

Bioinformática



RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR - RMN

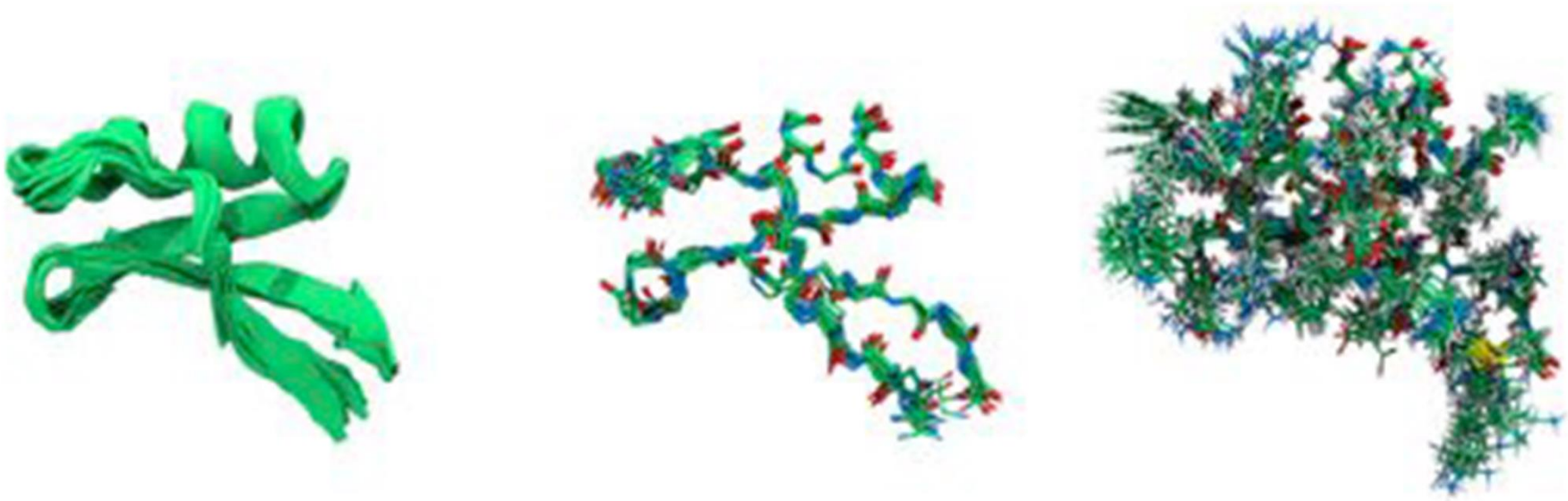
Disciplina de Bioinformática

Alunas: Rayssa H Arruda Pereira

Taciane Barbosa Henriques

Introdução

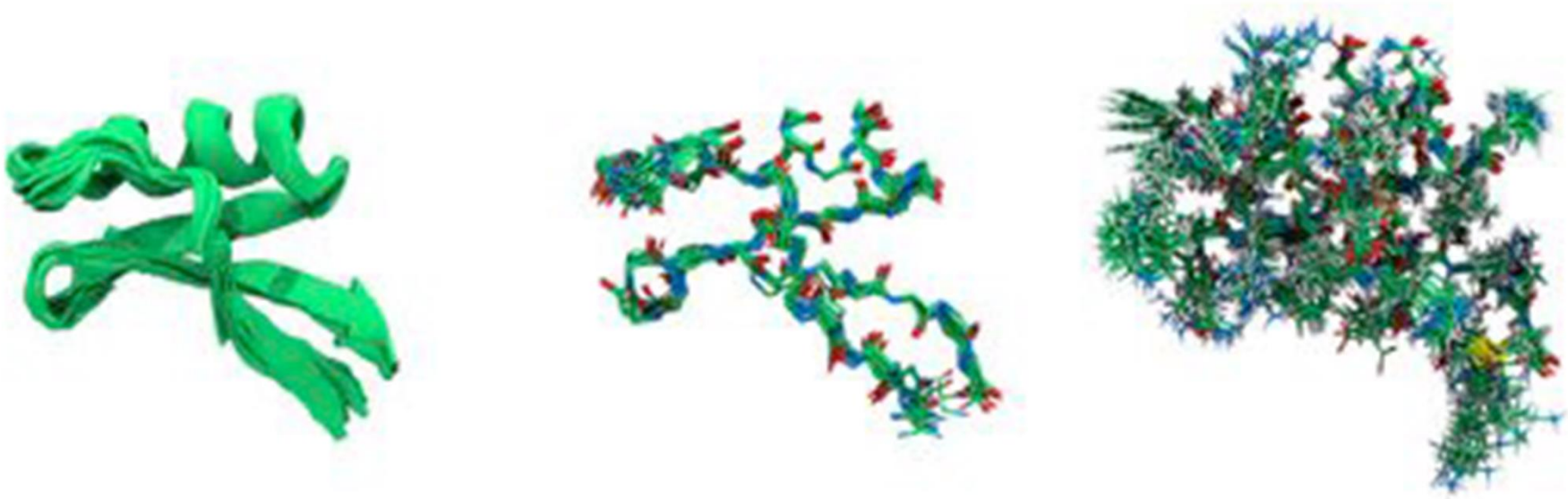
- A espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em solução e a cristalografia por raios-X são, essencialmente, as únicas técnicas experimentais capazes de fornecer informações da estrutura tridimensional de uma macromolécula com resolução atômica.



Estrutura 3D da proteína Psd1 determinada por RMN

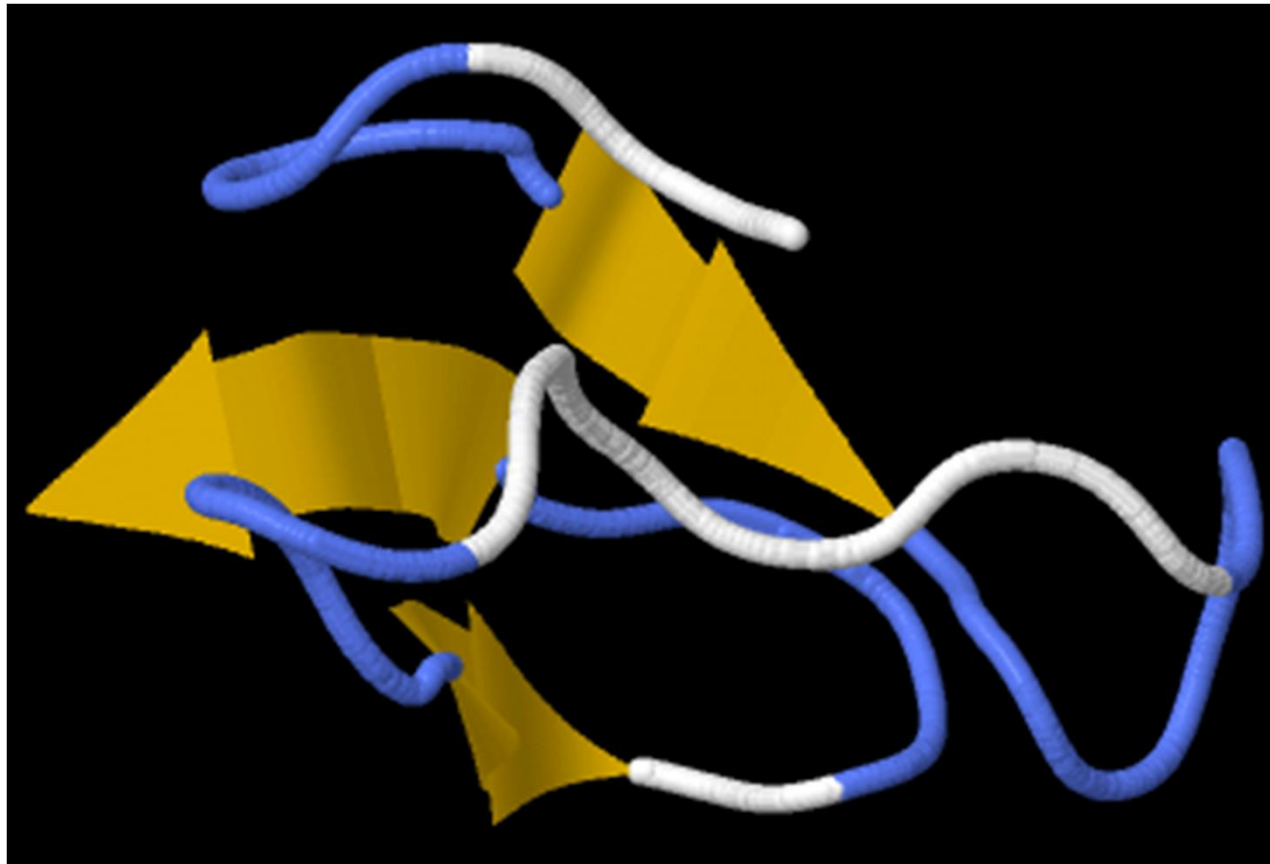
Introdução

- 97% do *Protein Data Bank* é resultante destas técnicas.
- Limitação: 6kDa para técnicas bidimensionais e 40kDa para três ou mais dimensões.



Estrutura 3D da proteína Psd1 determinada por RMN

Primeira estrutura 3D por RMN
Inibidor de α – amilase (tendamistat) em 1986 por Kline *et al.*



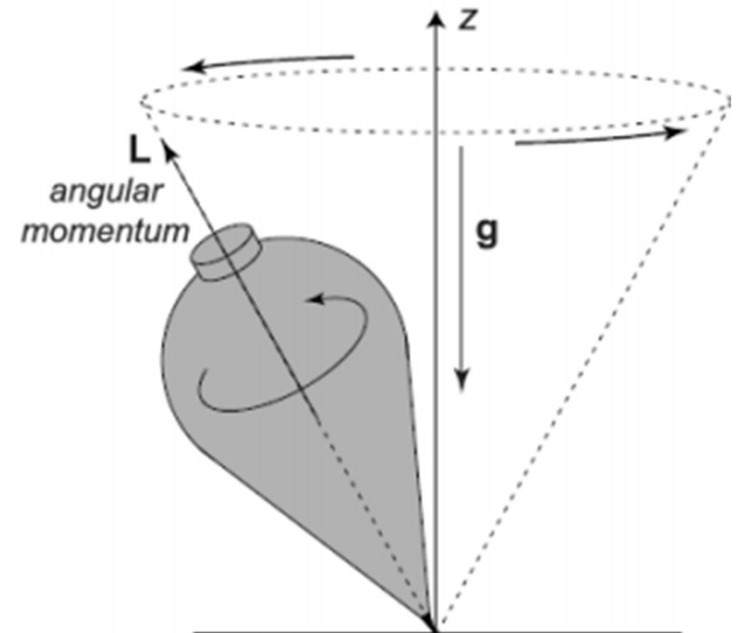
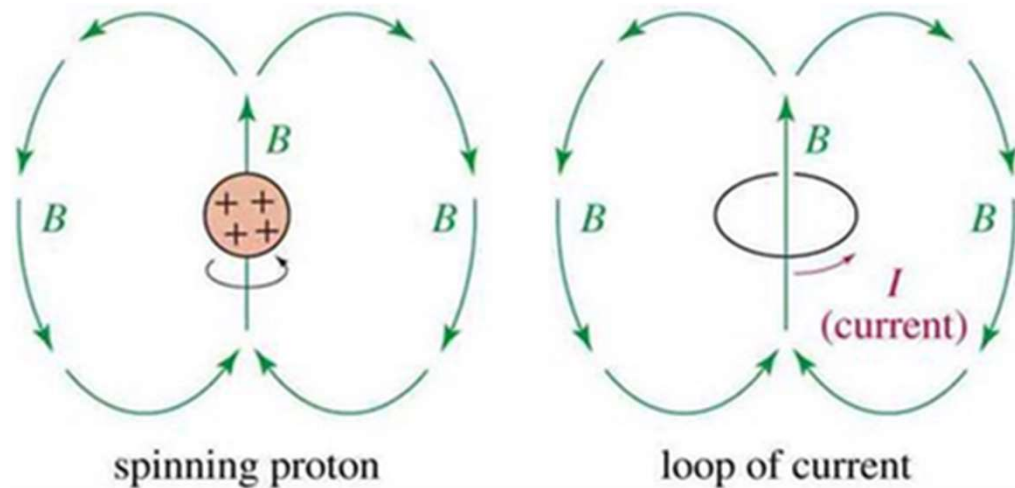
Retirada de: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1QFD&bionumber=1>



1ª estrutura 3D de **proteína** determinada com alta resolução através de RMN foi a **Interleucina 1 β** – 1991 por Clore *et al.*

