



Ядра о главном

Изучая структуру белков методом ядерного магнитного резонанса

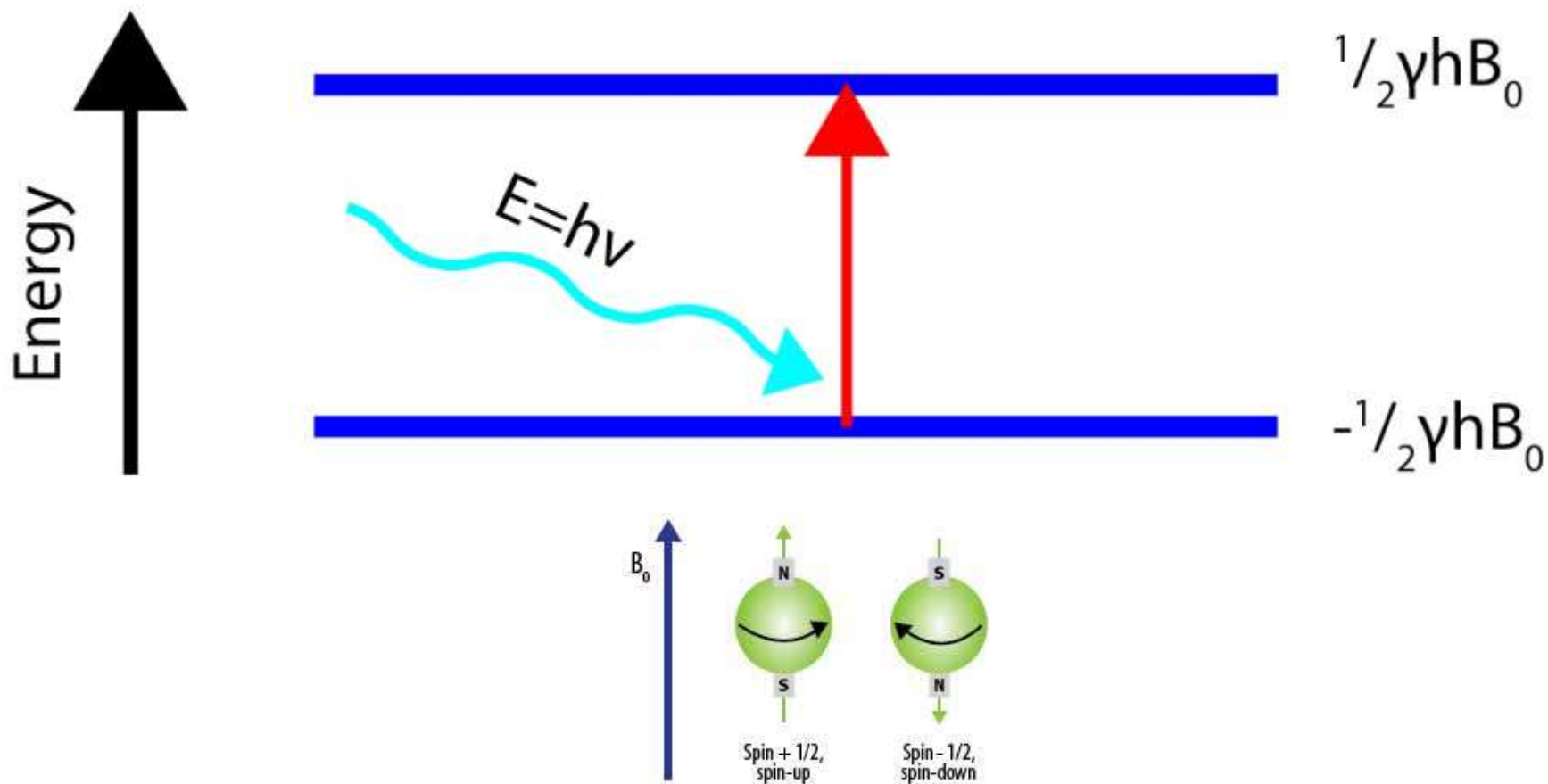
Константин Минеев, ИБХ РАН

mineev@nmr.ru

План доклада

- Эффект ЯМР
- Методики ЯМР
- Откуда берется структура белка?
- Что еще может ЯМР?
- История о рецепторе нейротрофинов p75

Ядерный магнитный резонанс



История (Нобелевские премии)



1943 *Отто Штерн*
Открытие спина ядер



1944 *Исидор Раби*
Магнитный резонанс в газах



1945 *Вольфганг Паули*
Формализм, принцип запрета



1952 *Эдвард Парселл*
Феликс Блох
Первый эксперимент ЯМР

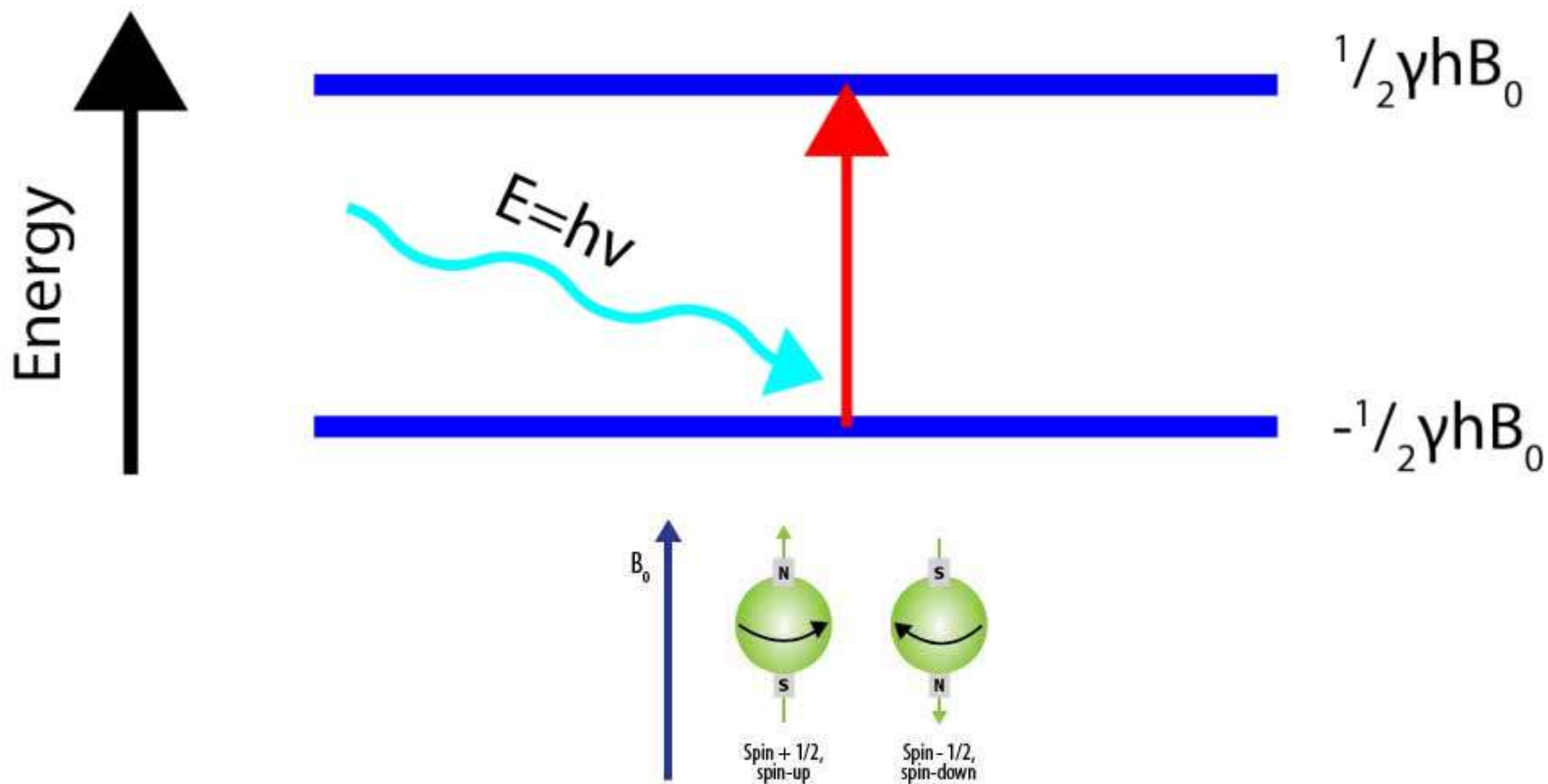


ЗАВОЙСКИЙ Евгений Константинович (1907 - 1976)

1941 г. - впервые зарегистрировал сигнал ядерного магнитного резонанса

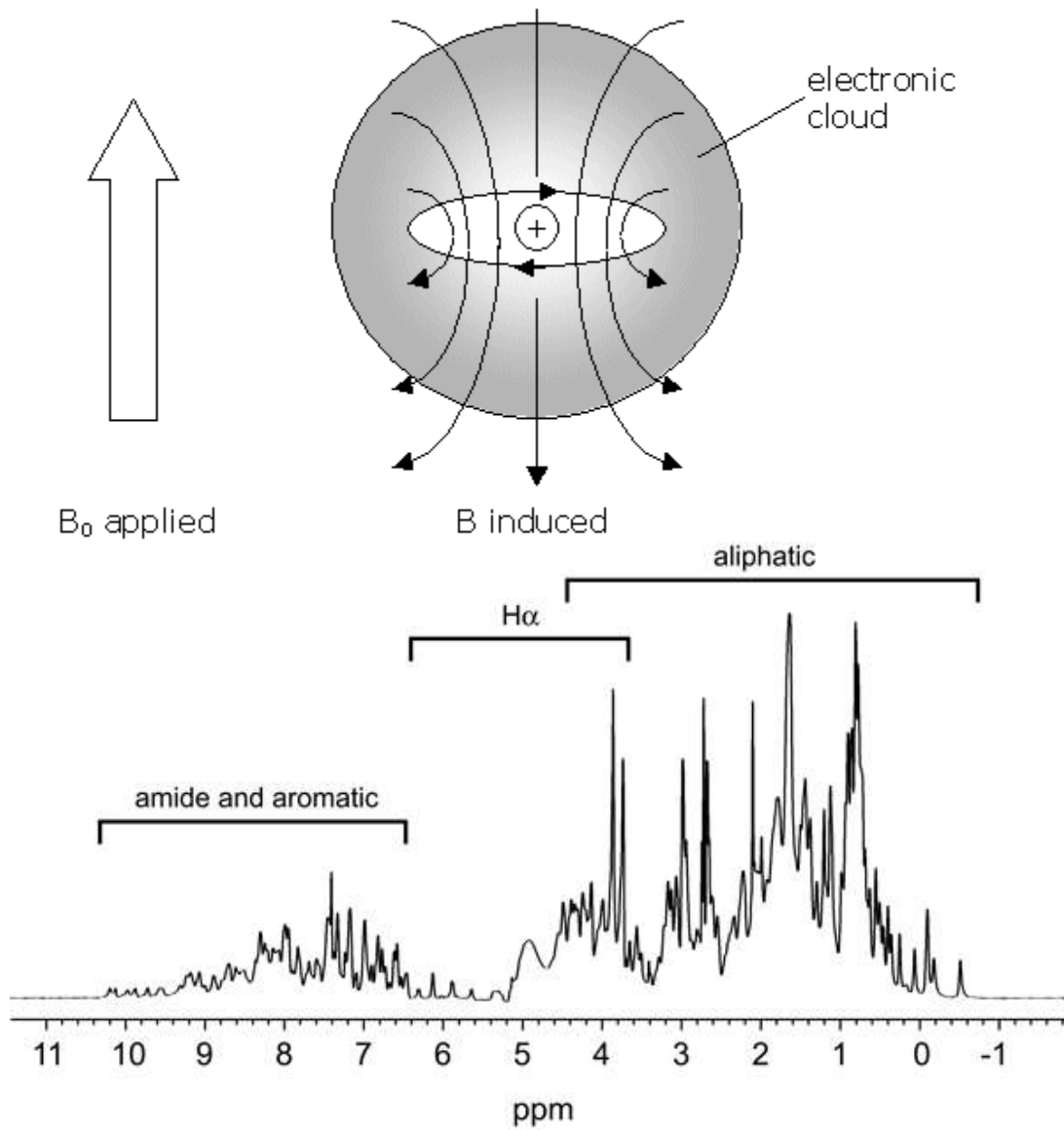
1944 г. - открытие электронного парамагнитного резонанса

Ядерный магнитный резонанс



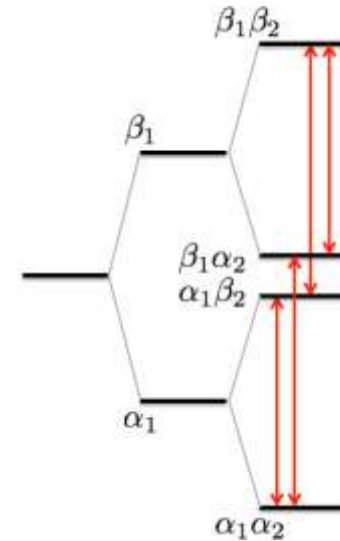
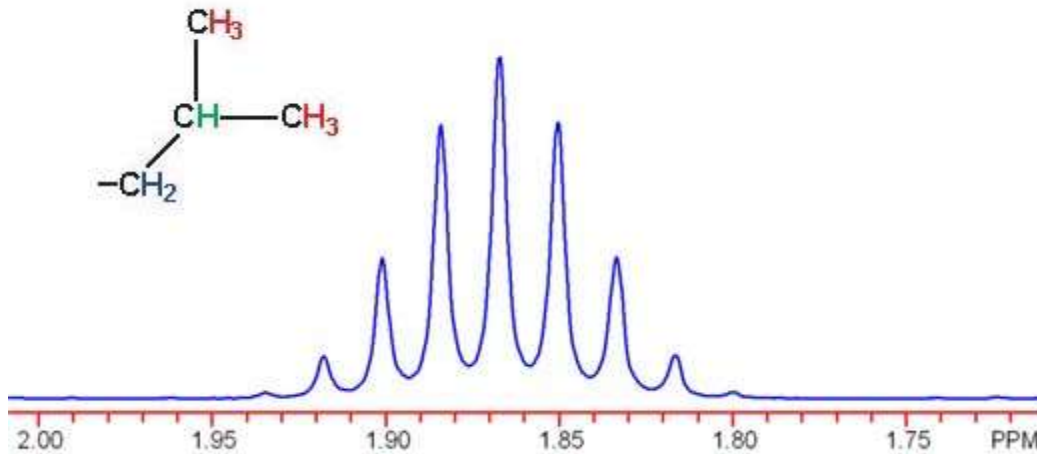
ПАРАМЕТРЫ СИГНАЛА В СПЕКТРАХ ЯМР

Химический сдвиг



- Положение сигнала от ядра в спектре зависит от электронной плотности и конфигурации орбиталей (двойные связи и сопряженные системы)

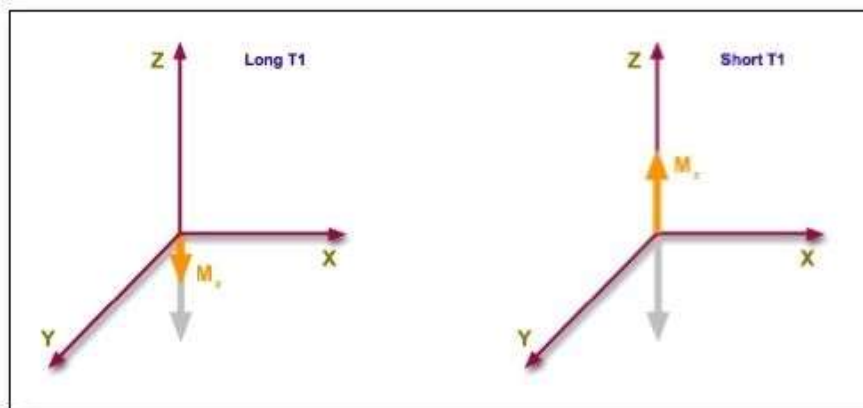
Константы спин-спинового взаимодействия



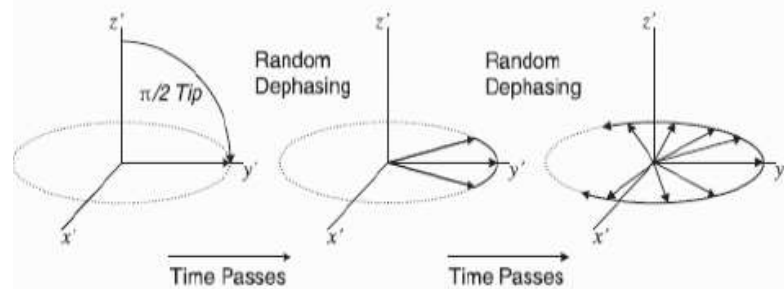
- КССВ могут быть прямыми (1 связь), геминальными (2 связи) и вицинальными (3 связи)
- КССВ бывают гомоядерными и гетероядерными

