

NMR Nuclear Magnetic Resonance

$$\left\{ \begin{array}{l} E = -\vec{\mu}_m \cdot \vec{H} \\ \frac{d\vec{L}}{dt} = \vec{\mu}_m \wedge \vec{H} \end{array} \right.$$

Energia (E) di una particella dotata di momento magnetico (μ) in un campo magnetico (H)

Variazione di momento angolare (L) di una particella dotata di momento magnetico (μ) in un campo magnetico (H)

Il momento magnetico di un nucleo dipende dallo spin nucleare (I)

Se il campo magnetico è diretto lungo la direzione z :

$$\vec{\mu}_m = \gamma \vec{I} \Rightarrow \mu_{m\hat{z}} = \gamma \hbar m_I$$

$$m_I = I, (I-1), \dots, -I \quad 2I+1 \quad \text{valori}$$

1

Nuclei sensibili a spettri NMR

Nuclei maggiormente ricorrenti nei sistemi biologici: ^1H , ^{12}C , ^{16}O , ^{14}N , ^{31}P , ^{32}S

$$\vec{\mu}_m = \gamma \vec{I} \Rightarrow \mu_{m\hat{z}} = \gamma \hbar m_I$$

$$I = \left\{ \begin{array}{l} 0, \text{ se il nucleo ha massa e carica pari, come } ^{12}\text{C}, ^{16}\text{O}, ^{32}\text{S} \\ \text{semintero } (n/2), \text{ se il nucleo ha massa dispari come } ^1\text{H}, ^{13}\text{C}, ^{31}\text{P} \\ \text{intero } (n), \text{ se il nucleo ha massa pari e carica dispari come, } ^{14}\text{N} \end{array} \right.$$

i nuclei con I semintero e maggiore di $\frac{1}{2}$ hanno un momento di quadrupolo elettrico che riduce il tempo di vita degli stati magnetici rendendo difficoltoso il loro studio.

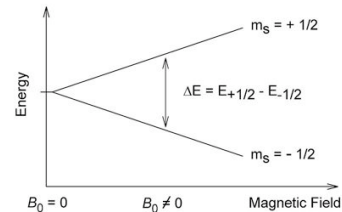
2

Sottoporre un nucleo ad un campo magnetico genera una sua *polarizzazione* (un allineamento del dipolo magnetico lungo la direzione del campo). Si generano diversi livelli di energia del nucleo nel campo magnetico dipendenti dal suo spin :

$$E(m_I) = -\gamma\hbar m_I H$$

La separazione tra 2 livelli energetici (entità della *polarizzazione*) dipende **dall'intensità del campo** magnetico:

$$\Delta E = \gamma\hbar H = h\nu \Rightarrow \nu = \frac{\gamma H}{2\pi} \quad \text{Hz}$$



La differente occupazione di 2 livelli energetici dipende dal fattore di Boltzmann:

$$\frac{n(+1/2)}{n(-1/2)} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) \approx 1 - \frac{\gamma\hbar H}{kT}$$

In un campo magnetico di 10000 gauss (=1 tesla) il rapporto tra le due occupazioni è solamente pari a 1.000007 \Rightarrow servono **campi molto intensi** per separare in modo apprezzabile i livelli energetici

3

Tecnica sperimentale

Campo magnetico fisso, molto intenso:

$$\vec{H} = H\hat{z}$$

Polarizzazione \Rightarrow separazione di stati con diverso orientamento di spin nucleare: differente energia

$$\Delta E$$

Campo magnetico **oscillante** perpendicolare a $\vec{H} = H\hat{z}$

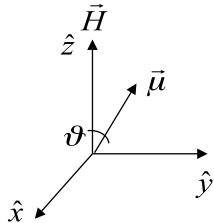
genera le transizioni tra stati a differente energia che producono il segnale misurato sperimentalmente. Ovviamente la **frequenza** di tale campo deve essere proporzionale a ΔE

Energia del campo magnetico oscillante: $h\nu = \Delta E$

4

Modello classico

$$\begin{cases} \frac{d\vec{I}}{dt} = \vec{\mu}_m \wedge \vec{H} \\ \vec{\mu}_m = \gamma \vec{I} \end{cases} \longrightarrow \frac{d\vec{\mu}_m}{dt} = \vec{\mu}_m \wedge \gamma \vec{H} = \gamma \begin{pmatrix} \hat{i} & \hat{j} & \hat{k} \\ \mu_x & \mu_y & \mu_z \\ 0 & 0 & H_z \end{pmatrix} = \gamma (\hat{i} \mu_y H - \hat{j} \mu_x H)$$



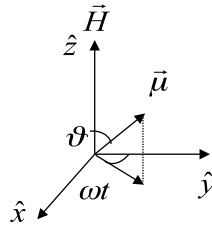
$$\begin{cases} \frac{d\mu_x}{dt} = \gamma H \mu_y \\ \frac{d\mu_y}{dt} = -\gamma H \mu_x \end{cases} \Rightarrow \frac{d^2 \mu_x}{dt^2} = -(\gamma H)^2 \mu_x \Rightarrow \mu_x = A \sin \omega t$$

$$\omega = \gamma H \Rightarrow \nu = \frac{\gamma H}{2\pi}$$

frequenza di Larmor

dipende del nucleo e del campo magnetico

$$\begin{cases} \mu_x = A \sin \omega t \\ \mu_y = A \cos \omega t \end{cases}$$



Rotazione di μ intorno ad H
con frequenza di Larmor

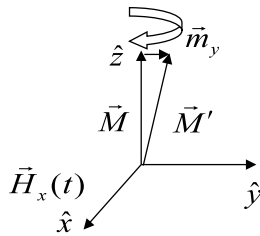
magnetizzazione del sistema: $\vec{M} = \mu \hat{z}$

5

Applichiamo ora un campo e. magnetico oscillante (con frequenza di Larmor = radio frequenza) e perpendicolare a z : $\vec{H}_x(t)$

$\vec{H}_x(t)$ genera M'

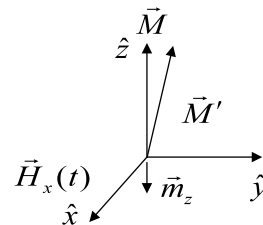
\vec{m}_y ruota con frequenza di Larmor γH per l'interazione con H



