

# Studying „Invisible“ Excited Protein States in Slow Exchange with a Major State Conformation

JACS 2012

Pramodh Vallurupalli, Guillaume Bouvignies, and Lewis E. Kay

MR-Seminar

Nina Kubatova

13.10.2014

# Inhaltverzeichnis

1. Einführung
2. Grundlagen
  - 2.1. Austauschprozesse
  - 2.2. CPMG-Experiment
  - 2.3. CPMG- vs. CEST-Experiment
  - 2.4.  $^{15}\text{N}$ -CEST-Pulssequenz
  - 2.5. Eliminierung der  $^1\text{H}$ -Entkopplungsartifakten
3. Faltung der A39G Mutante von der FF Domäne HYPA/FBP11
4. Zusammenfassung
5. Literatur

# Einführung

3

Proteine: Haupt- und Nebenkonformationen

→ Kinetik und Thermodynamik der Austauschprozessen

Ziel: Detektion der Konformationen mit kurzer Lebensdauer und geringer Population

Methode:

- CPMG Relaxation-Dispersion-Experiment

Grenzen: Austauschrate zwischen  $200 \text{ s}^{-1}$  und  $2000 \text{ s}^{-1}$  und  
fraktionelle Population der Nebenkonformation Minimum 0,5%

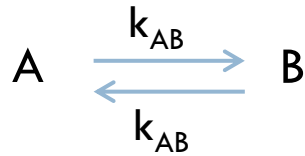
- Magnetisierungsaustauschbasierte Experimente

Austauschrate weniger als  $100 \text{ s}^{-1}$

→ CEST-basierte Experimente

# Austauschprozesse

4



langsamer Austausch:  $k_{AB} < \Delta\omega$   
 intermediär Austausch:  $k_{AB} \approx \Delta\omega$   
 schneller Austausch:  $k_{AB} > \Delta\omega$

## schneller Austausch:

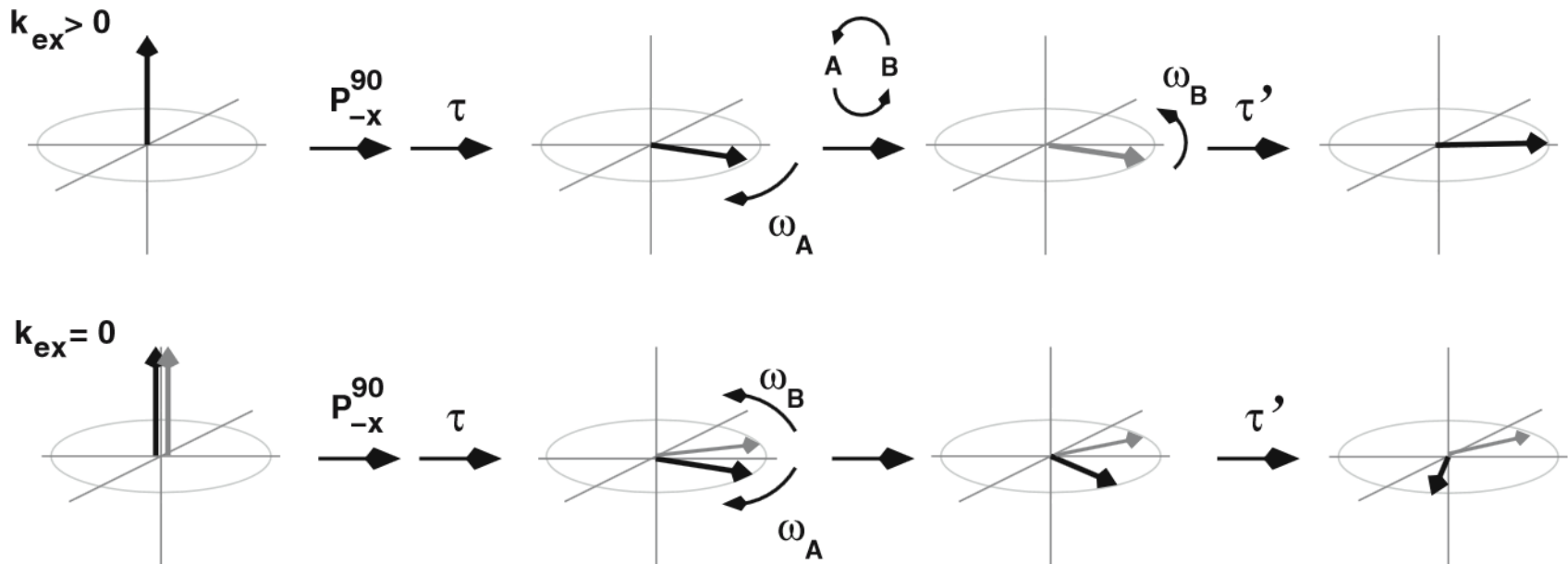
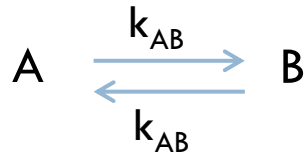


Abbildung 1: schneller Austausch. Die Abbildung ist aus Gordon S. Rule and T. Kevin Hitchens. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*; Springer, 2006. übernommen.

# Austauschprozesse

5



langsamer Austausch:  $k_{AB} < \Delta\omega$   
intermediär Austausch:  $k_{AB} \approx \Delta\omega$   
schneller Austausch:  $k_{AB} > \Delta\omega$

## langsamer Austausch:

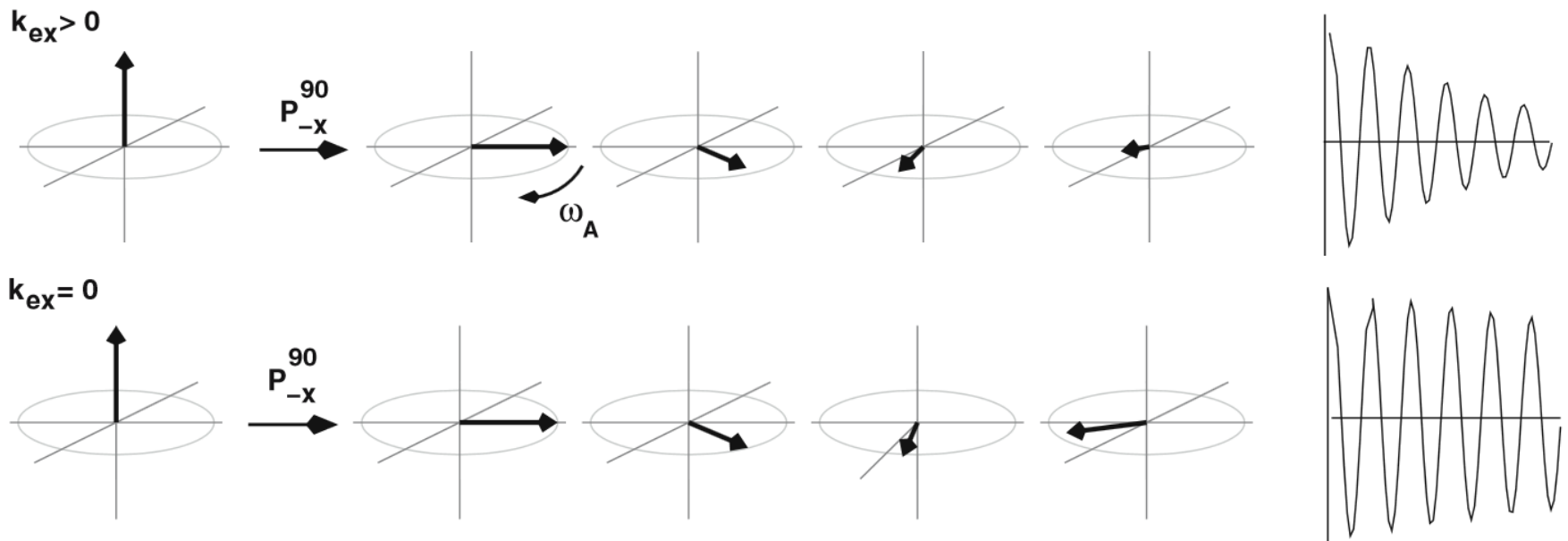


Abbildung 2: langsamer Austausch. Die Abbildung ist aus Gordon S. Rule and T. Kevin Hitchens. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*; Springer, 2006. übernommen.