Релаксация

T1

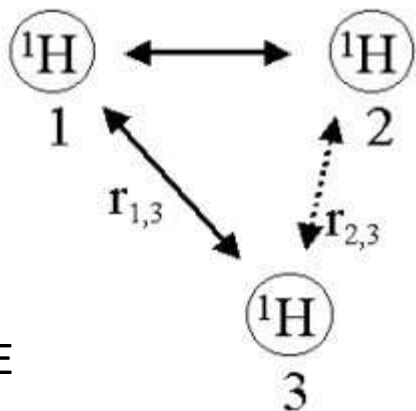


T2

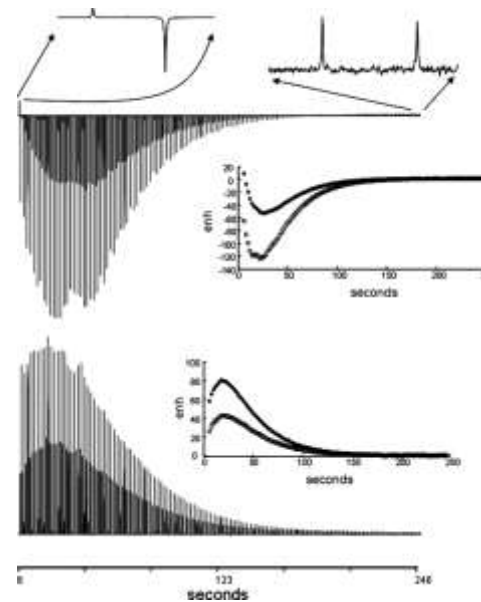


- Transverse relaxation decays

$$M_{xy}(t) = M_0 \sin \alpha e^{-j(\omega_0 t - \phi)} e^{-t/T_2}$$

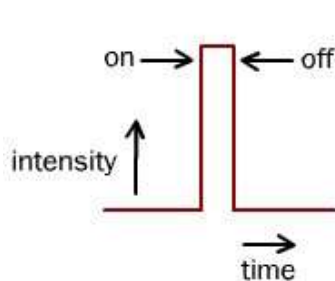
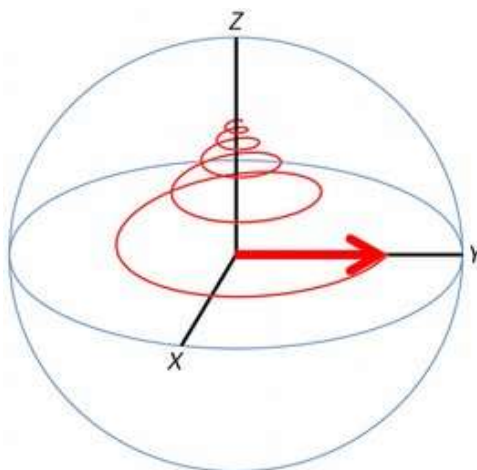
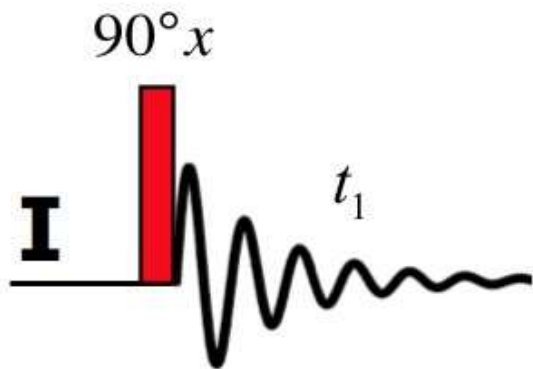


ЯЭО/НОЕ

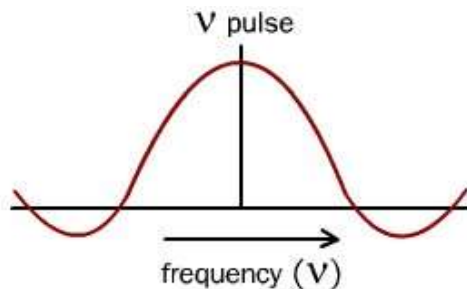


СОВРЕМЕННАЯ ЯМР- СПЕКТРОСКОПИЯ?

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”

Сердце спектрометра ЯМР - магнит



Магнит спектрометра Bruker
AVANCE 600 МГц



Магнит спектрометра Varian 900 МГц

Спектры ЯМР-¹H белков

162 a.a., ~16 kDa

10.0 5.0 0.0

16 a.a., ~2 kDa

10.0

5.0

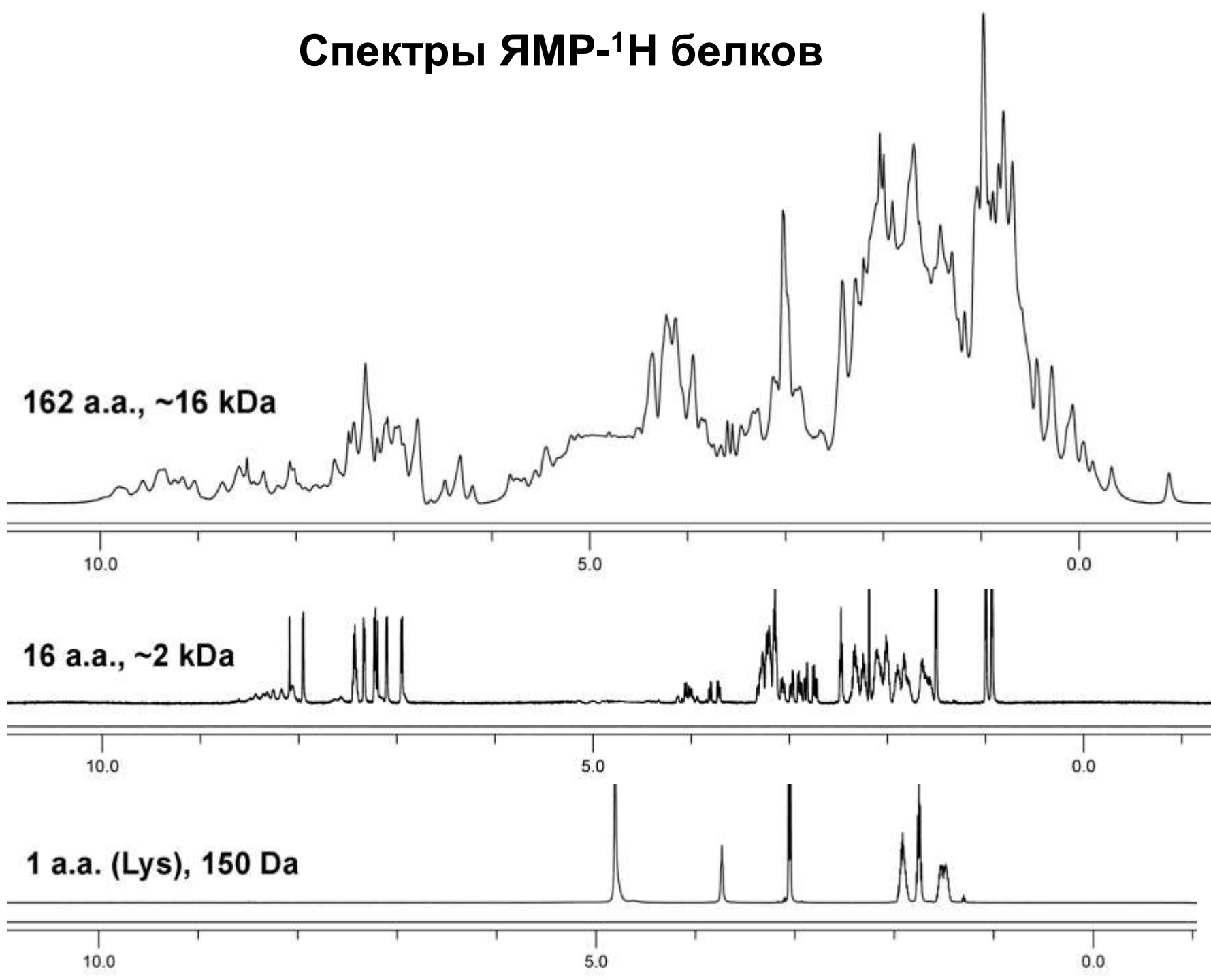
0.0

1 a.a. (Lys), 150 Da

10.0

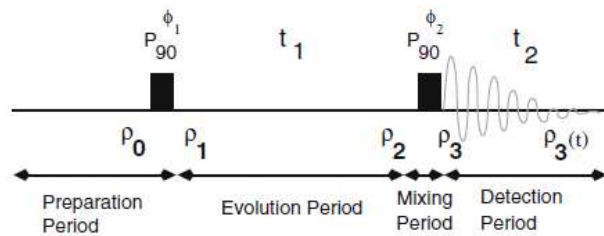
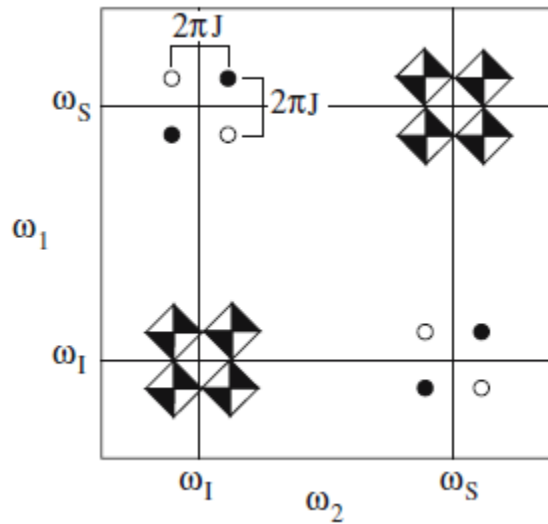
5.0

0.0

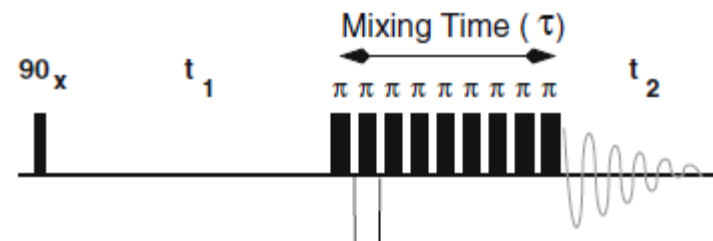
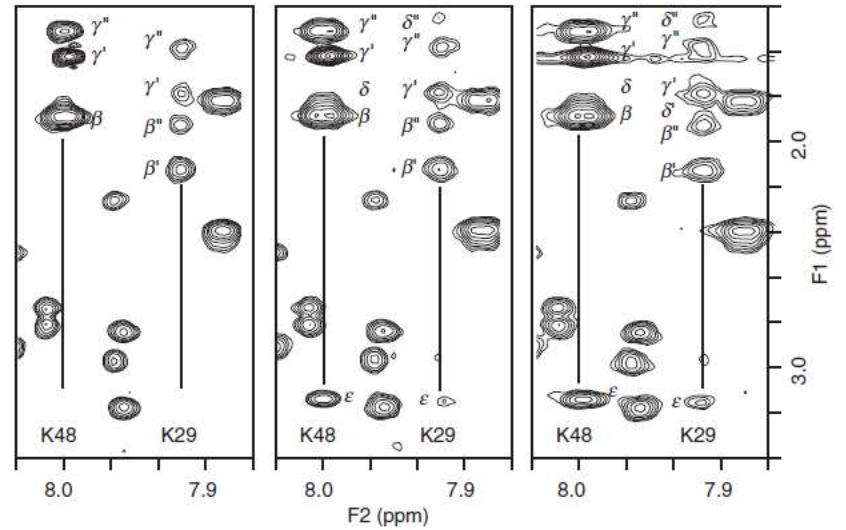


