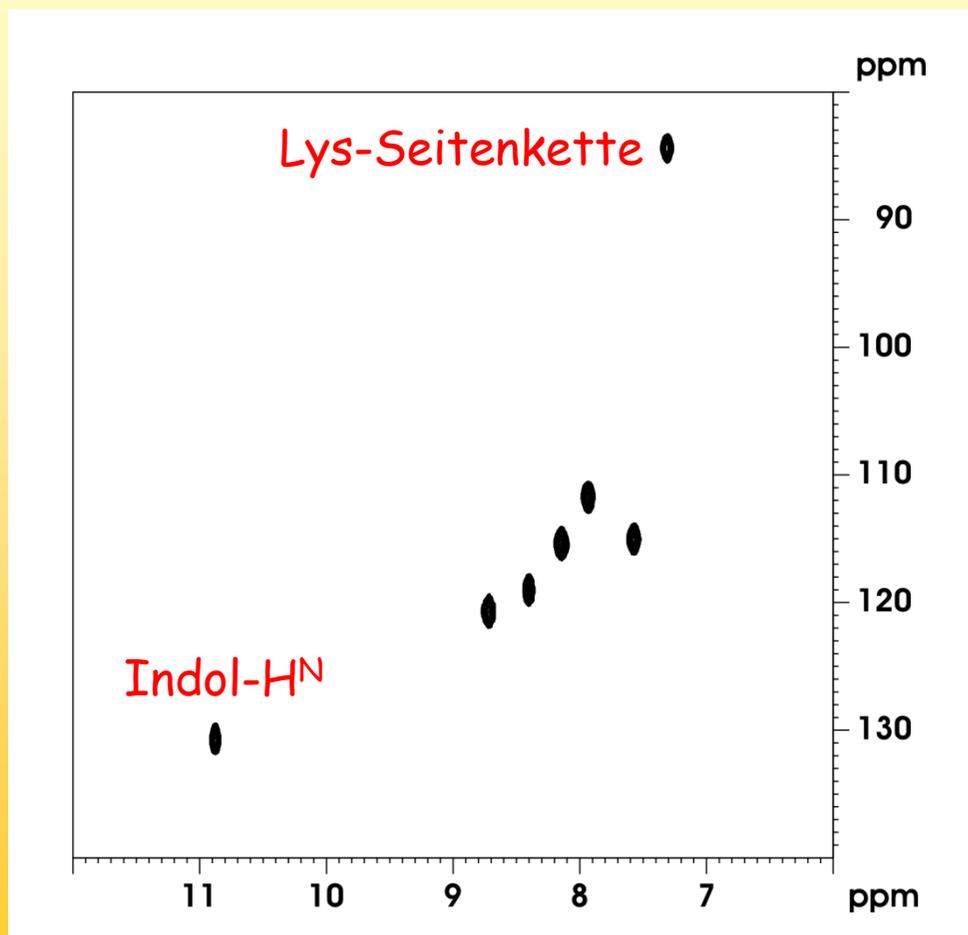
F3-008



Bei den Aromaten
kann es aber noch
immer eng sein.

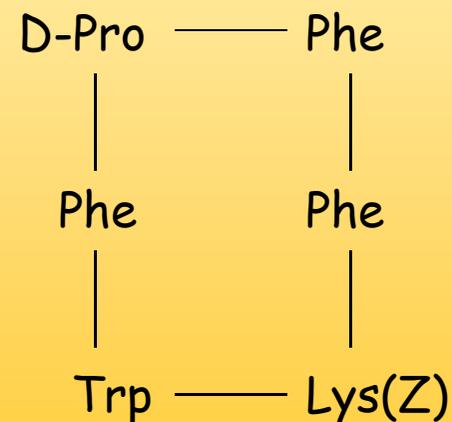
Heteronukleare NMR von Peptiden

^{15}N -HMQC von F3-008



Das klappt auch mit

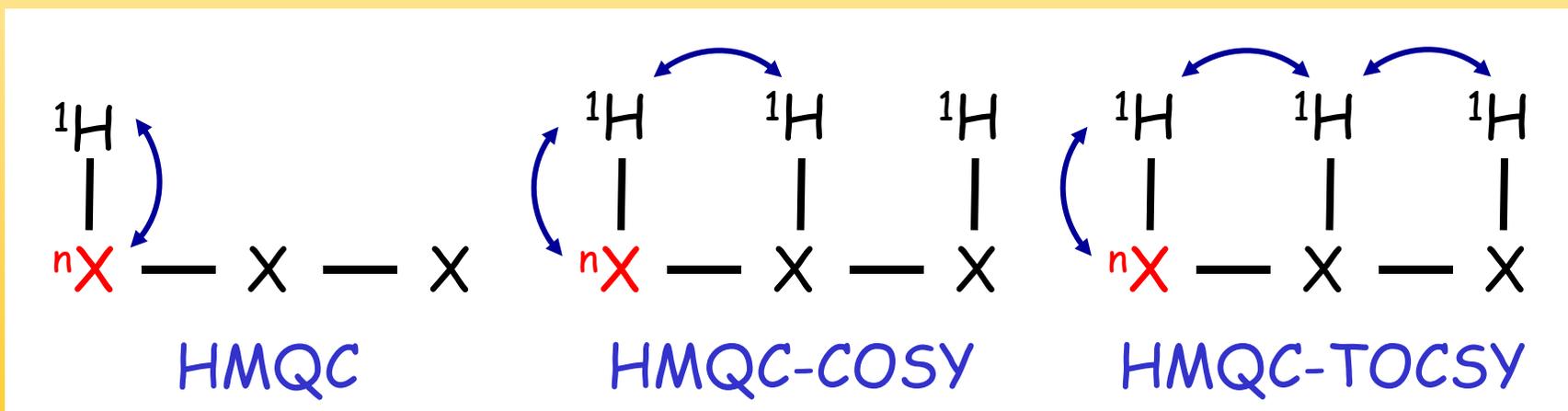
$$X = {}^{15}\text{N}.$$



Heteronukleare NMR von Peptiden

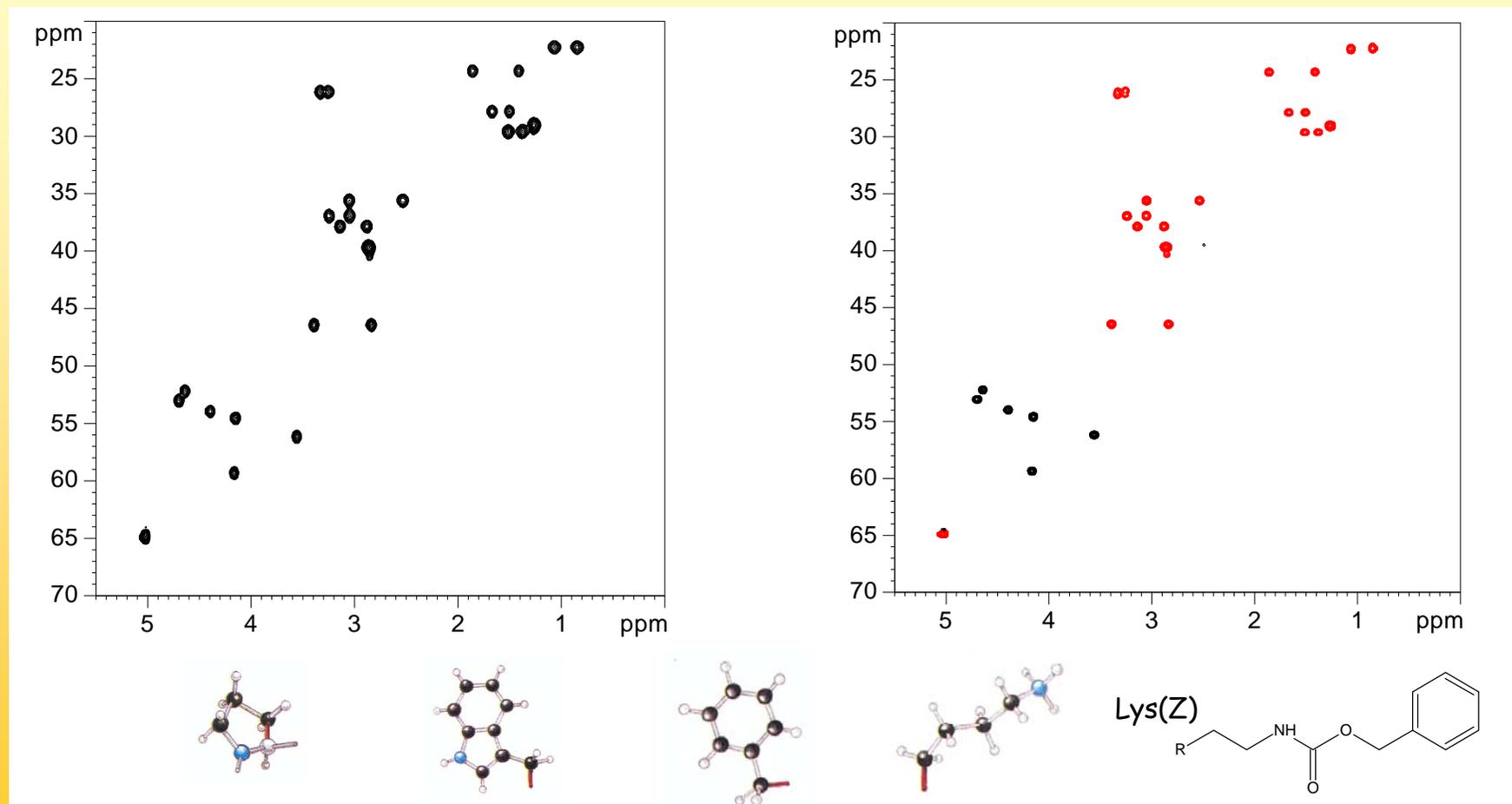
Wir haben gesehen dass heteronukleare Experimente durch die bessere Dispersion der Signale eine bessere Auflösung bieten.

