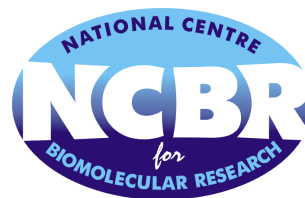




**Masarykova univerzita**  
Přírodovědecká fakulta  
Ústav chemie a NCBR



**Zadání 4. série**

**2. ročník (2011/2012)**

# Úvodník

```

-----
/Milí Víbušníci, \
/ egňcběžubwxqeok \
-----/m, bcbucmžbuwblg. bUk \
/b bxct, bmugškbctqtqxqxcnkBkčwJbwab \
/nqok, brscxđrqrqčogbd' gmcxcnkboğlcmqw \
-----/bmwnkt' csow. b mncñwbxct. bAceožmqogd' okm \
-----
/bogčweg, bcngbocbwugjwb wtuncbcngtrqpbwnqicb .bČgiğñbñ \
/kownžjbtgskkbltugbocčžxcnk b cmnceokb ocnqtuk, brqtuwrogblg \
/bsq t' kšqxcnkbcbožokblgršgebcñkd' usucbtsgkgbwnqi, brqñžtn \
-----/ožbxsjqnbržscñkež. bTocaugbtgrsqubxžšgt' kubdqboğlxxkđgbwmqmw, b \
-----
/řcugbrqtngcokbñqaoqtubxžngt' kubtxgbtmqsg. bXbngvgbd' gmcbužboğlngt' kb bxctb cx \
/gsgd' ogbtqwtušegok, bmeğbtgrqumcugbocx clgñ, btbcwuqžbwnqi bcboćkqbqschcok cuqsz \
/, bcbincxogbčwegub cbxžocnqagogbwtknbqeřgogok. břqmwebčžbtgbcñogrqecšknqbršgnqw \
-----/tmcubugouqbugzu, bogčwfugb buqi qbtñwuok, baceocbewngakucbkohqšćdgbuwobogok, brqw gbršk \
-----
/legugbqboğlcmžbčqekmb brqtngcokbwnqižb .buğt' kňgtgbocbtgumcokbtbxcñkbcbršglgñgbiqeogb cswbrškbsğ \
/t' gokbwnqi. b0cb cxgsbčžjbtgbjugnboğñwxkub cbrškrceogbršgmngřzb: -)
/Za všechny členy týmu
-----

```

Petr Stadlbauer

Nápověda:

```

-----
| abcčdđ' eřghchi jklmňopqrřššt' uvwxyzž |
-----

```

## A3 Studium enzymatické reakce metodami výpočetní chemie

Autoři: Petr Kulhánek a Zora Střelcová (e-mail: kulhanek@chemi.muni.cz)

15 bodů

Cílem předkládaného iKurzu je seznámit zájemce s metodami výpočetní chemie, kterými lze studovat chemické reakce probíhající v živých organismech. Hlavním předmětem naší studie je enzym chorismátmutasa, který se podílí na biosyntéze aromatických aminokyselin.

V první části kurzu jsme charakterizovali dostupné struktury enzymu. V druhé části jsme studovali reakční mechanismus přeměny chorismátu na prefenát ve vakuu. Ačkoliv je prostředí vakua velmi vzdálené fyziologickým podmínkám živých buněk, nalezené struktury reaktantu, tranzitního stavu a produktu reakce nám dále poslouží k zpřesňování použitých modelů. V dnešní úloze se zaměříme na jedno takové zpřesnění, kterým bude popis přeměny ve vodném prostředí při různém pH. Druhá část úlohy pak bude o hledání komplexu mezi chorismátem a enzymem pomocí molekulárního dockingu.

K řešení budete mít podrobnou nápovědu. Samotné výpočty budete provádět převážně na výpočetním klastru WOLF. Pokud na klastru ještě nemáte zřízený účet, postupujte podle informací uvedených v nápovědě. Rádi bych vás upozornili na to, že řešení úlohy bude i tentokrát technicky a časově náročnější (více než předchozí úloha), proto si na něj vyhrad'te dostatek času. V případě, že při řešení narazíte na jakýkoliv technický problém, neváhejte nás kontaktovat, rádi vám poradíme.

**Úkol 1:** Chorismát obsahuje dvě karboxylové skupiny, které se mohou vyskytovat v neutrální a ionizované formě. Určete, v kolika formách se může celkem chorismát vyskytovat. Pro každou formu pak odhadněte pH, při kterém bude daný stav nejvíce pravděpodobný.

**Úkol 2:** Pro struktury chorismátu, tranzitního stavu přeměny a prefenátu, které jste našli pomocí semiempirické kvantově-chemické metody PM3 ve vakuu (úkol A2), spočítejte solvatační energii ve vodě. K výpočtům použijte implicitní model rozpouštědla (vody). Do výsledku uveďte vypočtenou solvatační energii jednotlivých struktur, dále pak reakční a aktivační energii přeměny ve vodě. Popište, jakým způsobem voda ovlivňuje průběh reakce.

**Úkol 3:** Stejná data (solvatační, reakční a aktivační energie) vypočtete pro ostatní ionizační formy chorismátu. Při jakém pH bude přeměna chorismátu na prefenát ve vodě probíhat nejrychleji?

**Úkol 4:** Proveďte analýzu struktury enzymu chorismátmutasy (PDB kód 2FP2). Kde se nachází aktivní místo enzymu (vyjmenujte důležité aminokyseliny tvořící aktivní místo enzymu)?

**Úkol 5:** Pomocí programu Autodock Vina najděte strukturu komplexu mezi chorismátmutasou a 8-hydroxy-2-oxabicyclo[3.3.1]non-6-en-3,5-dikarboxylátem, což je analog tranzitního stavu (transition structure analogue – TSA) přeměny. Kriticky porovnejte nalezenou strukturu komplexu se strukturou experimentální (PDB kód 2FP2).

**Úkol 6:** Pomocí programu Autodock Vina nalezněte pět nejlepších struktur komplexu mezi chorismátmutasou a chorismátem.

Energie uvádějte v kcal/mol, souřadnice atomů v Å.

Výsledky jednotlivých úloh shrňte do stručného a přehledného protokolu (povolené formáty MS Word, Open Office, Libre Office, PDF). V hlavičce protokolu uveďte vaše jméno, název a adresu školy, přihlašovací jméno, pod kterým jste registrováni na portálu kurzu Vibuch a dále přihlašovací jméno, které jste používali pro přístup na klastr WOLF. V protokolu od sebe viditelně oddělte řešení jednotlivých úloh. U všech hodnot uvádějte jednotky. Každý vložený obrázek a graf by měl být uveden stručným popiskem. Osy grafů musí být popsány včetně uvedení jednotek. Struktury přikládejte k protokolu v samostatných souborech ve formátech: xyz, mol2, pdb, pdbqt. Souborům přiřad'te jednoznačná jména, která uveďte i v protokolu.

Touto sérií uzavíráme korespondenční část kurzu zabývající se přeměnou chorismátu na prefenát a strukturní charakterizací enzymu, který přeměnu katalyzuje. Během letního soustředění pak završíme celý projekt modelováním přeměny přímo v aktivním místě enzymu. K tomuto účelu použijeme většinu informací, které jsme získali během řešení jednotlivých sérií, převážně pak:

1. Informace o struktuře enzymu a pravděpodobném umístění jeho aktivního místa.

2. Znalosti o mechanismu přeměny ve vakuu.
3. Informaci o struktuře tranzitního stavu reakce.
4. Jaký vliv má rozpouštědlo (voda) na průběh přeměny.
5. Informace o pravděpodobné struktuře předreakčního komplexu enzymu s chorismátem.

Úspěšní řešitelé se mohou již nyní pokusit o návrh vhodného inhibitoru chorismátmutasy. Všechny indicie pro úspěšný návrh již známe. Našli jsme strukturu tranzitního stavu přeměny, inspiraci pro svůj návrh můžeme hledat ve struktuře již známého inhibitoru, kterým je 8-hydroxy-2-oxabicyclo[3.3.1]non-6-en-3,5-dikarboxylát. Z vašich návrhů během soustředění vybereme nejvhodnějšího kandidáta, kterého pak otestujeme pomocí dalších výpočetních metod. Než se ale společně pustíme do tohoto výběru, přejeme vám hodně zdarů při řešení závěrečné série!

## C3 Spinová alchymie

Autor: Lukáš Žídek (e-mail: lzidek@chemi.muni.cz)

15 bodů

*Milí Vibušníci,*

*ve druhé třídě školy spinové alchymie už budeme většinou cvičit praktické triky ovládnání stavů jader. Jedna teoretická lekce nám ale z první třídy zbyla. Zatím jsme si nevysvětlili, jak sestavit magické čtverce jader, jejichž magnetické momenty se vzájemně ovlivňují. Pojd'me se na tento složitý problém podívat.*

### 1 Interakce mezi jádry

#### 1.1 Vědí o sobě aneb skalární interakce

Představte si, že zkoumáte roztok soli kyseliny mravenčí. Mravenčanový anion bude obsahovat jeden atom vodíku, jeden atom uhlíku a dva atomy kyslíku. Kyslíkem se dále zabývat nebudeme, protože se v přírodě vyskytuje většinou v isotopech s nulovým magnetickým momentem<sup>1</sup>. Většina uhlíku je tvořena isotopem  $^{12}\text{C}$ . V molekulách, kde je vázán vodík na atom uhlíku  $^{12}\text{C}$  není tedy jádro vodíku ovlivněno magnetickými momenty žádných jiných jader. Pro takové molekuly již umíte chování jádra vodíku (protonu) popsat a ze záznamu experimentu spinové alchymie dokážete určit jeho rezonanční frekvenci. Více než jedno procento přírodního uhlíku ale tvoří isotope  $^{13}\text{C}$ , který má stejný spin jako elektron. Navíc molekuly, které zkoumáme, často isotopem  $^{13}\text{C}$  obohacujeme, takže pak téměř každý uhlík je  $^{13}\text{C}$ . Co bude cítit jádro vodíku v molekule, ve které bude vázáno přímo na atom uhlíku  $^{13}\text{C}$ ?

Magnetické momenty jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  na sebe budou docela silně působit. Účinek tohoto působení bude ale záviset na tom, jak je vazba C-H natočena vůči vnějšímu magnetickému poli. V roztoku se molekuly volně otáčejí a směr vazby C-H se stále mění. Proto bude vliv přímého působení magnetických momentů protonu a uhlíku  $^{13}\text{C}$  v průměru nulový.

