

# NMR-Spektroskopie an Peptiden

Seminar AG Rademann  
3.11.2005



Worum soll es heute gehen ?

Peptide

2D-NMR-Spektroskopie

Sequenzspezifische Zuordnung

Bestimmung der 3D-Struktur



NMR-Spektroskopie an Peptiden

01.11.2005

## Peptide

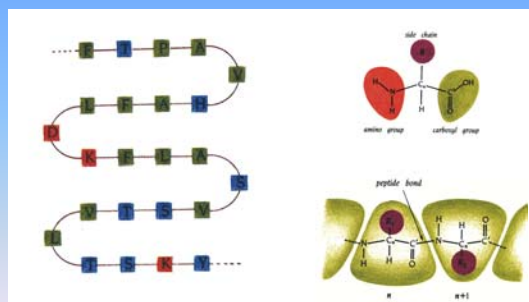


NMR-Spektroskopie an Peptiden

01.11.2005

## Peptide

Die Primärstruktur

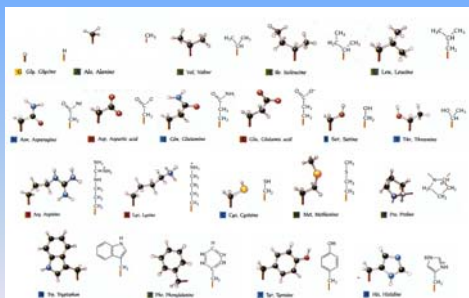


NMR-Spektroskopie an Peptiden

01.11.2005

## Peptide

20 natürliche Aminosäuren

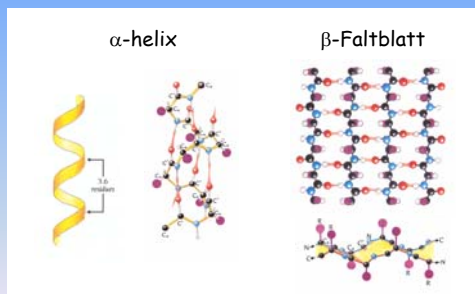


NMR-Spektroskopie an Peptiden

01.11.2005

## Peptide

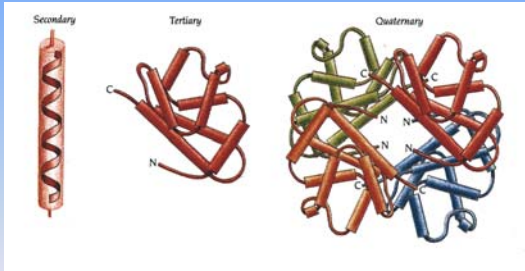
Sekundärstrukturelemente



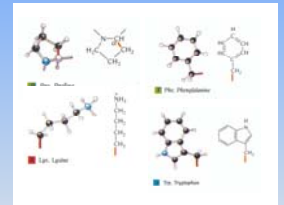
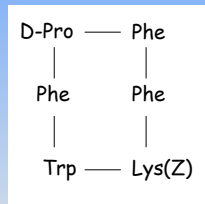
NMR-Spektroskopie an Peptiden

01.11.2005

Ebenen struktureller Organisation

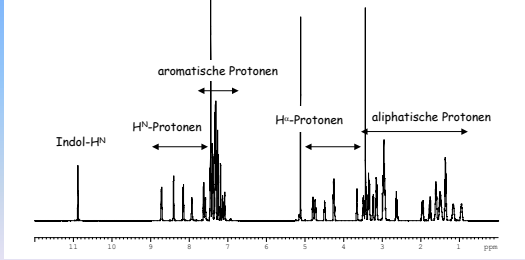


cyclische Peptide sind kleine Peptide mit fixierter Konformation

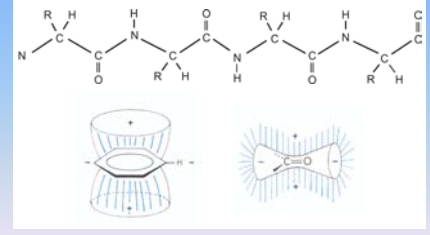


F3-008: *cyc*-(dP-F-F-K(Z)-W-F)

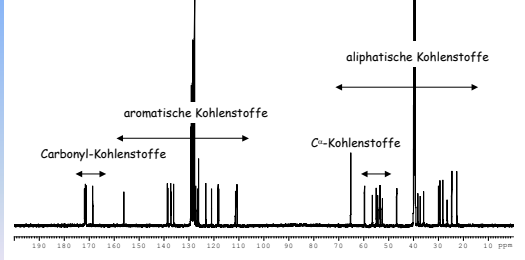
<sup>1</sup>H-1D-Spektrum von F3-008  
 (in d<sub>6</sub>-DMSO, 300 K)



Unterschiede in der chemischen Verschiebung treten durch Strukturierung auf



<sup>13</sup>C-1D-Spektrum von F3-008  
 (in d<sub>6</sub>-DMSO, 300 K)



Peptide sind quasi Polymere, es ergeben sich zwei Folgerungen.