$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \wedge \gamma \vec{H}$$

M' ruota con frequenza di Larmor = segnale misurabile da un detector a bobina

$\vec{H}_x(t)$ deve ruotare alla frequenza di Larmor per produrre un valore costante di \vec{m}_z



$$\vec{m}_y \wedge \gamma \vec{H}_x \Rightarrow \vec{m}_z$$

Il sistema cambia la sua magnetizzazione $\rightarrow M \rightarrow M - m_z \rightarrow$ fa una transizione da un valore di spin nucleare ad un altro: **assorbe energia!**

Il campo magnetico perpendicolare H_x oscillante alla frequenza di Larmor genera delle transizioni

6

Equazioni di Bloch

2 differenti tempi di rilassamento:

$$M_z = \bar{M}_z(1 - \exp(-t/T_1))$$

$$M_{x,y} = \bar{M}_{x,y}(\exp(-t/T_2))$$

Quando spegnamo i campi magnetici abbiamo delle equazioni di rilassamento:

$$\frac{dM_z}{dt} = -(M_z - \bar{M}_z)/T_1$$

$$\frac{dM_{x,y}}{dt} = -M_{x,y}/T_2$$

T_1 longitudinal relaxation time
accoppiamento spin-ambiente:
spin-lattice

T_2 transverse relaxation time,
allargamento delle linee spettrali:

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi T_2} \approx 0.1 \text{ Hz}$$

Quando i campi magnetici sono presenti abbiamo delle equazioni che descrivono la variazione della magnetizzazione indotta dal campo magnetico:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \wedge \gamma\vec{H} + \text{rilassamento} \quad 7$$

campo magnetico perpendicolare a z che ruota con frequenza di Larmor:

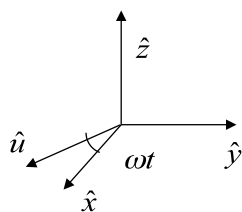
$$\begin{cases} H_x = H_{xy} \cos \omega t \\ H_y = -H_{xy} \sin \omega t \end{cases} \quad \begin{array}{c} \uparrow \\ \vec{H}_{xy}(t) \\ \swarrow \hat{x} \quad \searrow \hat{y} \end{array} \quad \frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \wedge \gamma\vec{H} + \text{rilassamento}$$

$$\begin{aligned} \frac{d\vec{M}}{dt} &= \gamma \begin{pmatrix} \hat{i} & \hat{j} & \hat{k} \\ M_x & M_y & M_z \\ H_x & H_y & H_z \end{pmatrix} + \text{rilassamento} = \\ &= \gamma \hat{i} (M_y H_z - M_z H_y) + \dots = \hat{i} \left[\gamma M_y H_z + \gamma M_z H_{xy} \sin \omega t - \frac{M_x}{T_2} \right] + \dots \end{aligned}$$

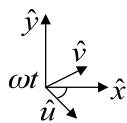
$$\begin{cases} \frac{dM_x}{dt} = \left[\gamma M_y H_z + \gamma M_z H_{xy} \sin \omega t - \frac{M_x}{T_2} \right] \\ \frac{dM_y}{dt} = \left[-\gamma M_x H_z + \gamma M_z H_{xy} \cos \omega t - \frac{M_y}{T_2} \right] \\ \frac{dM_z}{dt} = \left[-\gamma M_x H_{xy} \sin \omega t - \gamma M_y H_{xy} \cos \omega t - \frac{M_z - \bar{M}_z}{T_1} \right] \end{cases} \quad \text{Equazioni di Bloch}$$

Consideriamo un sistema di riferimento ruotante

$$\vec{H}_{xy} = H_{xy} \hat{u}$$



$$\vec{M} = \vec{M}_{xy} + \vec{M}_z = \hat{i}M_x + \hat{j}M_y + \hat{k}M_z = \hat{u}u + \hat{v}v + \hat{k}M_z$$



$$\begin{cases} \hat{u} = \hat{i} \cos \omega t - \hat{j} \sin \omega t \\ \hat{v} = \hat{i} \sin \omega t + \hat{j} \cos \omega t \end{cases} \quad \begin{cases} M_x = u \cos \omega t + v \sin \omega t \\ M_y = -u \sin \omega t + v \cos \omega t \end{cases}$$

sist. di rif. ruotante

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \wedge \gamma \vec{H} + \text{rilassamento} \quad \frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma \begin{pmatrix} \hat{u} & \hat{v} & \hat{k} \\ u & v & M_z \\ H_{xy} & 0 & H_z \end{pmatrix} + \text{rilassamento} =$$

$$\frac{d\hat{u}}{dt} + \frac{d\hat{v}}{dt} + \frac{d\vec{M}_z}{dt} = \frac{du}{dt} \hat{u} + \frac{d\hat{u}}{dt} u + \dots = \frac{du}{dt} \hat{u} - \omega u \hat{v} + \frac{dv}{dt} \hat{v} + v \omega \hat{u} + \dots =$$

$$= \hat{u}v\gamma H_z + \hat{v}\gamma(M_z H_{xy} - u H_z) - \hat{k}v\gamma H_{xy} + \text{rilassamento}$$

9

Equazioni di Bloch nel sistema di riferimento rotante

$$\begin{cases} \frac{du}{dt} = \left[\gamma H_z v - \omega v - \frac{u}{T_2} \right] = \left[(\omega_0 - \omega) v - \frac{u}{T_2} \right] \\ \frac{dv}{dt} = \left[-\gamma H_z u + \gamma M_z H_{xy} + \omega u - \frac{v}{T_2} \right] = \left[(\omega - \omega_0) u + \gamma M_z H_{xy} - \frac{v}{T_2} \right] \\ \frac{dM_z}{dt} = \left[\gamma v H_{xy} - \frac{M_z - \bar{M}_z}{T_1} \right] \end{cases}$$

se $\omega \approx \omega_0 = \gamma H_z$ stato stazionario = magnetizzazione costante: $\Rightarrow \frac{du}{dt} = \frac{dv}{dt} = \frac{dM_z}{dt} = 0$

$$\vec{H}_{xy} = H_{xy} \hat{u}$$

quando siamo nella condizione di risonanza: $\omega = \omega_0$ e $u=0$

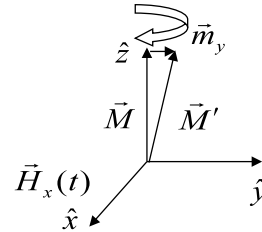
10

Schema sperimentale

1. Si applica un campo magnetico H_z
2. Si applica un impulso perpendicolare ad H_z di durata sufficiente a ruotare \vec{M} di 90° ($\vec{M} \rightarrow \vec{M}_{xy}$)

