

Dynamische Kernpolarisation bei deuterierten Proteinen**

Ümit Akbey, W. Trent Franks, Arne Linden, Sascha Lange, Robert G. Griffin,
Barth-Jan van Rossum und Hartmut Oschkinat*

Die NMR-Spektroskopie unter Drehung im magischen Winkel (MAS) hat sich zu einer zuverlässigen und vielfältig anwendbaren Methode entwickelt, um die Struktur und Dynamik biologischer Systeme zu untersuchen.^[1–3] Für strukturelle Studien an Amyloiden,^[4,5] nanokristallinen Proteinen^[6,7] oder Membranproteinen^[8] stellt sie derzeit ein unverzichtbares Werkzeug dar. Jedoch begrenzt die geringe Empfindlichkeit von direkt detektierten ¹³C- und ¹⁵N-Signalen in MAS-Spektren die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode, insbesondere bei Proben, die nur in kleinen Mengen bereitgestellt werden können. Durch eine Verbesserung der Empfindlichkeit könnte diese Methode neuen Anwendungen geöffnet werden. Bemerkenswerte Fortschritte in dieser Hinsicht wurden durch die Einbindung der dynamischen Kernpolarisation (Dynamic Nuclear Polarisation, DNP) in die MAS-NMR-Messtechnik erzielt.^[9–17] Die DNP nutzt den durch Mikrowelleneinstrahlung ermöglichten Polarisationstransfer von einem paramagnetischen Zentrum, z. B. einem freien Nitroxylradikal, zu einem Kernspin. Es konnte gezeigt werden, dass dies zu einheitlich polarisierten makromolekularen Proben führt. Theoretisch können so Signalverstärkungen von $\epsilon = (\gamma_e/\gamma_i) \approx 660$ für ¹H erreicht werden; Signalverstärkungen von $\epsilon = 100$ –200 wurden bereits gemessen. Jedoch wurden mit DNP bei biologischen Systemen, unter anderem Lysozymen^[18] und Bakteriorhodopsin,^[16,19,20] bislang nur geringere Signalverstärkungen von $\epsilon = 40$ –50 erzielt. Eine Ausnahme ist das amyloidogene Peptid GNNQQNY_{7–13}. Dieses bildet Nanokristalle mit einer langen T_1 -Zeit für die Protonen, wodurch Verstärkungen von $\epsilon \approx 100$ beobachtet wurden.^[21]

Vor fast zehn Jahren konnte an Modellsystemen gezeigt werden, dass durch Deuterierung des Lösungsmittels ϵ deutlich erhöht werden kann.^[22] Daraufhin wurden viele DNP-Experimente in ²H-markierten Gläsern durchgeführt, z. B. in [D₆]DMSO oder [D₈]Glycerol/D₂O/H₂O (im ungefähren Verhältnis 6:3:1).^[23–25] Die ²H-Konzentration von ca. 90 % verlangsamt die Relaxation der Protonen, deren Konzentra-

tion von 10 % jedoch ausreicht, um über ¹H-¹H-Spindiffusion die erhöhte Polarisation gleichmäßig in der Probe zu verteilen. Die Gültigkeit dieser Theorie erklärt den Erfolg der DNP-Experimente mit GNNQQNY, obwohl dieses Peptid protoniert war.

Obwohl also Deuterierung zu einer deutlich ausgeprägteren DNP-Signalverstärkung führen kann, wurde sie bisher noch nicht auf Proteine angewendet. Im Folgenden zeigen wir, dass eine Deuterierung von Proteinen zu einer drei- bis fünffach höheren DNP-Verstärkung in ¹³C-MAS-NMR-Spektren führt. Aufgrund dieser sehr signifikanten Steigerung der DNP-Effizienz könnte sich diese Methode zum Standard bei DNP-MAS-Experimenten mit biologischen Systemen entwickeln.

