

„Molekulare Biophysik“

NMR-Spektroskopie
(Teil 6)



NMR an großen Proteinen

NMR an großen Proteinen

Wenn die Größe der Proteine weiter zunimmt, wird es aber auch mit den bislang gezeigten Tripelresonanzexperimenten immer schwieriger.

Zum einen wird die Zahl der Signale immer größer ohne das die Dispersion der Signale sich ändert.

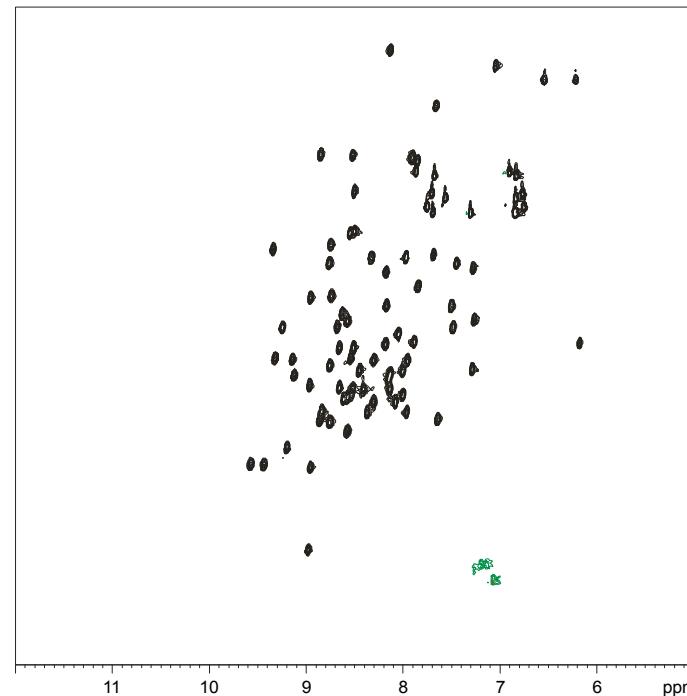
Zum anderen wird die Relaxation der involvierten Kerne immer effizienter, dadurch wird die Linienbreite immer größer und der Transfer von Magnetisierung wird immer schwächer bei gleichbleibender Länge der Wartezeiten (da sich die Kopplungen nicht ändern)



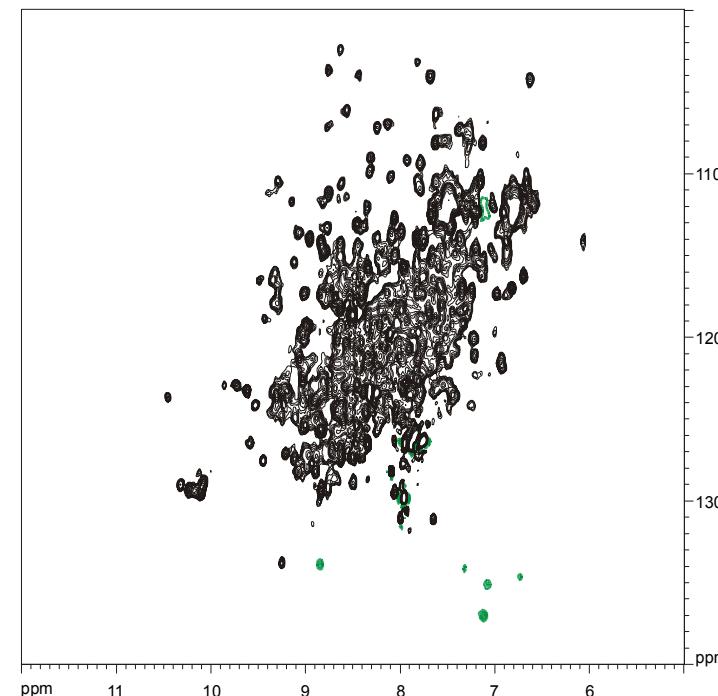
NMR an großen Proteinen

Die Zahl der Signale nimmt zu

Ubiquitin (76 aa)

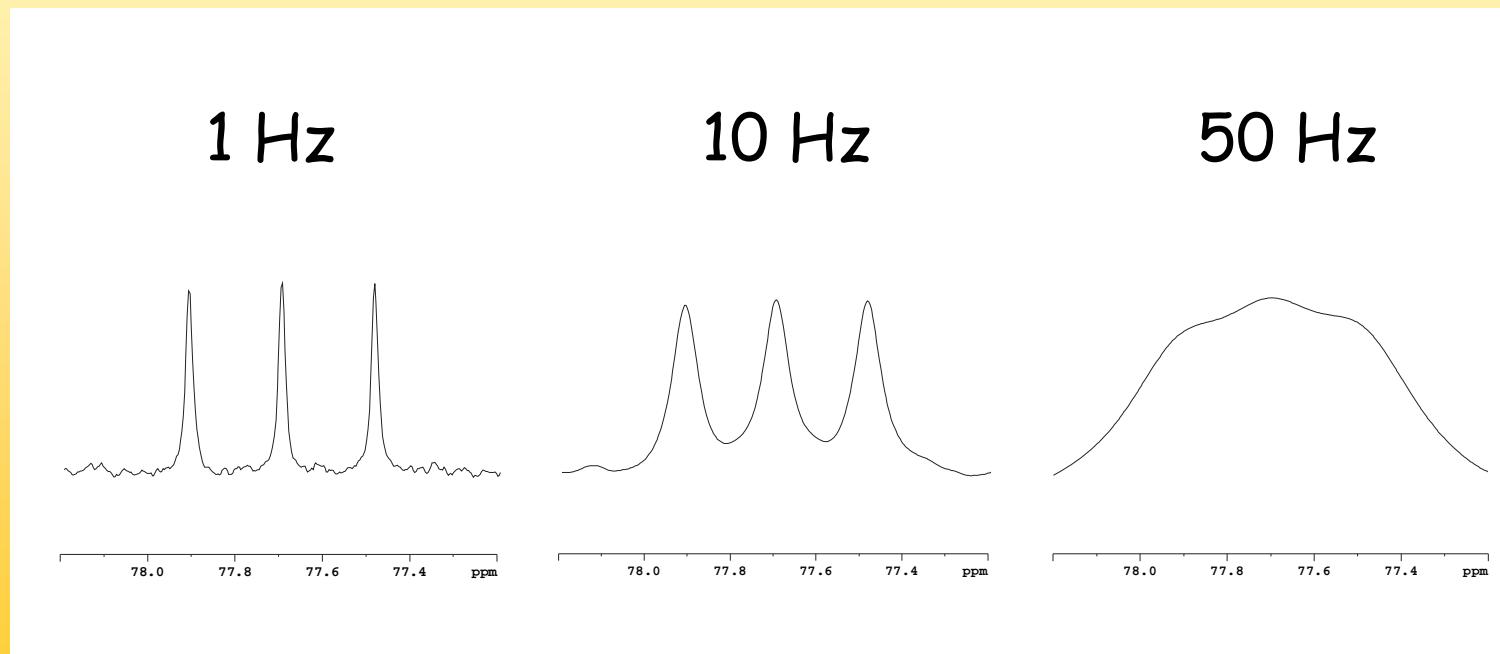


Cph1- Δ 2 (514 aa)



NMR an großen Proteinen

Die Linien werden breiter, das sorgt für mehr Überlagerung und für ineffizienteren Magnetisierungstransfer



NMR an großen Proteinen

Während man gegen die zunehmende Zahl der Signale nur wenig tun kann, kann man sich überlegen wie man die zunehmende Relaxation zurückdrängt. Dazu gibt es zwei Vorgehensweisen, die man sowohl unabhängig als auch gemeinsam nutzen kann:

Deuterierung

TROSY

NMR an großen Proteinen

Die Hauptquelle der Relaxation ist für die involvierten Kerne unterschiedlich

Protonen (${}^1\text{H}$)

andere Protonen

Kohlenstoff (^{13}C)

das direkt gebunden Proton

Stickstoff (¹⁵N)

das direkt gebunden Proton

Wobei der Unterschied zwischen Stickstoff und Kohlenstoff gebundenen Protonen die Austauschbarkeit mit dem Wasser ist

NMR an großen Proteinen

Wir haben gesehen das viele der Experimente die wir bislang gesehen haben mit dem H^N beginnen und es auch detektieren. Das macht man sich zu nutze:
Die Proteine werden deuteriert (in D_2O) hergestellt und erst am Ende in H_2O überführt wo nur die austauschbaren Protonen (hauptsächlich die H^N) zurücktauschen. Damit sind um die H^N -Protonen nur noch wenige andere Protonen und der Hauptrelaxationspartner der Kohlenstoffe ist weg

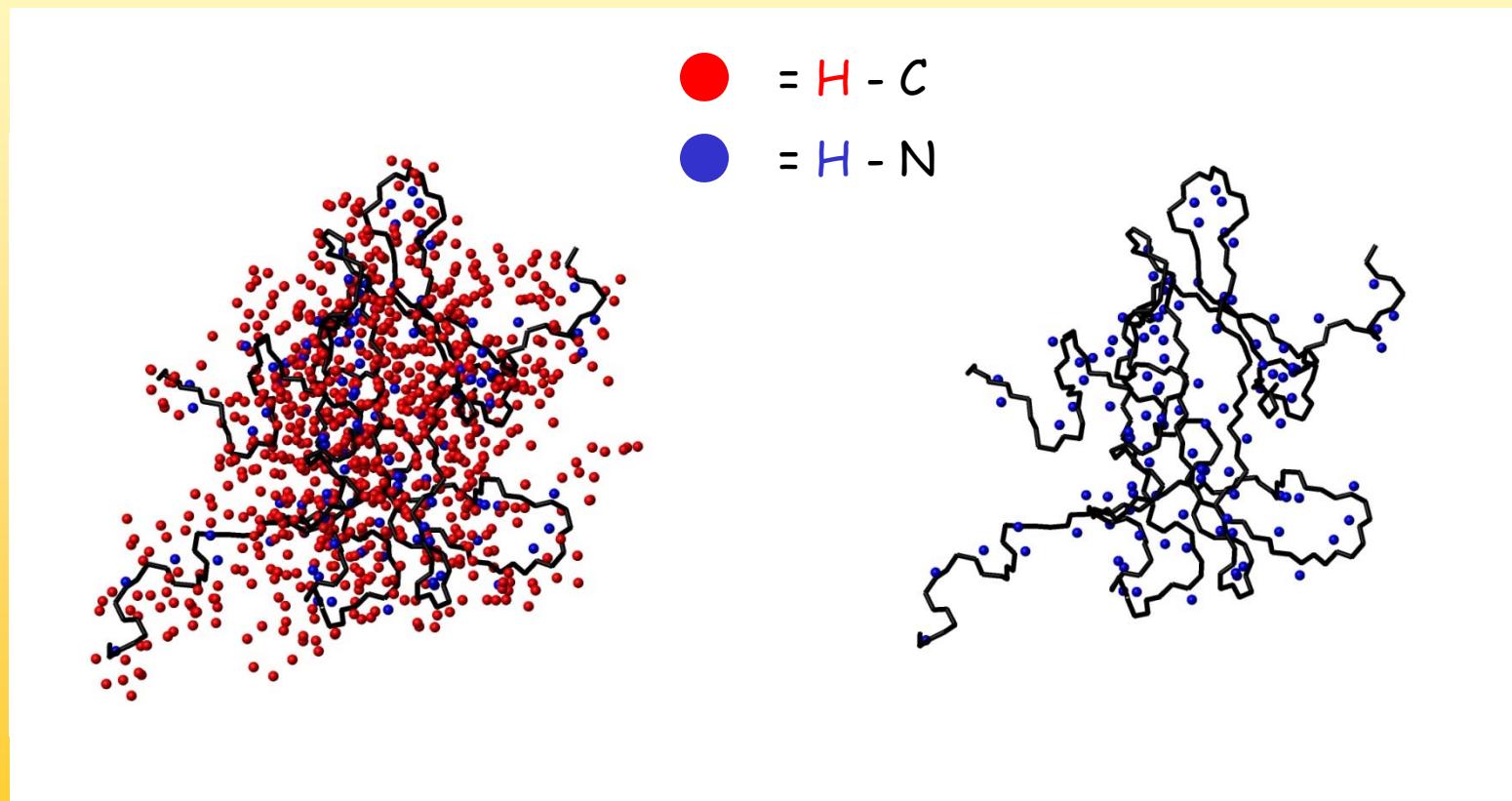


NMR an großen Proteinen

Deuterierung

"normales" Protein

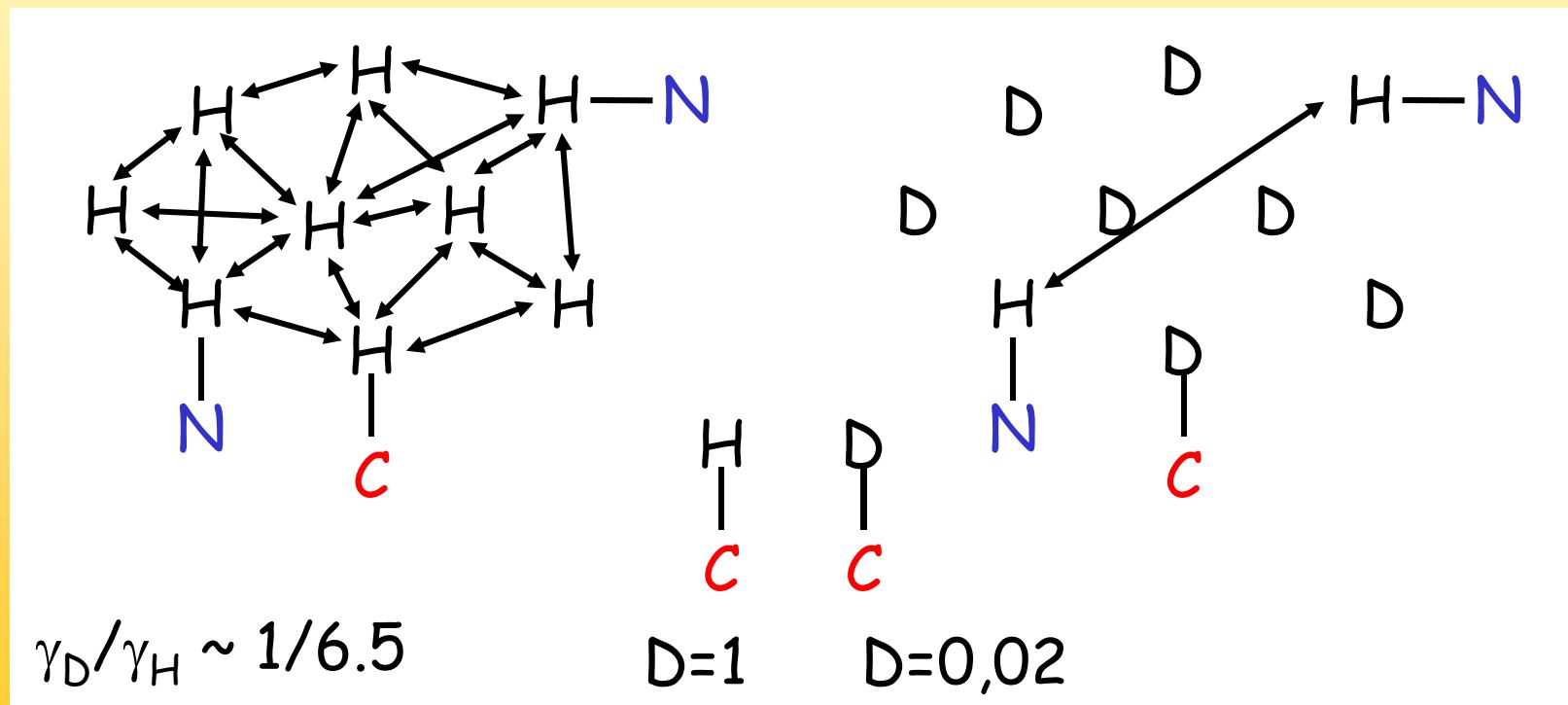
deuteriertes Protein



NMR an großen Proteinen

Deuterierung

Protonenspins werden verdünnt, die C-H-Wechselwirkung entfernt



NMR an großen Proteinen

Jetzt bleiben noch die Stickstoffkerne, die ihren Hauptrelaxationspartner noch haben. Beim

TROSY

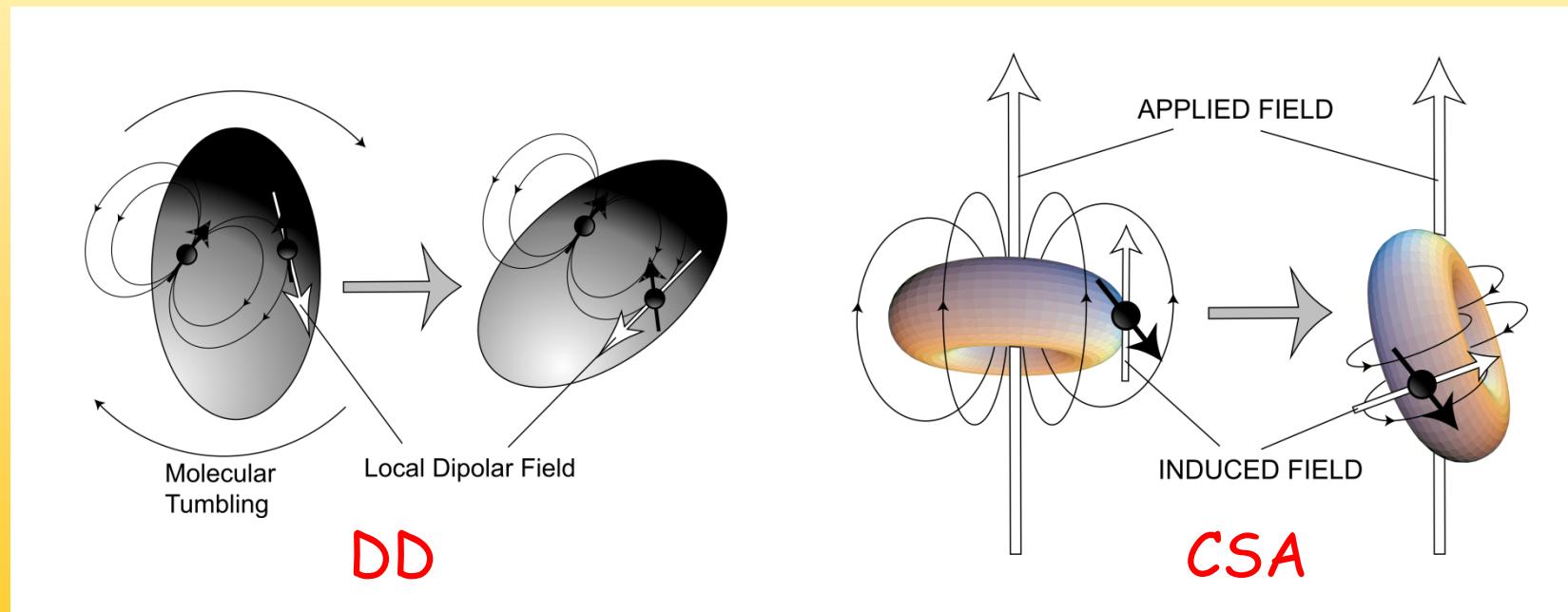
(Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)

werden nun unterschiedliche Relaxationseffekte genutzt um die Linien von Stickstoff und H^N zu verbessern



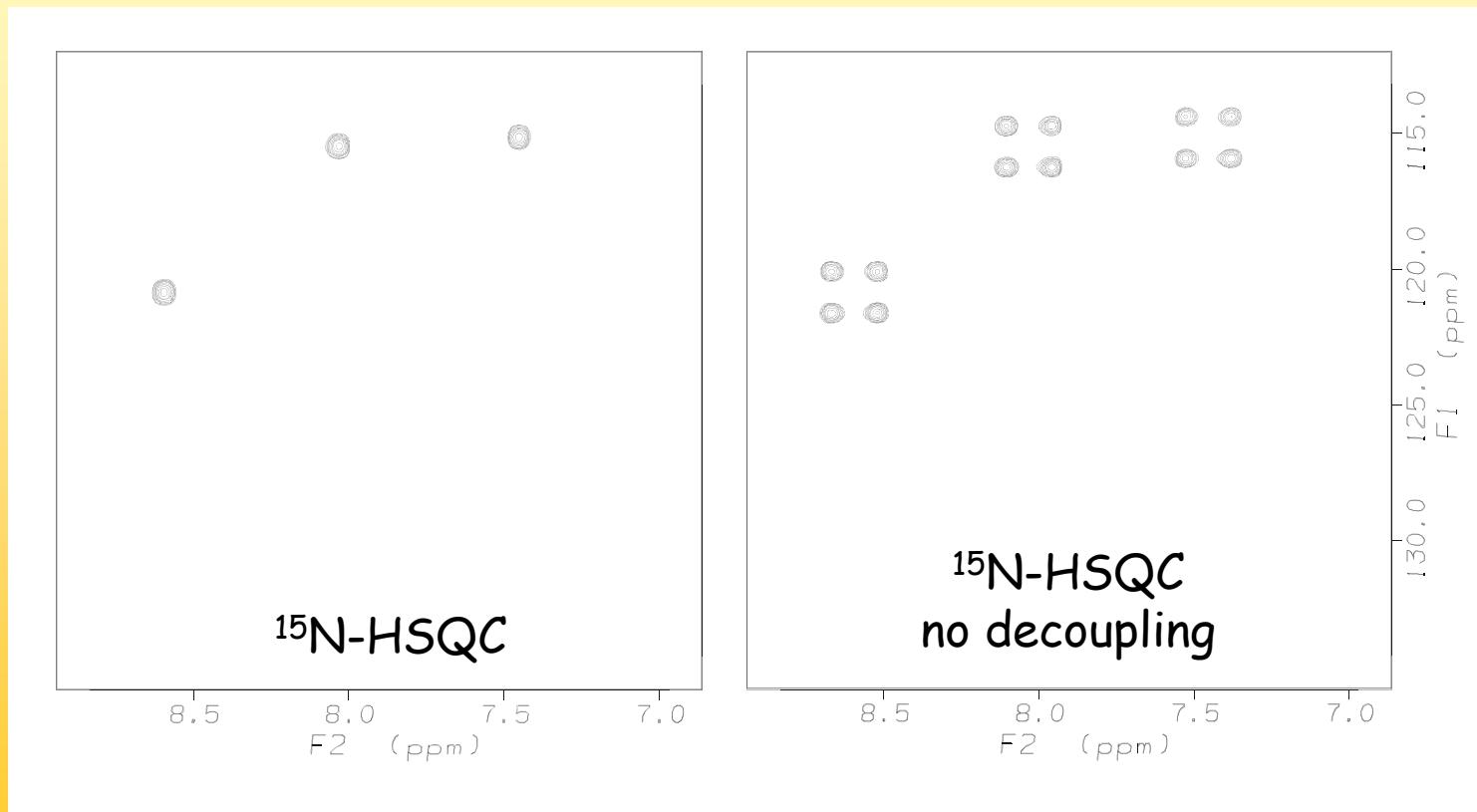
NMR an großen Proteinen

Zwei der wichtigsten Relaxationsmechanismen haben wir zu Beginn kennen gelernt, die Dipol-Dipol-Wechselwirkung (DD) und die chemical-shift-anisotropie (CSA). Beide Mechanismen können sich gegenseitig beeinflussen.



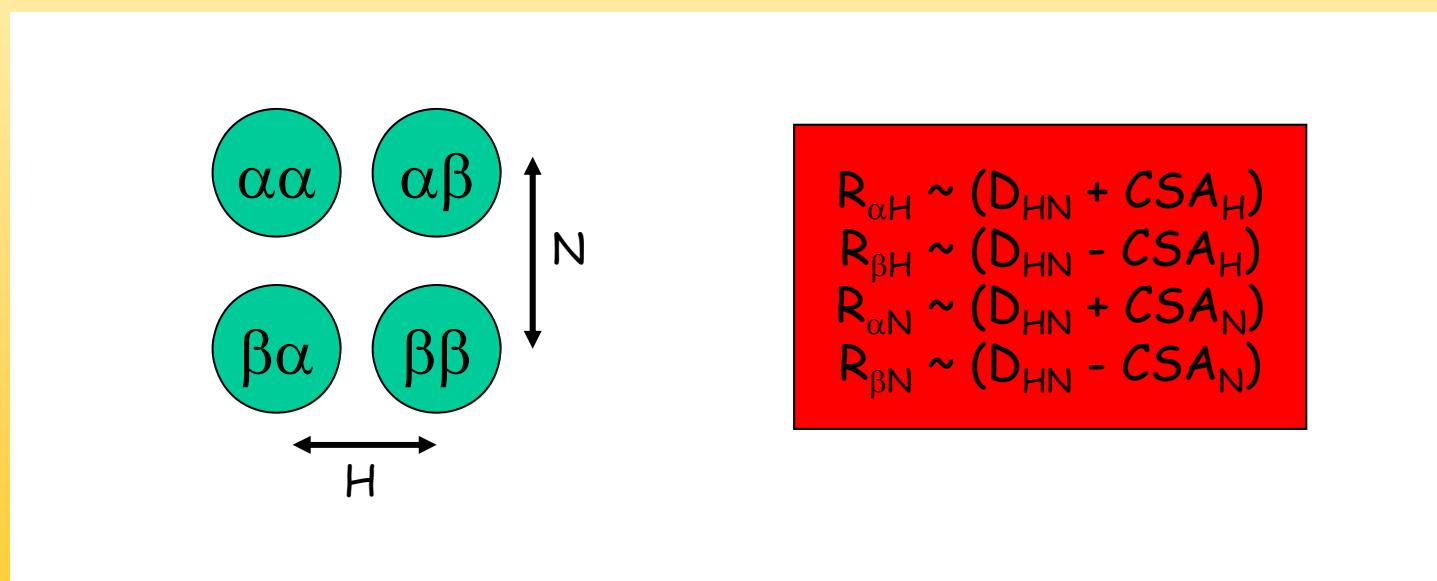
NMR an großen Proteinen

Bei kleinen Molekülen ist diese Beeinflussung
nicht leicht zu erkennen



NMR an großen Proteinen

Wir erinnern uns aber, dass den vier Komponenten des Multipletts die beiden unterschiedlichen Spinzustände (α und β) zuzuordnen sind. Es stellt sich heraus, dass die Beeinflussung von CSA und DD bei jeder anders ist.

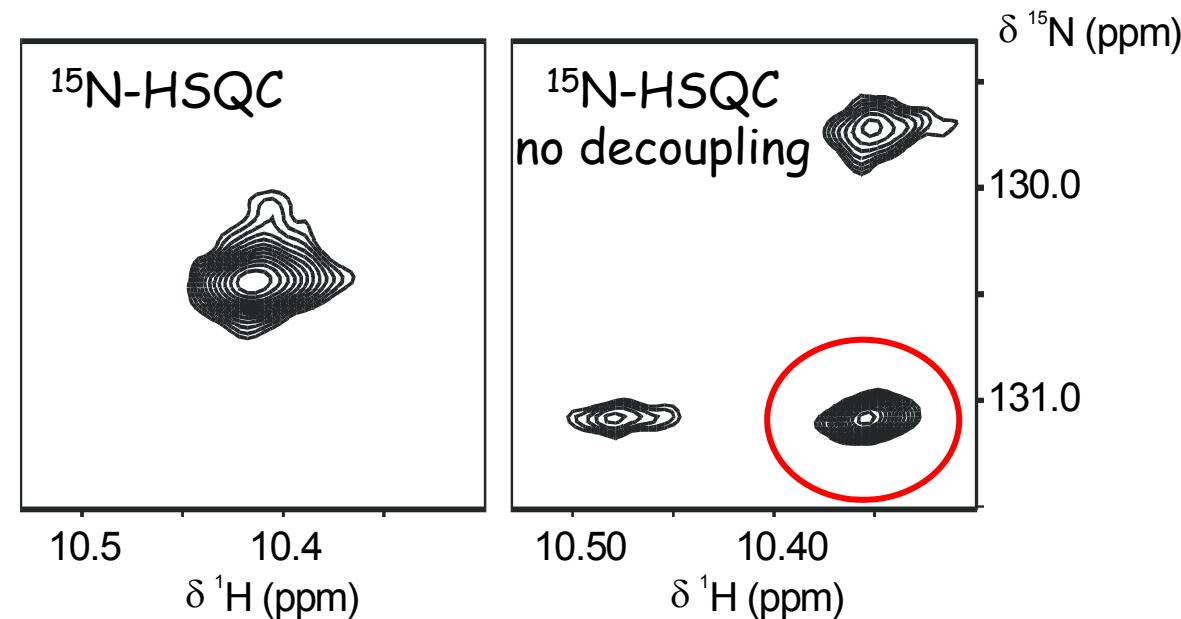


$$\begin{aligned} R_{\alpha H} &\sim (D_{HN} + CSA_H) \\ R_{\beta H} &\sim (D_{HN} - CSA_H) \\ R_{\alpha N} &\sim (D_{HN} + CSA_N) \\ R_{\beta N} &\sim (D_{HN} - CSA_N) \end{aligned}$$



NMR an großen Proteinen

Und bei großen Molekülen ist das dann in der Tat zu sehen, jeweils eine Linie von ^1H und ^{15}N ist schmal, eine der vier Peaks des Multipletts also besonders scharf



NMR an großen Proteinen

Man kann nun berechnen wann der Effekt am größten ist

$$D_{HN} = (1/2\sqrt{2}) \gamma_H \gamma_N \mu (h/2\pi(r_{HN})^3)$$

$$\gamma_H = 2.6 * 10^8 (\text{Ts})^{-1}$$

$$CSA_H = (1/2\sqrt{2}) \gamma_H B_0 \Delta\sigma_H$$

$$\gamma_N = - 2.7 * 10^7 (\text{Ts})^{-1}$$

$$CSA_N = (1/2\sqrt{2}) \gamma_N B_0 \Delta\sigma_N$$

$$\Delta\sigma_H = - 16 \text{ ppm}$$

$$\Delta\sigma_N = - 160 \text{ ppm}$$

$$\Delta\sigma_H / \Delta\sigma_N = \gamma_N / \gamma_H$$

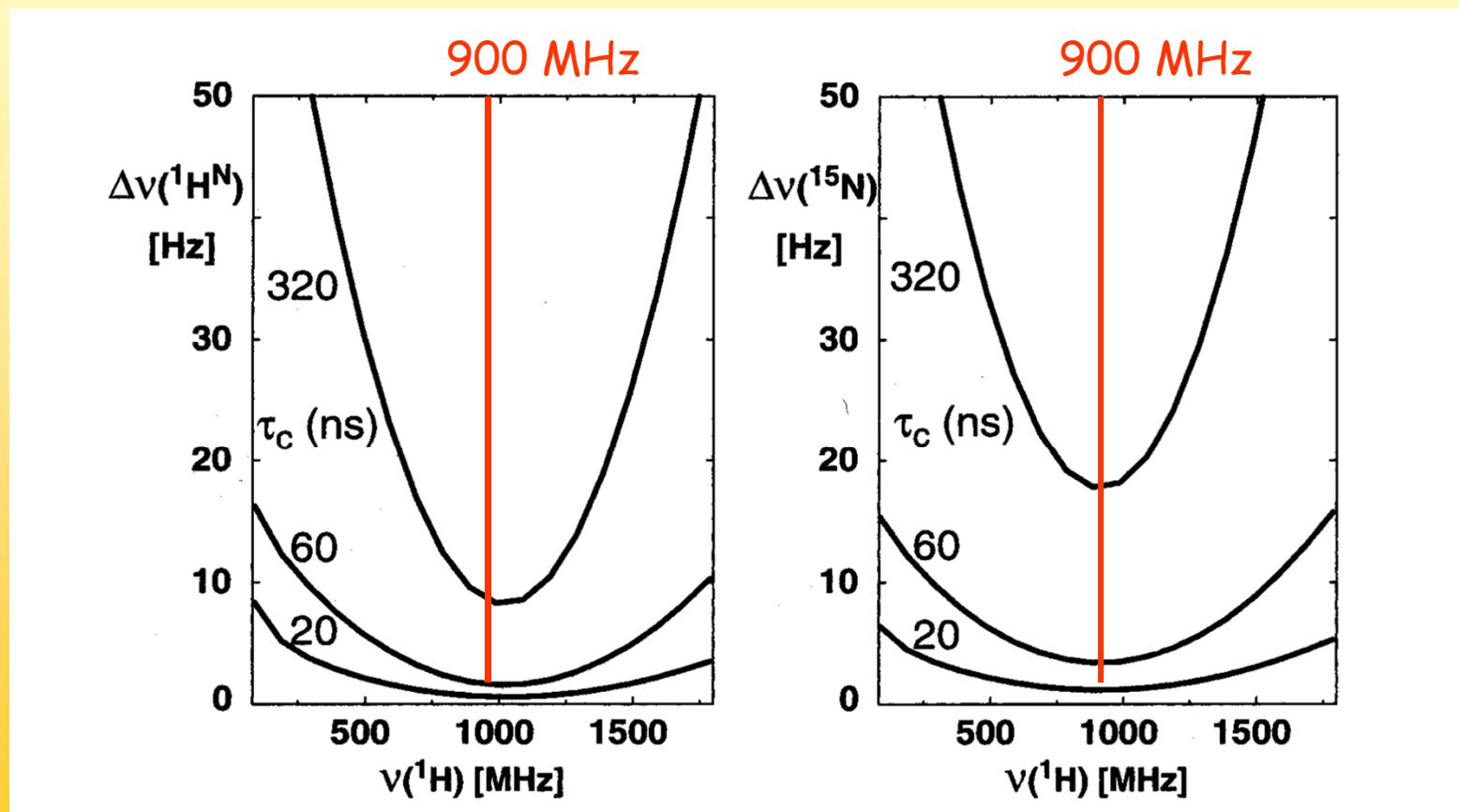
$$(D_{HN} - CSA_N) = (D_{HN} - CSA_H) = 0 \text{ for the same } B_0$$

$$B_0 = 25.6 \text{ T} \sim 1.1 \text{ GHz}$$



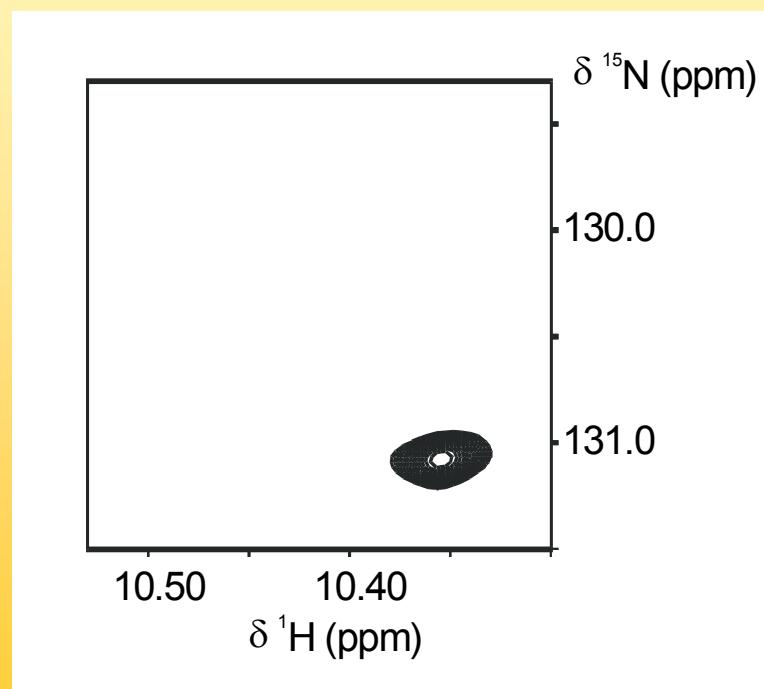
NMR an großen Proteinen

Mit realistischen Annahmen liegt das Maximum nah bei 950 MHz



NMR an großen Proteinen

Am Ende erhält man dann im TROSY scharfe Linien
auch für größere Moleküle



NMR an großen Proteinen

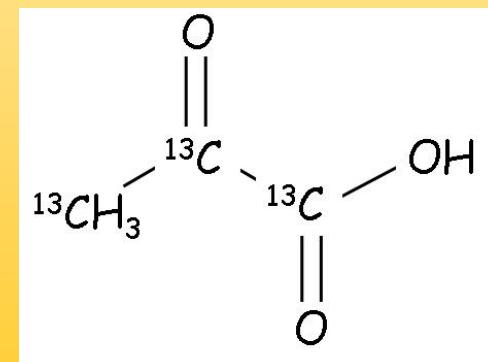
Der Preis für die scharfen Linien der H^N -Kerne war das Deuterieren und damit das Verschwinden aller anderer Wasserstoffkerne. Dadurch kann man kaum noch etwas über die Seitenketten lernen und hat keinen Distanzinformation mehr von NOESY-Spektren.