2D спектры

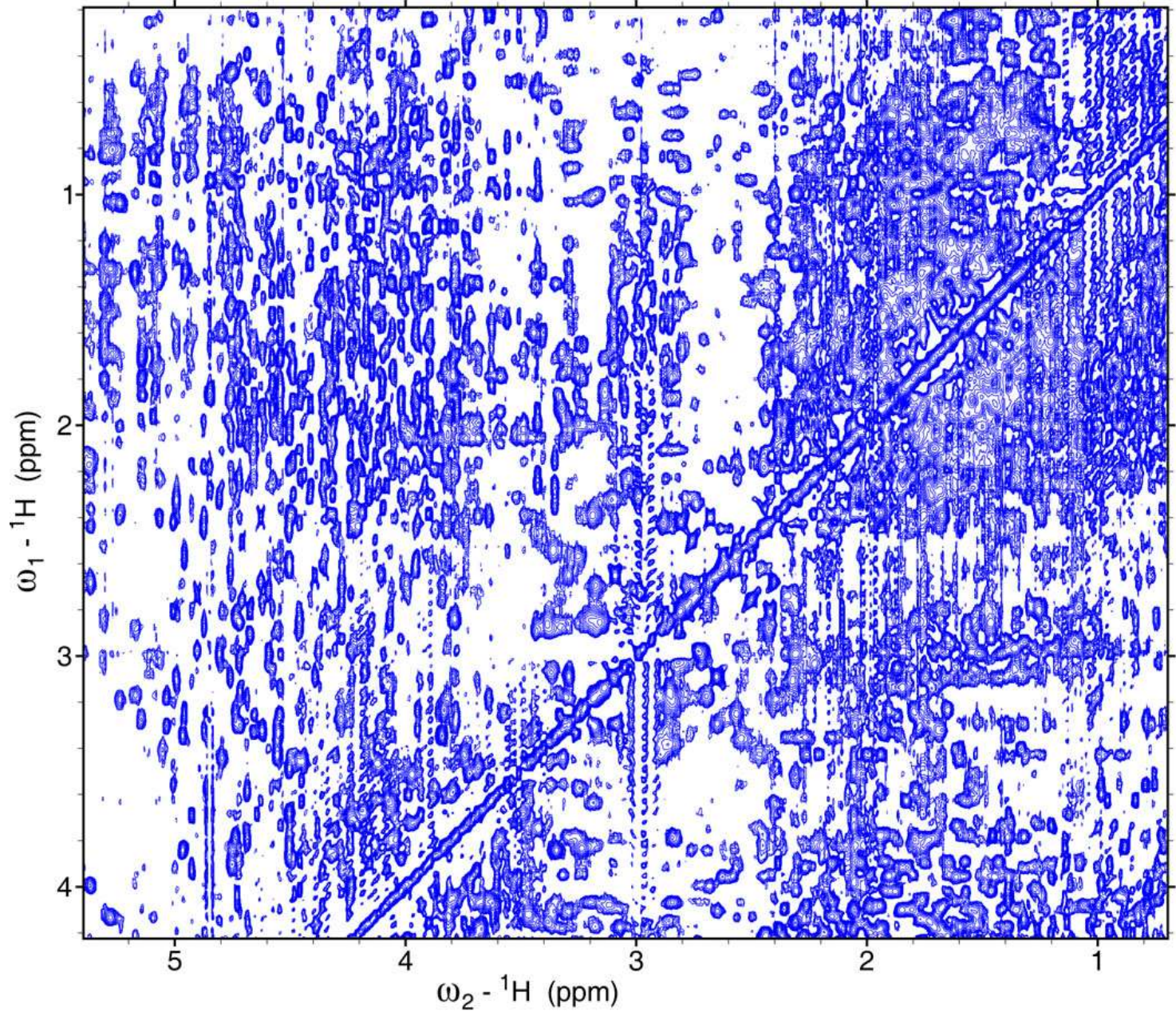
COSY



TOCSY



Фрагмент 2D спектра NOESY белка 18 кДа



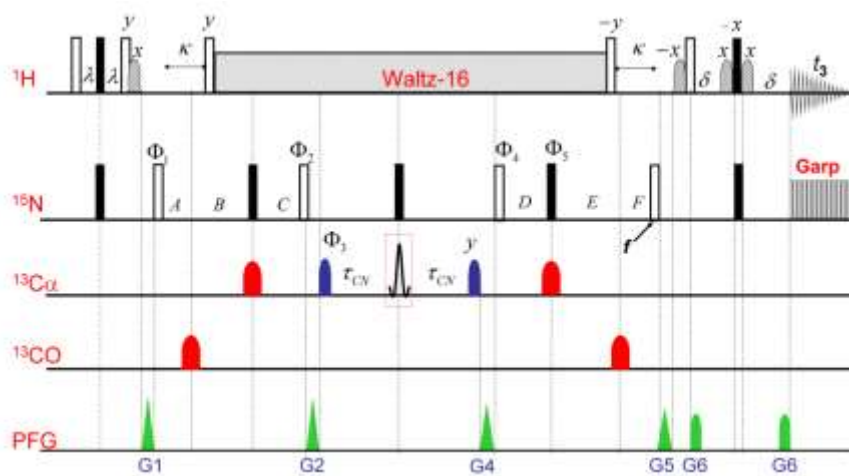
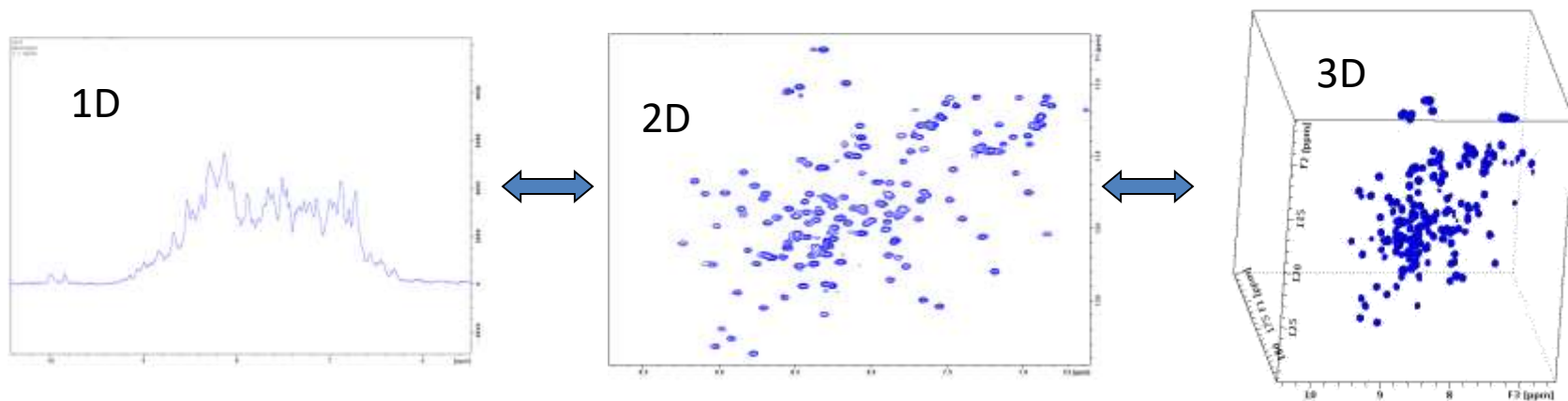
Изотопное мечение

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

Многомерная ЯМР-спектроскопия

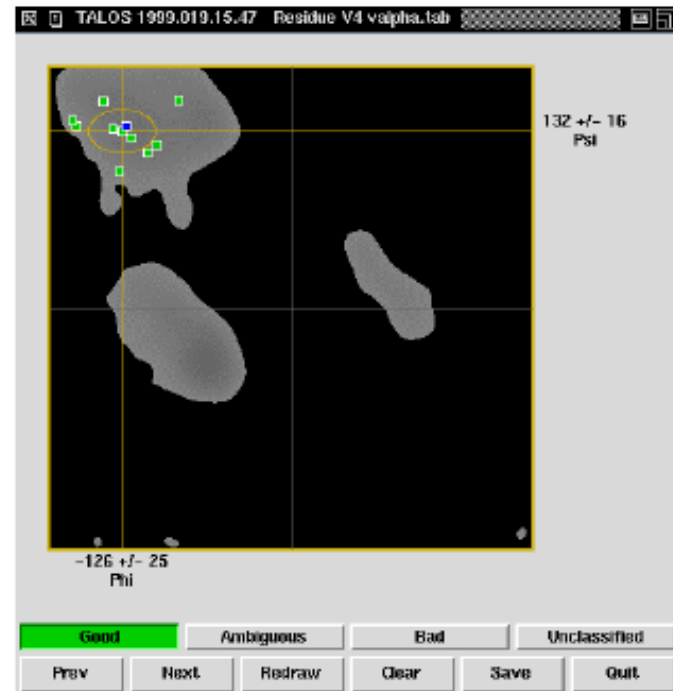
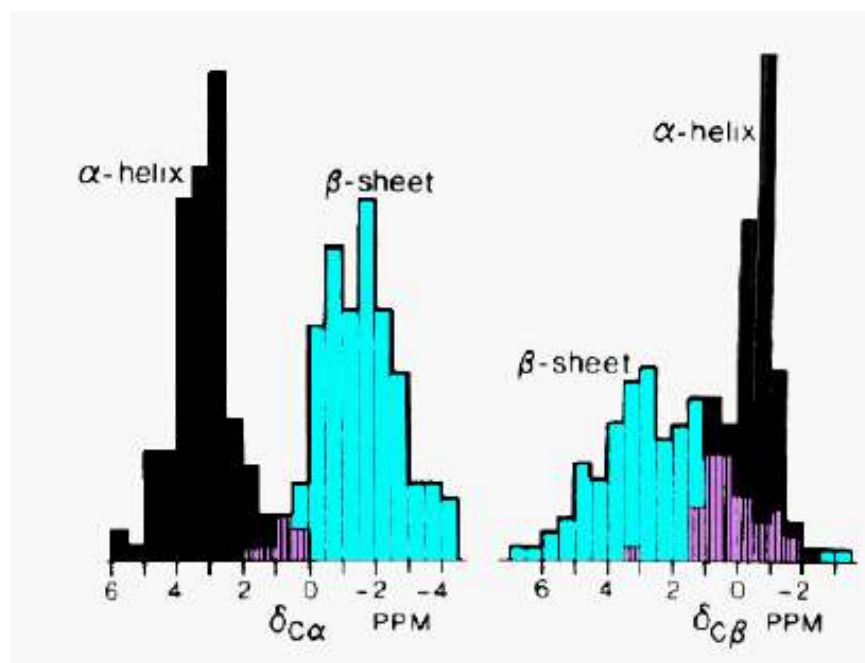


IL-25, 15 kDa

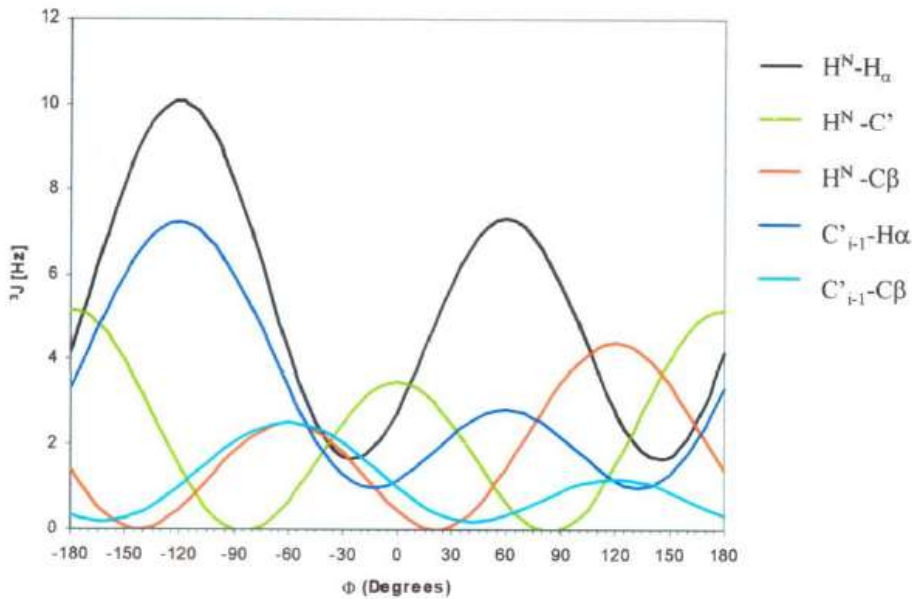
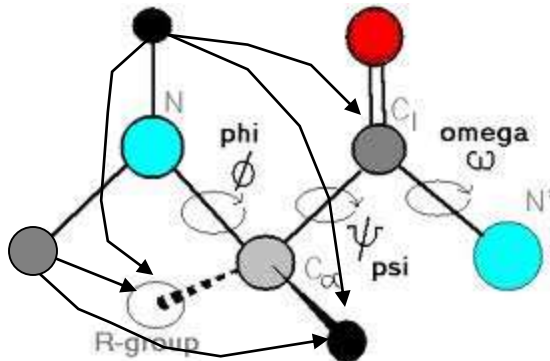
**ОТКУДА БЕРЕТСЯ СТРУКТУРА
БЕЛКА?**

Вторичный химический сдвиг

- CSI – индекс вторичного химического сдвига (хим. сдвиг по сравнению с известным значением для random coil конформации) – индикатор вторичной структуры белка.
- TALOS, PREDITOR, CS-ROSETTA программы для расчета структуры по химическим сдвигам (по аналогии с известными структурами) Точность предсказания 88%.

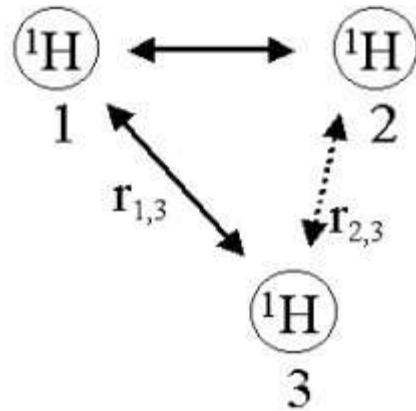


Константы спин-спинового взаимодействия



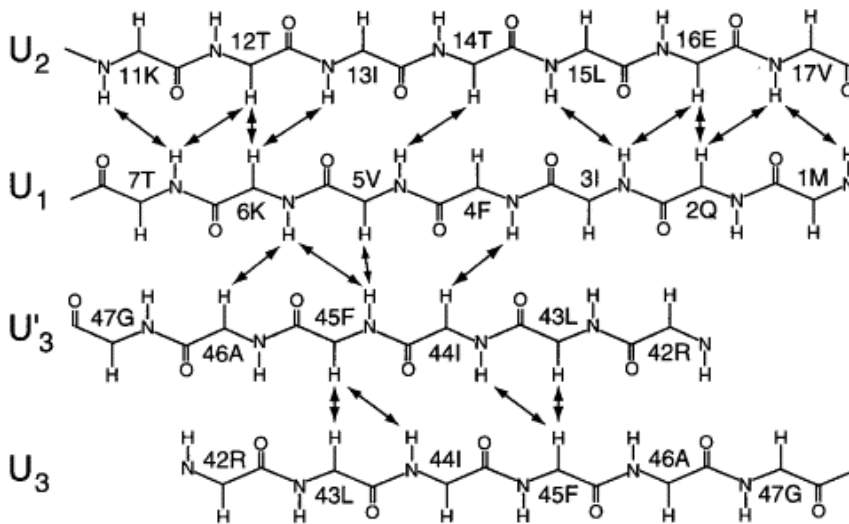
Angle	Atoms Involved	3J [Hz]
PHI	HN-HA	1.7 – 10.1
	HN-C	0.0 – 5.2
	HN-CB	0.0 – 4.4
	C_(i-1)-HA	1.0 – 7.2
	C_(i-1)-CB	0.2 – 2.5
PSI	HA-N_(i+1)	-1.8 – -0.2
OMEGA	HA-HB	1.8 – 12.9
	N-HB	-5.5 – 0.2
	C-HB	0.5 – 9.8

NOE

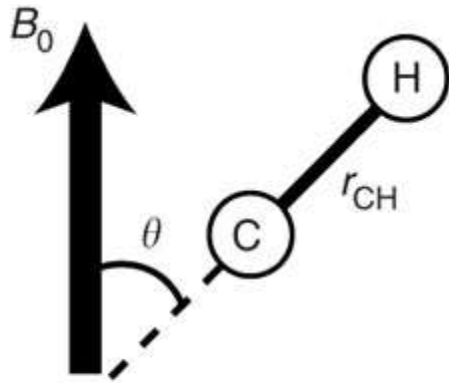


$$NOE \propto \frac{1}{r_{ij}^6}$$

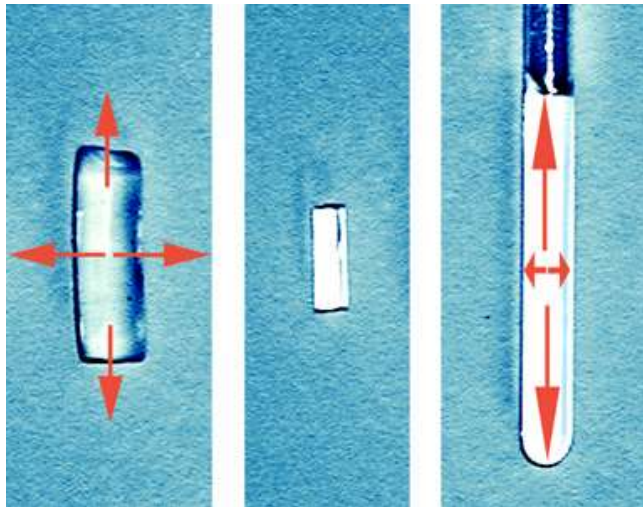
- NOE – основной источник информации о структуре белка, если нет дейтерирования
- Если размер белка большой и необходимо его дейтерировать, нужны другие источники информации



Остаточные дипольные константы

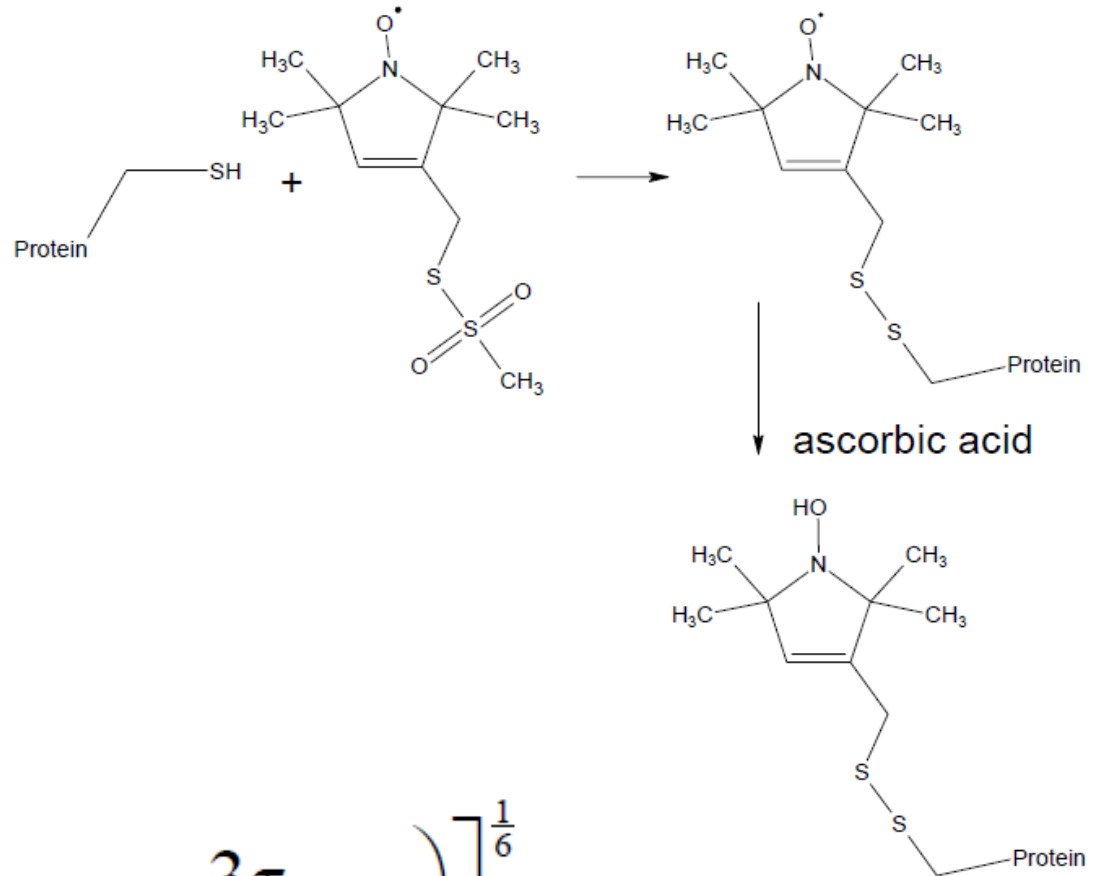
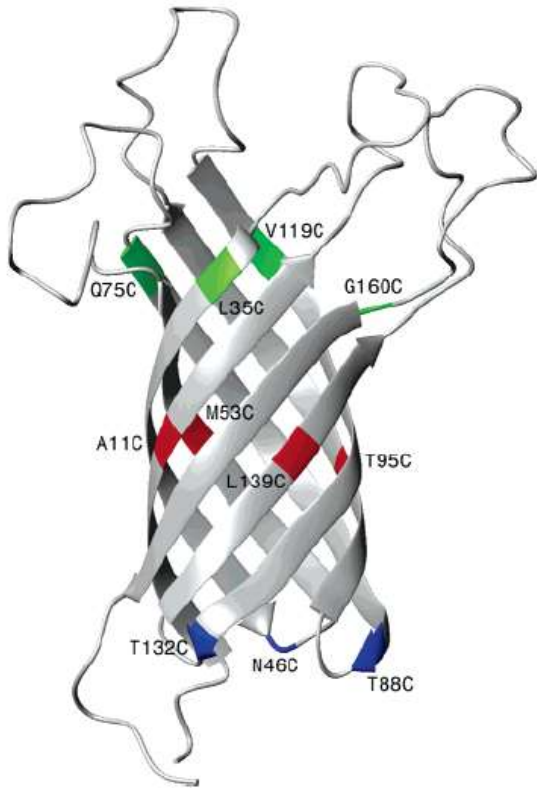


$$D_{CH} = -\frac{\gamma_C \gamma_H \mu_0 h}{(2\pi)^3 r_{CH}^3} \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle$$