Die hier beschriebenen Experimente wurden mit der SH3-Domäne des Proteins α -Spectrin durchgeführt, bei der zunächst alle Aminosäuren deuteriert wurden und die dann in einem geeigneten H₂O/D₂O-Puffer umkristallisiert wurde, um das gewünschte ¹H/²H-Verhältnis an den austauschbaren Positionen einzustellen. Anschließend wurde das Protein in einer [D₈]Glycerol/D₂O/H₂O-Matrix gelöst. Abbildung 1 zeigt einen Vergleich von 1D-¹³C-MAS-Spektren, aufgenommen mit kontinuierlicher Mikrowellenbestrahlung und unter Verwendung der in Abbildung 1A und B gezeigten Pulssequenzen, mit Kreuzpolarisation (CP) für protoniertes SH3 (Abbildung 1C) und deuteriertes SH3 (Abbildung 1D). Die Abbildungen 1E und F zeigen MAS-Spektren mit direkter ¹³C-Anregung und unterschiedlichen Wartezeiten zwischen den Messungen (recycle delays, RDs). Die gemessene DNP-Signalverstärkung von $\epsilon = 31$ bei den CP-Experimenten mit dem protonierten und vollständig ¹³C/¹⁵N-markierten Protein (Abbildung 1C) ist vergleichbar mit zuvor beobachteten Verstärkungen.^[16,19,26]

Im deuterierten Protein hingegen ist die Effizienz der DNP-Verstärkung um einen Faktor von rund 3.9 höher als im protonierten ($\epsilon = 120$, Abbildung 1D). Des Weiteren kann die Signalverstärkung verglichen mit der im ¹³C-CP-MAS-Experiment mit vollständig protoniertem SH3 bei direkter ¹³C-Anregung und deuterierter Probe sogar um einen Faktor von etwa 4.8 ($\epsilon = 145$, Abbildung 1F) gesteigert werden.

Der Empfindlichkeitsanstieg im ¹³C-CP-DNP-MAS-Experiment wird durch die verstärkte Polarisation des ¹H-Spinreservoirs bestimmt, die dann auf ¹³C übertragen wird und dabei durch den Faktor γ_e/γ_{1H} limitiert ist. In gleicher Weise hängt im MAS-Experiment mit direkter ¹³C-Anregung die Signalverstärkung vom Verhältnis γ_e/γ_{13C} ab, das um den Faktor 4 größer ist. Daher wird eine höhere Signalverstärkung im Experiment mit direkter ¹³C-Anregung erwartet, obwohl die benötigte Wartezeit aufgrund langsamerer Spindiffusion in das ¹³C-Reservoir länger sein kann. Diese Über-

[*] Dr. Ü. Akbey, Dr. W. T. Franks, A. Linden, S. Lange,
Dr. B.-J. van Rossum, Prof. H. Oschkinat
NMR-Supported Structural Biology
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-9479-3199
E-Mail: oschkinat@fmp-berlin.de

Prof. R. G. Griffin
Francis Bitter Magnet Laboratory and Department of Chemistry
Massachusetts Institute of Technology (USA)

[**] Wir danken Anne Diehl und Kristina Rehbein für die Synthese der perdeuterierten SH3-Proben mit unterschiedlichem Protonierungsgrad.