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M} \wedge \gamma \vec{H}$$

$$\vec{M} \rightarrow \vec{M}' = \vec{M}_{xy}$$



3. L'impulso si spegne e si misura la magnetizzazione che, ruotando con freq. di Larmor, ritorna a $\vec{M} \rightarrow$ **si misura la freq. di Larmor**



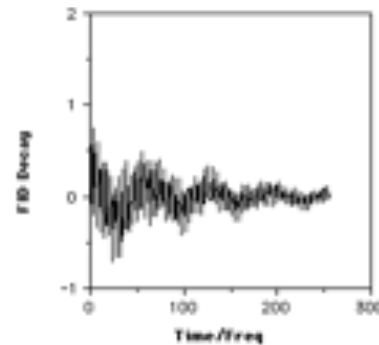
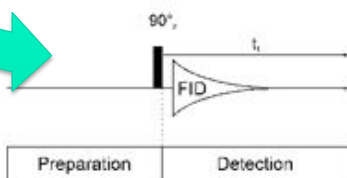
si misurano tutte le freq. di Larmor nel sistema $\omega = \gamma H$

11

Spettri monodimensionali

Viene prodotto un impulso di frequenza ν (per esempio lungo x) con durata temporale pari a t_0 . Si può dimostrare che tale impulso contiene tutte le frequenze comprese nell'intervallo $\nu \pm 1/t_0$.

Lo spettro che si misura (per esempio lungo la dir. y) è dato dal decadimento esponenziale di tutti gli stati eccitati dall'impulso (FID= Free Induction Decay).



Spettro di assorbimento

$$g(\omega) = \text{const.} \int_0^{\infty} dt g(t) \cos(\omega t)$$

12

Segnale NMR

Il segnale è proporzionale a $\nu \omega_0$

a sua volta ν è proporzionale alla magnetizzazione \bar{M}_z

se consideriamo un nucleo con spin $\frac{1}{2}$ si ha: $\bar{M}_z = \mu(N_{1/2} - N_{-1/2})$

considerando la distribuzione di Boltzmann: $\bar{M}_z = \mu N \left(\exp\left(\frac{\mu H}{kT}\right) - \exp\left(\frac{-\mu H}{kT}\right) \right) \approx \mu N \left(2 \frac{\mu H}{kT} \right)$

$$SEGNALE \propto \mu^2 N \left(\frac{H^2}{kT} \right) \left(\frac{\gamma^2 H_{xy} T_2}{1 + T_2^2 (\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_{xy}^2 T_1 T_2} \right)$$

$$SEGNALE \propto \mu^2 N \left(\frac{H^2}{kT} \right)$$

13

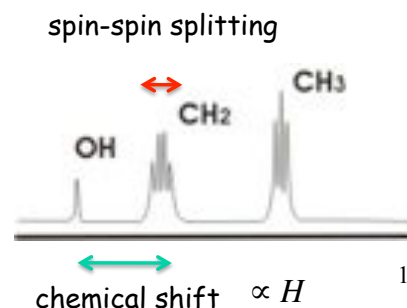
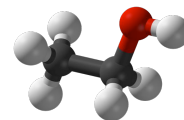
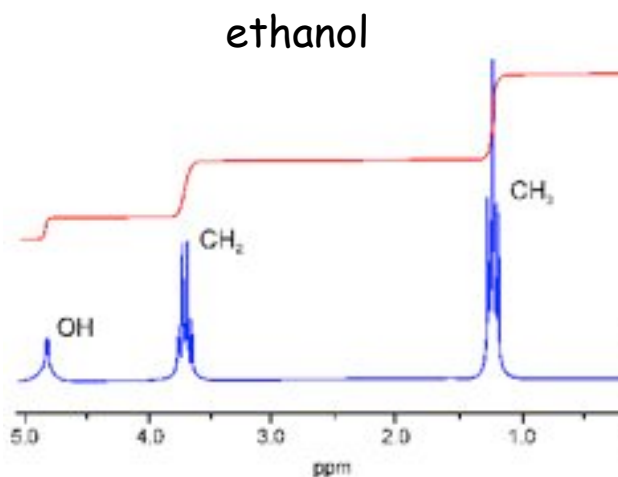
Caratteristiche degli spettri NMR

si misurano tutte le freq. di Larmor nel sistema $\omega = \gamma H$

Chemical shifts:

Il campo magnetico "sentito" dalle particelle non è quello applicato ma dipende dall'intorno chimico delle particelle stesse:

$$H' = H - \sigma H$$



14

$$H' = H(1 - \sigma) \leq H \quad \text{effetto di schermo degli elettroni}$$

$$\nu = \frac{\gamma H(1 - \sigma)}{2\pi} \quad \text{piu alta e' la schermatura piu \nu e' piccolo}$$

Si usa descrivere gli spettri in funzione del parametro di **chemical shift** δ :

$$\delta = (\nu - \nu_{ref}) / \nu_0$$

composto di riferimento
apparato sperimentale utilizzato

δ cresce (diminuisce lo schermo, aumenta la frequenza di Larmor) quando i protoni sono legati a gruppi che tendono a catturare gli elettroni: esempio: per gli idrogeni del CH₃:

$$\delta(\text{CH}_3\text{-CH}_3)=1, \delta(\text{CH}_3\text{-OH})=4$$

15

Se $H=50$ kgauss (=5 tesla)

$$\nu_{ref} \approx 220 \text{ MHz} \quad \Delta\nu \approx 0 \div 2500 \text{ Hz} \quad \delta \approx 0 \div 10 \text{ ppm}$$

parti per milione

Il parametro che descrive lo shift chimico dipende da 3 differenti fattori:

$$\sigma = \sigma_1 + \sigma_2 + \sigma_3 \quad H' = H - \sigma H$$

σ_1 è maggiore di 0 e dipende dalla **polarizzazione diamagnetica** della corrente di elettroni che circondano il nucleo.

σ_2 è determinato da **effetti paramagnetici** degli atomi vicini con un contributo minore di **effetti diamagnetici**, può essere positivo o negativo.