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

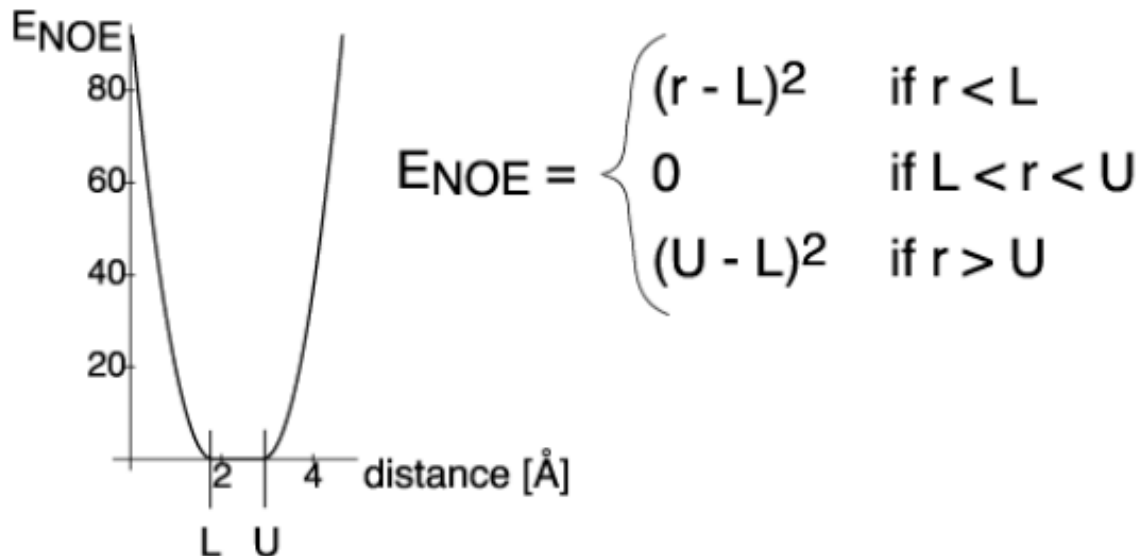
Парамагнитные зонды



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

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)



Свойства структуры ЯМР

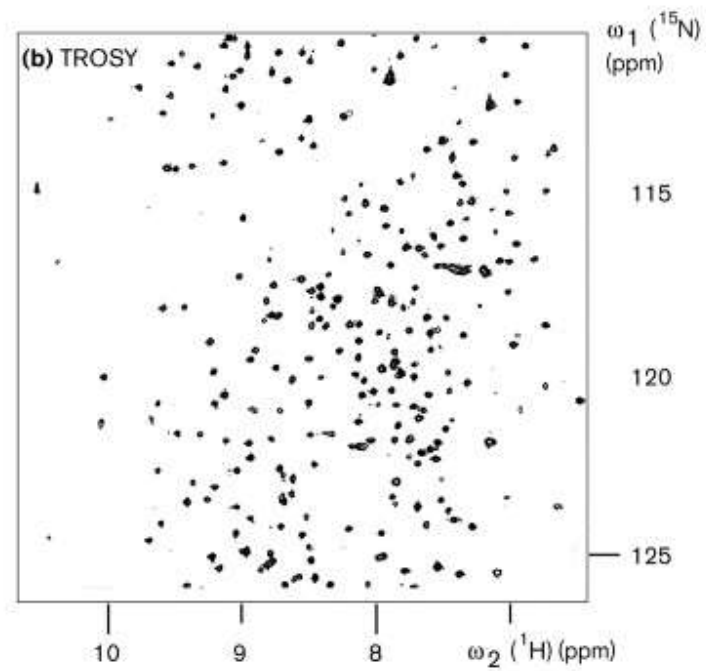
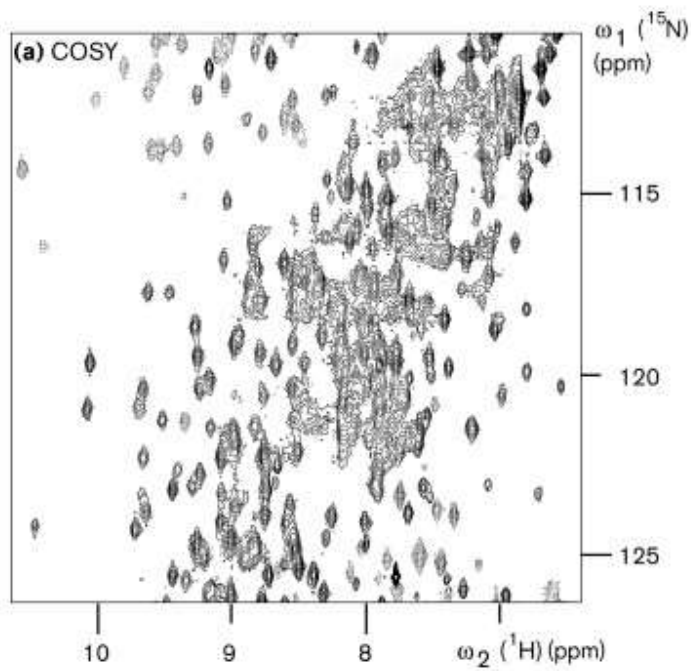
- ЯМР-спектроскопия дает структуру, усредненную по ансамблю молекул.
- Нужно с осторожностью относиться к полученным данным, на участках с подвижностью.
- У структуры ЯМР нет параметра «разрешение».

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

Ограничения ЯМР в растворе

- Размер молекулы (до 25-30 кДа для стандартного подхода)
 - Много сигналов
 - Широкие линии
- Оптимизация релаксации (до 1 МДа)
 - Изотопное мечение (частичное или полное дейтерирование, селективное мечение)
 - Импульсные последовательности (TROSY, BEST, CRIPT, CRINEPT, etc..)



Current Opinion in Structural Biology

45 кДа

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

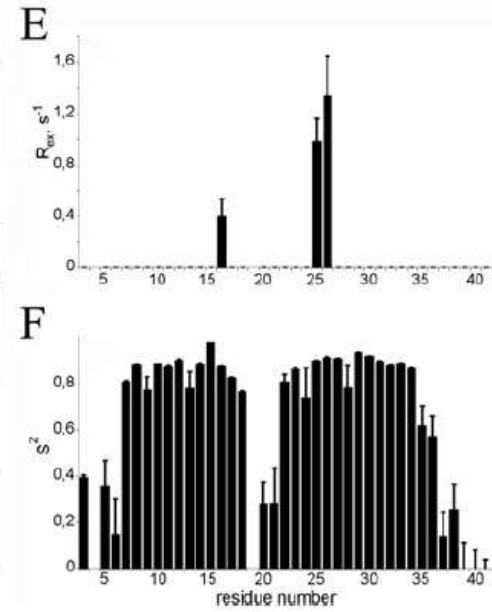
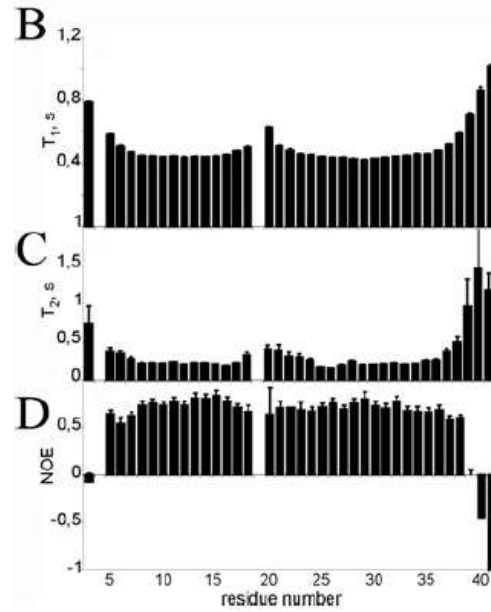
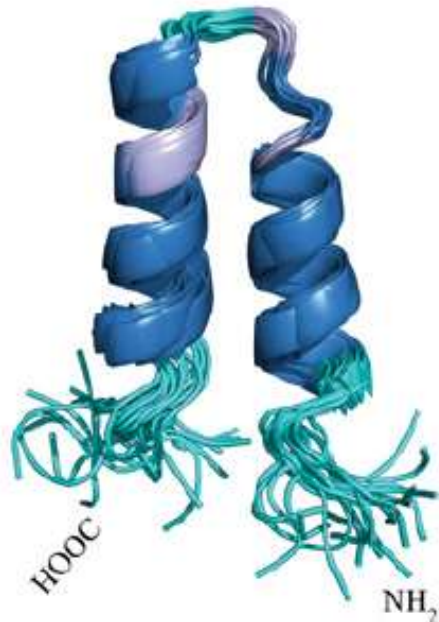
ЧТО ЕЩЕ МОЖЕТ ЯМР?

Причины ЯМР релаксации

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

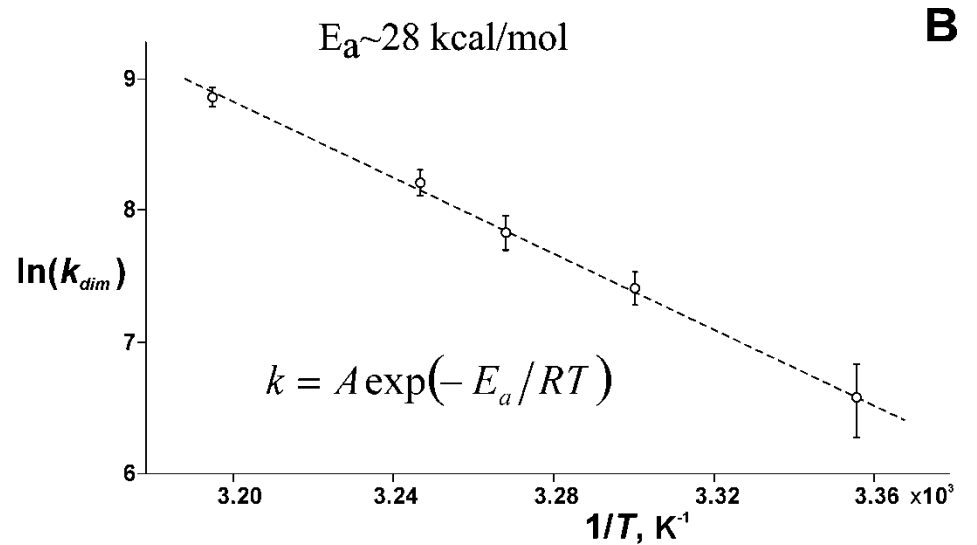
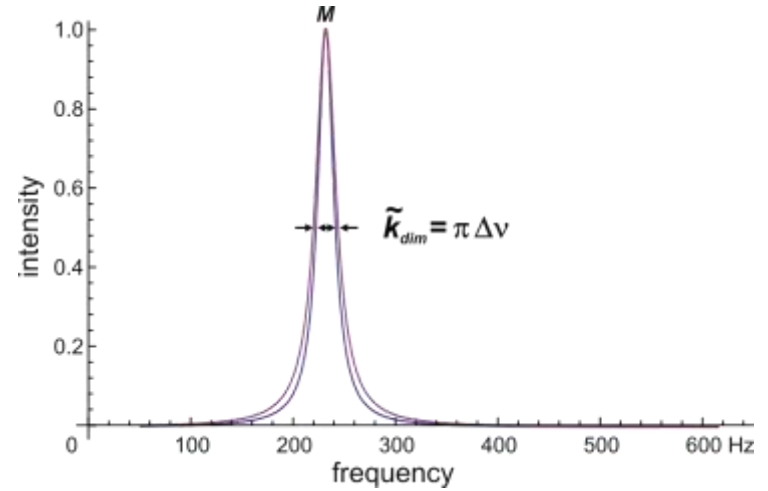
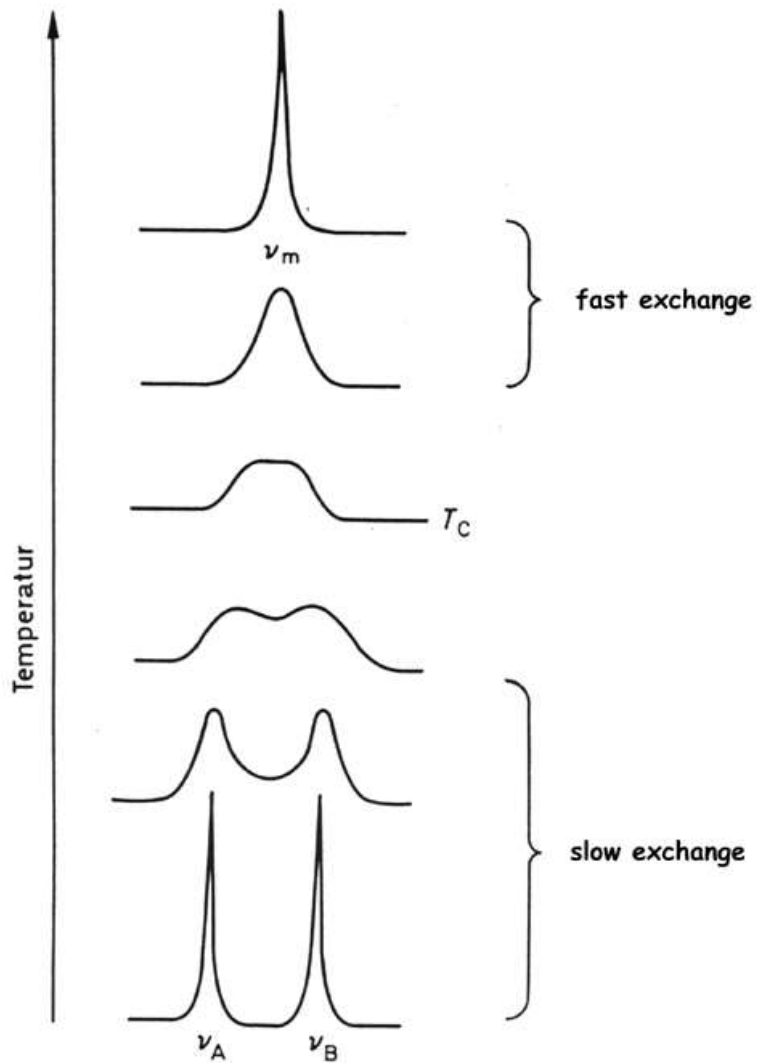
- Диполь-дипольное взаимодействие
- Анизотропия химического сдвига
- Химический обмен
- Квадрупольное взаимодействие
- Скалярное взаимодействие
- Парамагнитное взаимодействие