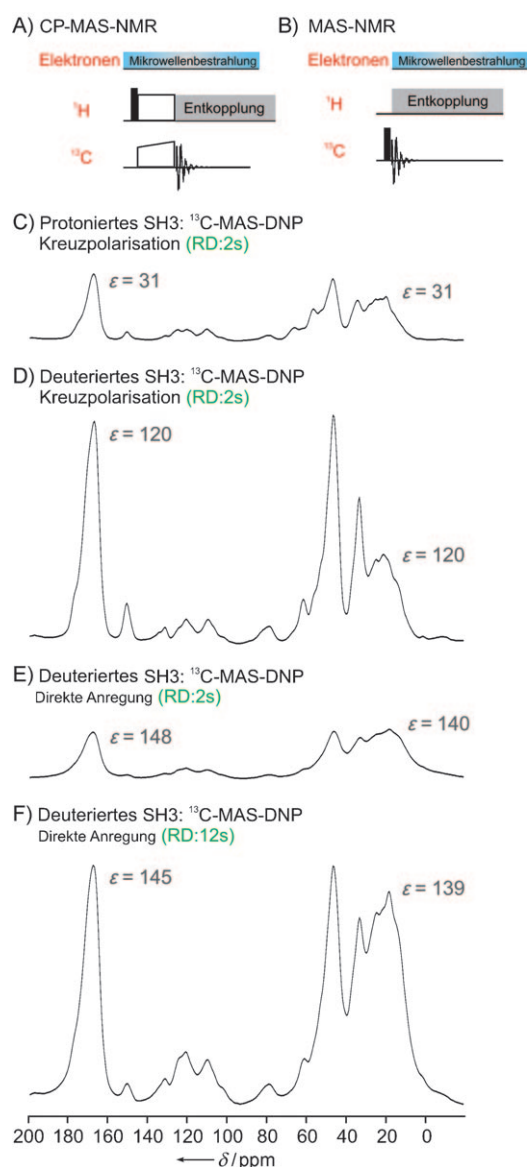


Abbildung 1. Pulssequenzen für die Aufnahme DNP-verstärkter ^{13}C -NMR-Spektren mit CP MAS (A) und direkter ^{13}C -Anregung (B) bei ca. 98 K und 9 kHz MAS. C) DNP-verstärktes ^{13}C -CP-MAS-Spektrum von protoniertem SH3. DNP-verstärkte ^{13}C -CP-MAS- (D) und MAS-Spektren (E, F) von deuteriertem SH3 mit einem Protonierungsgrad von 50 % an den austauschbaren Positionen. Es wurden Wartezeiten von 2 s (C–E) und 12 s (F) verwendet. Während der Datenakquisition wurden die Proben kontinuierlich mit Mikrowellen bestrahlt. Für die Berechnung der DNP-Signalverstärkung wurden Spektren mit Mikrowellenbestrahlung mit Spektren verglichen, die unter exakt den gleichen Bedingungen, jedoch ohne Mikrowellenbestrahlung aufgenommen wurden. Um einen direkten Vergleich der Spektren zu ermöglichen, sind diese mit gleichem Rauschniveau dargestellt.

legung wurde kürzlich experimentell bestätigt.^[26] Zudem wurde gezeigt, dass das Maximum im Signalverstärkungsprofil von ^1H und ^{13}C identisch ist, doch liegt das optimale Feld für die ^{13}C -Signalverstärkung aufgrund des kleineren gyromagnetischen Wertes $\gamma_{^{13}\text{C}}$ auf der gegenüberliegenden Seite des Profils. Dennoch sind im Falle von SH3 die T_1 -Zeiten von ^{13}C kurz, sodass in DNP-MAS-Experimenten eine

Signalverstärkung von $\epsilon = 148$ (Abbildung 1E) erreicht werden kann. Diese Signalverstärkung ist signifikant größer als bei vergleichbaren CP-Experimenten (Abbildung 1D). Bei vollständig protoniertem SH3 und direkter ^{13}C -Anregung wird dagegen nur ein ^{13}C -DNP-Verstärkungsfaktor von $\epsilon = 8$ gemessen.

Diese Beobachtungen sprechen stark dafür, dass sowohl die Proteindeuterierung als auch die direkte ^{13}C -Anregung für den weiteren Anstieg von ϵ verantwortlich sind. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass die DNP-Signalverstärkung bei direkter ^{15}N -Anregung und 50 % Protonen an den austauschbaren Positionen $\epsilon = 207$ beträgt. Um die Signalintensität pro Zeiteinheit zu quantifizieren, wurde ein ^{13}C -NMR-Spektrum mit direkter Anregung und kurzer Wartezeit (2 s) von einer deuterierten Probe mit 50 % Protonen an den austauschbaren Positionen aufgenommen (Abbildung 1E). Die Intensität der CO- und Glycerol-C-Signale ist geringer als im CP-Spektrum von vollständig protoniertem SH3 (Abbildung 1C), während die Signalstärke in der aliphatischen Region leicht erhöht ist.