Eine erste Lösung war die Deuterierung zu 75%, die aber zu Problemen mit Isotopomeren und der Empfindlichkeit geführt hat.

Die bessere Lösung ist **Methyl-Protonierung**.

Das wurde zunächst mit Pyruvat versucht, was aber zu „Scrambling“ führt.

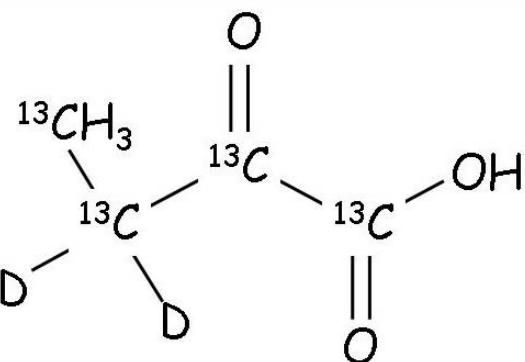
Rosen et al. *J.Mol.Biol.* 263, 627-636 (1996)



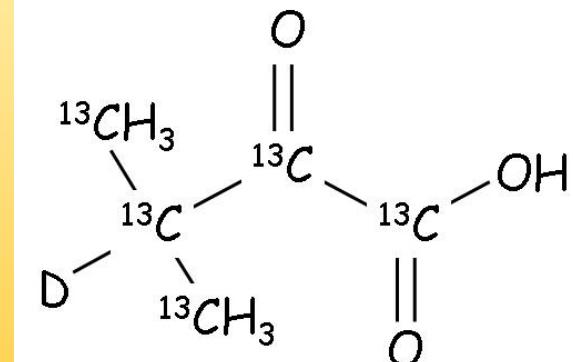
NMR an großen Proteinen

Um das zu vermeiden wurden kompliziertere Vorstufen eingeführt, die Ketosäuren, die einem Minimalmedium zugefügt werden, zusammen mit einer geeigneten Form von Glucose.

Dadurch kommt es zu einer kontrollierten Markierung von Valin, Leucin und der δ -Position von Isoleucin.



α -Keto-Buttersäure

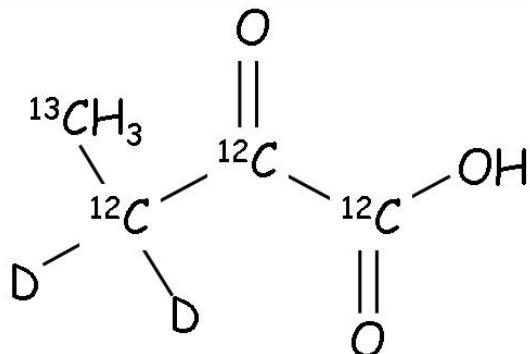


α -Keto-Valeriansäure

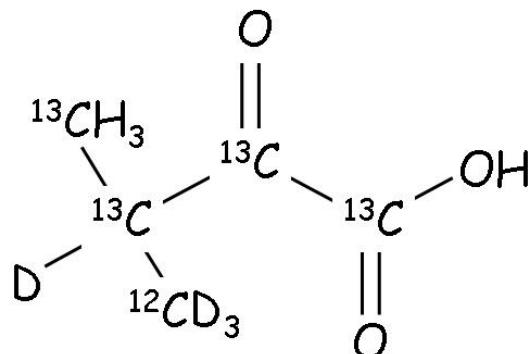
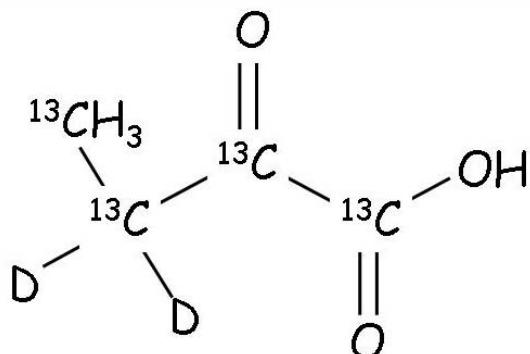
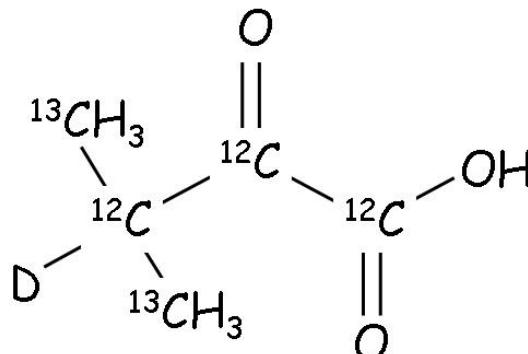
NMR an großen Proteinen

Für besondere Messungen kann man das Muster noch variieren

α -Keto-Buttersäure



α -Keto-Valeriansäure



Relaxations-
Untersuchungen

Linearisierte
Kette für die
Zuordnung



NMR an großen Proteinen

SH3(CN)

SH3(DCN)

SH3(DCN, $^1\text{H-CH}_3$)



LEIBNIZ-INSTITUT
FÜR MOLEKULARE
PHARMAKOLOGIE

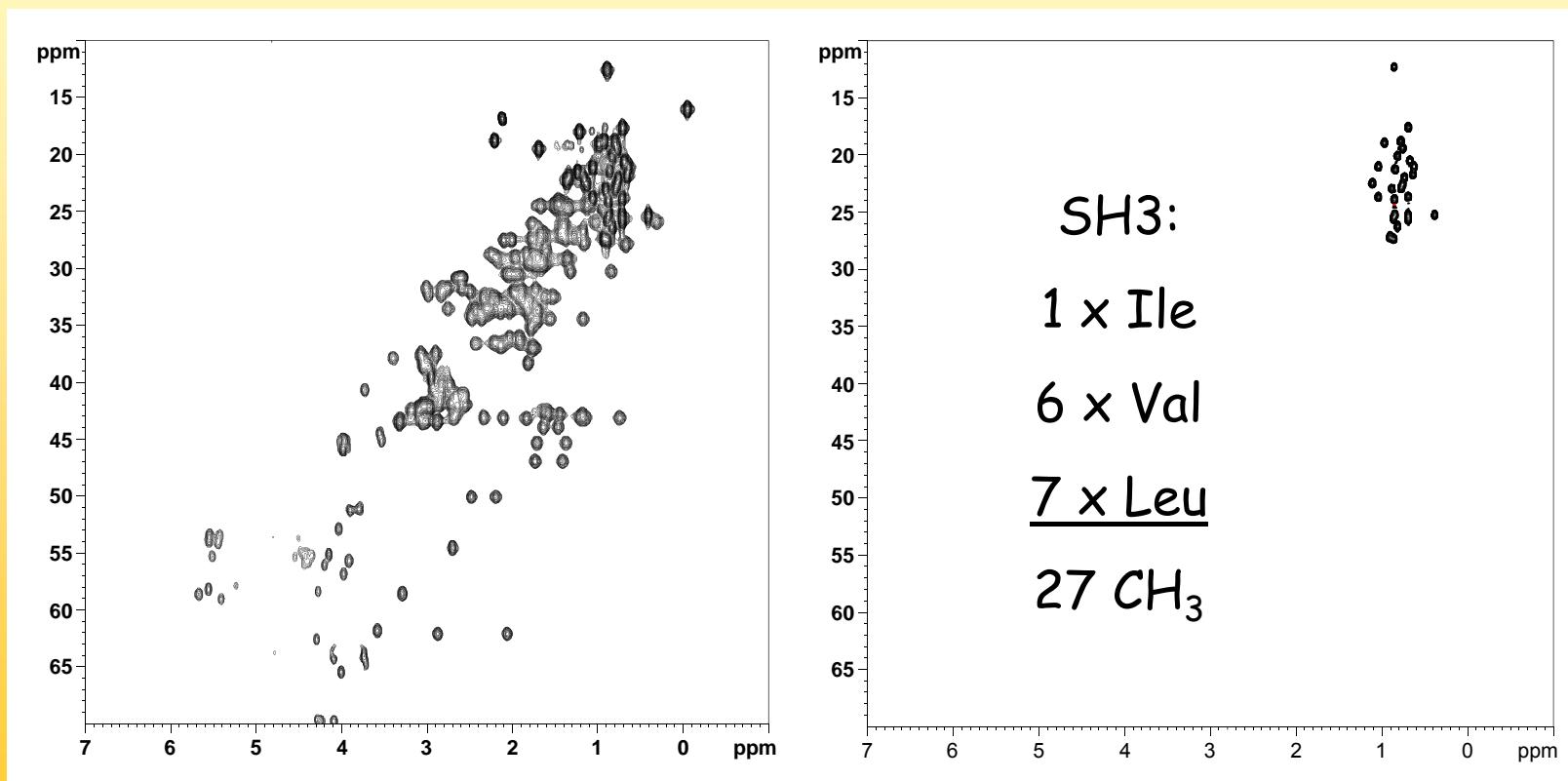
Vorlesung "Molekulare Biophysik": NMR-Spektroskopie

Peter Schmieder
AG NMR

NMR an großen Proteinen

SH3(DCN, ^1H -CH₃)

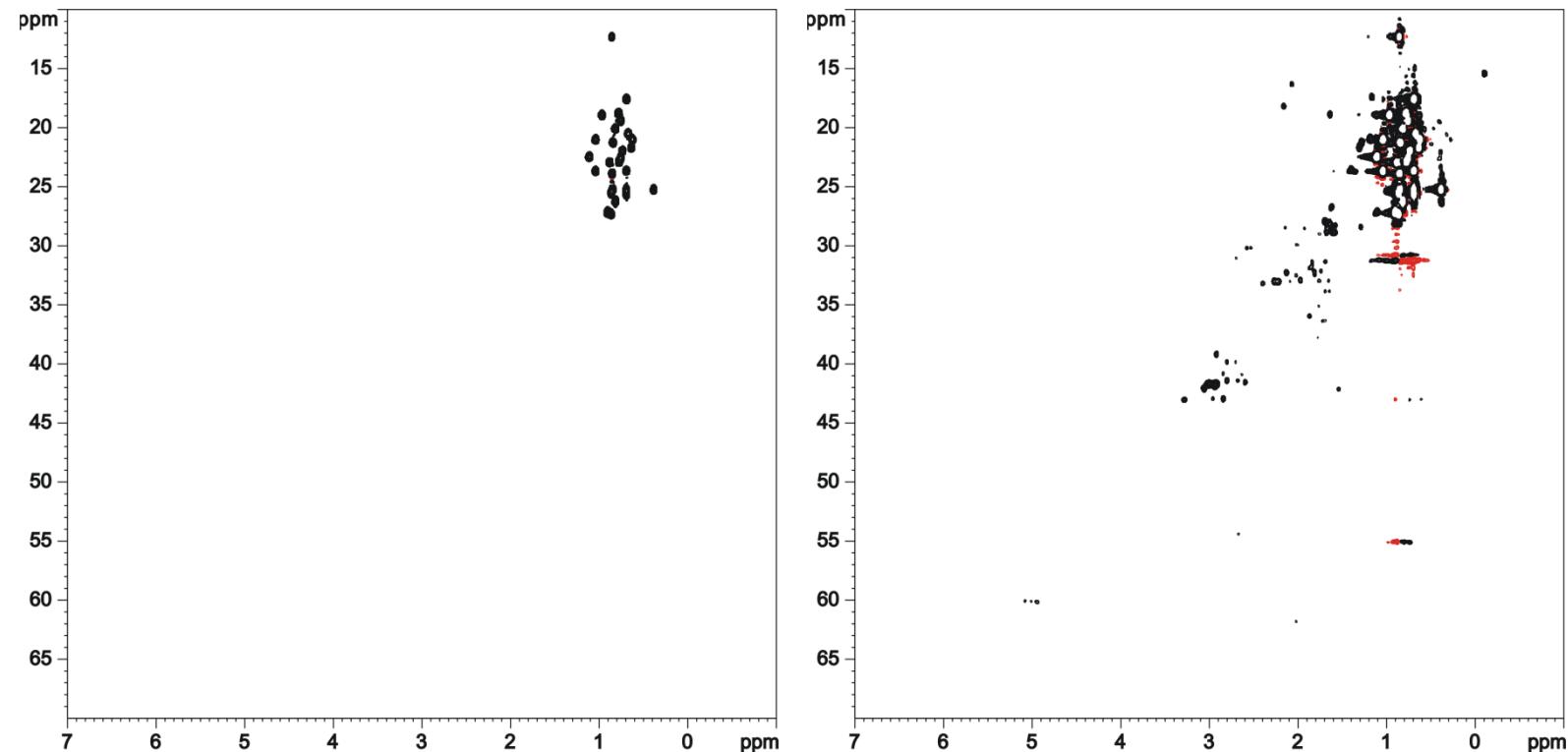
Vergleich eines „normalen“ HMQCs mit einem der
Methyl-Protonierten Probe



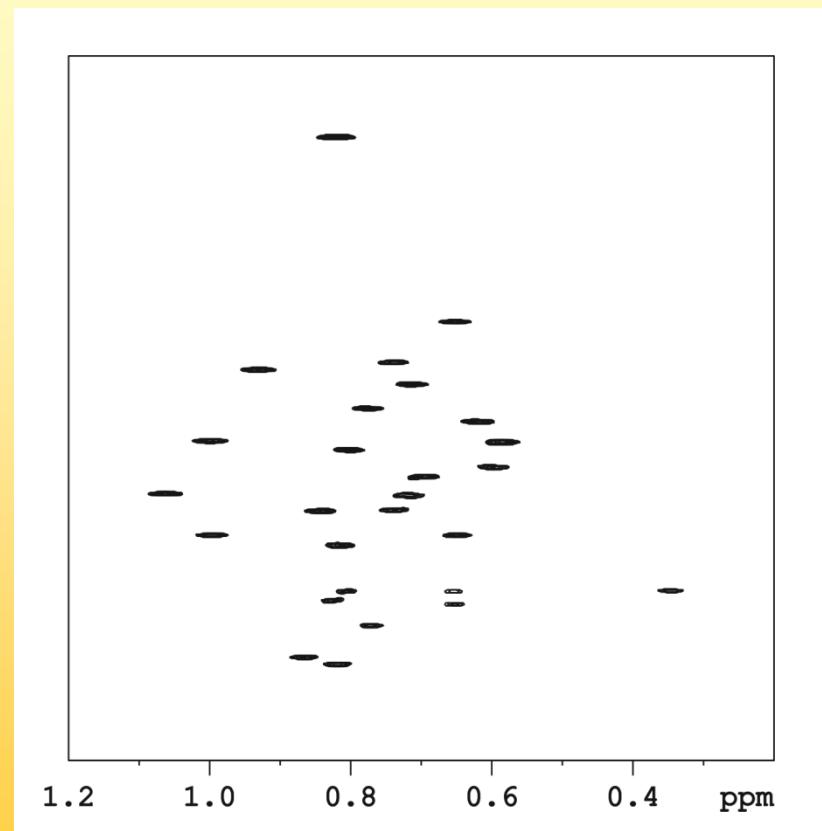
NMR an großen Proteinen

SH3(DCN, ^1H -CH₃)

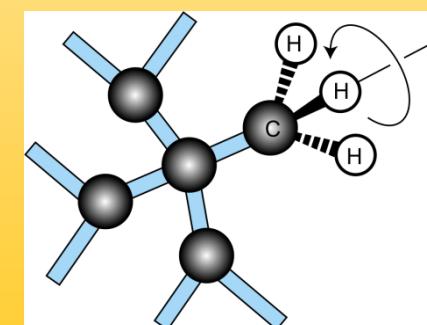
Untersuchung des Deuterierungsgrades



NMR an großen Proteinen



Methyl-TROSY
Ein einfaches HMQC hat
scharfe Linien für die
Methylgruppen, auch für ein
großes Protein und
unabhängig von der
Feldstärke



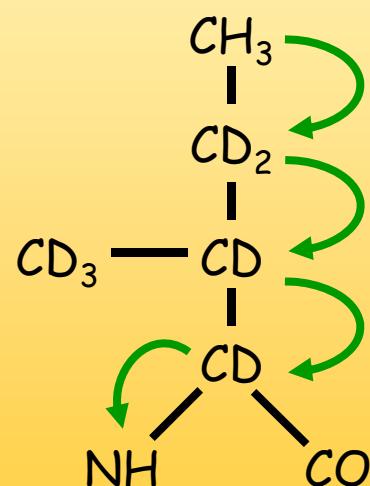
NMR an großen Proteinen

Experimente für die Zuordnung der Methylgruppen

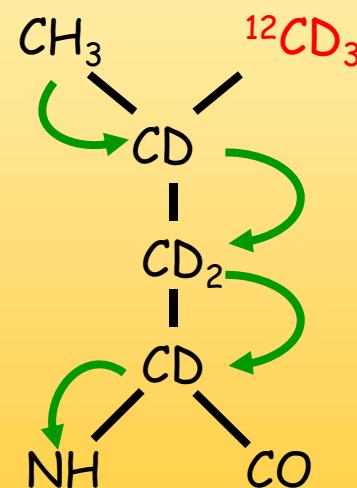
Tugarinov and Kay *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13868-13878 (2003)

„straight-through“

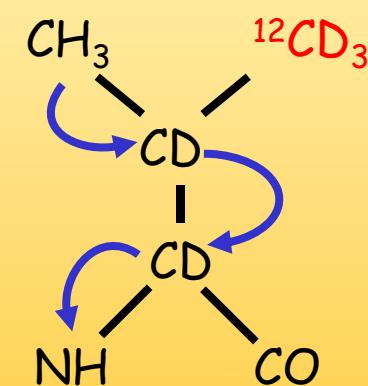
Leu, Ile-(HM)CM(CGBCA)NNH



Val-(HM)CM(CBCA)NNH



Hier bekommt die linearisierte Kette Bedeutung

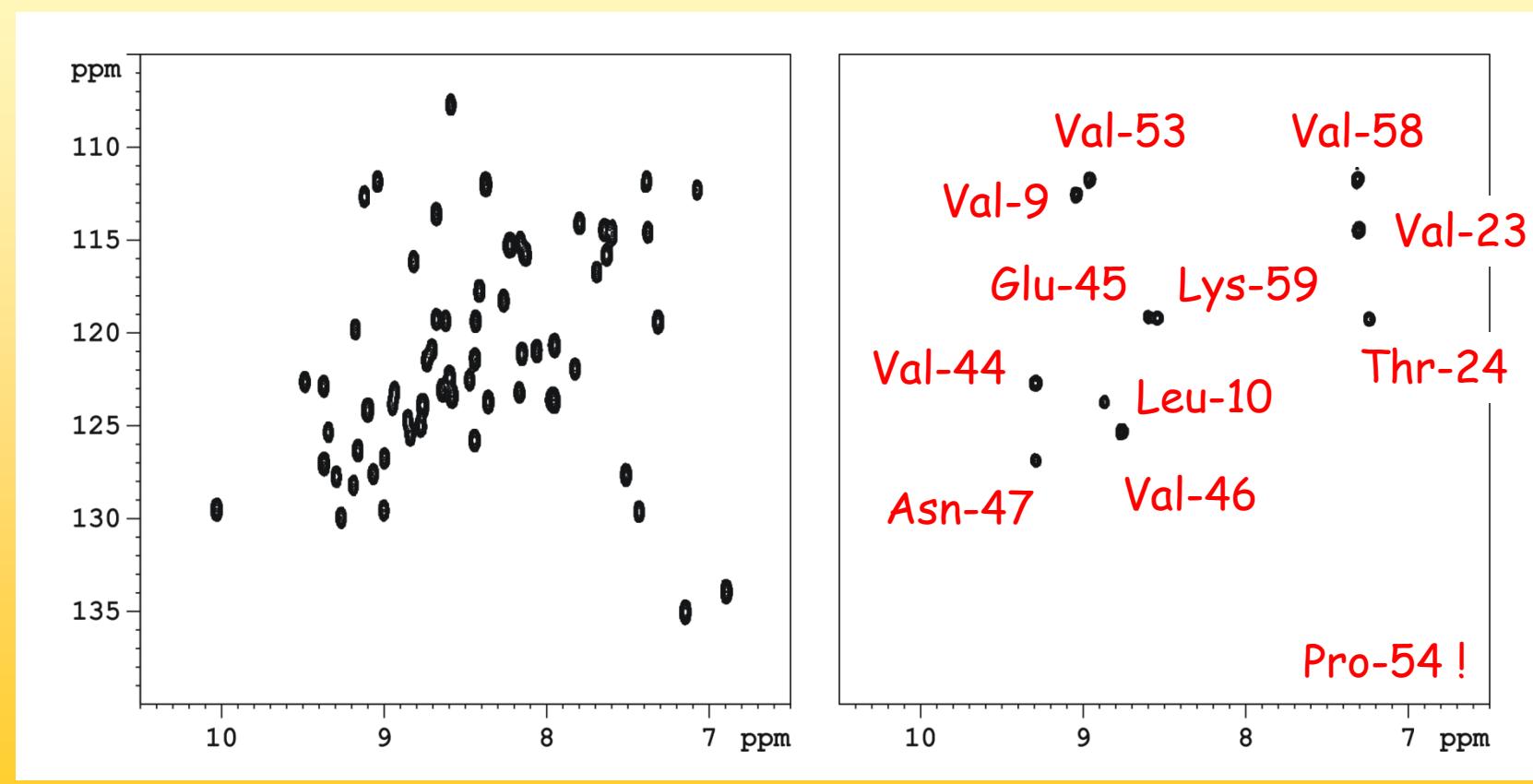


NMR an großen Proteinen

Val-(HM)CM(CBCA)NNH

TROSY

HN-plane

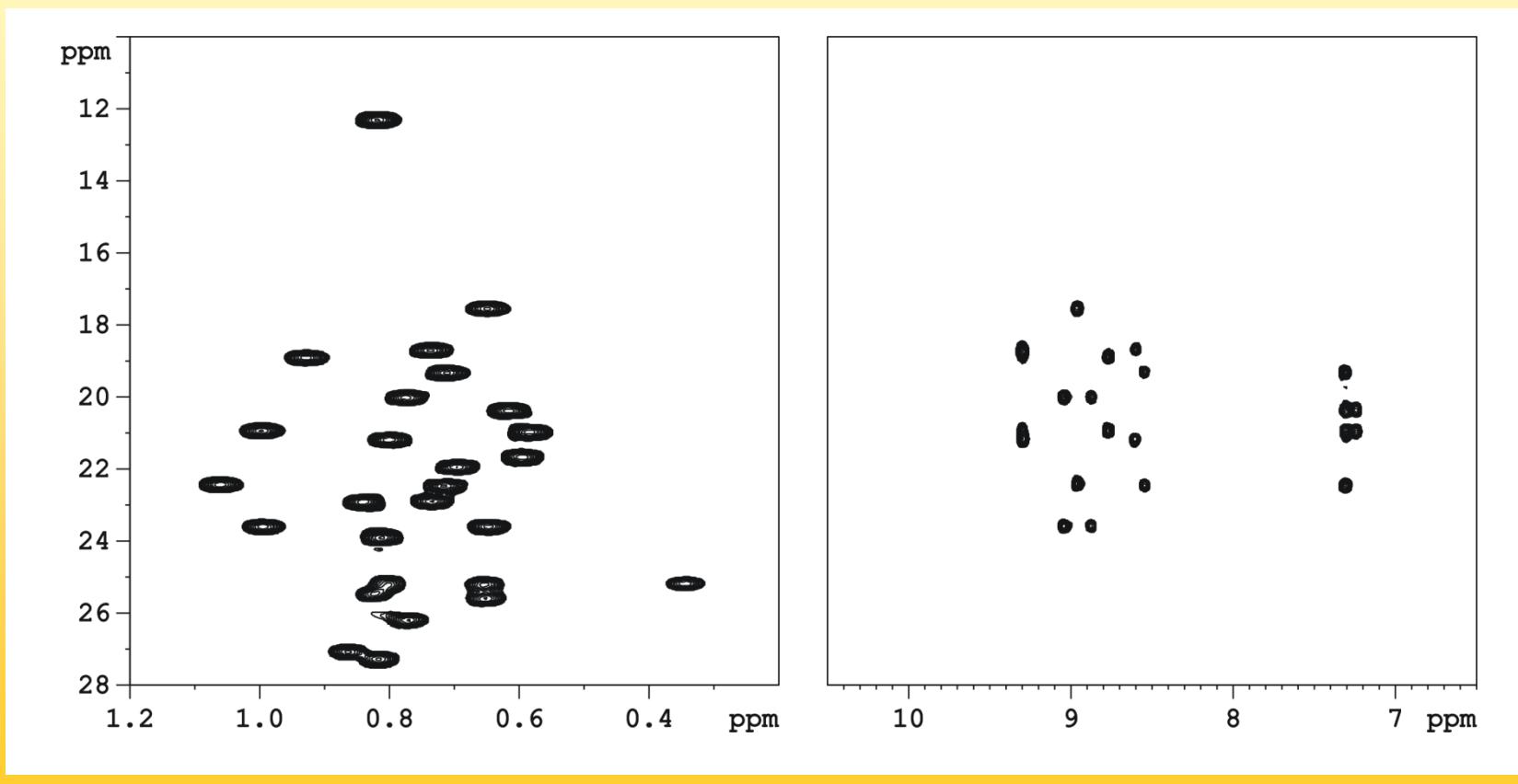


NMR an großen Proteinen

Val-(HM)CM(CBCA)NNH

CH₃-region

HC-plane



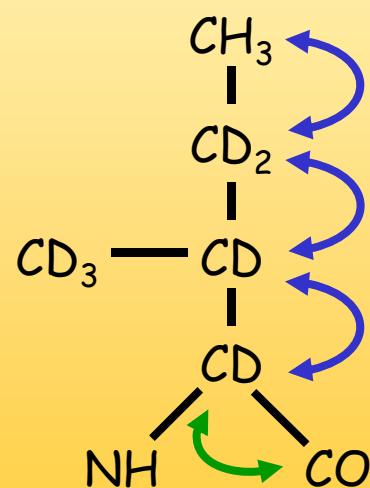
NMR an großen Proteinen

Experimente für die Zuordnung der Methylgruppen

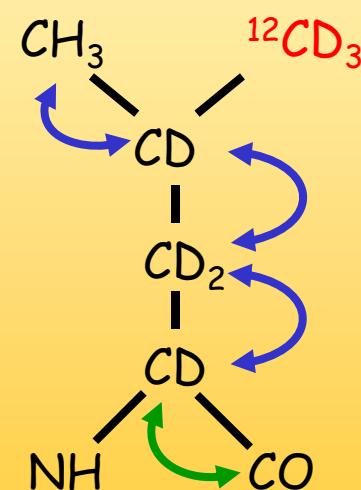
Tugarinov and Kay *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13868-13878 (2003)