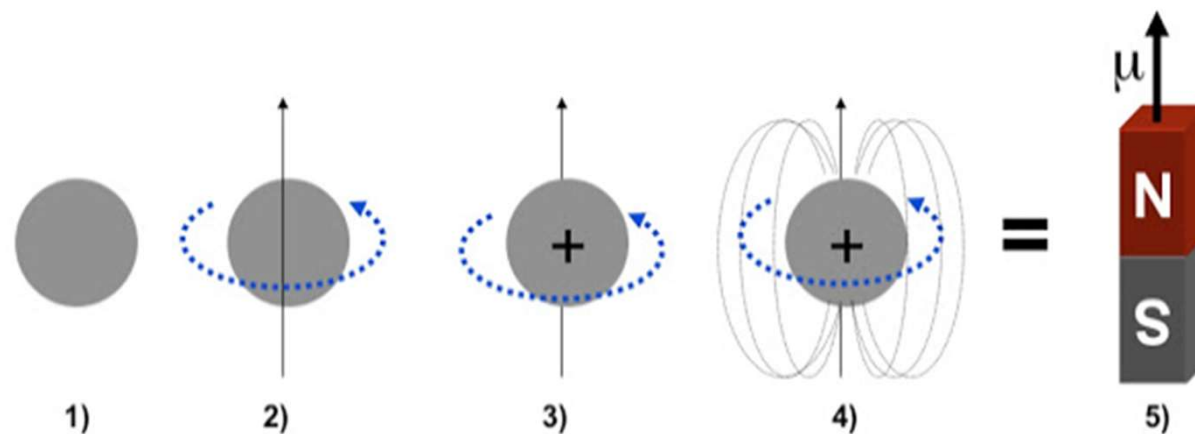
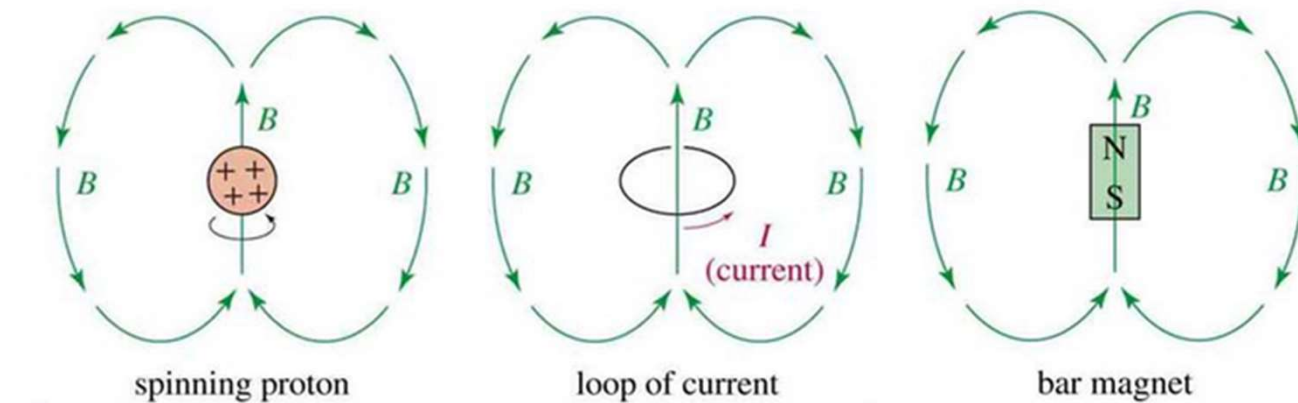
Fundamentos

- O núcleo atômico tem rotação em torno do seu próprio eixo – spin
- Os núcleos com spin possuem **momento angular (p)**
- O número máx. das componentes do momento angular é representado pelo número quântico de spin (I)
- Um núcleo possui $2I + 1$ estados de magnetização, podendo seus estados de spin variar entre $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$..



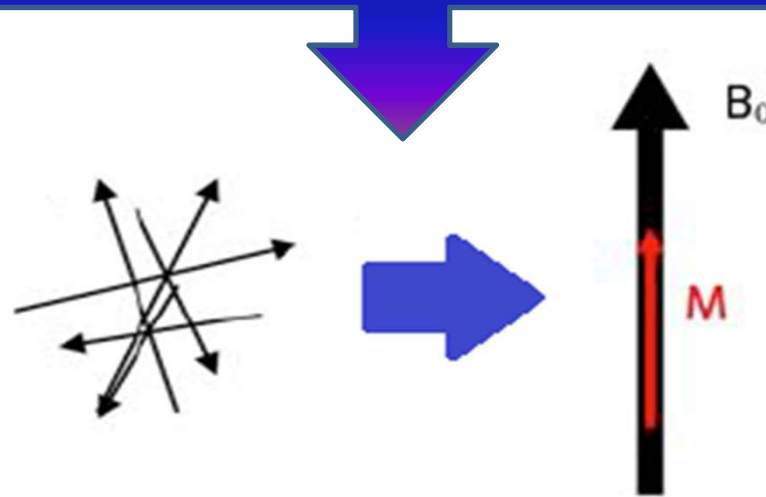
Fundamentos

- Em prtns, os núcleos mais importantes são ^1H , ^{13}C , ^{15}N .
- O spin $\rightarrow$ campo magnético paralelo ao eixo do spin $\rightarrow$ **Momento Magnético**.
- O M. Magnético é diretamente proporcional ao $\mathbf{L}$ e à cte giromagnética (γ)



Para obter sinal de RMN:

Orienta-se o vetor μ , através de um campo magnético externo (vetor B_0), paralelamente a B_0 em ambos os sentidos.



A transição entre os dois estados energéticos pode ser conseguida através da absorção e emissão de radiação eletromagnética em uma frequência ν_0 (de Larmor – f_L).

$$\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$$

- Os espectros de RMN, em geral, são classificados de acordo com a **frequência de Larmor do ^1H** , a qual irá variar conforme B_0 .
- Ex: Um B_0 de 14,1 T gera uma frequência de Larmor de **600 MHz**.
- Os núcleos se distribuem desigualmente entre os dois estados energéticos, possuindo excesso de núcleo no estado de menor energia. Este excesso é representado por um **vetor de magnetização resultante** denominado **M**.

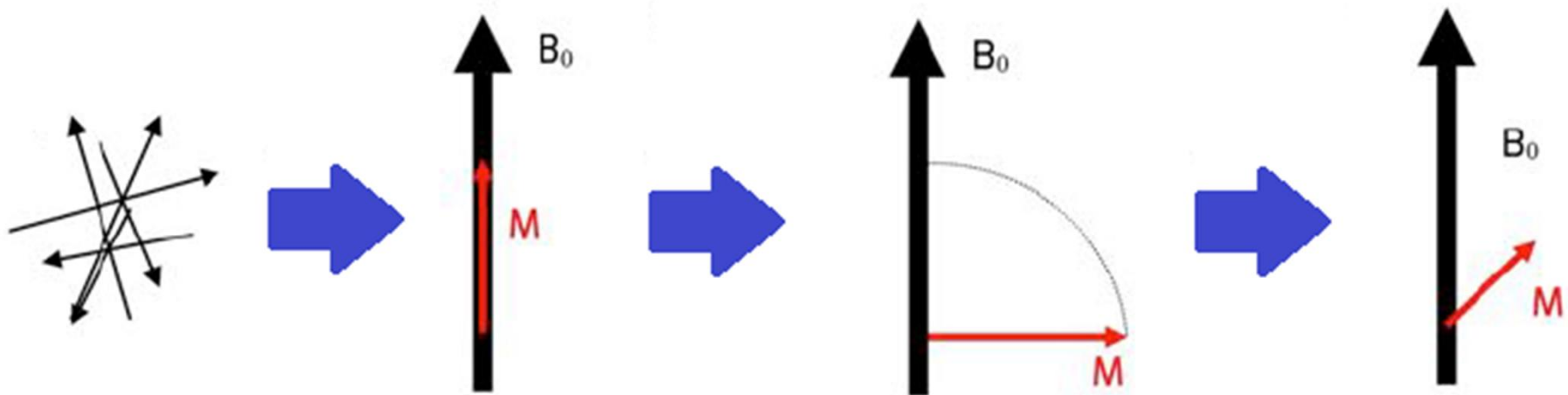
$$f_L = \gamma B_0 / 2\pi$$



Aplica-se um segundo campo B_1 (mseg) para excitar todos os núcleos (^1H) simultaneamente.



Cessa-se o pulso e detecta-se o sinal de ressonância de cada núcleo enquanto seus vetores M retornam à condição inicial.

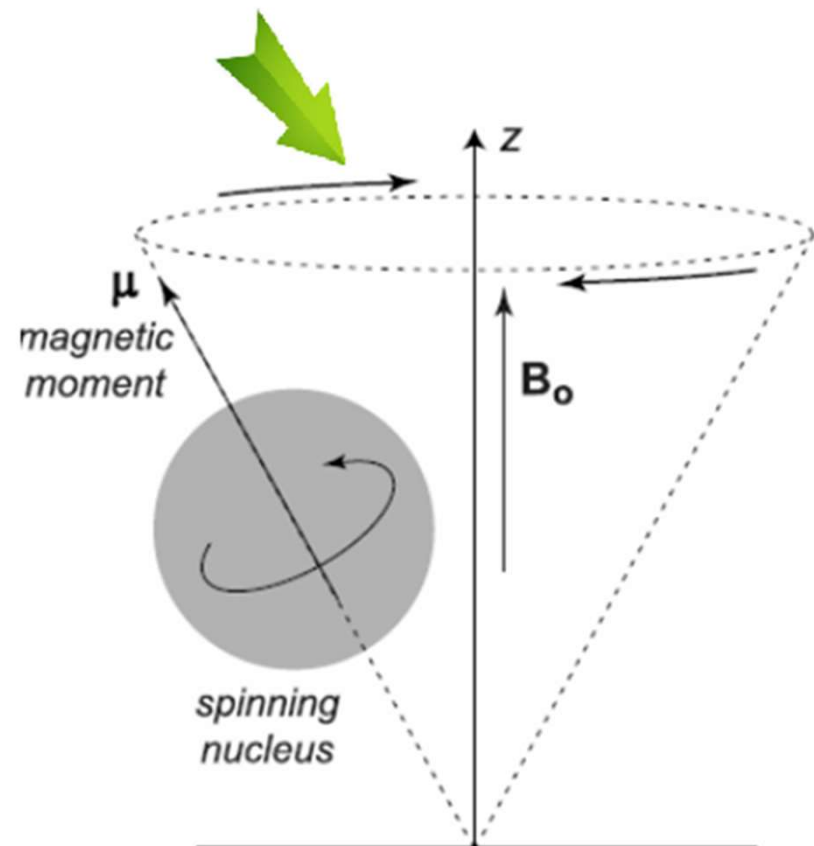
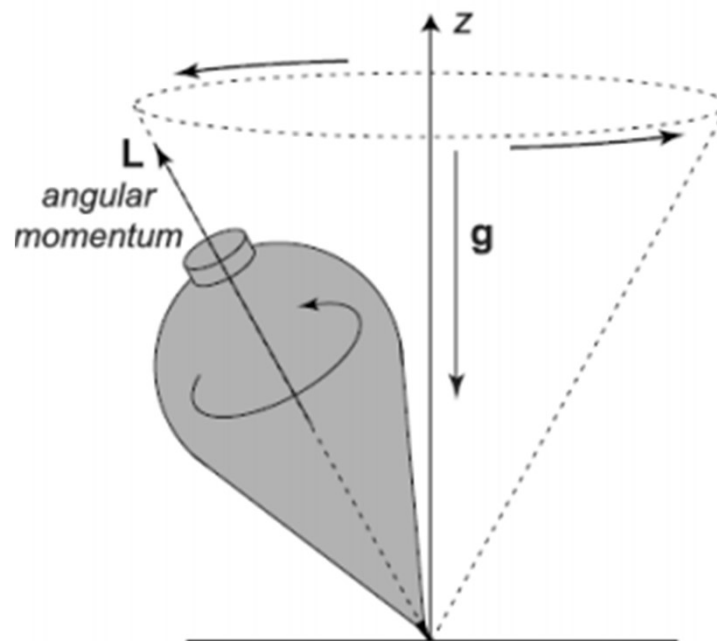


- **Sinal de ressonância** → frequência de precessão do vetor **M** de cada núcleo quando estes **retomam ao alinhamento** paralelo com o vetor **B₀**. → **FID *Free Induction Decay***.