# CPMG-Experiment

6

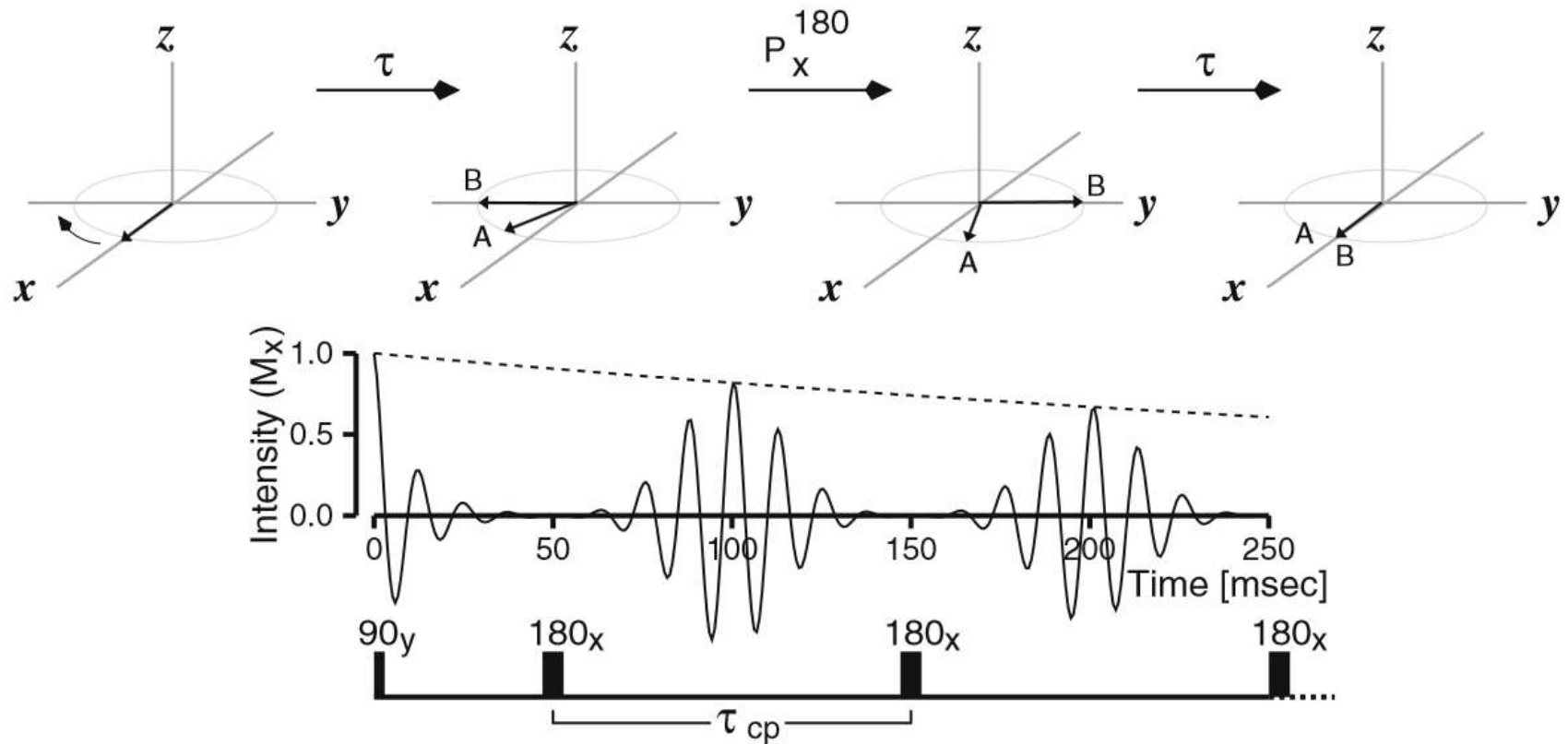
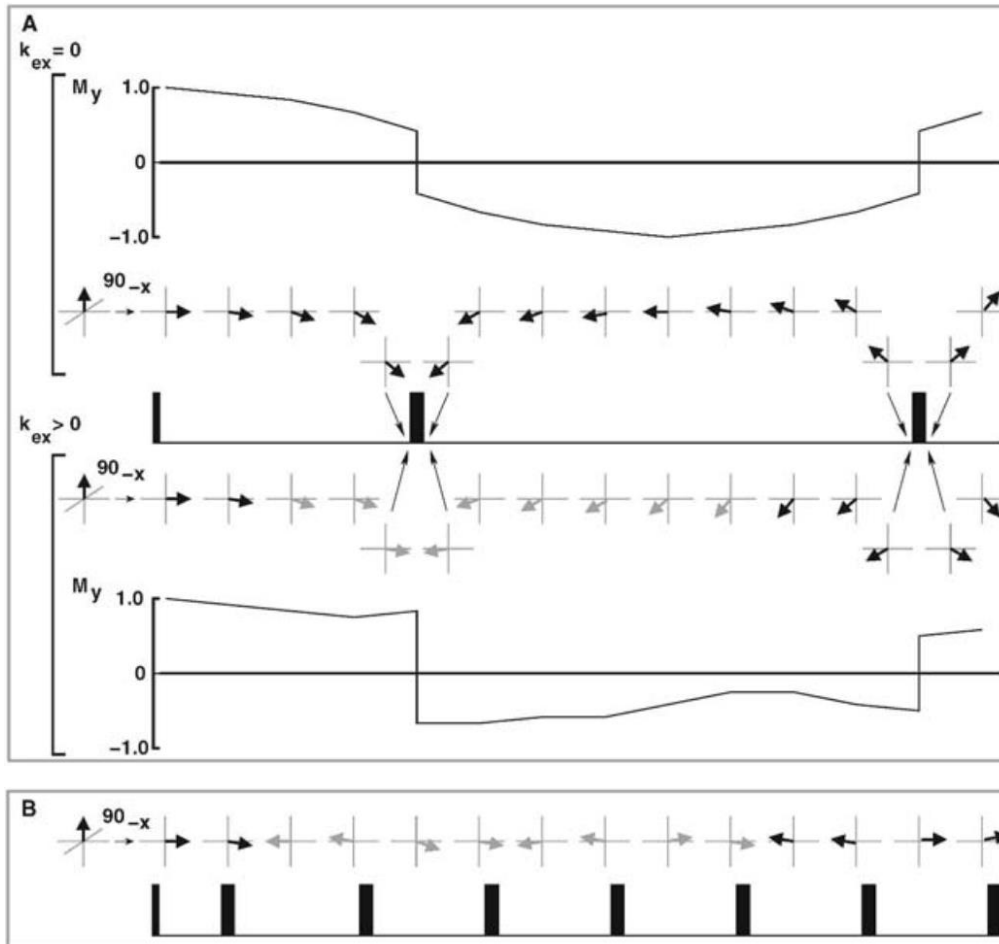


Abbildung 3: CPMG-Experiment. Die Abbildung ist aus Gordon S. Rule and T. Kevin Hitchens. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*; Springer, 2006. übernommen.

# CPMG-Experiment

7



langsamer Austausch



$\tau_{cp}$  vs  $T_2$

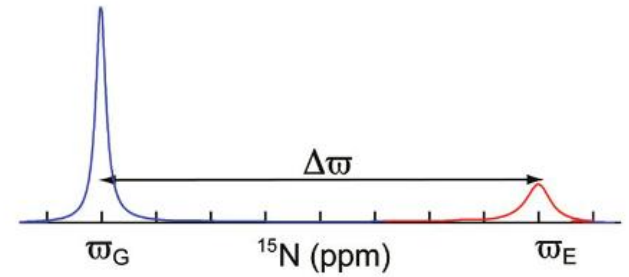
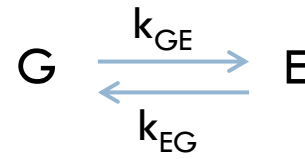
schneller Austausch



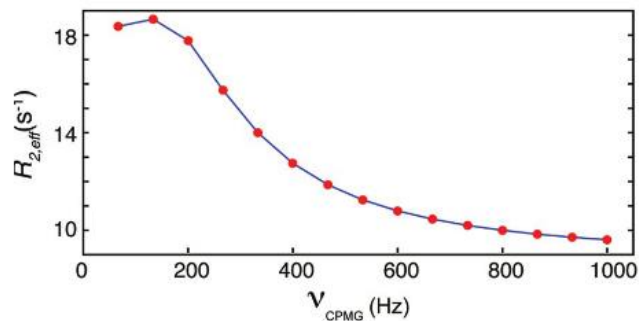
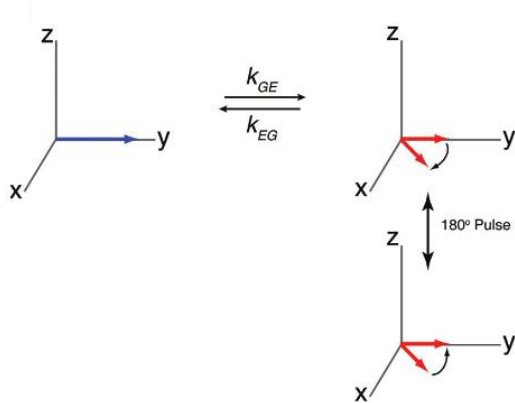
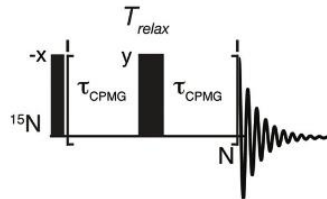
$\tau_{cp} < 1$  ms Heizprobleme