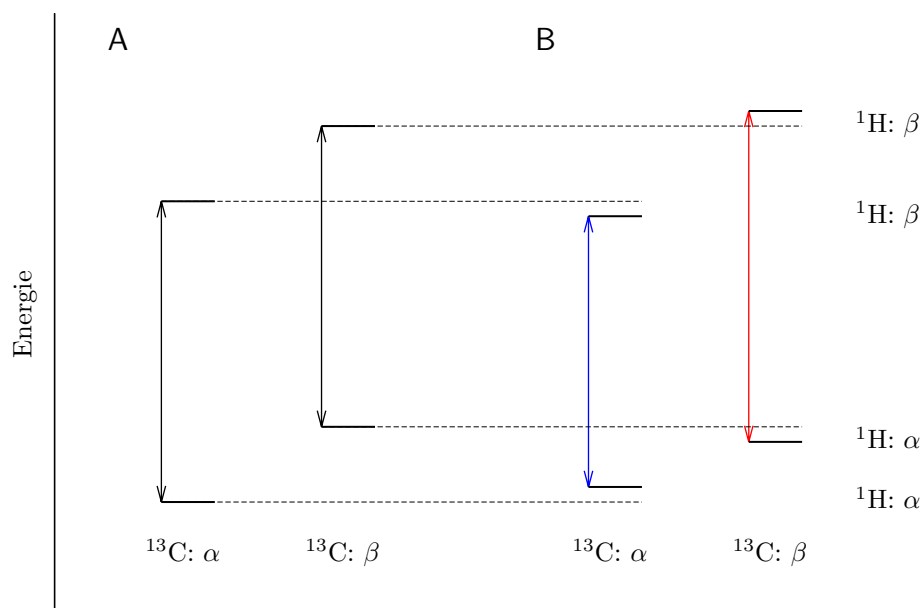
Jádra  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  na sebe ale působí ještě jinak, nepřímou. Jsou navzájem propojena kovalentní chemickou vazbou, která je tvořena dvěma elektrony. Elektrony ale mají také svůj spin a svůj magnetický moment. Budou proto magneticky působit na jádra a jádra zase na ně. Energeticky je výhodnější, když mají dvě částice opačný spin. Představte si, že každé z jader je v magnetickém kontaktu s jedním elektronem. Pro jádro vodíku bude tedy výhodnější opačný spin, než spin elektronu. Totéž platí i pro jádro  $^{13}\text{C}$ . Elektrony ale budou mít také vzájemně opačný spin. Z toho vyplývá, že energeticky bude výhodnější, aby  $^1\text{H}$  byl v opačném spinovém stavu, než  $^{13}\text{C}$ . Tato nepřímá interakce nazávisí na orientaci vazby vůči  $\vec{B}_0$ , ale závisí na rozložení elektronů v molekule. Bude tedy různá pro různé funkční skupiny, ale nebude záviset na natočení funkčních skupin k vnějšímu magnetickému poli. Pokud budeme předpokládat, že se struktura molekuly nemění<sup>2</sup>, nepotřebujeme ji popisovat vektorem (který udává velikost i směr), stačí ji popsat skalárem (který udává jenom velikost). Proto se této nepřímé interakci říká *skalární interakce*.

Pojd'me si teď porovnat hodnoty energie jader ve dvou různých molekulách – mravenčanovém aniontu s uhlíkem  $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$ . Mravenčan s  $^{12}\text{C}$  obsahuje magneticky izolovaný proton, zatímco v mravenčanu s  $^{13}\text{C}$  najdeme naši dvojici jader  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$ . Z první třídy víte, že jádra vodíku mají nižší energii, když jejich magnetické momenty míří (v průměru) ve směru vektoru indukce vnějšího magnetického pole  $\vec{B}_0$  (tomu jsme říkali stav 1). Opačná orientace magnetického momentu (kterou jsme označovali stav 2) má vyšší energii. Také víte, že rozdíl energií zmíněných stavů se rovná rezonanční frekvenci vynásobené Planckovou konstantou ( $E_2 - E_1 = hf_0$ ). V mravenčanu s uhlíkem  $^{12}\text{C}$  se tedy proton nalézá ve dvou stavech a rezonanční frekvence protonu je jednoduše dána rozdílem energií těchto stavů (obrázek 1A).

Pokud je ale vodík navázán na  $^{13}\text{C}$ , závisí energie také na magnetickém momentu jádra  $^{13}\text{C}$ . Pro zjednodušení následujících úvah budeme označovat (průměrný) směr magnetického momentu podél směru  $\vec{B}_0$  písmenkem  $\alpha$  a směr magnetického momentu opačný směru  $\vec{B}_0$  písmenkem  $\beta$ . Jestliže směřuje magnetický moment uhlíku  $^{13}\text{C}$  ve směru  $\vec{B}_0$  (směr  $\alpha$ ), má vodík v energeticky výhodnějším stavu (tedy s magnetickým momentem  $\alpha$ ) vázaný na uhlík  $^{13}\text{C}$  trochu vyšší energii, než kdyby byl vázaný na nemagnetický  $^{12}\text{C}$  (stejný směr je méně výhodný). Naopak vodík v energeticky méně výhodném stavu ( $\beta$ ) má o něco nižší energii, pokud je navázán na atom uhlíku  $^{13}\text{C}$  s magnetickým momentem ve směru  $\alpha$ , protože pak mají obě jádra různou orientaci magnetického momentu. Proto je rozdíl energií (a tedy i rezonanční frekvence) protonu v různých stavech nižší, je-li navázán vodík na uhlík  $^{13}\text{C}$  s orientací magnetického momentu  $\alpha$  (modrá šipka na obrázku 1B), než kdyby byl navázán na  $^{12}\text{C}$  (černá šipka na obrázku 1A).

<sup>1</sup>Jediný magnetický isotope  $^{17}\text{O}$  se k našim pokusům moc nehodí a v přírodě se vyskytuje jen v zanedbatelných množstvích.

<sup>2</sup>Nepřímé působení se šíří až na vzdálenost několika vazeb, pokud jde o interakci přes více než dvě vazby, bude se měnit při rotaci kolem vazby.



Obrázek 1: Energie stavů protonu přímo vázaného na  $^{12}\text{C}$  (A) a  $^{13}\text{C}$  (B).

Naopak rozdíl energií protonu v různých stavech je vyšší, pokud je navázán na uhlík  $^{13}\text{C}$  s orientací magnetického momentu  $\beta$  (červená šipka na obrázku 1B). Proton vázaný na uhlík  $^{13}\text{C}$  se tedy nevyskytuje ve dvou různých stavech, ale hned ve čtyřech. Totéž platí o rozdílech energií a rezonančních frekvencích uhlíku  $^{13}\text{C}$  s navázaným protonem.

Obrázek 1 také otvírá zajímavou otázku: jaké rozdíly populací jader jsme schopni pomocí NMR ještě rozlišit. Z rovnic 35 a 36 z první třídy vyplývá, že rozdíly populací můžeme spočítat z rozdílu frekvencí pomocí rovnice

$$\Delta P = \frac{h\Delta f_0}{k_{\text{B}}T} P, \quad (1)$$

kde  $\Delta f_0$  je rozdíl frekvencí odpovídající rozdílu mezi červenou a modrou šipkou na obrázku 1 a  $P$  je celkový počet jader ve vzorku (zjednodušení  $e^{-x} \approx 1 - x$  platí pro rozdíly frekvencí, se kterými se setkáváme, téměř přesně). Pro vodík přímo vázaný na  $^{13}\text{C}$  nebo  $^{15}\text{N}$  jsou rozdíly frekvencí mezi 90 a 200 Hz, interakce mezi atomy oddělenými více chemickými vazbami jsou ale výrazně nižší.

**Úkol 1:** Spočítejte, kolik atomů vodíku tvoří rozdíl populací, který jsme schopni naměřit při  $25^\circ\text{C}$  ve vzorku proteinu. Typický objem vzorku je  $520\ \mu\text{l}$ , signál jsme schopni získat pro  $2\ \mu\text{M}$  koncentrace proteinu a za nejmenší rozdíl frekvencí, který jsme schopni měřit, považujte 0,2 Hz.

## 1.2 Magické čtverce pro páry aneb součinné operátory

Vidíme, že v případě vzájemného působení jader nemůžeme popisovat každé jádro zvlášť. Systém, který zkoumáme, teď tvoří celá dvojice jader  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , která se může nacházet v jednom ze čtyř možných stavů. Jak budou vypadat magické čtverce, kterými popíšeme vlastnosti takové dvojice jader? Jestliže se samotný proton mohl vyskytovat v jedné ze dvou stavů a všechny operátory popisující jeho vlastnosti jsme mohli poskládat ze čtverců o dvou řádcích a dvou sloupcích, dvojici jader  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , která může být v jednom ze čtyř stavů, musíme popisovat magickými čtverci o čtyřech sloupcích a čtyřech řádcích. Operátory popisující dvojici jader  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  tedy získáme jako kombinaci šestnácti magických čtverců o šestnácti políčkách. Vzájemné působení jader tedy spinovou alchymii notně komplikuje. Pro dvojici jader máme například čtyři různé operátory populací (s různými hodnotami podél diagonály) a dokonce dvanáct různých koherencí! Pokusme se teď v této divočině trochu zorientovat.

Při popisu jednoho jádra jsme vycházeli z operátorů velikosti a jednotlivých složek spinu:  $\hat{I}$ ,  $\hat{I}_x$ ,  $\hat{I}_y$ ,  $\hat{I}_z$ . Čtyři bezrozměrné matice z nich odvozené nám posloužily jako základ pro operátory všech možných veličin. U dvojice jader budeme postupovat podobně. Vezmeme šestnáct bezrozměrných matic a z nich

složíme jakýkoli operátor. Jednou z možností, jak definovat oněch šestnáct matic, je také použít operátory velikostí a složek spinů obou jader. Pokud vynásobíme každý ze zmíněných operátorů jednoho jádra jedním z operátorů druhého jádra, získáme potřebných šestnáct součinů. Proto, se tyto operátory nazývají *součinnové operátory*.

Bezrozměrné matice systému dvou jader začínají být díky svým rozměrům (čtyři řádky, čtyři sloupce) už trochu nešikovné na psaní. Proto se většinou nevyepisují celé, ale značí nějakým symbolem. Nепolarizovaný systém popisuje stejně jako u jednoho jádra jednotková matice, tentokrát ale vynásobená jednou čtvrtinou. Ta je úměrná operátoru velikosti spinu, která je stejná pro obě jádra. V duchu součinnových operátorů se symboly ostatních matic odvozují od značení operátorů složek spinu, kterým je daná matice úměrná. Abychom si je odlišili od opravdových operátorů složek spinu, budeme je značit bez stříšky nad písmeny. A abychom rozlišili jednotlivá jádra, budeme místo písmenka  $I$  používat chemický symbol daného prvku. Například bezrozměrnou matici úměrnou operátoru  $\hat{I}_z$  protonu budeme značit<sup>3</sup>  $H_z$ . Polarizaci systému jader  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  můžeme popsat pomocí tří součinů matic<sup>4</sup>:  $H_z$ ,  $C_z$  a  $2H_zC_z$ , spolu s jednotkovou maticí tak můžeme zapsat populace všech čtyř stavů systému. Zbývajících dvanáct součinů poslouží k označení všech možných koherencí. Seznam všech šestnácti matic naleznete v tabulce 1 ve formě, z jaké lze přímo poskládat matici  $\hat{\rho}$  popisující stav systému. Operátory včetně Hamiltoniánu získáte vynásobením těchto matic příslušnou konstantou, jak jsme to probírali v první třídě.