Das kann man nutzen, indem man entweder im HMQC wie im DEPT editiert oder das HMQC mit homonuclearen Experimenten kombiniert



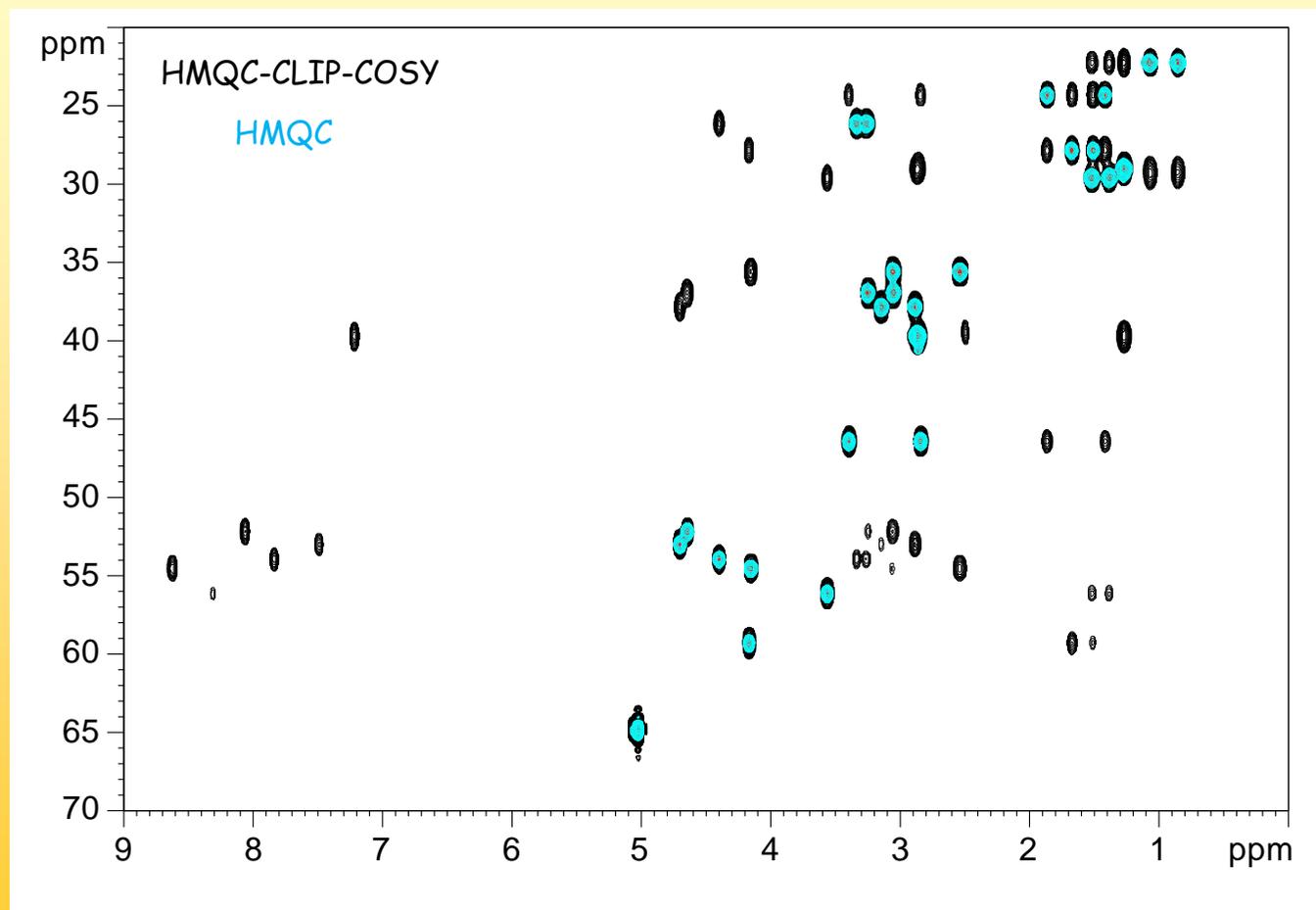
Heteronukleare NMR von Peptiden

Das DEPT-HMQC zeigt die Multiplizitäten im HMQC



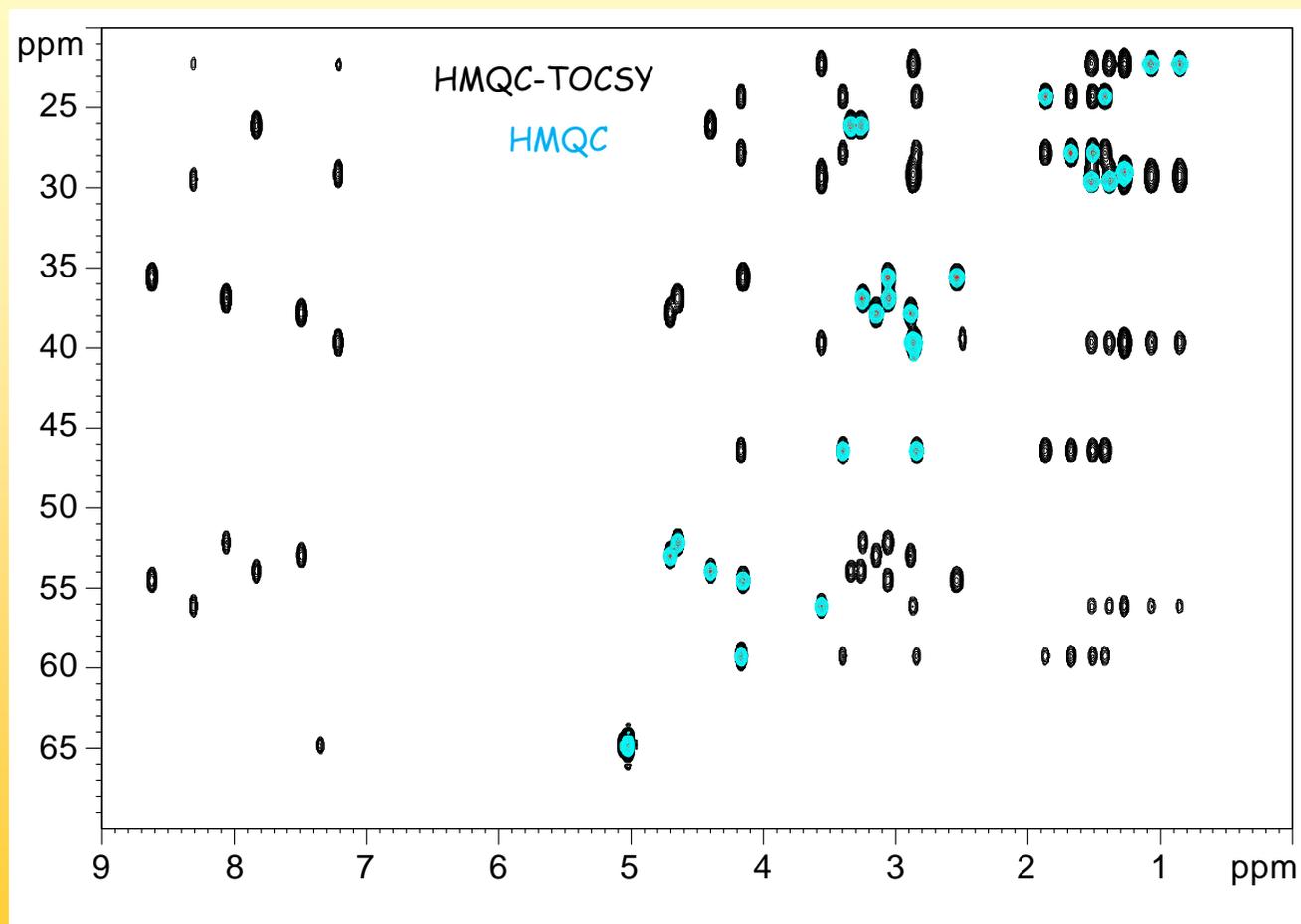
Heteronukleare NMR von Peptiden

Das HMQC-CLIP-COSY führt uns einen Schritt weiter



Heteronukleare NMR von Peptiden

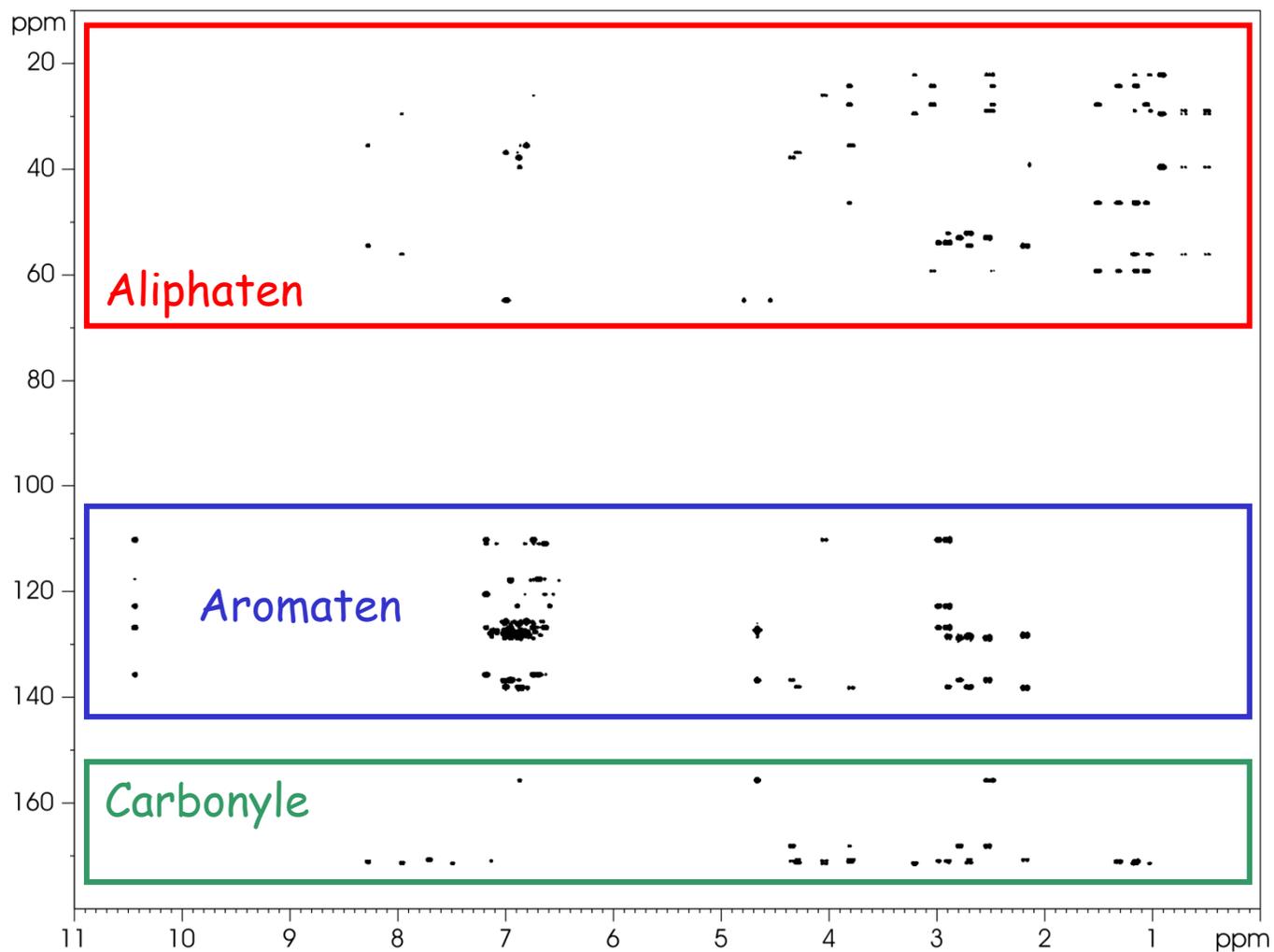
Das HMQC-TOCSY zeigt das ganze Spinsystem