# CPMG vs CEST

8



CPMG



CEST

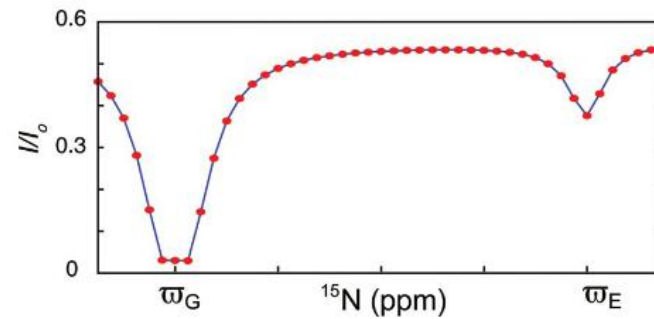
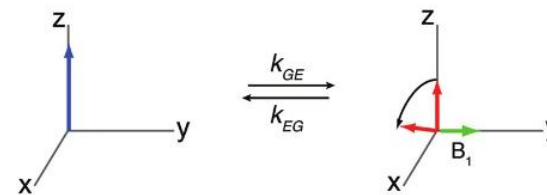
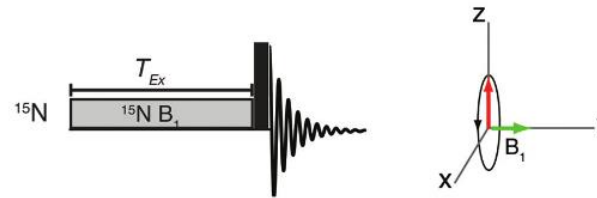
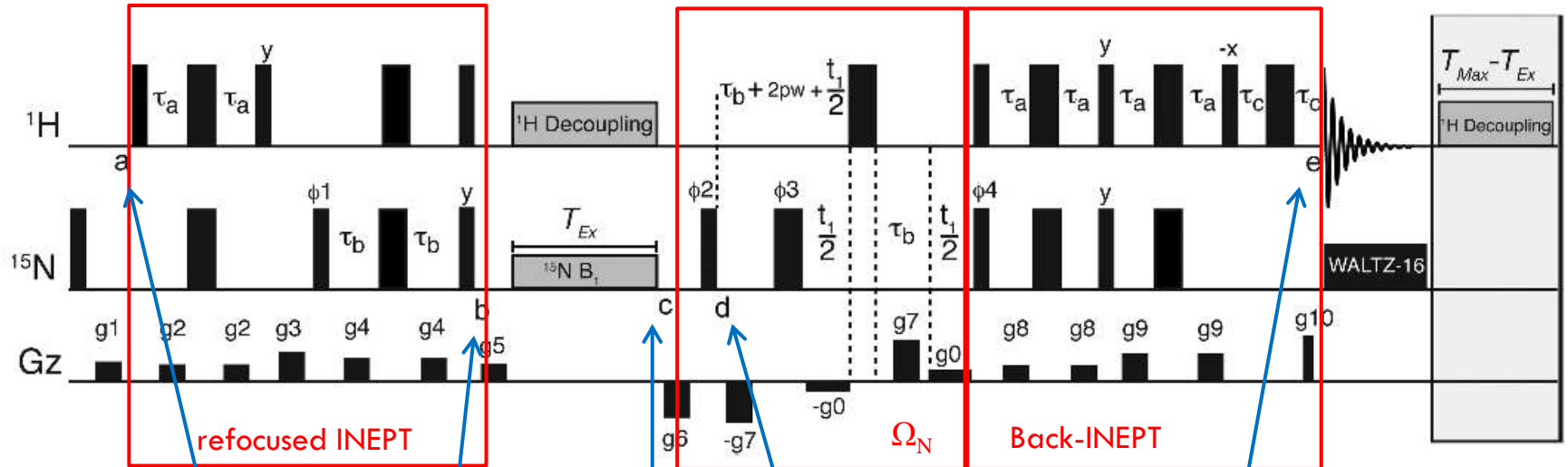


Abbildung 5: Vergleich von CPMG- und CEST-Experimenten. Die Abbildung ist aus Vallurupalli and Bouvignies et al. 2012 übernommen.



# $^{15}\text{N}$ -CEST-Pulssequenz

Gradient-coherence-selected, enhanced-sensitivity-based pulse scheme

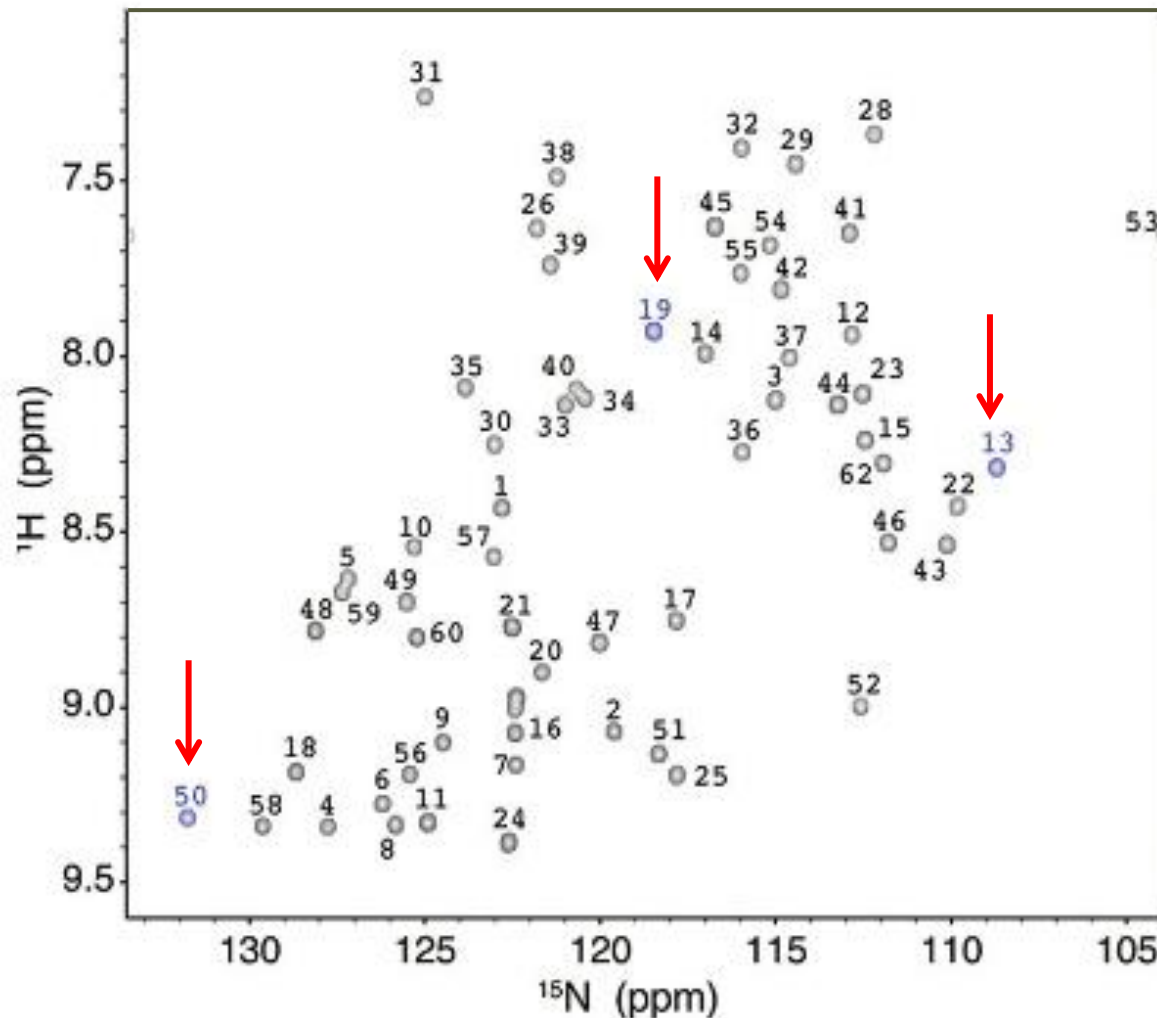


$${}^1\text{H}_z(a) \rightarrow {}^{15}\text{N}_z(b) \xrightarrow{T_{EX}} {}^{15}\text{N}_z(c) \rightarrow {}^{15}\text{N}_x(d) \xrightarrow{t_1/SE-RINEPT} {}^1\text{H}_{x/y}(e)$$