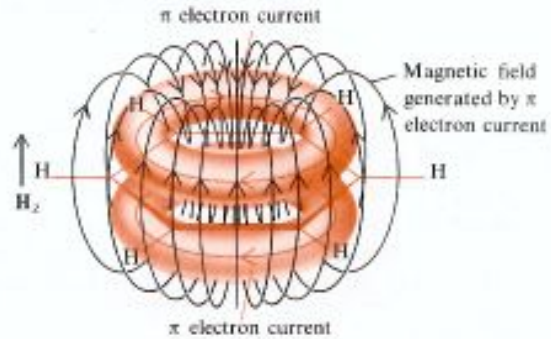
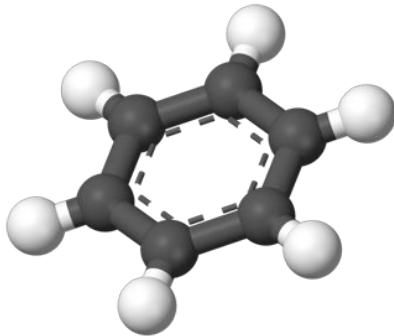
σ_3 è determinato dalle correnti interatomiche e può essere maggiore o minore di 0.

16

Esempio:

Il benzene ha un σ negativo generato dalle correnti degli elettroni π che caratterizzano la molecola (downfield shift).

$$\text{campo sui protoni} \quad H' = H - \sigma H \geq H$$

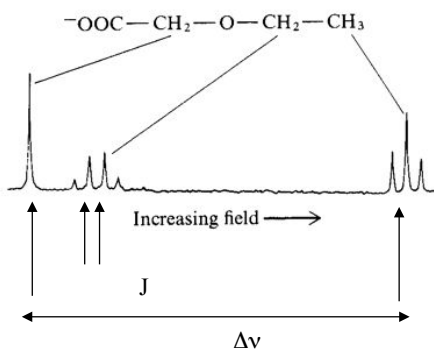


il legame idrogeno D—H - A provoca una diminuzione dello schermo diamagnetico indotto su H (σ negativo, downfield shift).

17

Effetti dell'interazione spin-spin

Lo stato di spin nucleare degli idrogeni vicini induce uno splitting delle righe nello spettro NMR:

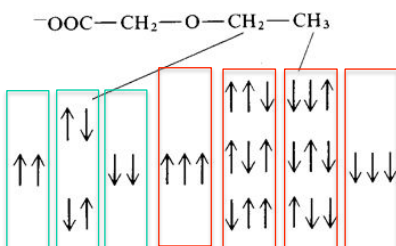


Il picco NMR dei 2 idrogeni di CH_2 (metilene) sarà splittato in 4 picchi a causa della presenza dei 3 idrogeni di CH_3 (metile)

Il rapporto di altezza dei picchi splittati dipende dalla probabilità dei vari stati di spin degli atomi vicini.

Il numero dei multipletti e la loro relativa intensità (= occupazione relativa degli stati di spin) può essere previsto facilmente nel caso in cui

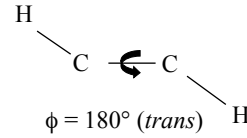
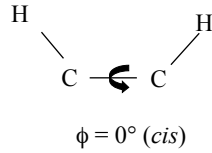
$$J \leq 0.1\Delta\nu$$



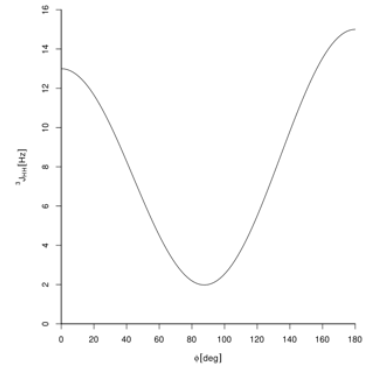
18

Costante di accoppiamento spin-spin: J

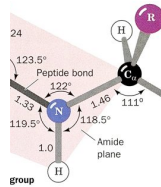
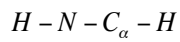
La costante di accoppiamento spin-spin (accoppiamento scalare) dipende dall'angolo diedro:



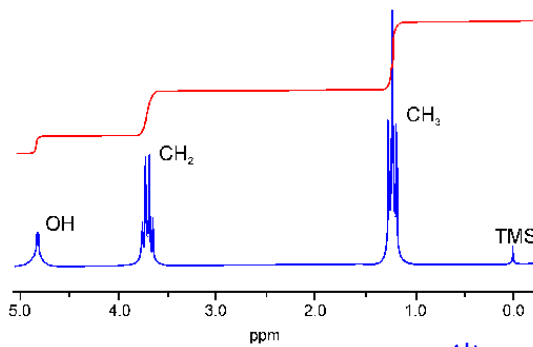
$$J(\phi) = A \cos^2 \phi + B \cos \phi + C$$



nelle proteine legame peptidico: eliche 120° , beta 180°



19

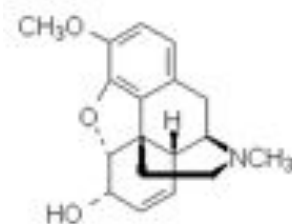
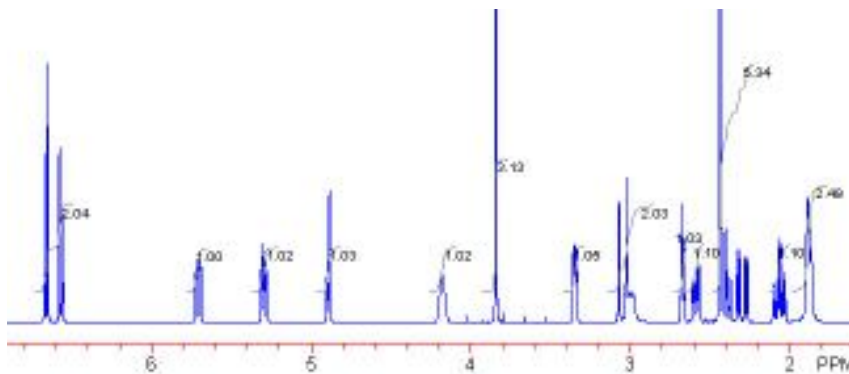


TMS= composto di riferimento=tetrametilsilano

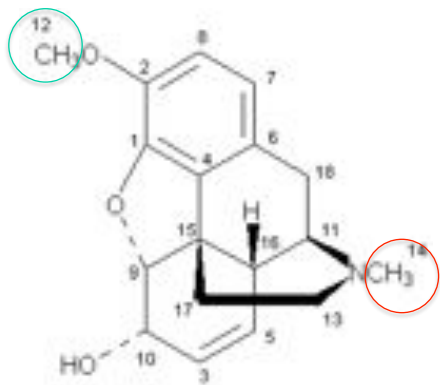
Splitting delle linee in multipletti

Altezza dei picchi proporzionale al numero di protoni

CODEINA, spettro 1H (21 H)