Heteronukleare NMR an Peptiden

HMBC

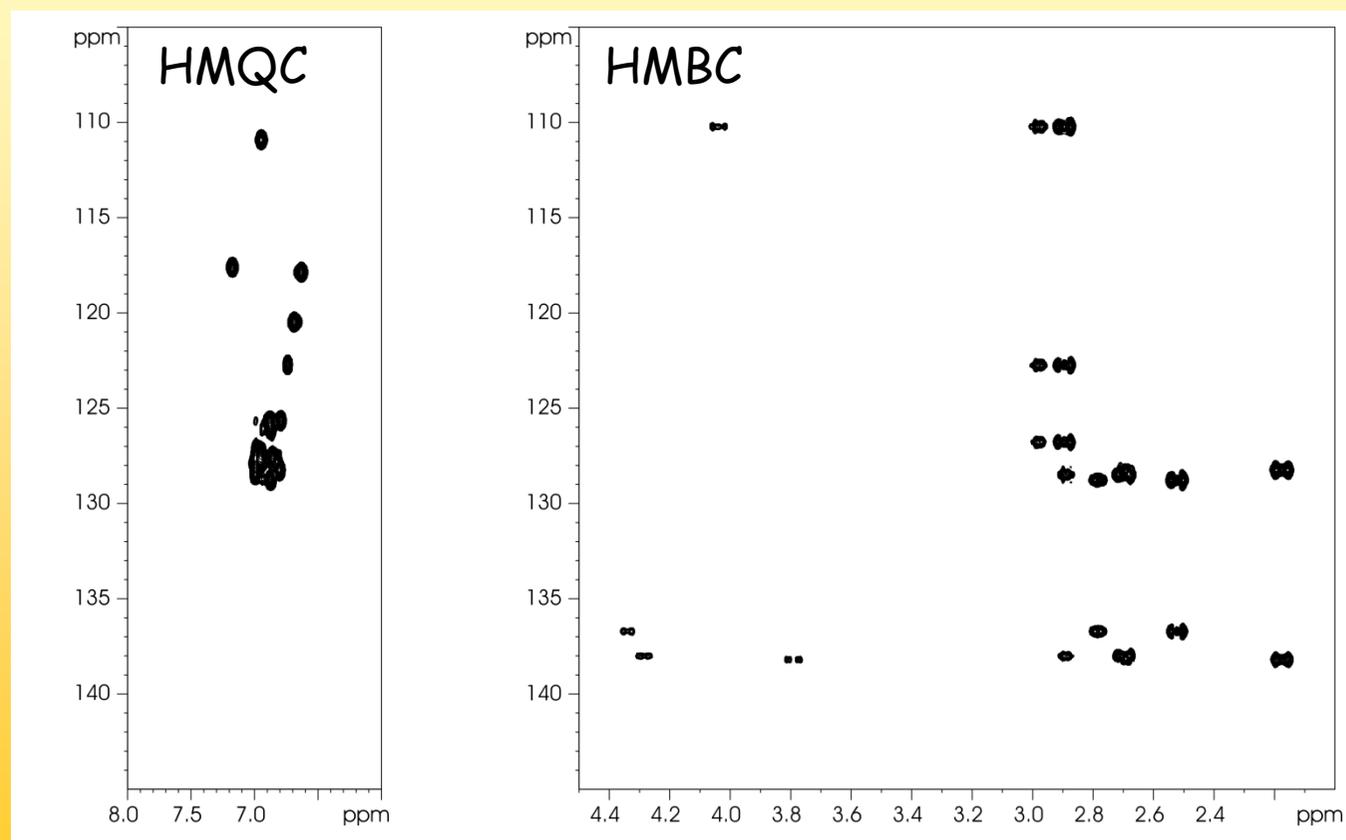
Heteronukleare NMR von Peptiden



^{13}C -HMBC
von F3-008

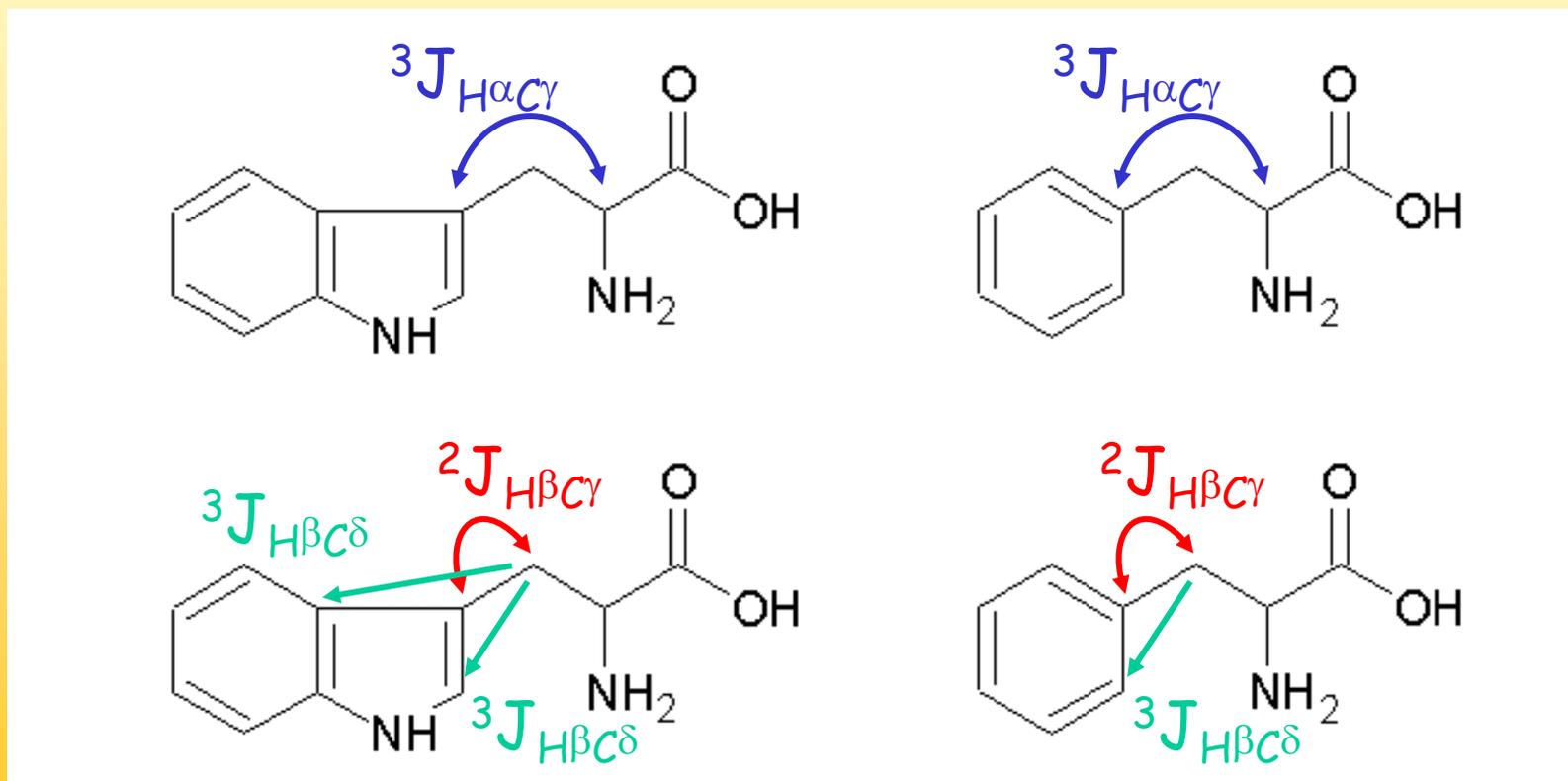
Heteronukleare NMR von Peptiden

Der Aromatenbereich des ^{13}C -HMBC dient zur Zuordnung von quartären Kohlenstoff in den aromatischen Ringen.



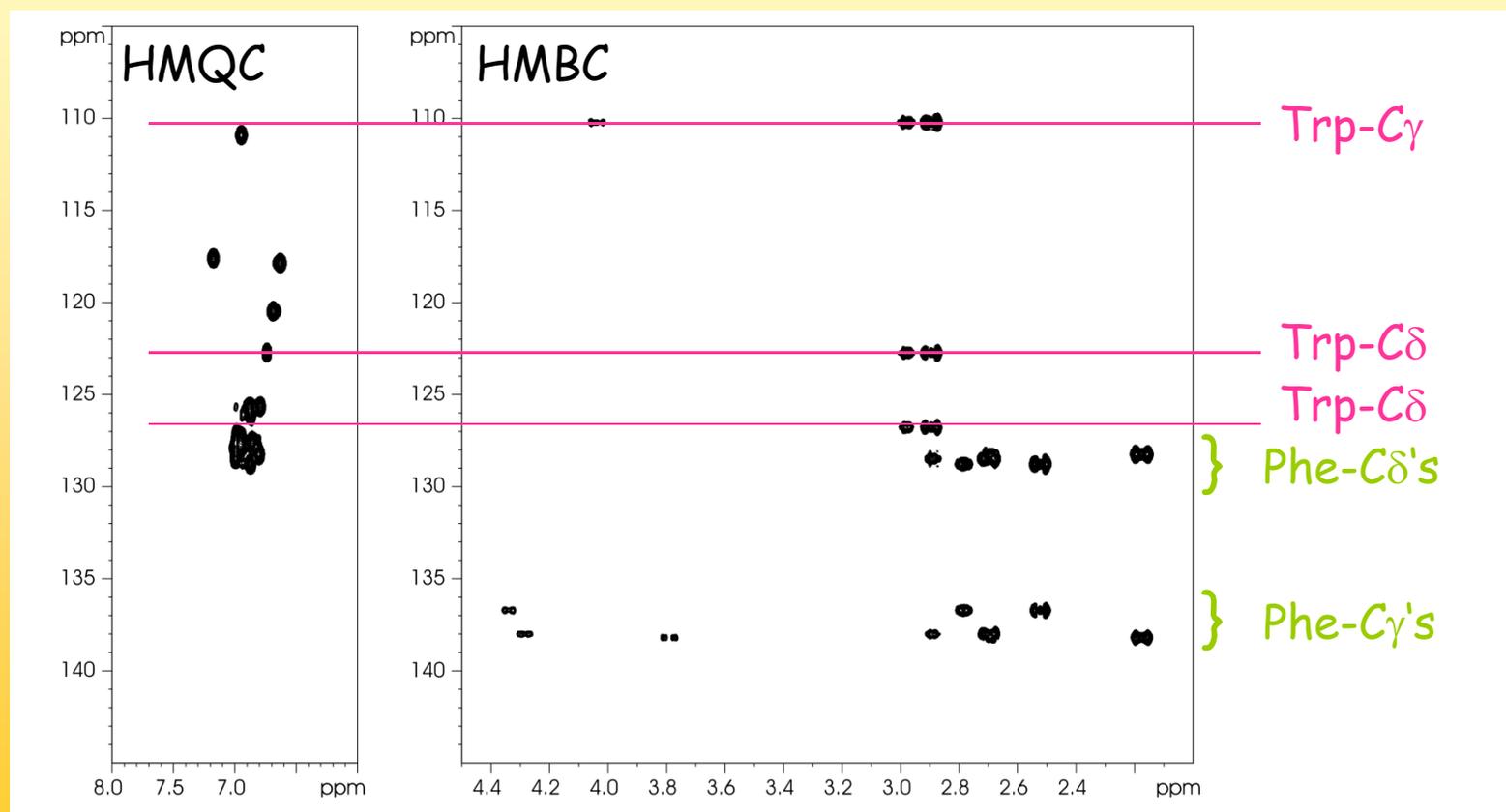
Heteronukleare NMR von Peptiden

Im Falle von unserem Modellpeptid, F3-008, gibt es Tryptophan und Phenylalanin.



