

Computergestützte Strukturbiologie
(Strukturelle Bioinformatik)

**Strukturbestimmung mit
NMR Spektroskopie**

Sommersemester 2009

Peter Güntert

NMR Spektroskopie: Geschichte

- 1924, Wolfgang Pauli: Vorhersage des Kernspins
- 1933, Isidor Rabi: Molekularstrahlmagnetresonanzdetektion
- 1945: Edward Purcell, Felix Bloch: Kernspinresonanz (NMR)
- 1953: A. Overhauser, I. Solomon: Nuclear Overhauser Effekt
- 1966, Richard Ernst: Fouriertransformations-NMR
- 1971, Jean Jeener: 2D NMR Spektren
- 1981, Kurt Wüthrich et al.: Resonanzzuordnung in Proteinen
- 1984, Kurt Wüthrich et al.: 3D Proteinstruktur in Lösung
- 1991, Ad Bax et al.: Tripelresonanzspektren (¹³C, ¹⁵N, ³H)
- 1997: TROSY, NMR Spektroskopie von großen Proteinen
- 2006: SAIL: Stereo-array Isotope Labeling für große Proteine
- 2009: ~8'000 NMR Strukturen in der Protein Data Bank

Prion proteins

Human
Chicken
Turtle
Frog
Pig
Dog
Cat
Sheep

Calzolari, L., Lysek, D. A., Pérez, D. R., Güntert, P., Wüthrich, K. *PLoS* 102, 851-855 (2005).
 Lysek, D. A., Schom, C., Nivon, L. G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Florio, F., Hermann, T., Güntert, P., Wüthrich, K. *PLoS* 102, 840-845 (2005).
 Lührs, T., Riek, R., Güntert, P., Wüthrich, K. *JMB* 326, 1549-1557 (2003).
 Zahn, R., Güntert, P., von Schroetter, C., Wüthrich, K. *JMB* 326, 225-234 (2003).
 Calzolari, L., Lysek, D. A., Güntert, P., von Schroetter, C., Riek, R., Zahn, R., Wüthrich, K. *PLoS* 97, 8340-8345 (2000).

NMR Spectrometer

900 MHz NMR spectrometer (VARIAN, Yokohama)

Liquid nitrogen
Liquid helium
Superconducting coil

2D NMR Spektren

through-bond
through-space

^AH — ^BH
| |
— C — — C —

NMR Spektrenauswertung

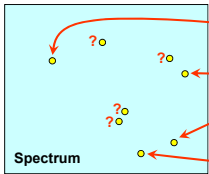
Manuell
Interaktiv

Automatisch

Automated Chemical Shift Assignment

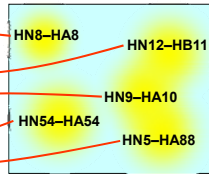
Observed peaks

Position known
Assignment unknown



Expected peaks

Assignment known
Position known only approximately



Assignment = Find mapping between expected and observed peaks.

Score for assignment

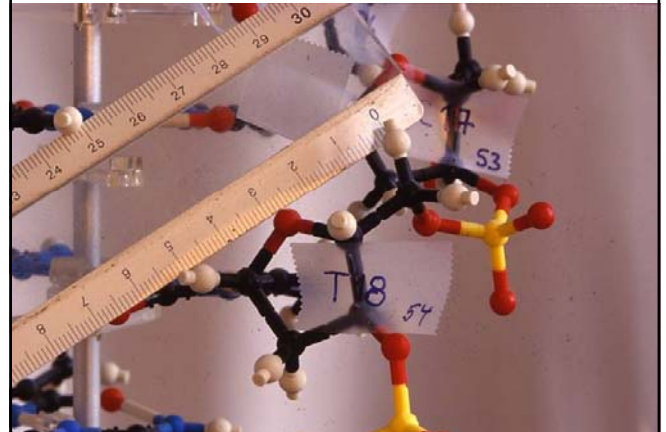
Presence of expected peaks
Positional alignment of peaks assigned to the same atom
Normality of assigned resonance frequencies

