

NMR

Εισαγωγή στο βιολογικό NMR, μορφή αποτελεσμάτων.

NMR : γενικά

Το NMR (σε αντίθεση με τις μεθόδους της κρυσταλλογραφίας και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας) δεν παράγει -μα ούτε και εμπεριέχει στην ανάλυση του- την έννοια του 'ειδώλου' ή της 'εικόνας' του μορίου. Η τρισδιάστατη δομή βιομακρομορίων προκύπτει με υπολογιστικές μεθόδους μέσω των περιορισμών (σε αποστάσεις και γωνίες δεσμών) που προκύπτουν από την καθ'αυτή μέθοδο.

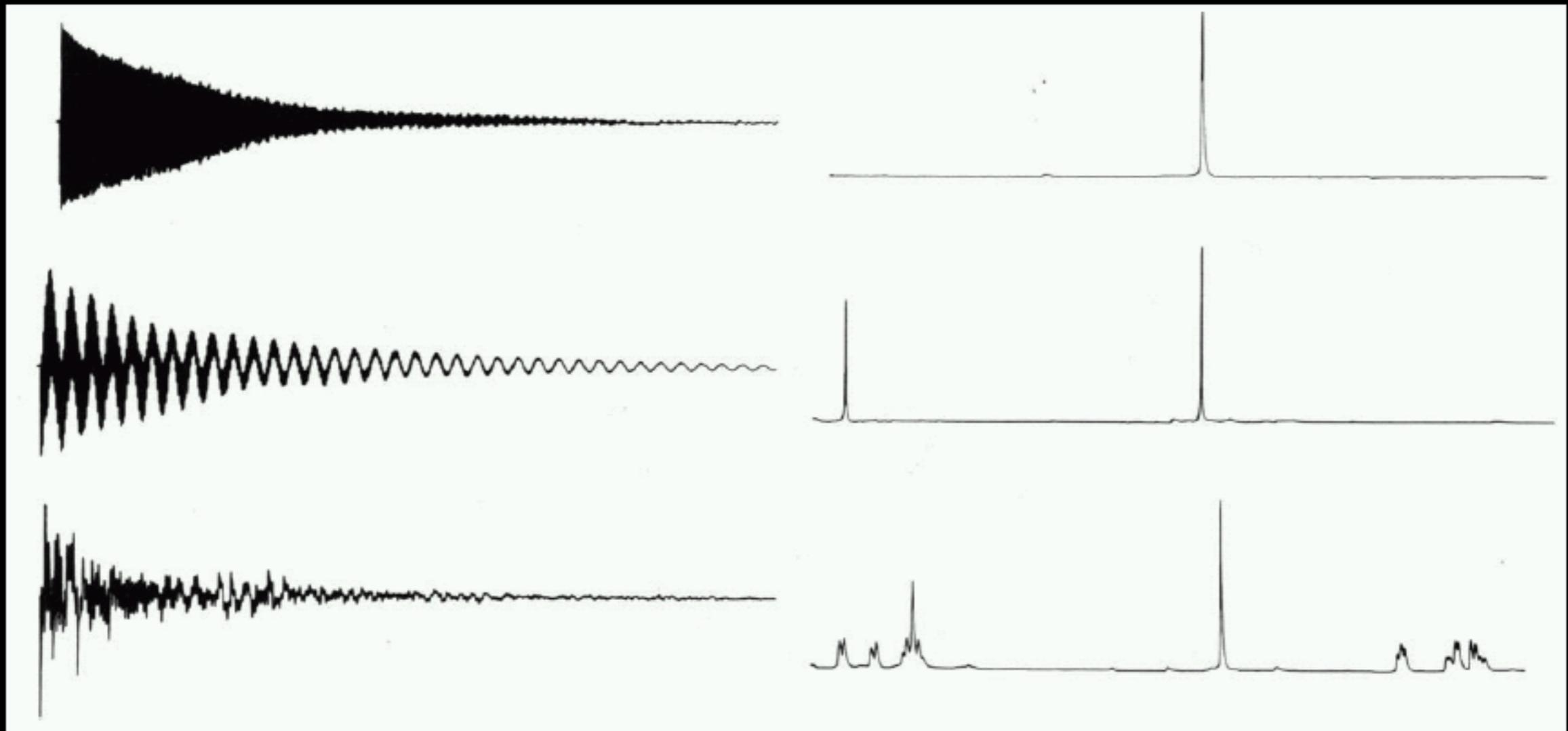
NMR : φυσικές αρχές

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του μαθήματος της οργανικής χημείας. Συνοπτικά, η φυσική της βάση βρίσκεται στην ιδιοπεριστροφή των πυρήνων. Για πυρήνες περιττού ατομικού αριθμού, αυτό οδηγεί στην δημιουργία ενός μαγνητικού διπόλου (spin) το οποίο παρουσία ενός ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου μπορεί να προσανατολιστεί με δύο μόνο τρόπους (παράλληλα ή αντιπαράλληλα). Οι δύο προσανατολισμοί διαφέρουν ενεργειακά και κατά συνέπεια οι πληθυσμοί των πυρήνων που ανήκουν σε αυτούς επίσης διαφέρουν (κατά πολύ λίγο: μερικά ppm για τα ^1H πρωτόνια).