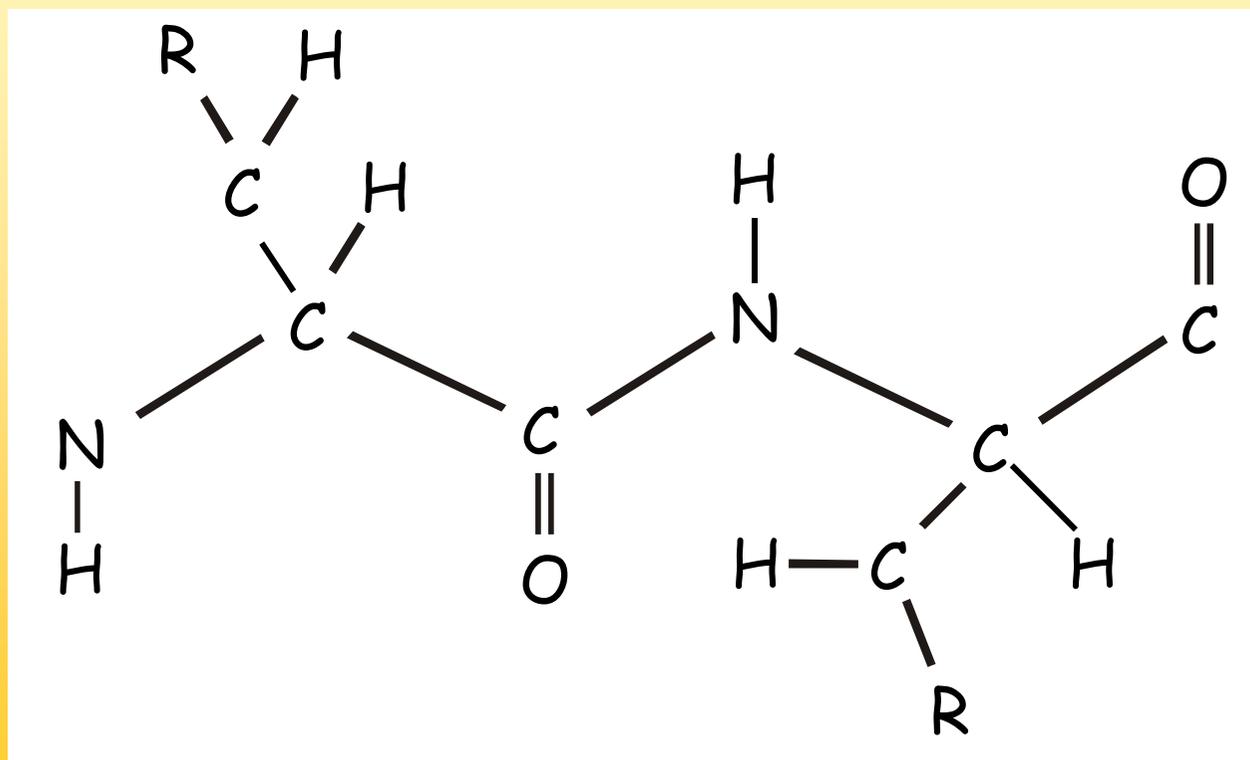
Heteronukleare NMR von Peptiden

Die Zuordnungen von quartären Kohlenstoffen in den aromatischen Ringen lassen sich dann leicht ableiten.



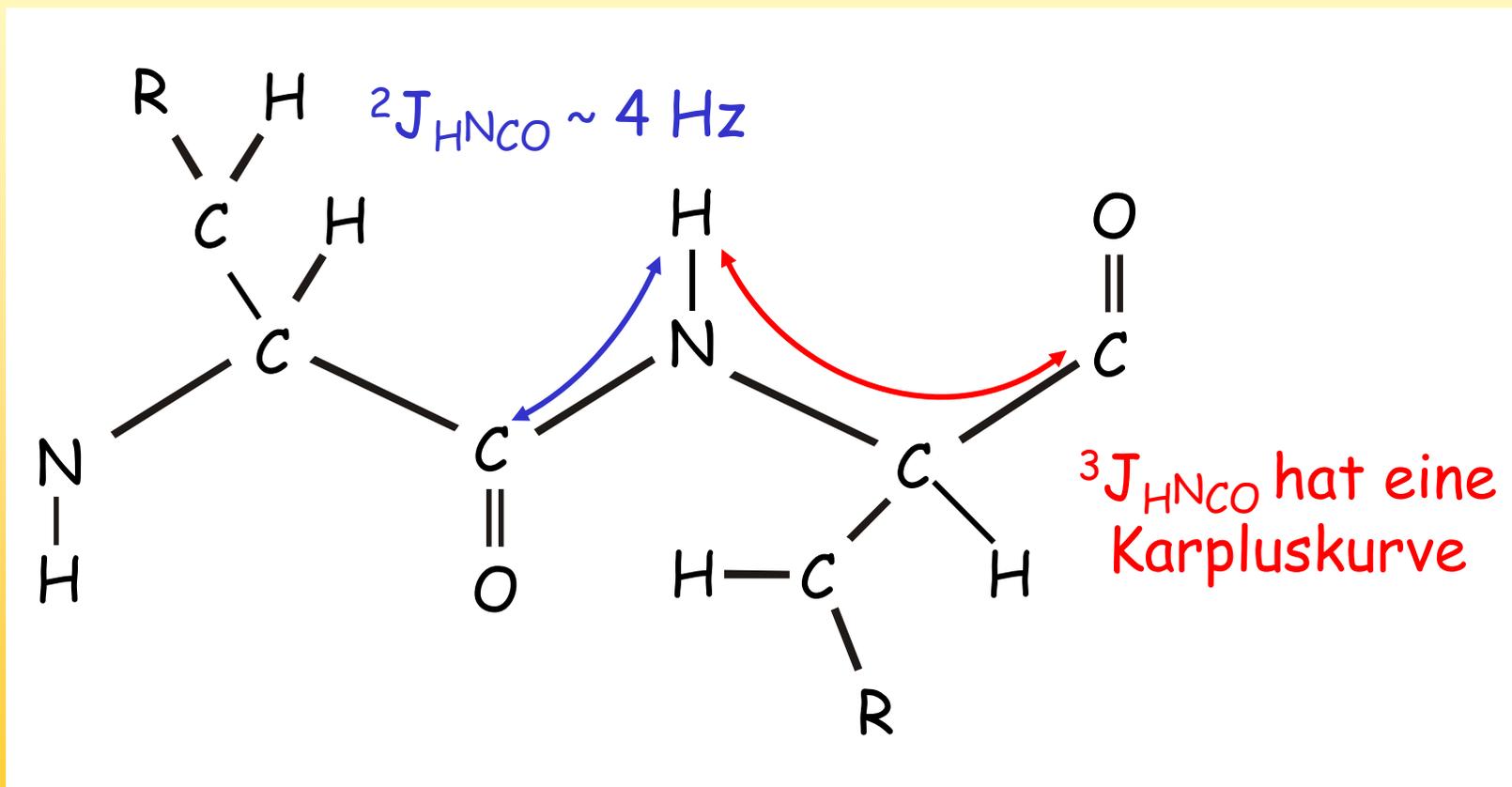
Heteronukleare NMR von Peptiden

Noch wichtiger ist aber das HMBC bei Peptiden im Zusammenhang mit den Carbonyl-Kohlenstoffen
Wie groß sind denn hier die Kopplungskonstanten ?



Heteronukleare NMR von Peptiden

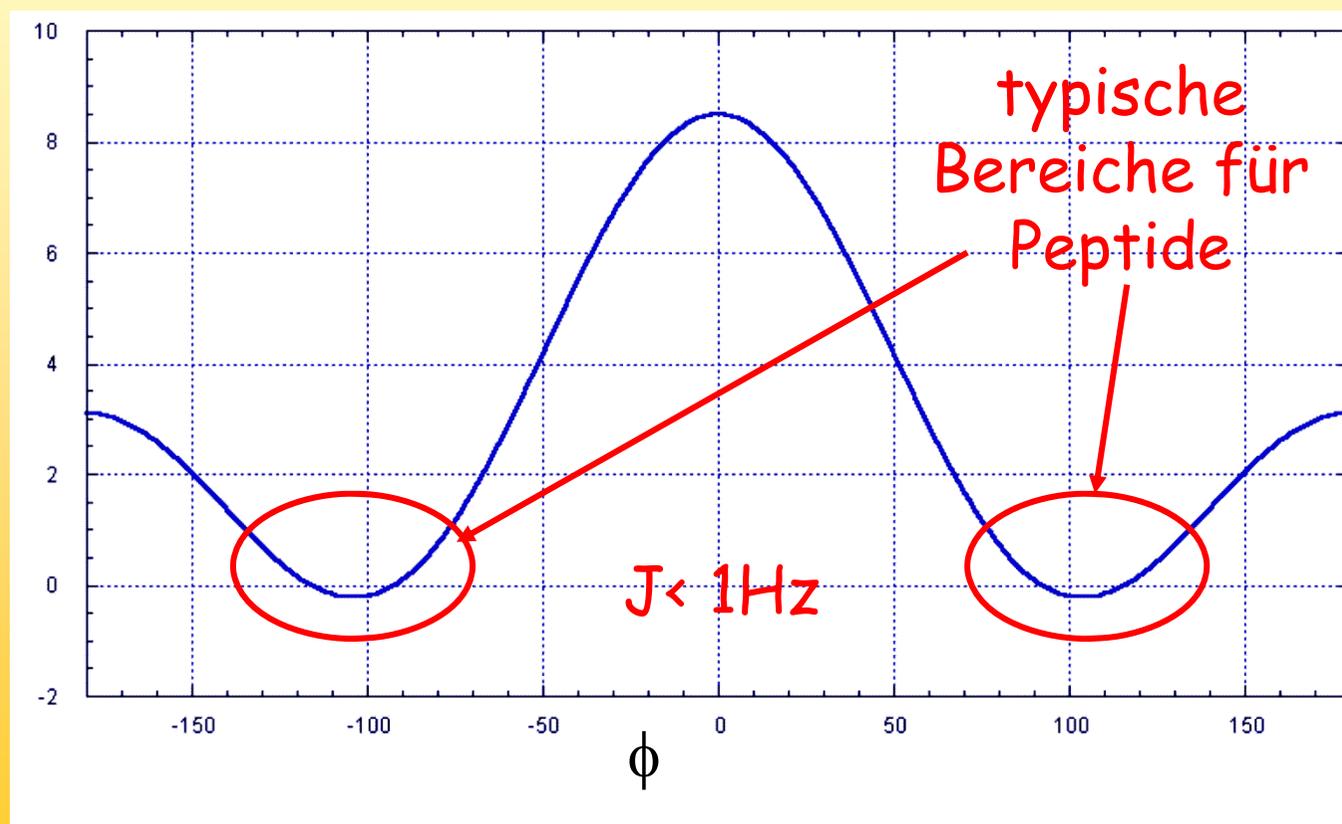
Die Kopplungskonstanten ausgehend vom Aminoproton