„out-and-back“

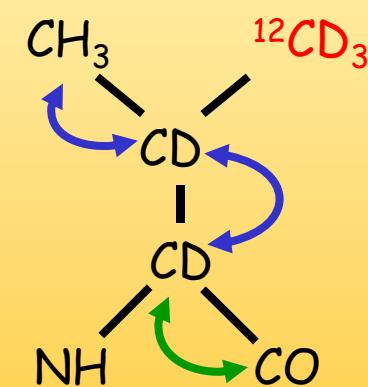
HMCM(CG)CBCA



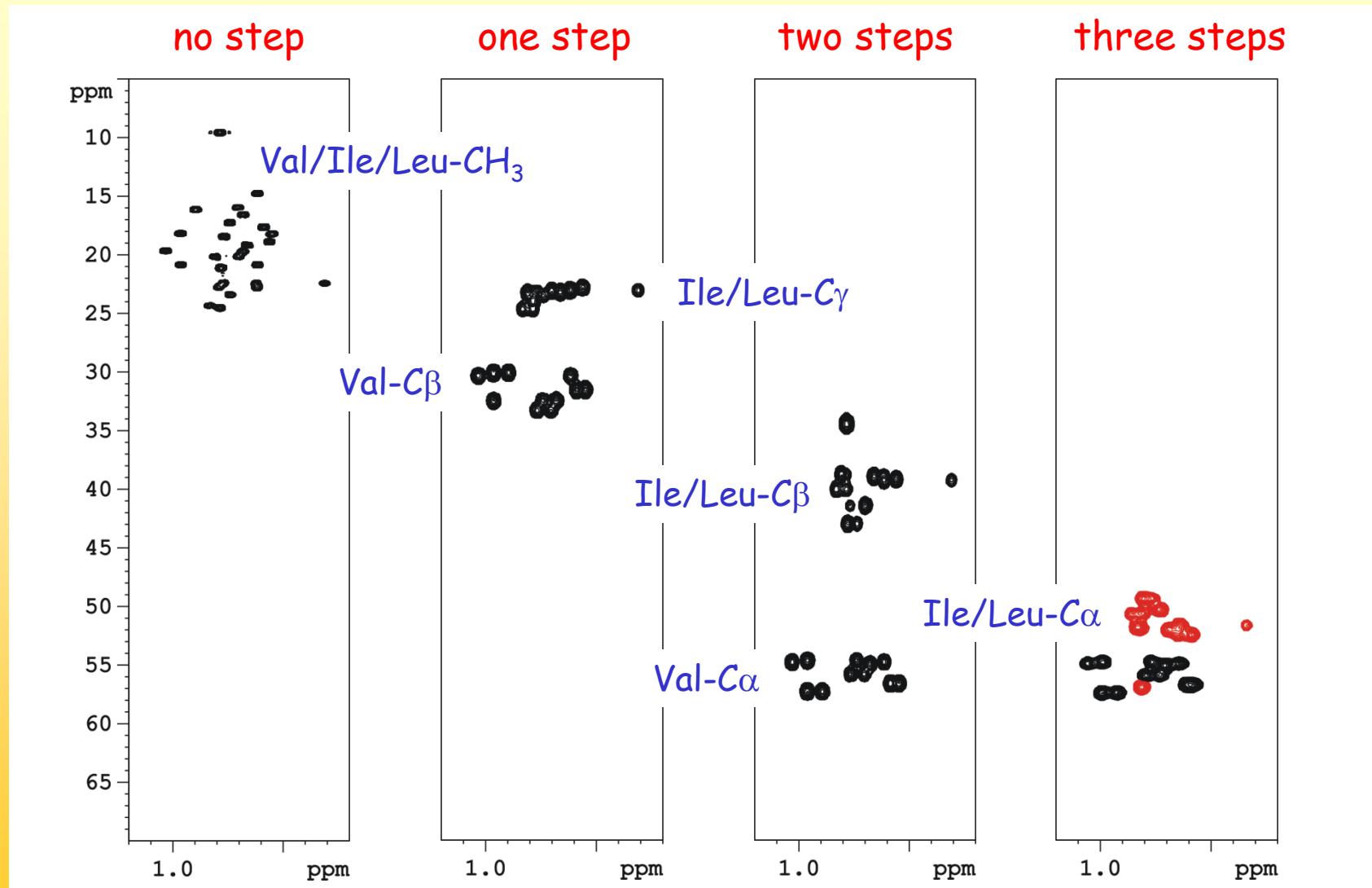
HMCM(CGCBCA)CO



here the linear chain becomes important



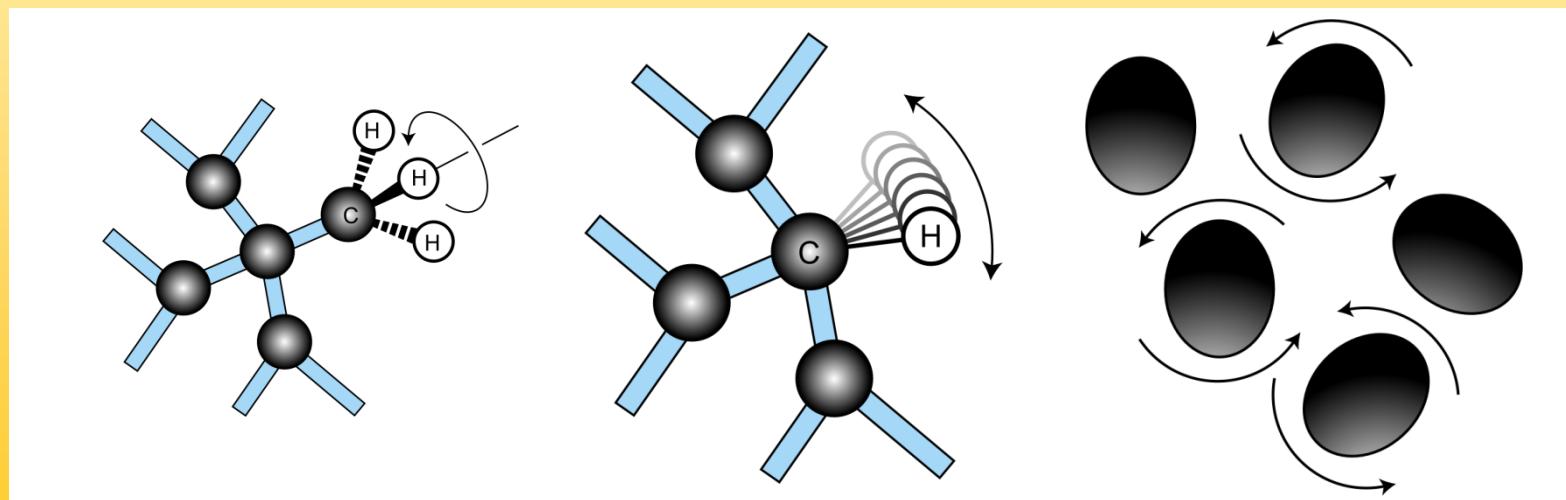
NMR an großen Proteinen



Relaxationsmessungen

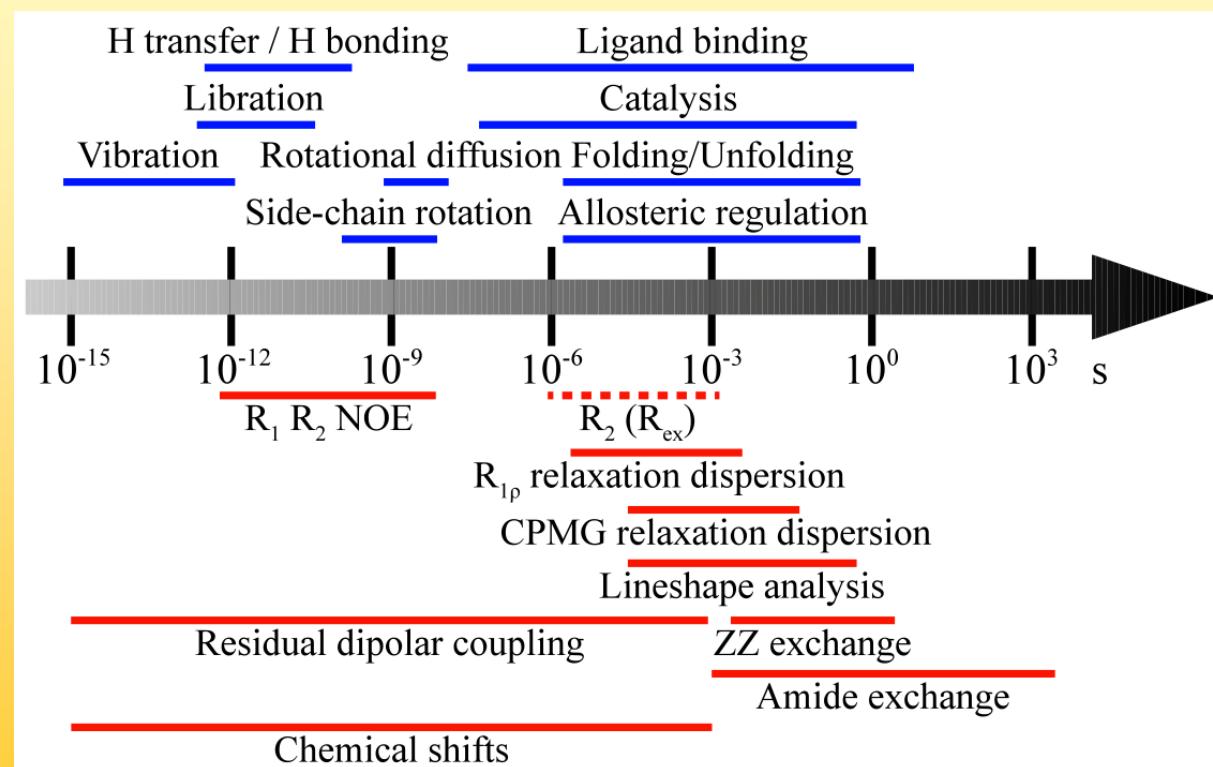
Relaxationsmessungen

Die Relaxation der NMR-Kerne haben wir schon anhand der Relaxationszeiten T_1 und T_2 kennen gelernt, es gibt aber noch zahlreiche andere Phänomene die ein Verschwinden der zu Beginn des Experimentes erzeugten Magnetisierung bewirken. Sie alle beruhen auf der Bewegung des Moleküls selber und lassen daher Rückschlüsse über die Dynamik zu.



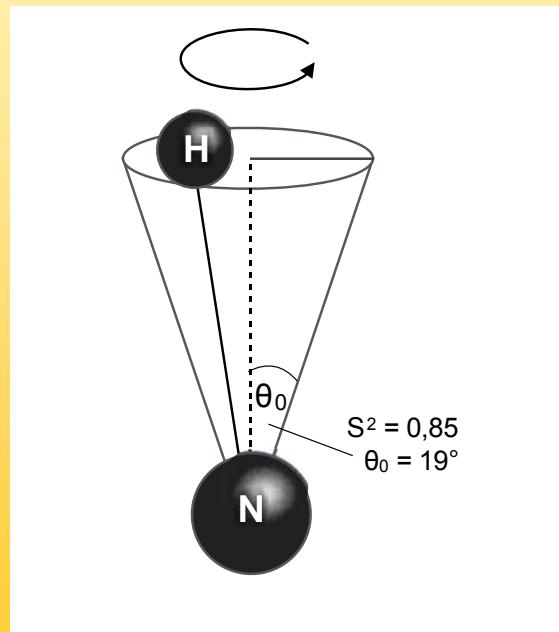
Relaxationsmessungen

Je nach Zeitskala der Dynamik sind unterschiedliche Relaxationsmechanismen interessant



Relaxationsmessungen

Der Zusammenhang zwischen der Bewegung eines Moleküls und der Relaxation ist allerdings enorm kompliziert. Deswegen beschränkt man sich bei den meisten Messungen auf die Messung der Relaxation der ^{15}N -Kerne, die fast ausschließlich vom daran gebundenen Proton bestimmt wird



Eine Möglichkeit ist die Messung der longitudinale Relaxationszeit T_1 , der transversale Relaxationszeit T_2 sowie des heteronuklearen NOEs.



Relaxationsmessungen

Für diese drei gibt es „simple“ Formeln die die Abhängigkeit der Bewegung beschreiben

$$\frac{1}{T_1} = d^2[3J(\omega_N) + J(\omega_H - \omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + \frac{c^2}{3}[3J(\omega_N)]$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_2} = & \frac{1}{2}\{d^2[4J(0) + 3J(\omega_N) + J(\omega_H - \omega_N) + 6J(\omega_H) \\ & + 6J(\omega_H + \omega_N)] + \frac{c^2}{3}[4J(0) + 3J(\omega_N)]\} \end{aligned}$$

$$NOE = 1 + \frac{\gamma_H}{\gamma_N} d^2[6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)] T_1$$

$$d = \frac{\mu_0 \hbar \gamma_N \gamma_H}{4\pi r_{NH} \sqrt{10}}, \quad c = \sqrt{\frac{2}{15}} \omega_N (\sigma_{||} - \sigma_{\perp})$$

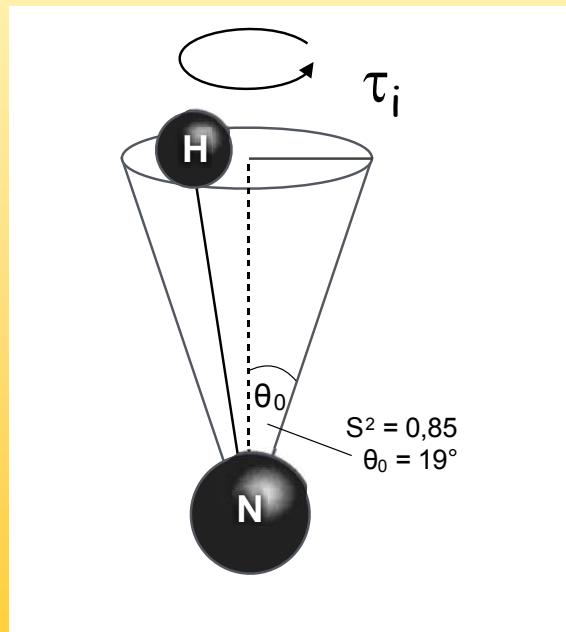
Die darin enthaltenen spektralen Dichten $J(\omega)$ beschreiben die Bewegung, man nimmt eine globale und eine lokale Bewegung an.



Relaxationsmessungen

Diese Analyse wird nach ihren Autoren Lipari-Szabo-Analyse genannt

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



Die Zeit τ_m ist die Korrelationszeit des gesamten Proteins und kann genutzt werden die Größe zu bestimmen. Sie hängt direkt von T_1 und T_2 ab:

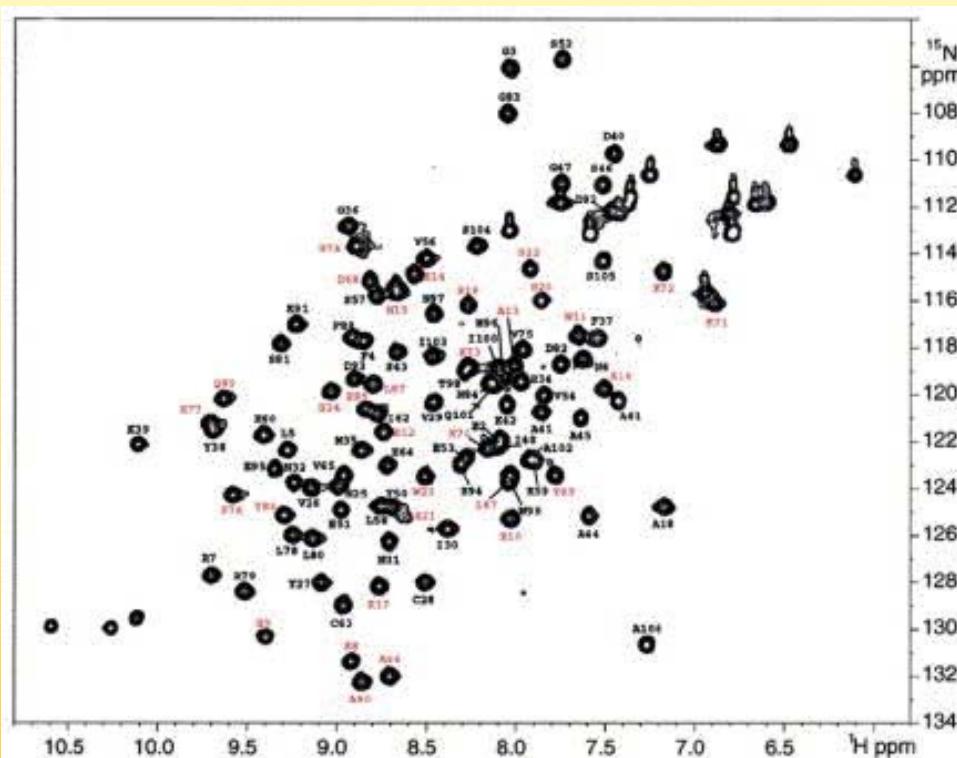
$$\frac{T_1}{T_2} = \frac{[4J(0) + 3J(\omega_N)]}{6J(\omega_N)} = \frac{7 + 4(\omega_N \tau_R)^2}{6}$$

Lipari, G. & Szabo, A. JACS 104, 4546-59 (1982); Lipari, G. & Szabo, A. JACS 104, 4559-70 (1982)



Relaxationsmessungen

Bei Proteinen geht man für die Messung wieder vom HSQC aus

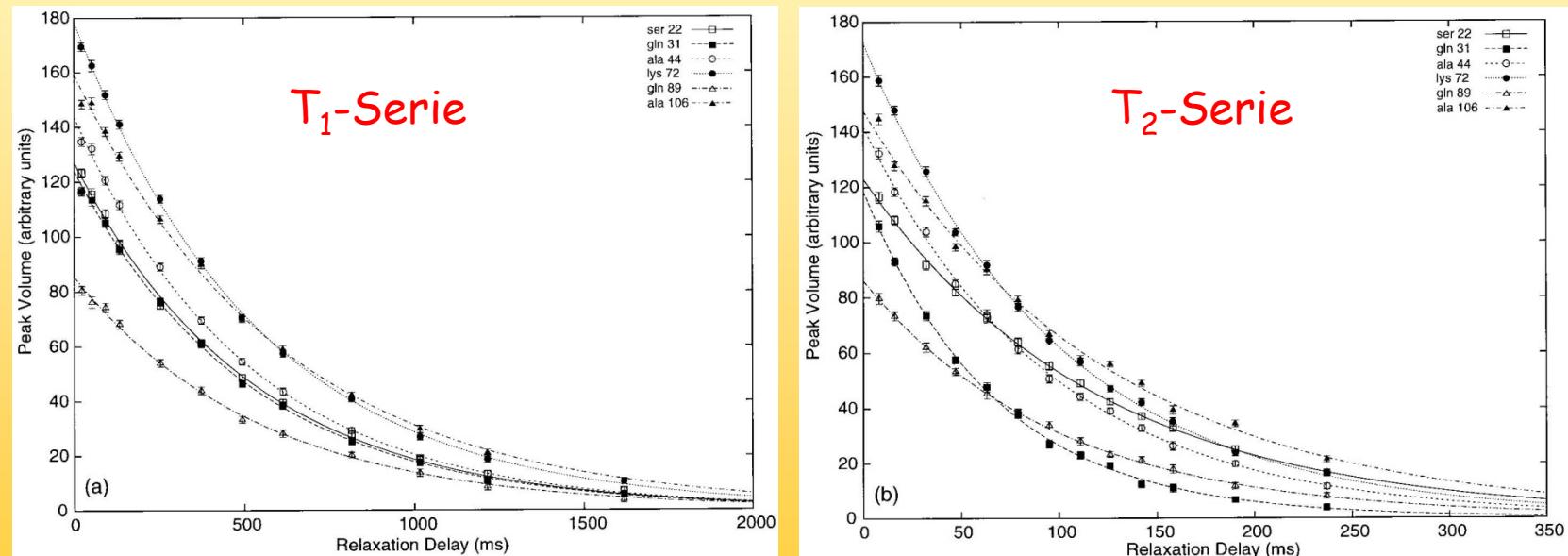


Basierend auf der Zuordnung können für jeden Rest die Relaxationszeiten gemessen werden

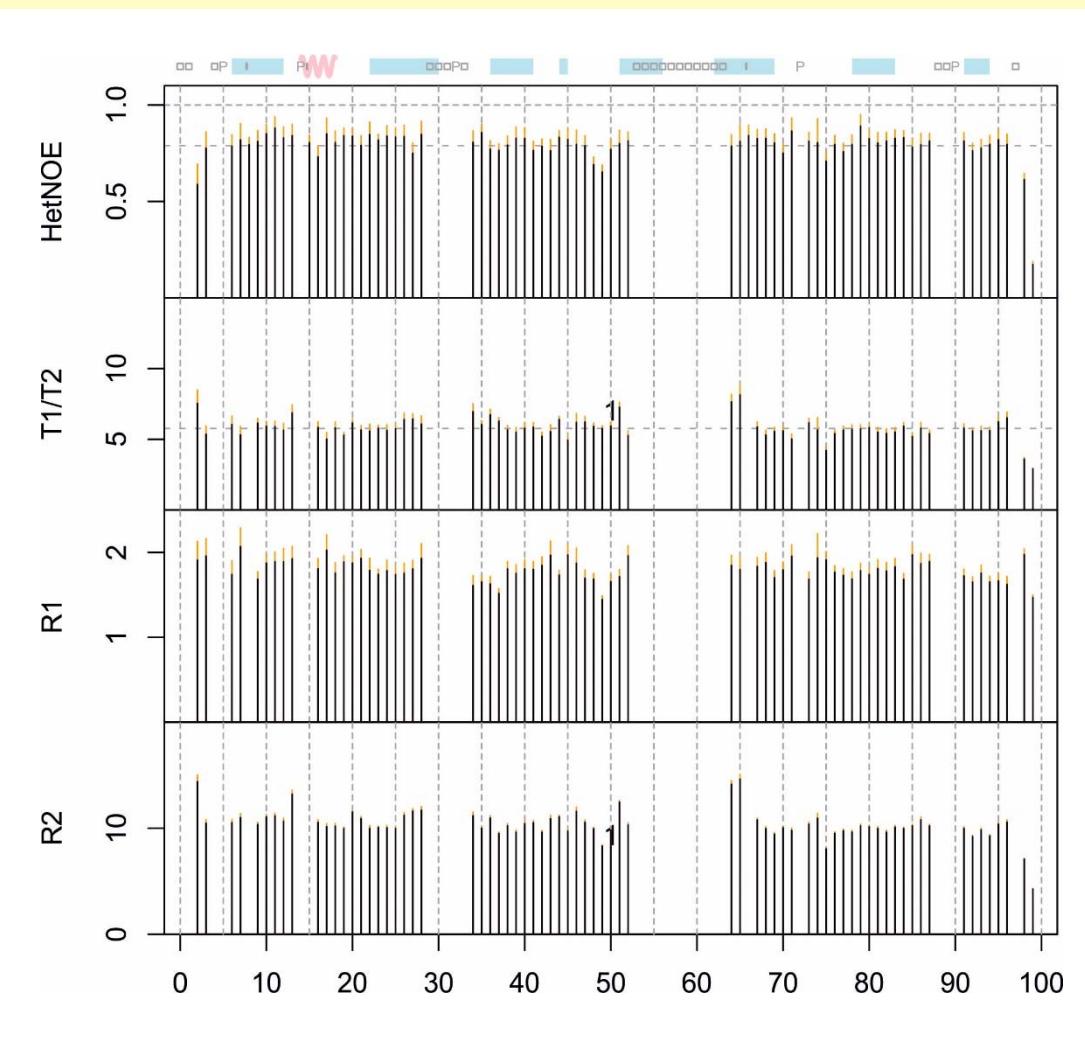


Relaxationsmessungen

Man bestimmt T_1 und T_2 -Zeiten für die ^{15}N -Kerne mit einer Serie von mehrdimensionalen Experimenten, da sonst die Überlagerung eine Auswertung verhindern würde.



Relaxationsmessungen

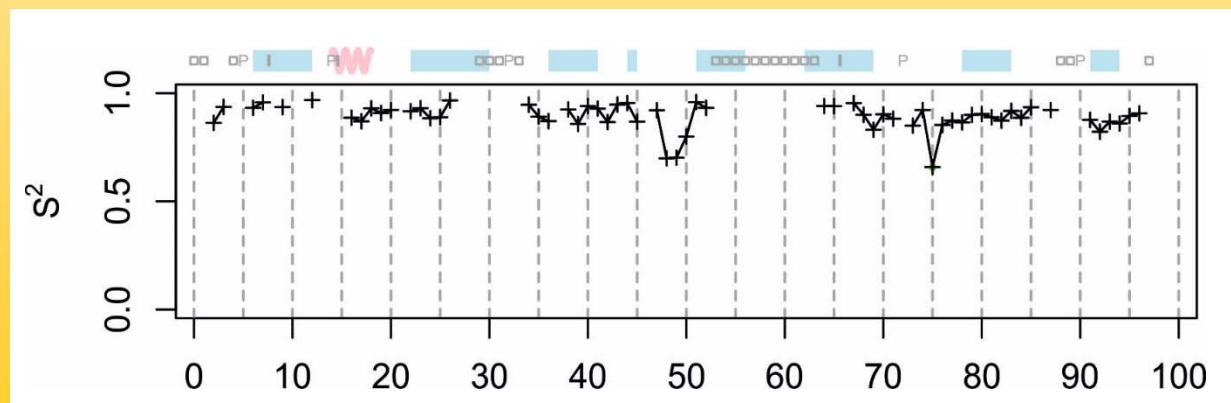
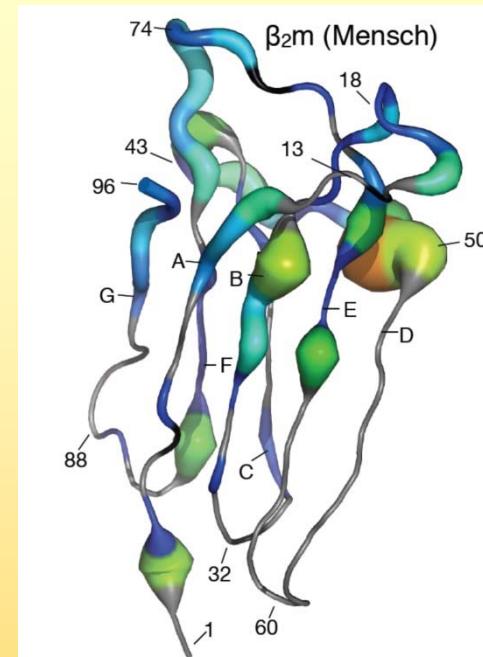


Um eine interne
Beweglichkeit zu
ermitteln muss man
die Analyse auf der
Basis der Aminosäure-
Sequenz durchführen



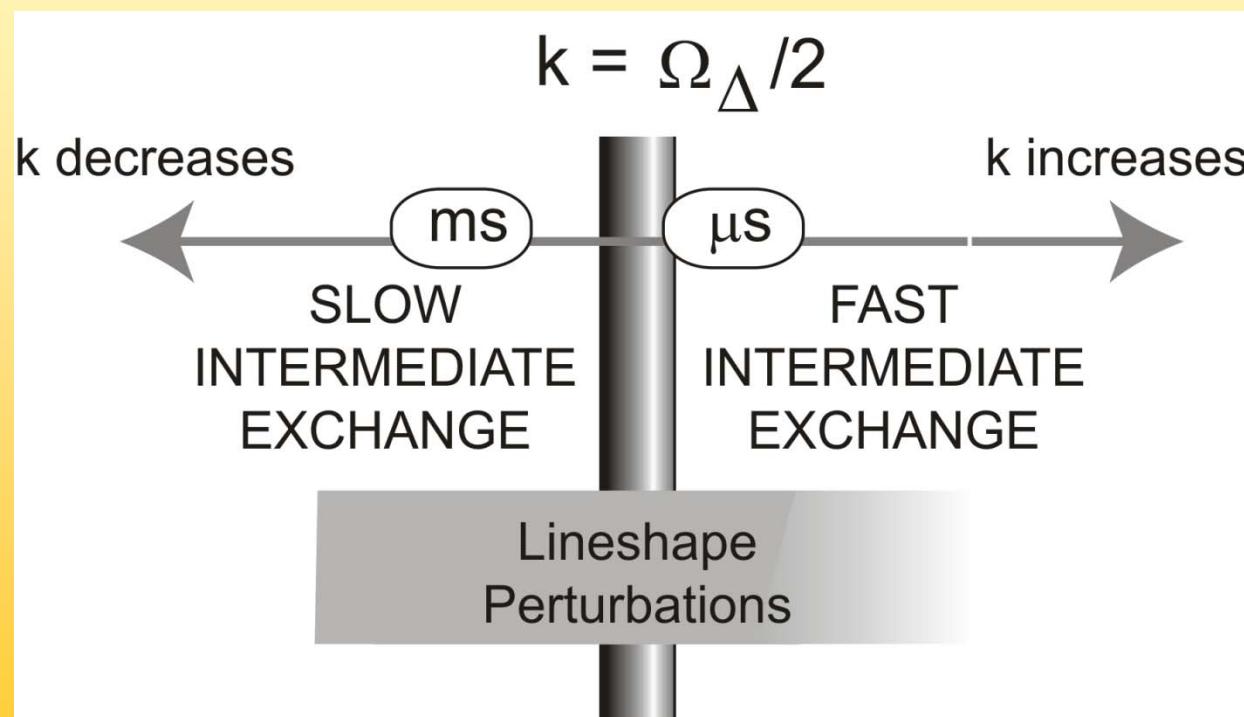
Relaxationsmessungen

Am Ende erhält man ein
Bild der internen
Beweglichkeit innerhalb
eines Proteins



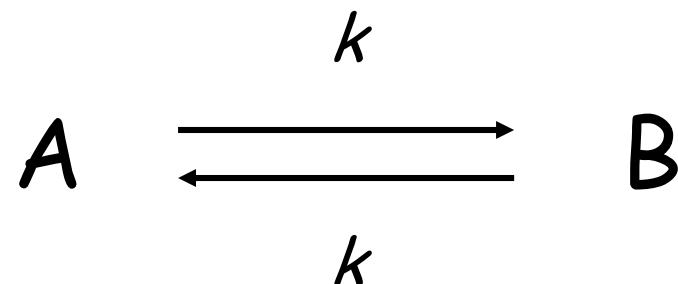
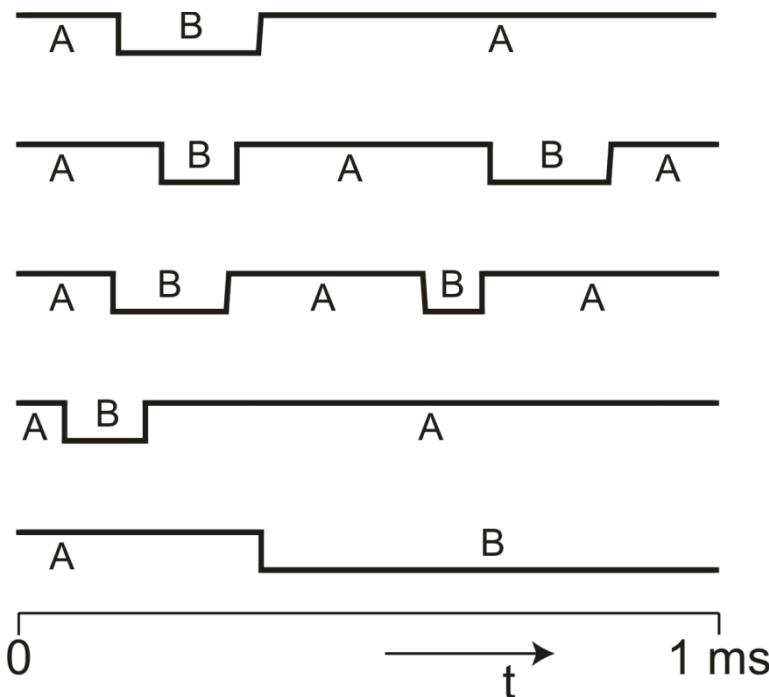
Relaxationsmessungen

Information über die Beweglichkeit auf einer anderen Zeitskala erhält man über die Analyse der Linienbreiten in den Spektren, damit können Austauschprozesse auf der μs bis ms Zeitskala untersucht werden



Relaxationsmessungen

Im einfachsten Fall ist das der Austausch zwischen zwei energetisch ähnlichen und daher gleich besetzten Zuständen