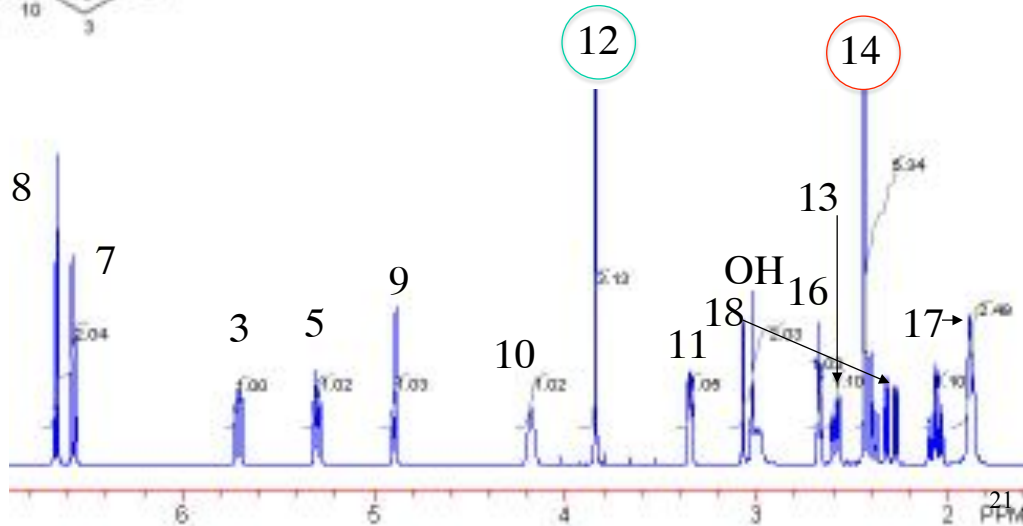


20



CODEINA, spettro ^1H (21 H)

ossigeno più elettronegativo dell'azoto= minore schermatura del CH_3



NOE: Nuclear Overhauser Enhancement

Sistema di 2 nuclei con γ differenti.

1. Una radiofrequenza saturante viene prodotta per polarizzare il nucleo con γ maggiore (S).
2. Rilassamento per cui la polarizzazione passa all'altro nucleo (I)

segnale con NOE segnale senza NOE

$$NOE = (I - I_0) / I_0$$

NOE: modulazione dell'accoppiamento dipolo-dipolo dei 2 spin nucleari da parte del moto browniano

$$NOE \propto f(r_{IS})F(t_c)$$

distanza tra i nuclei tempo di correlazione rotazionale

$$NOE \propto f(r_{IS})F(t_c)$$

dipolo-dipolo

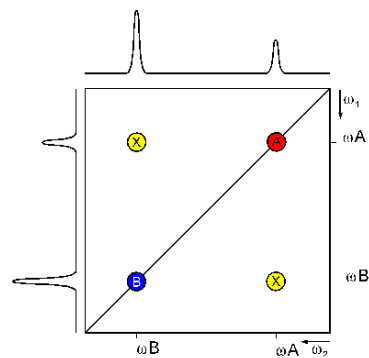
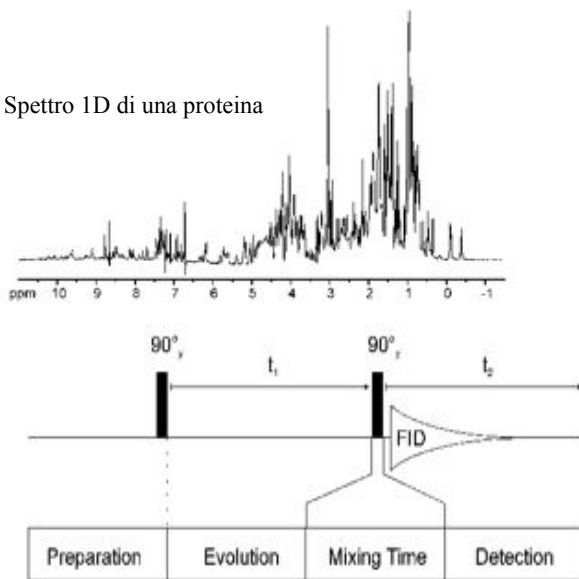
$$\frac{1}{r^3} \times \frac{1}{r^3} = \frac{1}{r^6}$$

distanze < 5 Å

23

Spettri 2D, struttura di proteine

Spettro 1D di una proteina

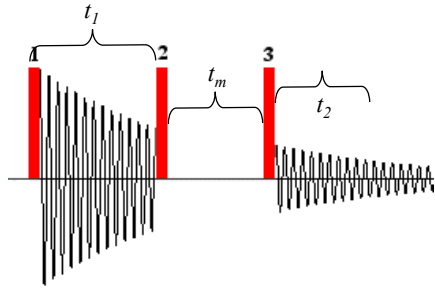


Ci sono 3 tipi di trasferimento di magnetizzazione che vengono utilizzati per lo studio delle proteine fino a 10 kD: 2D COSY, 2D TOCSY, 2D NOESY

Trasferimento di magnetizzazione: la magnetizzazione viene trasferita dal primo al secondo nucleo. Il trasferimento avviene per accoppiamento scalare o per interazione dipolare (Nuclear Overhauser Effect, NOE)

24

Spettri 2D: trasferimento di magnetizzazione



Prima del primo impulso il sistema è in equilibrio:

$$\vec{M} = (0 \quad 0 \quad M_{A0})$$

1. Il primo impulso lungo y produce una componente di magnetizzazione lungo x

Tra il primo e il secondo impulso la magnetizzazione perpendicolare a z ruota nel piano e decade con un periodo caratteristico T_2 . Tale stato è detto *evoluzione*

Prima del secondo impulso la magnetizzazione sul piano sarà:

$$\vec{M} = (M_{A0} \exp(-t_1/T_{2A}) \cos \Omega_A t_1 \quad M_{A0} \exp(-t_1/T_{2A}) \sin \Omega_A t_1 \quad 0)$$

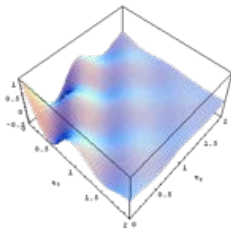
2. Il secondo impulso lungo y agisce sulla componente di magnetizzazione lungo x generando una magnetizzazione lungo z che decade con un periodo caratteristico T_1 .