- **Frequência de Larmor (MHz → RF)**

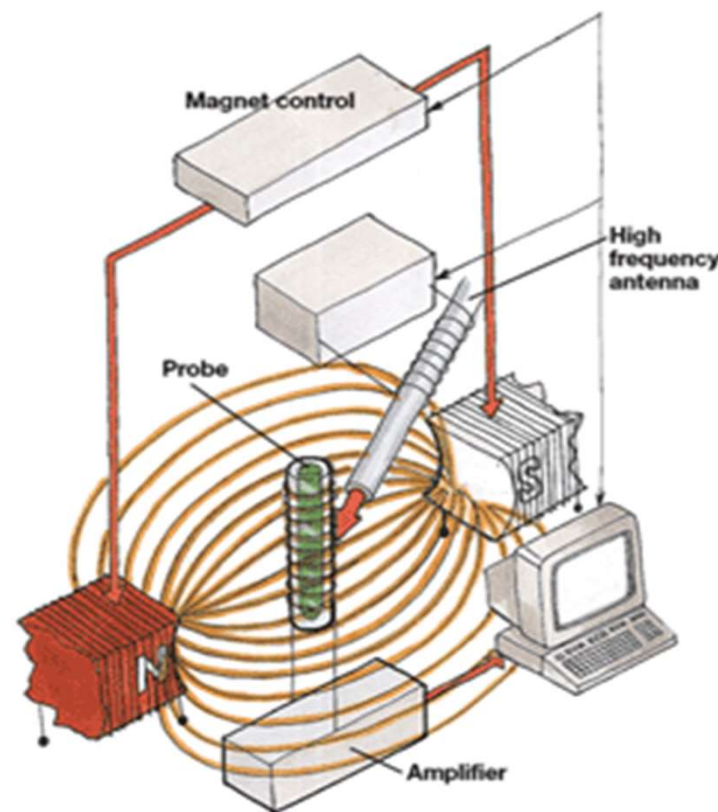
$$f_L = \gamma B_0 / 2\pi$$

PRECESSÃO DE LARMOR

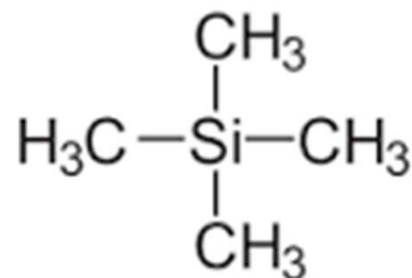
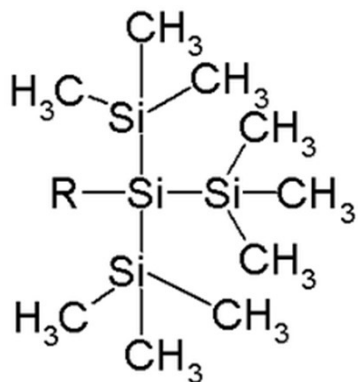


- O ***Free-Induction Decay (FID)*** apresenta-se como uma onda em um domínio **temporal** que é convertido em um espectro de **frequências** empregando-se a **transformada de Fourier**.

Os espectrômetros usam radiação de pulso de radiofrequências para fazer com que os núcleos em um campo magnético se alinhem.



A frequência de Ressonância é medida em relação a um composto de referência de padrões já definidos, como p.ex., o tetrametilsilano ou trimetilsililpropionato).



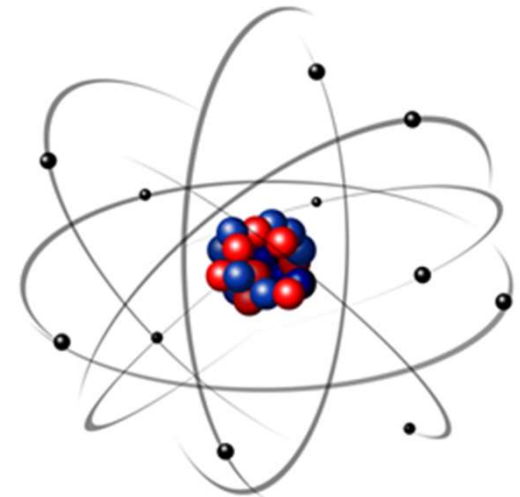
Como a frequência de um determinado ^1H varia de acordo com B_0 e os valores de frequência em Hz são muito grandes, optou-se por criar uma escala denominada **deslocamento químico** (δ), na qual

$$\delta = \frac{\nu \text{ núcleo observado (CHCl}_3) - \nu \text{ TMS}}{\text{Frequência do espectrômetro (em MHz)}} \cdot 10^6$$

Nas técnicas de RMN não se utiliza um único pulso de excitação, mas uma sequência de pulsos.

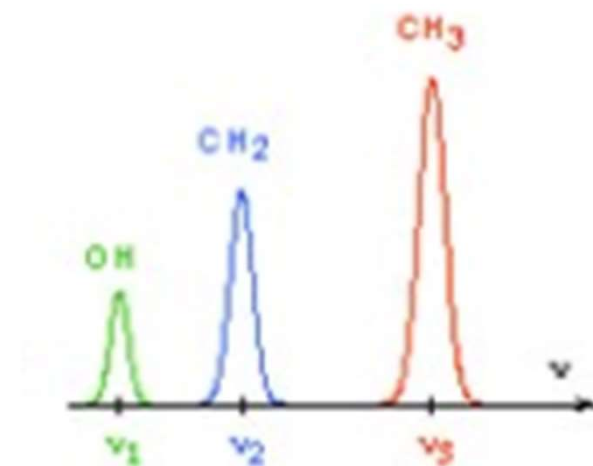
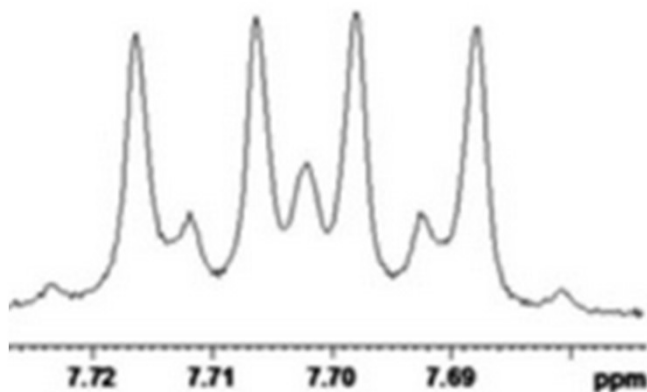
A manipulação da magnetização dos spins pode revelar influências externas sob um núcleo (ligações, proximidade a outros átomos)

Desta forma, obtêm-se informações relacionadas à estrutura da molécula, que podem ser “traduzidas” na estrutura tridimensional de uma proteína.



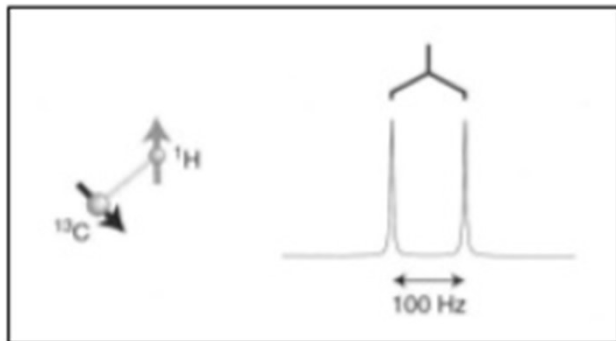
Deslocamento químico

- Cada núcleo de uma molécula fornece uma frequência de ressonância diferente, devido à nuvem eletrônica que o envolve.
- Campo magnético secundário da nuvem eletrônica influencia no deslocamento químico nuclear – efeito de blindagem
- Os sinais do deslocamento químico dependem da densidade eletrônica do ambiente no qual o próton do ^1H , ou o núcleo, está localizado.

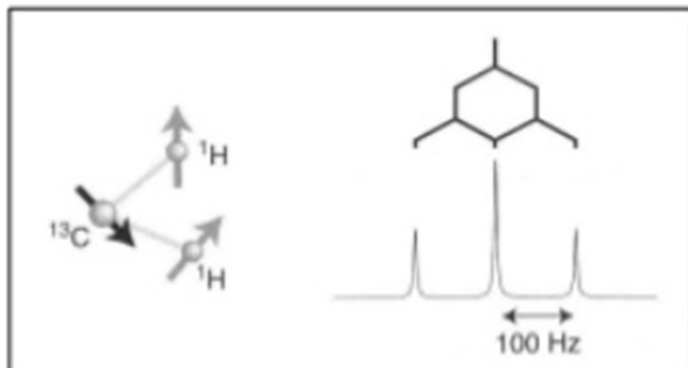


Acoplamento escalar

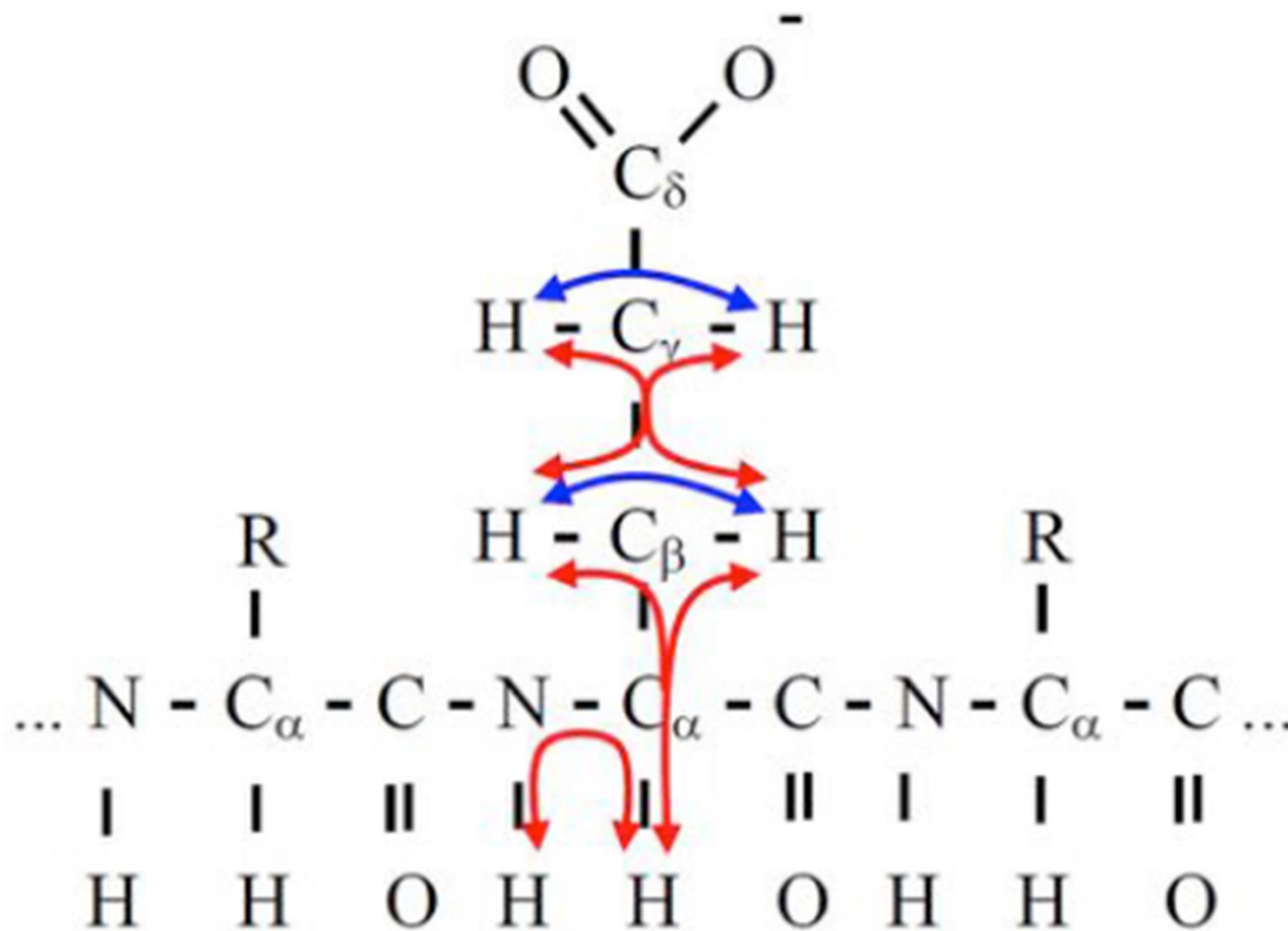
- É a interação entre os spins nucleares de átomos ligados entre si.
- Representado pela constante de acoplamento ($^nJ_{ab}$), onde n é o número de ligações covalentes separando os núcleos a e b
- Manifesta-se como um pico composto (multiplete).



Molécula contendo um ^{13}C (spin $I = 1/2$) e um ^1H ($I = 1/2$). Acoplamento $J_{\text{CH}} = 100$ Hz. O espectro gerado pelos spins do ^{13}C aparece desdobrado pelos protons vizinhos.