Внутримолекулярная подвижность



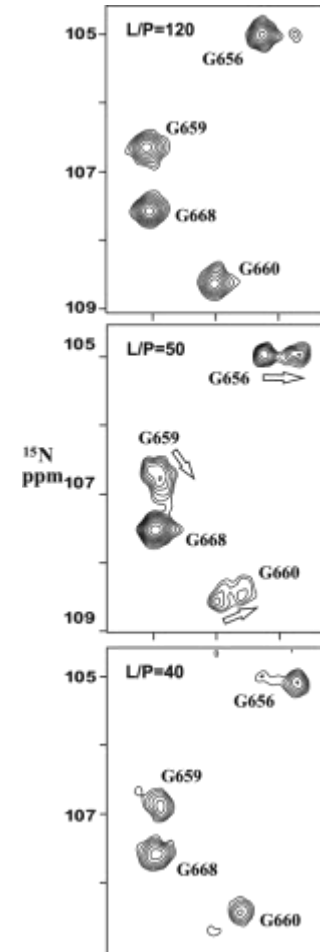
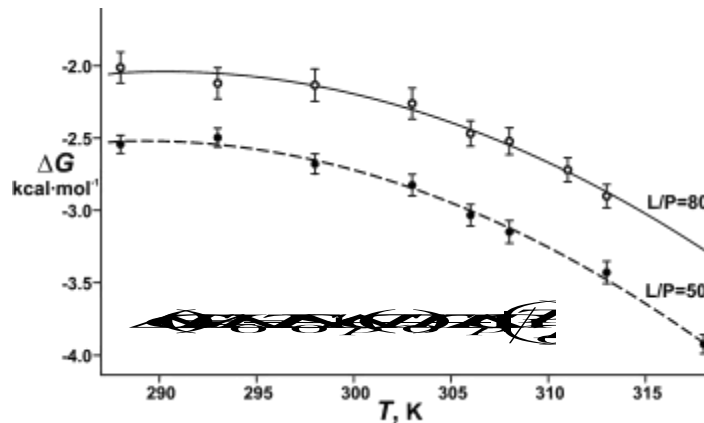
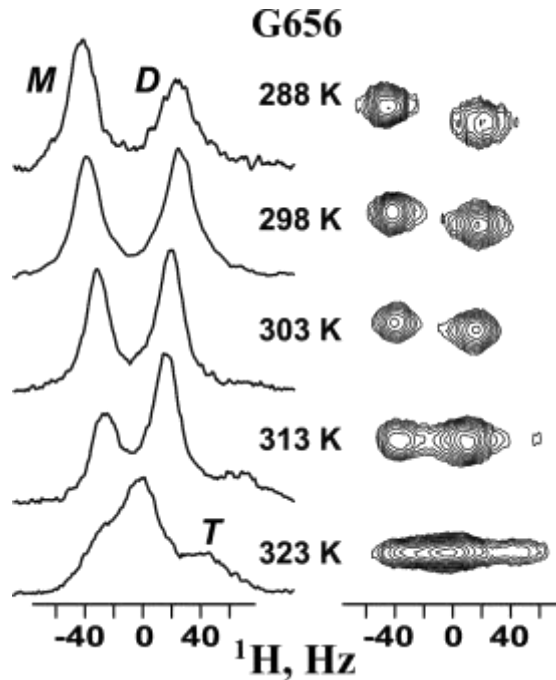
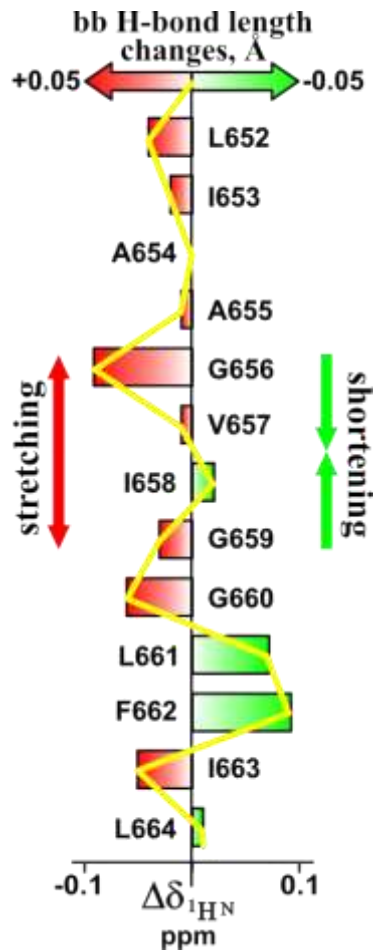
- Параметры ЯМР релаксации зависят от флуктуаций магнитного поля, вызываемых движениями молекулы

Кинетика процессов



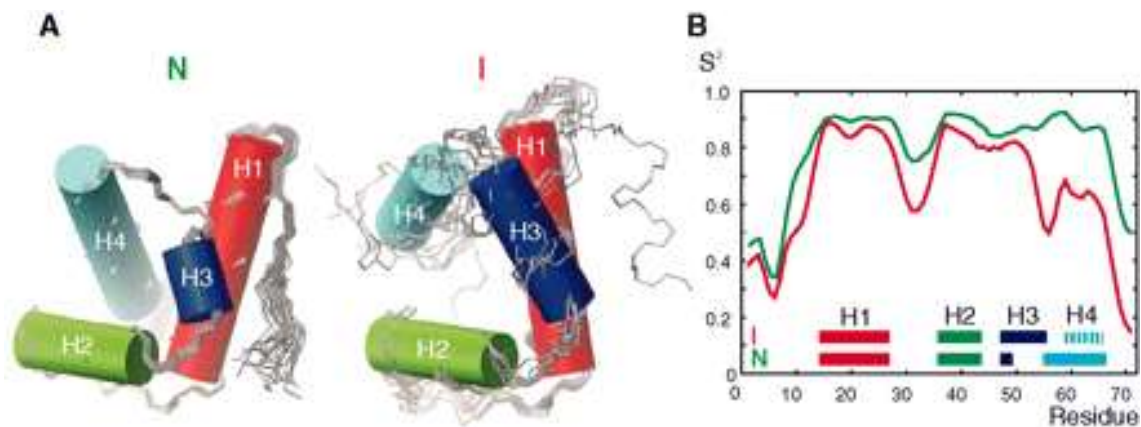
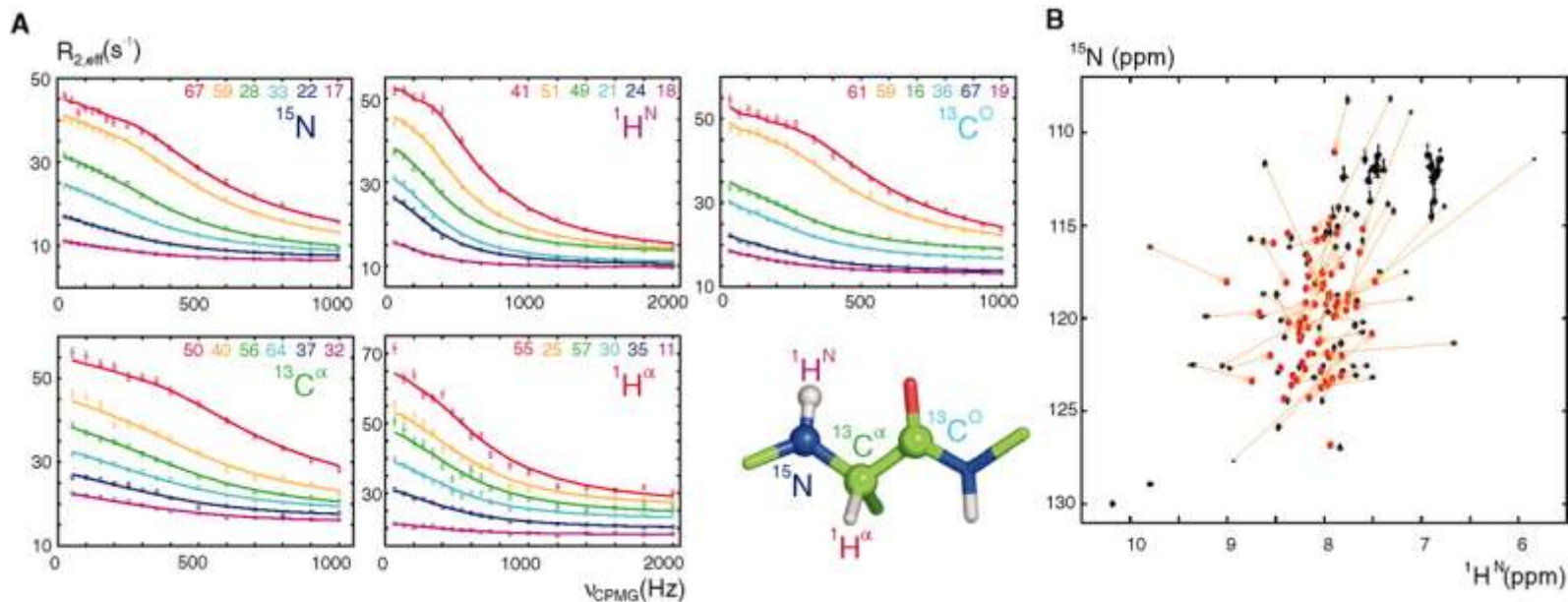
B

Конформационные переходы, межмолекулярные взаимодействия



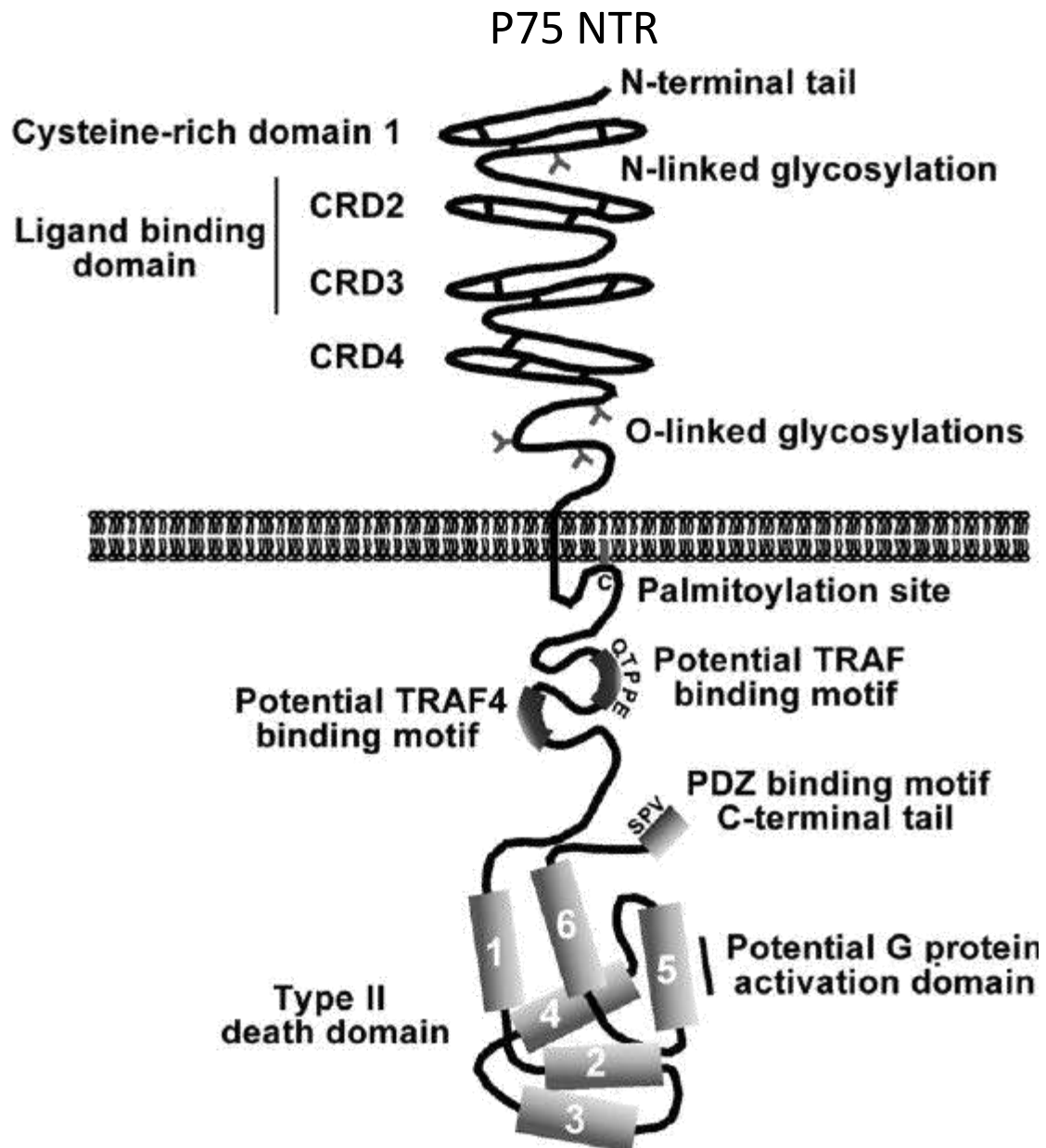
Bocharov et al.,
BBA-Biomembranes, 2012

короткоживущие переходные состояния

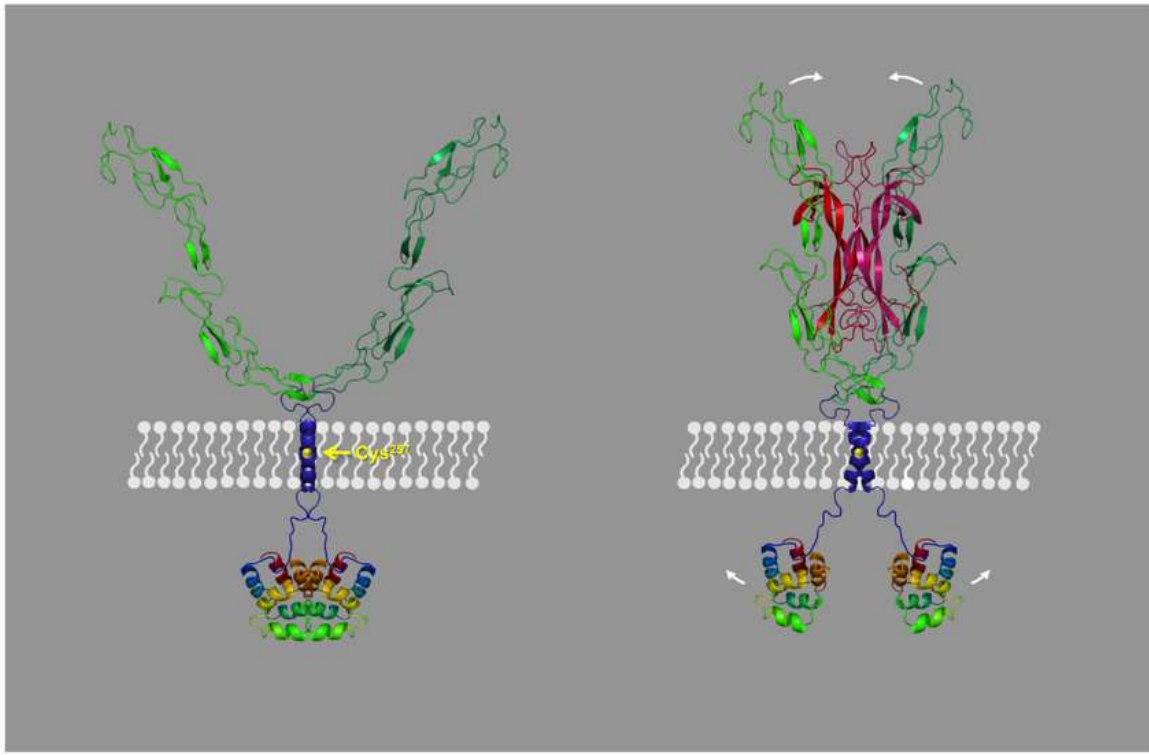


Заселенность
состояния -2%

РЕЦЕПТОР НЕЙРОТРОФИНОВ Р75



Snail-TONG model



Разделяй и властвуй



DIVIDE & CONQUER?