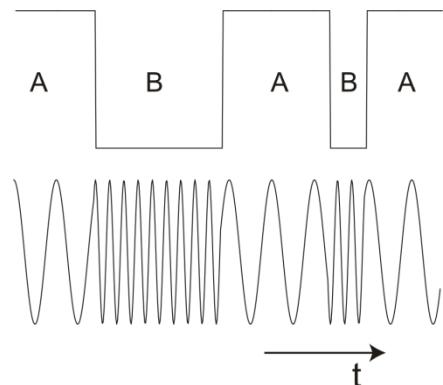
$$\Omega_\Delta = \Omega_A - \Omega_B$$

intermediate exchange:

$$k \sim |\Omega_\Delta / 2|$$

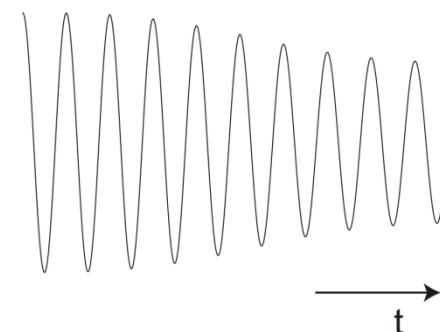
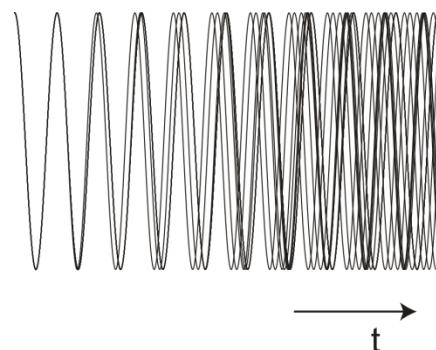
Relaxationsmessungen

Jedes Molekül für sich wechselt in zufälliger Abfolge den Zustand und die dazu gehörige NMR-Frequenz



Zu Beginn sind alle synchron, dann kommt es zu Überlagerung von veränderten Frequenzen

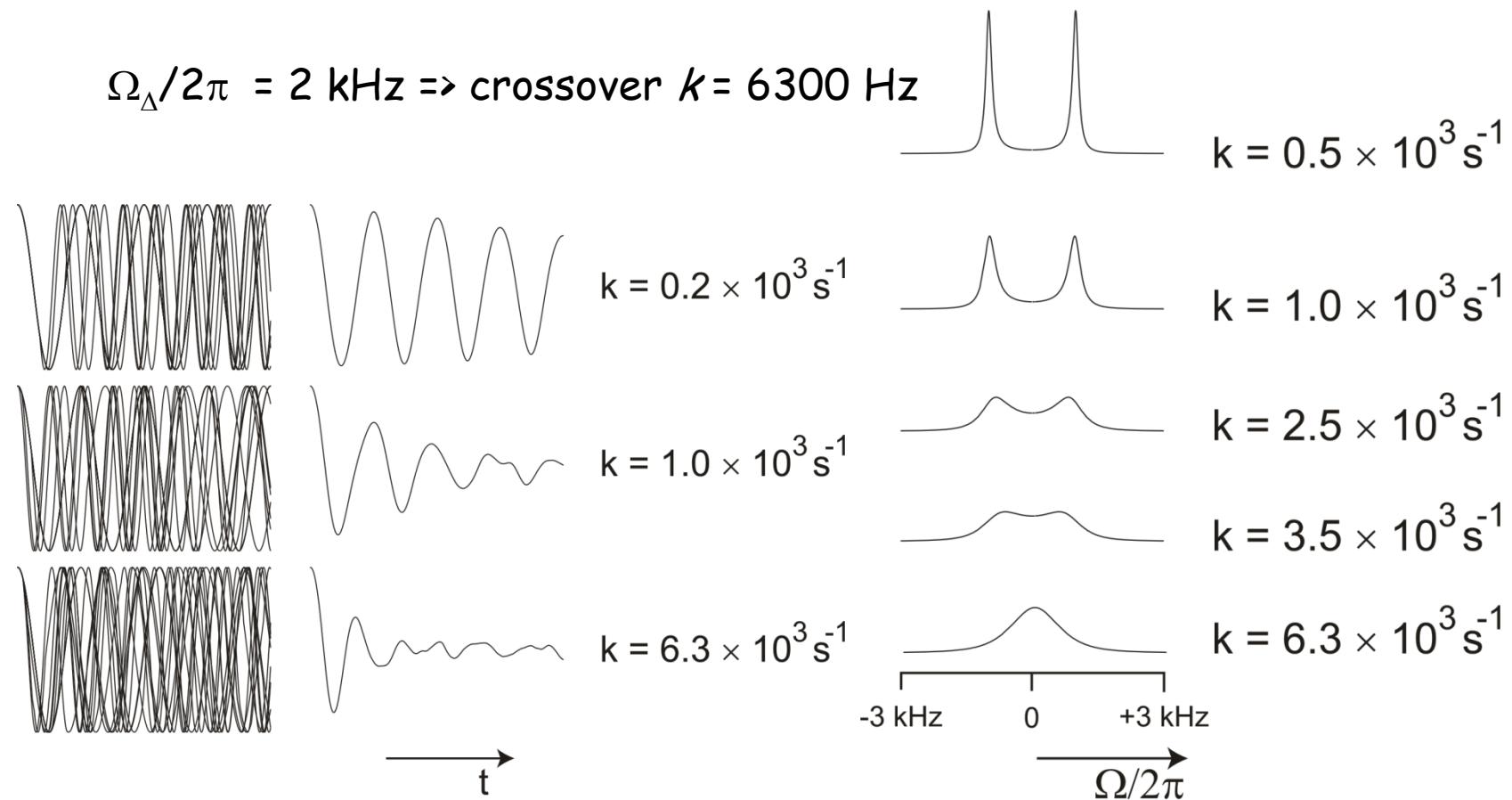
20 Moleküle überlagert:



Relaxationsmessungen

slow intermediate exchange: $k < |\Omega_\Delta / 2|$

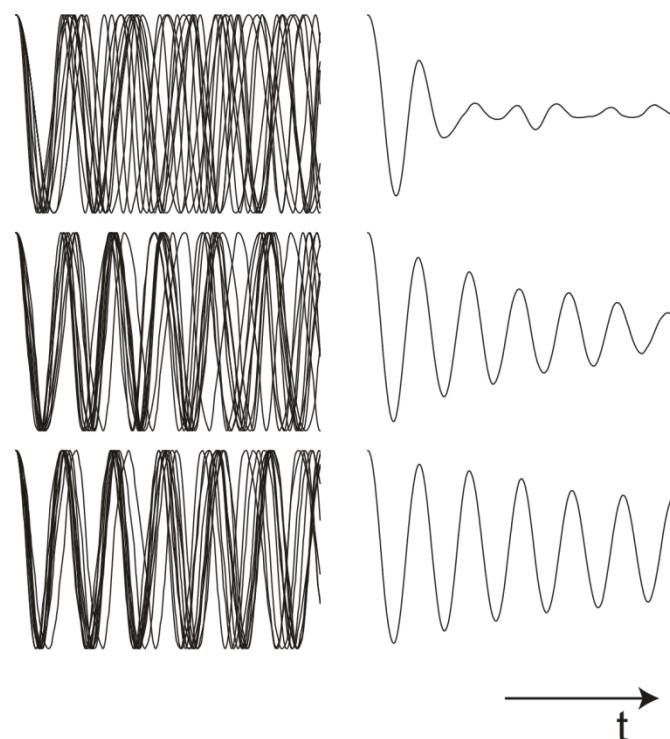
$$\Omega_\Delta / 2\pi = 2 \text{ kHz} \Rightarrow \text{crossover } k = 6300 \text{ Hz}$$



Relaxationsmessungen

fast intermediate exchange: $k > |\Omega_\Delta / 2|$

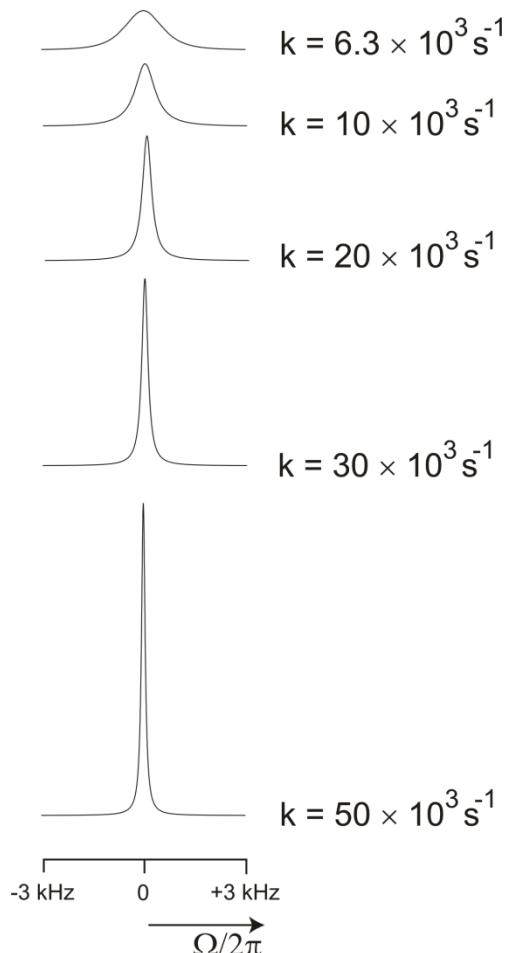
$$\Omega_\Delta / 2\pi = 2 \text{ kHz} \Rightarrow \text{crossover } k = 6300 \text{ Hz}$$



$$k = 6.3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$$

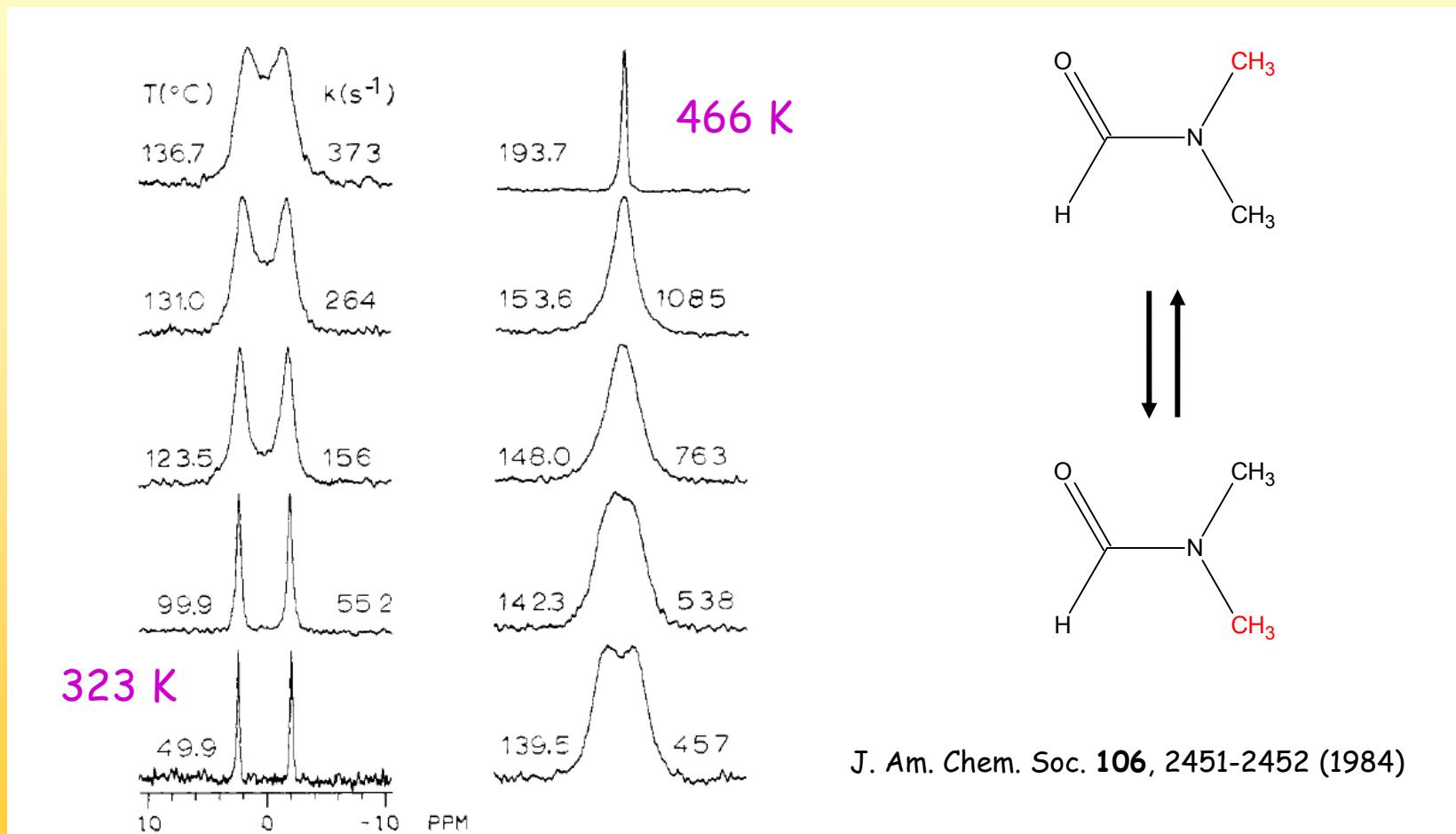
$$k = 20 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$$

$$k = 50 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$$



Relaxationsmessungen

Der Effekt kann einen großen Temperaturunterschied erfordern



J. Am. Chem. Soc. 106, 2451-2452 (1984)



LEIBNIZ-INSTITUT
FÜR MOLEKULARE
PHARMAKOLOGIE

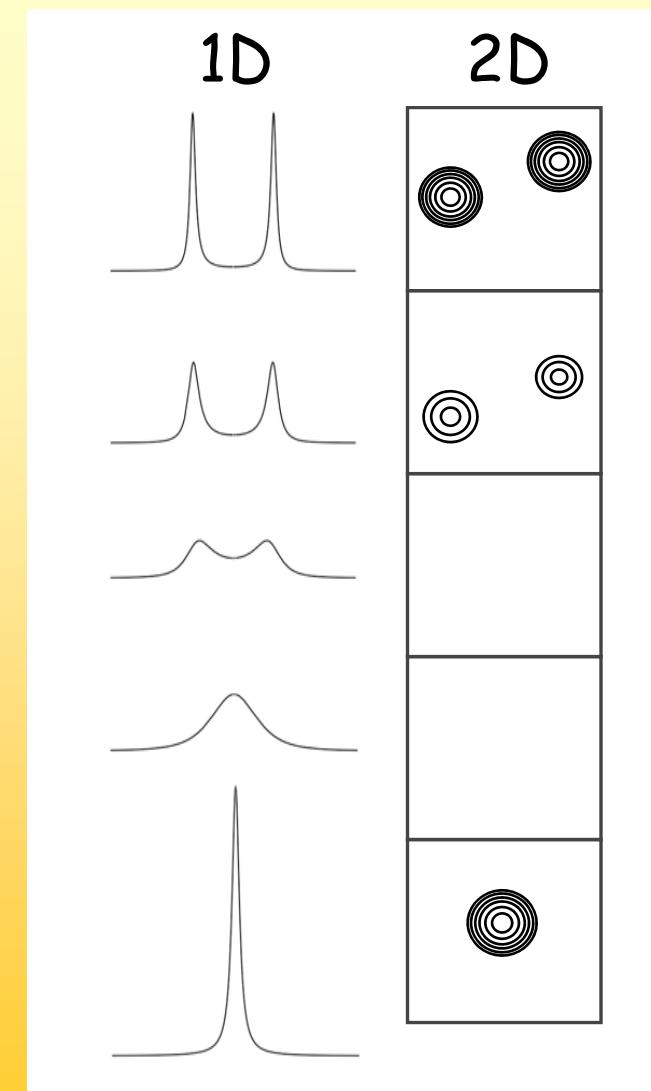
Vorlesung "Molekulare Biophysik": NMR-Spektroskopie

Peter Schmieder
AG NMR

Relaxationsmessungen

Austauschverbreiterung kann auch in mehrdimensionalen Spektren beobachtet werden, allerdings oft nur durch Abschwächung der Intensität und Verschwinden der Signale.

Während des Magnetisierungstransfers tritt oft Relaxation auf, die im ungünstigsten Fall die Signale auslöscht.

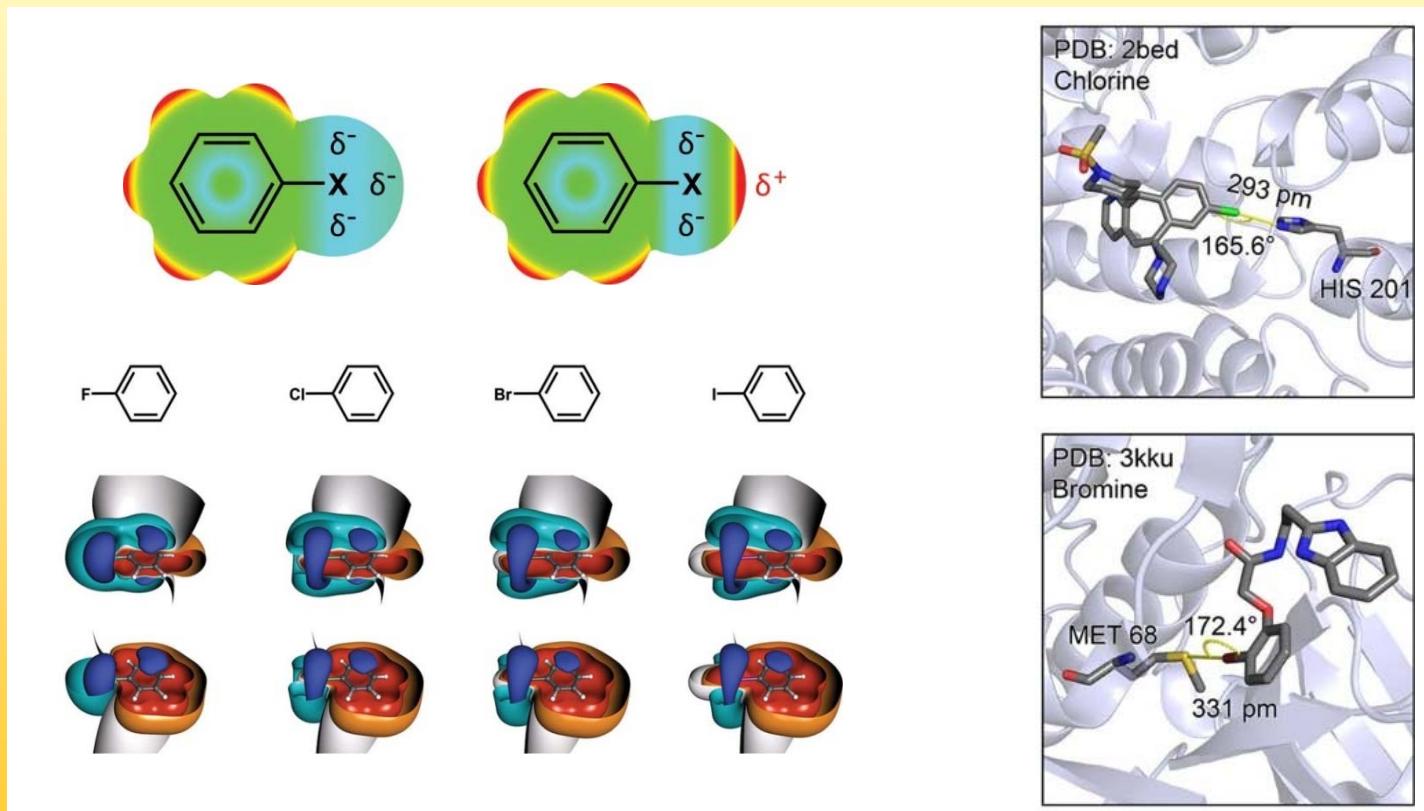


Molekular-Waagen



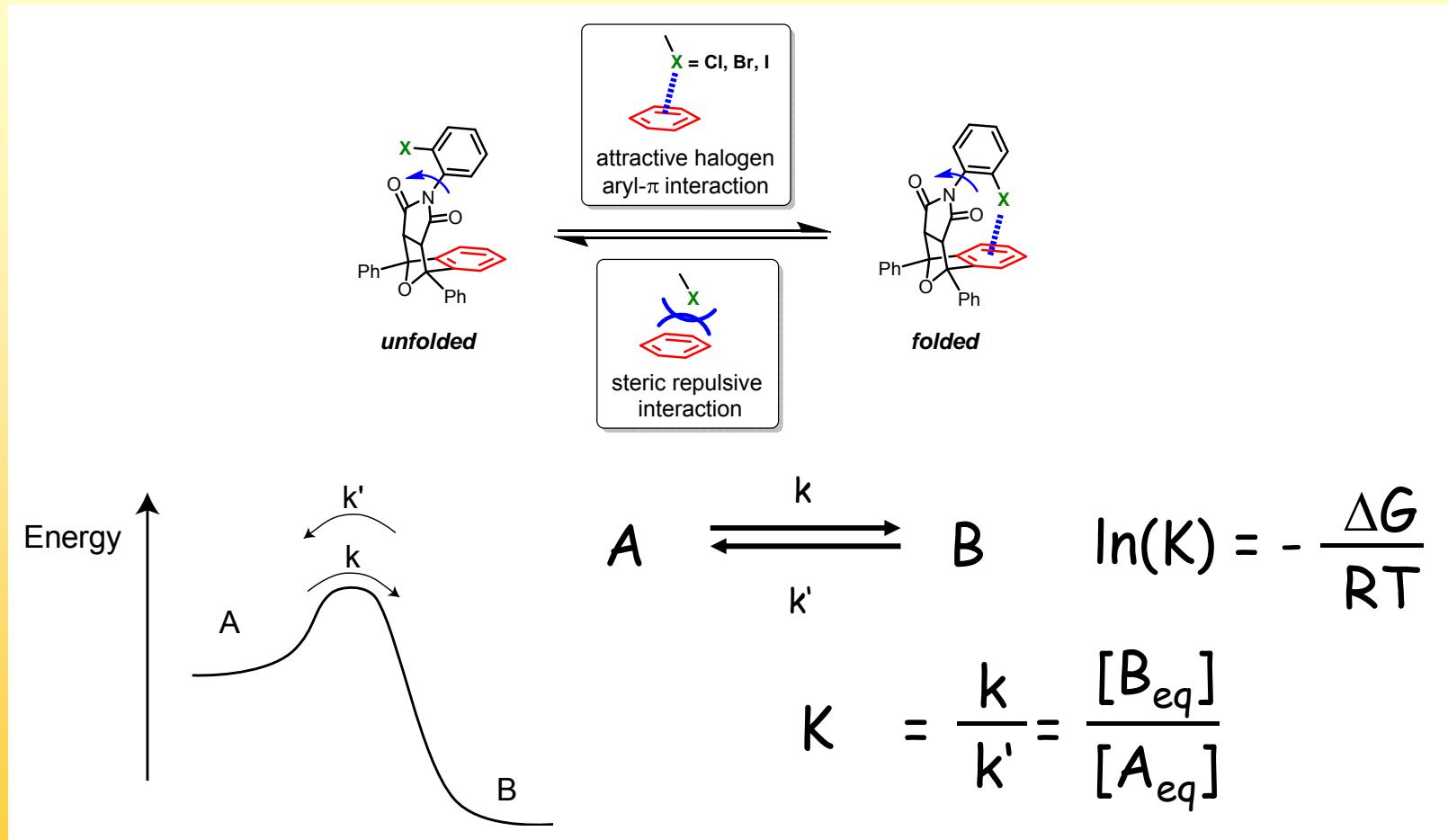
Molekular-Waagen

Die Dynamik einer Gleichgewichtsreaktion lässt sich mit NMR auch quantitativ beschreiben. Als Beispiel nehmen wir die Untersuchung von Halogen-Bindungen mit einer Molekular-Waage.



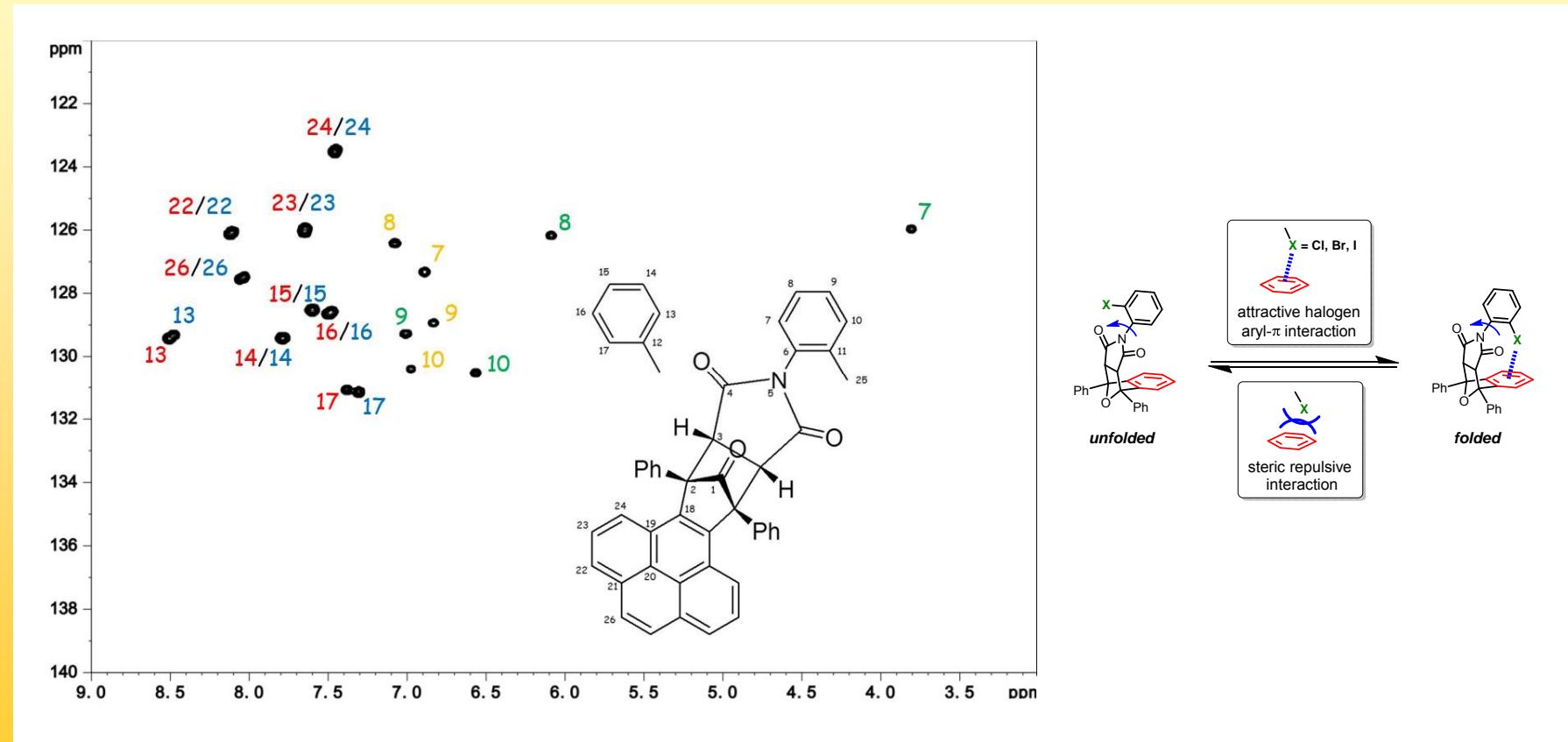
Molekular-Waagen

Hier eine Molekular-Waage um schwache Aren-Interactionen zu messen



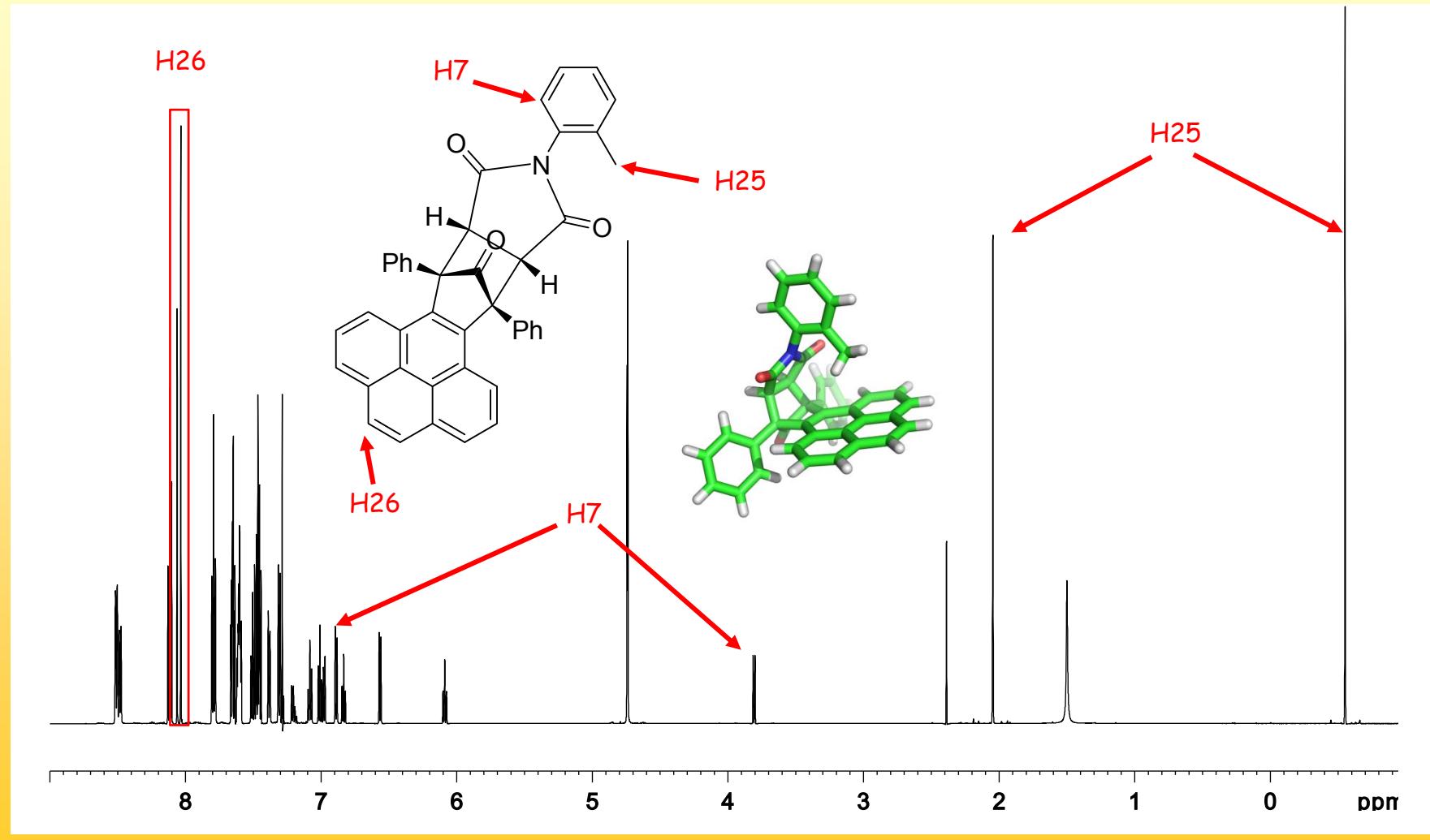
Molekular-Waagen

Voraussetzung ist natürlich eine Zuordnung der Signale, die wir mit konventionellen Methoden bewerkstelligen können. Zur Unterscheidung der beiden Zustände kann man Anisotropieeffekte nutzen