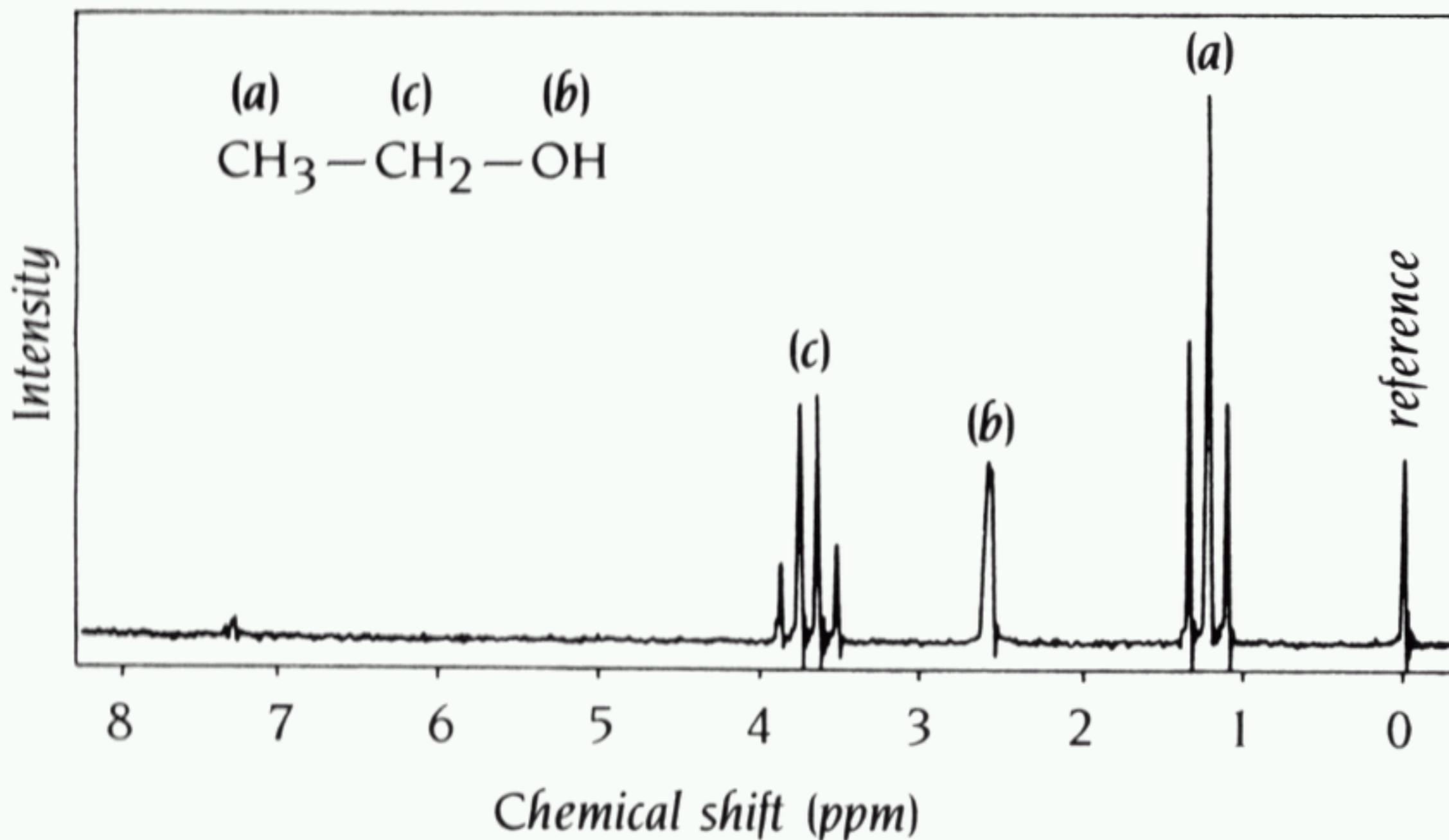
NMR : φυσικές αρχές

Συντονισμός της συχνότητας ιδιοπεριστροφής των πυρήνων με ένα δεύτερο εξωτερικό εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο (με τη μορφή ραδιοσυχνοτήτων) οδηγεί στη μετάπτωση των πυρήνων από την μία ενεργειακή στάθμη στην άλλη. Η επακόλουθη αποδιέγερση τους συνοδεύεται από την εκπομπή ανιχνεύσιμης ακτινοβολίας, ο μετασχηματισμός Fourier της οποίας δίνει το συνηθισμένα (1D) NMR φάσματα. Η συχνότητα στην οποία εκπέμπουν οι πυρήνες εξαρτάται από το χημικό περιβάλλον τους και συνεπώς από τη δομή (και δυναμική) του μορίου.