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

Die Linien sollten so scharf wie möglich sein, beim keinem der Spektren sollte ein Magnitude-Rechnung notwendig sein

## 2D-NMR-Spektroskopie

Die beiden entscheidenden Vorteile der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie sind

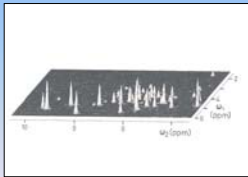
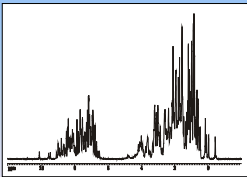
**Verbesserte Auflösung:** Die Signale werden über eine Fläche (2D) oder einen Raum (3D, 4D) verteilt

**Magnetisierungstransfer:** Es entstehen Signale die auf eine Wechselwirkung zwischen den Kernen hinweisen. Das können WW durch die Bindung (via J-Kopplung) oder durch den Raum (via NOE) sein.

Zusammen ermöglicht das eine Auswertung der Spektren bzgl. Zuordnung und Strukturinformation

1D-NMR  
2 Achsen:  
Intensität vs. Frequenz

2D-NMR  
3 Achsen:  
Intensität vs. Frequenz (1)  
vs. Frequenz (2)



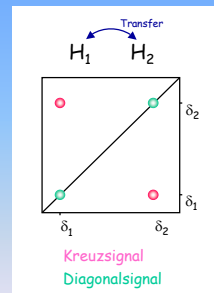
### homonukleare Spektren

Transfer von Magnetisierung findet zwischen gleichartigen Kernen statt. Beide Frequenzachsen zeigen die chemischen Verschiebungen des gleichen Kerns. Findet Transfer statt, ergibt sich in beiden Dimensionen eine unterschiedliche Verschiebung:

Kreuzsignal

Findet kein Transfer statt, dann ergibt sich in beiden Dimensionen die gleiche Verschiebung:

Verschiebung:  
Diagonalsignal



### homonukleare Spektren

Beispiele für homonukleare Spektren sind das DQF-COSY, das TOCSY, das NOESY und das ROESY

DQF-COSY: Transfer via skalare Kopplung, i.a. 2 - 3 Bindungen

TOCSY: Transfer via skalare Kopplung, ganzen Spinsysteme

NOESY: Transfer durch den Raum via dipolare Kopplung (z->z)

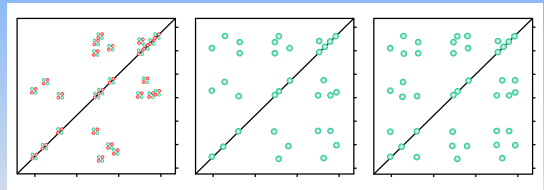
ROESY: Transfer durch den Raum via dipolare Kopplung (x->x)

### homonukleare Spektren

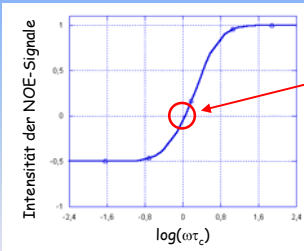
DQF-COSY

TOCSY

NOESY

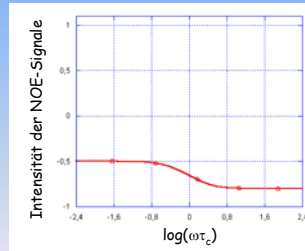


Es gibt aber beim NOESY ein Problem, das mit der Beweglichkeit der Moleküle zusammenhängt



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

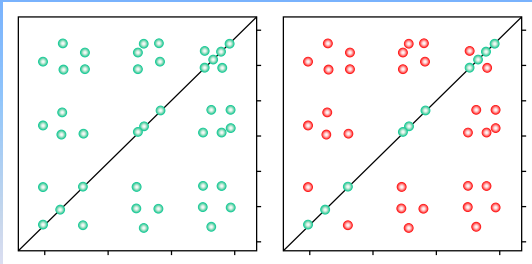
Einen Ausweg bietet das ROESY Experiment