${}^1\text{H}$ -Entkopplung :  $\nu_1 < J_{\text{HN}}$   $\longrightarrow$  Artefakte

# Eliminierung der $^1\text{H}$ -Entkopplungsartifakten

10



HSQC-Spektrum von Protein L (63 AS)

# Eliminierung der $^1\text{H}$ -Entkopplungsartifakten

11

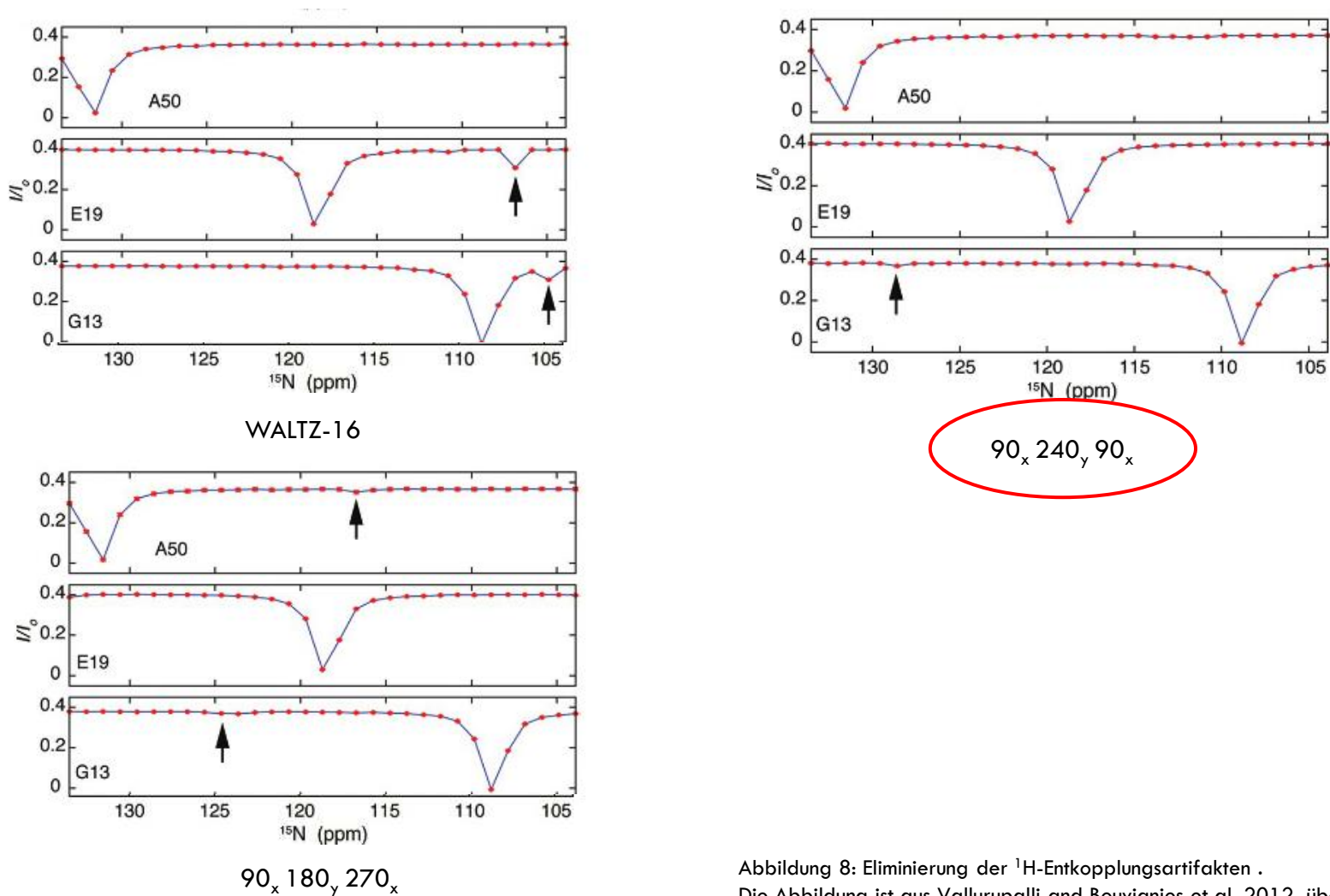


Abbildung 8: Eliminierung der  $^1\text{H}$ -Entkopplungsartifakten .  
Die Abbildung ist aus Vallurupalli and Bouvignies et al. 2012 übernommen.

# Validierung der Methode

12

Austauschsystem:

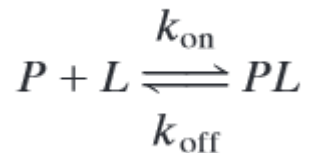
Protein - Abp1p SH3 Domäne, Ligand - Ark1p Peptid

Abp1p → Regulierung von Zytoskelett  
bei Pilzen, Fliegen und Säugetieren

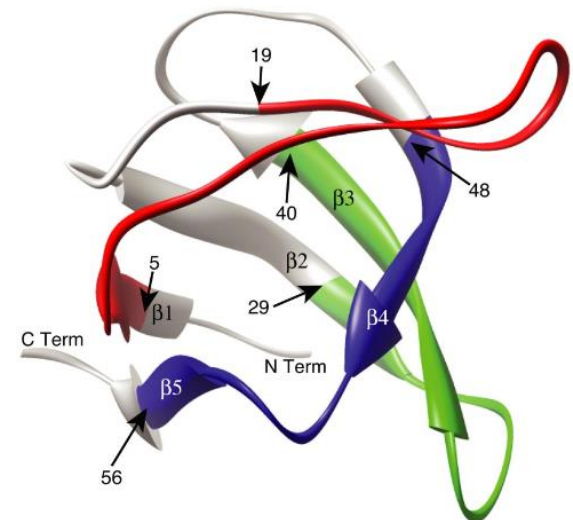
N-Terminus ADF-H Domäne  
Prolin-Region (PRR)  
C-Terminus SH3 Domäne



Protein-Protein-Wechselwirkungen



L: 5 - 10% → PL unsichtbar

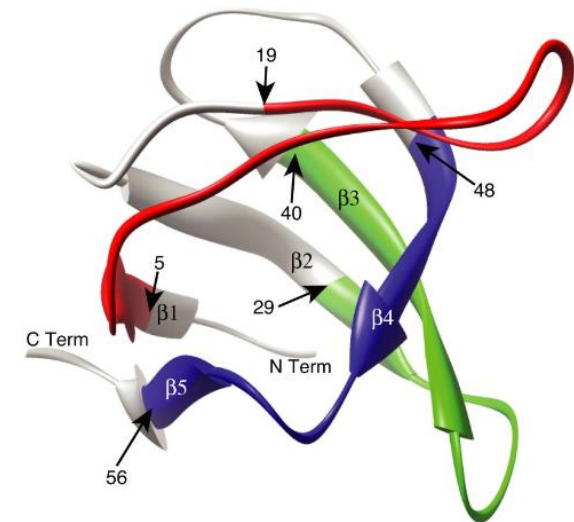
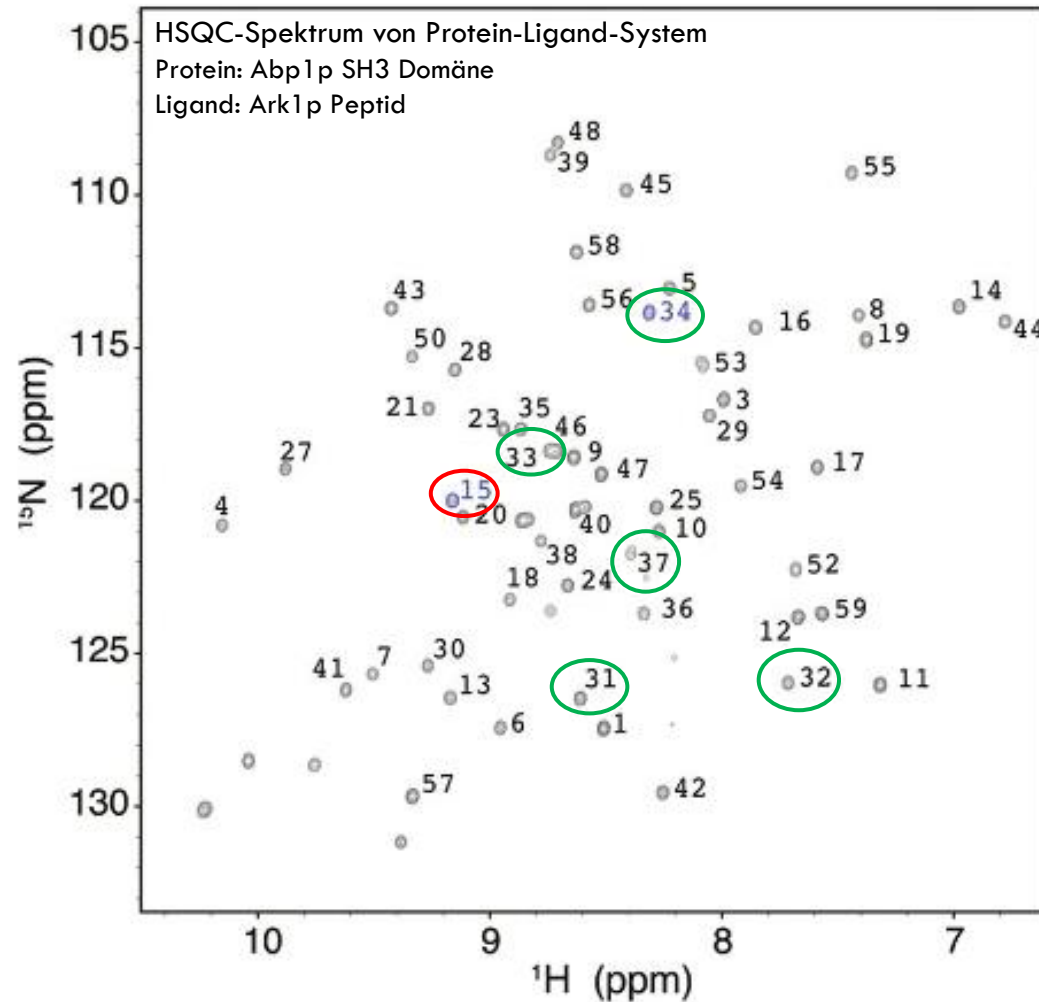