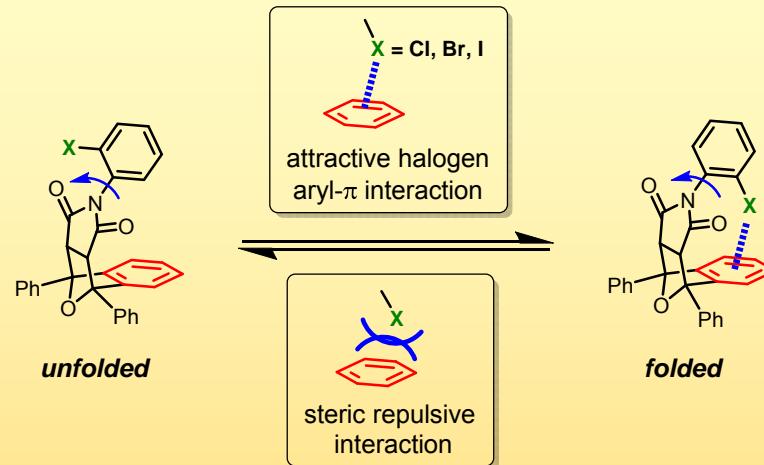
Molekular-Waagen

Nach der Zuordnung muss man nur noch die Intensität bestimmen



Molekular-Waagen

.... und kann dann die ΔG -Werte ableiten



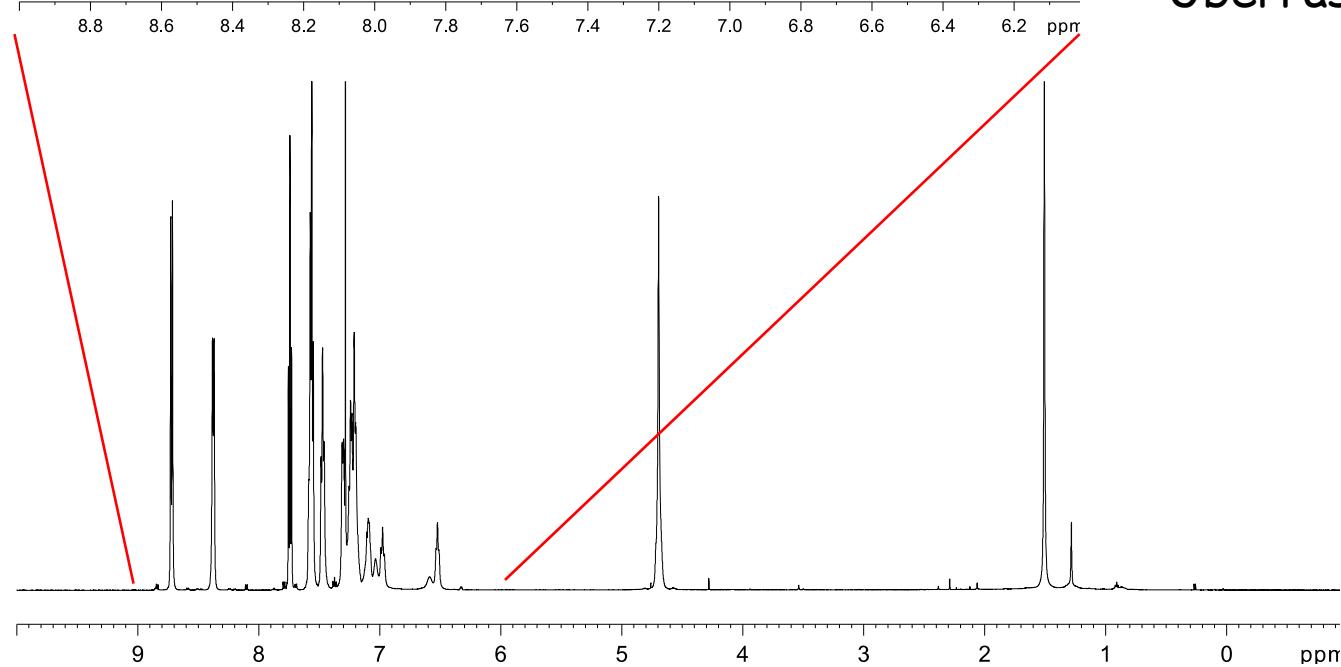
	unfolded (1)	unfolded (2)	folded (1)	folded (2)	ratio (1)	ratio (2)	average	$\Delta G @ 25^\circ C$ (kJ)
CH_3	4,0850	3,6990	5,3010	4,7970	1,2977	1,2968	1,2973	$-0,6232 \pm 0,0011$
Cl	26,6690	22,2520	12,5280	10,4090	0,4698	0,4678	0,4688	$1,8141 \pm 0,0072$
Br	103,1500	102,8000	30,3780	30,2390	0,2945	0,2942	0,2943	$2,9285 \pm 0,0020$
I	375,1310	372,6090	48,6370	48,1880	0,1297	0,1293	0,1295	$4,8946 \pm 0,0043$

Molekular-Waagen

300 K

Breite Linien am
Ring mit Fluor

Bei den Messungen
für Fluor gibt es eine
Überraschung



LEIBNIZ-INSTITUT
FÜR MOLEKULARE
PHARMAKOLOGIE

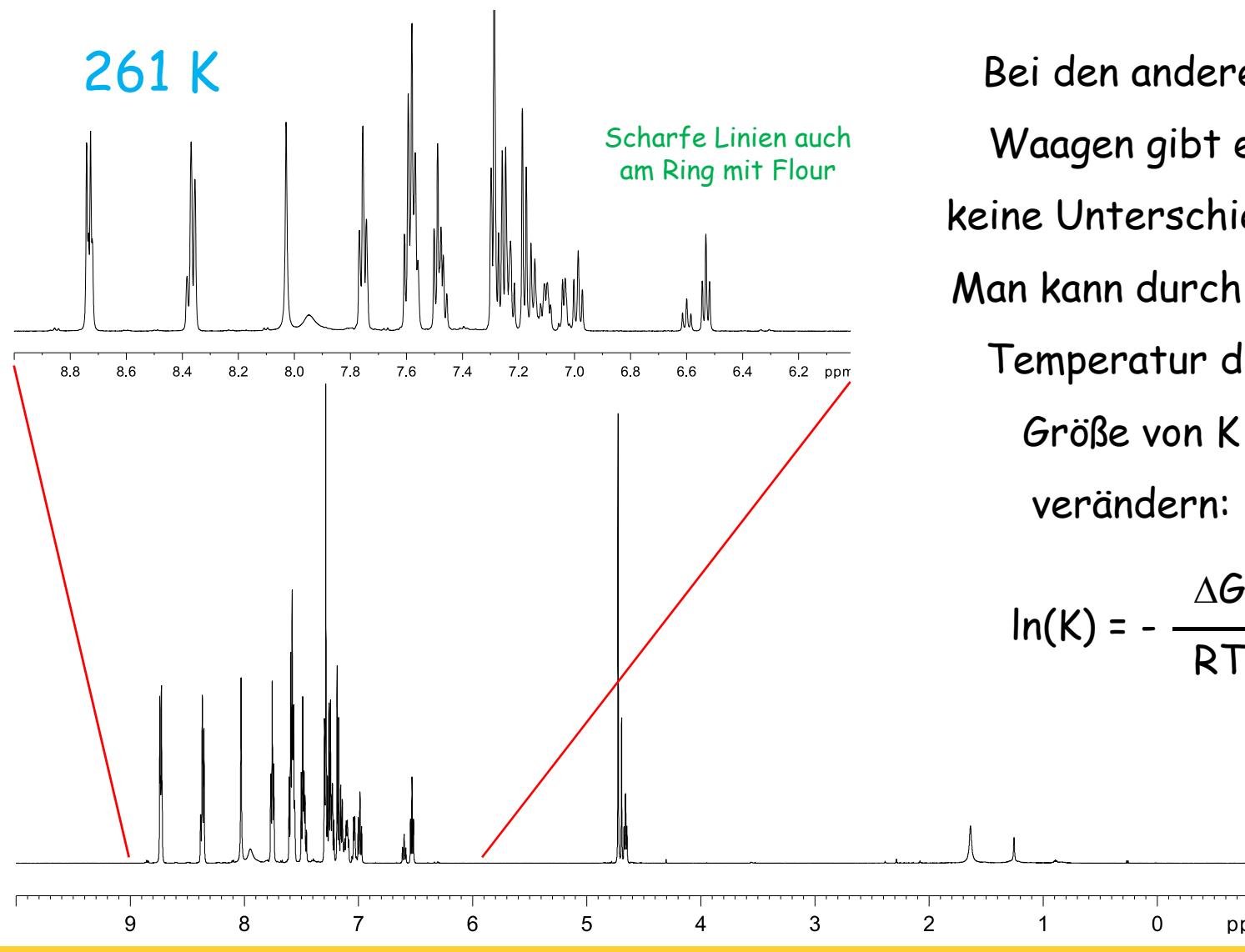
Vorlesung "Molekulare Biophysik": NMR-Spektroskopie

Peter Schmieder
AG NMR

Molekular-Waagen

261 K

Scharfe Linien auch am Ring mit Flour



Bei den anderen
Waagen gibt es
keine Unterschiede.
Man kann durch die
Temperatur die
Größe von K
verändern:

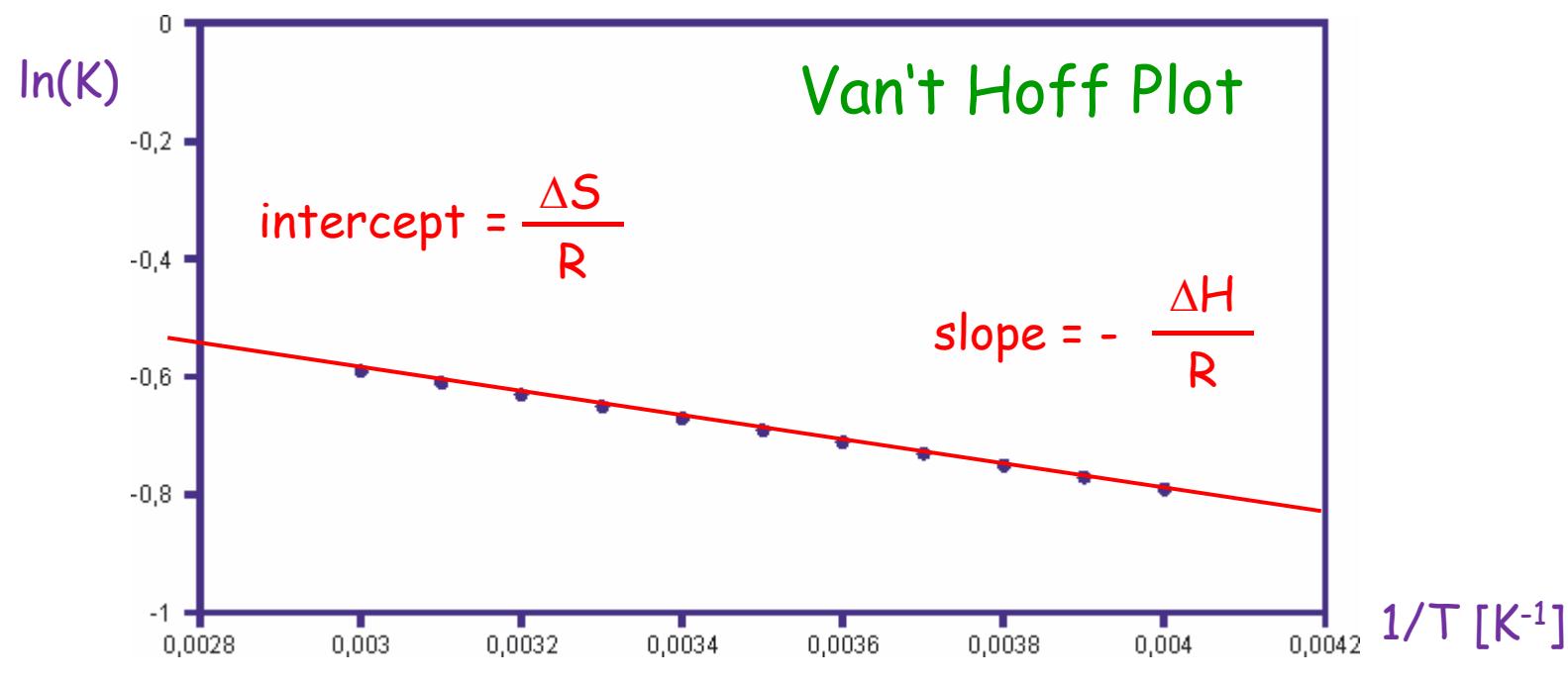
$$\ln(K) = - \frac{\Delta G}{RT}$$



Molekular-Waagen

Macht man die Messung dann systematisch bei anderen Temperaturen
bekommt man noch weitere Parameter

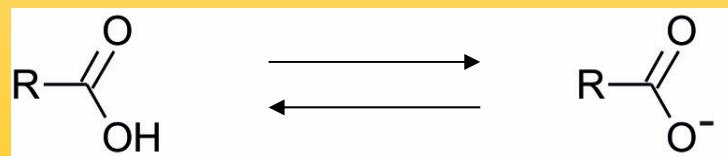
$$\ln(K) = -\frac{\Delta G}{RT} = -\frac{(\Delta H - T\Delta S)}{RT} = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R}$$



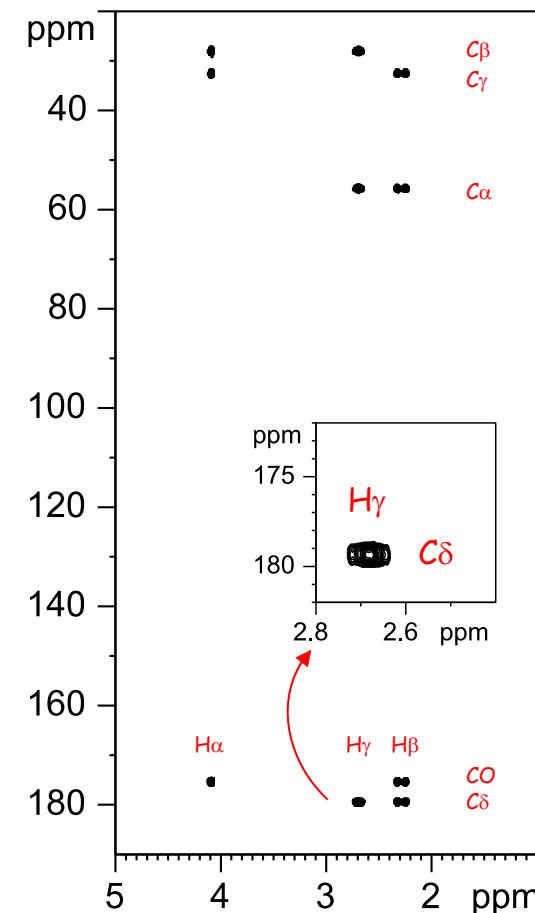
Bestimmung von pKa-Werten

Bestimmung von pKa-Werten

Eine andere Art der Bestimmung von Reaktionsparametern ist die Bestimmung von pKa-Werten, z.B. die der Seitenkette von Glutamat oder Apartat. Die chemische Verschiebung des Säure-CO hängt vom pH ab, man kann sie entweder aus einem 1D oder einem HMBC erhalten

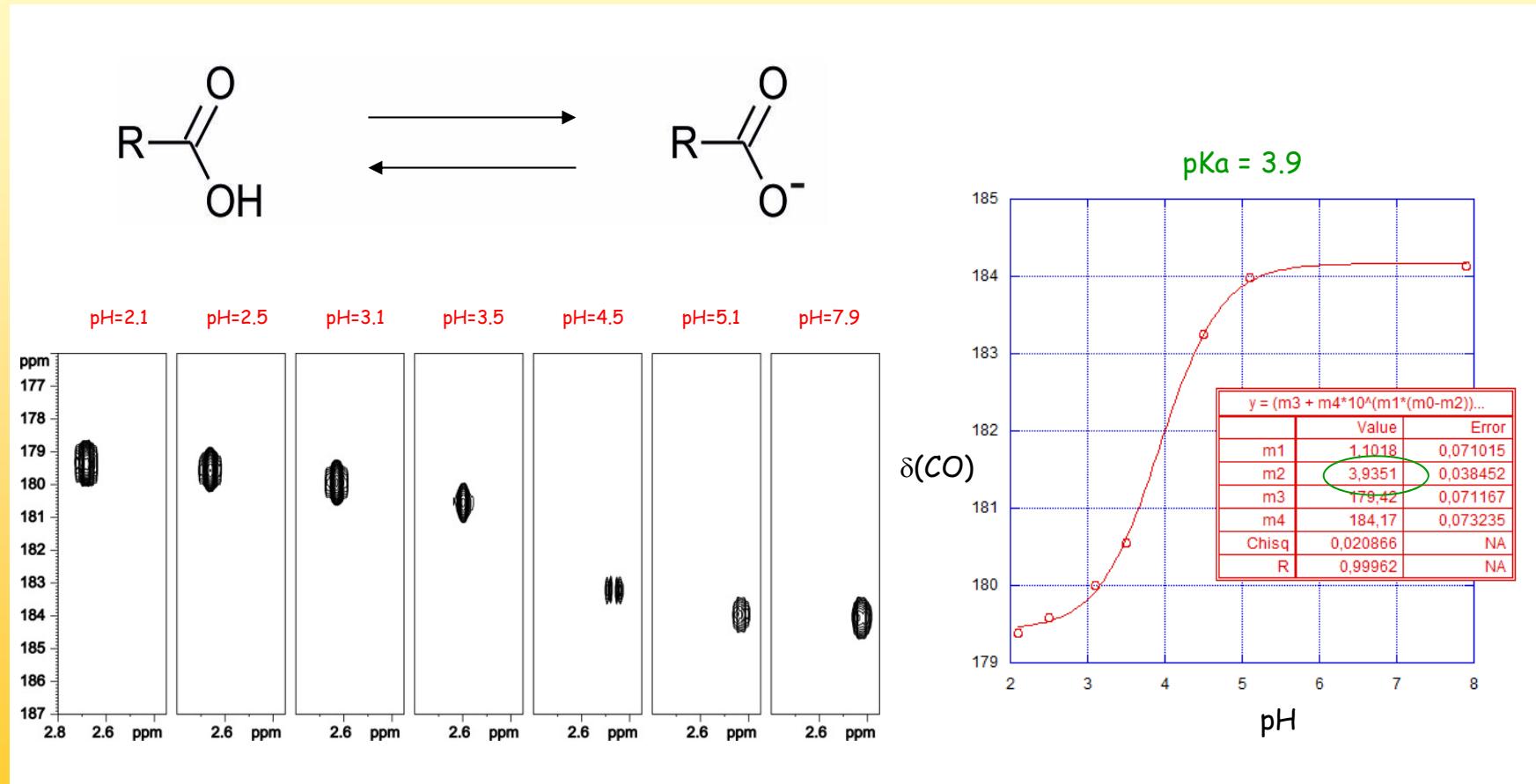


¹³C-HMBC of Glutamate



Bestimmung von pKa-Werten

Man variiert also den pH und verfolgt die Veränderung in der chemischen Verschiebung



Liganden-„Screening“

Liganden-Screening

Die NMR-Spektroskopie eignet sich gut für das Studium von Protein-Ligand-Interaktionen. Da solche Wechselwirkungen die magnetische Umgebung ändern, können sie durch Änderungen der chemischen Verschiebung oder anderer Parameter beobachtet werden.

Besonders wichtig ist dass schwache Wechselwirkungen beobachtbar sind (oft leichter als feste), die in anderen Experimenten nicht detektierbar sind.



Liganden-Screening

Unterschied zwischen "starker" und "schwacher" Bindung:

Starke Bindung: Protein und Ligand bilden eine Einheit.

Schwache Bindung: der Ligand ist fast unabhängig vom Protein.

Unterschied zwischen "kleine" und "großen" Molekülen:

Diffusionsgeschwindigkeit

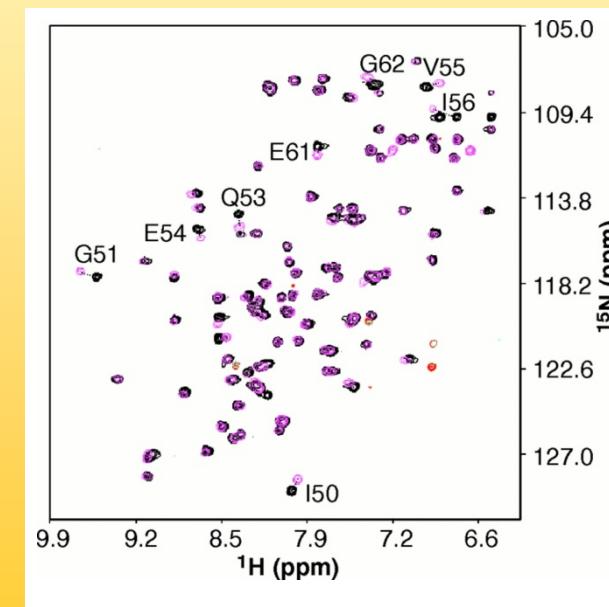
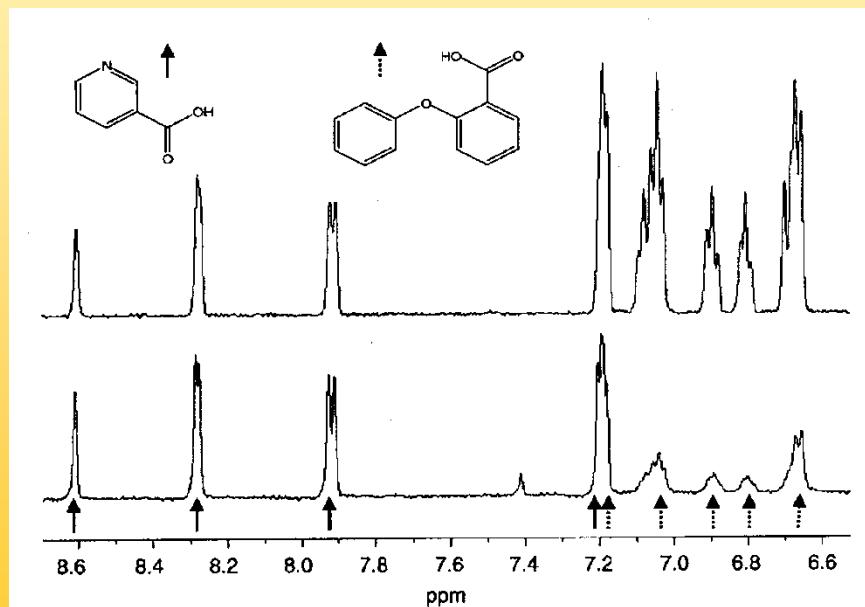
Rotationsgeschwindigkeit (Relaxation, NOE-Effekt, Spin-Diffusion)



Liganden-Screening

Im Prinzip gibt es zwei Wege die Wechselwirkungen zu beobachten:

Liganden-detektiert und Protein-detektiert



Liganden-Screening

Liganden-Detektion beobachtet Veränderungen am Liganden, benötigt keine Protein-Markierung, kleine Protein-Mengen und kann bei sehr großen Proteinen verwendet werden. Es liefert aber keine Information über die Interaktionsstelle am Protein.



Liganden-Screening

Protein-Detektion beobachtet Veränderungen am Protein, benötigt daher markiertes Protein und eine Zuordnung der Protein-Resonanzen, also einen erhöhten Aufwand. Und es gibt eine Größen-Obergrenze. Dafür steht aber Information über die Bindungsstelle zur Verfügung.



Liganden-Screening

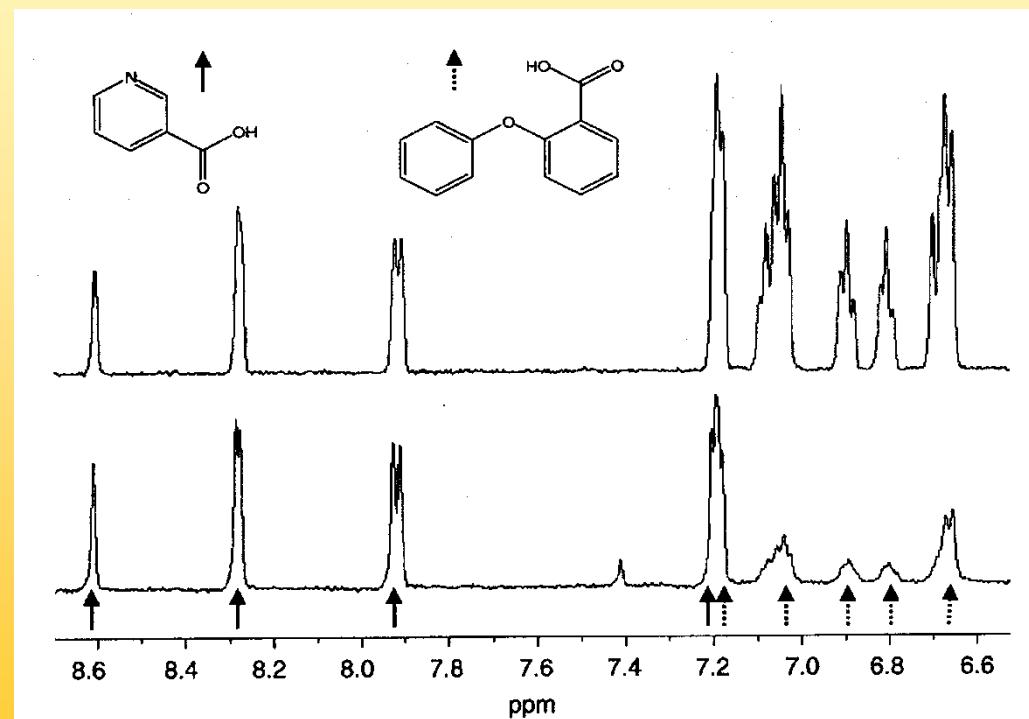
Liganden-detektierende Methoden

^1H -NMR



Liganden-Screening

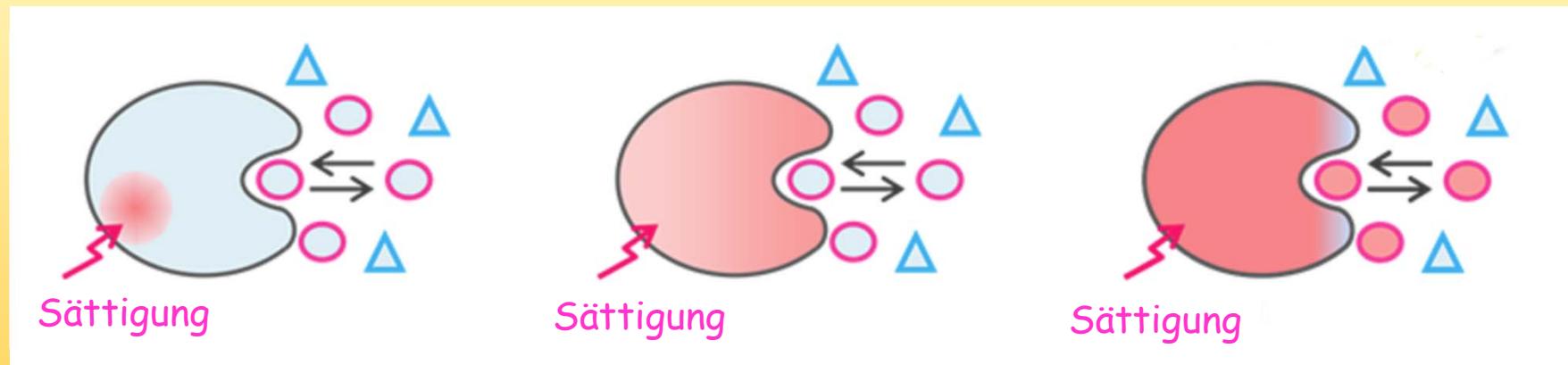
Liganden-detektierte Verfahren basieren auf der Tatsache, dass durch die Wechselwirkung bestimmte Eigenschaften des Proteins auf den Liganden übertragen werden, z.B. die Linienbreite (also Relaxationseigenschaften).



Liganden-Screening

STD

Eine viel verwendete Methode ist das STD-Experiment (Saturation Transfer Difference), das auf der Differenz zweier 1D-Spektren (mit und ohne Sättigung und Spin-Diffusion) beruht.