Heteronukleare NMR von Peptiden

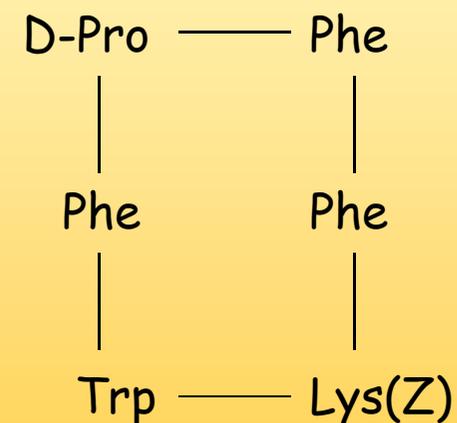
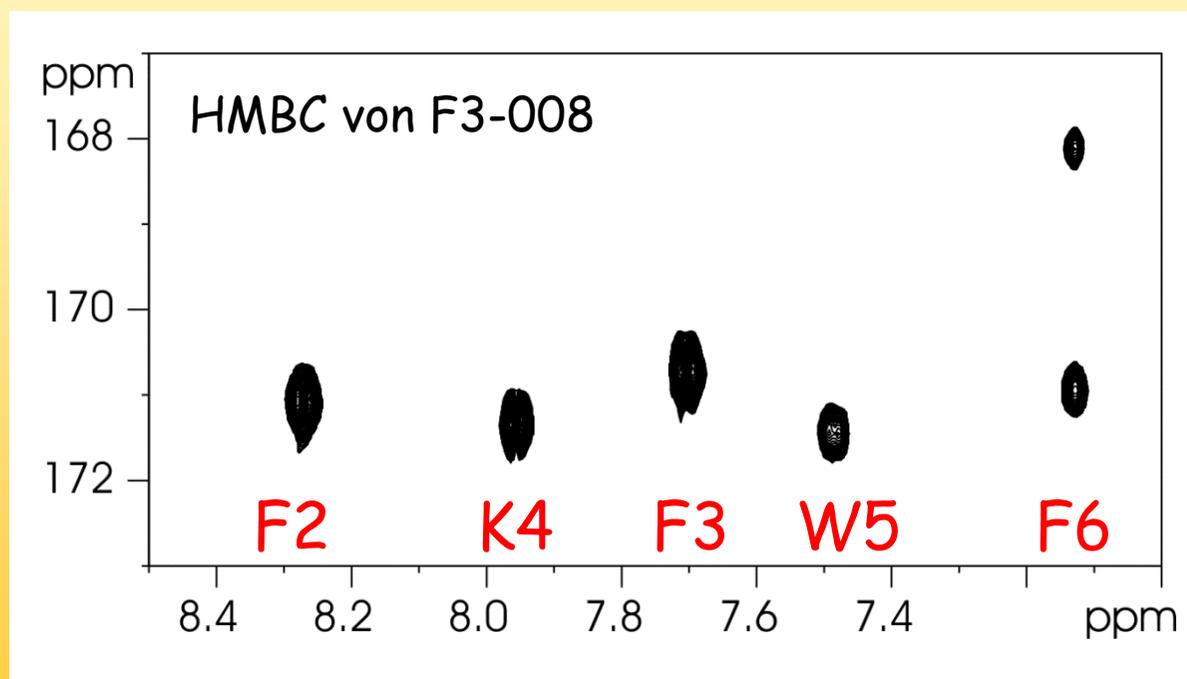
Die Karpluskurve für ${}^3J_{\text{HNCO}}$ hat die Gleichung

$${}^3J_{\text{HNCO}} = 5.7 \cos^2(\phi - 180) - 2.7 \cos(\phi - 180) + 0.1$$



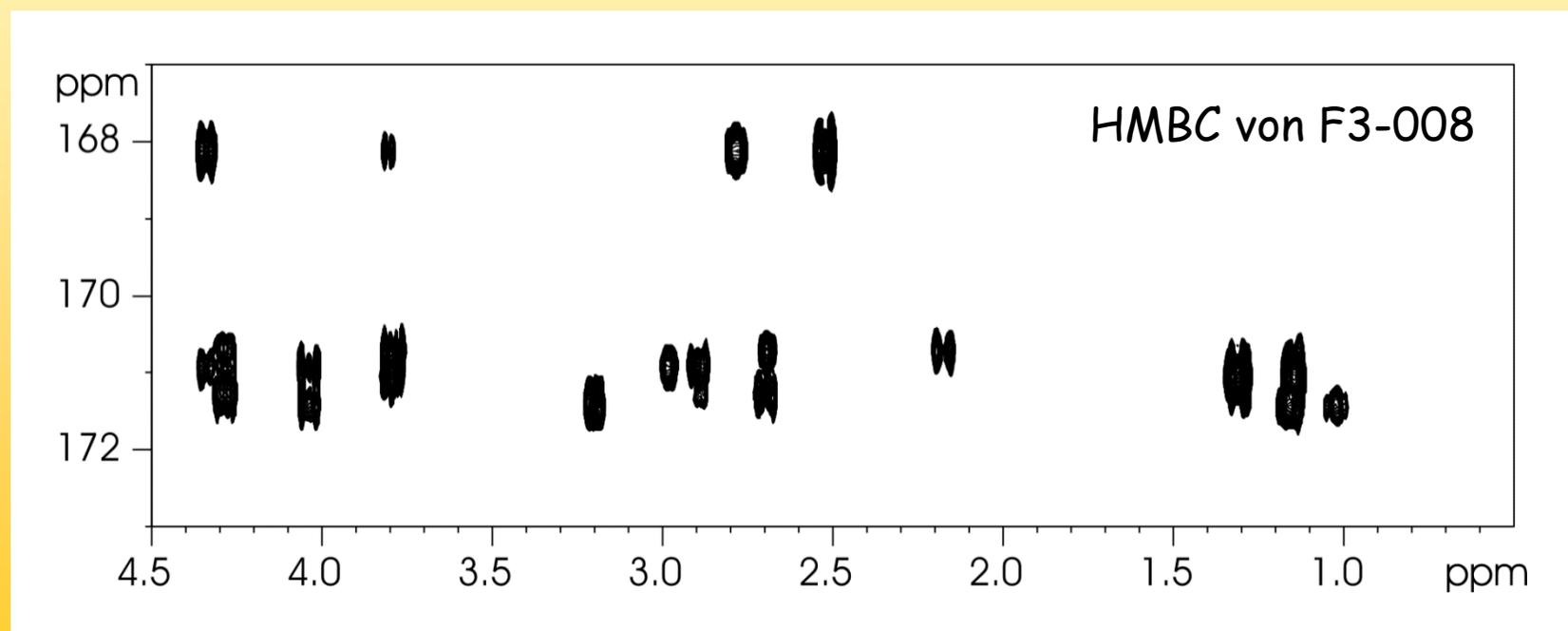
Heteronukleare NMR von Peptiden

Der Bereich der Aminoprotonen sieht dann so aus, alle Korrelationen via 2J sind zu sehen, nur eine via 3J , die kommt von F6.



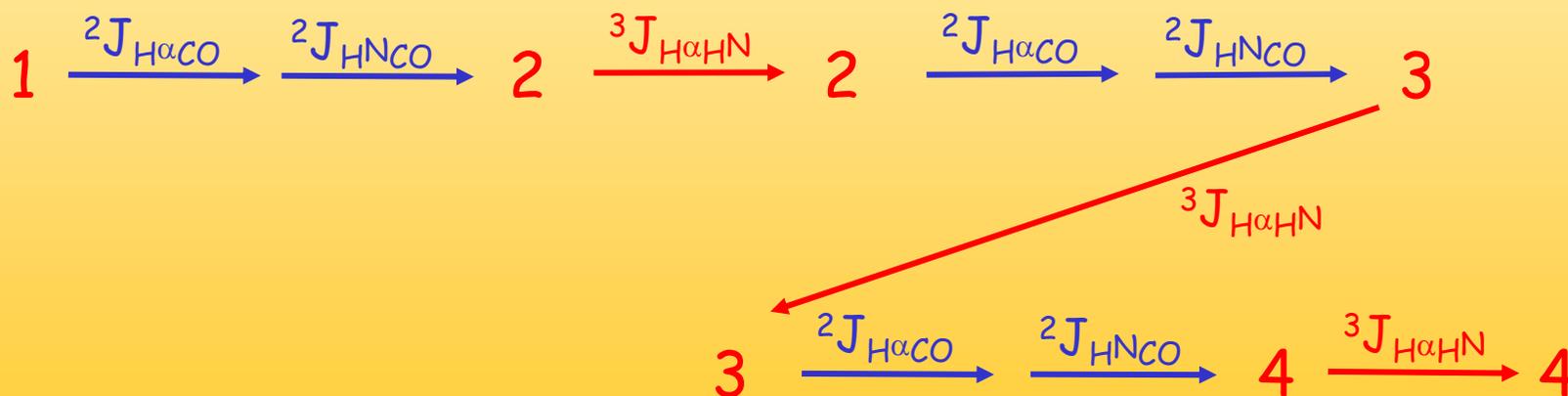
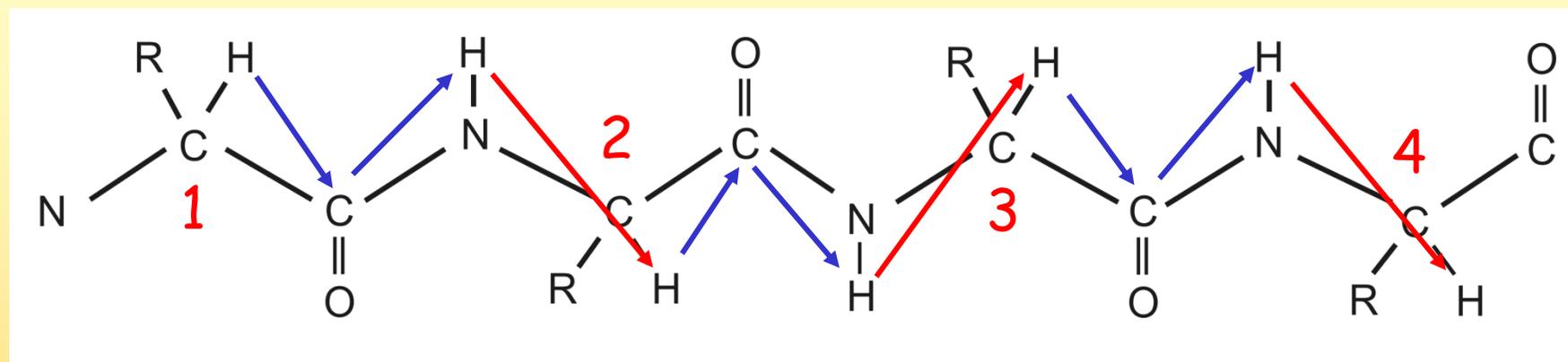
Heteronukleare NMR von Peptiden

Der Bereich der aliphatischen Protonen sieht dann so aus, alle H^α außer K4 zeigen 2 Korrelationen, es ist auch für jedes H^β eine Korrelation zu sehen, damit kann man die Carbonyle eindeutig einer Aminosäure zuordnen.