Лиганд X-ray



Комплекс Лиганд-ECD X-ray
(некоторые части ECD были удалены для оптимизации)



ICD димер X-ray



TMD в мембраноподобной среде(NMR)

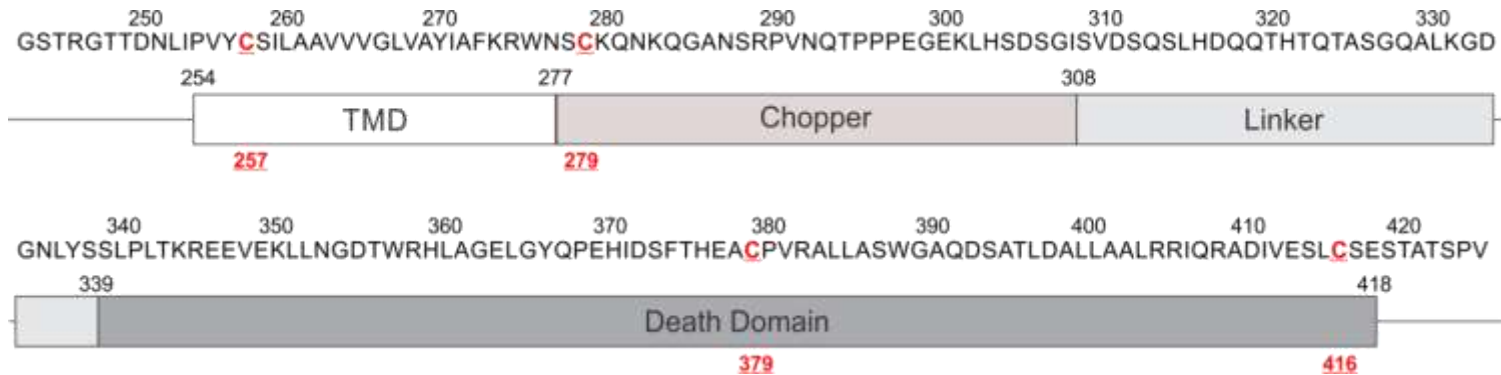


Сможем ли мы научиться играть в баскетбол?

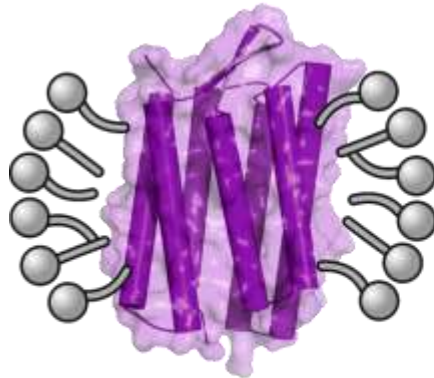
Решение

- Изучать связки доменов в динамике
- ADD&CONQUER vs DIVIDE&CONQUER
- Использовать ЯМР-спектроскопию

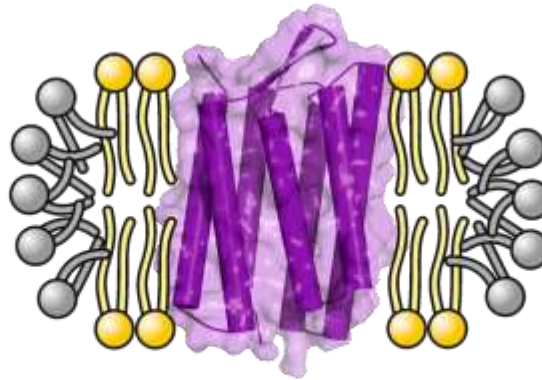
Выбор объекта



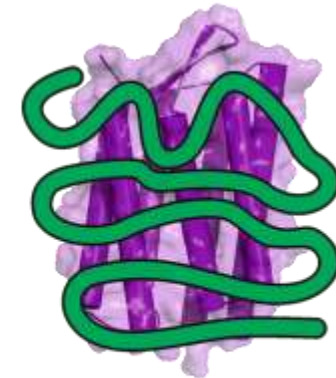
Выбор среды



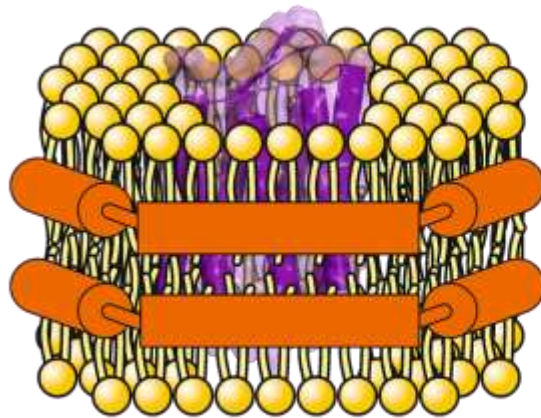
micelle



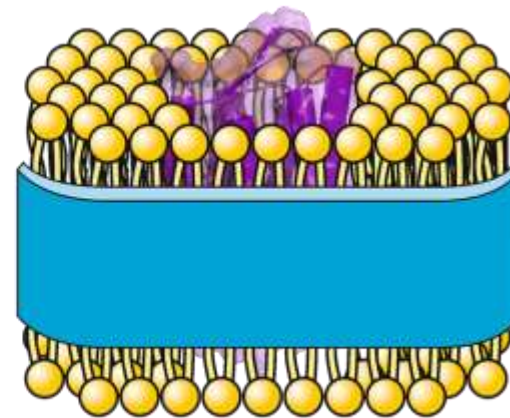
bicelle



amphipol

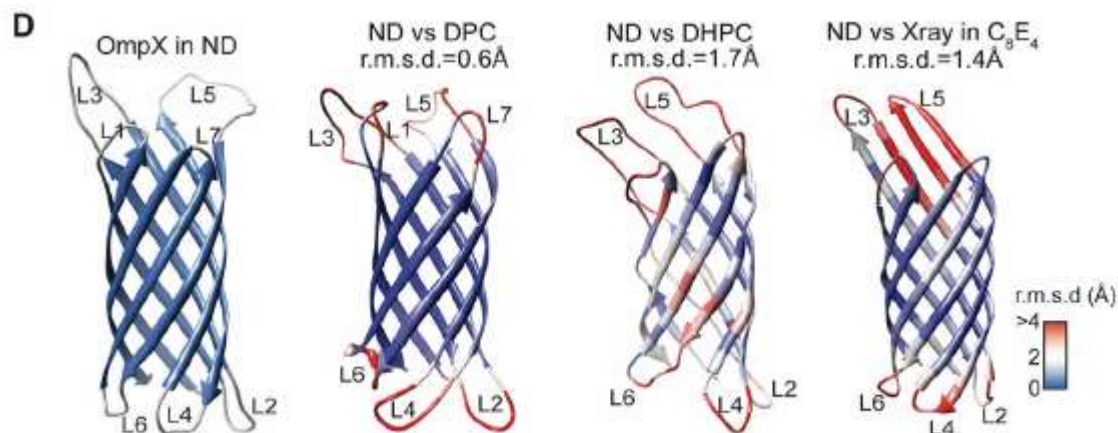
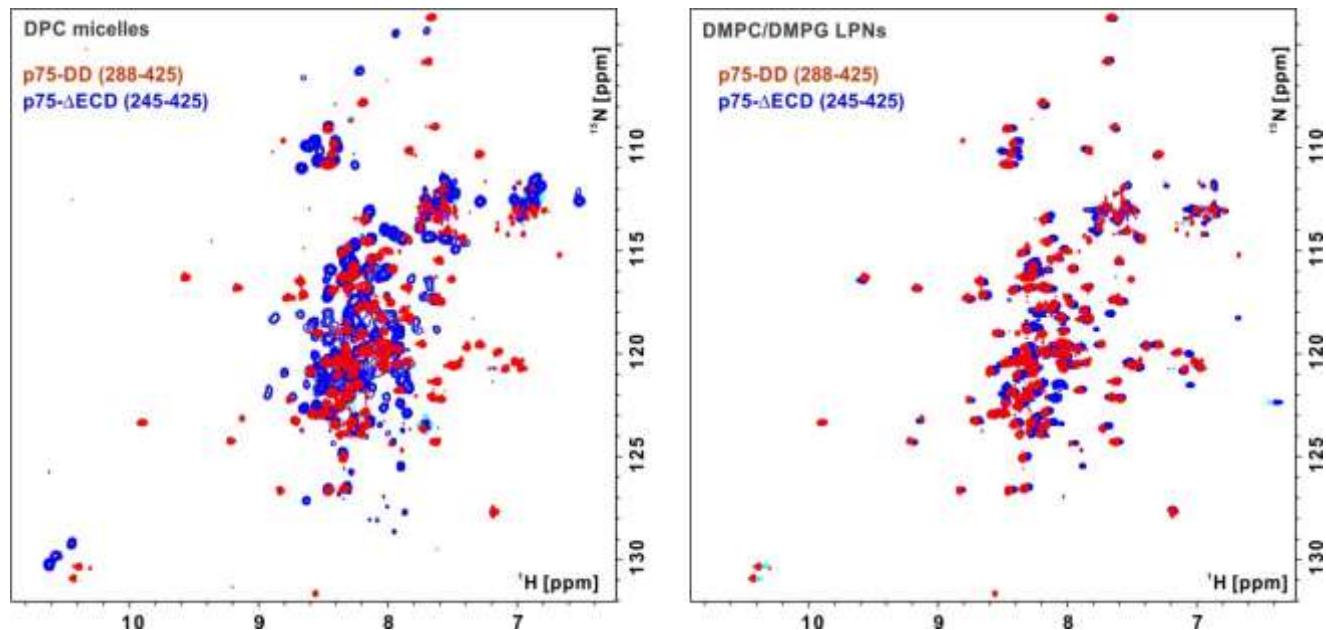


LPN

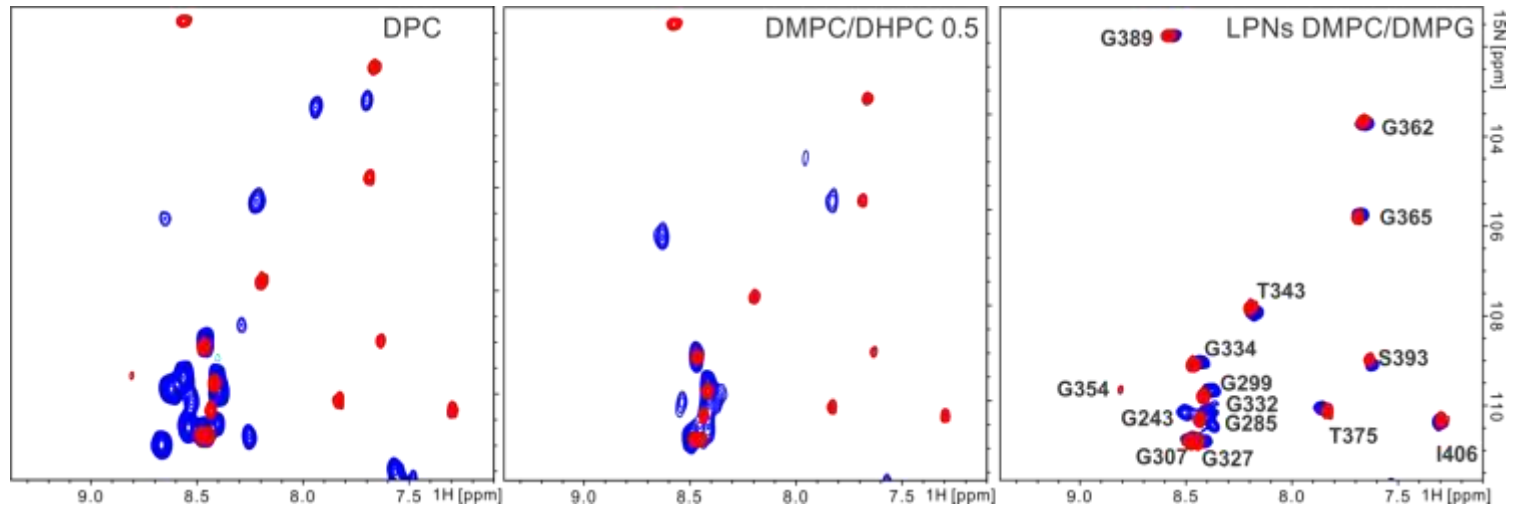


SMALP

Среда влияет на структуру



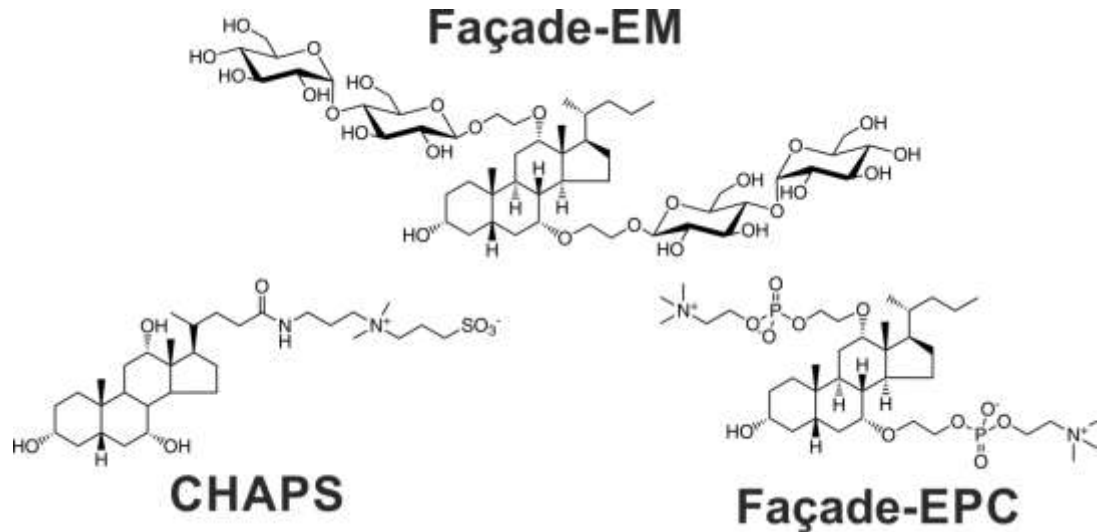
Поиск наилучшей среды



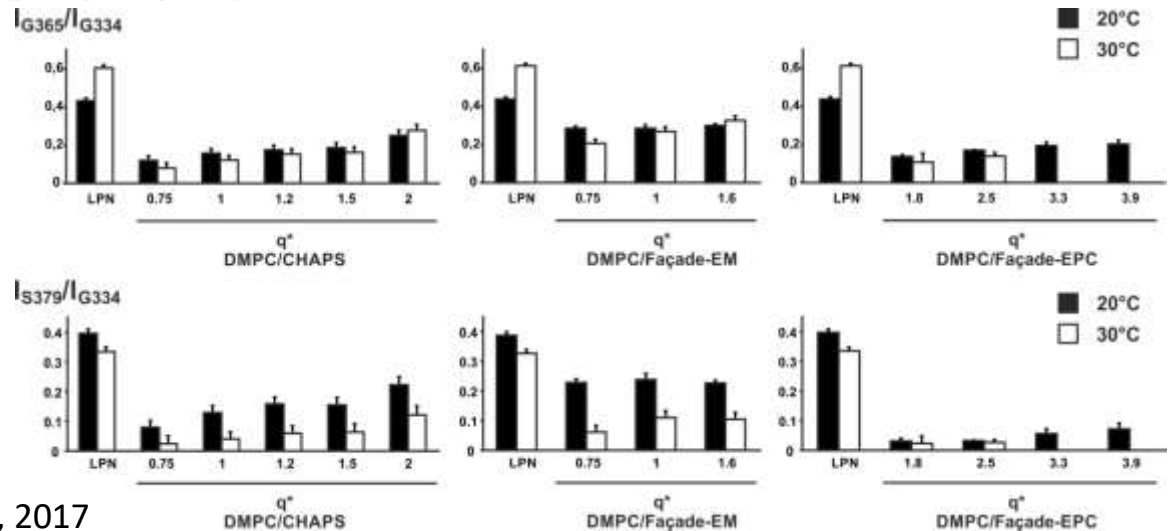
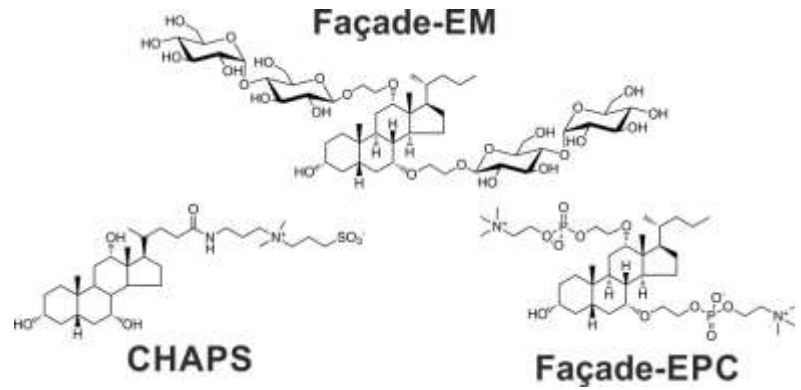
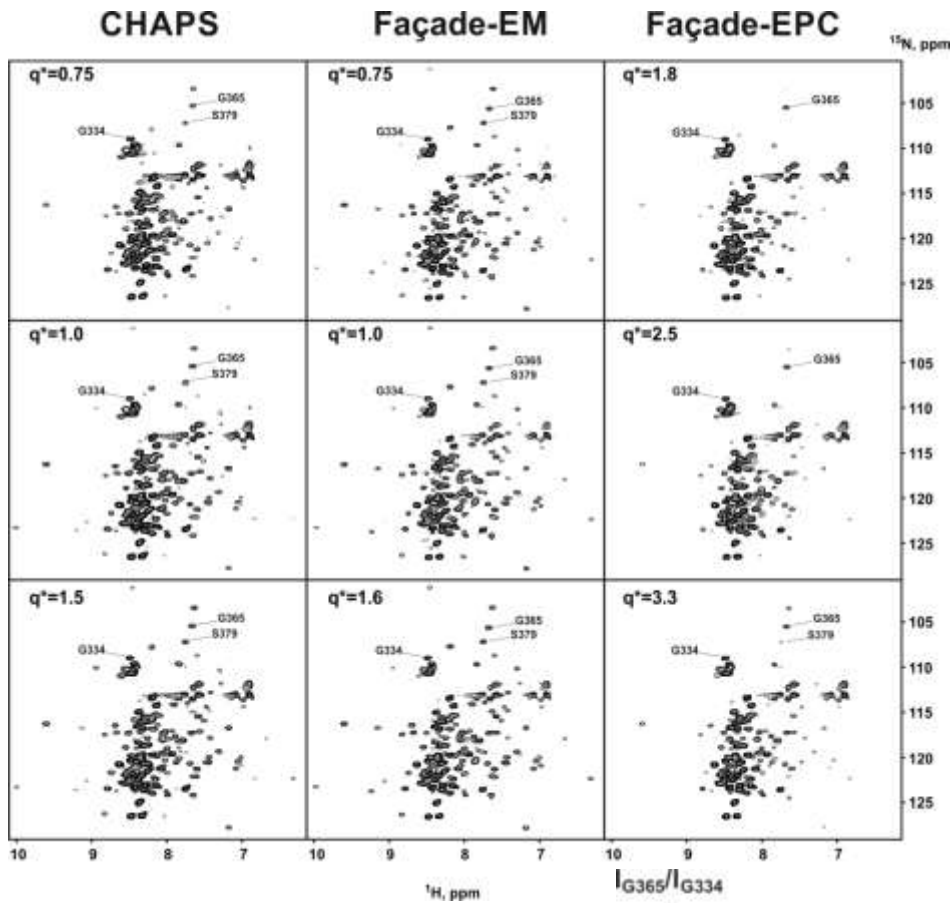
- Домен смерти p75 не свернут в средах, содержащих детергенты
- ЛБН слишком велики для стандартных подходов ЯМР и исключают обмен материей между частицами.