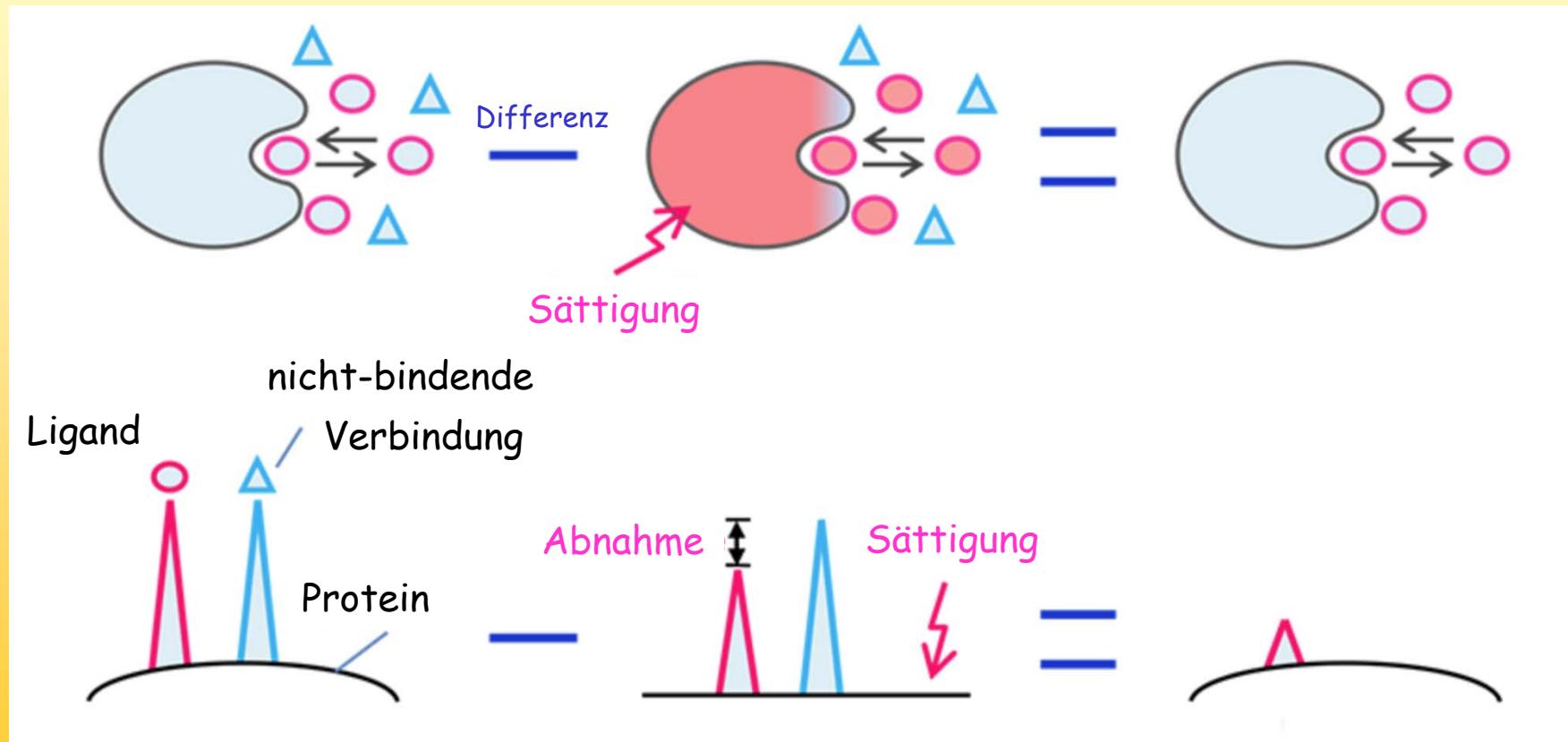


Besonders bei größeren Proteinen verteilt sich die Signal-Sättigung an einer Stelle zügig über das gesamte Protein und dann auch auf Liganden



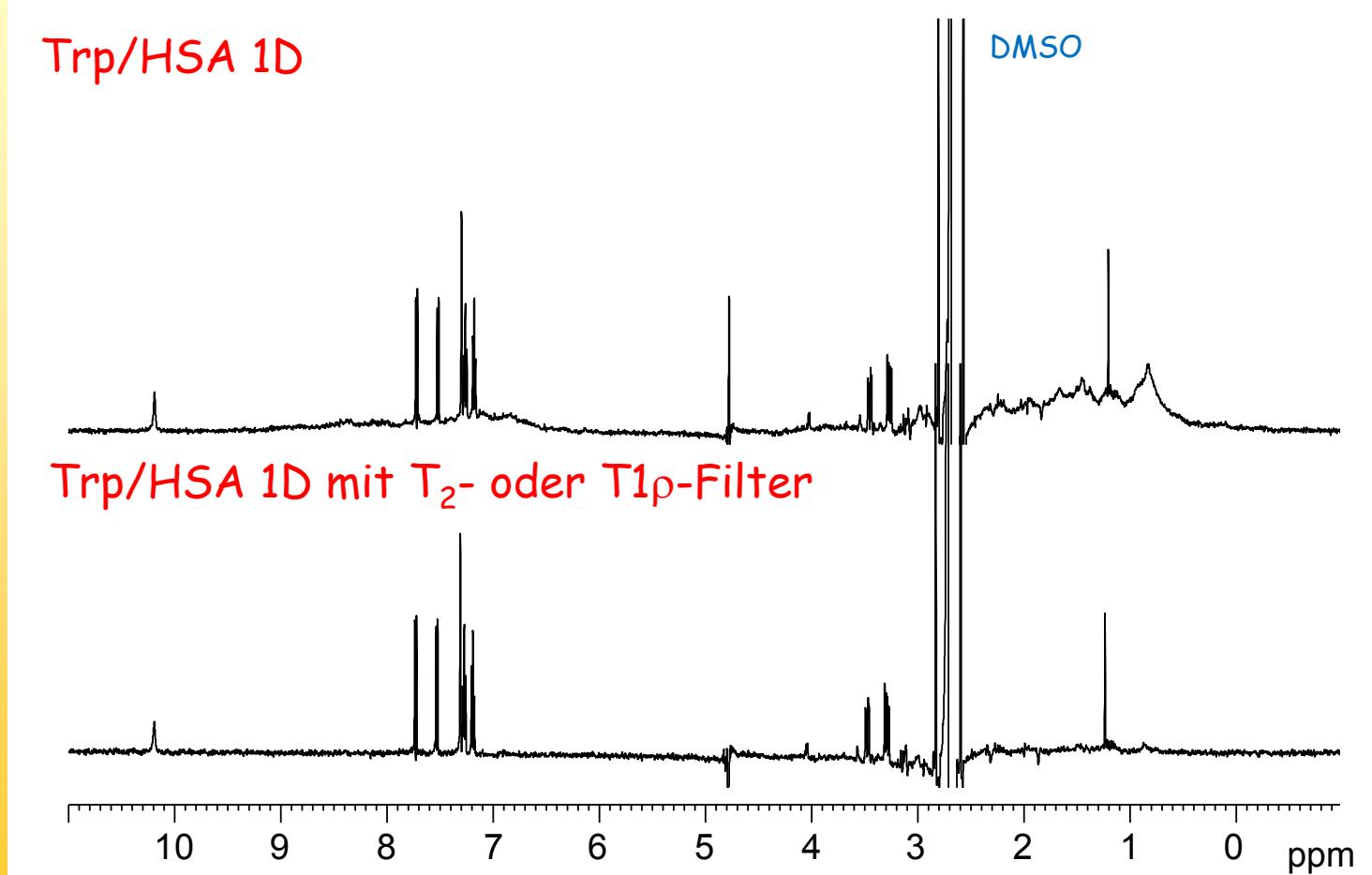
Liganden-Screening

Um die Liganden im Spektrum gut sichtbar zu machen bildet man die Differenz zwischen gesättigtem und Referenz-Spektrum



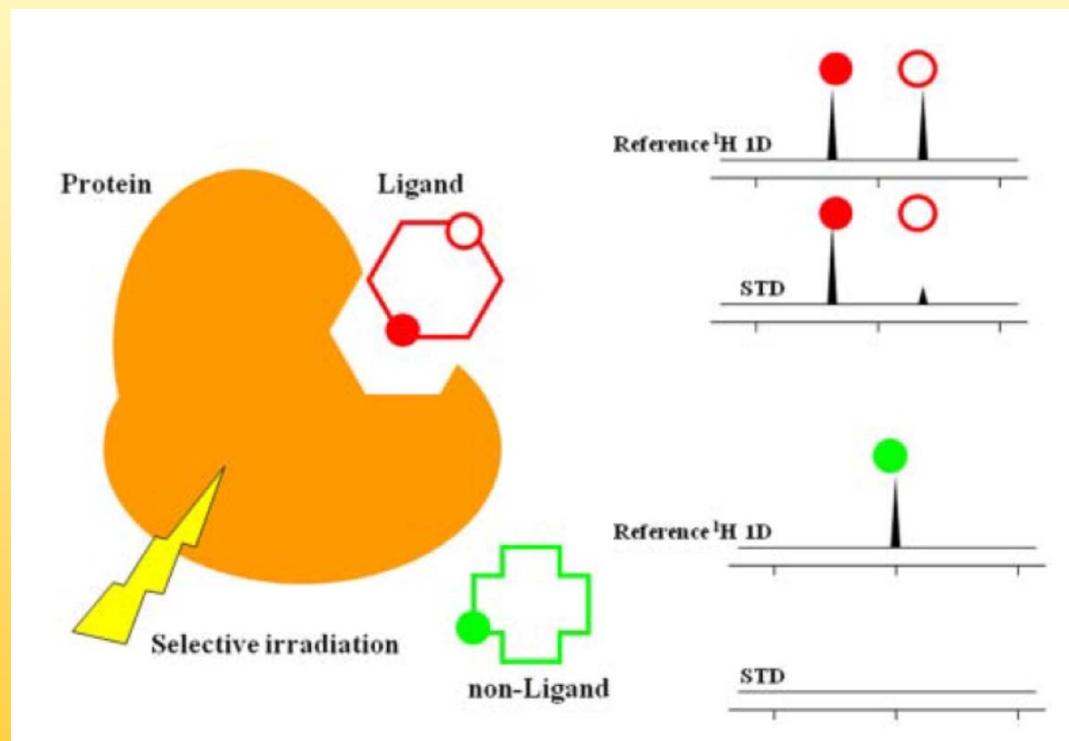
Liganden-Screening

Um das Protein zu entfernen nutzt man dessen schnellere Relaxation



Liganden-Screening

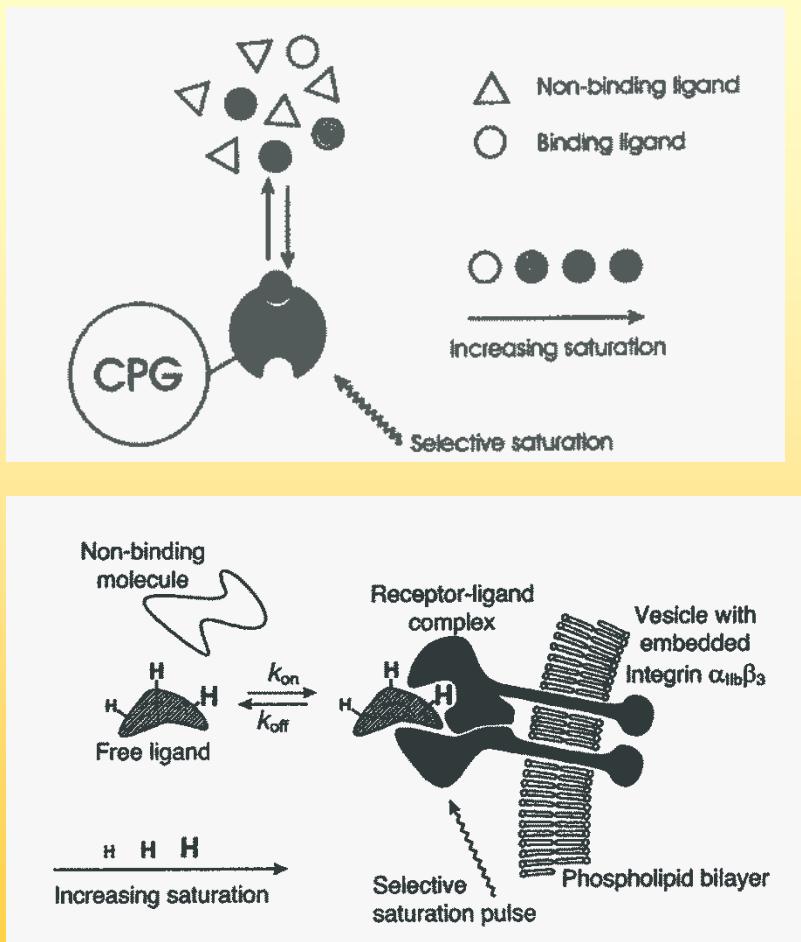
Da die Länge der Sättigung bestimmt wie weit sie auf den Liganden übertragen wird ist bei sorgfältigem Einstrahlen ist auch ein „Epitope-Mapping“ möglich.



N. Hiraishi et. Al *J Dent Res* 92(3):284-288, 2013



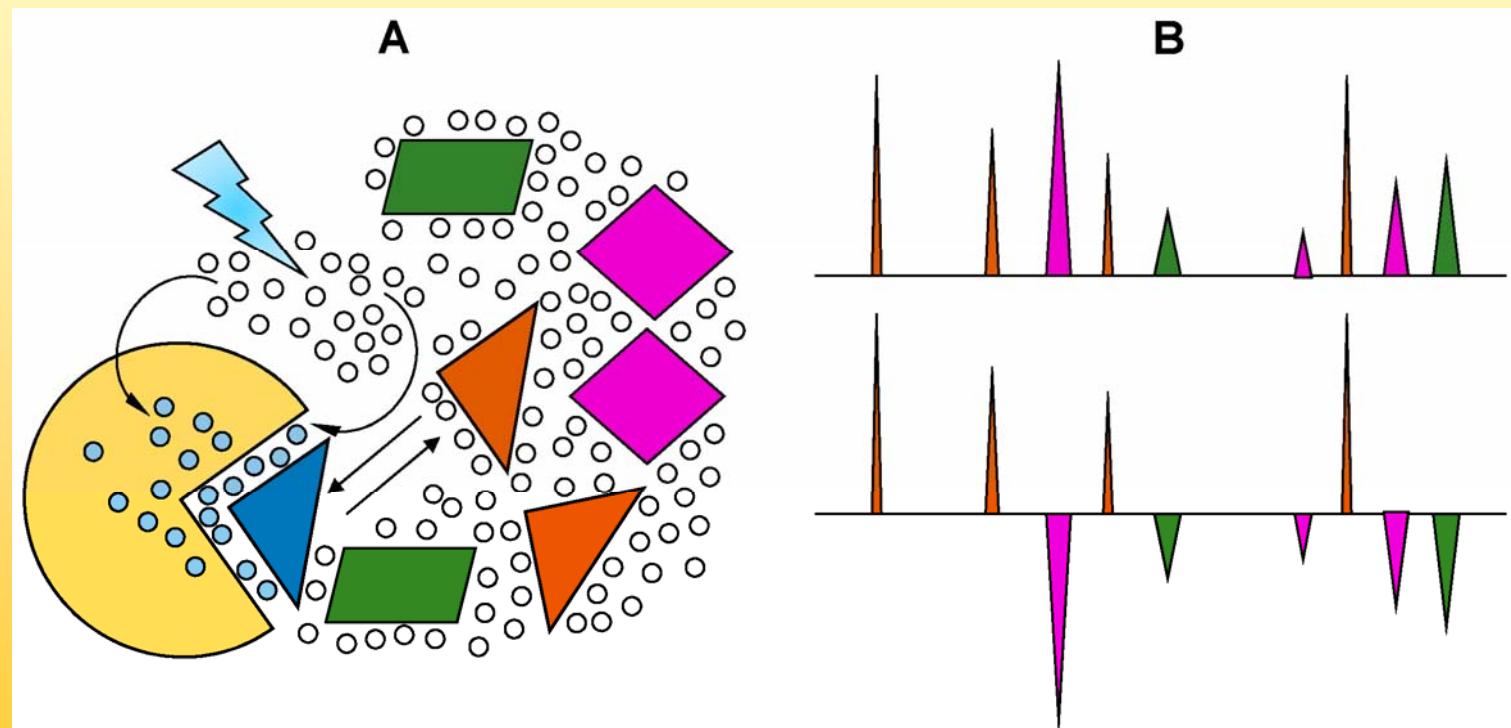
Liganden-Screening



Die Methode kann auch in der Festkörper-NMR-Spektroskopie und bei solubilisierten Rezeptoren verwendet werden.

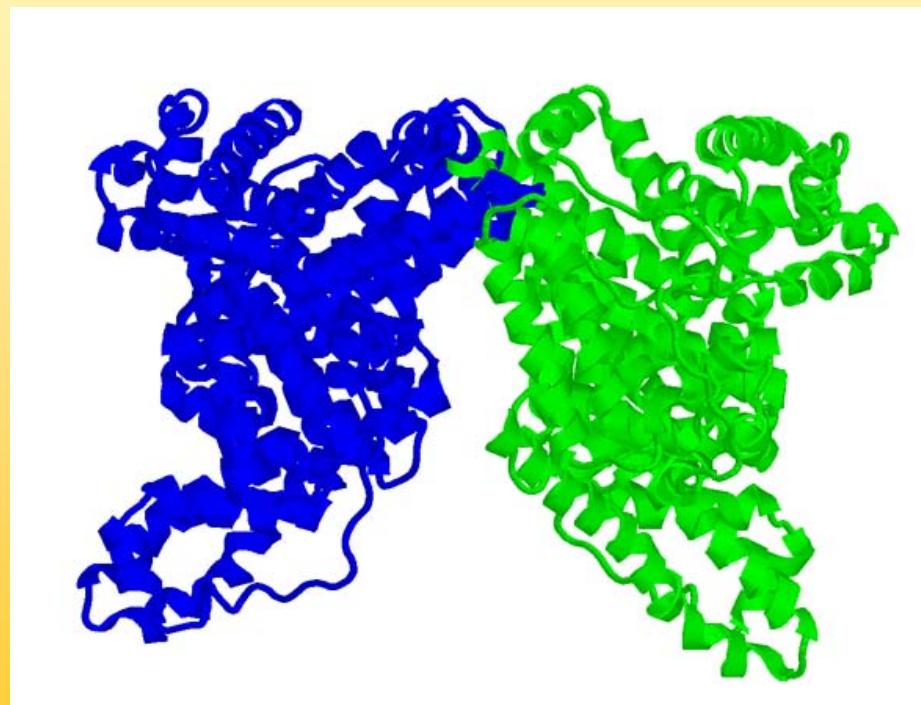
Liganden-Screening

Eine andere Methode, um die Bindung kleiner Liganden zu detektieren, ist das **WaterLOGSY**. Hier wird der Unterschied in der Wasserhülle von gebundenen und ungebundenen Liganden genutzt.



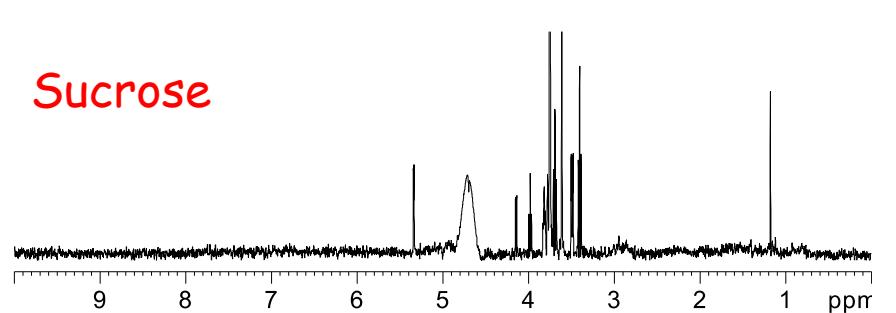
Liganden-Screening

Als Beispiel verwenden wir die Wechselwirkung von kleinen Molekülen mit Serum Albumin (HSA), die Experimente werden normalerweise mit einer Proteinkonzentration von $10 \mu\text{M}$ und einer Ligandenkonzentration von $200 \mu\text{M}$ durchgeführt.

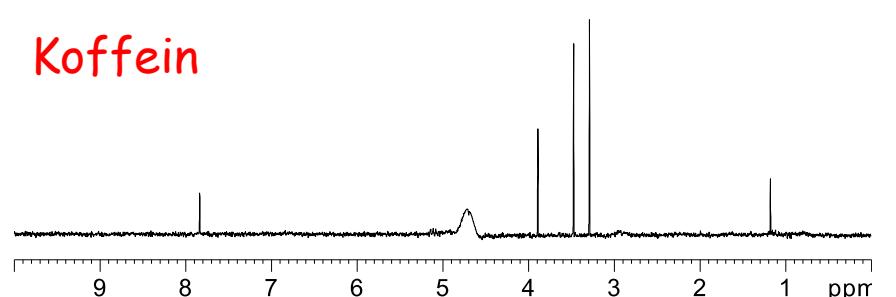


Liganden-Screening

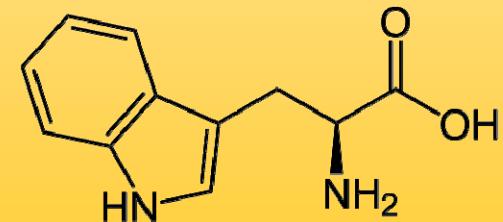
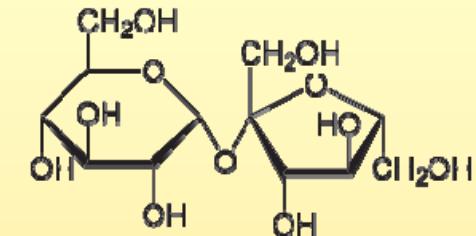
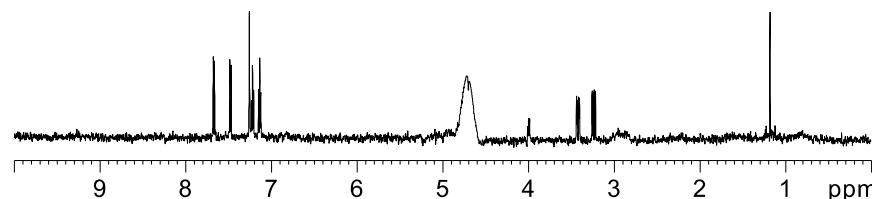
Sucrose



Koffein

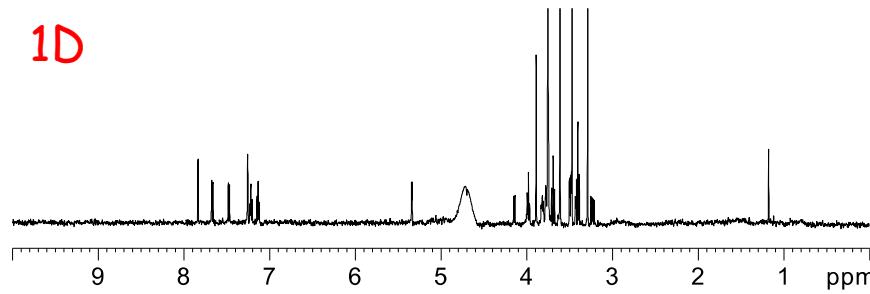


Tryptophan

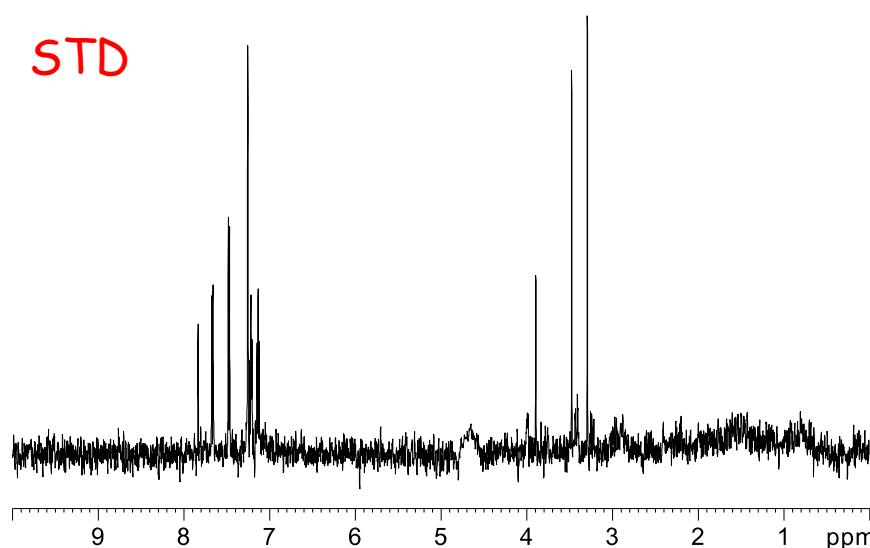


Liganden-Screening

1D



STD

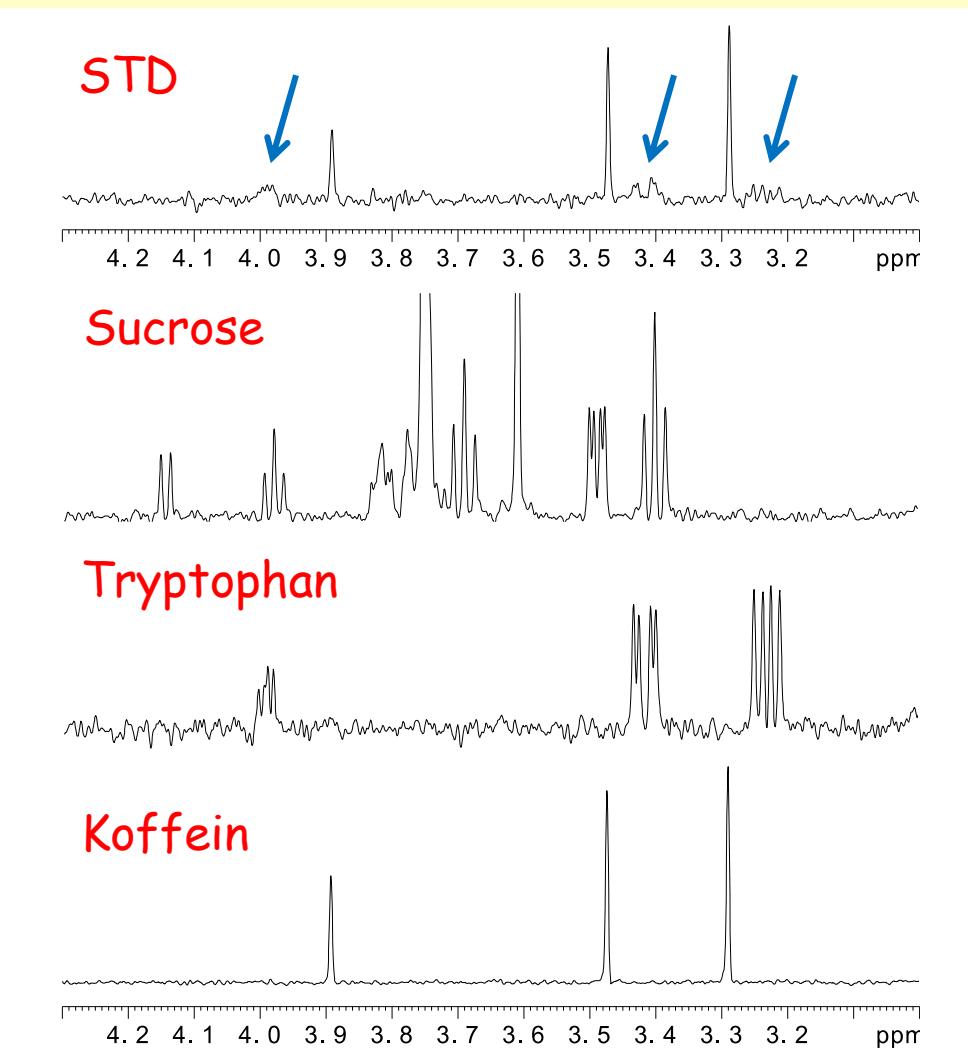


In einem STD-Experiment mit allen drei Verbindungen und HSA tauchen Signale nicht von allen Liganden auf.

Man beachte die Aromatensignale von Tryptophan !



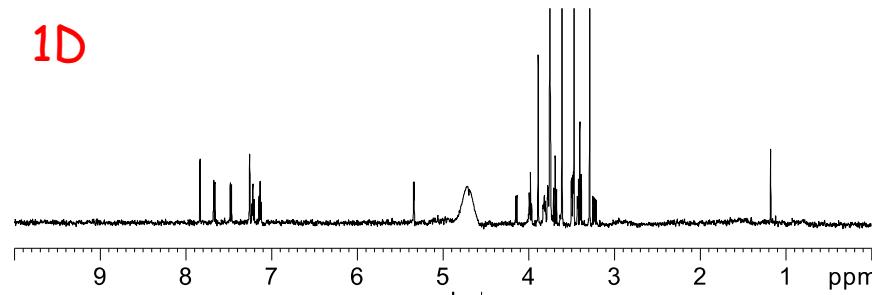
Liganden-Screening



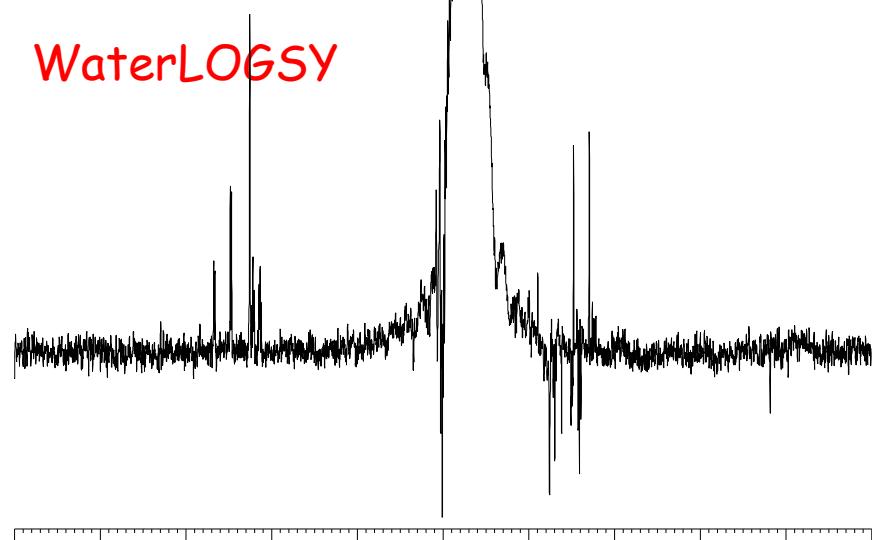
Ein Blick in die Region zwischen 3 und 4 ppm zeigt das Sucrose nicht an HAS bindet während Tryptophan und Koffein es tun.

Liganden-Screening

1D



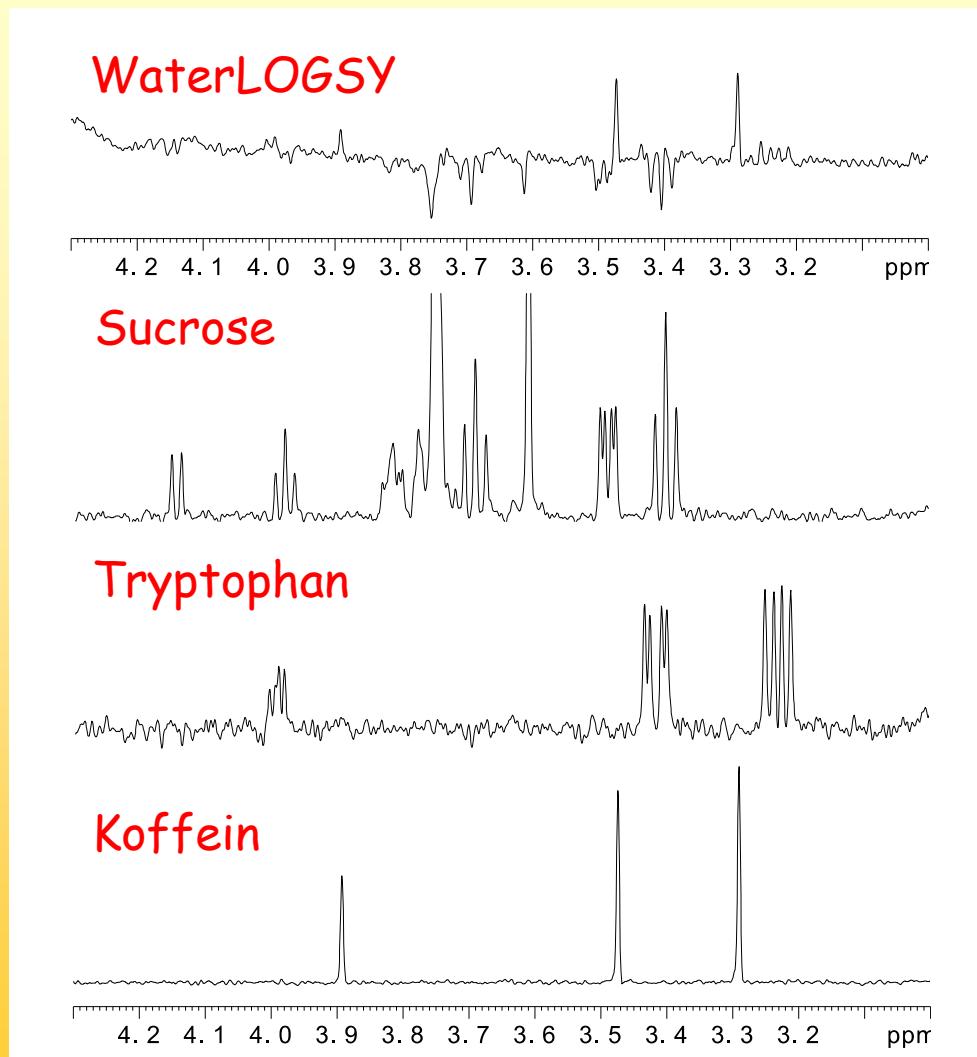
WaterLOGSY



In einem WaterLOGSY sollten wir das gleiche Resultat bekommen, hier zeigen nicht-bindende, kleine Moleküle Signale mit negativem Vorzeichen.



Liganden-Screening



Wieder schauen wir in die Region zwischen 3 und 4 ppm und sehen das Sucrose nicht bindet, während die anderen beiden positive Signale und damit Bindung zeigen.