## 2 Nové triky

### 2.1 Interakce pod kontrolou aneb spinová echa

Zatím jsme probírali jen nepříjemnosti, které nám vzájemné magnetické ovlivňování jader působí. Spinové alchymii ale přináší vzájemné magnetické působení nové možnosti. Jako adepti spinové alchymie se teď naučíte základní triky, kterými můžete chování systému dvou jader ovládat.

Začínat budete tam, kde jste v první třídě končili. Nejprve pomocí pulzu radiových vln vyrobíte z rovnovážného stavu stav koherentní, popsaný maticí<sup>5</sup>  $\hat{\rho} = \frac{f_0 h}{2k_B T} H_y$ . Použijete frekvenci radiových vln blízkou frekvenci protonu a délku pulzu  $\tau_p$  zvolíte tak dlouhou, aby se  $2\pi f_1 \tau_p$  rovnalo  $90^\circ$ . V experimentu, kterým jste končili první třídu, se vzniklý stav vyvíjel pod vlivem Hamiltoniánu  $\hat{H}_0 = -\gamma_H B_0 \frac{h}{2\pi} H_z = -f_{0,H} h H_z$ , který popisoval účinek magnetického pole  $\vec{B}_0$  na magnetický moment protonu. Teď ale musíme vzít do úvahy ještě vliv magnetického pole sousedního jádra  $^{13}\text{C}$ . Ten můžeme popsat Hamiltoniánem  $\hat{H}_J = J h H_z N_z$ , kde  $J$  je rozdíl mezi rezonanční frekvencí jader vodíku vázaných na  $^{13}\text{C}$  v orientaci  $\alpha$  a rezonanční frekvencí jader vodíku vázaných na  $^{13}\text{C}$  v orientaci  $\beta$  (odpovídající rozdílu mezi červenou a modrou šipkou na obrázku 1). Vidíme, že na dvoujaderný systém působí dva vlivy. Prvnímu říkáme vliv *chemického posunu* (anglicky *chemical shift*), druhému vliv *skalární interakce* (anglicky *scalar coupling*). Chemický posun způsobuje, že jádra stejného isotopu (například protonu) v různých místech v molekule mají odlišné rezonanční frekvence (protože jsou trochu jinak stíněny elektrony v okolí). Skalární interakce způsobuje, že jedno jádro má dvě různé rezonanční frekvence podle toho, jestli směřuje magnetický moment druhého jádra podél nebo proti poli  $\vec{B}_0$  (jestli je v orientaci  $\alpha$  nebo  $\beta$ ).

Základním trikem spinové alchymie je takzvané *spinové echo*. Skládá se ze dvou stejně dlouhých časových prodlev (trvání jedné prodlevy označíme  $\tau$ ), mezi kterými zapneme na krátkou chvíli vysílač radiových vln. Frekvence těchto vln může být blízká rezonanční frekvenci jednoho nebo druhého jádra, můžeme ale také vysílat zároveň vlny blízké frekvenci obou jader. Každá z těchto možností nám umožní manipulovat jádry různým způsobem. V každém případě ale bude délka působení radiových vln taková, aby se  $2\pi f_1 \tau_p$  rovnalo  $180^\circ$  (v případě protonů bude délka pulzu při stejné intenzitě radiových vln dvojnásobná než délka pulzu použitá k vybuzení koherence na začátku experimentu, v případě uhlíku  $^{13}\text{C}$  bude délka jiná, ale účinek stejný jako na protony).

Podívejme se nejprve na to, co se bude dít, když mezi prodlevami  $\tau$  žádné vlny nepoužijete (obrázek 2A). Systém, který je po vybuzení koherence ve stavu  $\rho$ , se bude vyvíjet po dobu  $2\tau$  pod vlivem chemického posunu a skalární interakce. Magnetické momenty protonů v různých místech molekuly, které všechny po vybuzení směřovaly jedním směrem v rovině  $xy$ , se budou v důsledku chemického posunu otáčet kolem

<sup>3</sup>Neplést si s označením Hamiltoniánu, který má vždycky stříšku!

<sup>4</sup>Operátory velikostí spinu obou jader jsou stejné a úměrné jednotkové matici. Násobení jednotkovou maticí z úsporných důvodů nevyepisujeme. Součin  $H_z C_z$  musíme vynásobit dvěma, aby nám vyšly prvky matice číselně správně.

<sup>5</sup>Pro vodík vázaný na  $^{12}\text{C}$  by se  $H_y$  rovnalo matici  $\begin{bmatrix} 0 & -\frac{i}{2} \\ +\frac{i}{2} & 0 \end{bmatrix}$ , protože je ale náš proton vázán na  $^{13}\text{C}$ , musíme použít

matici  $H_y = \begin{bmatrix} 0 & 0 & -\frac{i}{2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -\frac{i}{2} \\ +\frac{i}{2} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & +\frac{i}{2} & 0 & 0 \end{bmatrix}$  z tabulky 1.

Tabulka 1: Přehled nejčastěji používaných bezrozměrných matic, z nichž můžeme složit matici  $\hat{\rho}$  popisující stav systému  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Základní matice je černá, matice popisující polarizaci systému jsou modré a matice popisující koherence jsou červené.

Matice	Označení	Význam																
<table border="1"> <tr><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td></tr> </table>	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}\hat{1}$	Základ matice $\hat{\rho}$ nezahrnující žádný vliv magnetického pole
$+\frac{1}{2}$	0	0	0															
0	$+\frac{1}{2}$	0	0															
0	0	$+\frac{1}{2}$	0															
0	0	0	$+\frac{1}{2}$															
<table border="1"> <tr><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td></tr> </table>	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	$H_z$	Příspěvek k matici $\hat{\rho}$ popisující vliv vnějšího magnetického pole $\vec{B}_0$ na jádro $^1\text{H}$ bez ohledu na magnetické pole tvořené magnetickým momentem sousedního jádra $^{13}\text{C}$
$+\frac{1}{2}$	0	0	0															
0	$+\frac{1}{2}$	0	0															
0	0	$-\frac{1}{2}$	0															
0	0	0	$-\frac{1}{2}$															
<table border="1"> <tr><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td></tr> </table>	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	$C_z$	Příspěvek k matici $\hat{\rho}$ popisující vliv vnějšího magnetického pole $\vec{B}_0$ na jádro $^{13}\text{C}$ bez ohledu na magnetické pole tvořené magnetickým momentem sousedního jádra $^1\text{H}$
$+\frac{1}{2}$	0	0	0															
0	$-\frac{1}{2}$	0	0															
0	0	$+\frac{1}{2}$	0															
0	0	0	$-\frac{1}{2}$															
<table border="1"> <tr><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td></tr> </table>	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	$2H_zC_z$	Příspěvek k matici $\hat{\rho}$ popisující vliv magnetické pole tvořené magnetickým momentem sousedního jádra
$+\frac{1}{2}$	0	0	0															
0	$-\frac{1}{2}$	0	0															
0	0	$-\frac{1}{2}$	0															
0	0	0	$+\frac{1}{2}$															
<table border="1"> <tr><td>0</td><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td></tr> <tr><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td></tr> </table>	0	0	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	0	0	$H_x$	Příspěvek k matici $\hat{\rho}$ popisující koherenci složek magnetického momentu jádra $^1\text{H}$ , které jsou kolmé k $\vec{B}_0$ a mají stejnou fázi jako nosná vlna (složky označované $\mu_x$ v souřadné soustavě dané směry $\vec{B}_0$ a $\vec{B}_1$ )
0	0	$+\frac{1}{2}$	0															
0	0	0	$+\frac{1}{2}$															
$+\frac{1}{2}$	0	0	0															
0	$+\frac{1}{2}$	0	0															
<table border="1"> <tr><td>0</td><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td></tr> <tr><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td></tr> </table>	0	0	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	0	0	$2H_xC_z$	Příspěvek k matici $\hat{\rho}$ popisující vliv magnetického pole tvořeného magnetickým momentem sousedního jádra $^{13}\text{C}$ na koherenci $H_x$ , kvůli kterému se složky magnetického momentu jádra $^1\text{H}$ kolmé k $\vec{B}_0$ opožďují o $90^\circ$ vůči nosné vlně, má-li magnetický moment $^{13}\text{C}$ orientaci $\alpha$ , a předbíhají, má-li magnetický moment $^{13}\text{C}$ orientaci $\beta$
0	0	$+\frac{1}{2}$	0															
0	0	0	$-\frac{1}{2}$															
$+\frac{1}{2}$	0	0	0															
0	$-\frac{1}{2}$	0	0															
<table border="1"> <tr><td>0</td><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td></tr> <tr><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td></tr> </table>	0	0	$-\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	0	0	$H_y$	Příspěvek k matici $\hat{\rho}$ popisující koherenci složek magnetického momentu jádra $^1\text{H}$ , které jsou kolmé k $\vec{B}_0$ a mají fázi posunutou o $90^\circ$ vpřed vůči nosné vlně (složky označované $\mu_y$ v souřadné soustavě dané směry $\vec{B}_0$ a $\vec{B}_1$ )
0	0	$-\frac{1}{2}$	0															
0	0	0	$-\frac{1}{2}$															
$+\frac{1}{2}$	0	0	0															
0	$+\frac{1}{2}$	0	0															
<table border="1"> <tr><td>0</td><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td><math>+\frac{1}{2}</math></td></tr> <tr><td><math>+\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr> <tr><td>0</td><td><math>-\frac{1}{2}</math></td><td>0</td><td>0</td></tr> </table>	0	0	$-\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$+\frac{1}{2}$	$+\frac{1}{2}$	0	0	0	0	$-\frac{1}{2}$	0	0	$2H_yC_z$	Příspěvek k matici $\hat{\rho}$ popisující vliv magnetického pole tvořeného magnetickým momentem sousedního jádra $^{13}\text{C}$ na koherenci $H_x$ , kvůli kterému mají složky magnetického momentu jádra $^1\text{H}$ kolmé k $\vec{B}_0$ stejnou fázi jako nosná vlna, má-li magnetický moment $^{13}\text{C}$ orientaci $\alpha$ , a opačnou fázi, má-li magnetický moment $^{13}\text{C}$ orientaci $\beta$
0	0	$-\frac{1}{2}$	0															
0	0	0	$+\frac{1}{2}$															
$+\frac{1}{2}$	0	0	0															
0	$-\frac{1}{2}$	0	0															



osy  $z$  (směr  $\vec{B}_0$ ) s různými frekvencemi. Po době  $2\tau$  budou tedy magnetické momenty různých momentů směřovat různými směry. Navíc, účinkem skalární interakce, budeme pro každý proton pozorovat dvě různé populace magnetických momentů, jednu trochu rychlejší a druhou trochu pomalejší, podle toho, kam směřuje magnetický moment nevybuzeného jádra  $^{13}\text{C}$ , na který je proton navázán.