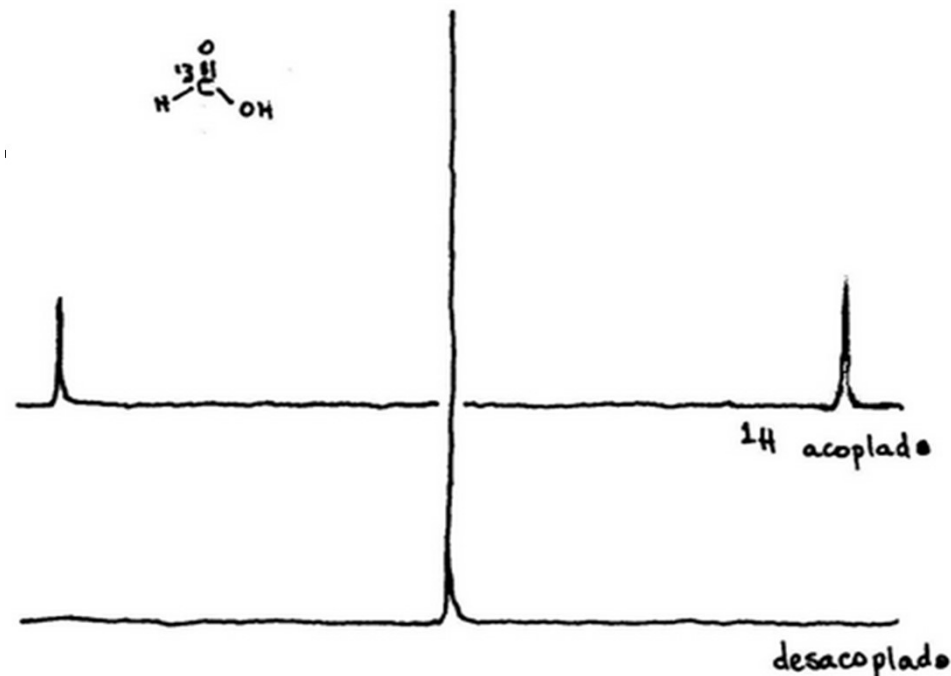
No caso do acoplamento do ^{13}C ser com dois protons, o desdobramento ocorre duas vezes, uma por cada acoplamento $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$.



Prótons em acoplamento escalar de um fragmento peptídico contendo o resíduo de ácido glutâmico. As setas vermelhas e azuis indicam acoplamento $3J_{HH}$ e $2J_{HH}$, respectivamente.

Efeito *Overhauser* nuclear

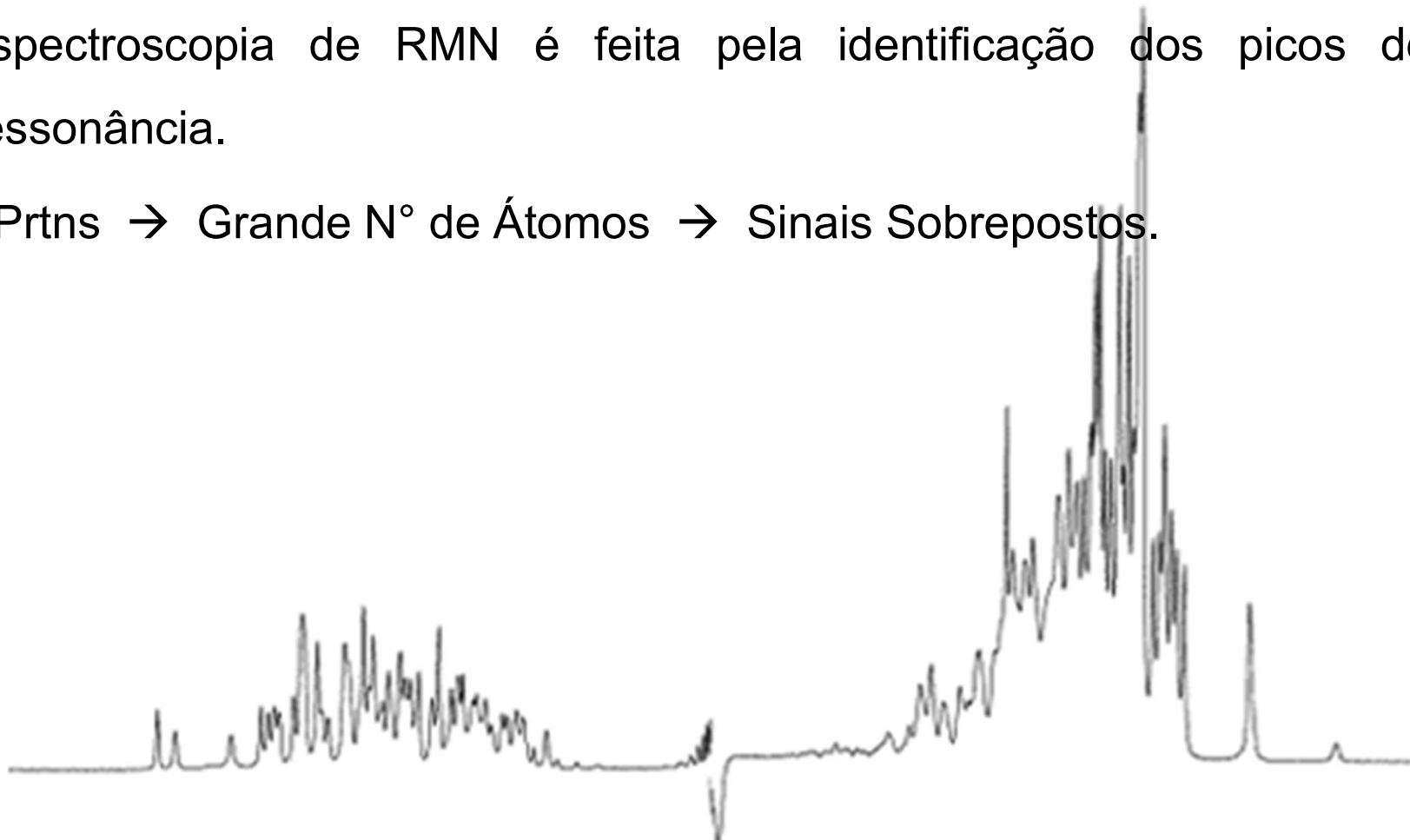
- Efeito da magnetização sobre átomos vizinhos sem ligações químicas entre si.
- Denominado Acoplamento Dipolar $\rightarrow$ transferência de magnetização entre os spins acoplados.
- A intensidade $\rightarrow 1/d^6$. Sendo d



NOE por irradiação dos hidrogênios

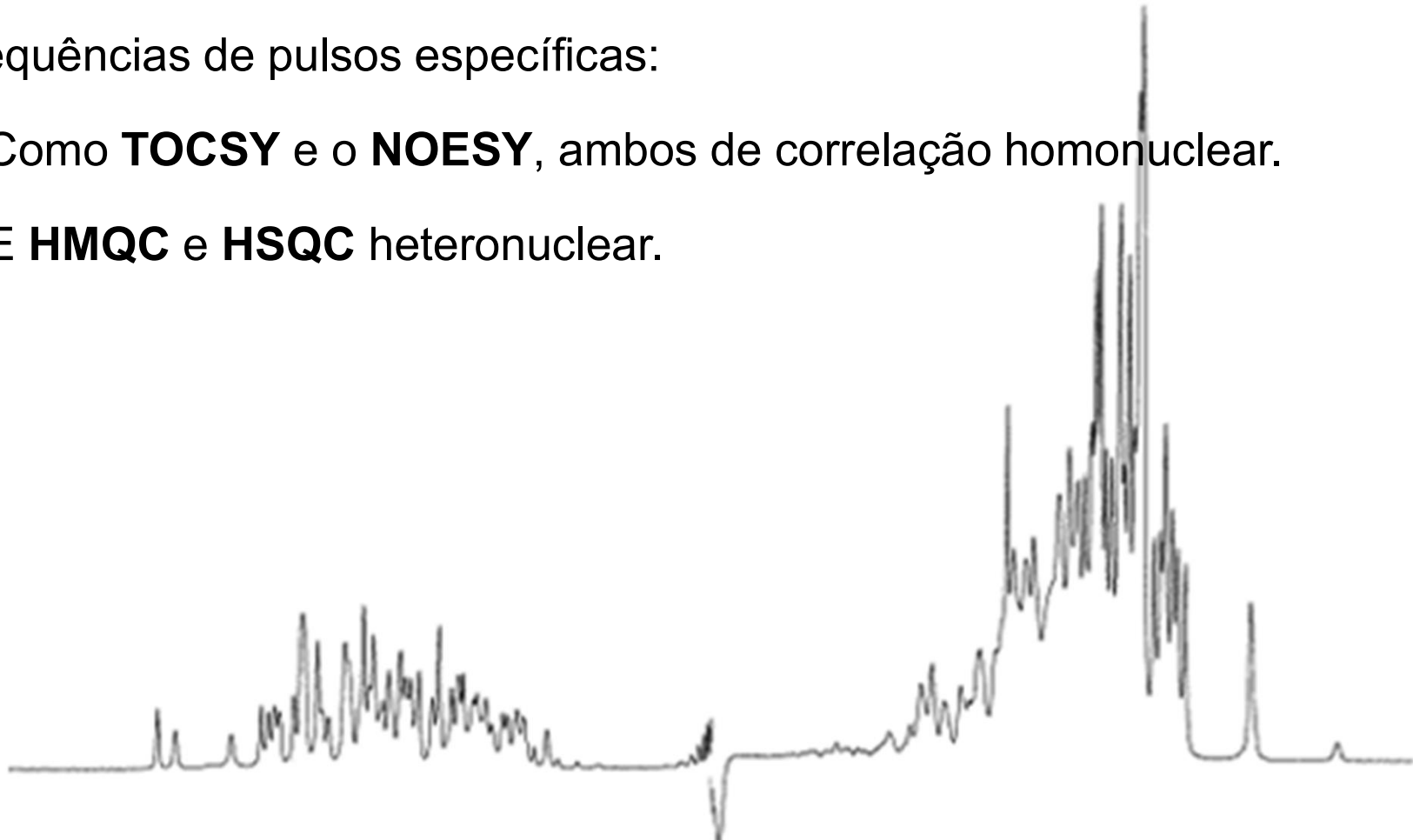
Estrutura das proteínas

- A determinação da estrutura tridimensional de macromoléculas por espectroscopia de RMN é feita pela identificação dos picos de ressonância.
- Prtns → Grande N° de Átomos → Sinais Sobrepostos.