Abp1p SH3 Domäne

Abbildung 9: x-ray structure von Abp1p SH3 Domäne.  
Die Abbildung ist aus Vallurupalli et al. 2008 übernommen.

# Validierung der Methode

13



Abp1 p SH3 Domäne

Abbildung 9: x-ray structure von Abp1 p SH3 Domäne.  
Die Abbildung ist aus Vallurupalli et al. 2008 übernommen.

# Validierung der Methode

14

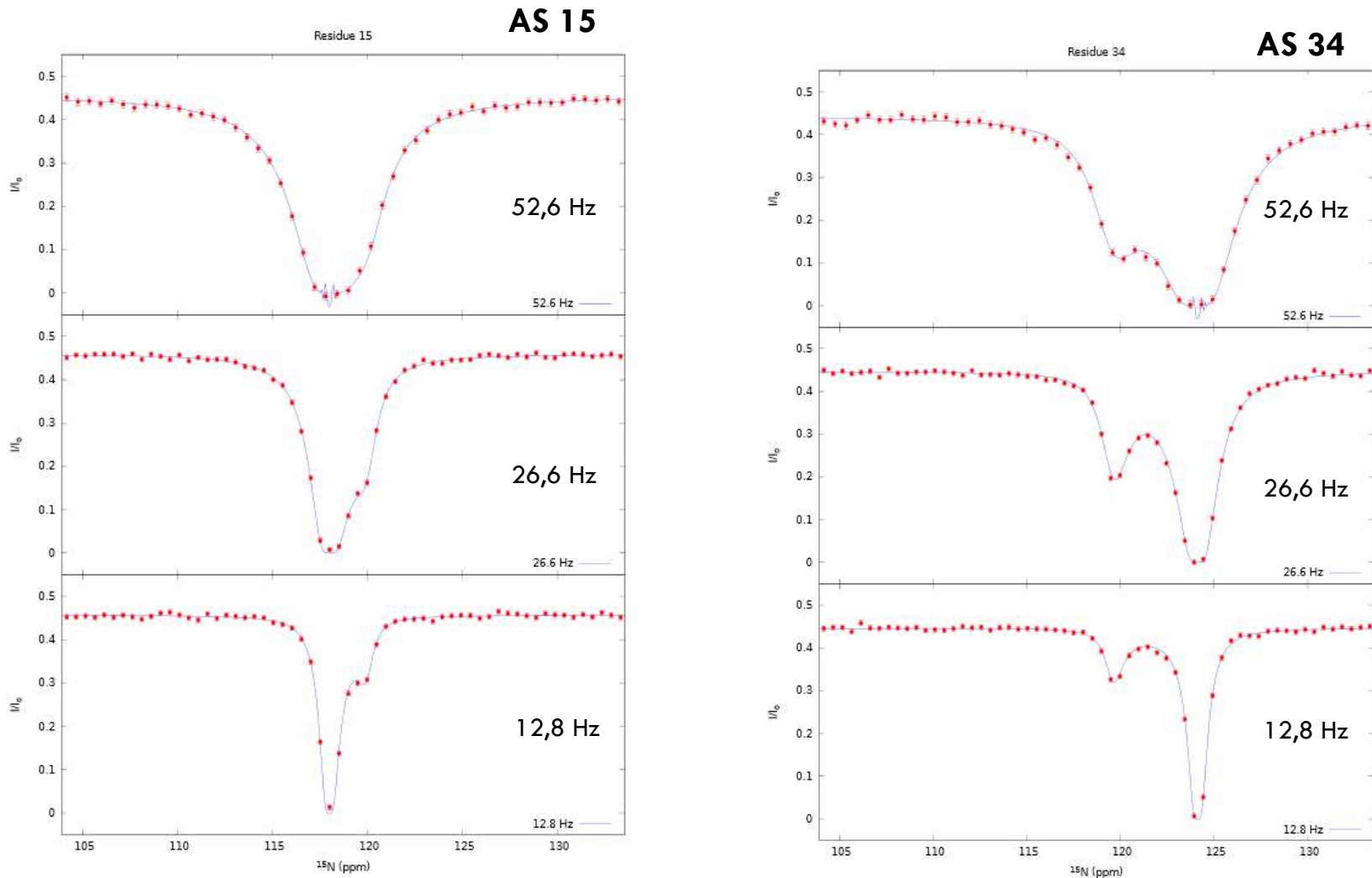
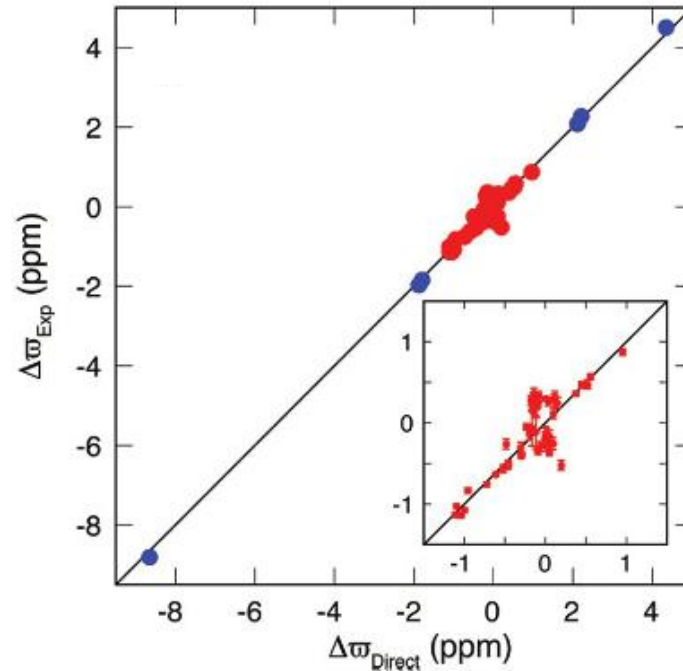
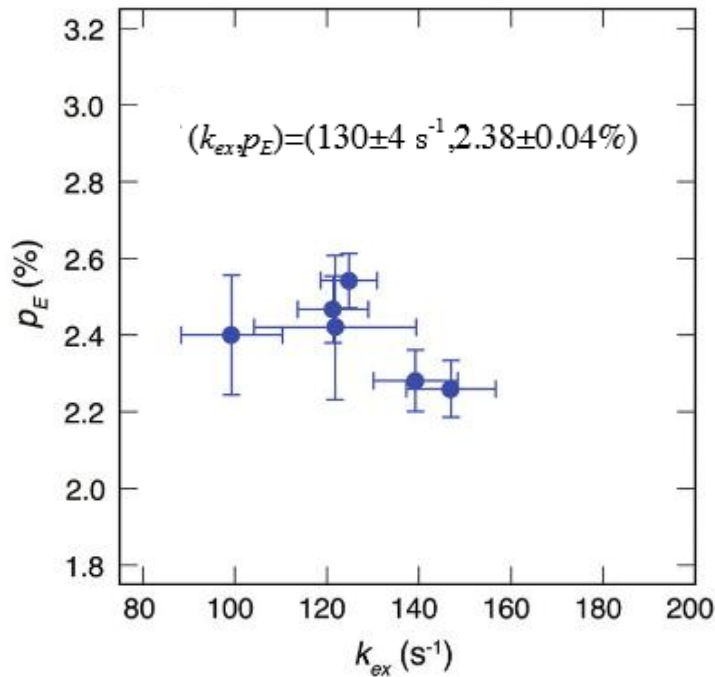


Abbildung 11: Intensitätsprofile der Aminosäure von Abp1p SH3 Domäne. Die Abbildung ist aus Vallurupalli and Bouvignies et al. 2012 übernommen.