Co se stane, když mezi prodlevami  $\tau$  zapneme vysílač vln rezonujících s frekvencí protonů (obrázek 2B)? Pokud bude pulz vln dlouhý tak, aby se  $2\pi f_1 \tau_p$  rovnalo  $180^\circ$ , otočí<sup>6</sup> se všechny magnetické momenty v půlce echa o  $180^\circ$ . Pro jednoduchost budeme předpokládat, že toto otočení bude velmi rychlé v porovnání s vlivem chemického posunu a skalární interakce. Co se bude dít během druhé prodlevy? Totéž, co během první poloviny echa, vliv chemického posunu a skalární interakce bude pořád stejný. Díky pulzu vln bude ale pořadí magnetických momentů převrácené. Ty co se v první polovině echa nejdříve zrychlovaly, budou po překlopení na chvostu. Protože jsou stále nejrychlejší, budou během druhé prodlevy dohánět náskok, který jste překlopením dali pomalejším magnetickým momentům. Pokud budou obě prodlevy stejně dlouhé, přesně na konci echa se všechny magnetické momenty doženou a budou mířit stejným směrem, tak, jak tomu bylo na začátku. Tomuto triku se říká *refokusační echo*, protože magnetické momenty „rozostřené“ chemickým posunem a skalární interakcí zase „zaostří“ (refokusuje) do jednoho směru.

Co se změní, když mezi prodlevami  $\tau$  použijeme vlny rezonujících ne s frekvencí protonů, ale s frekvencí uhlíku  $^{13}\text{C}$  (obrázek 2C)? Takový pulz nijak neovlivní protony, takže se během něj se sledovanými magnetickými momenty nic nestane. Žádné překlápění se tentokrát nekoná. Pulz bude mít ale vliv na magnetické momenty uhlíku  $^{13}\text{C}$ . Otočí je o  $180^\circ$ , takže ty, které byly v orientaci  $\alpha$ , se překlápí do orientace  $\beta$  a naopak. V důsledku toho bude populace magnetických momentů protonů, která byla během první prodlevy díky skalární interakce rychlejší, v druhé polovině echa pomalejší, a naopak. Na konci echa se tedy všechny vlivy skalární interakce vyrovnají, protože během první půlky působily přesně opačně, než v druhé polovině. Tomuto triku se anglicky říká *decoupling echo*, protože ruší účinek skalární interakce (*scalar coupling*). Na účinek chemického posunu nemá žádný vliv.

Poslední možností je použít v polovině echa vlny o obou rezonančních frekvencích zároveň (obrázek 2D). Zapnete tedy oba vysílací kanály (protonový i uhlíkový). V důsledku pulzů dojde k překlopení magnetických momentů protonů a zároveň k prohození orientací magnetických momentů uhlíku  $^{13}\text{C}$ . Magnetické momenty, které se v důsledku protonového pulzu octly na chvostu skupiny, dohoní stejně jako v refokusačním echu náskok momentů pomalejších díky chemickému posunu. Účinek skalární interakce se ale nesmaže, protože populace, která byla pomalejší v první polovině dostane nejen náskok díky protonovému pulzu, ale stane se i rychlejší díky uhlíkovému pulzu. Poslední echo tedy vyrovná rozdíly chemického posunu, ale zachová vliv skalární interakce.

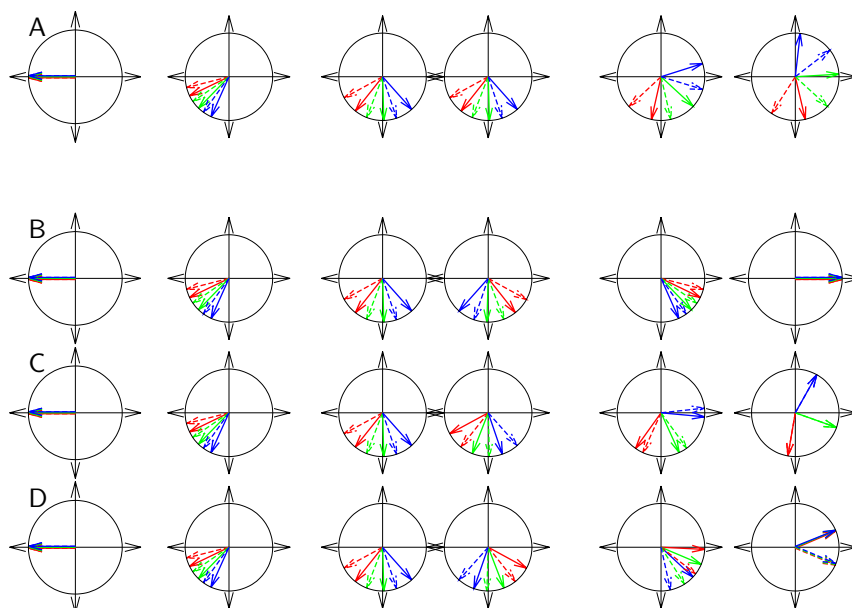
Když se zamyslíte nad popsánými variantami echa, jistě si uvědomíte jak mocným nástrojem spinového alchymisty tyto triky jsou. Pouze pomocí radiového vysílače dokážeme zapínat a vypínat základní fyzikální síly, které ovlivňují magnetické chování jader – stínění elektrony a skalární interakce se sousedními jádry.

## 2.2 Alchymie jak má být aneb z vodíku dusík

Vyzbrojení novými triky se můžeme pustit do ještě odvážnějších úkolů. Prvním z nich je cíl vpravdě alchymistický – vyvést nejdříve z rovnováhy jádra vodíku a vyrobit tak jejich koherentní stav, potom tuto nerovnováhu převést na sousední jádro (dusík  $^{15}\text{N}$  nebo uhlík  $^{13}\text{C}$ ) a měřit rezonanční frekvenci tohoto souseda. Proč se pouštět do takových kouzel a nevybudit přímo sousední jádro? Důvodů je hned několik, nejzajímavější jsou dva: zvýšíme tak citlivost a umožní nám to navrhnout dvojrozměrné experimenty i pro různá jádra. Z prvního důvodu je tento trik znám pod zkratkou INEPT, z anglického *insensitive nuclei enhanced by polarization transfer*, tedy necitlivá jádra zesílená přenosem polarizace. Protože velmi důležitou skupinou pro studium proteinů je NH peptidové vazby, ukážeme si použití INEPTu na příkladu přenosu polarizace z vodíku na dusík  $^{15}\text{N}$ , úplně stejně ale funguje přenos na uhlík  $^{13}\text{C}$  (který se také ve zkoumání bílkovin využívá, když se zaměřujeme na postranní řetězce aminokyselin). Abychom naše povídání trochu zjednodušili, nebudeme už zdůrazňovat, o jakém izotopu dusíku a uhlíku mluvíme. Pro biochemické NMR pokusy se jiné izotopy než  $^{15}\text{N}$  a  $^{13}\text{C}$  nehodí. Když budeme dál mluvit o spektrech dusíku, budeme mít na mysli vždycky jádro  $^{15}\text{N}$ , a totéž bude platit o uhlíku a jádru  $^{13}\text{C}$ .

INEPT získáme tak, že použijeme poslední echo z minulé kapitoly a po něm zapneme oba vysílací kanály po dobu  $\tau_p$  dlouhou tak, aby  $2\pi f_1 \tau_p$  odpovídalo  $90^\circ$ , stejně jako u pulzu, kterým na začátku experimentu budíme koherence vodíků (obrázek 3). Protože hodnota  $f_1$  na různých vysílacích kanálech je různá, budou také hodnoty  $\tau_p$  různé pro vodík a dusík (nebo uhlík). Důležité je, aby byly oba vodíkové pulsy v experimentu vzájemně posunuty o  $90^\circ$ . Další nezbytnou podmínkou je nastavení délky prodlev

<sup>6</sup>Podle naší volby souřadné soustavy se budou otáčet kolem osy  $x$ . Otáčení kolem jiné osy ale můžeme zařídit jednoduše posunutím fáze vlny. Pokud se bude například vlna mezi prodlevami opožďovat o  $90^\circ$  oproti vlně budící, otočí se magnetické momenty kolem směru  $-y$ .

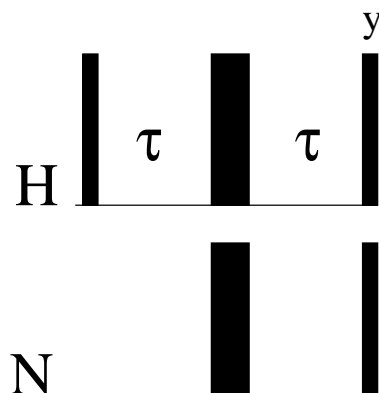


Obrázek 2: Princip spinového echa. Na jednotlivých rádcích je znázorněn pohyb vektoru magnetizace v rovině kolmé ke směru  $\vec{B}_0$  pro tři jádra vodíku, která se mírně liší frekvencí v důsledku chemického posunu (jádra jsou rozlišena barvou šipek) a která jsou navázána na atom uhlíku  $^{13}\text{C}$  (plné šipky označují magnetizaci vodíku navázaného na  $^{13}\text{C}$  ve stavu  $\alpha$ , čárkované šipky označují magnetizaci vodíku navázaného na  $^{13}\text{C}$  ve stavu  $\beta$ ). První obrázek na každém řádku popisuje magnetizaci na začátku echa, druhý obrázek popisuje magnetizaci čtvrtině echa (v polovině první prodlevy  $\tau$ ), třetí obrázek popisuje magnetizaci těsně před  $180^\circ$  pulzem v polovině echa, čtvrtý obrázek popisuje magnetizaci těsně po  $180^\circ$  pulzu v polovině echa, pátý obrázek popisuje magnetizaci ve třech čtvrtinách echa (v polovině druhé prodlevy  $\tau$ ) a poslední obrázek na každém řádku popisuje magnetizaci na konci echa. Řádek A odpovídá situaci, kdy neozařujeme žádné jádro, řádek B odpovídá situaci, kdy ozařujeme protony, řádek C odpovídá situaci, kdy ozařujeme  $^{13}\text{C}$  a řádek D odpovídá situaci, kdy ozařujeme obě jádra.