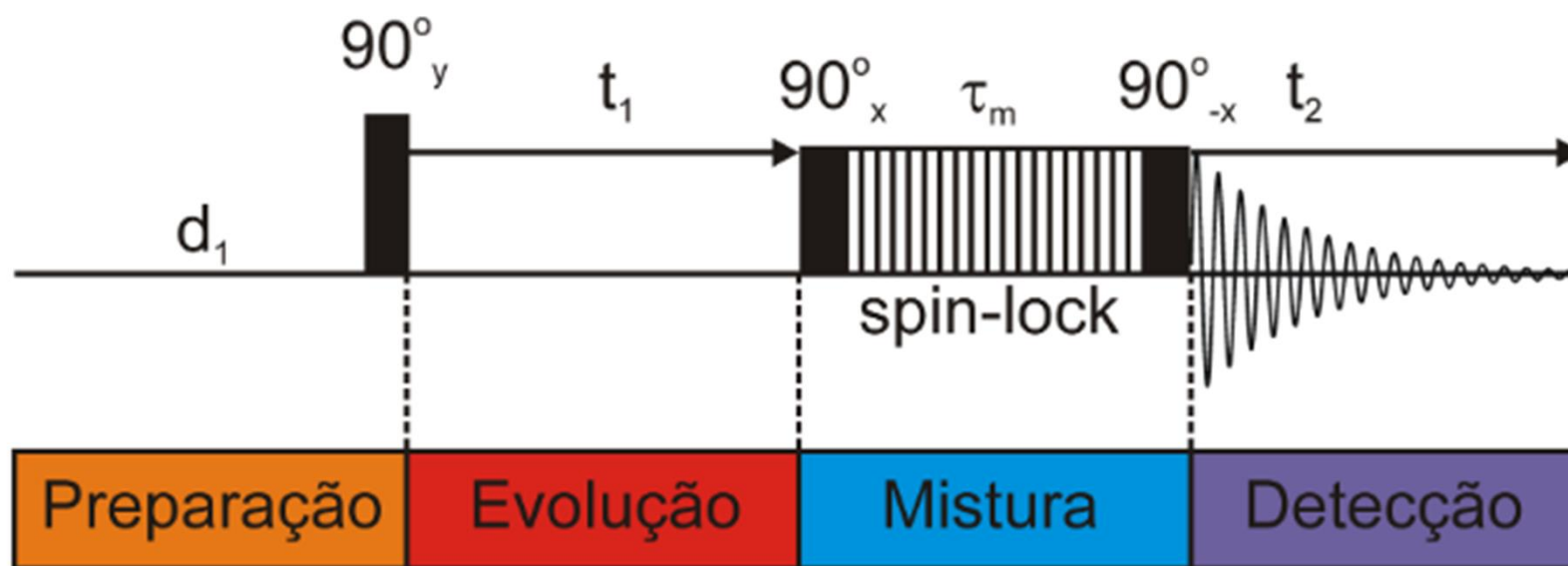
Estrutura das proteínas

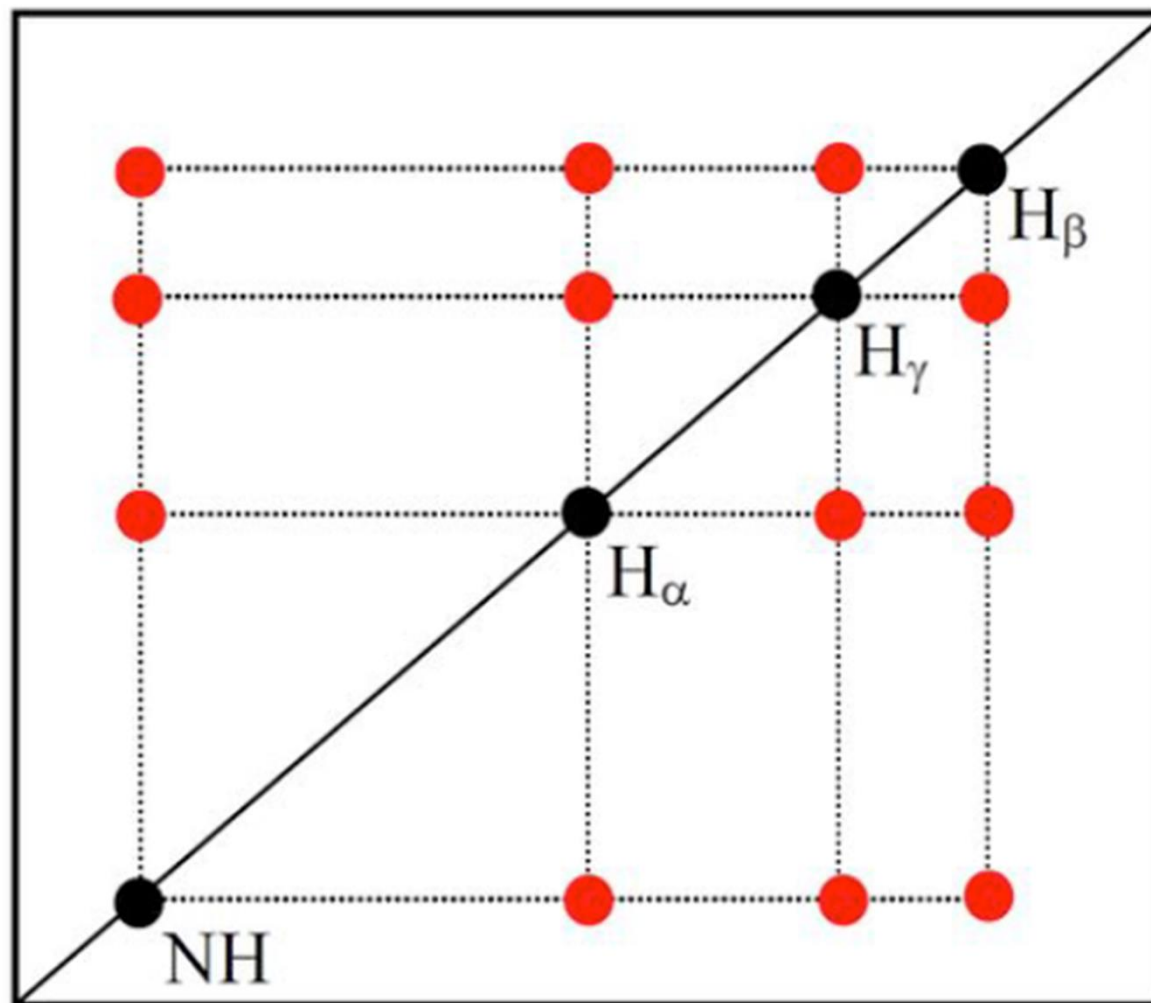
- Utiliza-se a espectroscopia bidimensional, através de uma série de sequências de pulsos específicas:
- Como **TOCSY** e o **NOESY**, ambos de correlação homonuclear.
- E **HMQC** e **HSQC** heteronuclear.



TOCSY *(Total Correlated Spectroscopy)*

- Sequência de pulsos que induzem a transferência da magnetização entre prótons ou carbonos via **acoplamento escalar**.





[1H,1H]-TOCSY, evidenciando os picos de correlação dos prótons do glutamato (vermelho). Os picos em preto na diagonal do espectro são os sinais de ressonância de cada próton do glutamato.

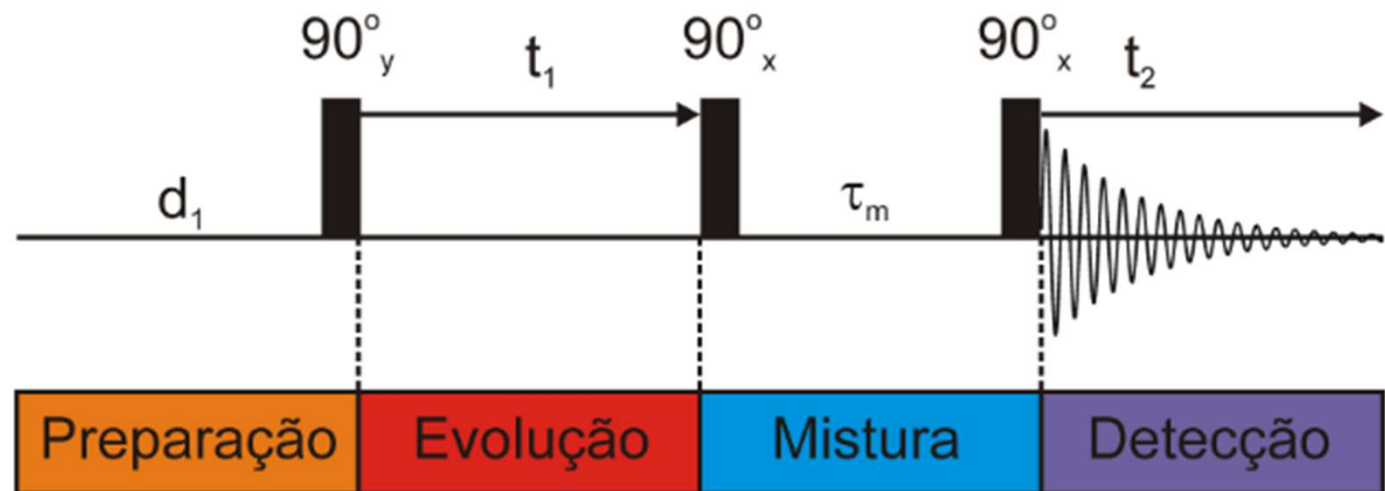
NOESY

- Induz a transferência de magnetização via **acoplamento dipolar**.
- No espectro de 2D $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ -NOESY aparecerão sinais de **NOEs**.
- A intensidade dos NOEs $\rightarrow$ distância entre os prótons acoplados.

1. **NOEs Intensos:** átomos separados por 1,8 a 2,7 Å.

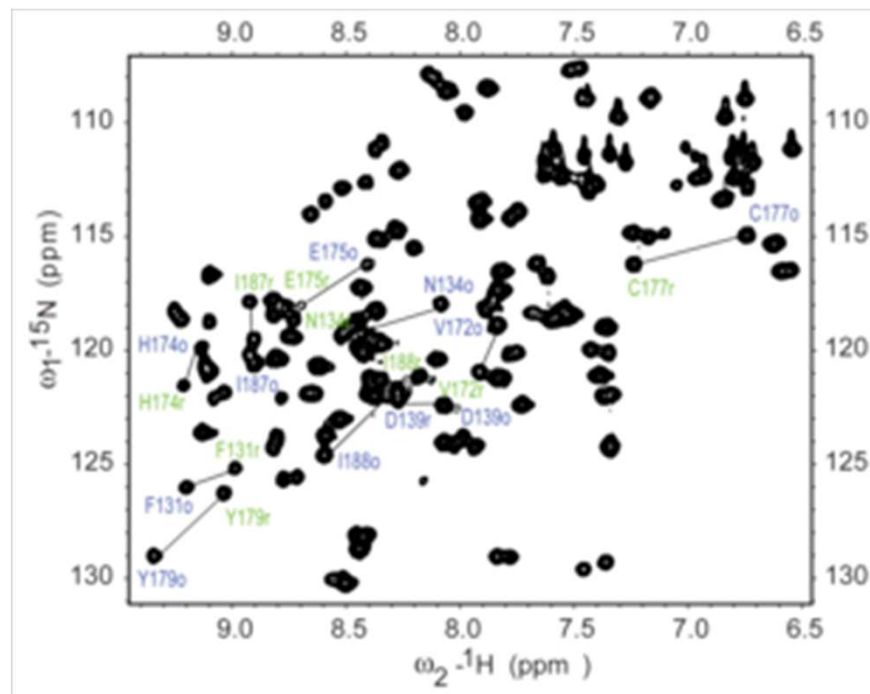
2. **NOEs Médios:** 2,7 a 3,4 Å.

3. **NOEs Fracos:** 3,4 a 5 Å.

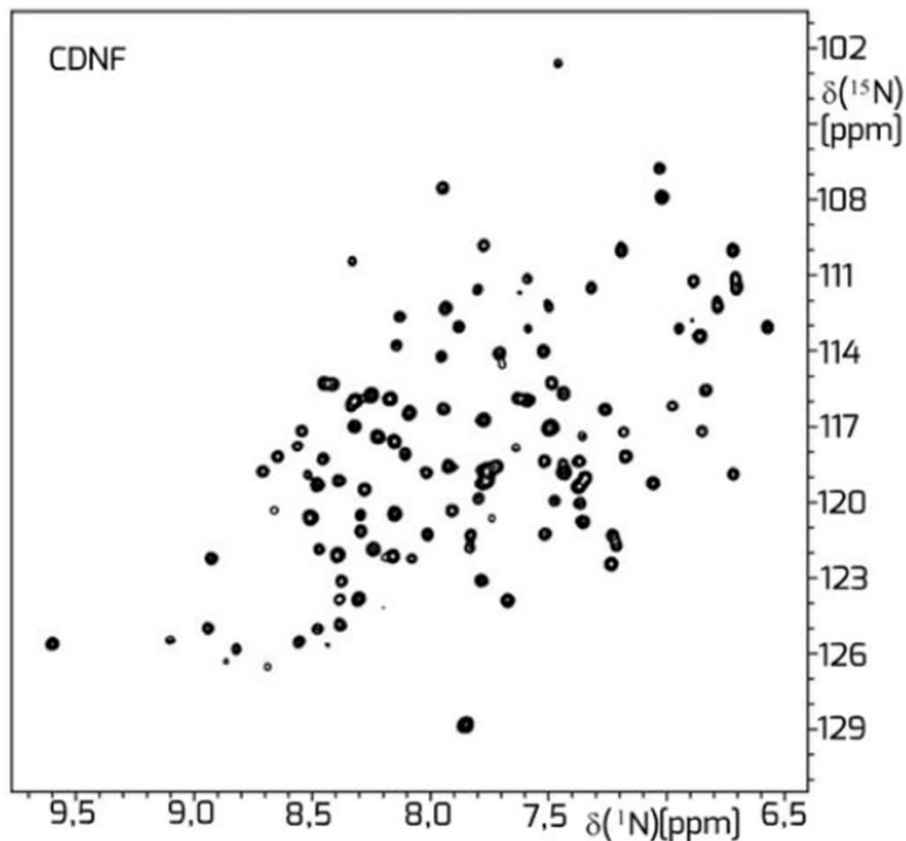


2D Heteronuclear (HMQC ou HSQC)