Optimization of assignment

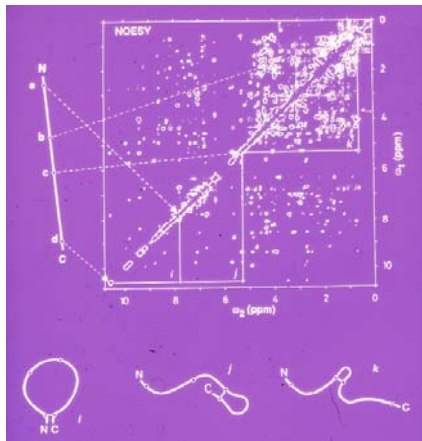
Genetic algorithm combined with local optimization

GARANT
Christian Bartels *et al.*
J. Comp. Chem. 18, 139–149 (1997)
J. Biomol. NMR 7, 207–213 (1996)

NMR measures distances between atoms



NOESY Spektrum



Konformationsdaten aus NMR Messungen

1. Nuclear Overhauser Effects (NOEs)
2. 3J skalare Kopplungen
3. H-Brücken
4. Chemische Verschiebungen
5. Residuelle dipolare Kopplungen (RDC)
- ...

NOE (Nuclear Overhauser Effect)

NMR Daten: Integral V von NOESY Kreuzsignalen
Konformationsdaten: obere Schranken für ^1H - ^1H Distanzen, d
Für isoliertes Spinpaar im starren Molekül:
 $V = C/d^6$ mit $C = \text{konstant}$

Eigenschaften:

- nur kurze Distanzen $< 5 \text{ \AA}$ messbar
- dichtes Netzwerk bzgl. der Sequenz kurz- und langreichweitiger Distanzschranken
- viele ^1H Atome im Molekül \rightarrow "Spindiffusion"
- interne Bewegungen \rightarrow nicht-lineare Mittelung
- Bestimmung von C ?
- Überlapp \rightarrow mehrdeutige Zuordnung, verfälschte Integrale

NOE distance restraints \rightarrow Protein structure



3J skalare Kopplungen

NMR Daten: Aufspaltung eines Signals

Konformationsdaten: Einschränkungen von Torsionswinkeln, θ

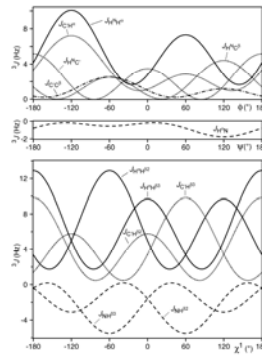
Karplus-Kurve: $^3J(\theta) = A \cos^2\theta + B \cos\theta + C$
mit empirischen Konstanten A, B, C

Zum Beispiel: $^3J_{\text{HNH}\alpha}(\phi)$, $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta}(\chi^1)$

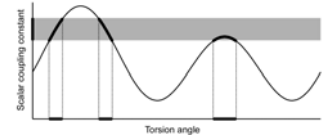
Eigenschaften:

- Information nur über lokale Konformation
- mehrdeutige Beziehung $^3J \leftrightarrow \theta$

3J skalare Kopplungen



- $^3J(\theta) = A \cos^2\theta + B \cos\theta + C$
- local information only
- ambiguous relation to torsion angle



H-Brücken

NMR Daten: langsamer $^1\text{H} \rightarrow ^2\text{H}$ Austausch + NOEs

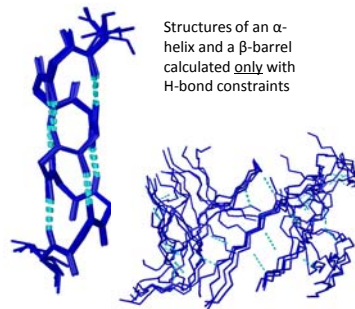
Konformationsdaten: Donor-Akzeptor Distanz

Typische H-Brücken: $-\text{N}-\text{H} \cdots \text{O}=\text{C}-$ in regulären Sekundärstrukturen (Helices, β -Blätter)