Liganden-Screening

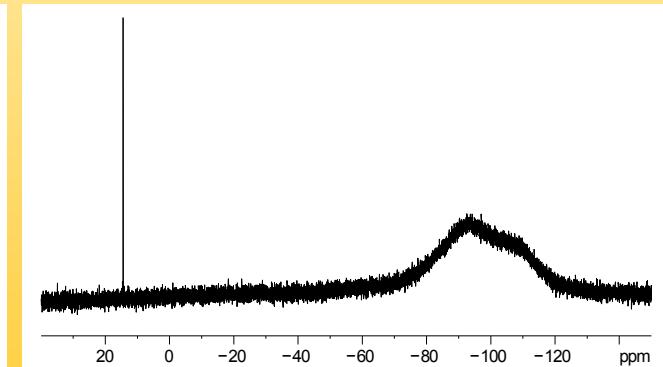
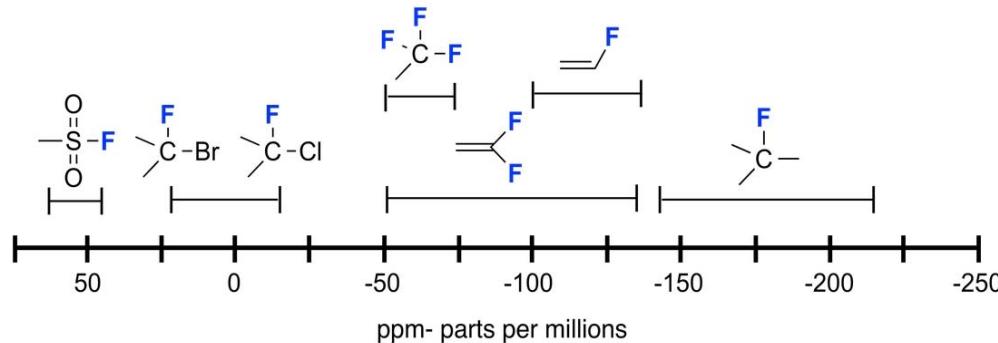
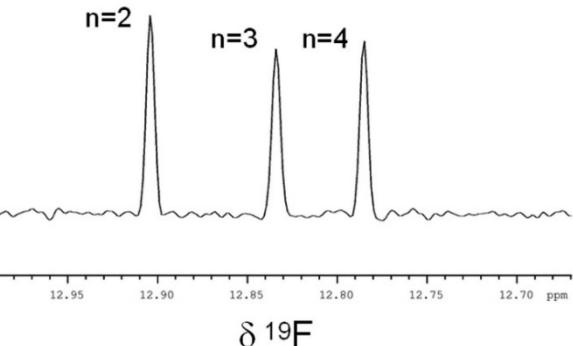
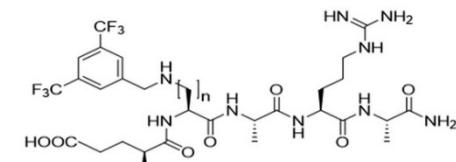
Liganden-detektierende Methoden

^{19}F -NMR



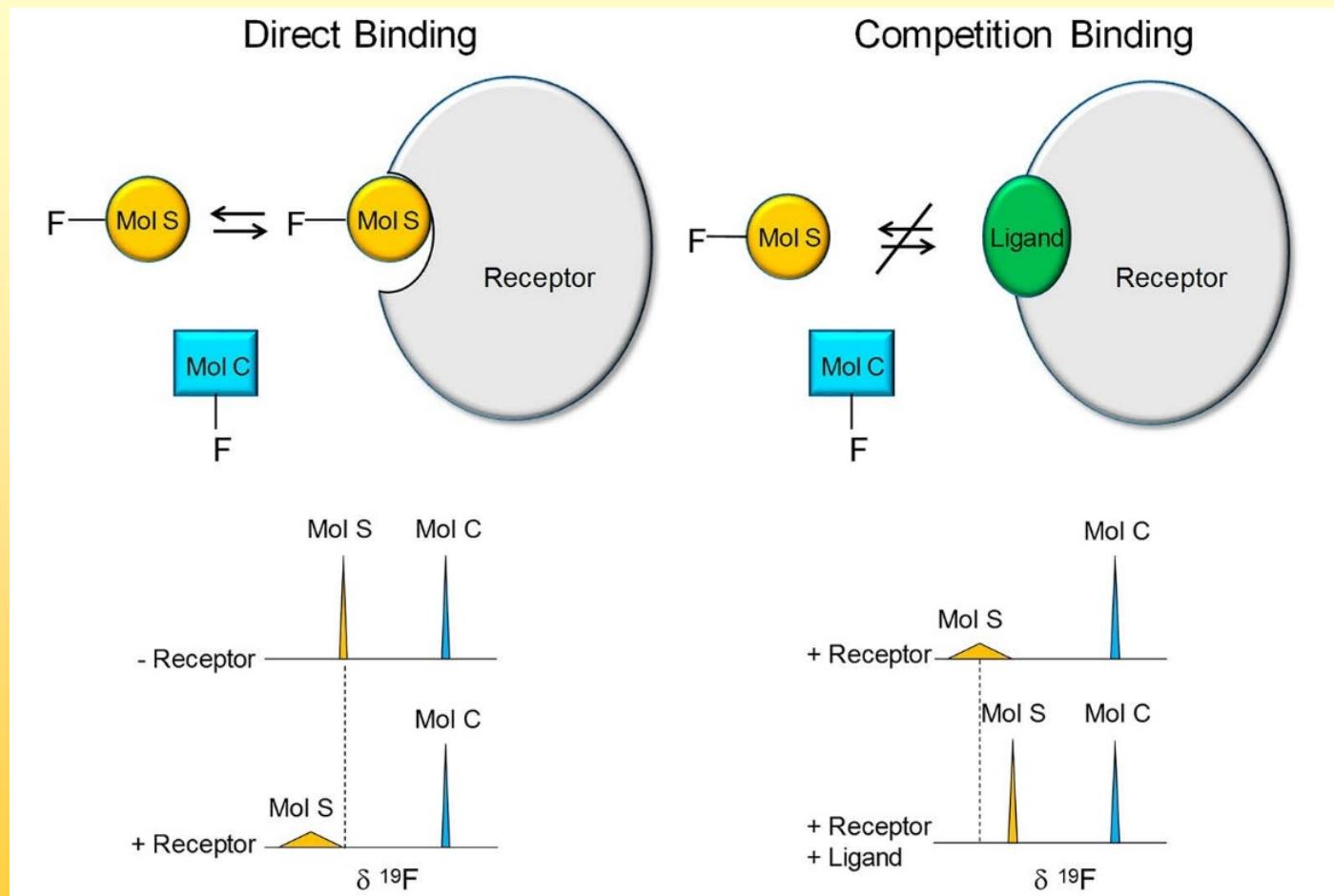
Liganden-Screening

^{19}F ist ein guter NMR-Kern, es hat eine hohe Empfindlichkeit (~ 90% von ^1H), ist eine Rein-Element (100% natürliche Häufigkeit) und zeigt eine gute Signal-Dispersion. Es kann ^1H in Molekülen gut ersetzen und es gibt keinen natürlichen Hintergrund



Liganden-Screening

Man kann auch Moleküle ohne Fluor untersuchen



C. Dalvit, A. Vulpetti J. Med. Chem. (2019) 62, 2218-2244

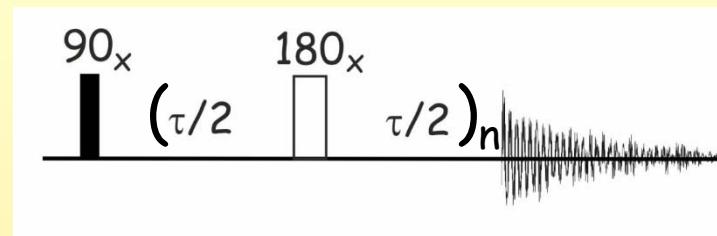


LEIBNIZ-INSTITUT
FÜR MOLEKULARE
PHARMAKOLOGIE

Vorlesung "Molekulare Biophysik": NMR-Spektroskopie

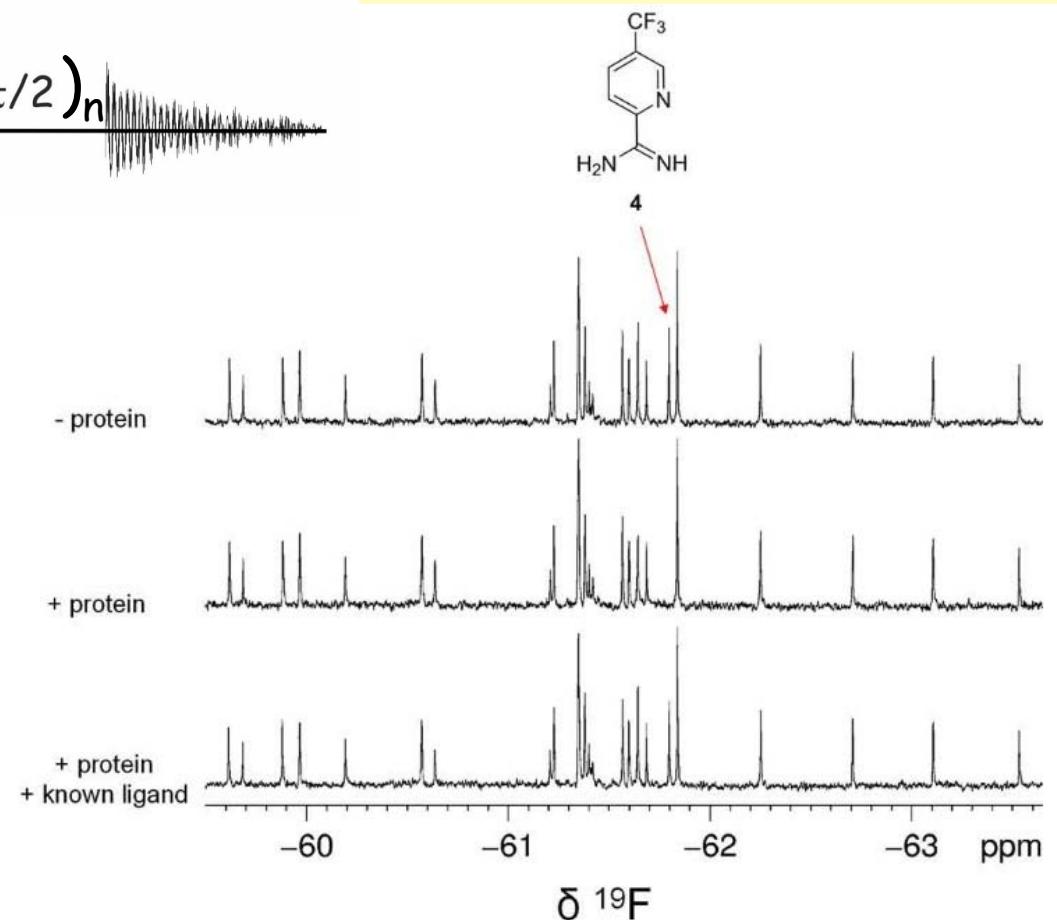
Peter Schmieder
AG NMR

Liganden-Screening



Wegen der guten
Dispersion der Signale im
 ^{19}F -Spektrum kann man
viele Verbindungen
gleichzeitig untersuchen.

Man verwendet meist
einen T_2 -Filter (CPMG)
um verbreiterte Signale
zu entfernen.

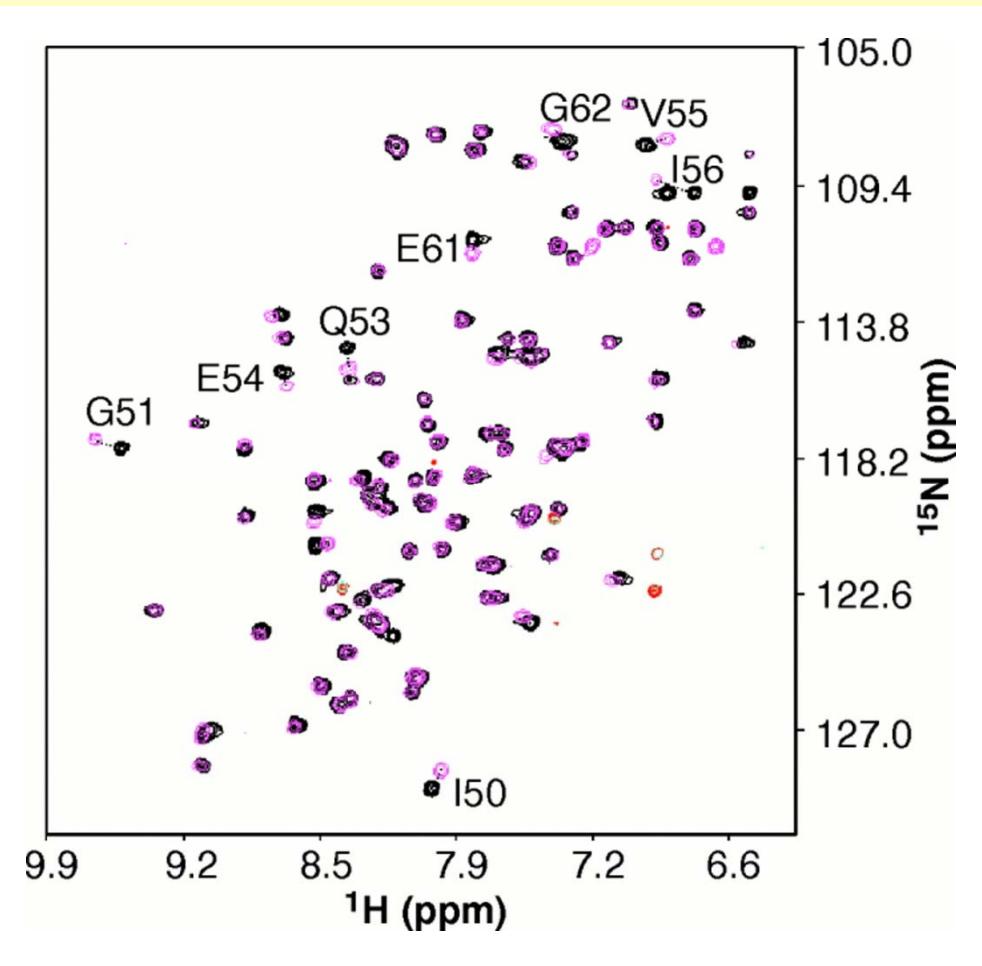


Liganden-Screening

Protein-detektierende Methoden



Liganden-Screening



Eine sehr bekannte
Methode ist

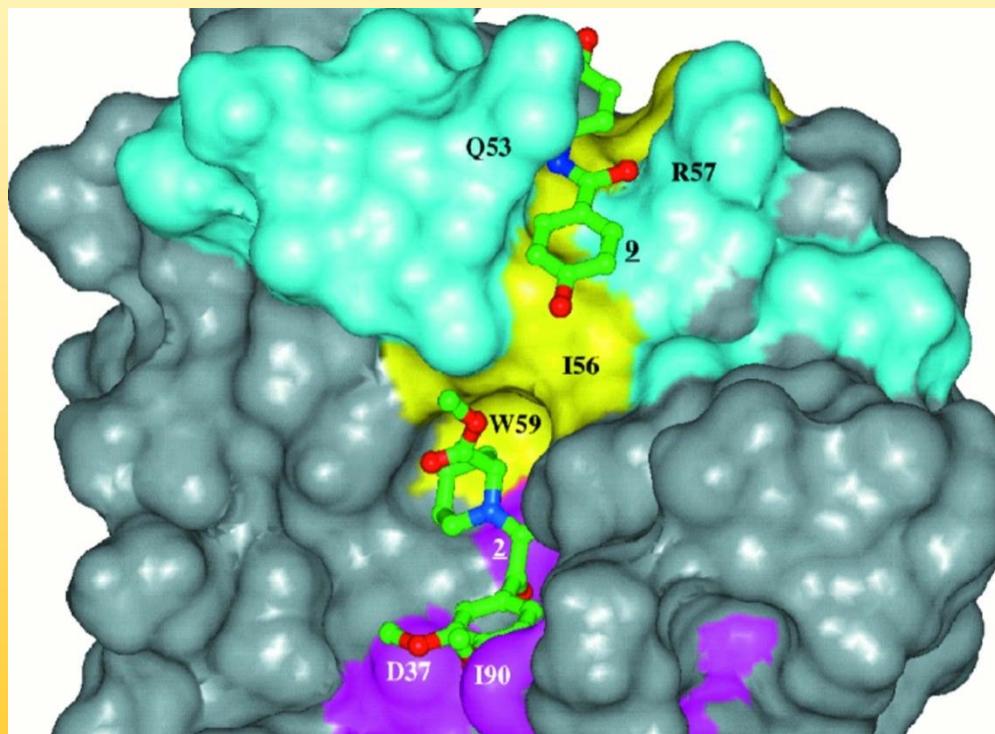
„SAR-by-NMR“

Bei der ein Vergleich
von ^1H , ^{15}N -HSQCs
mit und ohne Ligand
zur Detektion von
Bindung verwendet
wird.



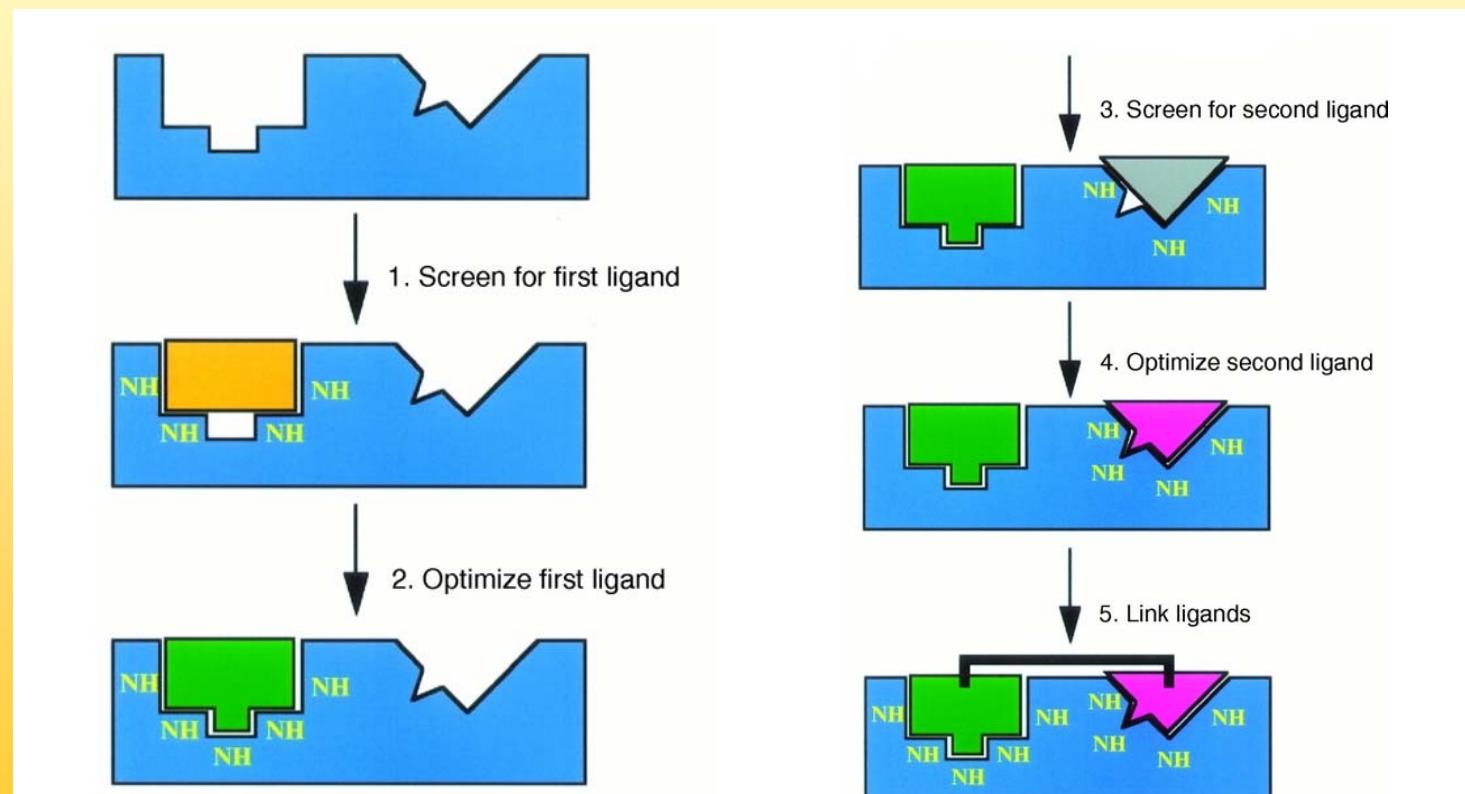
Liganden-Screening

Dabei ist es oft möglich die Interaktionsstelle zu bestimmen und auch eine Struktur des Ligand-Protein-Komplexes zu ermitteln.

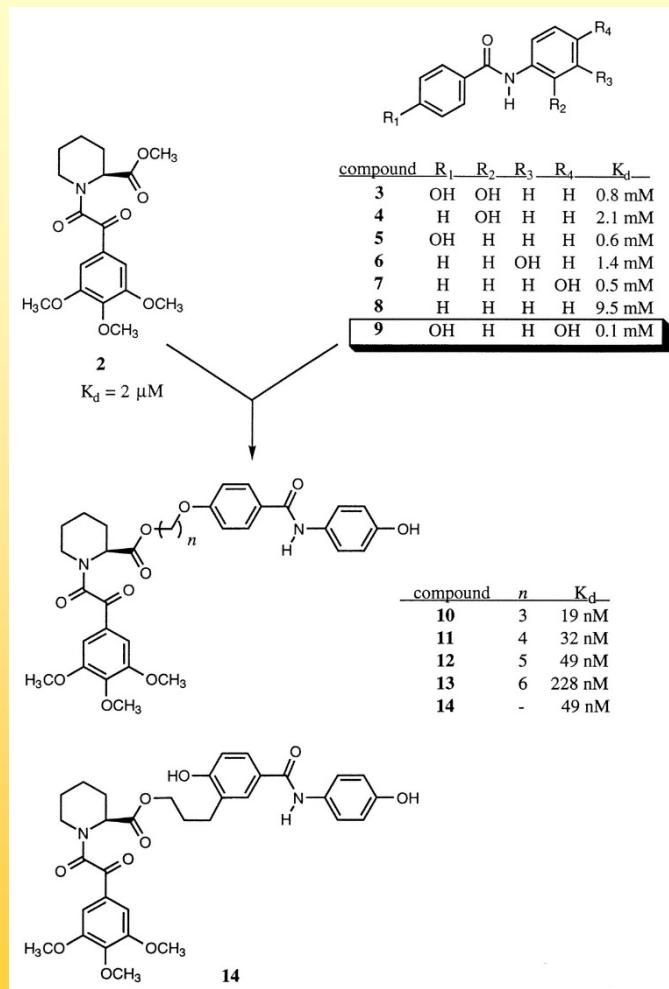


Liganden-Screening

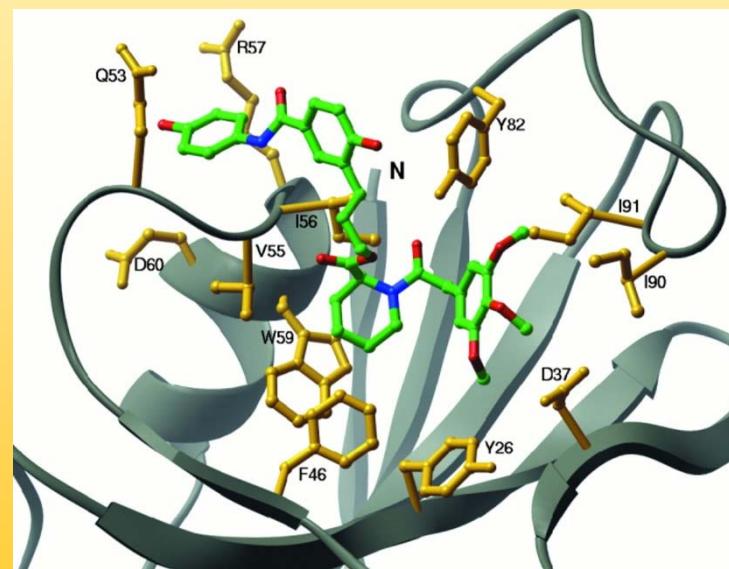
Mehrere schwach bindende Liganden, die an benachbarten Stellen binden, werden ermittelt und chemisch kombiniert.



Liganden-Screening



Was dann (hoffentlich) zu fest bindenden Liganden als neuen Leitstrukturen führt.

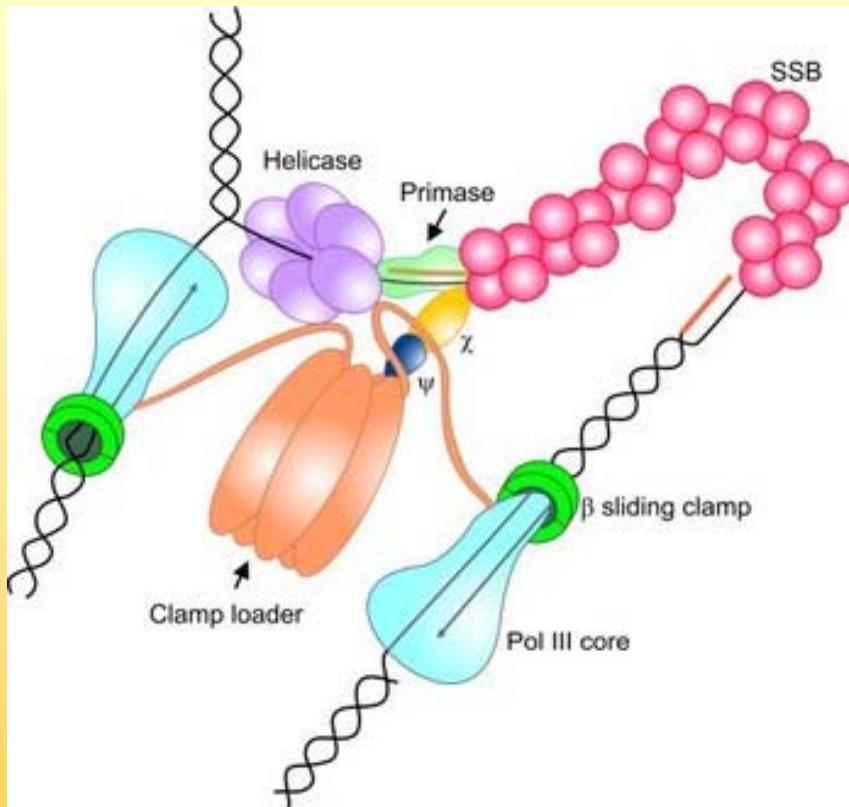


Liganden-Screening

Neben dem „Screening“ kann das gleiche Experiment natürlich auch zum Studium von Protein-Ligand-Wechselwirkungen genutzt werden. Dann wird nur ein, aus anderen Bindungsexperimenten schon bekannter Ligand eingesetzt und z.B. die Bindungsstelle ermittelt. Es kann auch die Bindungskonstante ermittelt werden, wenn man das Experiment als Titration durchführt und die Menge an Ligand kontinuierlich gesteigert wird.

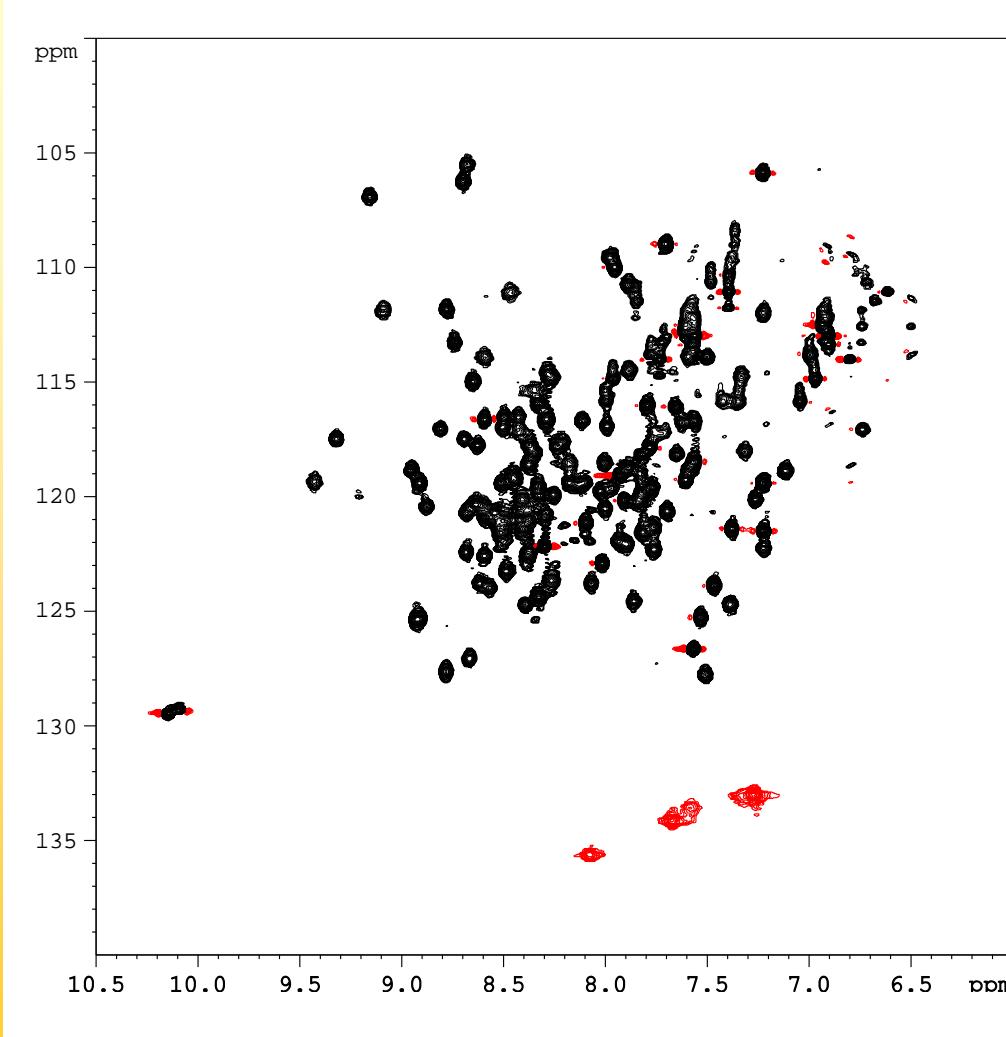


Liganden-Screening



Ein Beispiel ist die Wechselwirkung des C-Terminus des „single-strand-binding“ Proteins (SSB-ct-Peptid) innerhalb des Replikationskomplexes von Bakterien

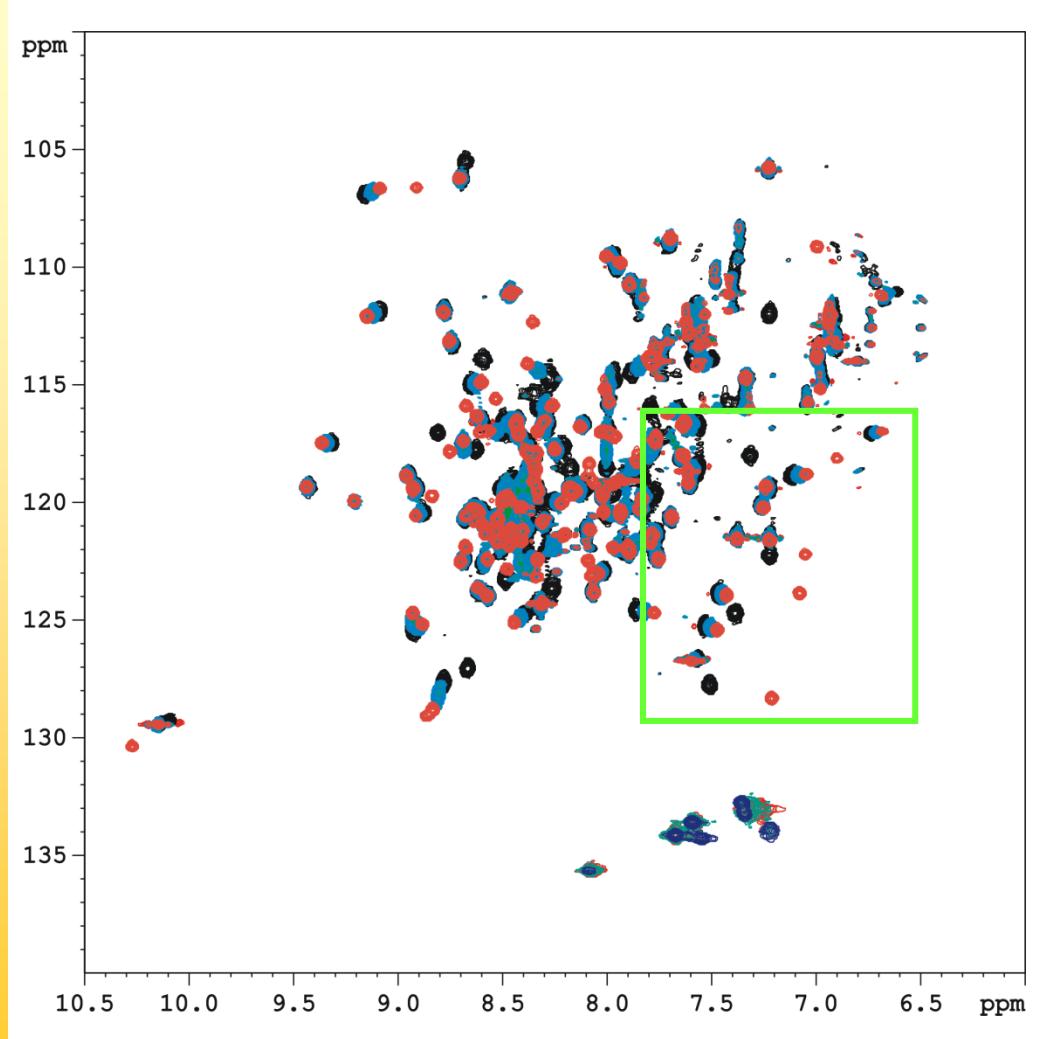
Liganden-Screening



Untersucht wird die C-terminale Domäne der Primase.
Diese muss dazu zunächst markiert und zugeordnet werden.