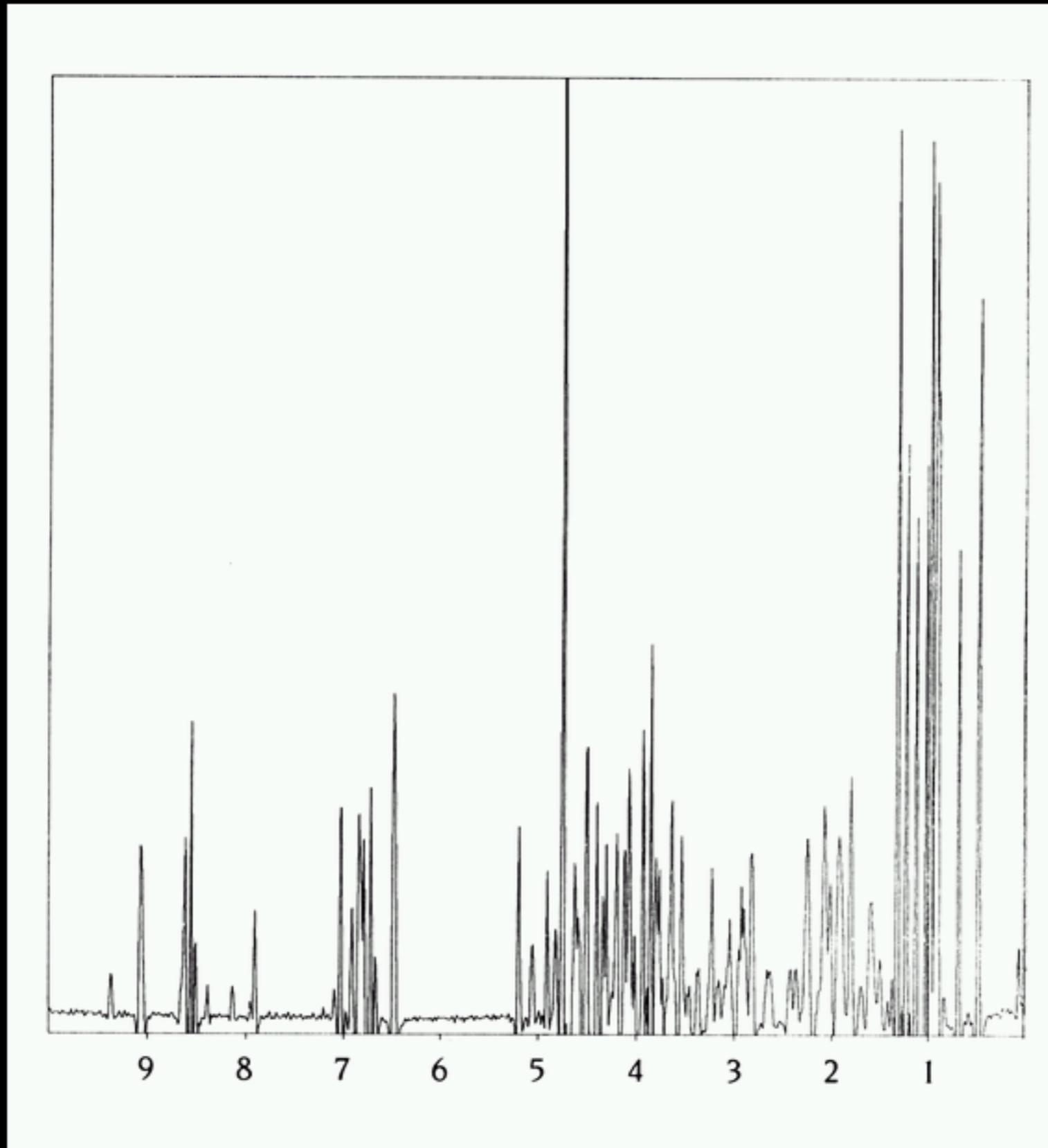
NMR : και εδώ ο κ.Fourier



NMR : απλά 1D φάσματα



NMR : μακρομοριακά φάσματα

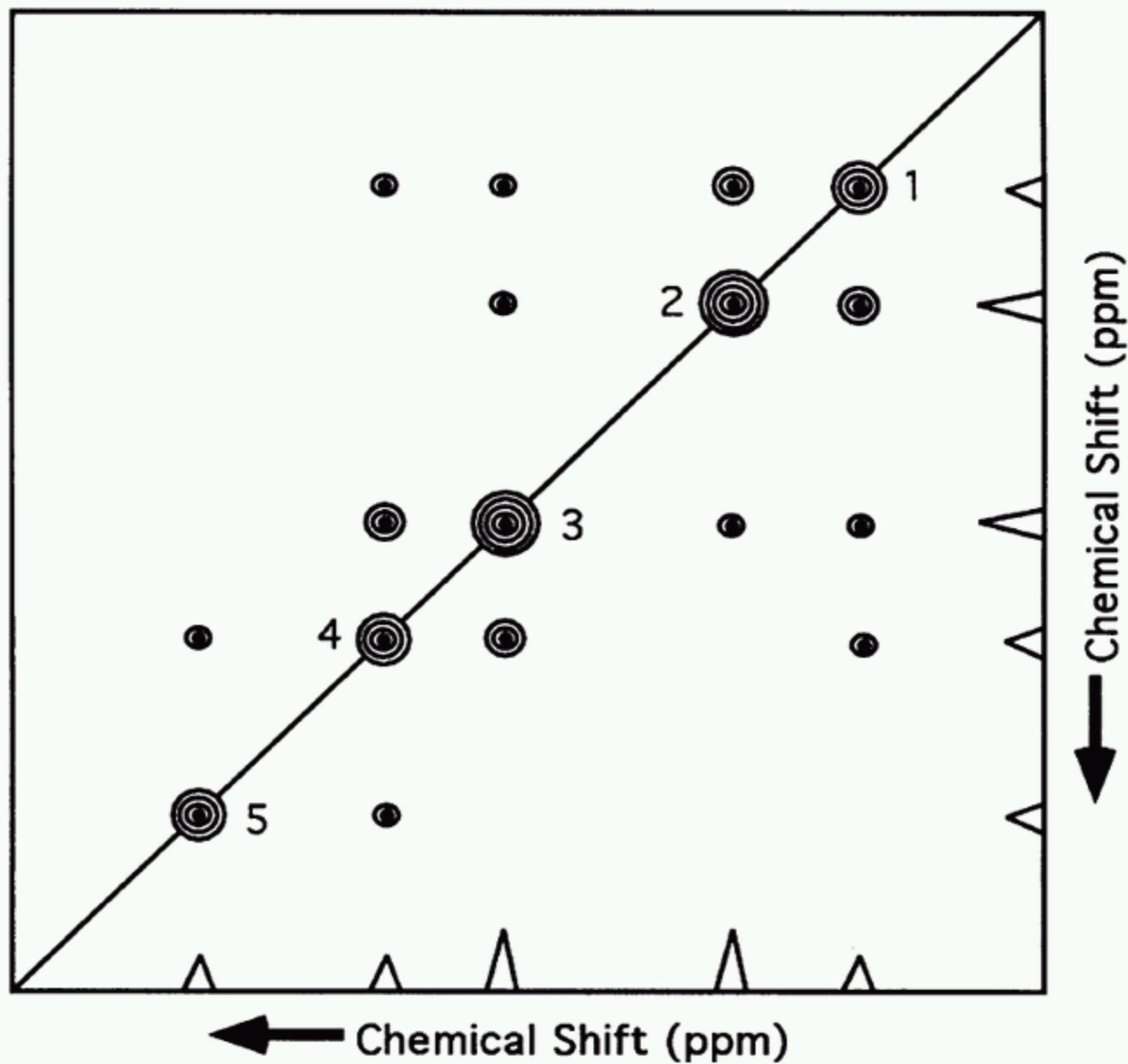


NMR : μακρομοριακά φάσματα

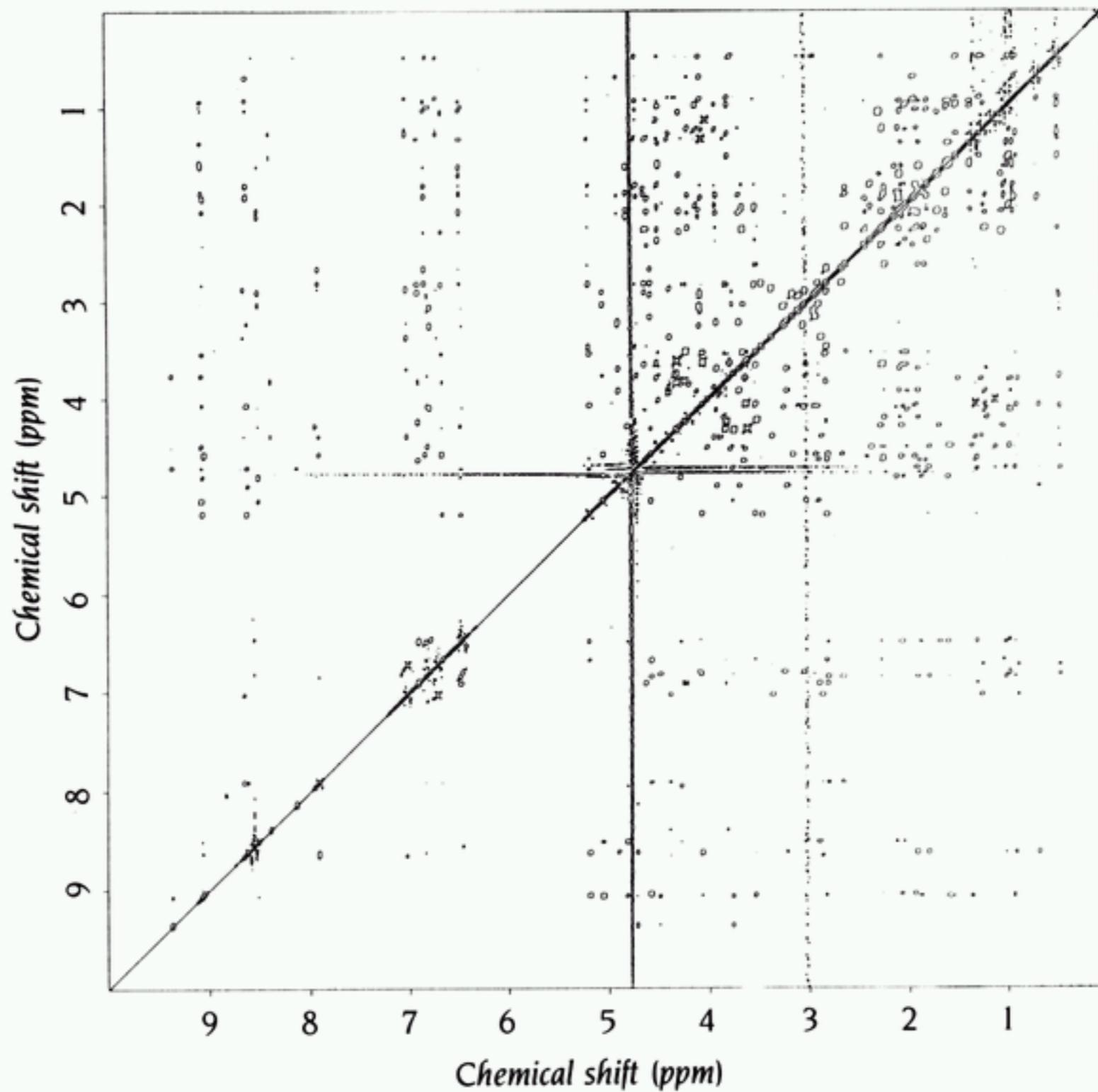
Η πολυπλοκότητα και αλληλοεπικάλυψη των μακρομοριακών φασμάτων, μαζί με την αδυναμία του προσδιορισμού της ταυτότητας των φασματικών γραμμών ('ποιο πρωτόνιο αντιστοιχεί σε αυτή τη γραμμή ;') λύνεται μέσω των πολυδιάστατων φασμάτων [2D, 3D, 4D(!), ...]. Η φυσική μεθοδολογία και οι φασματοσκοπικές τεχνικές που οδηγούν στα πολυδιάστατα φάσματα ανήκουν στα ειδικά κεφάλαια της δομικής. Εδώ θα αρκεστούμε σε μία απλοϊκή περιγραφή της πληροφορίας που περιέχεται σε δύο από αυτά : τα φάσματα COSY & NOESY.