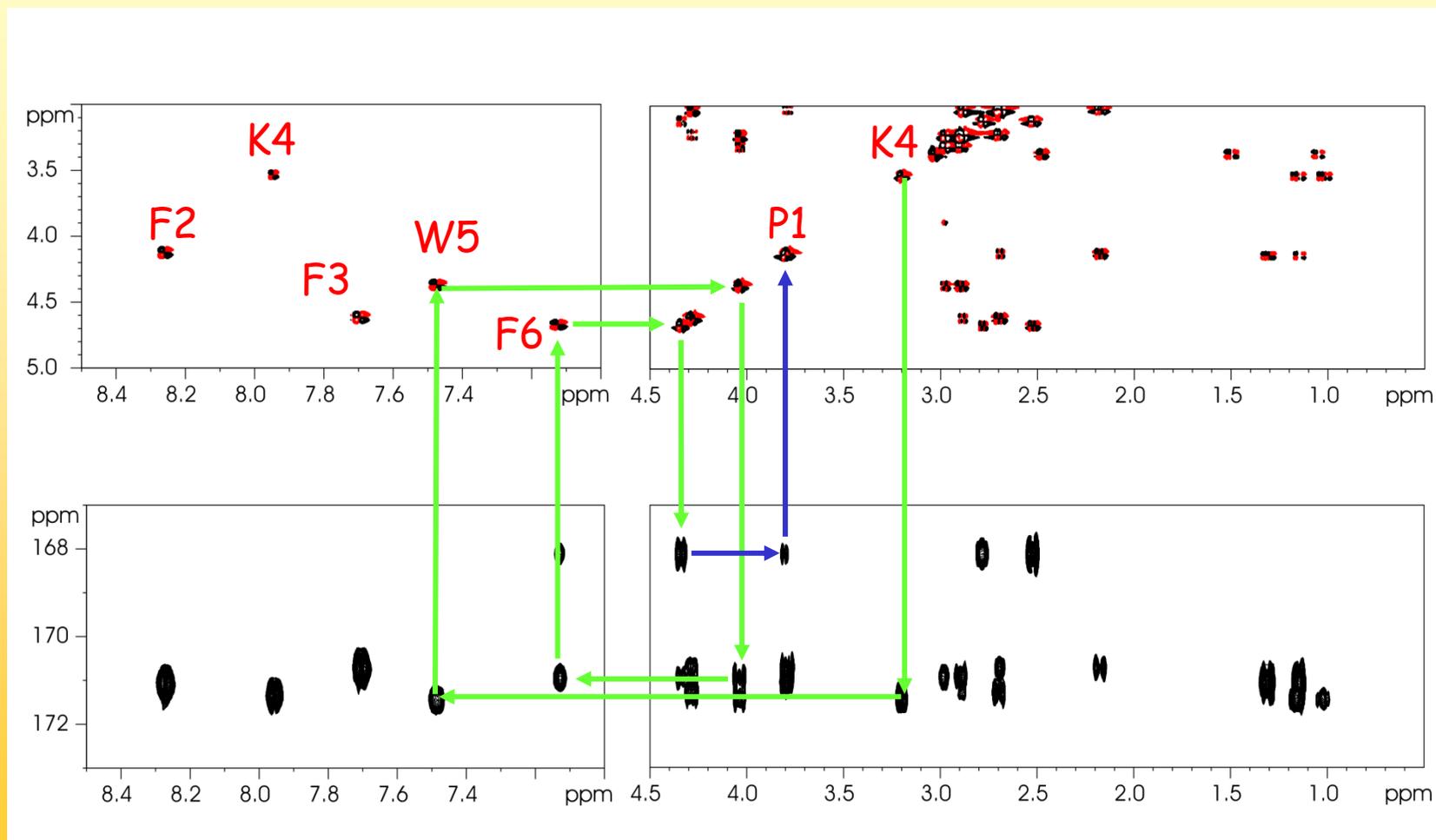
Heteronukleare NMR von Peptiden

Damit ergibt sich ein neuer „sequential walk“



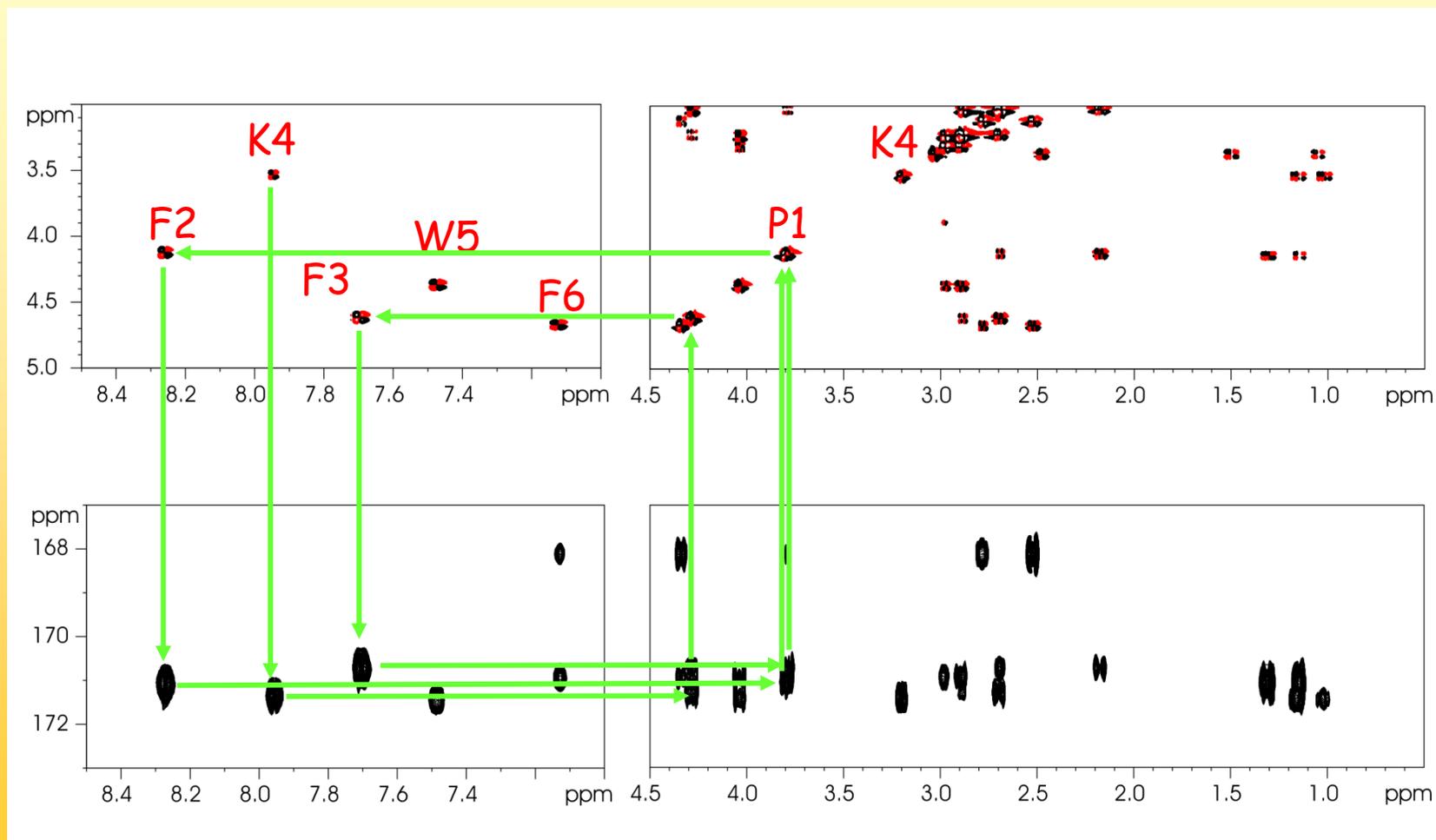
Heteronukleare NMR von Peptiden

Mit richtigen Spektren sieht das so aus:



Heteronukleare NMR von Peptiden

Von K4 in die andere Richtung



Bestimmung der 3D-Struktur

Bestimmung der 3D-Struktur

Ist die Zuordnung der Resonanzen abgeschlossen, ist damit aber die Raumstruktur des Peptides noch nicht bekannt. Hierzu ist die Extraktion von strukturgebender Information aus den NMR-Spektren notwendig.

Die ist aus drei Parametern erhältlich:

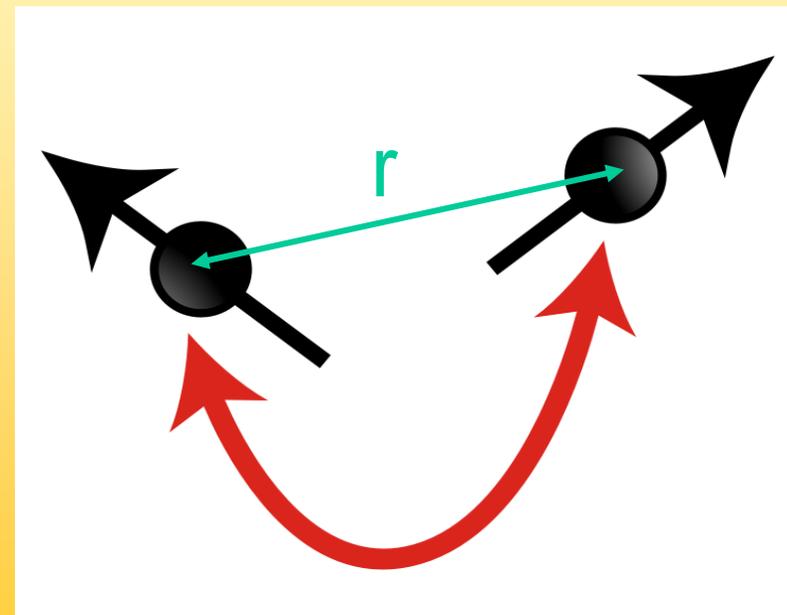
1. NOE-Effekten
2. skalaren Kopplungen
3. chemischen Verschiebungen

Bestimmung der 3D-Struktur

Den **NOE**-Effekt haben wir schon kennen gelernt
(**N**uclear **O**verhauser **E**nhancement Effekt)

$$I(\text{NOE}) \sim 1/r^6$$

Wegen des schnelle
Abfalls mit r^6 können nur
Abstände bis 400 pm,
manchmal 500 pm
bestimmt werden



Bestimmung der 3D-Struktur

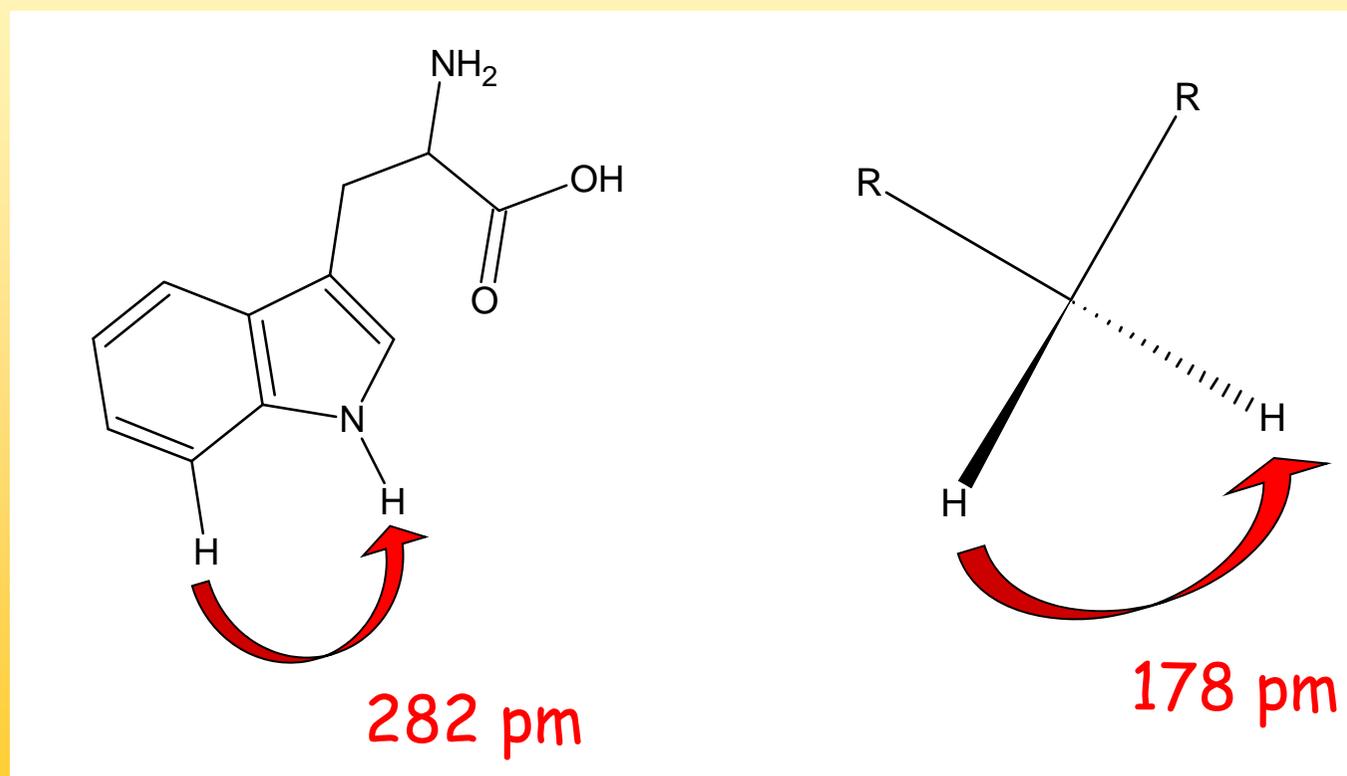
Abstände innerhalb des Moleküls sind zur Intensität der Kreuzsignale proportional. Allerdings lassen sich die Abstände nicht absolut bestimmen, sondern nur durch interne Kalibrierung. Dazu braucht man NOE-Effekte von bekannten Abständen.