Разработка новых типов сред

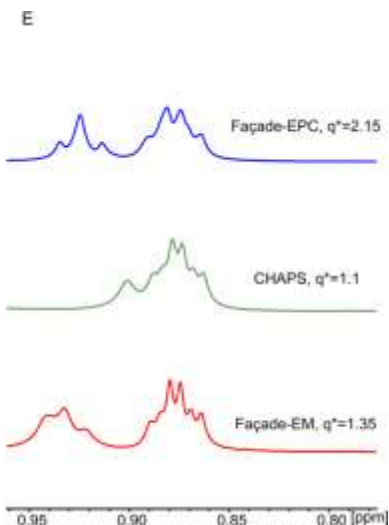
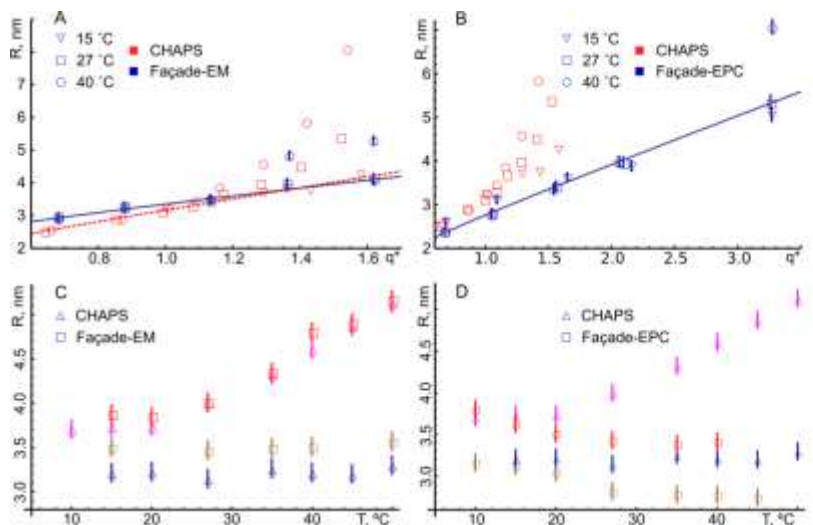
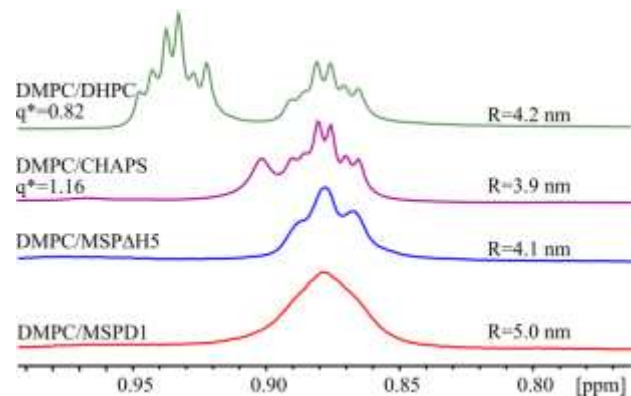
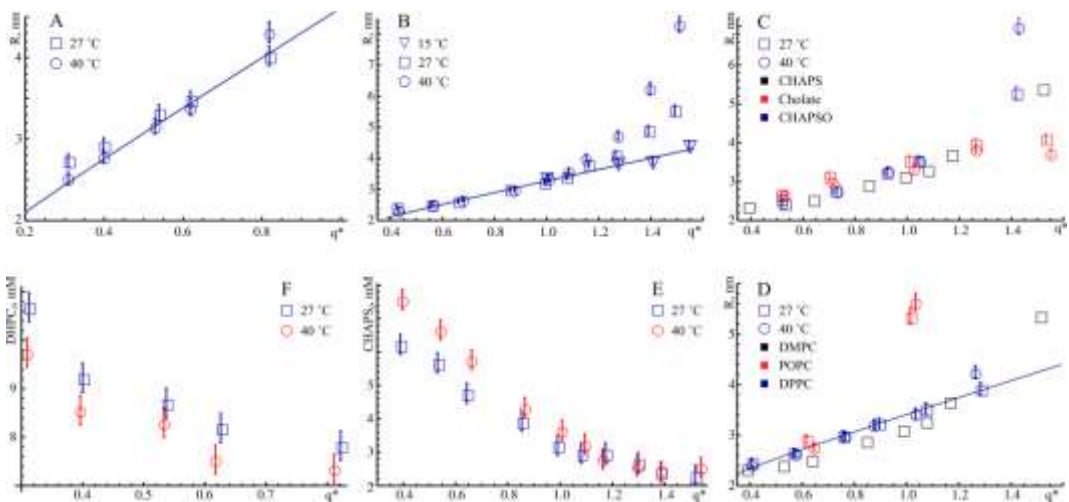
- Маленькие частицы
- Мягкие детергенты
- Наличие бислоя
- **Производные
холиевой
кислоты??**



Детергенты Façade

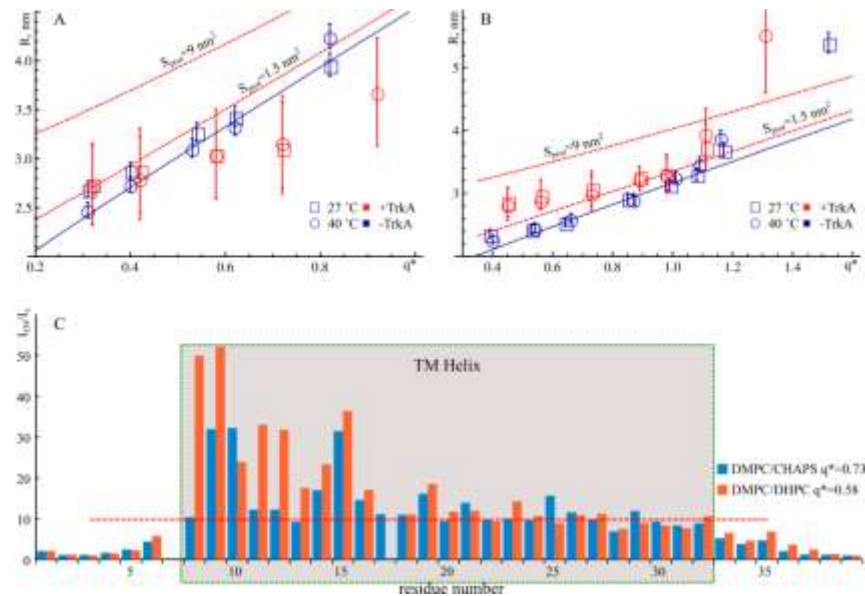
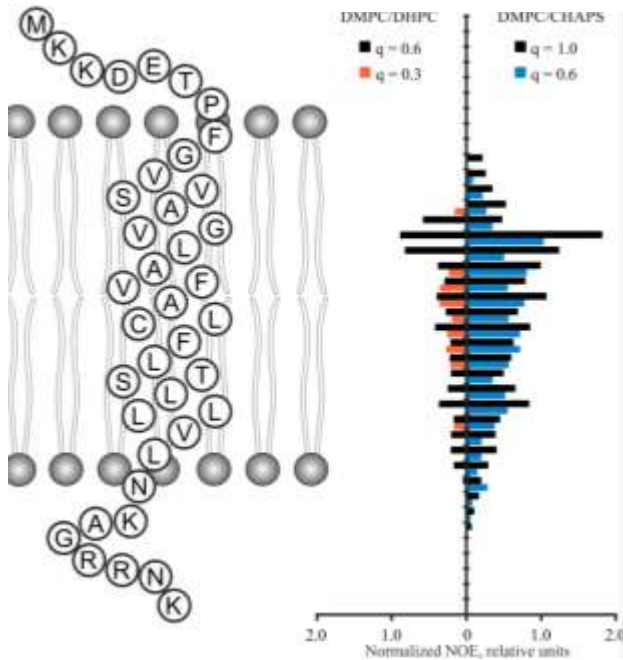


Размер и форма бицелл CHAPS/Facade



Наличие бислоя и упаковка липидов в бицеллах

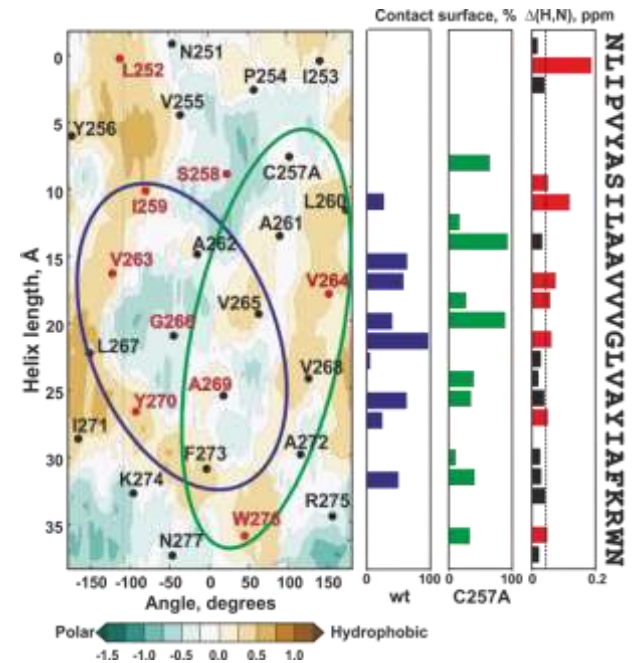
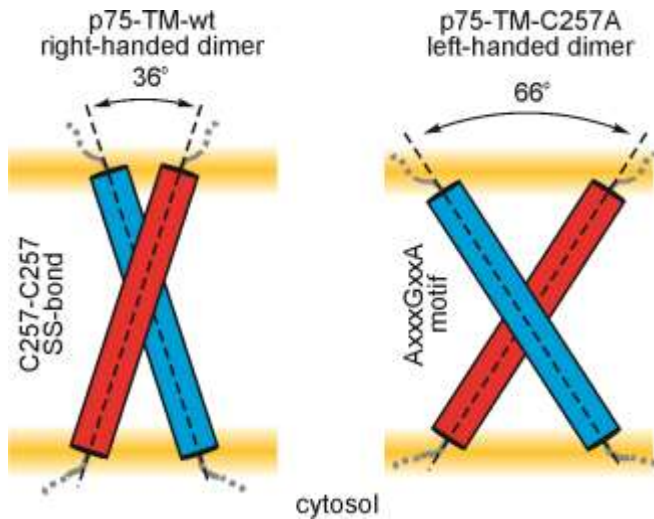
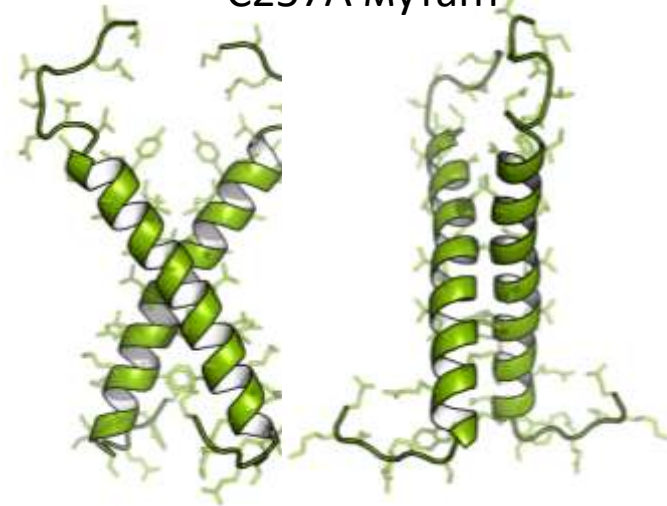
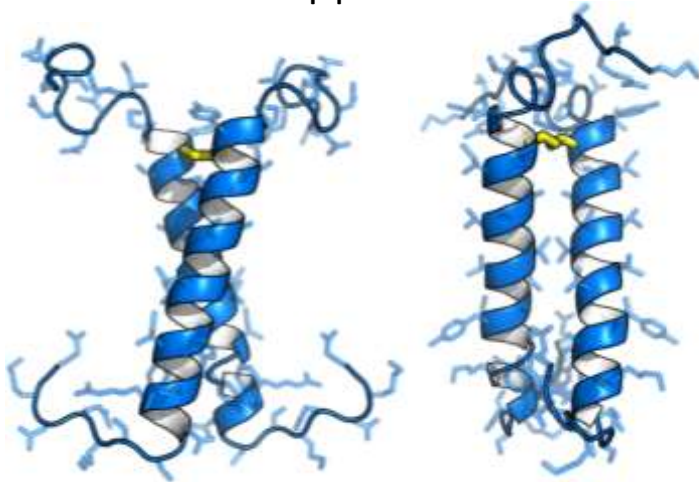
TrkA-TM NOE белок-липид