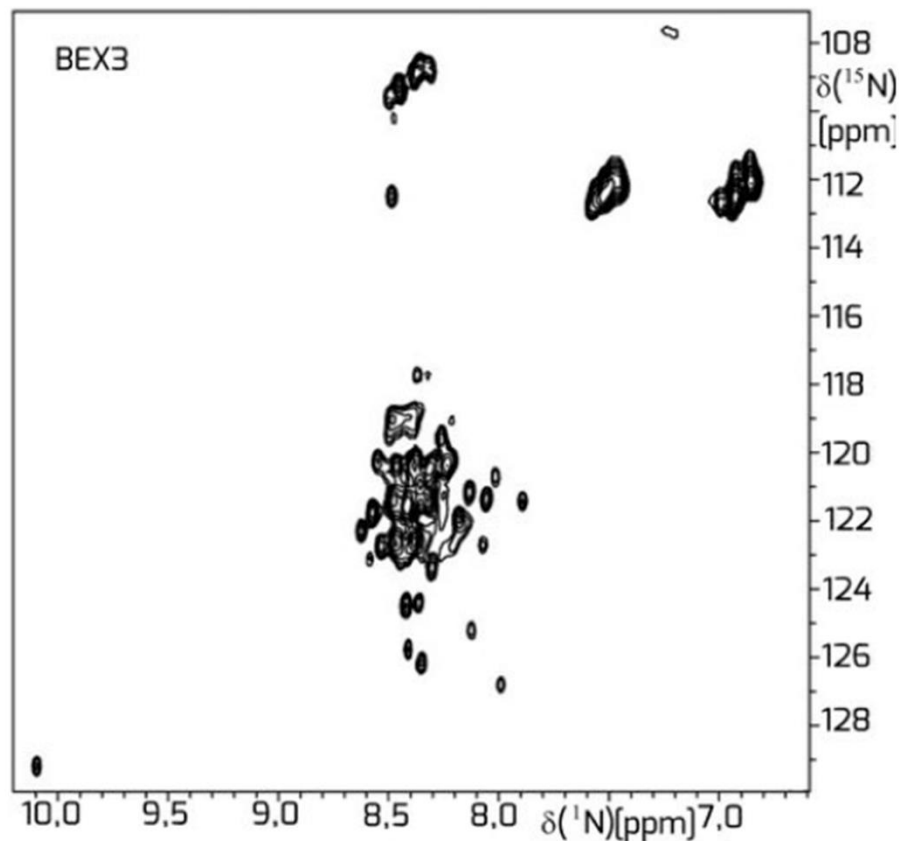
- Realiza-se a transferência de magnetização entre o spin do próton e o spin de outro núcleo atômico, através de somente uma ligação química.
- Aparecerão picos de correlação entre próton e ^{13}C ou entre próton e ^{15}N ---- caracterização geral da conformação da proteína,



Espectros bidimensionais heteronucleares 2D[1H,15N]-HSQC



- **CDNF:**
- Proteína enovelada e estável.
- Sinais dispersos e bem definidos.
- Determinação Estrutural Possível

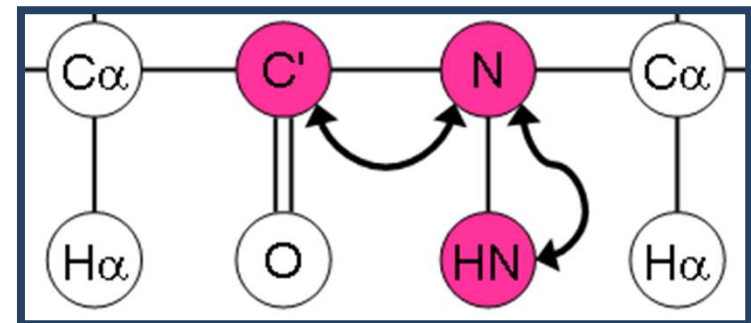
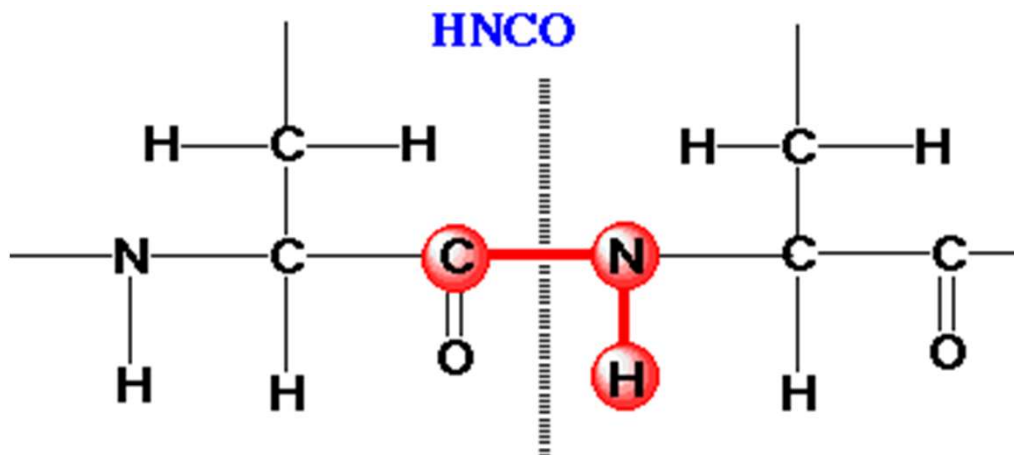


- **BEX3:**
- Proteína desordenada
- Formação de agregados
- Picos sobrepostos

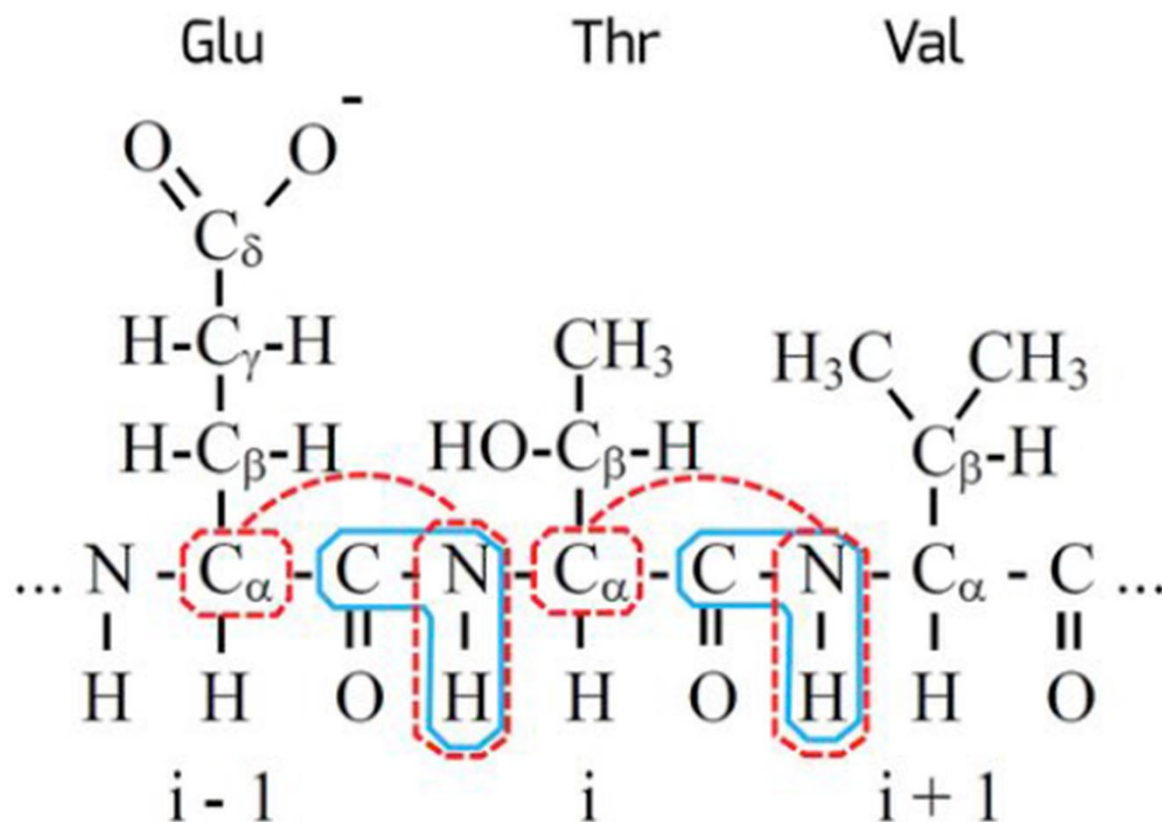
Espectros de tripla ressonância

- Pode-se associar a magnetização entre diferentes núcleos para se obter um mapeamento bem definido dos sinais de uma proteína:

Espectro **(3D)** de **HNCO**, ter-se-á um sinal oriundo da transferência de magnetização entre **próton amídico, nitrogênio amídico e carbono da carbonila**.

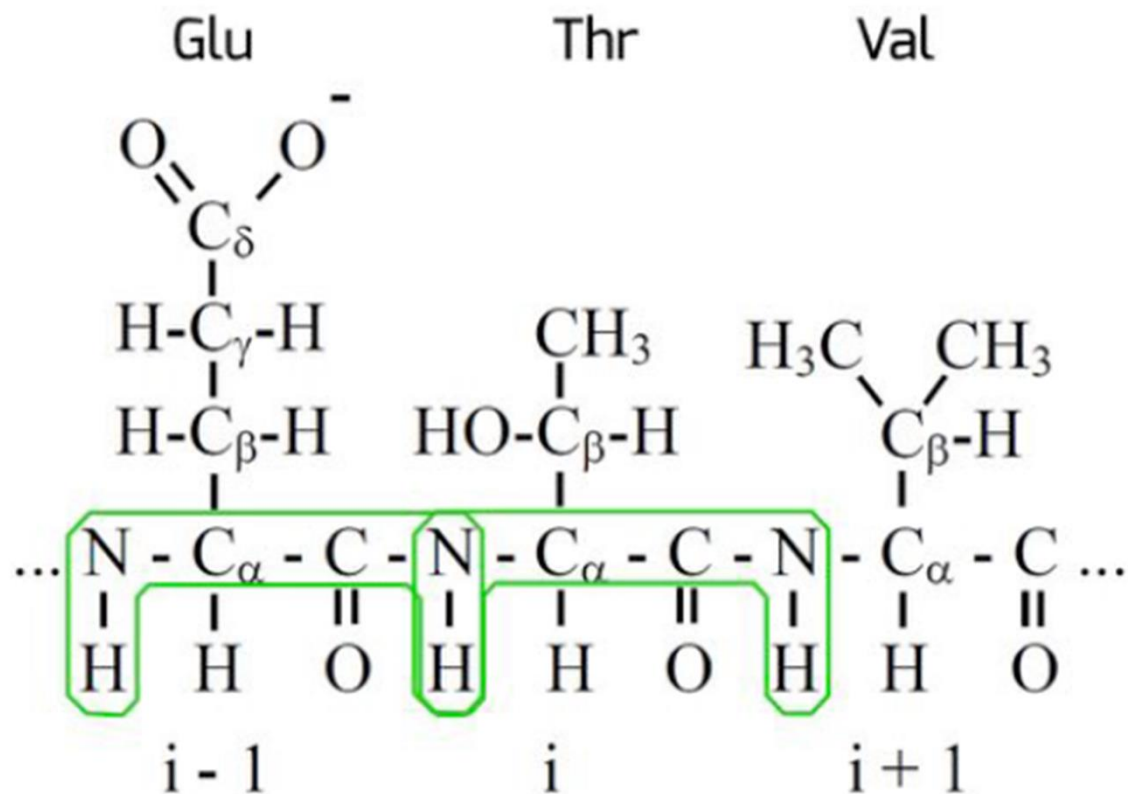


Segmento tripeptídico com alguns caminhos de transferência de magnetização obtidos por **dois experimentos de tripla ressonância** (**3D HNCO** em azul e **3D HN(CO)CA** em vermelho).



O sinal observado conterá os deslocamentos químicos de cada um dos átomos indicados, em um espectro de três dimensões (^1H , ^{13}C e ^{15}N).

Em um espectro **6D HNCOCANH**, a magnetização será transferida entre hidrogênios amídicos de **aminoácidos vizinhos** através da carbonila e do carbono alfa.



Para se determinar os sistemas de spin de uma proteína, são necessários pelo menos 4 de tripla ressonância e 2 espectros tridimensionais de TOCSY.