$$M_x(t) = M_{A0} \exp(-t_1/T_{2A}) \cos \Omega_A t_1 \exp(-t_m/T_{1A})$$

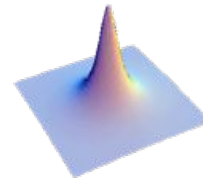
3. Il terzo impulso lungo y produce ancora una componente di magnetizzazione perpendicolare a z :

$$M_x^+(t) = M_{A0} \exp(-t_1/T_{2A}) \cos \Omega_A t_1 \exp(-t_m/T_{1A}) \exp[i t_2 (\Omega_A - 1/T_{2A})] \quad t_2 = t - t_m - t_1$$

25

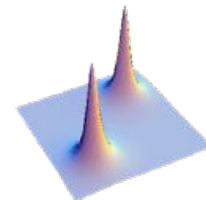


$f(t_1, t_2)$

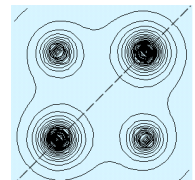
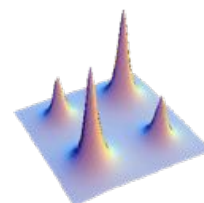


$g(\omega_1, \omega_2)$

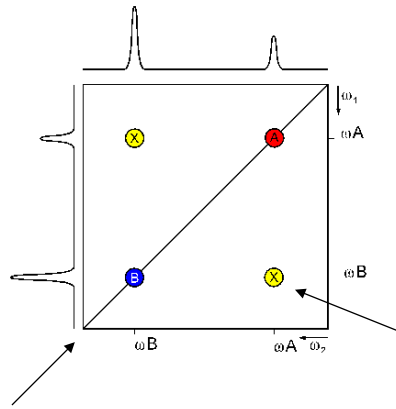
Sistema con due atomi indipendenti: 2 picchi lungo la diagonale: ω_1 e ω_2



Sistema con due atomi interagenti: 2 picchi lungo la diagonale: ω_1 e ω_2 più due picchi dovuti al trasferimento di magnetizzazione.

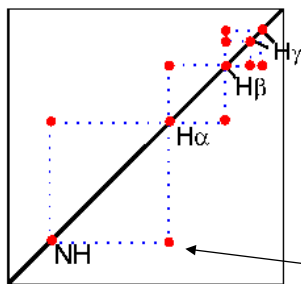


26

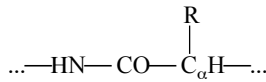


Segnale di interazione tra i 2 nuclei: fonte primaria di dati nell'esperimento 2D

Sulla diagonale: dati di magnetizzazione che non sono stati cambiati dal mixing = conservano la stessa frequenza in entrambe le dimensioni



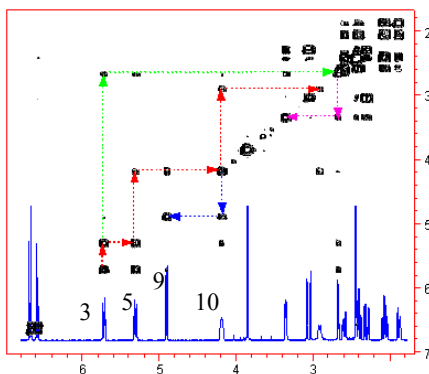
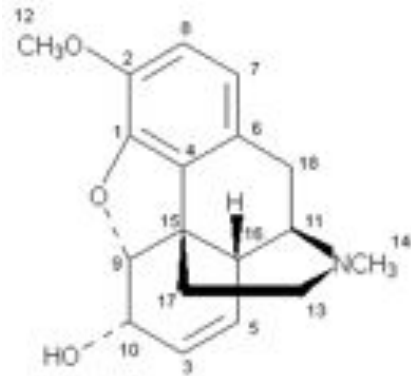
2D COSY (Correlation spectroscopy)
accoppiamento scalare, sensibile fino a 3J
(protoni a 3 legami di distanza)



Accoppiamento NH-H α importante per risalire all'angolo del legame peptidico ϕ

27

2D COSY: accoppiamento tra atomi vicini



H-5 \rightarrow H-3 \rightarrow H-10 \rightarrow OH

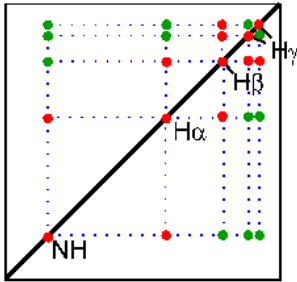
H-10 \rightarrow H-9

H-3 \rightarrow H-16

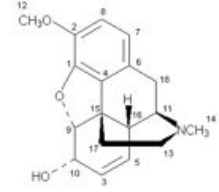
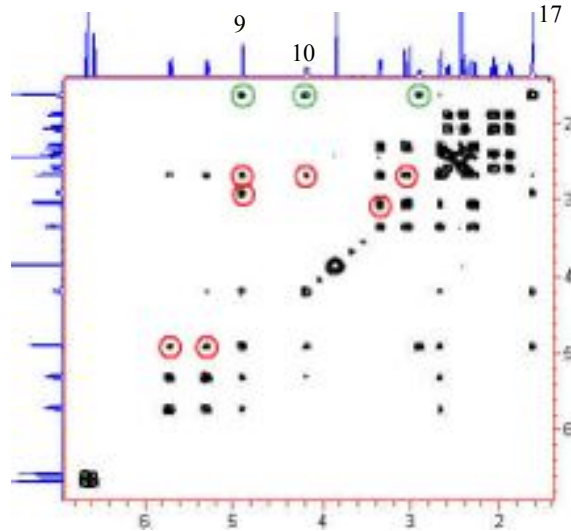
H-16 \rightarrow H-11

28

2D TOCSY (Total Correlation Spectroscopy): la magnetizzazione è maggiormente dispersa grazie a successivi accoppiamenti scalari)