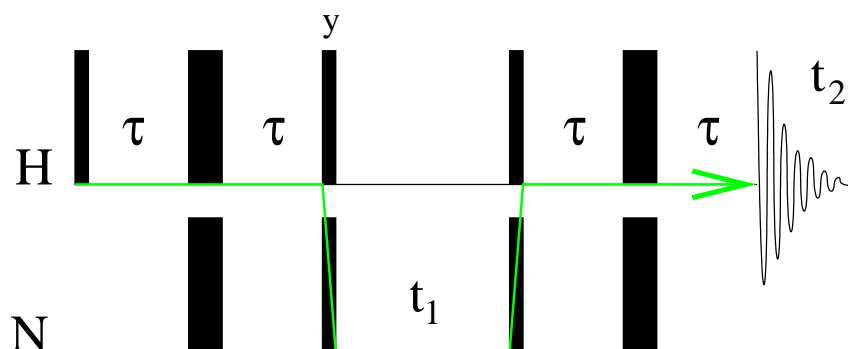
$\tau$  na takovou dobu, aby plné a čárkované šipky z obrázku 2D na konci echa směřovaly právě opačným směrem. Za těchto podmínek bude matice  $\hat{\rho}$  na konci INEPTu tvořit koherence  $2H_zN_y$  (nebo  $2H_zC_y$ ). Tato koherence sice nevede ke vzniku měřitelného signálu podle Receptu 10 z první třídy, ale pod vlivem Hamiltoniánu, který popisuje interakci mezi vodíkem a dusíkem, stav systému během měření osciluje mezi koherencemi  $2H_zN_y$  a  $N_x$  (když zanedbáme nezájímavé složky matice  $\rho$ , z kterých nic zajímavého nepojde). A koherence  $N_x$  už měřitelný signál tvoří. Když se povzneseme nad zmíněné technické detaily, můžeme říci, že jsme dosáhli našeho cíle. Vybudili jsme vodíky, ale měřitelný signál můžeme zaznamenat při frekvenci dusíku. A jak je to s tou citlivostí? Odpověď je skryta v populacích různých jader za rovnováhy. Podle rovnice 33 z první třídy závisí rozdíly populací na magnetogyrické konstantě jádra, která je pro vodík desetkrát vyšší (Recept 8 z první třídy). Po INEPTu sice měříme frekvenci dusíku, ale matice  $\hat{\rho}$  popisující mimo jiné intenzitu signálu, je úměrná rozdílu populací vodíku, ze kterého jsme vycházeli. Takže spinový alchymista je spokojen, tím že místo dusíku měří vodík převlečený za dusík, se mu podařilo ošálit přírodní zákony a získat větší citlivost, než je na první pohled možné.

### 2.3 Dva rozměry po druhé aneb heteronukleární korelace

Krom vyšší citlivosti nám INEPT umožňuje provádět velmi užitečné experimenty, ve kterých měříme dvojrozměrná spektra s frekvencí různých jader v různých dimenzích. Na obrázku 4 vidíme, jak v takovém případě postupujeme. Nebojte se, nebudeme teď analyzovat změny matice  $\hat{\rho}$  během každého pulzu radiových vln. Jako staří mazáci se na obrázek podíváte a vidíte, že po prvním (budicím) devadesátistupňovém pulzu následuje INEPT, potom prodleva  $t_1$ , potom zrcadlový obraz INEPTu a nakonec měříme magnetizaci vodíku v čase (čas měření od zapnutí radiového přijímače označujeme  $t_2$ ). Co dělá první pulz a INEPT jsme si vysvětlili před chvílkou. Zrcadlový obraz INEPTu má opačný účinek, než INEPT. Pokud INEPT funguje jako zaklínadlo, které proměňuje vodíky v dusíky (nebo uhlíky), zrcadlový INEPT toto kouzlo ruší a z dusíku dělá zase zpátky vodíky. Prodleva  $t_1$  funguje úplně stejně jako v experimentu NOESY za druhé třídy. Pokus opakujeme mnohokrát a pokaždé  $t_1$  trošku prodloužíme. Díky tomu bude amplituda signálu měření od měření (tedy vzhlede k  $t_1$ ) oscilovat s frekvencí dusíku. Po zapnutí přijímače tak měříme sice kmitání vodíkové magnetizace, ale amplituda těchto kmitůse mění podle toho, jak dlouhá bude prodleva  $t_1$ . Stejně jako v NOESY získáme obdobu amplitudově modulovaného



Obrázek 3: INEPT. Pulzy radiových vln jsou znázorněny obdélníčky, užší odpovídají  $90^\circ$  pulzům a širší  $180^\circ$  pulzům. Pulz označený  $y$  je fázově posunutý o  $90^\circ$  vzhledem k prvnímu (budícímu) pulzu. Dva vysílací kanály jsou označeny symbolem prvku (H pro vysílač s nosnou frekvencí v rozsahu rezonančních frekvencí protonu, N pro vysílač s nosnou frekvencí v rozsahu rezonančních frekvencí  $^{15}\text{N}$ ).



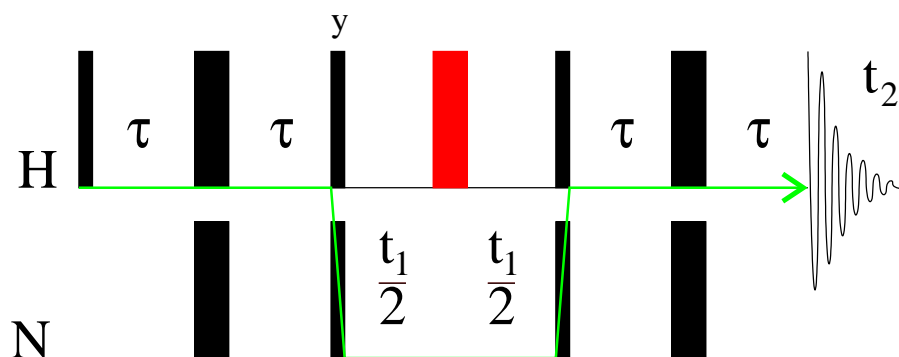
Obrázek 4: Experiment pro měření korelace protonů s dusíky. Zelená šipka znázorňuje přenos polarizace, ostatní symboly jsou stejné jako na obrázku 3.

(AM) radiového vysílání na středních vlnách. Výsledkem tedy bude signál kmitající s vodíkovou frekvencí v dimenzi  $t_2$ , modulovaný dusíkovou (nebo uhlíkovou) frekvencí v dimenzi  $t_1$ . Po dvojí Fourierově transformaci získáme opět dvojrozměrné spektrum, na rozdíl od NOESY bude ale na každé ose frekvence jiného jádra. Vrcholy v našem spektru budou poskytovat údaje o takzvané *heteronukleární korelaci* (tedy korelaci mezi jádry různého typu). Řečeno jednoduše, vrchol uvidíme jen na souřadnicích (frekvencích) vodíku a dusíku, které jsou přímo vázány kovalentní vazbou ve skupině N–H.

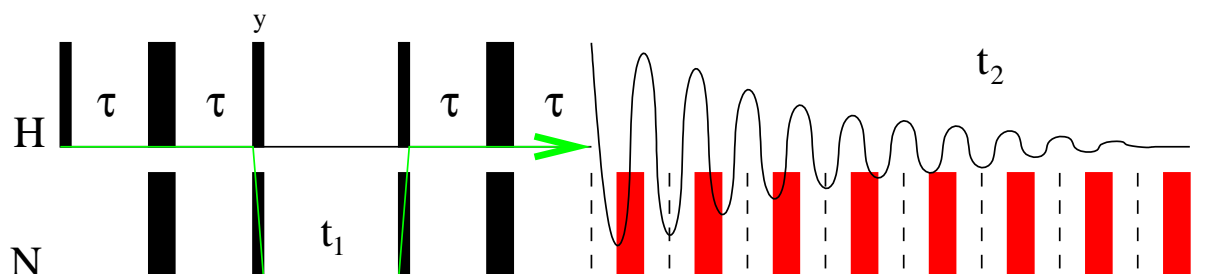
V dosud popsaném způsobu měření bychom získali signály štěpené v důsledku skalárních interakcí mezi jádry. To je pro nás většinou nevýhodné. Štěpení snižuje citlivost (intenzita se zbytečně dělí na více čar) i rozlišení (více čar znamená větší pravděpodobnost jejich náhodného překryvu). Toto štěpení (*scalar coupling*) lze snadno odstranit z nepřímé dimenze spektra. Stačí rozdělit prodlevu  $t_1$  na dvě poloviny délky  $\frac{t_1}{2}$  oddělené  $180^\circ$  pulzem působícím na vodík (obrázek 5, jde vlastně o echo druhého typu v našem přehledu). Vyrušení *couplingu* na konci takového echa můžeme nazvat *decoupling*.

Složitější je odstranění štěpení z přímé dimenze. Nestačí nám totiž odstranění frekvenční modulace v jednom časovém okamžiku, chceme vývoj v důsledku interakcí potlačit v celém průběhu měření. I s tímto zdánlivě neřešitelným problémem si spinový alchymista poradí. Zkuste si představit, že dobu  $t_2$ , kdy je zapnut radiový přijímač, rozdělíte na velké množství velmi krátkých ech se  $180^\circ$  pulzem působícím na dusík po celou dobu měření (obrázek 6). Během tak krátkých ech nebudou mít plné a čárkované šipky z obrázku 2 čas se příliš vzdálit, echo je vždycky za kratičkou dobu vrátí k sobě. Během celého měření tak bude vliv interakce mezi dusíkem a vodíkem zanedbatelný.

Zkrácení echa ovšem povede k tomu, že většina echa bude tvořena pulzem. Nemůžeme tedy jednoduše zanedbat vývoj magnetizace pod vlivem  $\hat{H}_0$  během pulzu, jak jsme si mohli dovolit u dlouhých ech. V důsledku toho se bude sekvence krátkých ech chovat jako dokonalé echo jen při přesném splnění rezonanční podmínky, kdy je vývoj v důsledku  $\hat{H}_0$  nulový. Proto se v praxi hledají sekvence co nejméně citlivé na odchylky od rezonanční frekvence. Například dva  $180^\circ$  pulzy je výhodné nahradit sledem tří pulzů účinku  $90^\circ$ ,  $180^\circ$ ,  $270^\circ$  s fází měnící znaménko. Taková decouplingová sekvence na tři doby se



Obrázek 5: Decoupling v nepřímé dimenzi. Pulz pro decoupling je vyznačen červeně, ostatní symboly jsou stejné jako na obrázku 4.



Obrázek 6: Princip decouplingu v přímé dimenzi. Pulzy pro decoupling jsou vyznačeny červeně, ostatní symboly jsou stejné jako na obrázku 4.

označuje akronymem WALTZ. Jiná oblíbená sekvence GARP se skládá z opakování 25 pulzů různé délky navržené počítačovou optimalizací. Metou takovýchto sekvencí je většinou dobrý účinek pro co nejširší rozsah frekvencí.

**Úkol 2:** S použitím Receptu 8 z první třídy určete, kolikrát silnější signál získáte po přenesení polarizace z protonu na uhlík pomocí INEPTu ve srovnání se spektrem, které byste získali přímo vybuzením uhlíku.

