

Topic 1-2 ed experimental : Introduzione ai metodi di determinazione strutturale di proteine

Esperimenti 3D per l'assegnamento di proteine marcate

Strategie per l'assegnamento di proteine marcate: strategie basate su NOE e su correlazioni J. Principi base delle sequenze NMR eteronucleari: esperimenti di doppia risonanza (NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC) e tripla risonanza.

Esperimenti per l'assegnamento del backbone: HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CO, CBCANH, CBCA(CO)NH.

Elementi di base delle sequenze di impulsi:

Efficienza di trasferimento INEPT;

“Out and back” rispetto ad esperimenti di trasferimento classici;

Acquisizione “constant time” rispetto a “real time”;

Sensibilità degli esperimenti di tripla risonanza;

HNCA come prototipo di esperimento di tripla risonanza

Come aumentare le prestazioni degli esperimenti di base: sensitivity enhancements; water flip-back; deuteroazione; TROSY; CRIPT.

Esperimenti per l'assegnamento di catene laterali: (H)CC(CO)NH-TOCSY; H(CC)(CO)NH-TOCSY; HCCH-TOCSY

Lettura consigliata

Sattler, M., Schleucher, J., Griesinger, C. Prog. NMR Spectroscopy (1999), 34, 93-158

Residual dipolar couplings:

Teoria. Deduzione dell'espressione per calcolare le RDC.

Mezzi di allineamento: bicelle, fago, gel, cristalli liquidi.

Esperimenti per la misura delle RDC: IPAP, J-modulation, esperimenti 3D.

Determinazione strutturale di proteine:

I constraints NMR: chemical shifts (TALOS), costanti di accoppiamento, NOEs, RDC, ponti idrogeno. Valore di ognuno di questi dati.

Proteine beta e alfa, differenze.

Proteine multimeriche.

Analisi delle strutture durante il calcolo.

Validazione delle RDC.

Determinazione dell'allineamento durante il calcolo.

Protocolli per refinement a partire da modelli.

Proteine paramagnetiche, determinazione strutturale e studio di complessi

Applicazioni pratiche

Metodologie di assegnazione automatica con CYANA con sistemi di diverso peso molecolare e partendo da diversi gradi di assegnamento

Protocollo per il raffinamento strutturale di proteine tramite MD in solvente esplicito utilizzando il package AMBER

Programmi recenti per la validazione di strutture

Procedure totalmente automatiche: UNIO

Automazione ed e-NMR

Il calcolo delle strutture proteiche di solito richiede un utente esperto nell'analisi dei dati NMR e nell'uso di una considerevole varietà di strumenti software use oltre a rilevanti risorse computazionali. Tutte queste capacità e risorse si sono costruite all'interno dei singoli laboratory y

nel corso degli anni, spesso ricorrendo a soluzioni personalizzate che non sono state validate completamente e che spesso non possono essere riprodotte da altri ricercatori in altri laboratori. Ne segue che tutti questi aspetti spesso creano una barriera significativa all'entrata di nuovi ricercatori nel campo del bio-NMR. Inoltre l'aggiornamento continuo degli strumenti software così come delle strategie computazionali e dei vari protocolli adottati richiede uno sforzo considerevole. E' quindi ragionevole ed importante fornire all'intera comunità NMR un unico punto di riferimento dove, tramite un portale web, ogni utente può accedere ed utilizzare gli strumenti software più aggiornati e protocolli di lavoro ampiamente validati. Una potenza di calcolo adeguata per effettuare calcoli con questi strumenti è disponibile grazie all'adozione di una infrastruttura computazionale su grid, e-NMR (www.e-nmr.eu). In questo modo ricercatori già operanti nel campo o desiderosi di utilizzare bio-NMR per lo studio strutturale di sistemi proteici non devono affrontare il peso dell'installazione, validazione e aggiornamento dei protocolli di calcolo e, contemporaneamente, possono evitare i costi delle risorse di calcolo necessarie.

In quest ambito verranno descritti i seguenti aspetti:

- che cos'è il calcolo su grid;
- che cos'è la piattaforma e-NMR;
- I web servers ospitati sulla piattaforma e-NMR (MARS; TALOS+; Xplor-NIH; AMBER; HADDOCK);
- come ottenere l'accesso alla piattaforma e-NMR;
- l'iniziativa e-NMR per valutare le performances degli strumenti di determinazione strutturale automatica: CASD-NMR

Topic 3 Produzione di proteine marcate

Dal gene ai campioni proteici per NMR

Introduzione ai metodi di clonaggio

Espressione di protein selettivamente ed uniformemente marcate

Modificazioni post translazionali (possibilità di espressione in *Pichia pastoris*)

Introduzione di probe utili per l'NMR

Topic 4 Misure di rilassamento ed informazioni dinamiche

- esperimenti-tipo di rilassamento NMR e fenomenologia dei dati.
- la "reduced spectral density mapping" come strumento fenomenologico di analisi dei dati di rilassamento..
- il metodo di Lipari Szabo e l'estrapolazione di parametri dinamici da dati di rilassamento.
- andare oltre oltre il ω_c : le misure di relaxation dispersion.
- andare oltre il ω_c : gli RDCs e il loro emergente ruolo nello studio della dinamica e della flessibilità delle proteine.

Types of relaxation

- Spin-lattice relaxation
- Transverse relaxation

Relaxation mechanisms:

- Intramolecular dipolar interaction
- Chemical shift anisotropy
- Interference effects

and possibly:

Beyond the T1 and T2 limits ...

- NMR relaxation experiments and phenomenological data analysis

- "reduced spectral density mapping" as phenomenological tool for the analysis of relaxation data
- The Lipari Szabo approach and the derivation of dynamic parameters from relaxation data
- beyond τ_c : relaxation dispersion measurements.
- beyond τ_c : RDCs and their emerging role in the study of dynamics and flexibility of proteins

Recommended reading:

J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer, III, M. Rance, and N.J. Skelton, 'Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice', Elsevier, 2007, second edition

Topic 5 Studio di interazioni

Interazione proteina-protein/ proteina-DNA

Interazioni proteina-piccola molecola

Misure di diffusione:DOSY

Misure delle affinità di legame, approcci di drug discovery

Topic 6 ^{13}C detection

Topic 7 NMR allo stato solido e proteine di membrana