NMR : 2D φάσματα

2D NOE Spectrum



NMR : 2D φάσματα

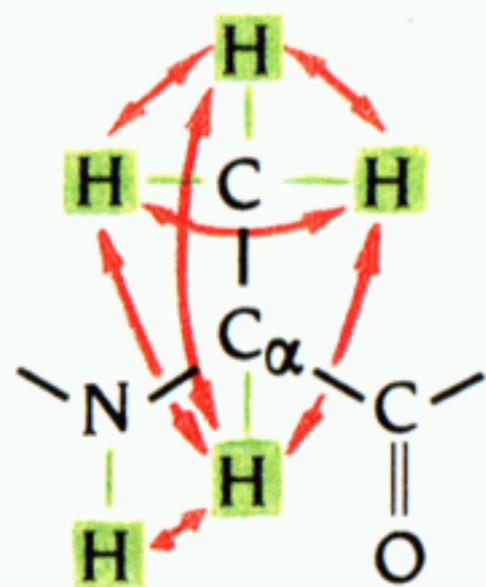


NMR : COSY

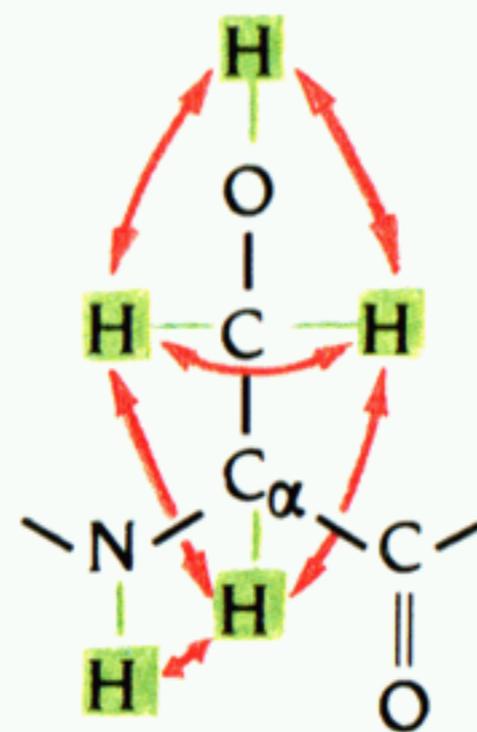
Τα φάσματα COSY (για COrrelation SpectroscopY) περιέχουν πληροφορία για το ποιοι πυρήνες του μορίου είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένοι μέσω δύο ή τριών δεσμών. Επειδή τόσο ο αριθμός όσο και οι ομοιοπολικές συνδέσεις μεταξύ των πρωτονίων διαφέρουν από αμινοξύ σε αμινοξύ, είναι δυνατό από τα φάσματα COSY να ταυτοποιηθούν ποιά πρωτόνια ανήκουν σε ποιους τύπους των αμινοξέων.

Για παράδειγμα, είναι εφικτό να συναχθεί ότι ένα συγκεκριμένο πρωτόνιο είναι το πρωτόνιο του υδροξυλίου μιας σερίνης (αλλά όχι για το εάν πρόκειται π.χ. για την Ser12 ή την Ser112).