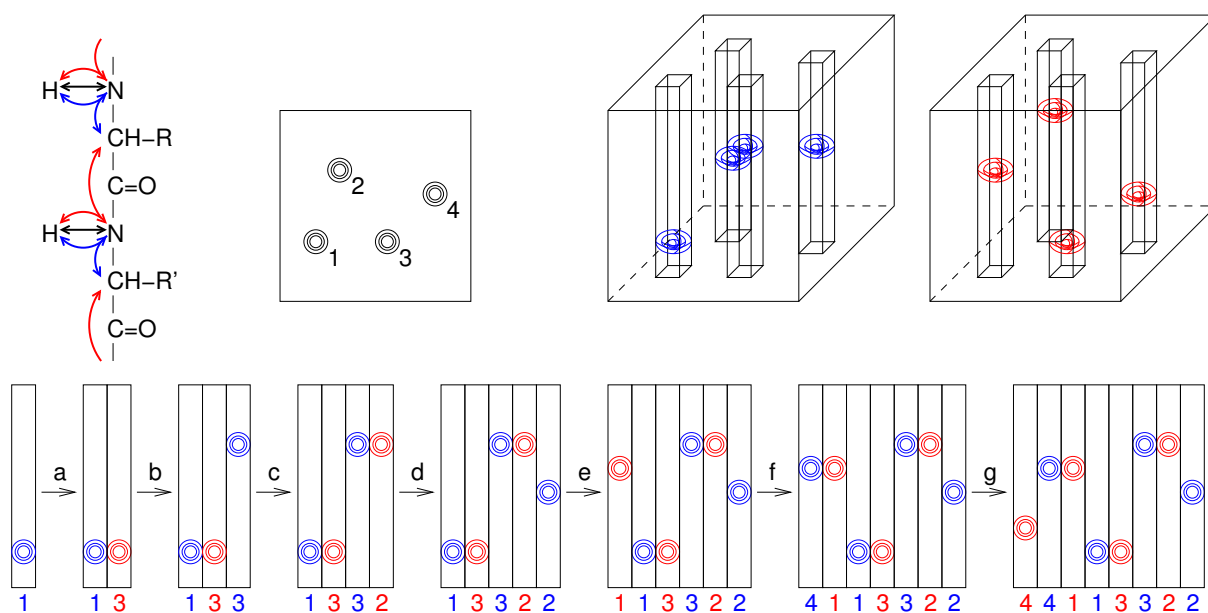
### 3 Přiřazení frekvencí využívající heteronukleárních korelací

#### 3.1 Kráčíme po vazbách aneb trojrezonanční experimenty

Princip heteronukleární korelace, díky které ve spektrech vidíme která jádra jsou spojena chemickou vazbou, je velmi užitečný. INEPT je totiž možné vkládat do experimentů vícekrát a pro různé kombinace jader. Dvojměrnou korelaci z obrázku 4 je tak možné rozšířit na další jádro, například na uhlík  $C^\alpha$ . Stačí do experimentu zařadit INEPT působící na dusík a uhlík<sup>7</sup>, jeho zrcadlový obraz, a další prodlevu, kterou budeme postupně prodlužovat. Výsledkem bude spektrum, ve kterém uvidíme korelace mezi vodíkem, dusíkem a uhlíkem  $\alpha$  ve skupině  $H-N-C^\alpha$ . Celkem logicky se takovému experimentu říká HNCA. Spektrum si můžeme znázornit jako podivnou trojrozměrnou mapu, ve kterém vrstevnice nebudou kolem vrcholů tvořit soustředné kruhy (nebo spíše elipsy), ale něco jako ruské matřjošky: Kolem každého bodu v trojrozměrném prostoru (každý rozměr odpovídá jiné frekvenci) nakreslíme elipsoid, kolem něj další, a tak dále. Při analýze takových spekter si člověk může připadat, že hraje počítačovou hru založenou na 3D grafice, ale výsledek je velmi praktický. Pomocí 3D spekter můžeme totiž mnohem snáz udělat to, co jste cvičili už ve druhé třídě, přiřadit jednotlivým frekvencím příslušné atomy.

Jak na to? Nestačí nám jedno 3D spektrum, potřebujeme dvě. Kromě pokusu HNCA můžeme naměřit spektrum s korelací vodík-dusík-karboxylový uhlík (spektrum HNCACO). To samo o sobě by nestačilo.

<sup>7</sup>Na dusík v peptidové vazbě, který nás zajímá, jsou navázány dva atomy uhlíku, uhlík  $\alpha$  a uhlík karboxylový. Jejich rezonanční frekvence se ale liší natolik, že při dostatečně opatrném ozařování můžeme zasáhnout zvlášť jeden nebo druhý z uhlíků.



Obrázek 7: Příklad sekvenčního přiřazení pomocí experimentů HNCA a HN(CO)CA. Nahoře je schema korelace v jednotlivých experimentech (černě korelace  $^1\text{H}$  a  $^{15}\text{N}$ , modře korelace v HNCA, červeně korelace v HN(CO)CA) a naměřená spektra. Dole je postup sekvenčního přiřazení.

Můžeme ale přidat další INEPT, působící na karbonylový uhlík a uhlík  $\alpha$ , a jeho zrcadlový obraz. Kdybychom přidali i další prodlouženou prodlevu, získali bychom experiment HNCO, který už by byl čtyřrozměrný. Nám budou stačit dimenze tři (taková spektra se také jednodušeji analyzují), proto čtvrtou prodlevu už postupně prodlužovat nebudeme. Takový experiment se označuje HN(CO)CA. Závorka upozorňuje na to, že sice interakce dusíku a uhlíku  $\alpha$  s karbonylovým uhlíkem využíváme k přenosu polarizace, frekvenci karbonylového uhlíku ale neměříme. Opět tedy získáme spektrum s korelací tří atomů, vodíku, dusíku a uhlíku  $\alpha$ . Ale tato tři jádra přece koreluje i ve spektru HNCA! V čem je tedy rozdíl? Experiment HN(CO)CA koreluje frekvence atomů ve skupině H–N s uhlíkem  $\alpha$ , ne ale ze stejné skupiny H–N–C $^\alpha$ , nýbrž s uhlíkem  $\alpha$  ze sousední aminokyseliny, ke kterému jsme se dostali přes karbonyl. Ve dvou spektrech máme tak korelaci stejné NH skupiny peptidové vazby se dvěma různými uhlíky  $\alpha$ , z téže a předchozí aminokyseliny. Porovnáním těchto dvou spekter se proto můžeme dozvědět, které frekvence patří sousedním aminokyselinám. Pokud najdeme všechny sousedské páry, je vlastně problém přiřazení vyřešen: pořadí frekvencí, určené na základě sousedských vztahů, stačí srovnat s pořadím aminokyselin našeho proteinu.

Postup sekvenčního přiřazení si můžeme ukázat na příkladu krátkého peptidu, složeného z pěti aminokyselin. Obrázek 7 ukazuje jedno dvojrozměrné spektrum takového peptidu, které poskytuje korelaci  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , a dvě trojrozměrná spektra, označovaná HNCA a HN(CO)CA. Pokud pentapeptid neobsahuje NH skupiny v postranních řetězcích, uvidíme v dvojrozměrném spektru čtyři signály (měřitelné budou pouze signály NH skupiny v peptidové vazbě, koncová aminoskupina signály neposkytne, protože její protony snadno disociují a během měření se rychle vyměňují s protony vody). Trojrozměrná spektra rozšiřují korelaci na uhlíky  $\alpha$ . Ve spektru HNCA (na obrázku 7 modře) jsou korelovány protony a dusíky NH skupiny (v peptidové vazbě) aminokyseliny číslo  $k$  s  $\alpha$ -uhlíkem téže  $k$ -té aminokyseliny. Naopak ve spektru HN(CO)CA (na obrázku 7 červeně) jsou korelovány protony a dusíky NH skupiny aminokyseliny číslo  $k$  opět s  $\alpha$ -uhlíkem, ale tentokrát aminokyseliny číslo  $k - 1$  (tedy prostřednictvím karbonylového uhlíku). Všimněte si, že promítnutím spektra HNCA nebo HN(CO)CA získáme stejnou korelaci, jako vidíme v dvojrozměrném spektru. Jinými slovy, signály v trojrozměrných spektrech leží vždycky v „komínku“ stojícím nad místem signálu v dvojrozměrném spektru („komínky“ jsou také znázorněny na obrázku 7).

Na začátku vyhodnocování spekter nevíme, který signál odpovídá které aminokyselině. Proto si signály ve spektrech očíslováme libovolně (ale stejně ve všech spektrech). Příklad číslování je na obrázku 7 uveden v dvojrozměrném spektru. Další postup je ukázán v dolní části obrázku 7. Vybereme si jeden signál v HNCA spektru, například signál označený 1 v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  korelaci. Pro tento signál si vyřízneme z HNCA spektra proužek, který představuje řez prostředkem komínku. V této chvíli můžeme říci pouze to, jaká frekvence jader  $\alpha$ -uhlíku odpovídá NH skupině popsané dvojicí frekvencí  $^1\text{H}$  a  $^{15}\text{N}$ , kterou jsme si označili číslem 1. Pak se snažíme nalézt v HN(CO)CA spektru signál se *stejnou* frekvencí  $^{13}\text{C}$ , odpovídající témuž  $\alpha$ -uhlíku (krok „a“ v dolní části obrázku 7). V HN(CO)CA spektru samozřejmě najdeme korelaci této  $^{13}\text{C}$ -frekvence s jinou NH skupinou, a to s NH skupinou *následující* aminokyseliny. V našem případě jde

o NH skupinu označenou číslem 3. Zprostředkovaně přes frekvenci  $\alpha$ -uhlíku se tak dozvíme, které dvě NH skupiny následují v sekvenci po sobě. V kroku „b“ přiložíme k dvojici proužků proužek z HNCA spektra, který odpovídá stejné NH skupině jako proužek z HN(CO)CA spektra (číslo tři). Krok „c“ je opakováním kroku „a“, v HN(CO)CA spektru hledáme signál se stejnou frekvencí  $^{13}\text{C}$ . V našem případě jej nalezneme v proužku 2. Pak připojíme proužek 2 z HNCA spektra (krok „d“) a hledáme v HN(CO)CA spektru signál se stejnou frekvencí  $^{13}\text{C}$ . Žádný takovýto signál ale nenalezneme. Znamená to, že sekvenční informace je zde přerušena (v našem případě proto, že jsme dorazili na konec peptidu, při přiřazování frekvencí proteinů je často sekvenční informace přerušena prolinem). Pokračujeme proto opačným směrem. V kroku „e“ přiložíme k proužku 1 spektra HNCA proužek 1 spektra HN(CO)CA. V kroku „f“ hledáme, jaký signál v HNCA spektru má stejnou frekvenci  $^{13}\text{C}$  jako signál 1 ve spektru HN(CO)CA. V našem případě jde o signál číslo 4. V kroku „g“ proto přiložíme proužek 4 spektra HN(CO)CA. Teď bychom měli hledat v HNCA spektru signál se stejnou frekvencí  $^{13}\text{C}$ , žádný takový signál ale už ve spektru nenalezneme, protože jsme dorazili na začátek peptidu. Výsledek analýzy nám ukazuje, že očíslované NH skupiny v sekvenci následují v pořadí 4-1-3-2.