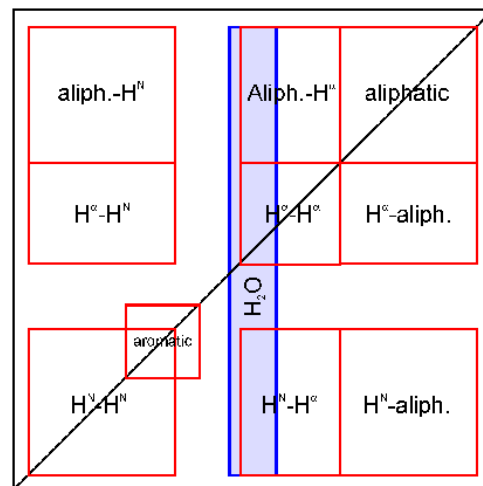
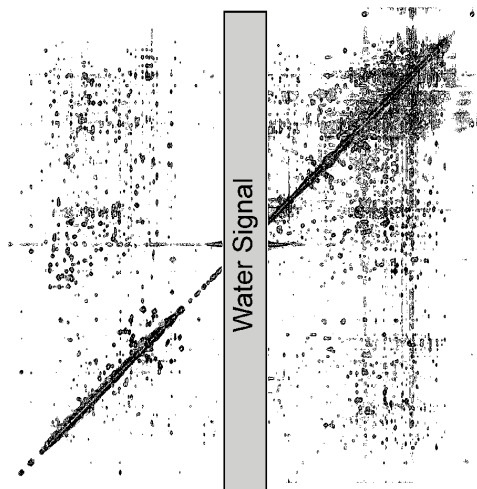
Con questa tecnica è possibile individuare segnali caratteristici utili ad identificare i differenti amminoacidi



29

2D NOESY (Usa l'interazione dipolare degli spin: l'effetto Overhauser nucleare: NOE)

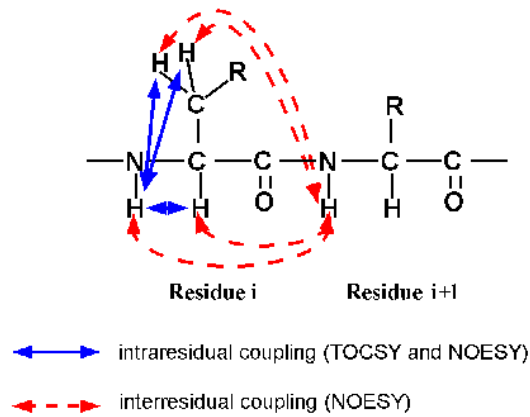
L'intensità dei picchi è proporzionale a $1/r^6$ (dist. inferiori a 5 Å)



30

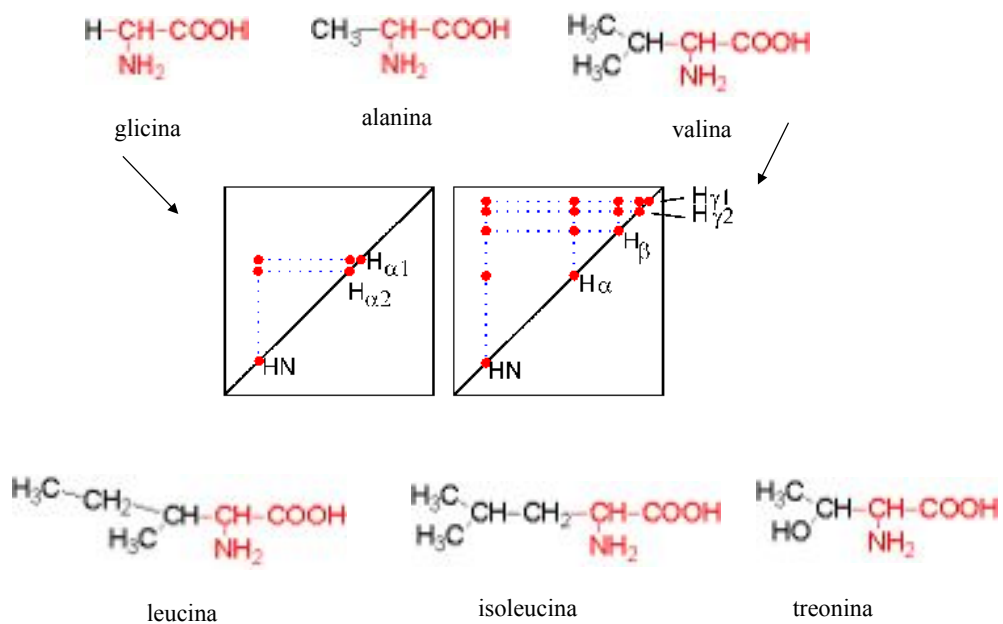
Analisi di uno spettro NMR, NOESY

Assegnazione delle risonanze: ciascun picco di risonanza è assegnato ad un particolare protone.



31

Identificazione dei 5 aminoacidi con un pattern specifico di cross signals (**gruppi metile -CH₃**):

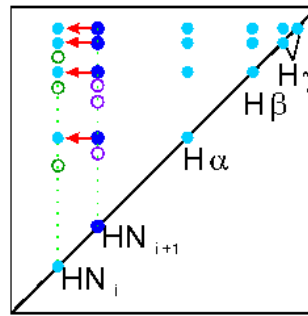
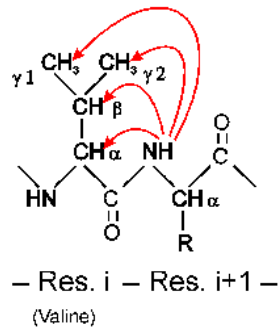


32

Contatti sequenziali tra gli amminoacidi già identificati

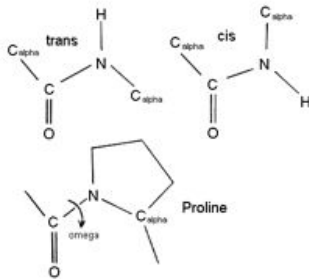
Analisi dello spettro 2D NOESY

Dipeptide Fragment



I dipeptidi identificati si prolungano in oligopeptidi.

La connettività si interrompe quando si incontrano delle proline. Infatti esse non hanno l'idrogeno amminico:



Comunque, se la prolina (i) è in configurazione *trans*, si può apprezzare un cross signal tra $H_N(i-1)-H_d(i)$ e $H_a(i-1)-H_d(i)$.