Análise dos espectros de RMN

Atribuição das ressonâncias – cada sinal de ressonância deve ser associado a um núcleo específico

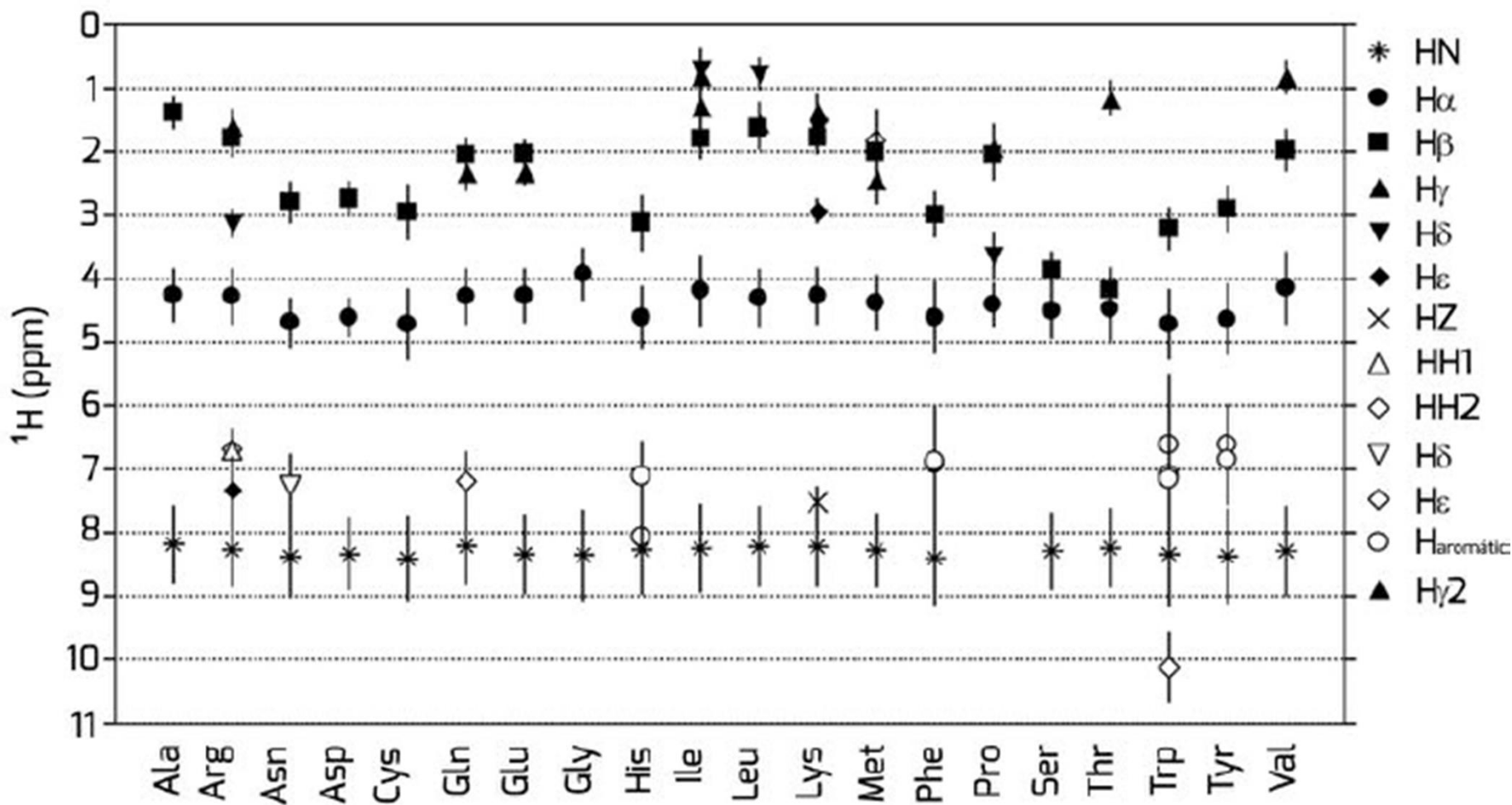


Análise em conjunto dos espectros de **NOESY**, **TOCSY**, espectros **bidimensionais heteronucleares** e de **tripla ressonância**

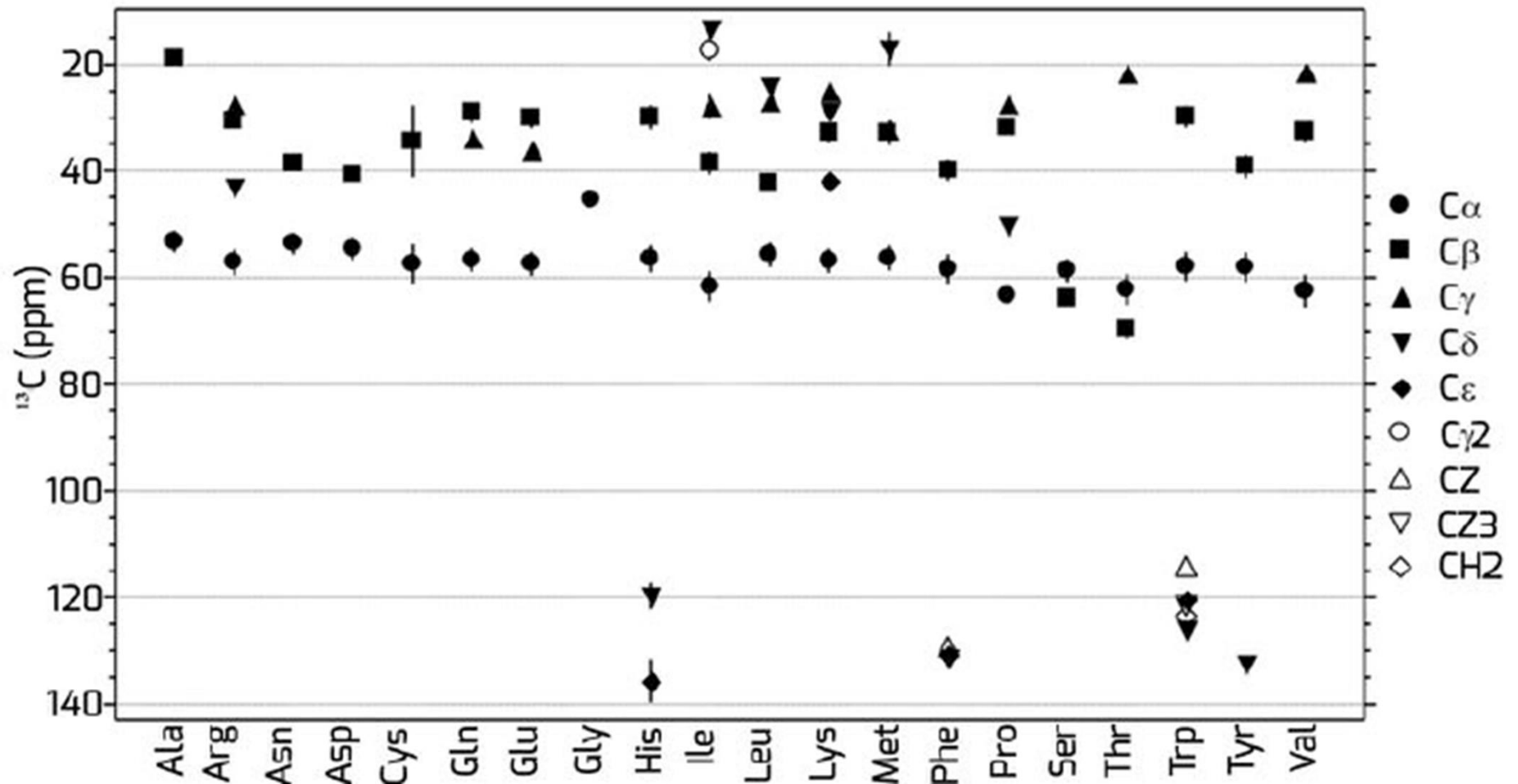


Correlacionar cada um dos **sinais** com os ^1H , ^{13}C e ^{15}N de cada um dos aminoácidos da proteína. Classificando as ressonâncias de acordo com **deslocamento químico**.

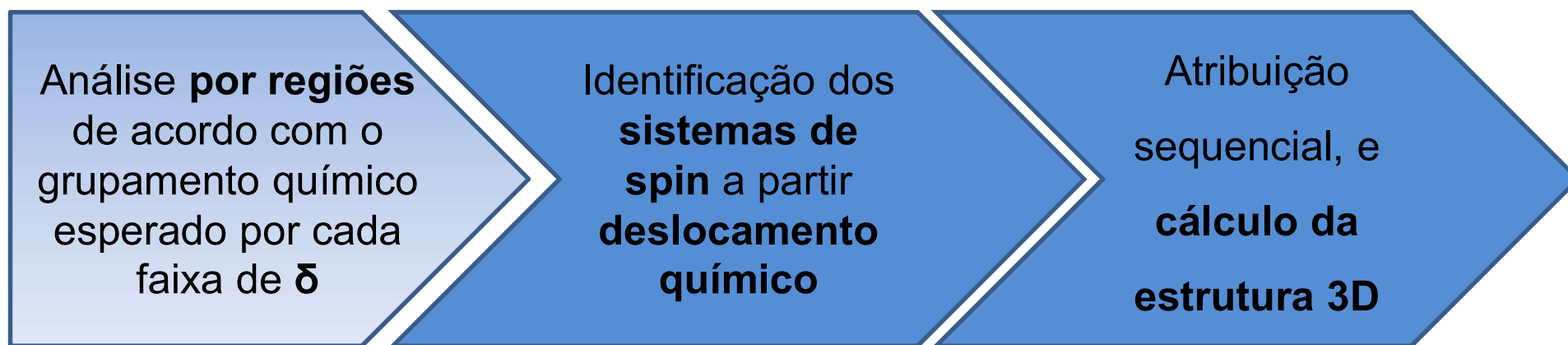
Deslocamento Químico de ^1H

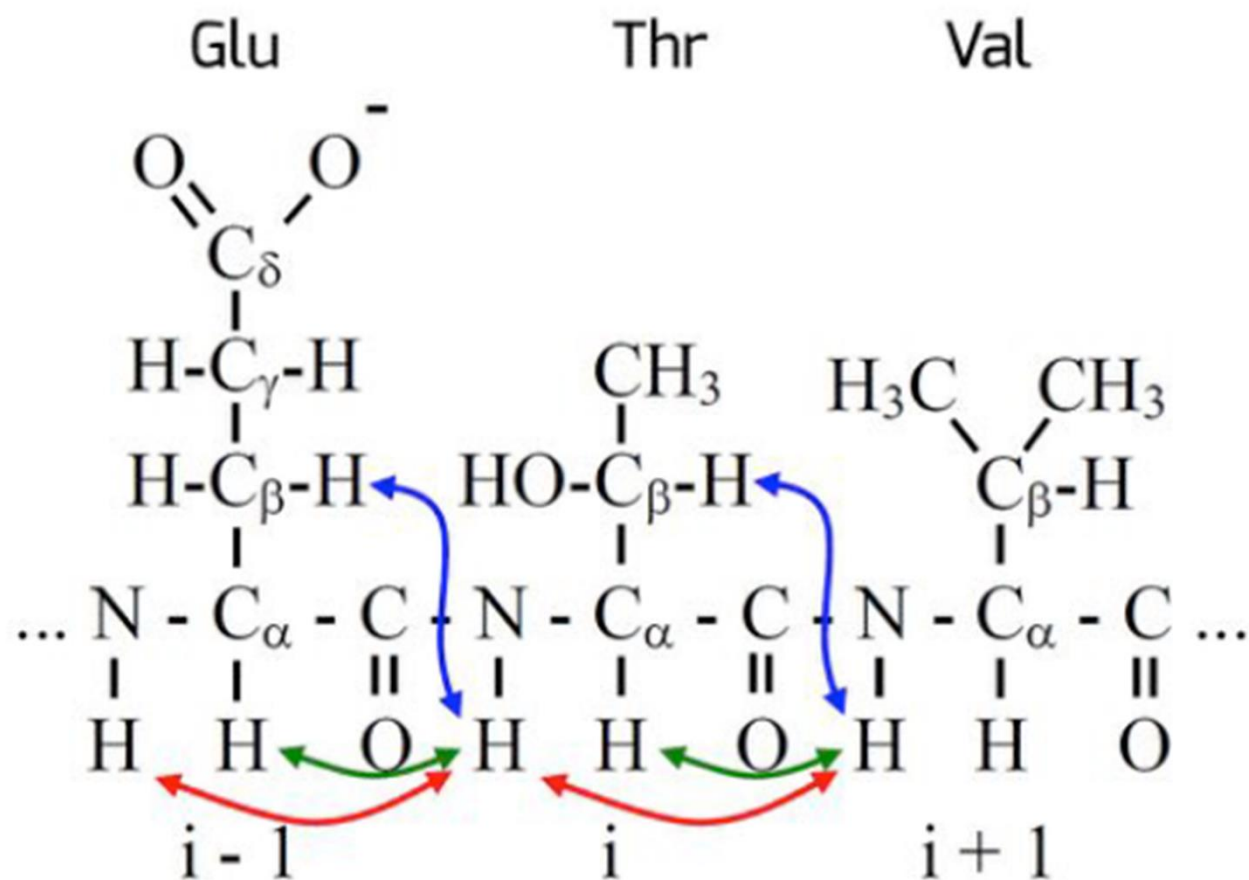


Deslocamento Químico de ^{13}C



Análise dos espectros de RMN





Seguimento tripeptídico com indicação de NOEs sequencias empregados para atribuir as ressonâncias dos três sistemas de spin a partir da Treonina