# Validierung der Methode

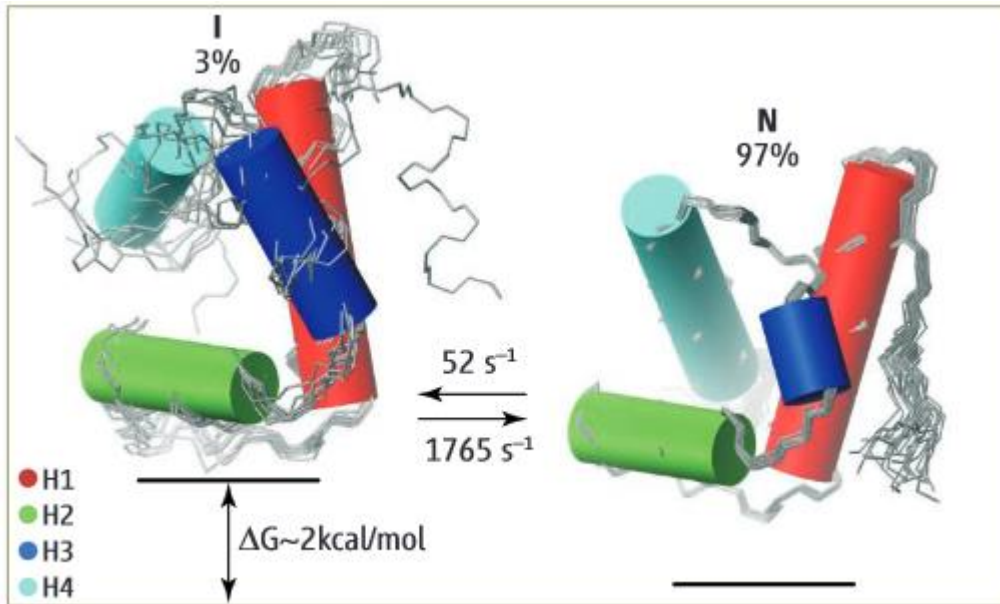
15



Residue	$\Delta\omega$ (ppm)	$R_2^G$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$R_2^E$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$R_1^G$ ( $\text{s}^{-1}$ )
15	$-1.98 \pm 0.02$	$8.27 \pm 0.13$	$13.4 \pm 4.6$	$1.67 \pm 0.01$
31	$2.06 \pm 0.02$	$9.73 \pm 0.14$	$6.4 \pm 4.8$	$1.64 \pm 0.01$
32	$-8.82 \pm 0.01$	$7.71 \pm 0.14$	$19.9 \pm 5.9$	$1.70 \pm 0.01$
33	$2.27 \pm 0.02$	$8.11 \pm 0.15$	$13.2 \pm 5.7$	$1.97 \pm 0.01$
34	$4.52 \pm 0.01$	$8.07 \pm 0.14$	$27.1 \pm 5.3$	$1.70 \pm 0.01$
37	$-1.94 \pm 0.03$	$9.79 \pm 0.26$	$0.0 \pm 4.9$	$1.96 \pm 0.01$

# Faltung der A39G Mutante von der FF Domäne HYPA/FBP11

16



71 AS

$\alpha$ -Helix (H1): AS 14-28

$\alpha$ -Helix (H2): AS 36-44

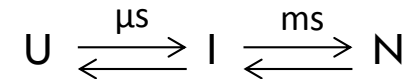
$3_{10}$ -Helix (H3): AS 48-50

$\alpha$ -Helix (H4): AS 55-68

Loop I: AS 29-35

Loop II: AS 45-47

Loop III: AS 51-54



A39G Mutation  $\longrightarrow k_{\text{ex}} \downarrow$

CPMG-D: versagt

CEST: 37 AS

Abbildung 13: Angeregter Zustand und Grundzustand von FF Domäne.  
Die Abbildung ist aus Hashim M. Al-Hashimi et al. 2010 übernommen.



# Faltung der A39G Mutante von der FF Domäne HYPA/FBP11

17

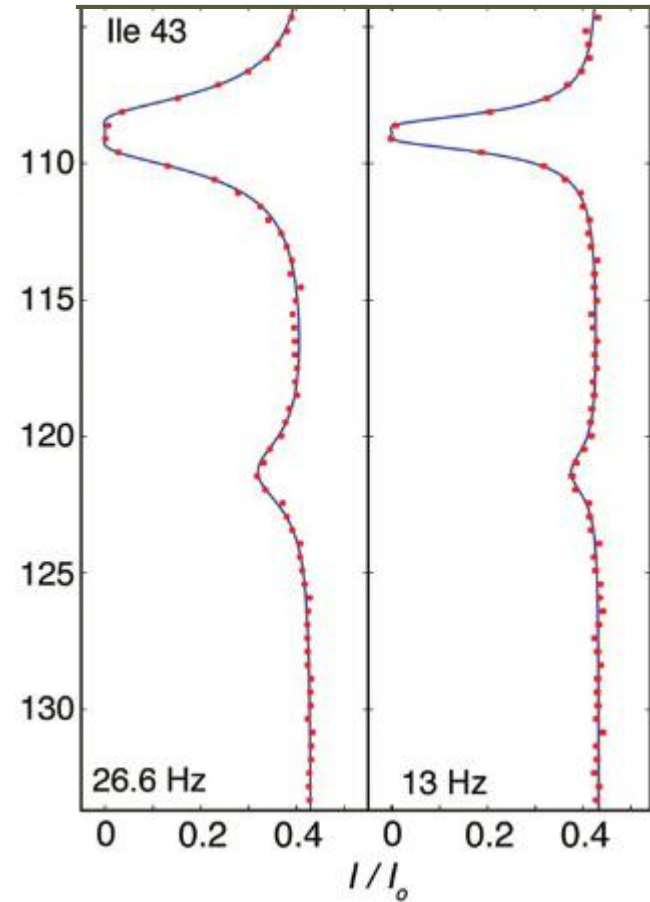
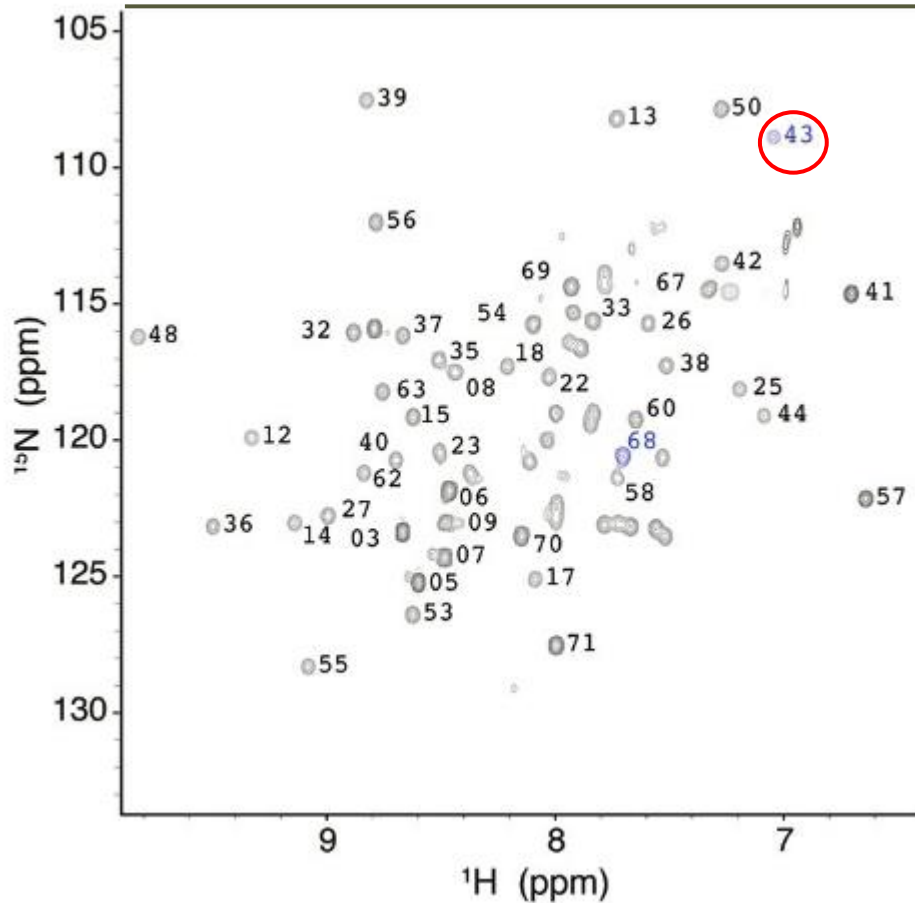


Abbildung 14: Links: HSQC-Spektrum von A39G Mutante. Rechts: Intensitätsprofile der Aminosäure von A39G Mutante. Die Abbildung ist aus Vallurupalli and Bouvignies et al. 2012 übernommen.