Hier gibt es keinen Nulldurchgang

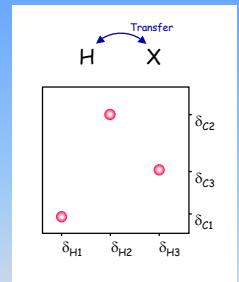
NOESY mit  $\omega\tau_c > 1$

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



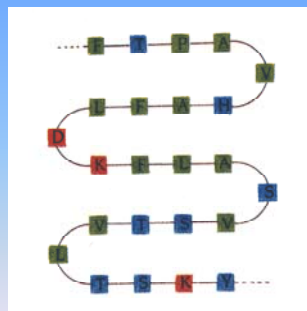
heteronukleare Spektren

Transfer von Magnetisierung findet zwischen unterschiedlichen Kernsorten statt. Beide Frequenzachsen zeigen die chemischen Verschiebungen unterschiedlicher Kerne. Findet Transfer statt, ergibt sich ein Signal am Schnittpunkt der chemischen Verschiebungen der involvierten Kerne. Findet kein Transfer statt, dann ergibt sich kein Signal.



Heteronukleare Spektren werden wir hier nicht verwenden, sie können aber auch bei Peptiden sehr hilfreich sein

# Sequenzspezifische Zuordnung

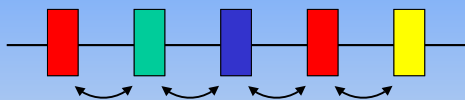


Ein Peptid ist ein Polymer

Die Kenntnis der Sequenz ist unbedingt erforderlich

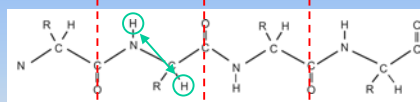
Man führt eine sequenzspezifische Zuordnung durch

Sequenz-spezifische Zuordnung

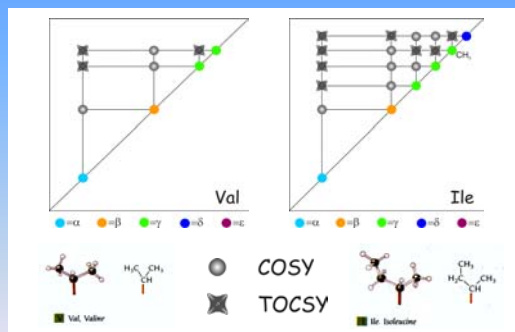


1. Welcher Aminosäuretyp liegt vor (welche Farbe)
2. Welche Aminosäure liegt neben welcher (Nachbarschaft)
3. Abgleich mit der Peptidsequenz
4. Die Reihenfolge von (1) und (2) ist egal

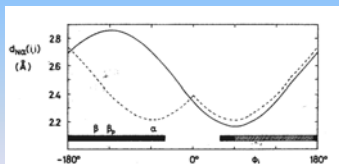
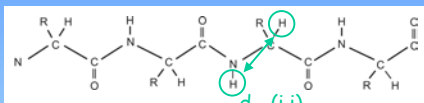
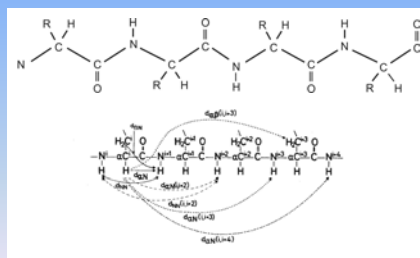
Der Aminosäuretyp wird aus DQF-COSY und TOCSY bestimmt. Jede Aminosäure bildet ein separates Spinsystem, da über den Carbonyl-Kohlenstoff keine signifikante skalare Kopplung reicht



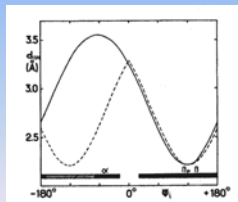
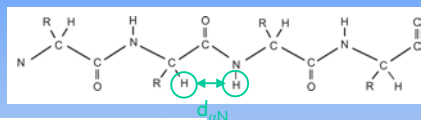
$H^N-H^\alpha$  gibt es in jeder Aminosäure (außer Prolin), die Seitenketten sind unterschiedlich



Die Verknüpfung der Aminosäuren erfolgt über Abstände entlang des Peptid-"backbone"