Abbildung 2A zeigt die Abhängigkeit der DNP-Signalverstärkung von der Konzentration austauschbarer Protonen in Protein und Puffer. Die Verstärkungen, gemessen mit unterschiedlichen Experimenten (MAS oder CP-MAS) an den Kernen ^1H , ^{13}C und ^{15}N , hängen stark vom Protonierungsgrad ab. Ein schrittweiser Anstieg der ^{13}C - und ^{15}N -DNP-Signalverstärkung kann durch Erhöhung des Protonierungsgrades von 15 auf 50 % erreicht werden. In allen Experimenten ist die DNP-Signalverstärkung von vollständig protoniertem SH3 (Messpunkte ganz rechts) geringer. Diese Daten deuten darauf hin, dass einerseits ein Zuviel an Protonen die Signalverstärkung vermindert und andererseits ein Mangel an Protonen eine Verteilung der Polarisation durch Spindiffusion verhindert und damit auch zu einer reduzierten Signalverstärkung führt.^[23–25]

Die vollständig protonierte SH3-Probe hat mit Ausnahme der Werte für ^{15}N kleinere T_1 -Werte als die perdeuterierten Proben, während die Werte der deuterierten Proteine einander relativ ähnlich sind (Abbildung 2B). Daraus resultiert ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis pro Zeiteinheit für die vollständig protonierte Probe, da das Experiment schneller wiederholt werden kann. Mit höheren Diradikalkonzentrationen kann dieses Problem umgangen werden, vorausgesetzt, das Radikal dringt nicht in den Kristall ein und führt so zu einer Verbreiterung der ^{13}C -Linien. Weiterhin könnte die Möglichkeit, ^2H für den initialen Polarisationstransfer zu nutzen, die absolute Empfindlichkeit deuterierter Proteine erhöhen und damit helfen, die Polarisation weiter zu verstärken.

Die Auflösung, die derzeit bei tiefen Temperaturen und einer Feldstärke von 400 MHz erreicht wird, ist noch nicht ausreichend für eine vollständige Zuordnung der Signale vollständig markierter Proteine. Daher wäre es von Interesse, die Temperatur zu erhöhen, um so eine höhere Auflösung zu erzielen, wobei ein Teil der DNP-Signalverstärkung geopfert würde.^[27] Dafür müsste eine Kompromisstemperatur definiert werden, bei der eine ausreichende Auflösung und zugleich eine ausreichend große DNP-Signalverstärkung erzielt werden können. Um den Einfluss der Temperatur zu unter-