Cálculo da estrutura

**Estrutura
tridimensional de
macromoléculas**



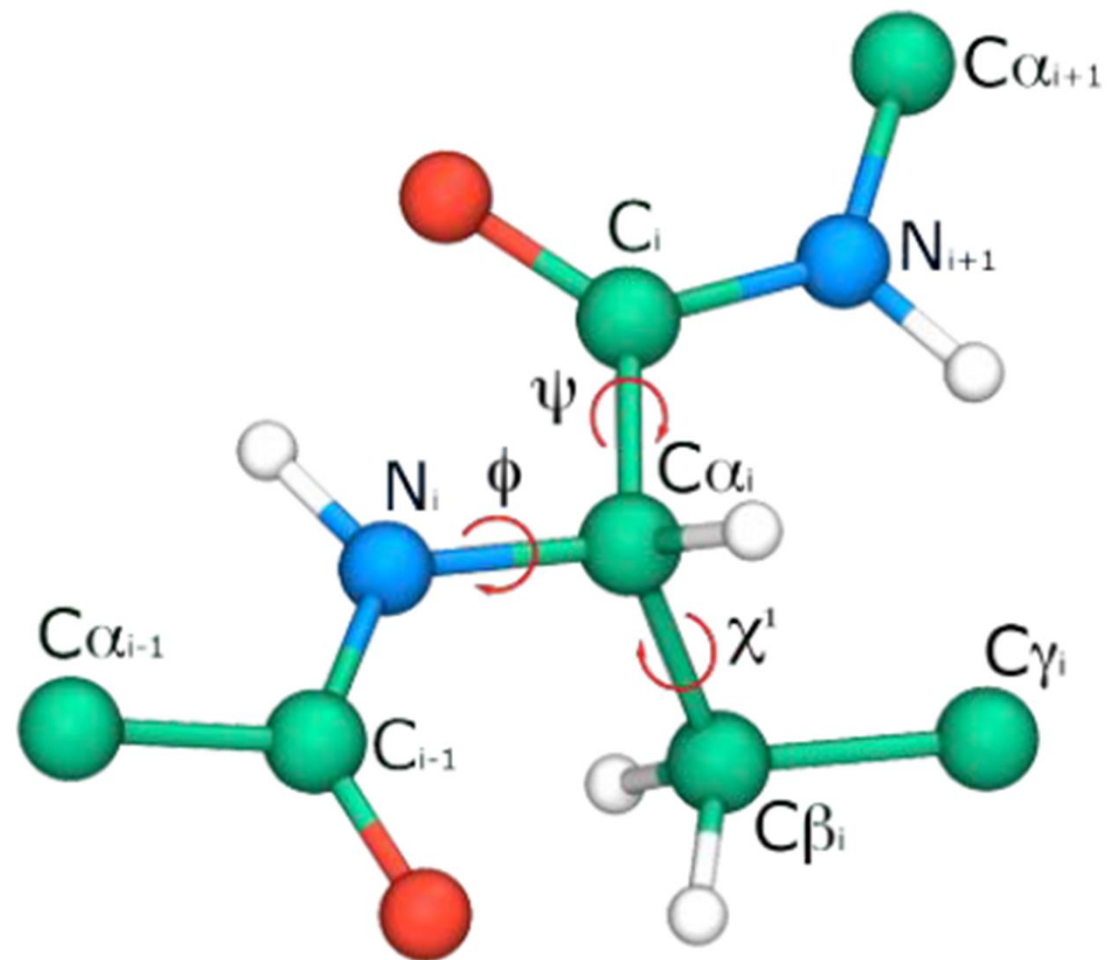
Baseada em
informações de distância
interprótons



Ângulos torcionais como
Diedro φ e χ_1 são úteis.
São inferidos via
constante de
acoplamento $3J_{HNH\alpha}$ e
 $3J_{H\alpha H\beta}$



Intensidade dos
NOEs faz-se
aproximação da
distância entre
prótons envolvidos
em acoplamento
dipolar



Fragmento de uma cadeia polipeptídica evidenciando os ângulos de diedro ϕ , ψ e χ^1

diedro φ e ψ



inferidos a partir do índice de deslocamento químico dos núcleos (CSI)



ângulo χ_1



fornece importante
informação sobre a
conformação da
cadeia lateral dos
aminoácidos

DQ é sensível ao
ambiente e a geometria
das ligações químicas.



DQ de $^{13}\text{C}\alpha$ e $^1\text{H}\alpha$ são os
mais usados e melhor
correlacionados com a
presença de estruturas
2árias em proteínas.

O cálculo do CSI, sigla para *Chemical Shift Index* é feito através do site:
<http://www.bionmr.ualberta.ca/bds/software/csi/latest/csi.html>



**PENCE / CIHR-Group
Joint Software Centre**



Funding for this software has been provided in part by the
[Canadian Institutes of Health Research \(CIHR Group\)](#)
and the
Protein Engineering Networks of Centres of Excellence (PENCE).

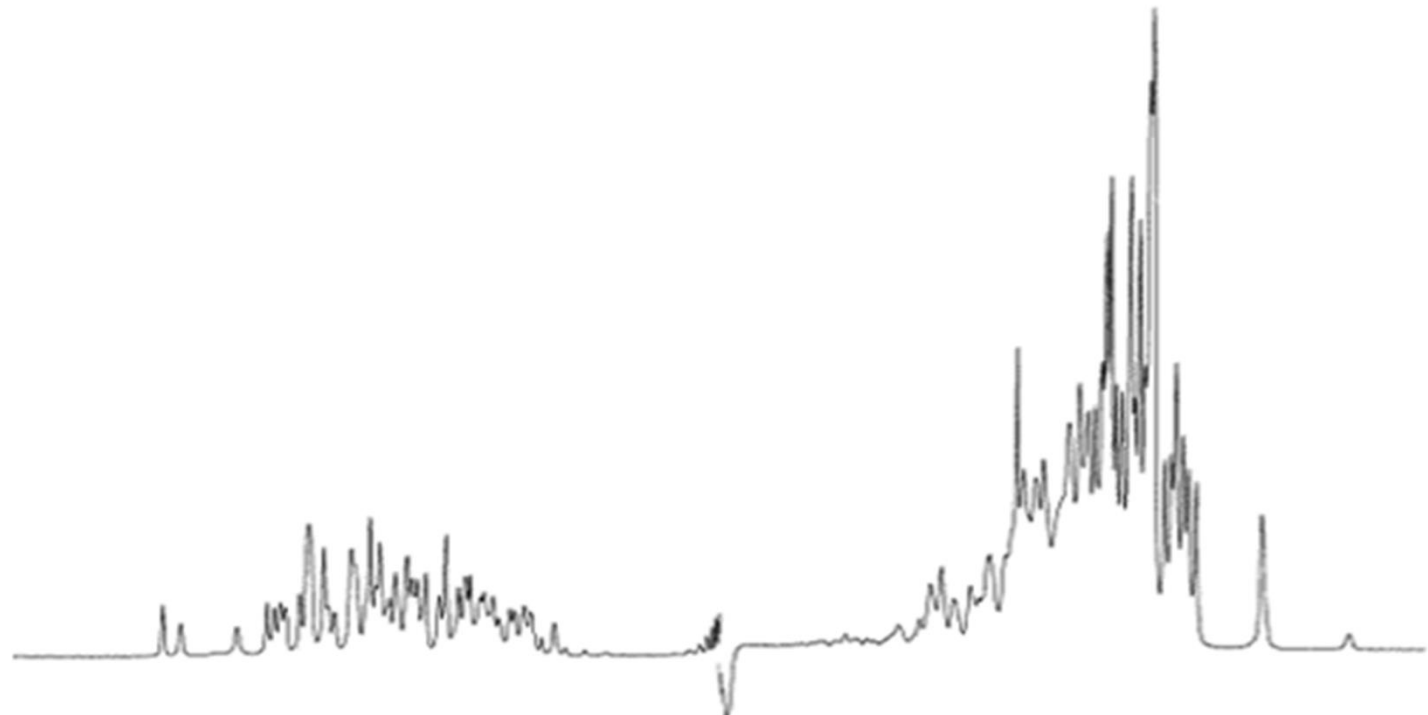
csi - Chemical Shift Index

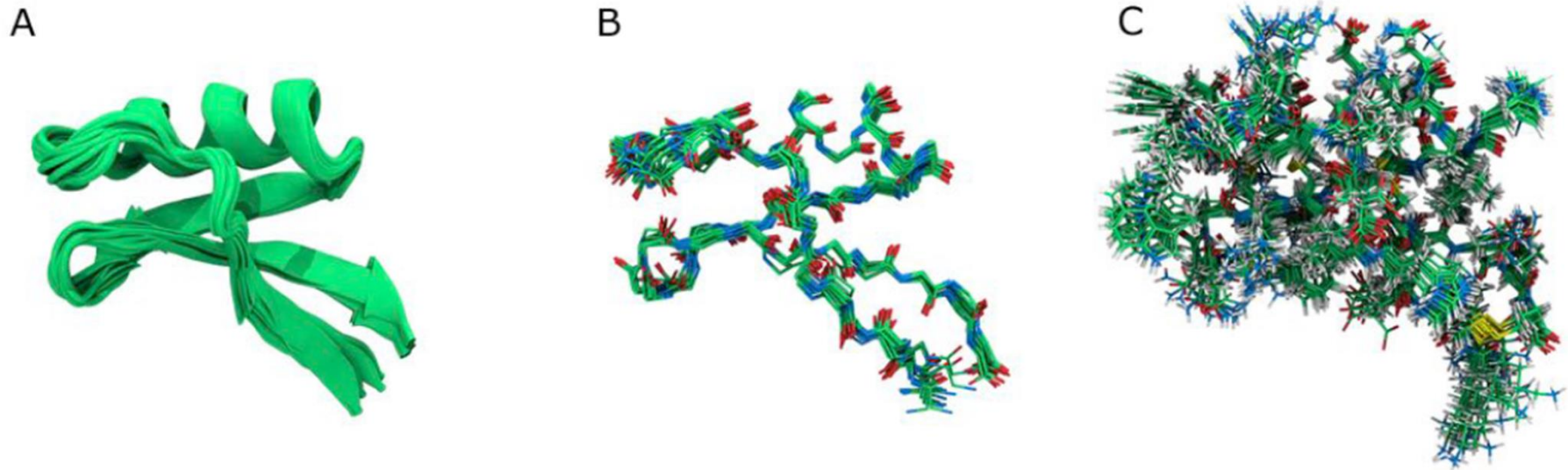
Version: 2.0 - Dec 2002

CSI é um programa para determinação da estrutura secundária das proteínas a partir dos índices dos deslocamentos químicos de 1-H e os núcleos 13-C.

As restrições de distância obtidas por NOEs, assim como de distância entre prótons envolvidos em ligações de hidrogênio e as restrições de ângulos φ , ψ e χ_1 , são então usadas em protocolos de dinâmica molecular realizados por programas específicos para ajustar a estrutura da proteína.

O programa busca conformações da molécula que satisfaçam o máximo possível às restrições empíricas e experimentais.





Nesta figura é mostrada uma sobreposição de vinte estruturas obtidas como descrito. Em A, um desenho evidenciando as estruturas secundárias. Em B, são mostrados apenas os átomos da cadeia principal (verde – carbono, azul – nitrogênio e vermelho – oxigênio). Em C, são mostrados todos os átomos (cinza – hidrogênio e amarelo – enxofre).

Programa	Distribuidor	Função do Programa	Aquisição
<u>13C-NMR-Module V1.1b</u>	<u>Institute for Organic Chemistry of Technical University of Graz, Austria</u>	Prognóstico de deslocamentos de ^{13}C de estruturas acíclicas e de anéis	Gratuito
<u>ACD/CNMR V 1.1</u>	<u>Advanced Chemistry Development, Inc.</u>	Simula espectros de ^{13}C . Contém uma base de dados interna com mais de 170.000 deslocamentos químicos experimentais e mais de 18.000 estruturas de compostos orgânicos	Consultar o Distribuidor
<u>ACD/HNMR V 1.0</u>	<u>Advanced Chemistry Development, Inc.</u>	Simula espectros de ^1H . Contém uma base de dados interna com mais de 180.000 deslocamentos químicos experimentais, mais de 25.000 constantes de acoplamento, e mais de 45.000 estruturas	Consultar o Distribuidor
<u>ACD/Specview3.50</u>	<u>Advanced Chemistry Development, Inc.</u>	Processamento e visualização de espectros de RMN. Este programa precisa rodar com o programa editor de moléculas: <u>ACD/Chemsk3.5</u>	Gratuito

<u>Fantom</u>	<u>University of Texas Medical Branch at Galveston, Human Biological Chemistry and Genetics Department</u>	Calcula conformações de polipeptídeos e proteínas de baixa energia conformacional com restrições de experimentos de RMN. Modelagem molecular	Gratuito para acadêmicos
<u>Felix</u>	<u>Molecular Simulations, Inc.</u>	Análise e visualização de espectros de RMN de alta resolução em 1, 2 e 3 dimensões, homo e heteronucleares	Consultar o Distribuidor
<u>Felix for Windows</u>	<u>Molecular Simulations, Inc.</u>	Análise e visualização de espectros de RMN 1D	Consultar o Distribuidor
<u>FFT SpecEV</u> NOVO!	<u>LSO -FFCLRP-USP</u>	Este programa mostra como a transformada de Fourier pode ser utilizada para processar os dados obtidos de um espectrômetro de ressonância magnética nuclear, transformando a curva "fid" obtida do espectrômetro em um espectro de RMN.	Gratuito
<u>FTNMR Simulator</u>	<u>Virginia Polytechnic Institute</u>	Simula os princípios e operação de RMN da transformada de Fourier	Gratuito