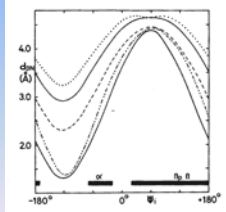
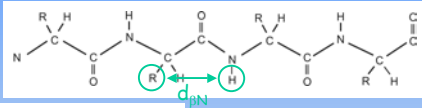
Der Abstand vom  $H^N$  zum  $H^\alpha$ ,  $d_{N\alpha}(i,i)$  innerhalb einer Aminosäure ist immer kurz genug für einen NOE



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

Peptide: Sequenzspezifische Zuordnung

31/52



und auch - mit Einschränkungen  
- für den Abstand vom H<sup>N</sup> zum  
H<sup>β</sup> der Aminosäure (i-1), d<sub>βN</sub>

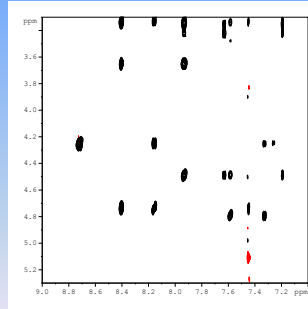


NMR-Spektroskopie an Peptiden

01.11.2005

Peptide: Sequenzspezifische Zuordnung

32/52



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

Daneben gibt es aber noch  
andere Signale von HN zu  
Seitenketten und  
Aromaten zu Seitenketten



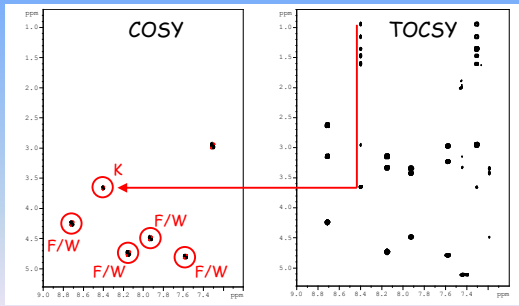
NMR-Spektroskopie an Peptiden

01.11.2005

Peptide: Sequenzspezifische Zuordnung

33/52

1. Identifizierung der Aminosäuretypen



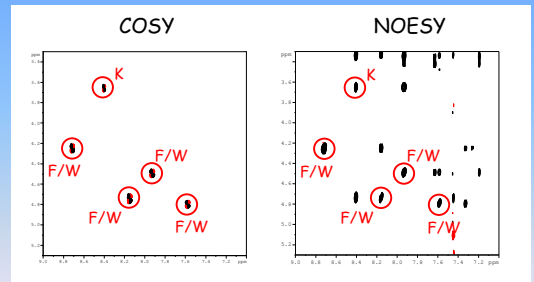
NMR-Spektroskopie an Peptiden

01.11.2005

Peptide: Sequenzspezifische Zuordnung

34/52

2. Übertragung der COSY-Peaks ins NOESY



NMR-Spektroskopie an Peptiden

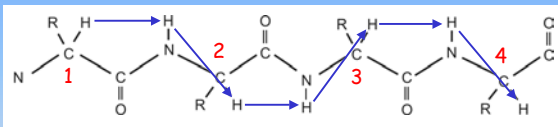
01.11.2005

Peptide: Sequenzspezifische Zuordnung

35/52

3. Dann kommt der „sequential walk“

Erst in der Theorie....



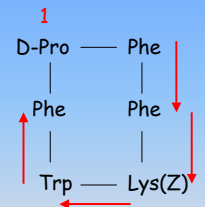
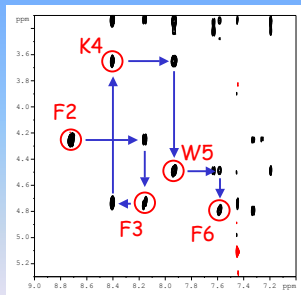
NMR-Spektroskopie an Peptiden

01.11.2005

Peptide: Sequenzspezifische Zuordnung

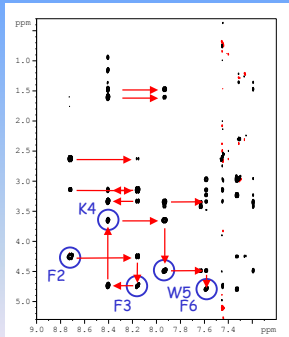
36/52

4. Dann im Spektrum

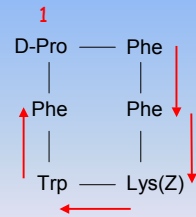


NMR-Spektroskopie an Peptiden

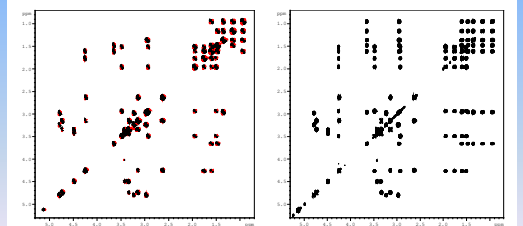
01.11.2005



nimmt man die H $\beta$  mit dazu wird es noch etwas sicherer



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



## Bestimmung der 3D-Struktur

Aus den NMR-Spektren lassen sich zahlreiche strukturell relevante Parameter extrahieren:

Abstände über NOE-Effekte

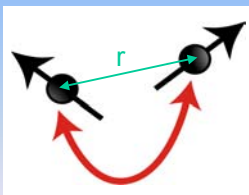
Dihedralwinkel über J-Kopplungen

Dihedralwinkel über chemische Verschiebungen

Den NOE-Effekt haben wir schon kennen gelernt  
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

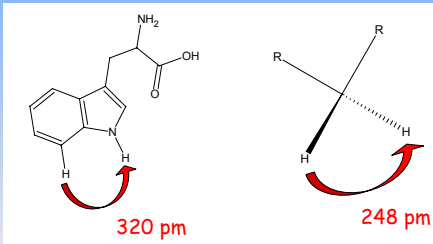


Abstände innerhalb des Moleküls sind zur Intensität der Kreuzsignale proportional. Allerdings lassen sich die Abstände nicht absolut bestimmen, sondern nur durch interne Kalibrierung. Dazu braucht man NOE-Effekte von bekannten Abständen

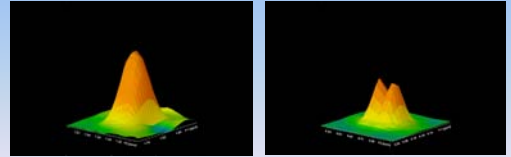
Dann kann man die unbekannten Abstände durch Vergleich der Intensitäten ermitteln

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

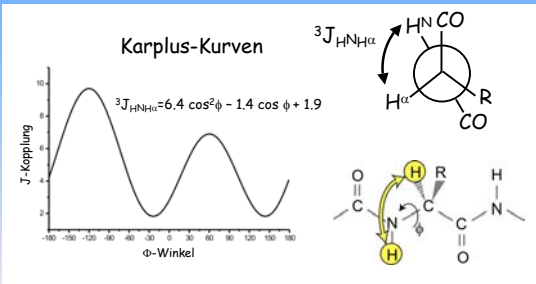
Als Eichabstände eignen sich der Indol-Ring von Tryptophan oder zwei geminale Protonen



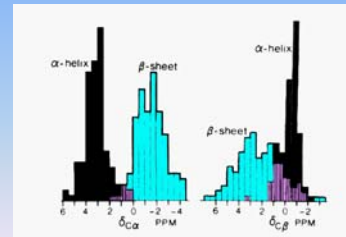
Die Intensität der Signale wird dabei durch Volumenintegration bestimmt, ganz analog den eindimensionalen Spektren, bei denen die Fläche unter der Kurve der Intensität entspricht



Dihedralwinkel kann man aus J- Kopplungen erhalten

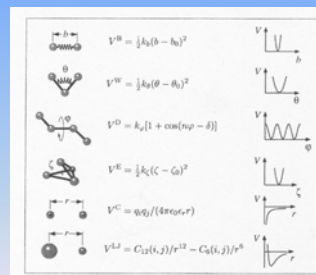


Aber auch chemische Verschiebungen enthalten Strukturinformation. Der Zusammenhang ist zuerst für die Werte von  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  aufgefallen



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

Elemente eines Kraftfeldes



- Abstände
- Tetraederwinkel
- Dihedralwinkel
- Coulombwechselwirkung
- Lennard-Jones



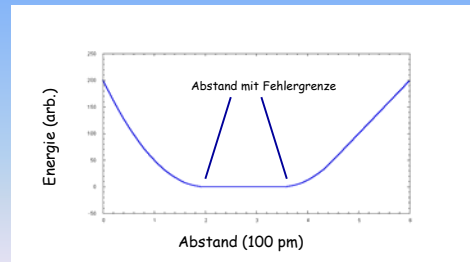
Zu den „chemischen“ Elemente eines Kraftfeldes kommen noch die experimentellen hinzu, mit entsprechender Gewichtung

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

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

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

Das experimentelle Potential für Abstände aus NOES wird so eingeführt



Am Ende steht dann die dreidimensionale Struktur des Peptides



That's it