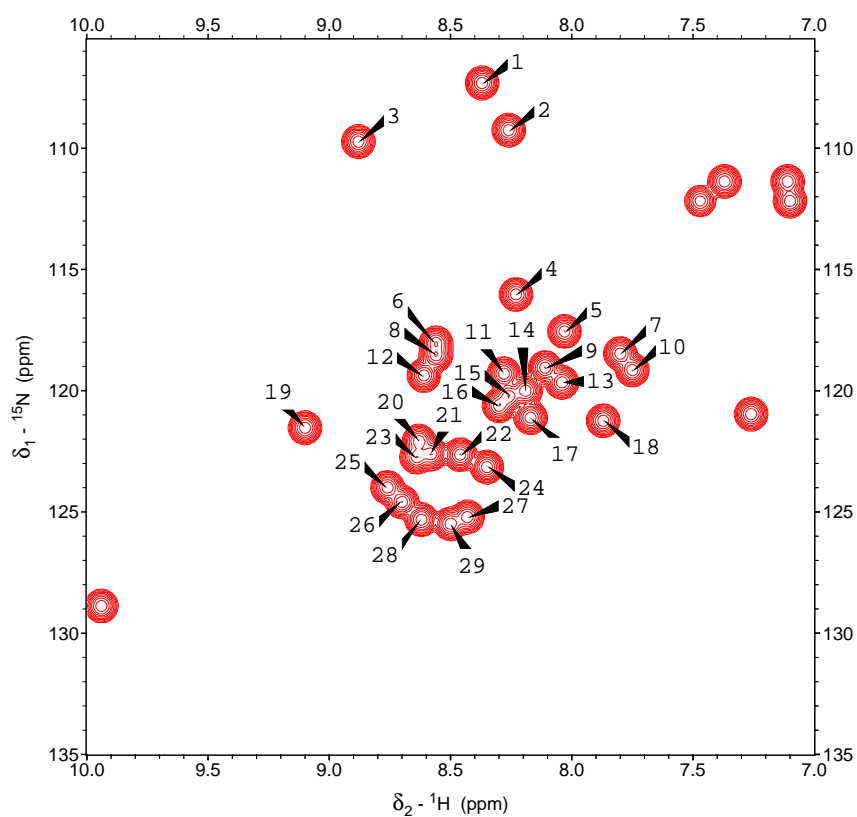
Srovnáním HNCA a HN(CO)CA spektra tedy porovnááme korelace téže NH skupiny s  $\alpha$  uhlíkem dvou sousedních aminokyselin. Zprostředkovaně přes frekvenci  $\alpha$ -uhlíku se tak dozvíme, které dvě NH skupiny následují v sekvenci po sobě. Můžeme tedy určit pořadová čísla všech NH skupin. K sekvenčnímu přiřazení se častěji využívá dvojice spekter, ve které jsou korelovány nejen  $\alpha$ , ale i  $\beta$  uhlíky (spektra HNCACB a HN(CO)CACB). Zahnutí  $\beta$  uhlíků snižuje možnost náhodného výskytu shodné frekvence v uhlíkové dimenzi a proto tato varianta experimentů bývá používána nejčastěji.

Tabulka 2:

Aminokyselina	číslo vrcholu na obr. 8	aminokyselina	číslo vrcholu na obr. 8
E 1	–	T 16	
D 2		M 17	
L 3		T 18	
A 4		W 19	
Q 5		N 20	
V 6		G 21	
L 7		I 22	
K 8		S 23	
R 9		V 24	
H 10		A 25	
V 11		V 26	
A 12		A 27	
V 13		G 28	
C 14		G 29	
I 15		S 30	

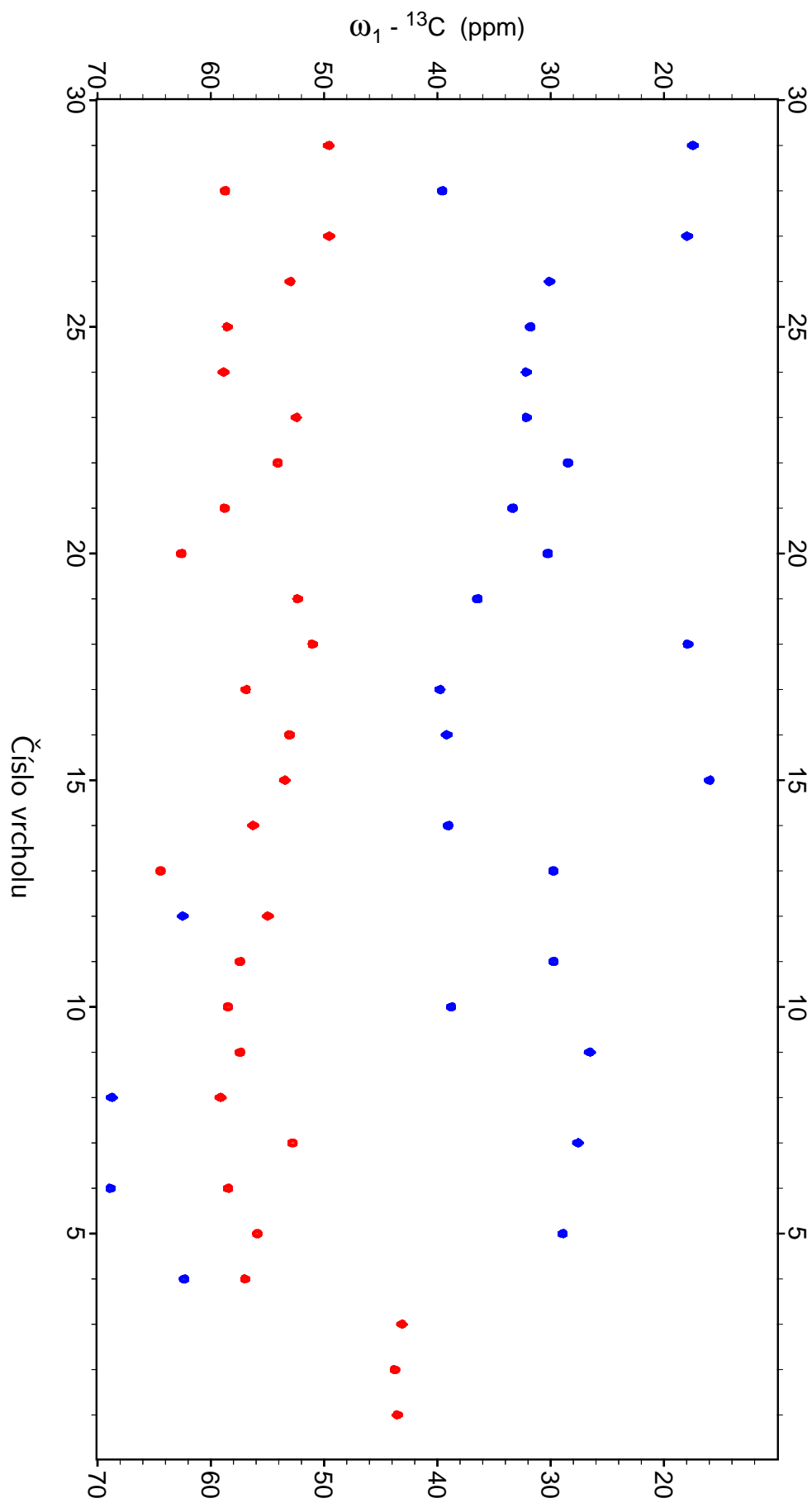
**Úkol 3:** Na základě spekter HNCACB a HN(CO)CACB přiřaďte v tabulce 2 jednotlivým aminokyselinám peptidu EDLAQVLKRHVAVCITMTWNGISVAVAGGS čísla vrcholů ve spektru proton-dusíkové korelace (obrázek 8). Postupujte podle návodu na obrázku 7. K přiřazení použijte takzvaný stripplot – komínky vyříznuté z 3D spekter nad jednotlivými vrcholy ve spektru proton-dusíkové korelace a seřazené vedle sebe podle čísel vrcholů. Stripploty si stáhněte z (HNCACB) a (HN(CO)CACB) ve formátu ucsf a shodné frekvence hledejte v programu Sparky. Pokud nemůžete program Sparky použít, vytiskněte si stripploty HNCACB a HN(CO)CACB vytištěné na předposlední a poslední stránce tohoto souboru (Modrou barvou jsou ve stripplotu HNCACB označeny frekvence uhlíku  $\beta$ ).