Eigenschaften:

- Bzgl. Sequenz mittel- und langreichweitig
- Donor (H) identifizierbar
- Akzeptor (O) nur indirekt bestimmbar (benachbarte NOEs + Annahmen über Sekundärstruktur)

Impact of hydrogen bond restraints



- Strong impact on structure
- Direct detection of H-bonds by NMR is possible, but not sensitive
- Without identification of acceptor atom \approx assumption on secondary structure

Chemische Verschiebungen

NMR Daten: chem. Verschiebungen, δ

Konformationsdaten: (ϕ, ψ) Torsionswinkelbereiche

Komplexe Beziehung: $\delta \leftrightarrow (\phi, \psi)$

Eigenschaften:

- einfache Messung
- (ϕ, ψ) -Werte aus Datenbank von Proteinen mit bekannter Struktur und chem. Verschiebungen (TALOS)
- Information nur über lokale Konformation

Three principal challenges of NMR protein structure analysis

1. Efficiency

Spectrum analysis requires (too) much time and expertise.

2. Size limitation

Structures of proteins > 30 kDa are very difficult to solve.

3. Objectivity

Agreement between structure and raw NMR data?

Computational tasks in NMR structure determination

Peak picking	→ Signal frequencies
Shift assignments	→ Spin frequencies
NOESY assignment	→ Structural restraints
Structure calculation	→ 3D structure
Refinement, validation	→ Final structure

Structure calculations

- Structure calculation programs try to “fold” a protein into a three-dimensional structure that agrees with the measured data.
- Differences between measured data and the structure are manifested as violations.
- Violations cause forces that act on the molecule, driving it towards minimal (pseudo)energy and optimal agreement with the measured data.
- The target function (pseudoenergy) is the sum of squares of the violations.
- The energy landscape of this target function is complex and has many local minima.

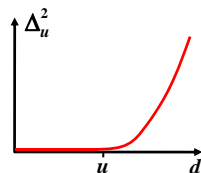
CYANA target function

$$T = \sum \Delta_u^2 + \sum \Delta_l^2 + \sum \Delta_a^2 + \dots$$

upper distance limits (NOEs)
lower distance limits (steric)
torsion angle restraints

$\Delta_u, \Delta_l, \Delta_a$: restraint violations,

$$\text{e. g., } \Delta_u = \begin{cases} d - u & \text{if } d > u \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