NMR : COSY

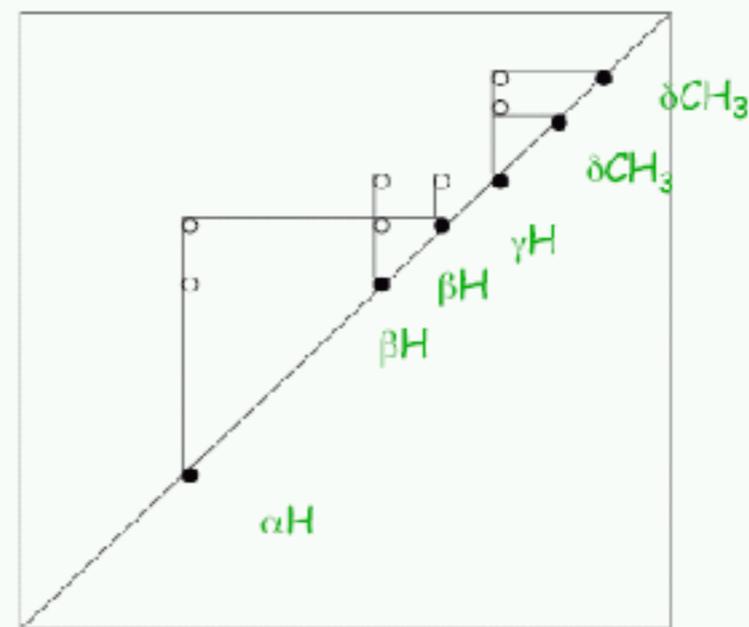
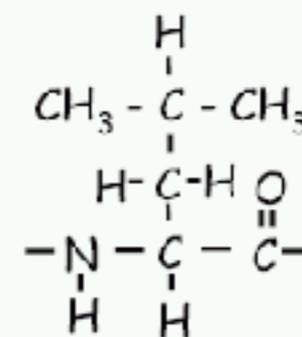
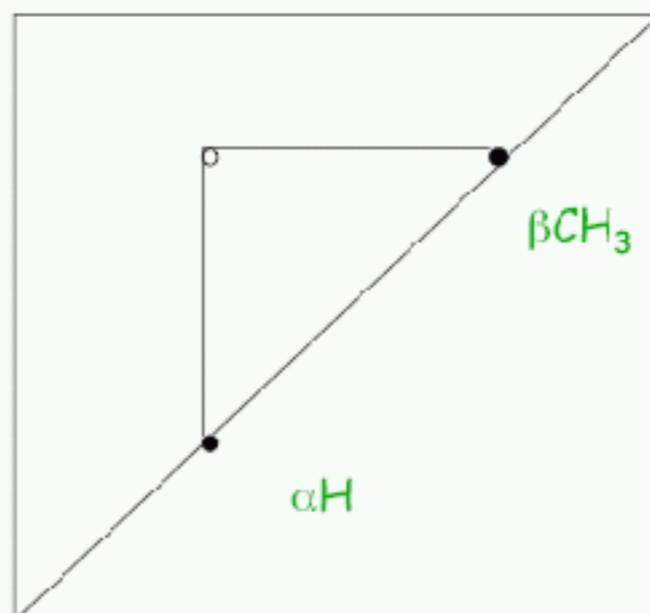
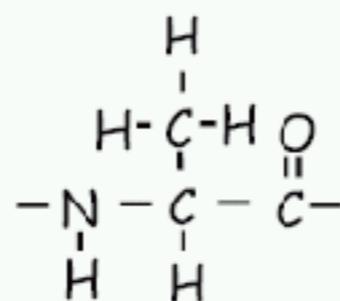
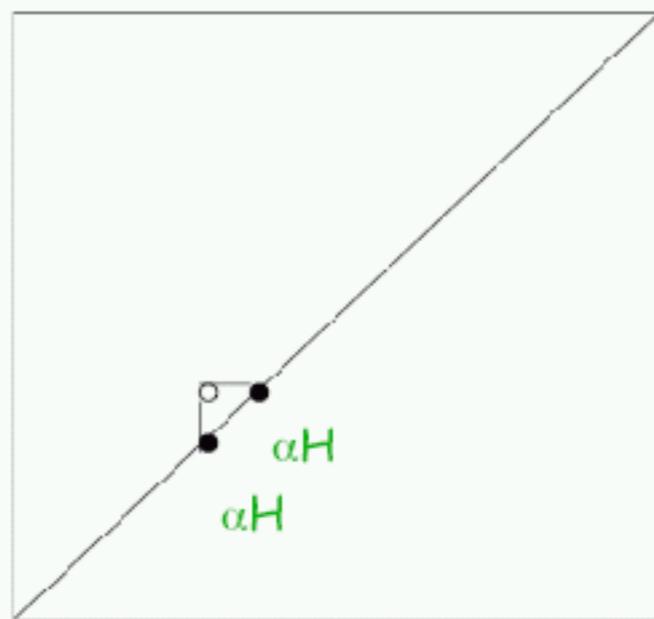
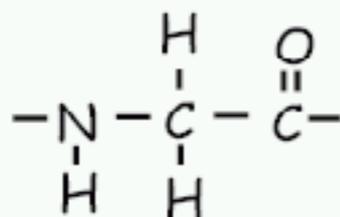