Dann kann man die unbekannt Abstände durch Vergleich der Intensitäten ermitteln.

$$\frac{I_{\text{eich}}}{I_{\text{dist}}} = \frac{r_{\text{dist}}}{r_{\text{eich}}} \quad r_{\text{dist}} = r_{\text{eich}} \frac{I_{\text{eich}}}{I_{\text{dist}}}$$

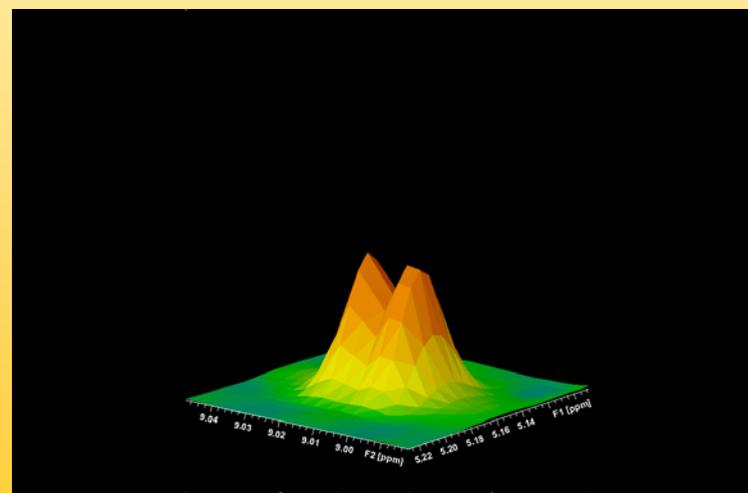
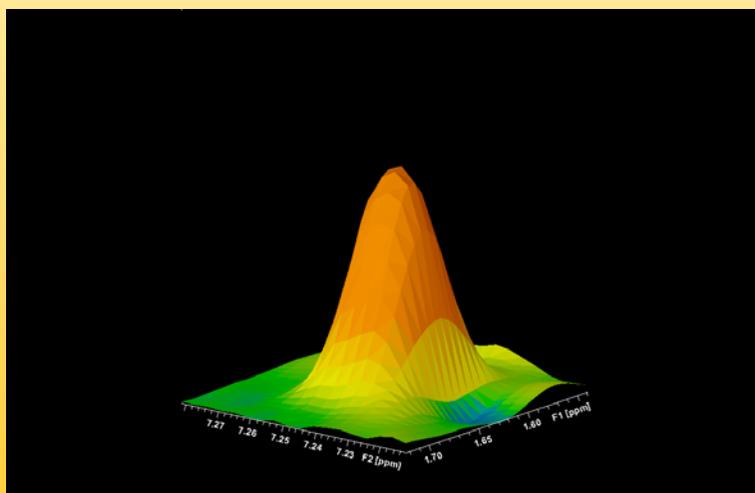
Bestimmung der 3D-Struktur

Als Eichabstände eignen sich der Indol-Ring von Tryptophan oder zwei geminale Protonen.



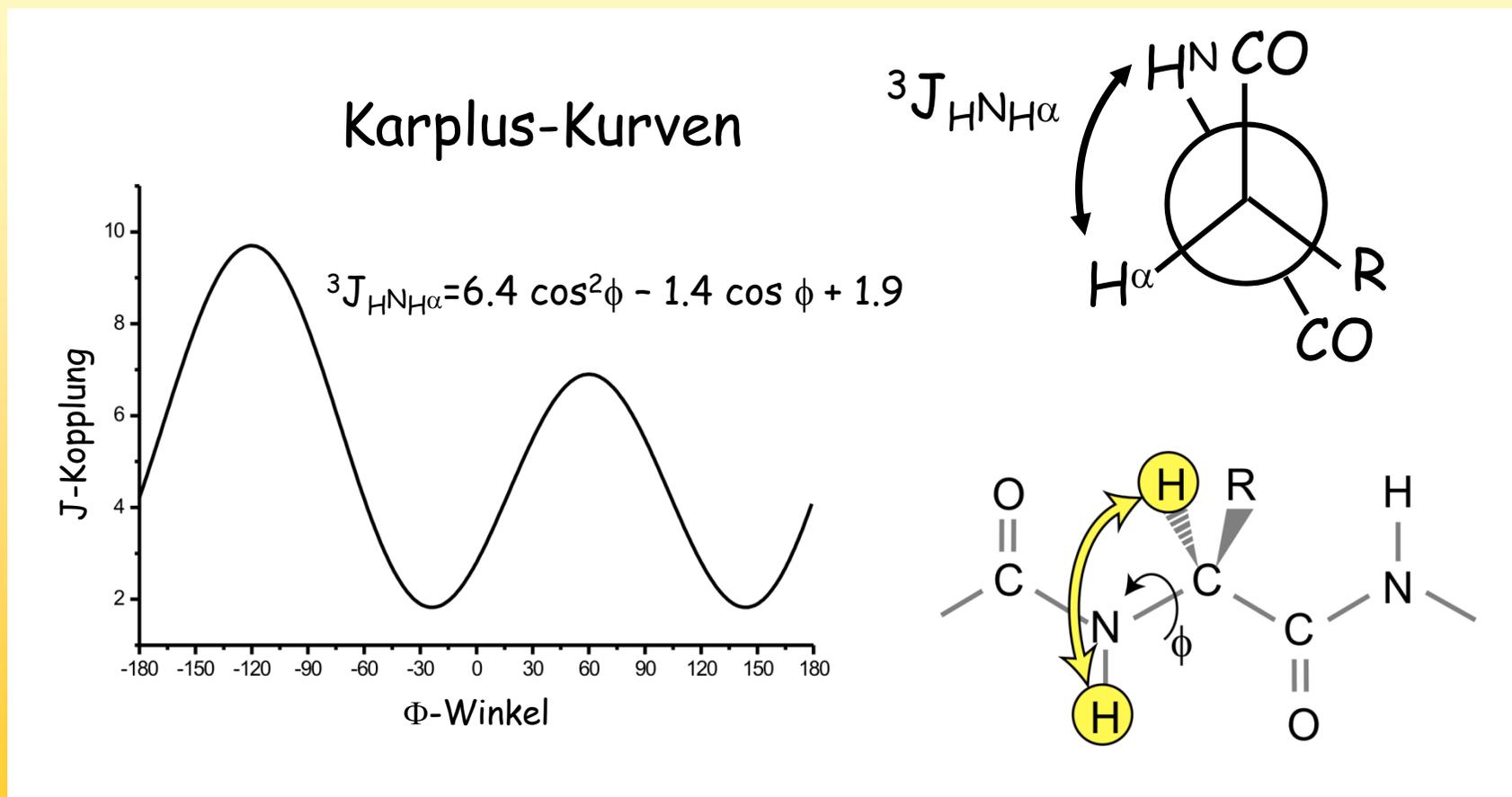
Bestimmung der 3D-Struktur

Die Intensität der Signale wird dabei durch Volumenintegration bestimmt, ganz analog den eindimensionalen Spektren, bei denen die Fläche unter der Kurve der Intensität entspricht.



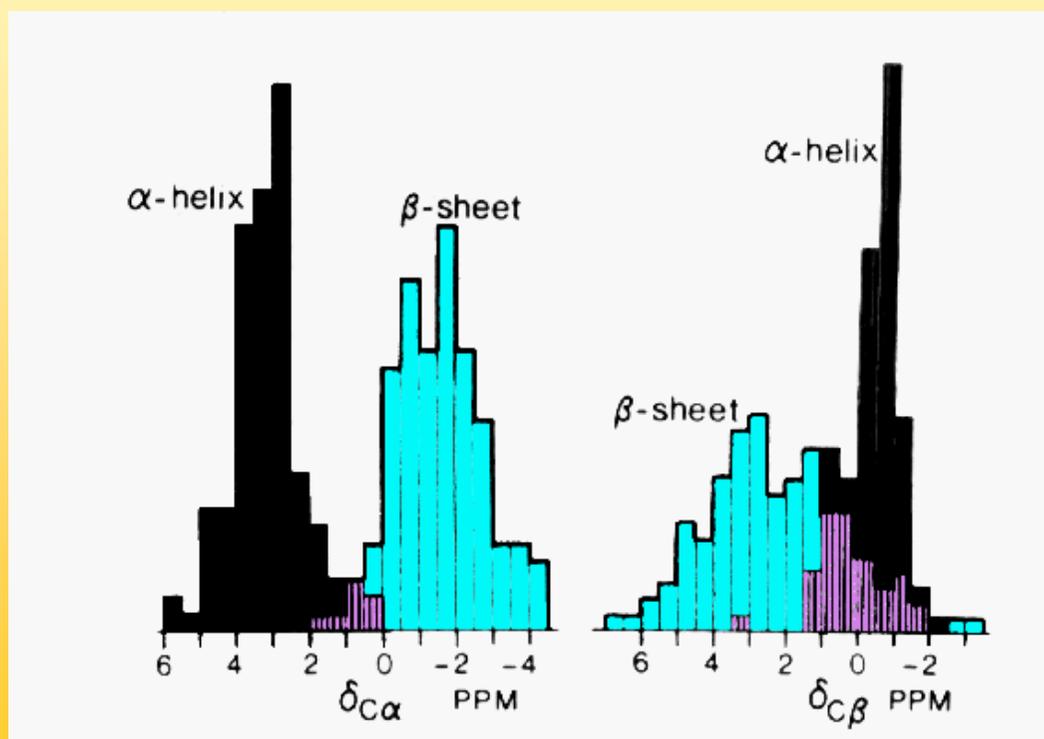
Bestimmung der 3D-Struktur

Dihedralwinkel kann man aus J- Kopplungen erhalten:



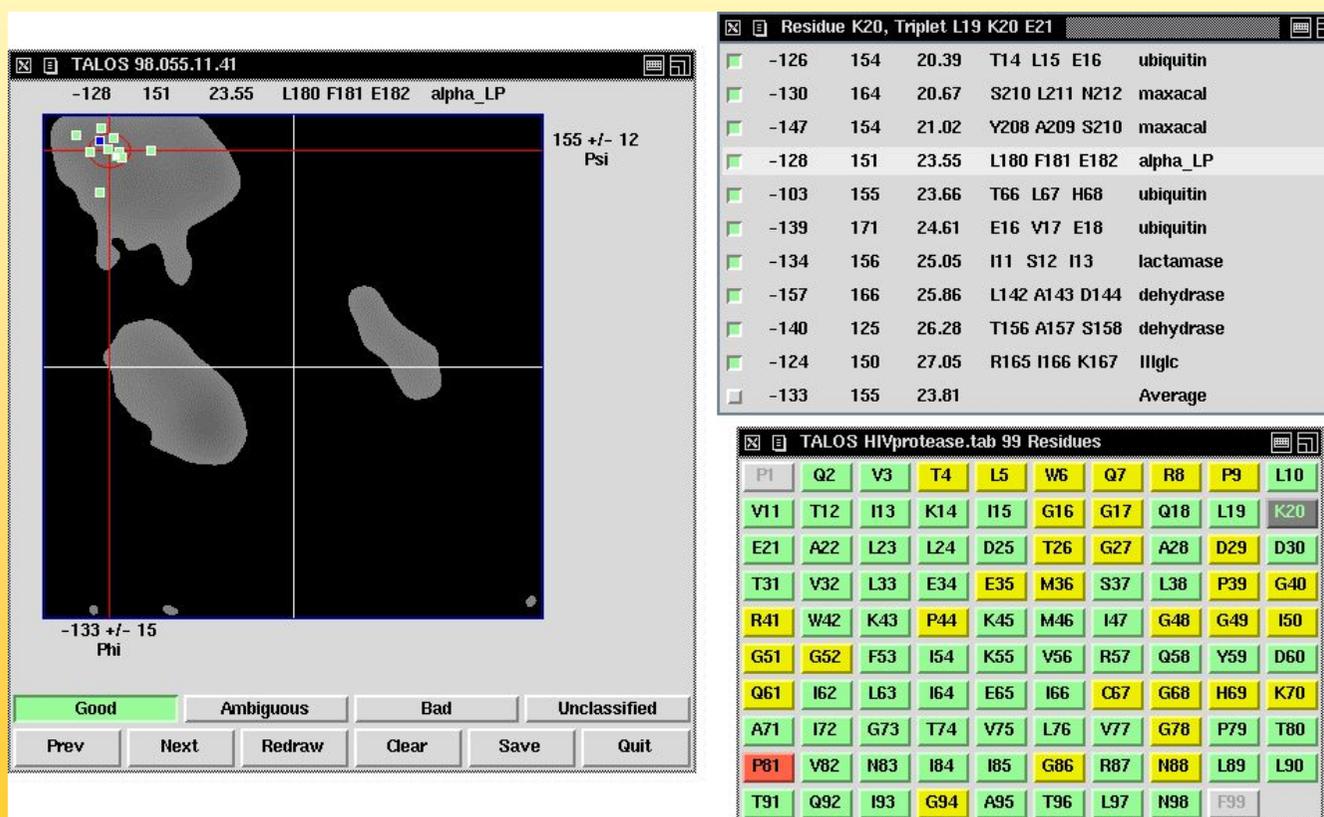
Bestimmung der 3D-Struktur

Aber auch chemische Verschiebungen enthalten Strukturinformation. Der Zusammenhang ist zuerst für die Werte von C^α und C^β aufgefallen.



Bestimmung der 3D-Struktur

Mithilfe einer Datenbank und dem Vergleich eines Satzes von zugeordneten Proteinen mit den dazu gehörigen Röntgenstrukturen kann man die chemischen Verschiebungen auch in quantitative Information umsetzen



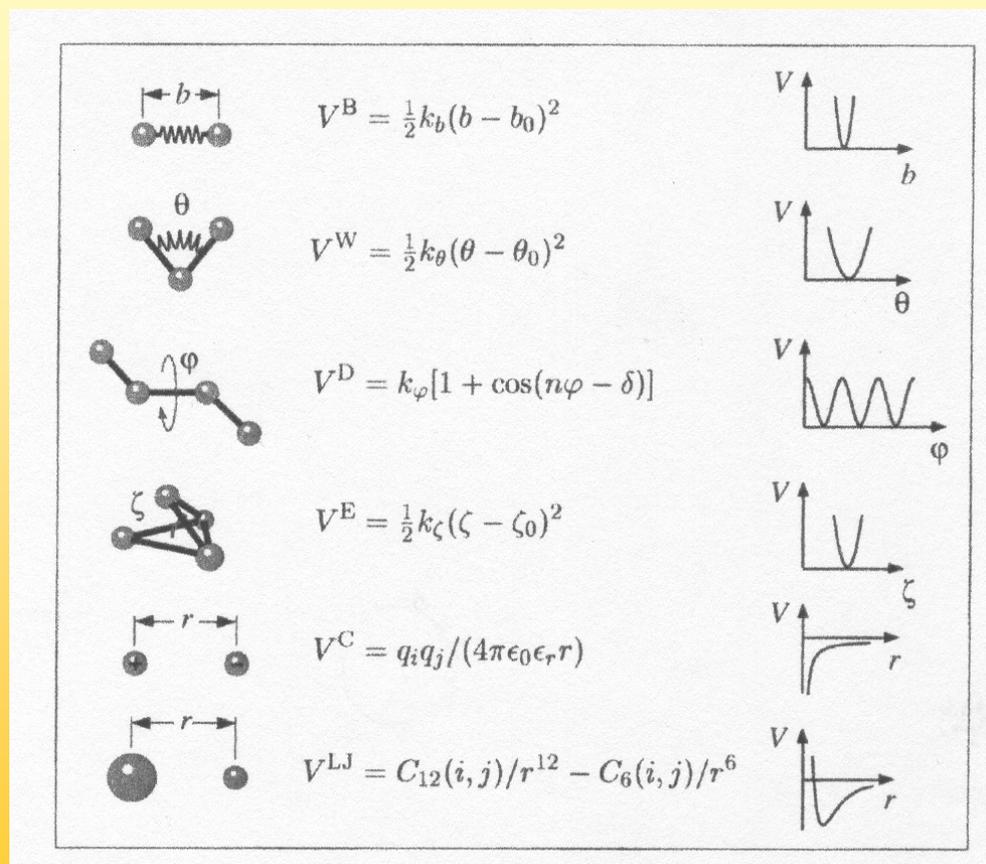
Bestimmung der 3D-Struktur

Die gewünschte Struktur erhält man nun, indem man die Peptidkette so anordnet, dass alle durch die Experimente erhaltenen Vorgaben gleichzeitig erfüllt sind.

In Anbetracht der vielen Freiheitsgrade ist das nur mit der Hilfe eines Computers möglich. Dabei wird im allgemeinen so vorgegangen, dass eine Molekulardynamik-Simulation durchgeführt wird und die experimentellen Parameter als Randbedingungen zum Kraftfeld hinzugefügt werden.

Bestimmung der 3D-Struktur

Elemente eines Kraftfeldes



Abstände

Tetraederwinkel

Dihedralwinkel

Coulombwechselwirkung

Lennard-Jones

Bestimmung der 3D-Struktur

Zu den „chemischen“ Elemente eines Kraftfeldes kommen noch die experimentellen hinzu, mit entsprechender Gewichtung:

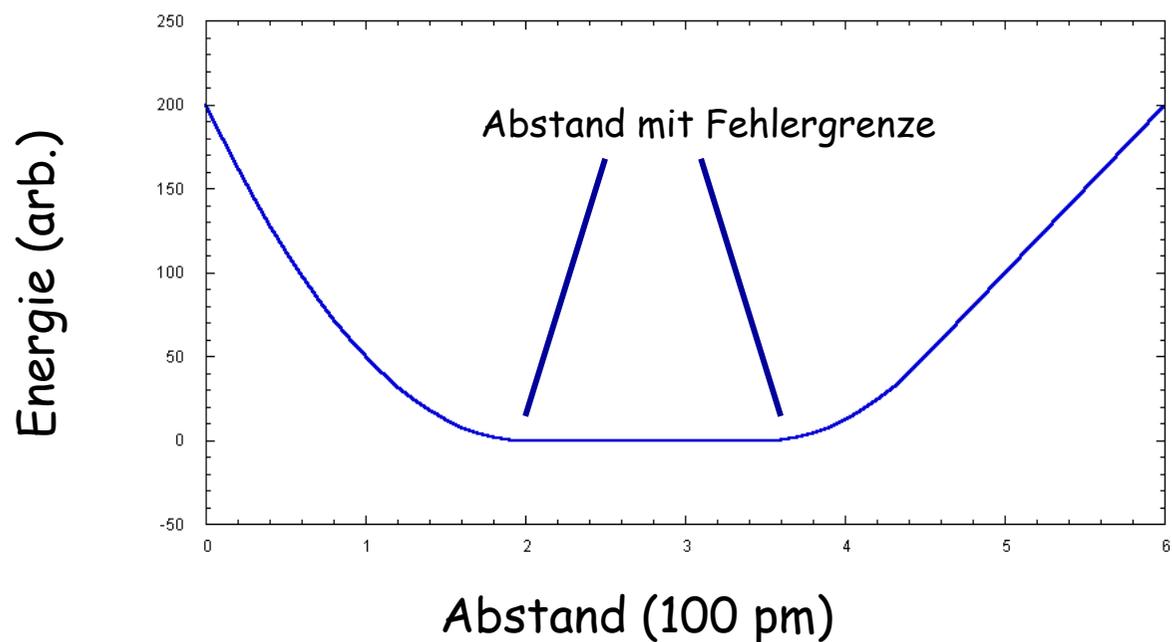
$$V_{\text{chem}} = V^B + V^W + V^D + V^E + V^C + V^{LJ}$$

$$V_{\text{param}} = V^{\text{NOE}} + V^J + V^{\text{shift}}$$

$$V = V_{\text{chem}} + W_{\text{param}} * V_{\text{param}}$$

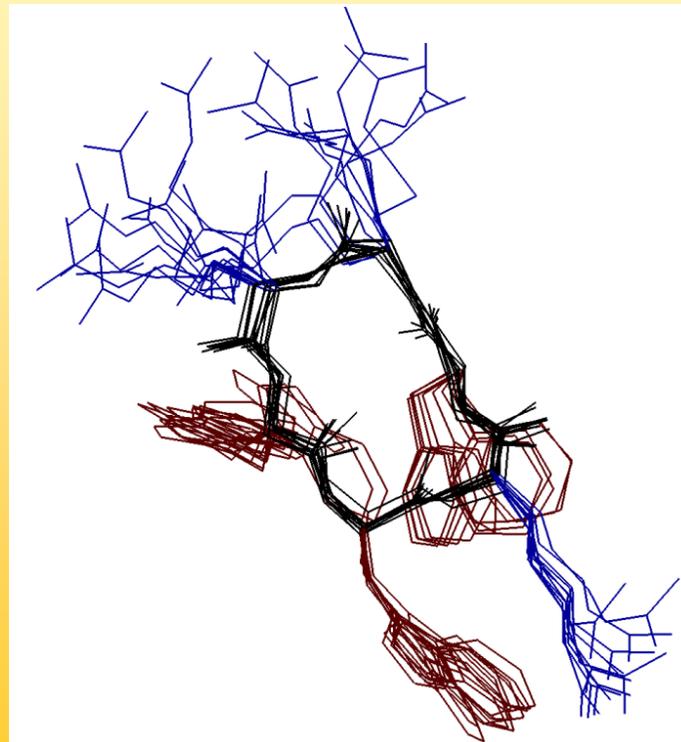
Bestimmung der 3D-Struktur

Das experimentelle Potential für Abstände aus NOES wird so eingeführt:



Bestimmung der 3D-Struktur

Am Ende steht dann die dreidimensionale Struktur des Peptides.



That's it

Fragen: schmieder@fmp-berlin.de

Scripte:

schmieder.fmp-berlin.info/teaching/vorlesung_mbph/vorlesung_mbph_scripte.htm