Liganden-Screening



Dann wird
titriert:
kein Peptid

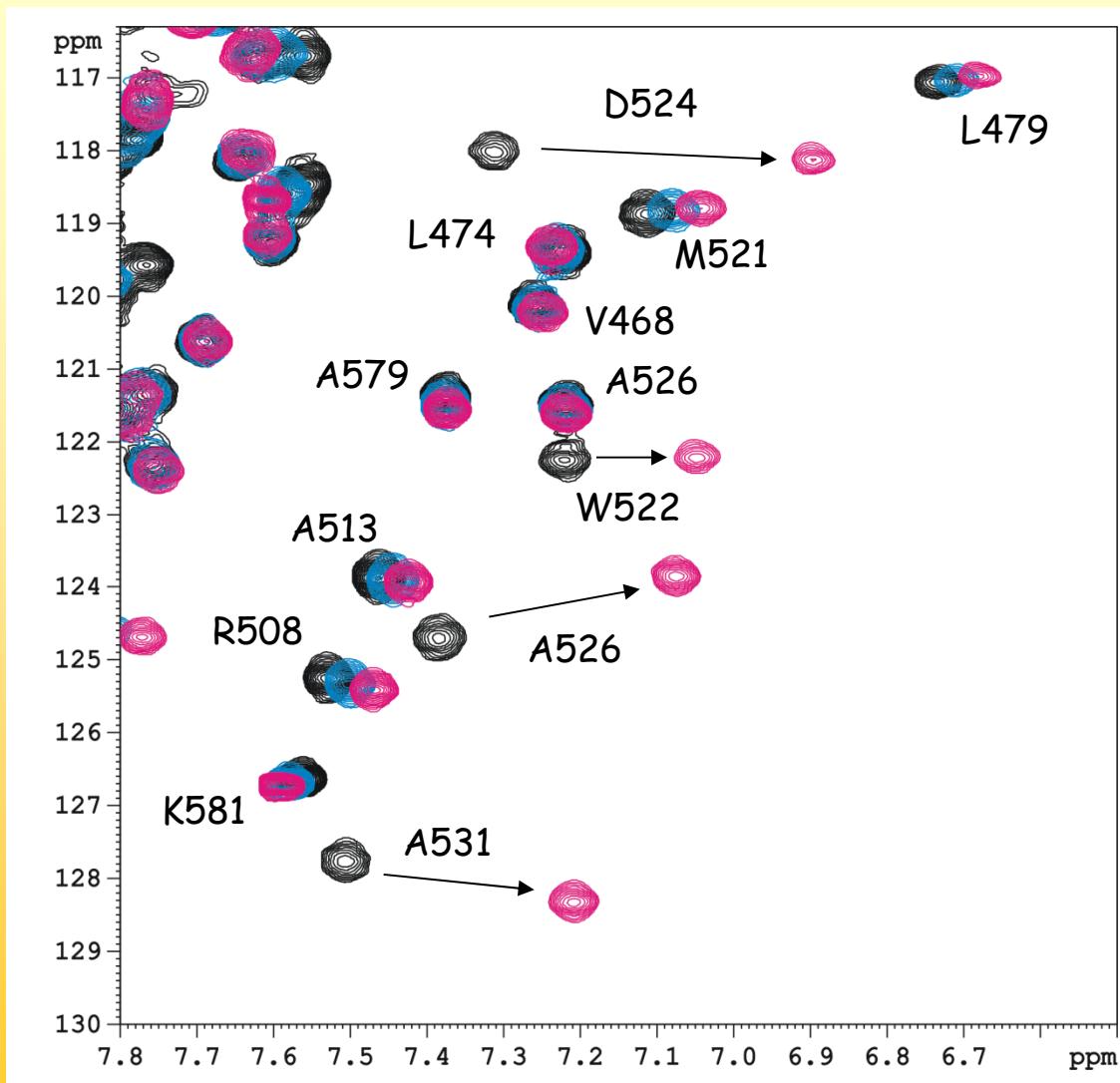
100 μM Peptid

300 μM Peptid

Kaum
Veränderung
mit 600 μM und
1 mM
Peptid



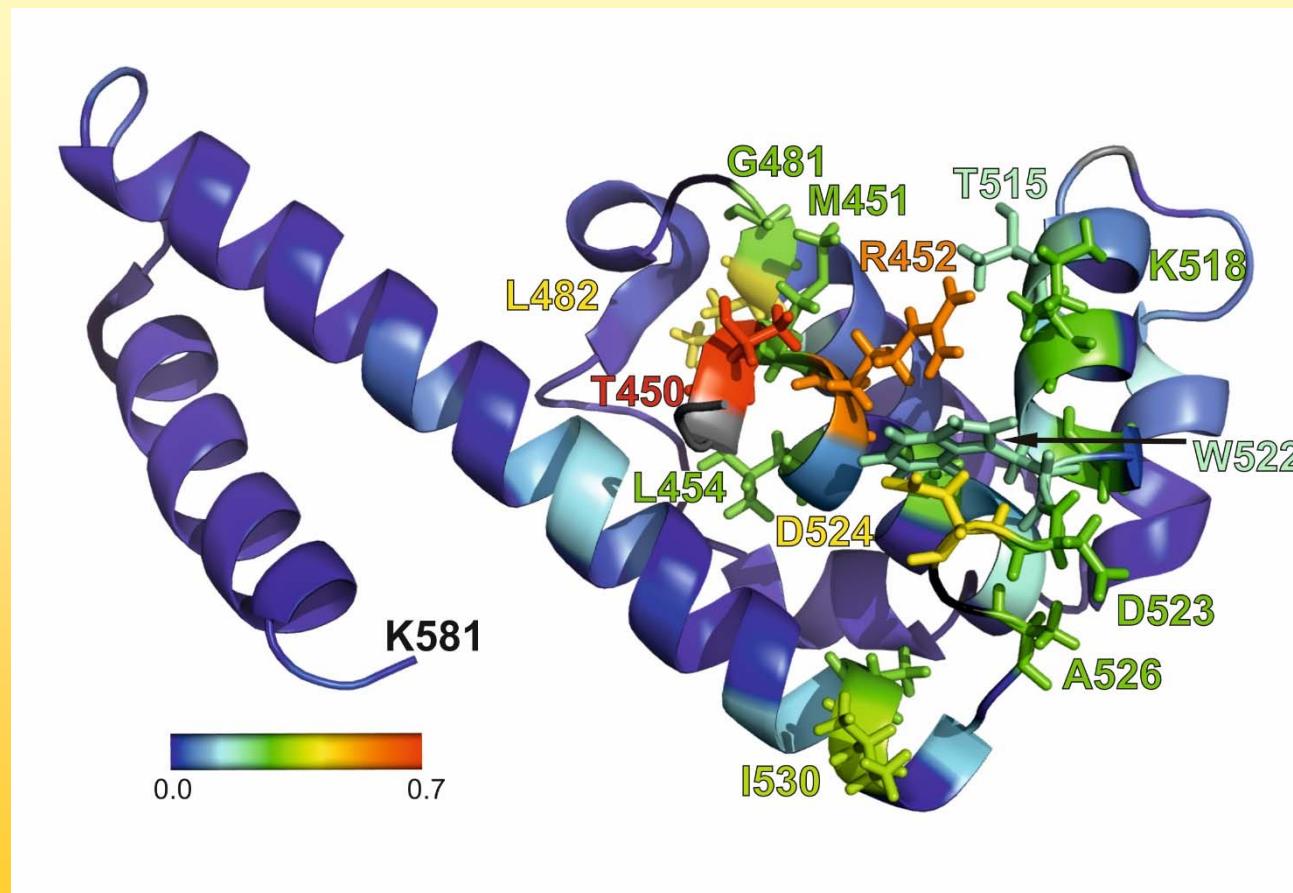
Liganden-Screening



Die Stärke der Veränderung ist ein qualitatives Maß für die Nähe zur Bindungsstelle

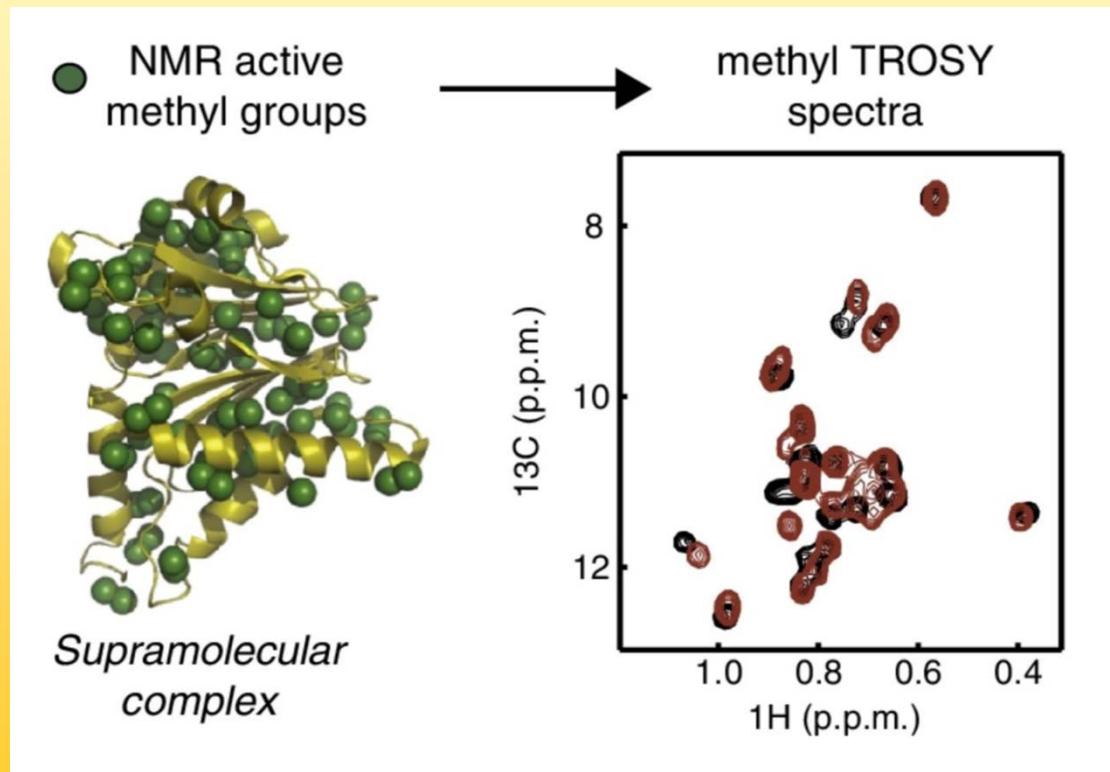
Liganden-Screening

Auf diese Art und Weise kann man die Bindungsstelle identifizieren



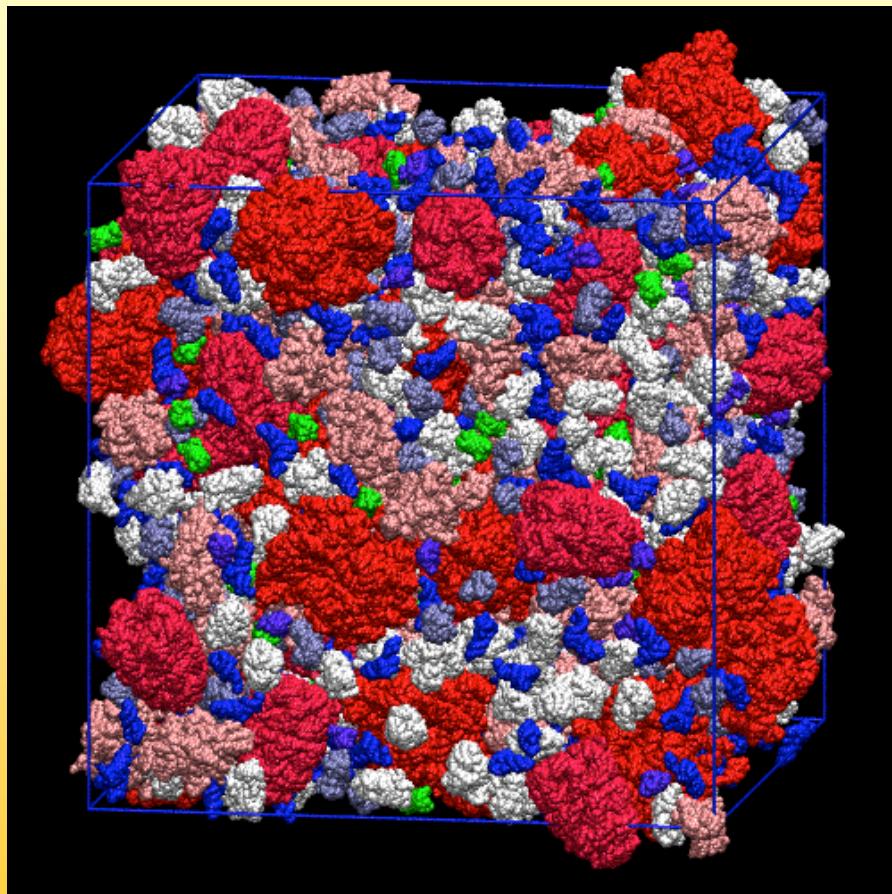
Liganden-Screening

Wir haben vorhin gesehen dass man bei Proteinen - gerade auch besonders großen - die Methylgruppen selektiv protonieren kann und dann sehr gut Spektren mit guter Auflösung aufnehmen kann. Das kann man natürlich auch zum Screenen verwenden, CH_3 -Gruppen sind auch oft in Bindungsstellen



In-cell NMR

In-cell NMR

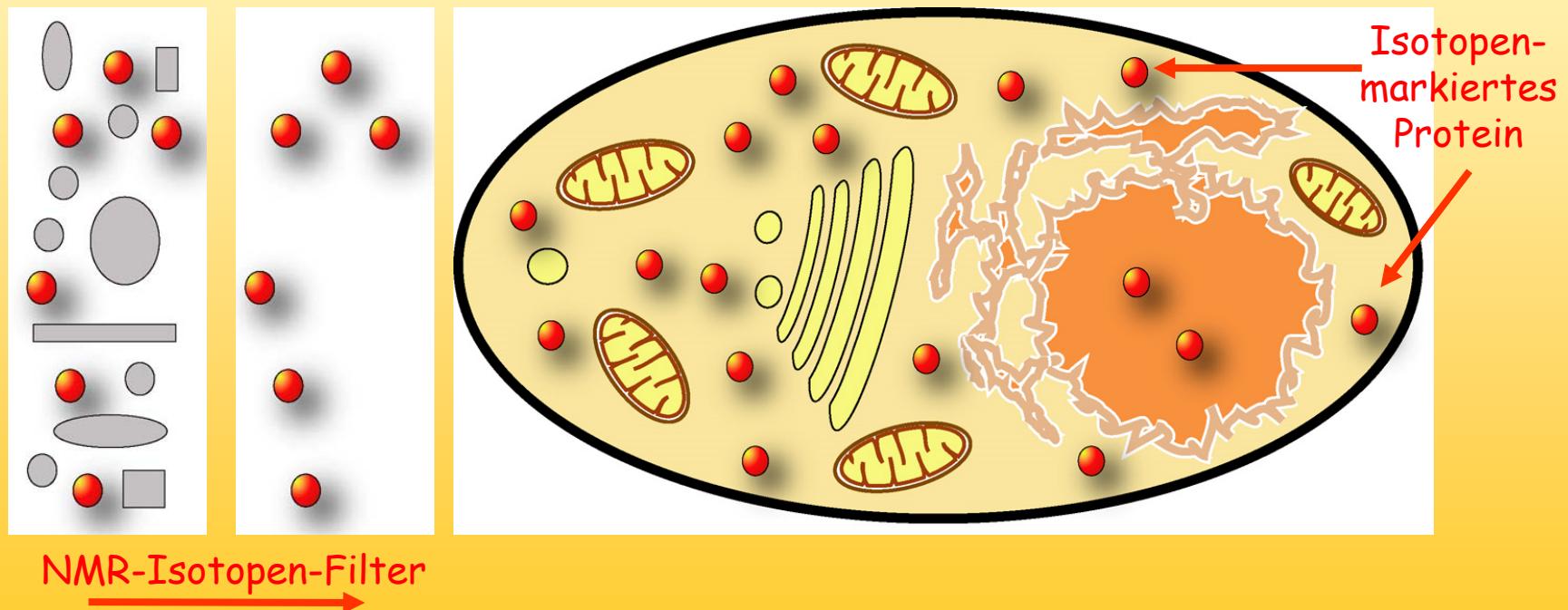


Die Situation die normalerweise bei der Untersuchung von Proteinen vorliegt (eine aufgereinigte Spezies Protein in wässrigem Puffer) entspricht nicht der Situation in der Zelle



In-cell NMR

Es kann also attraktiv sein Protein in der Zelle zu untersuchen. Dazu müssen sie isotopen-markiert sein um sie von den anderen Zellinhaltsstoffen zu unterscheiden, ansonsten ist das Cytosol auch „nur“ eine Lösung

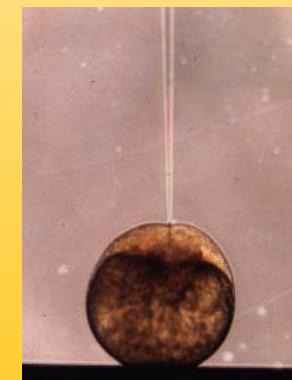
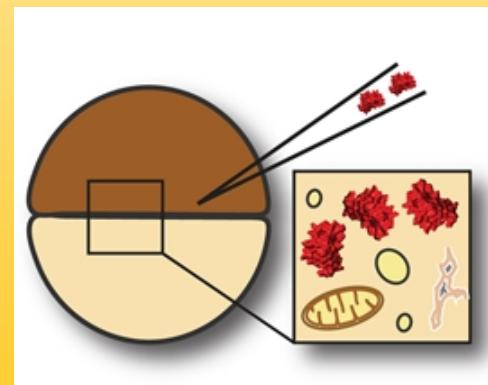


In-cell NMR

Wie bekommt man das Protein in die Zellen ?

Xenopus laevis Oozyten

sind recht groß, sie
werden mit Spritzen
injiziert, das kann auch
automatisiert werden



In-cell NMR

Wie bekommt man das Protein in die Zellen ?

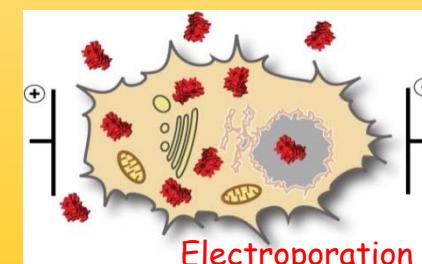
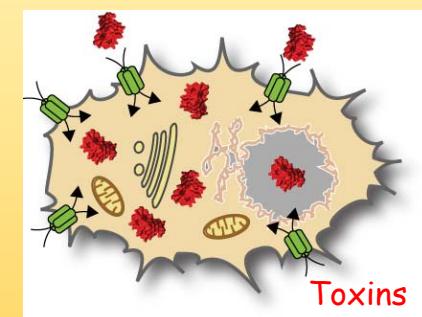
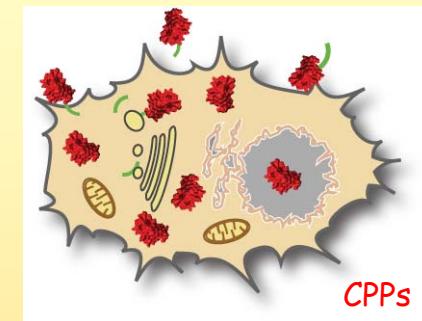
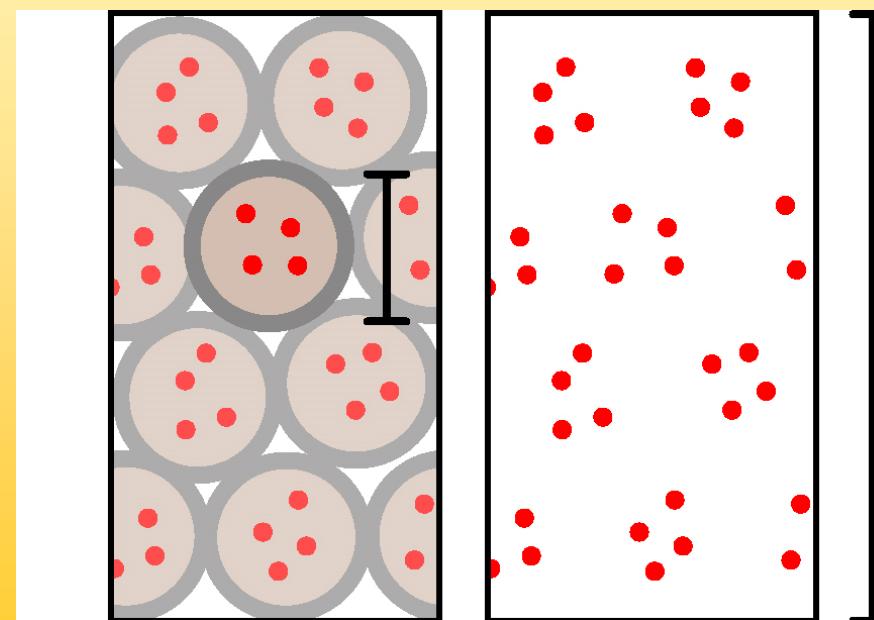
Bei Säugerzellen ist es schwerer

15 Millionen
Zellen

aber nicht unmöglich

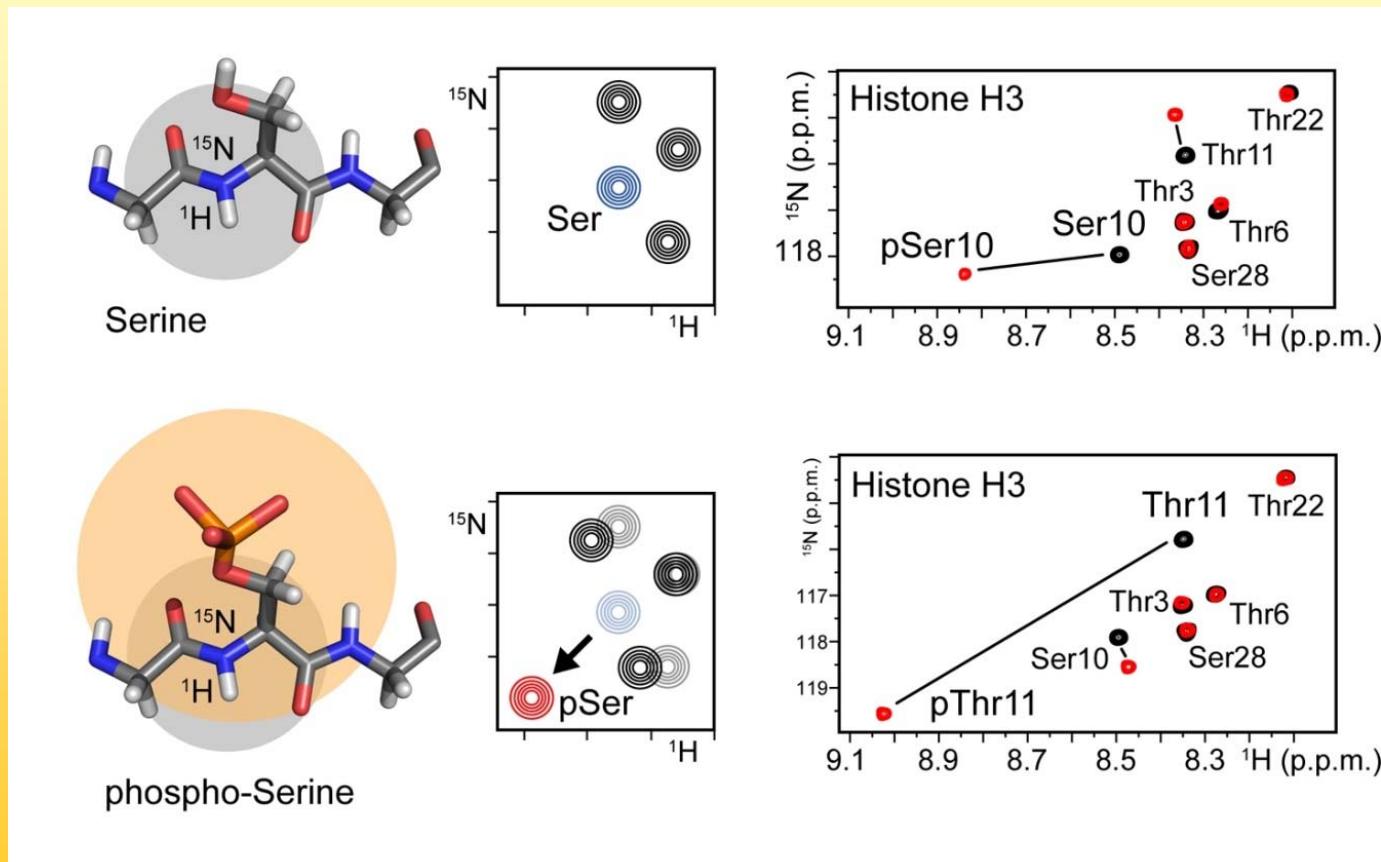


NMR-Isotopen-Filter



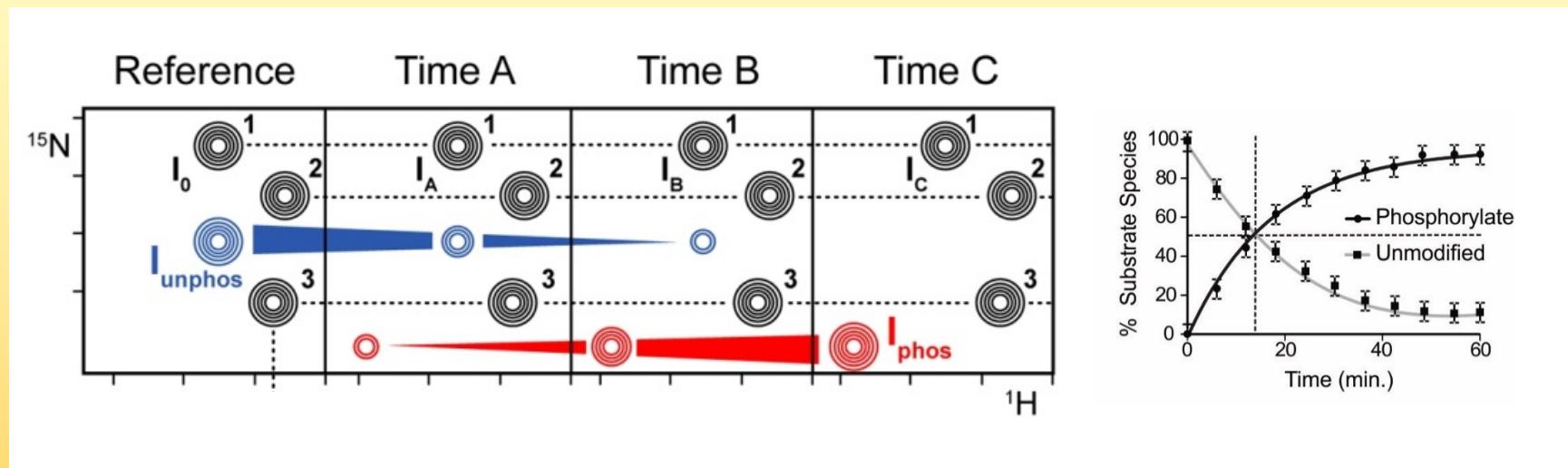
In-cell NMR

Ein Beispiel für die Anwendung von in-cell NMR ist die Untersuchung von Phosphorylierung in der Zelle.



In-cell NMR

Ein Beispiel für die Anwendung von in-cell NMR ist die Untersuchung von Phosphorylierung in der Zelle.

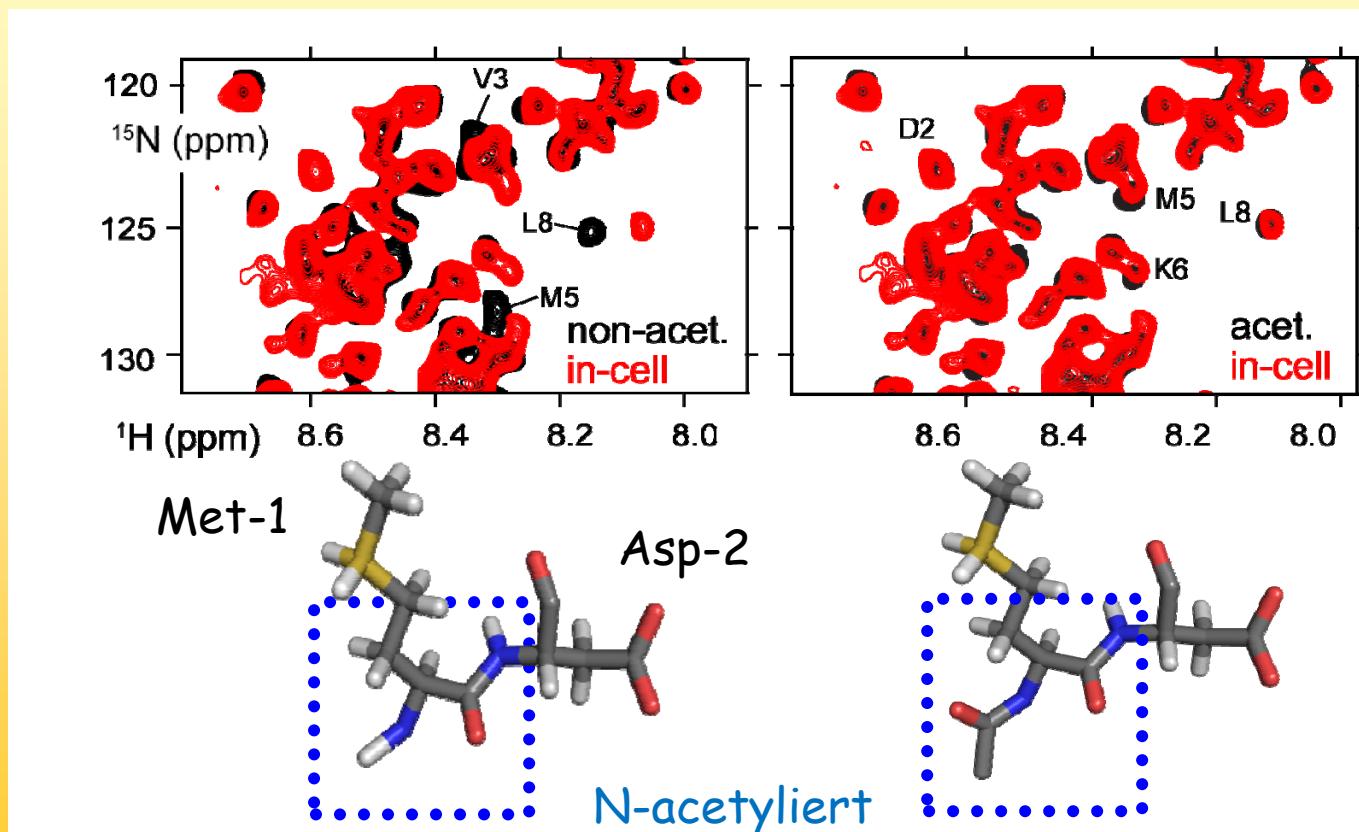


Falls die Reaktionen nicht zu schnell sind, können kinetische Parameter und die Reihenfolge von Phosphorylierungen bestimmt werden.



In-cell NMR

Allgemein kann man alle mögliche post-translationalen Modifikationen untersuchen: Acetylierung, Methylierung...



That's it

Fragen: schmieder@fmp-berlin.de

Scripte:

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