Ala



Ser

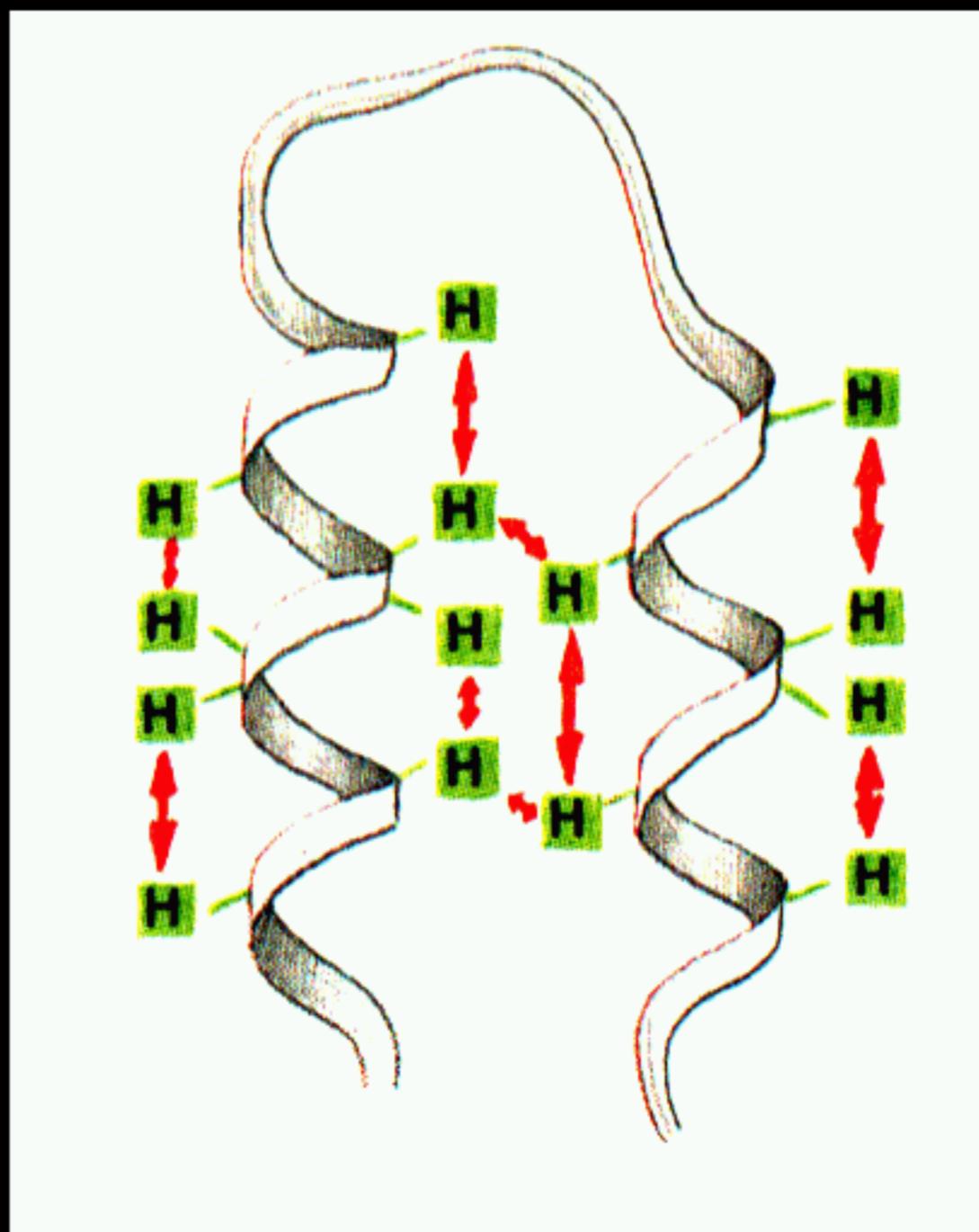
NMR : COSY



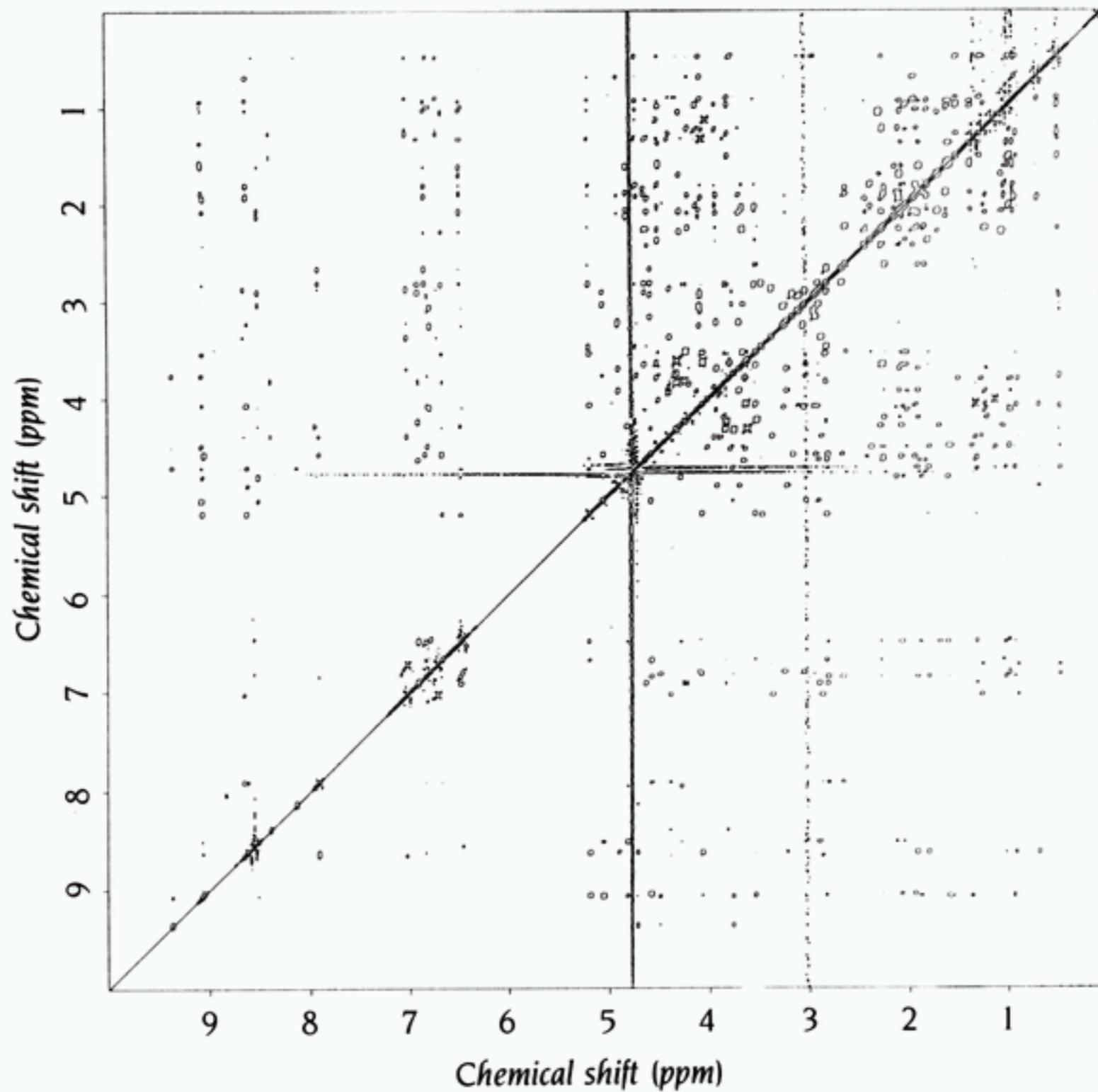
NMR : NOESY

Τα NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) φάσματα περιέχουν πληροφορία για τις αποστάσεις μεταξύ των πυρήνων του μορίου. Οι αποστάσεις αυτές είναι Ευκλείδειες αποστάσεις στον τρισδιάστατο χώρο, χωρίς να έχει σημασία η απόσταση σε επίπεδο αλληλουχίας. Αποστάσεις μέχρι και 5Å μπορούν να ανιχνευθούν από αυτά τα φάσματα, αλλά η αβεβαιότητα για τις ακριβείς τιμές των αποστάσεων είναι μεγάλη: συνήθως οι προκύπτουσες αποστάσεις κατηγοριοποιούνται σε τρεις μόνο ομάδες (π.χ. 1.8-3, 3-4, 4-5Å) και συνεπώς οι μετρήσεις περισσότερο περιορίζουν παρά καθορίζουν τις τιμές των αποστάσεων.