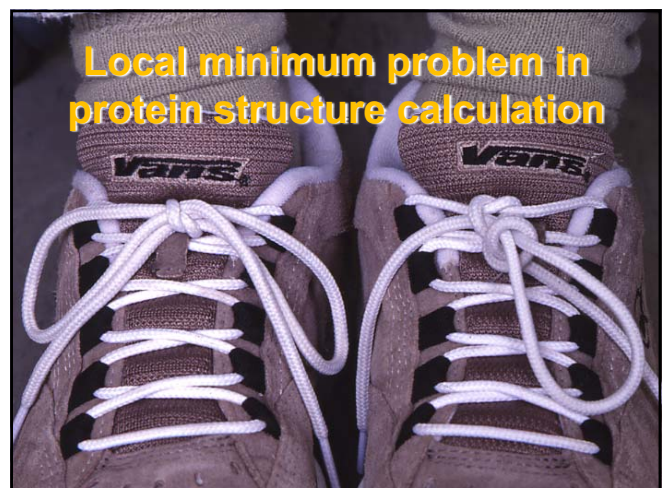


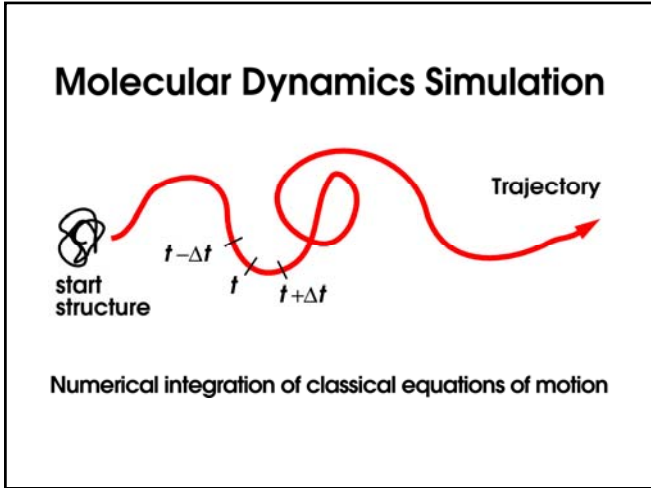
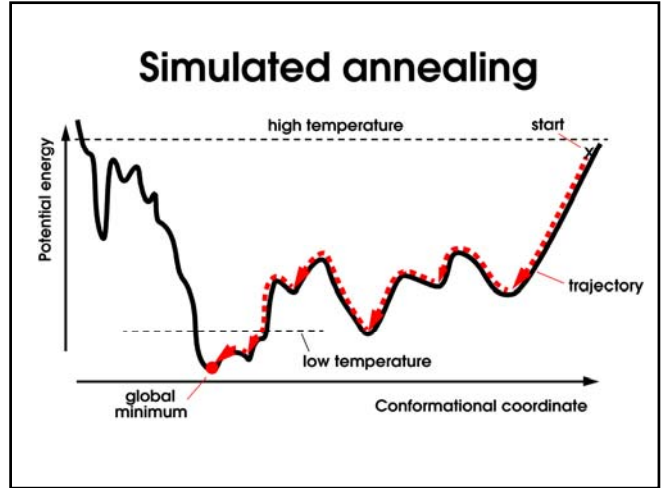
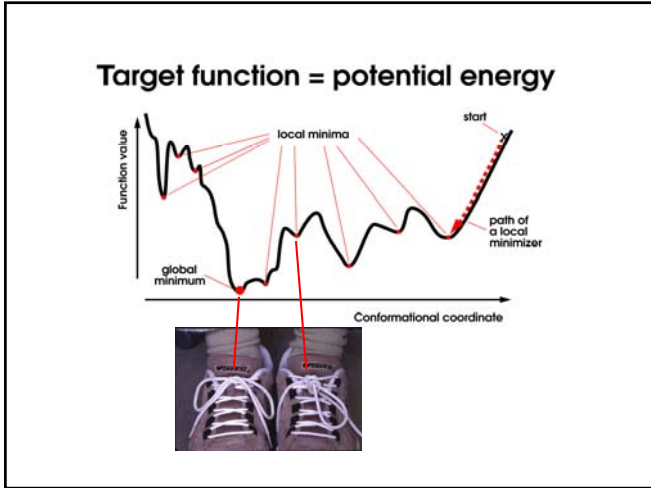
Strukturberechnungsalgorithmen

- Frühere Methoden:
 - Interaktiver Modellbau
 - Distanzgeometrie
 - Minimierung einer variablen Zielfunktion
- Simulated annealing:
 - Monte Carlo
 - Moleküldynamiksimulation im kartesischen Raum
 - Moleküldynamiksimulation im Torsionswinkelraum

Ist NMR Strukturberechnung möglich?

- Grundsätzlich:
 - NOEs messen nur kurze Distanzen < 5 Å
 - ungenaue obere Schranken
 - Kann damit die globale Struktur eines 30 Å großen Proteins bestimmt werden?
JA, wenn genügend Daten da sind.
- Praktisch:
 - Zielfunktion hat viele lokale Minima
 - Kann eine (fast) optimale Struktur gefunden werden?
JA.





- ### Strukturbündel
- 100 Startstrukturen mit zufälligen Torsionswinkeln
 - 100 unabhängige simulated annealing Läufe mit:
 - gleichen experimentellen Daten
 - unterschiedlichen Startstrukturen
 - Auswahl der 20 "besten" Strukturen mit den tiefsten Zielfunktionswerten
 - Sampling des Konformationsraums?