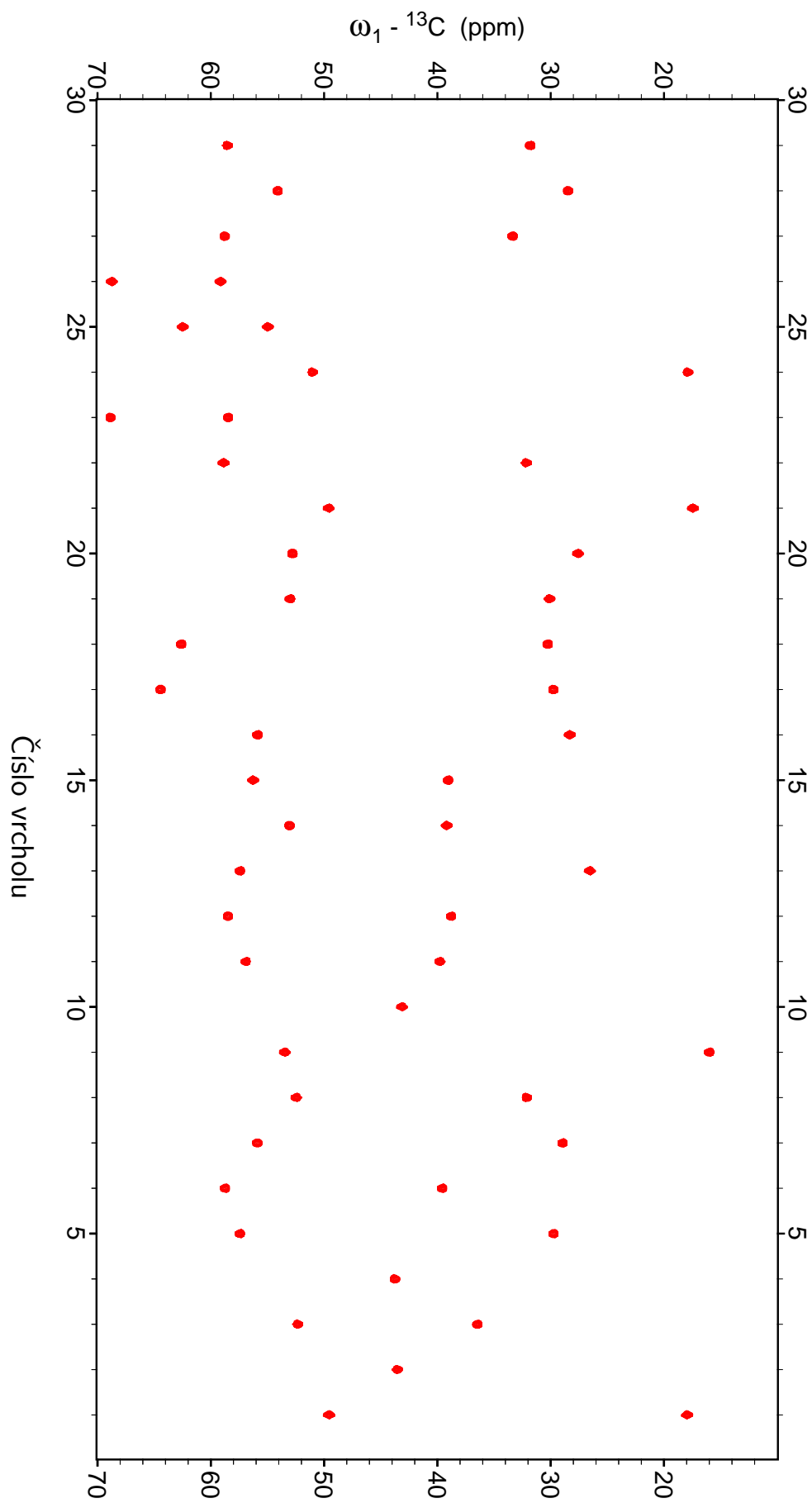
Milí Vibušníci, dospěli jsme na konec naší školy spinové alchymie. Vyzkoušeli jste si nesmírně důležitý úkol – zjistit, kterým atomům proteinu přísluší které frekvence pozorované ve spektrech. Bez tohoto kroku bychom nemohli bílkoviny pomocí NMR vůbec studovat, protože bychom nerozuměli jejich spektrům. Bylo by samozřejmě zajímavé pustit se teď po cestě, kterou nám přiřazení otevřelo, snažit se nejdříve určit, jakou mají zkoumané bílkoviny strukturu, potom zkoumat jejich pohyby a role, které hrají v organismech. Bohužel to není možné v mezích korespondenčního kurzu. I když třeba obrázek 6 z druhé třídy obsahuje informaci potřebnou pro výpočet struktury, přiřazení všech vrcholů by zabralo spoustu času. Potom byste potřebovali složité programy pro vlastní výpočet struktury. Určitě ale nemusíte litovat, že jsme se tak daleko nedostali. Na nejúspěšnější z vás čeká letní soustředění, kde vám můžeme ledacos ukázat přímo v laboratoři. A každému, kdo by se rozhodl pro studium na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně, jsou otevřené dveře do jedné z nejlépe vybavených laboratoří NMR v Evropě.



Obrázek 8: Spektrum ukazující proton-dusíkové korelace peptidu EDLAQVLKRHVAVGITMTWNGISVAVAGGS. Vrcholy odpovídající NH skupině peptidové vazby jsou náhodně očíslovány, neočíslované vrcholy přísluší N–H korelacím v postranních řetězcích aminokyselin.



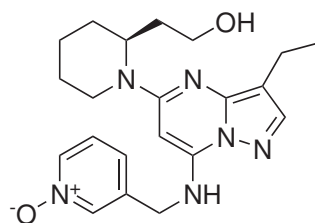




## D3 Organická syntéza – léčiva, biologicky aktivní látky

Autor: Kamil Paruch (e-mail: paruch@chemi.muni.cz)

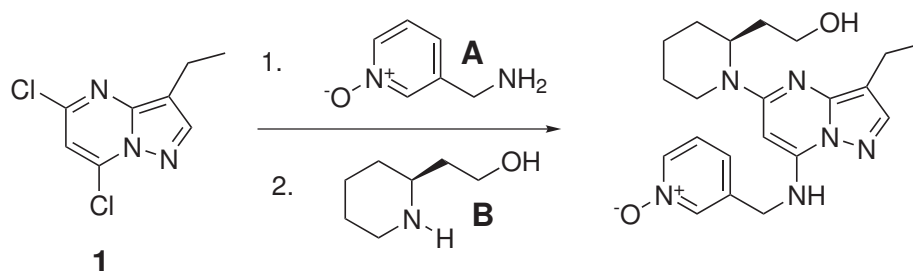
14 bodů



**dinaciclib**

Dr. Kamil Paruch, jenž v současnosti vede skupinu medicínální chemie na Ústavu chemie MU, během svého působení ve firmě Schering-Plough v USA objevil sloučeninu dinaciclib. Jedná se o účinný a selektivní inhibitor cyklin-dependentních kináz se silným protirakovinným účinkem. Sloučenina se nachází ve druhé fázi klinického testování.

Syntéza dinaciclibu vychází z intermediátu **1**, který je podroben dvěma reakcím s příslušnými aminy (Schéma 1).



**Schéma 1**

**Úkol 1:** Určete, o jaký typ reakcí se jedná.

**Úkol 2:** Většina organických transformací je doprovázena vznikem vedlejších produktů. Zkuste odhadnout alespoň dva vedlejší produkty u každé z těchto dvou reakcí.

**Úkol 3:** Jedna z těchto dvou reakcí probíhá za výrazně mírnějších podmínek než druhá. Zkuste určit a zdůvodnit, která to je.

**Úkol 4:** Navrhněte přípravu aminu **A** (pozn. přímá oxidace 3-(aminomethyl)pyridinu není vhodná).

## Z Doplňková úloha: Glykoluril

Autoři: Tomáš Fiala (e-mail: tom.fiala90@gmail.com) a  
Lukáš Mikulů (e-mail: Lukas.Mikulu@seznam.cz)

10 bodů

Glykoluril je zajímavá bicyklická a zároveň heterocyklická sloučenina, jejíž využití spočívá především v přípravě supramolekulárních hostitelských molekul, jako jsou molekulární klipsy a makrocikly.

**Úkol 1:** Nakreslete strukturní vzorec glykolurilu a systematicky jej pojmenujte s využitím názvosloví a) bicyklických sloučenin; b) kondenzovaných heterocyklických sloučenin.

Glykoluril se dá poměrně snadno připravit reakcí glyoxalu s dvěma molárními ekvivalenty močoviny ve vodném roztoku HCl.

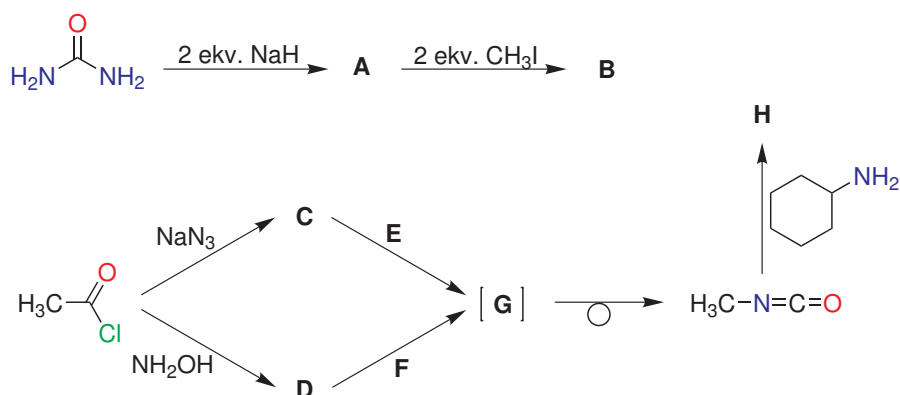
**Úkol 2:** Napište mechanismus vzniku glykolurilu výše uvedenou reakcí.

Velmi často však nechceme „obyčejný“ glykoluril, ale jeho derivát nesoucí alkylové nebo arylové substituenty na dusících jednoho z imidazolidinonových cyklů. Příprava takového glykolurilu pak zahrnuje dvě reakce, přičemž v první vzniká 4,5-dihydroxyimidazolidin-2-on a ten následně přeměníme na 2,4-dialkylglykoluril (číslováno podle bicyklického názvosloví).

**Úkol 3:** Napište schéma zmíněné dvoukrokové reakce, při které vzniká 2,4-dimethylglykoluril. Doplňte také podmínky (kyselé/bazické prostředí), za kterých si myslíte, že tyto reakce probíhají, a svoji volbu zdůvodněte.

Močovinu lze před přípravou glykolurilu všemožnými způsoby modifikovat. Tři reakce vedoucí k substituovaným močovinám si nyní zkusíme vyřešit.

**Úkol 4:** Doplňte následující reakční schémata:



Kromě již zmíněných *N*-substituovaných glykolurilů existují i deriváty, které nesou substituenty na methinových uhlících.

**Úkol 5:** Jaký derivát glykolurilu připravíme, když místo glyoxalu použijeme jako výchozí látku benzil?

**Úkol 6:** Jakou výchozí látku byste použili pro přípravu 1-methyl-5-isopropylglykolurilu?

Mezi významné reakce glykolurilu patří reakce s formaldehydem. V závislosti na zvolených podmínkách můžeme připravit širokou škálu produktů.

**Úkol 7:** Co vznikne reakcí glykolurilu se čtyřmi ekvivalenty formaldehydu ve vodném hydroxidu sodném?

**Úkol 8:** Lze předpokládat, že produkt předchozí reakce bude podléhat v kyselém prostředí intramolekulární kondenzační reakci za odštěpení dvou molekul vody. Nakreslete strukturní vzorec produktu.

**Úkol 9:** Pro reakci v otázce 7 můžeme použít formalín nebo paraformaldehyd. Jak se tyto formy formaldehydu liší a která z nich je rizikovější z hlediska bezpečnosti práce a proč?

## ZZ Druhá doplňková úloha

*Autor: Petr Stadlbauer (e-mail: silchemix@centrum.cz)*

3 body

Občas býváme kritizováni za naše logo s tím, že ViBuCh nemá nic společného s jadernou problematikou. Abychom toto tvrzení vyvrátili, rozhodli jsme se zařadit tuto aktuální úlohu.

**Úkol 1:** Třsuqoqtogbčweqxžbrqťmq gožjblcegožjbsgcmuqswbtgbňqiqwbqčgtucxgubtcsmqhchcgň, bx okmcbucmbňgchcnqñcotmgbcbrsceqzogbuwsktukdmžbcuscsmuxokbeknq.bRqťngugbqčsc gmbucmqxgiqbtcsmqhchchwbcocrkťug, bmugsqwbňgchcnqñcotmqwbuwsktukdmžb clkñcxqwbwtucxčwbrškrqňkocbuxcsgňbwxqeokm.

**Úkol 2:** Do následujícího obrázku dokreslete orgány, které budou při vystavení radioaktivitě poškozeny nejsnáze, tj. již relativně malá dávka povede k jejich poškození.