NMR : NOESY



NMR : NOESY



NMR : NOESY & COSY

Επειδή τα NOE φάσματα περιέχουν πληροφορία για αποστάσεις μεταξύ πυρήνων στο χώρο (και όχι μέσω δεσμών), συμπληρώνουν την πληροφορία που προέρχεται από τα COSY και επιτρέπουν την ολοκλήρωση της συσχέτισης μεταξύ φάσματος και αλληλουχίας (δηλ. την εύρεση της απάντησης στο ερώτημα 'ποιο πρωτόνιο αντιστοιχεί σε αυτή τη φασματική γραμμή;'). Ταυτόχρονα, λόγω των χαρακτηριστικών μοτίβων που ακολουθούν οι αποστάσεις πρωτονίων που ανήκουν σε δευτεροταγείς δομές (α-έλικα, β-πτυχωτή) γίνεται εφικτός και ο προσδιορισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής.

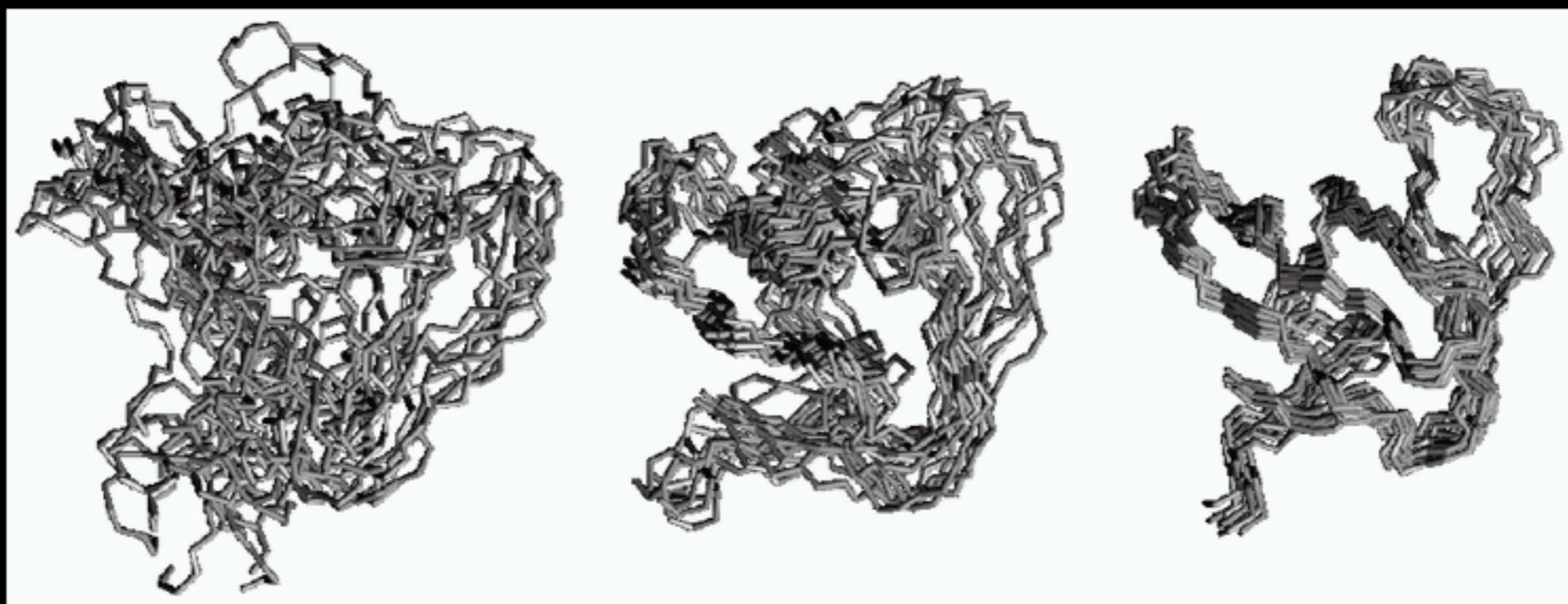
Ναι, αλλά η δομή που είναι ;

Η γνώση των αποστάσεων μεταξύ των πρωτονίων της δομής, μαζί με τη γνώση της δευτεροταγούς δομής και τους περιορισμούς για μερικές γωνίες, μειώνουν τόσο δραστικά τον αριθμό των πιθανών δομών που μπορούν ταυτόχρονα να ικανοποιούν όλους αυτούς τους περιορισμούς, ώστε η τρισδιάστατη δομή να ορίζεται (για καλά δεδομένα) μονοσήμαντα.

Η ανάπτυξη των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των δομών που είναι συμβατές με τα δεδομένα ανήκουν (αυτοδίκαια) στα ειδικά κεφάλαια της δομικής βιολογίας.

NMR : η σημασία των NOEs

Η παράμετρος που φαίνεται να είναι η πλέον καθοριστικής σημασίας για την 'ποιότητα' (ακρίβεια προσδιορισμού) μιας δομής NMR είναι το πλήθος των NOEs (αποστάσεων) που έχουν προσδιοριστεί.
Ένα παράδειγμα του τι συμβαίνει στις συμβατές (με τα δεδομένα) δομές καθώς ο αριθμός των NOEs αυξάνει, φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί :



NMR : μορφή αποτελεσμάτων