33

Analisi delle distanze

Le distanze tra atomi vengono ricavate dall'intensità dei picchi dopo la calibrazione per segnali *NOE* che vengono da distanze note

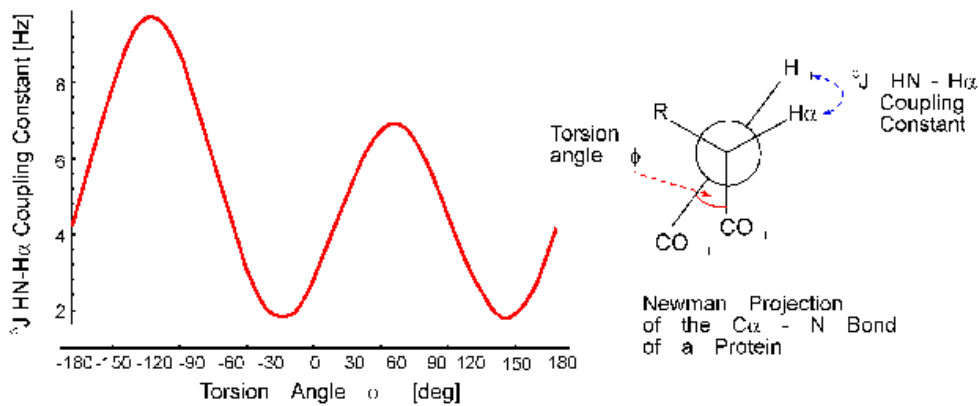
I picchi da assegnare superano facilmente i 1000 per proteine di 120 a.a.

NOE class	distance [Å]	upper bound [Å]
very strong	2.3	2.5
strong	2.8	3.1
medium	3.1	3.4
weak	3.5	3.9
very weak	4.2	5.0

Si distinguono 2 regioni. La prima tra cross picchi di aa. distanti non più di 5 aa. (range medio) utili a ricavare la posizione della catena principale e dunque le strutture secondarie.

34

Strutture secondarie: equazione di Karplus



$$J(\phi) = A * \cos^2(\phi - 60) - B * \cos(\phi - 60) + C$$

35

Calcolo della struttura terziaria

Si determinano sperimentalmente distanze e angoli di torsione

Si usano i vincoli dati dalle distanze di legame note

Si calcola una struttura 3D casuale sulla base del dato sperimentale e dei vincoli

Si determina una funzione di *energia potenziale generalizzata*, che tenga conto del dato sperimentale e delle interazioni interne nella proteina

Si utilizza una procedura di *simulated annealing* per minimizzare l'energia potenziale del sistema

$$V = E_{\text{empirical}} + E_{\text{effective}}$$

$$E_{\text{effective}} = E_{\text{NOE}} + E_{\text{torsion}}$$

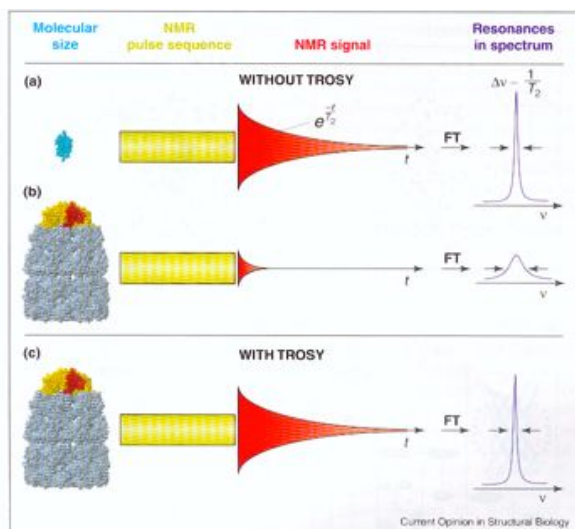
$$E_{\text{empirical}} = E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dihedral}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{elect}}$$

36

Lo stato dell'arte: spettroscopia TROSY (Transverse Relaxation-Optimised Spectroscopy)

L'NMR ha dei grossi problemi nell'analisi di proteine con massa maggiore di 25 kDa:

- Il grande numero di risonanze causa sovrapposizione del segnale. Problema risolvibile con parziale deuteroazione
- Il segnale NMR per molecole più grandi tende a decadere più velocemente: allargamento dei picchi. Problema risolvibile con TROSY



37

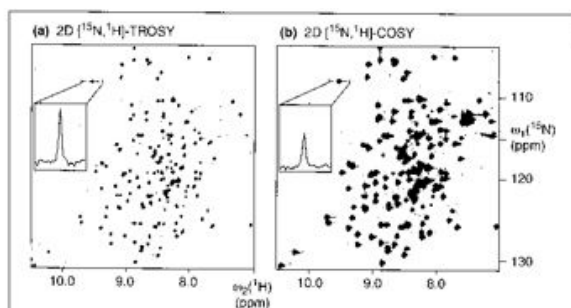
Con la tecnica TROSY il rilassamento effettivo può essere ridotto sia durante la fase di preparazione che durante la fase di acquisizione **si è arrivati alla struttura di proteine di 900 kDa.**

L'interferenza tra *due differenti meccanismi di rilassamento* può essere additiva o può determinare una effettiva sottrazione

Sostituendo nella catena polipeptidica ^{15}N (massa dispari e carica dispari, spin semintero) si ha un accoppiamento scalare ^1H - ^{15}N che determina la presenza di 2 picchi per ogni idrogeno.

Tali picchi sono legati a tempi di decadimento differenti (hanno larghezza diversa) e vengono riuniti in uno negli esperimenti classici.

La tecnica TROSY seleziona il picco più stretto (si perde così la metà del segnale). La tecnica funziona meglio con proteine aventi massa maggiore di 20 kDa



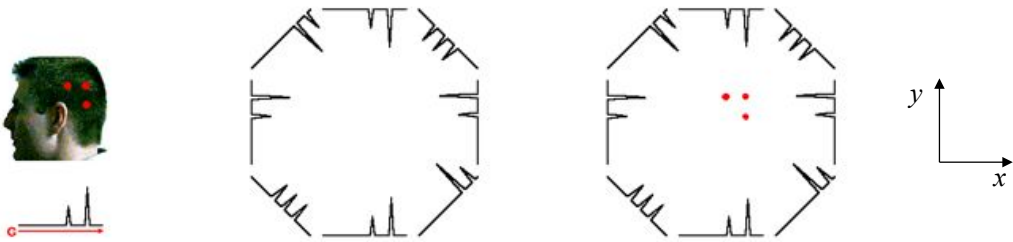
38

MRI: magnetic resonance imaging

La tecnica si basa sulla *variazione del campo magnetico in funzione della posizione* nello spazio

$$v = \gamma(B_0 + Gx) = v_0 + \gamma Gx \quad \Rightarrow \quad x = \frac{v - v_0}{\gamma G}$$

Volendo un'immagine sul piano xy si applica un gradiente di campo magnetico lungo la direzione y e si registrano più spettri man mano che il vettore y viene ruotato.



Una volta soppresso il background si può visualizzare un'immagine