# Faltung der A39G Mutante von der FF Domäne HYPA/FBP11

18

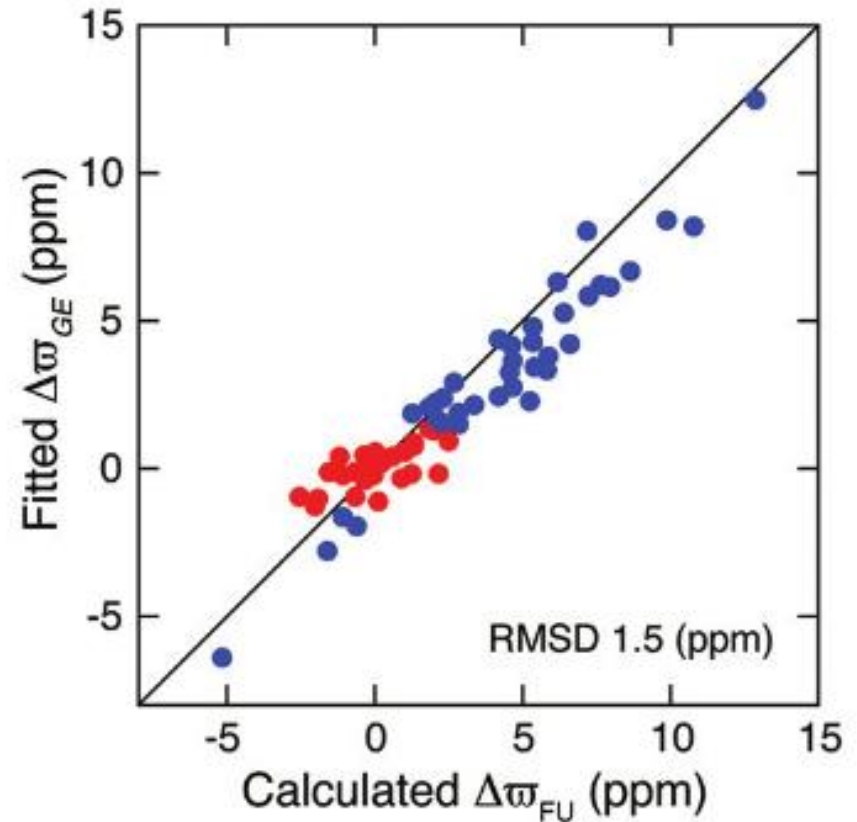
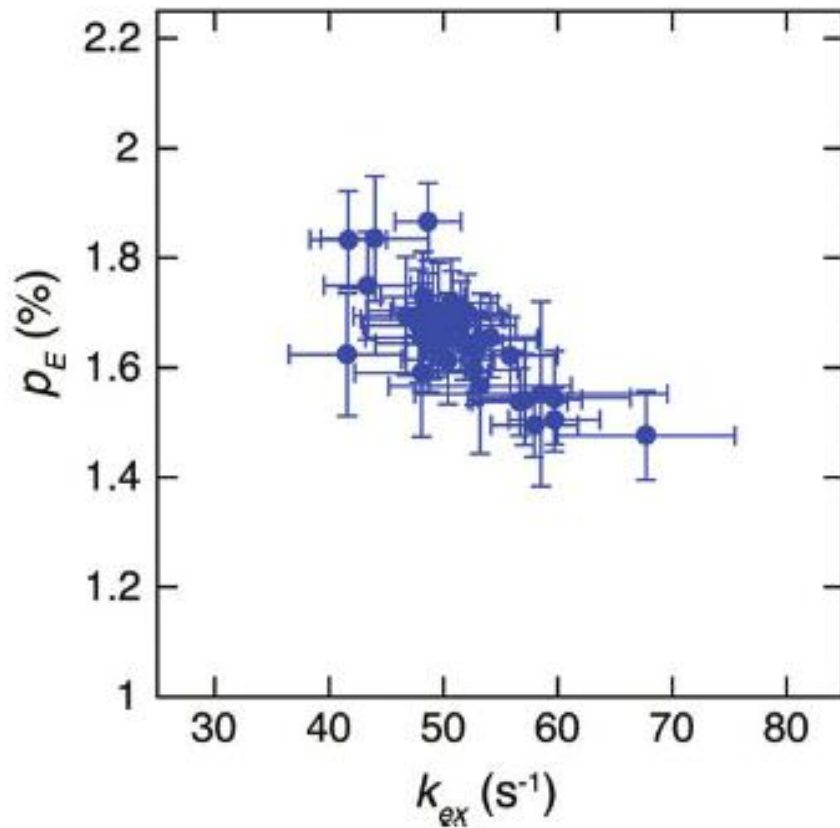
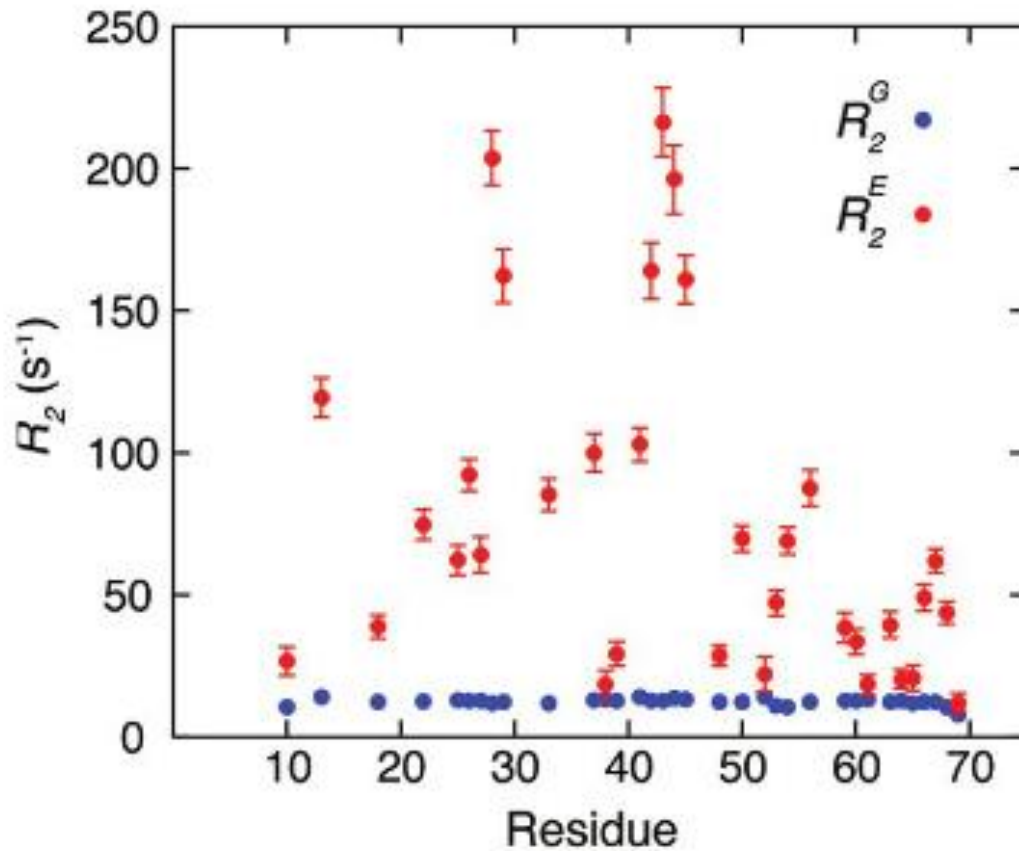


Abbildung 15: Die Abbildung ist aus Vallurupalli and Bouvignies et al. 2012 übernommen.