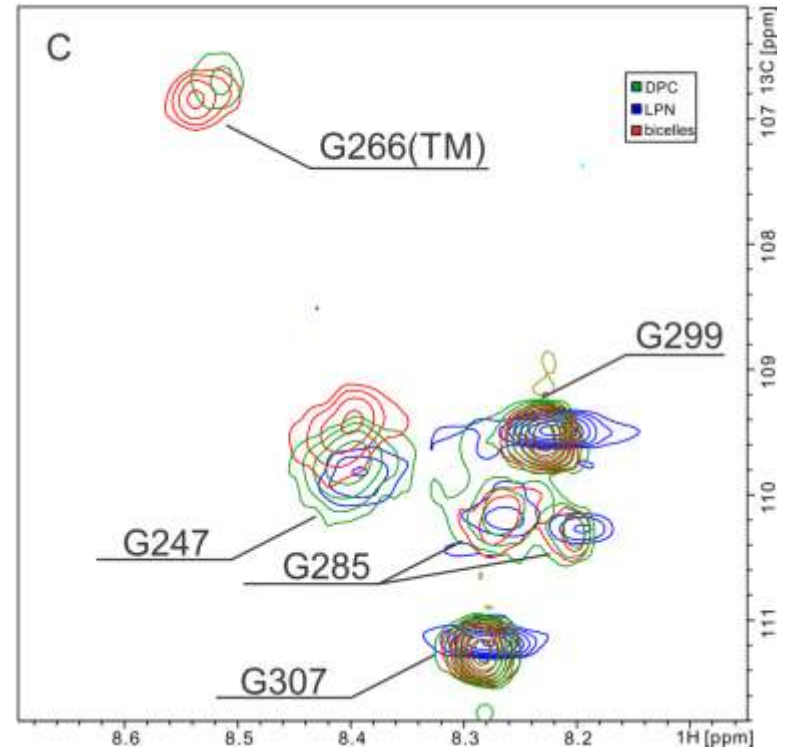
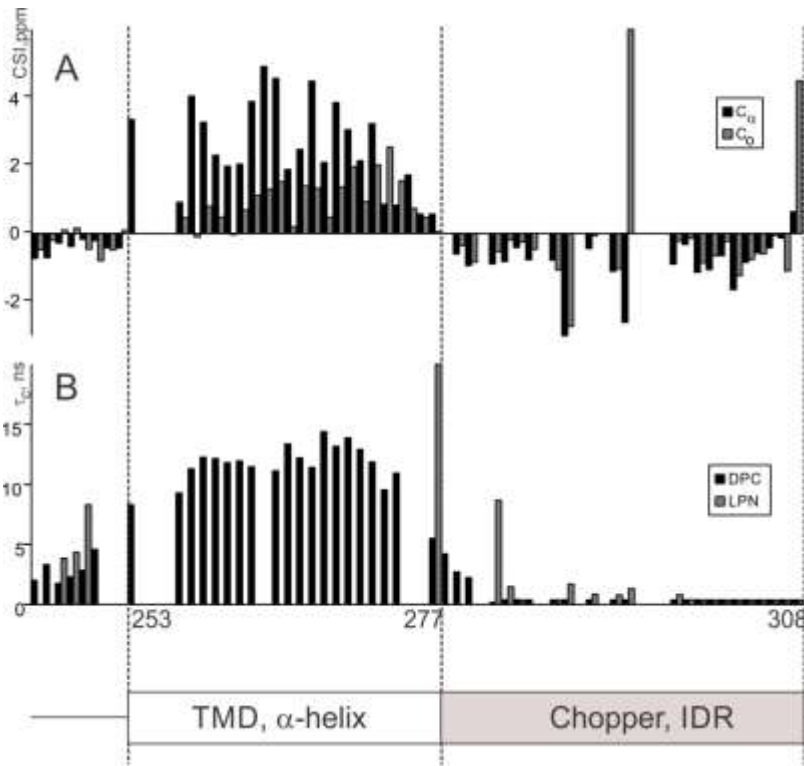
Структура ТМД р75

Дикий тип

C257A мутант

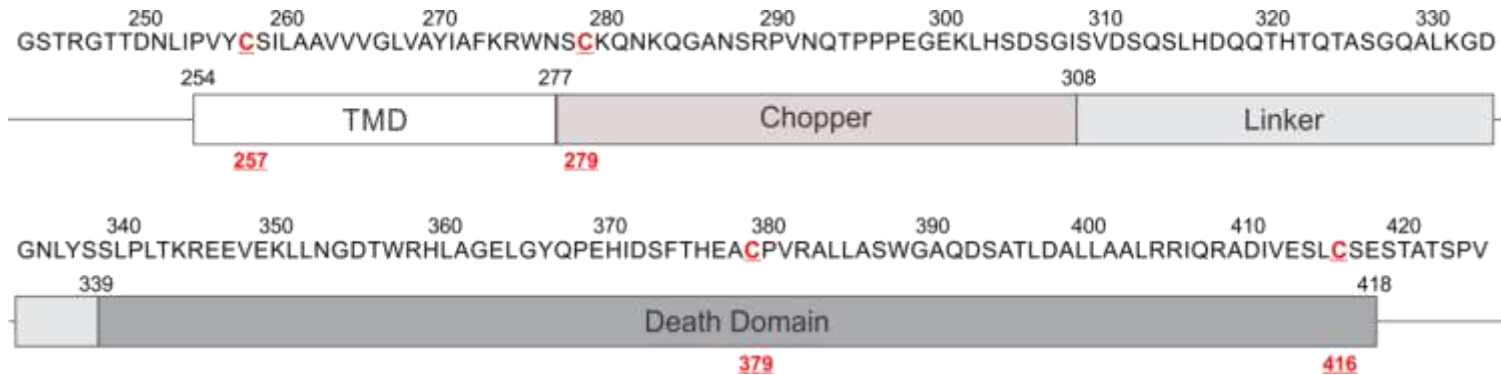


Конструкт P75 TM+Chopper

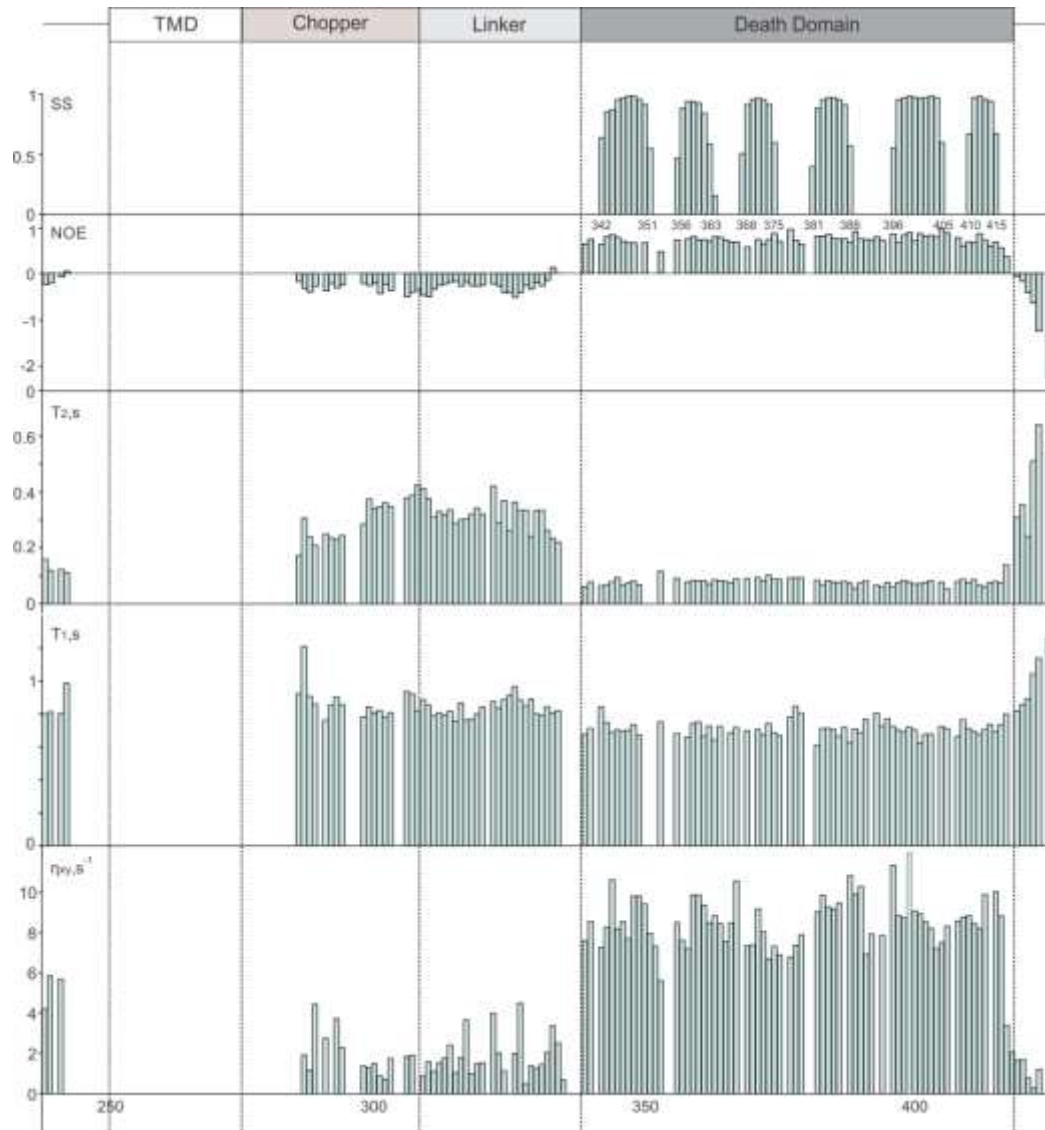


- Chopper неупорядочен во всех мембраноподобных средах

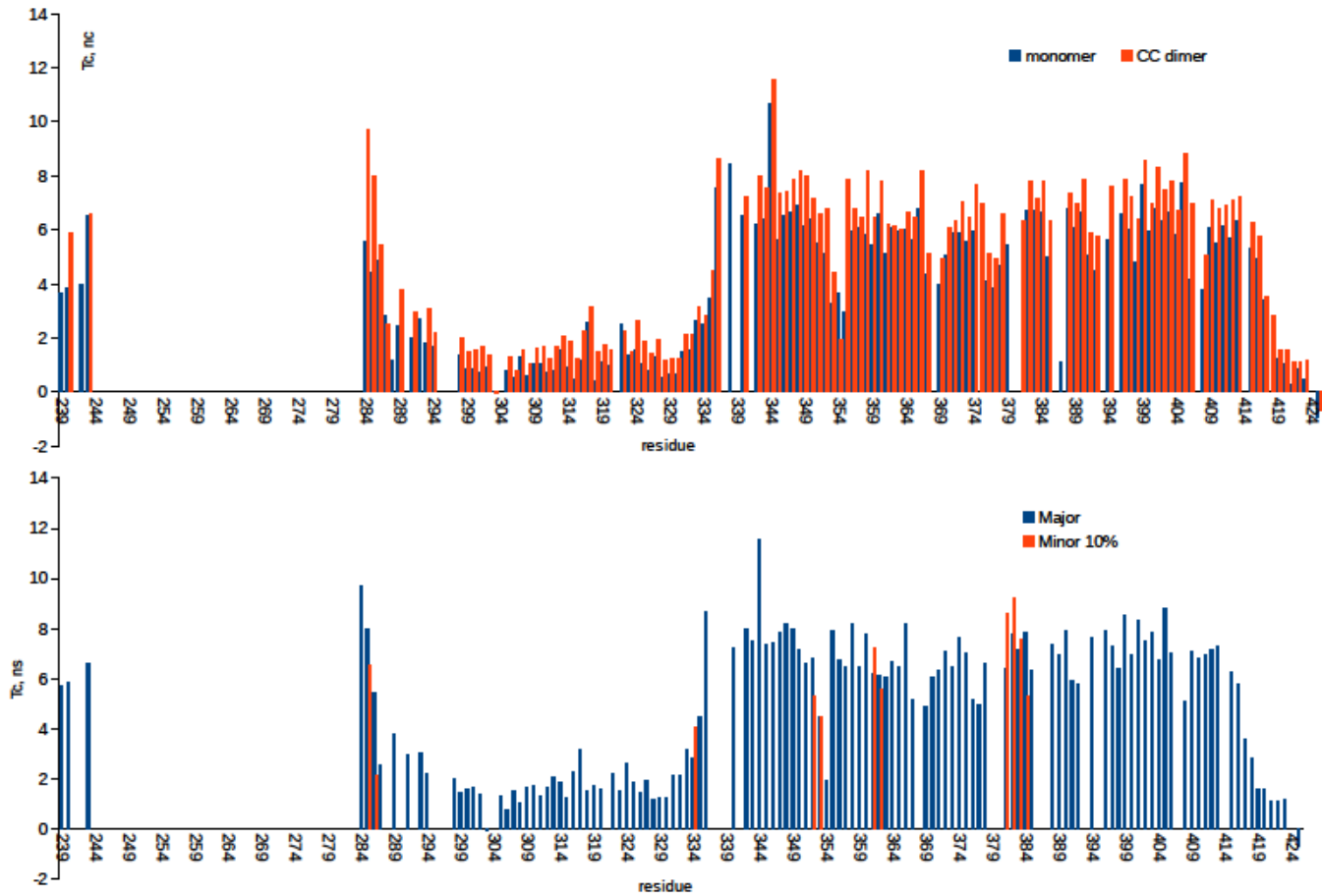
Выбор объекта



Конструкт P75 TM+ICD

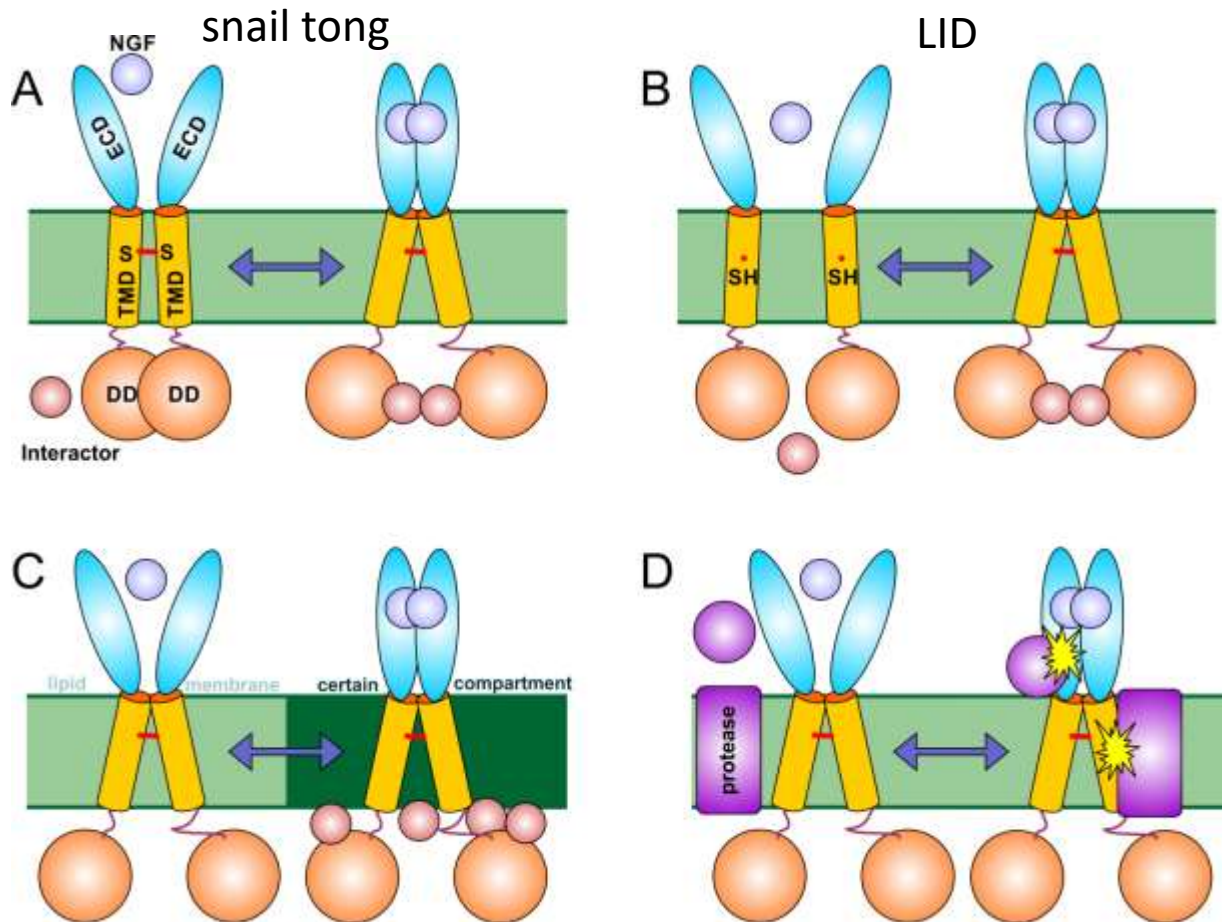


Ковалентная димеризация Р75 TM+ICD 3CS



P75 TM+ICD резюме

- Чоппер - IDR
- Движения домена смерти не связаны с движениями ТМД
- Нет взаимодействия между ТМД в димерах
- Snail-tong механизм невозможен
- **Нужно придумать другой механизм активации!**





Отдел структурной биологии, ИБХ



Acknowledgements



Lab. of Neurodegeneration, ISCIII

- **Marçal Vilar, Prof.**
- **Irmina Garcia-Caprio, Ph.D.**