# Faltung der A39G Mutante von der FF Domäne HYPA/FBP11

19



Erwartet:

gefaltet vs. ungefaltet

flexibler

$R_{2, \text{gefaltet}} > R_{2, \text{ungefaltet}}$

two-state exchange

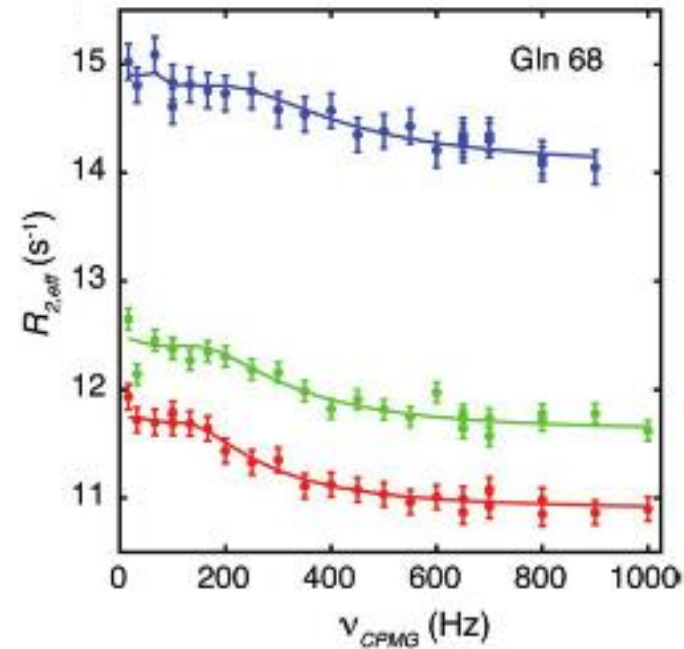
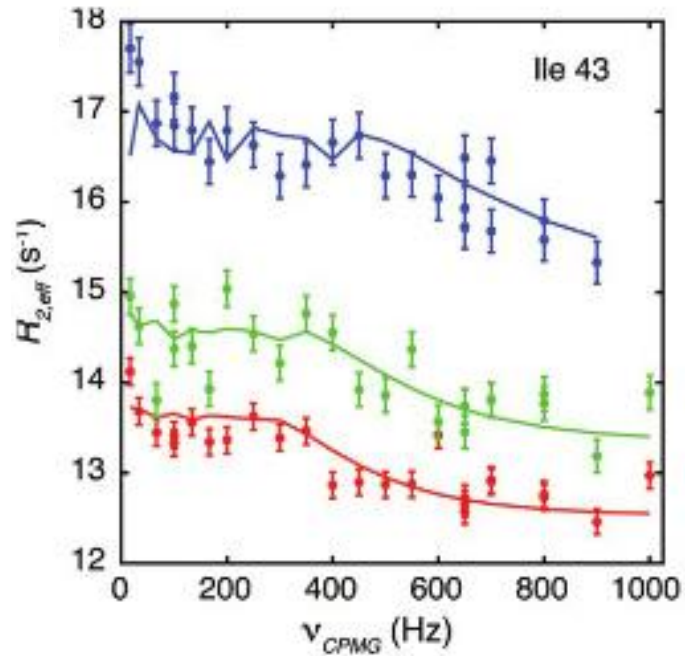
vs.

tree-state exchange

# Faltung der A39G Mutante von der FF Domäne HYPA/FBP11

20

## $^{15}\text{N}$ -CPMG-Relaxations-Dispersion-Experiment



11,7 T

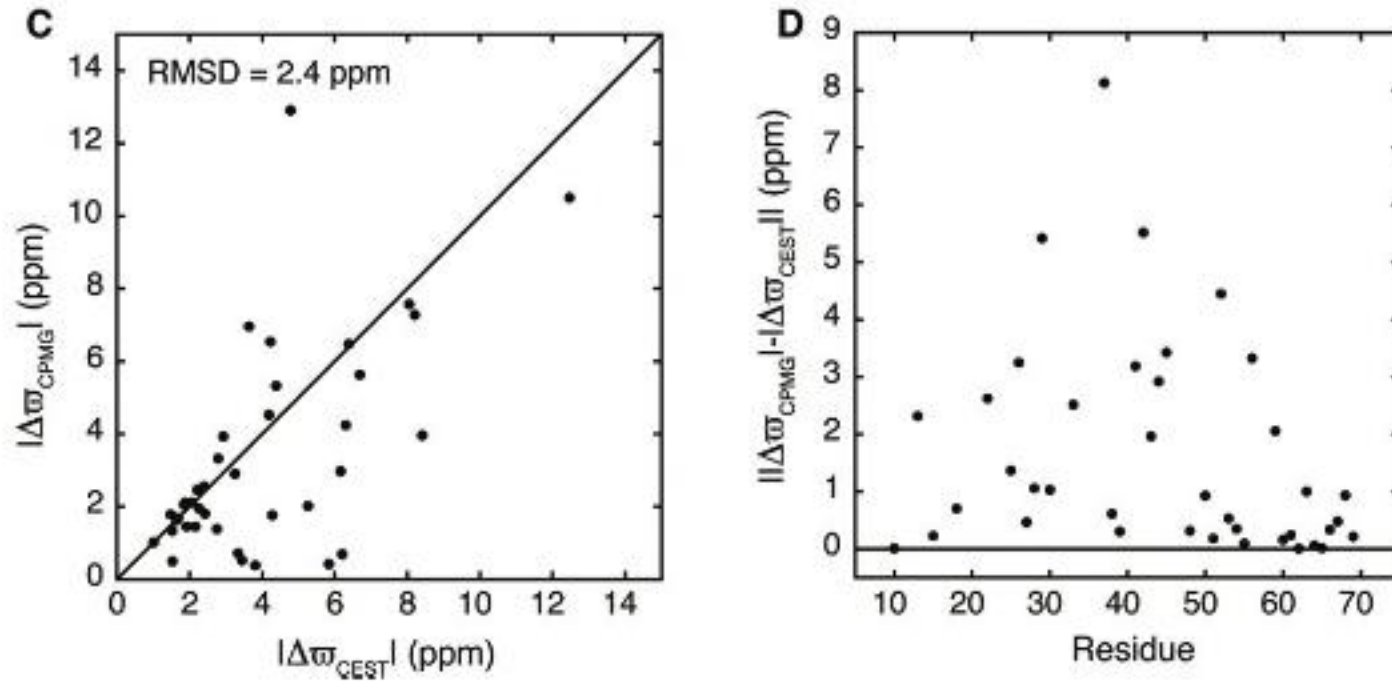
14,0 T

18,8 T

# Faltung der A39G Mutante von der FF Domäne HYPA/FBP11

21

## CPMG vs. CEST



	$k_{\text{ex}}$	$p_{\text{F}}$
CPMG-D:	$101 \pm 18 \text{ s}^{-1}$	$0,8 \pm 0,1 \%$
CEST:	$51,6 \pm 1 \text{ s}^{-1}$	$1,65 \pm 0,02 \%$

# Zusammenfassung

22



	<u>CPMG-D</u>	<u>CEST</u>
$k_{es}$	200-2000 s <sup>-1</sup>	< 200 s <sup>-1</sup>
$p_E$	> 0,5%	beliebig
		gut für große Proteine (T1, T2)



Validierung der CEST-Methode an Abp1p SH3 - Ark1 System



Faltung der A39G Mutante von der FF Domäne HYPA/FBP11:

Bestimmung von  $k_{ex}$ ,  $p_E$  und  $R_2$

two-state exchange vs. tree-state exchange

CPMG vs. CEST

# Literatur

1. Vallurupalli, P.; Bouvignies G.; Kay, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8148–8161.
2. Vallurupalli, P.; Hansen, D. F.; Kay, L. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 11766–11771.
3. Vallurupalli, P.; Hansen, D. F.; Stollar, E.; Meirovitch, E.; Kay, L. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 18473–18477
4. Bouvignies, G.; Hansen, D. F.; Vallurupalli, P.; Kay, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1935–1945
5. Jemth, P.; Day, R.; Gianni, S.; Khan, F.; Allen, M.; Daggett, V.; Fersht, A. R. *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 363–378
6. Korzhnev, D. M.; Religa, T. L.; Banachewicz, W.; Fersht, A. R.; Kay, L. E. *Science* **2010**, *329*, 1312–1316
7. Jemth, P.; Day, R.; Gianni, S.; Khan, F.; Allen, M.; Daggett, V.; Fersht, A. R. *J. Mol. Biol.* **2005**, *350*, 363–378
8. Korzhnev, D. M.; Vernon, R. M.; Religa, T. L.; Hansen, A. L.; Baker, D.; Fersht, A. R.; Kay, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10974–10982
9. Fawzi, N. L.; Ying, J.; Ghirlando, R.; Torchia, D. A.; Clore, G. M. *Nature* **2011**, *480*, 268–72
10. Farrow, N. A.; Muhandiram, R.; Singer, A. U.; Pascal, S. M.; Kay, C. M.; Gish, G.; Shoelson, S. E.; Pawson, T.; Forman-Kay, J. D.; Kay, L. E. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5984–6003
11. Rule G. S. and Hitchens T. K. *Fundamentals of Protein NMR Spectroscopy*; Springer, **2006**.

**Danke für die Aufmerksamkeit**