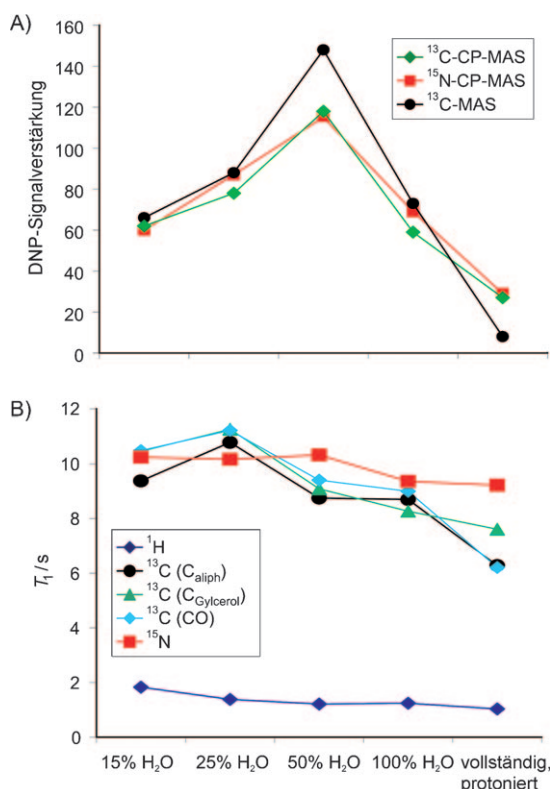


Abbildung 2. Die Abhängigkeit der DNP-Signalverstärkung (A) und der T_1 -Relaxationszeit (B) von der Protonenkonzentration, untersucht an einer vollständig (an austauschbaren und nichtaustauschbaren Positionen) protonierten und drei verschiedenen (an nichtaustauschbaren Positionen) deuterierten SH3-Proben. Der Protonierungsgrad an den austauschbaren Positionen wurde durch Umkristallisation von SH3 in Puffern mit unterschiedlichen H₂O/D₂O-Verhältnissen eingestellt. Als H₂O-Konzentrationen wurden 15, 25, 50 und 100% gewählt, um die volle Bandbreite unterschiedlicher Protonierungsgrade abzudecken. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von etwa 98 K, einer MAS-Frequenz von ca. 9 kHz und einer Mikrowellenleistung von rund 5 W in einem Zirkoniumoxidrotor aufgenommen. Die eingezeichneten Linien dienen nur zur Orientierung; die experimentellen Datenpunkte sind diskontinuierlich.

suchen, wurden die ¹H- und die ¹³C-Signalverstärkungen bestimmt, die bei steigender Temperatur (98–200 K) sowohl bei vollständig protoniertem als auch bei perdeuteriertem SH3 auftreten (Abbildung 3). In diesem Temperaturbereich verursacht ein Anstieg der Temperatur um 20 K eine Verminderung der Signalverstärkung von 30–40%. Oberhalb von 160 K ist ein DNP-MAS-NMR-Experiment für das vollständig protonierte oder das perdeuterierte Protein mit einem Protonierungsgrad von 15% aufgrund des drastisch sinkenden DNP-Effekts so gut wie unmöglich. Für die SH3-Probe mit 50% Protonierungsgrad sinkt die Signalverstärkung von 98 bis 178 K jedoch nur um 90%, d. h., die gemessenen Verstärkungen betragen noch $\epsilon = 10$ bei einem ¹³C-CP-Experiment bzw. 15 bei direkter ¹³C-Anregung. Daher ist diese Probe für Hochtemperatur-DNP-Experimente geeignet.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich die Perdeuterierung eines Proteins deutlich auf die zu beobachtende DNP-Signalverstärkung auswirkt. Gegenüber vollständig protoniertem SH3 nahm die Verstärkung um den

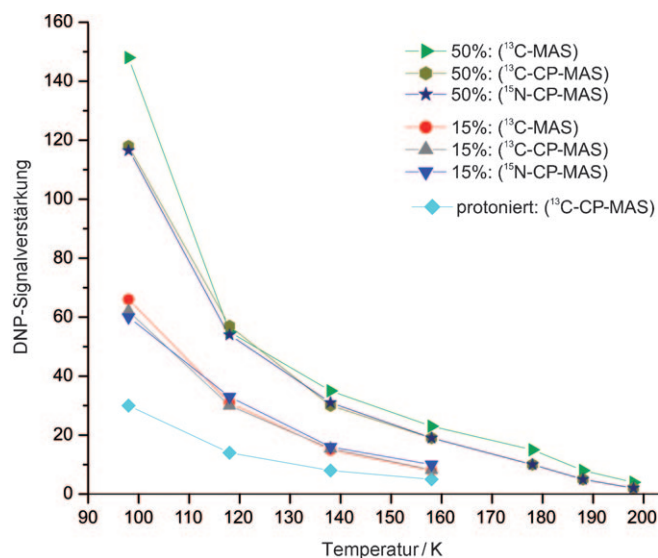


Abbildung 3. Die Temperaturabhängigkeit der DNP-Verstärkung für ¹H, ¹³C und ¹⁵N. Verglichen sind protoniertes und perdeuteriertes (15 und 50% Protonen an den austauschbaren Positionen) SH3. Die Verstärkungsfaktoren wurden für jede Temperatur und jeden Experimenttyp ermittelt. Für das protonierte SH3 sind nur die ¹³C-CP-DNP-MAS-Werte gezeigt.

bemerkenswerten Faktor von 3.9 für ¹³C-CP-MAS- bzw. 18.5 für ¹³C-MAS-Experimente zu. Der optimale Protonierungsgrad beträgt rund 50%, wobei eine maximale Verstärkung von $\epsilon = 148$ in ¹³C-MAS-NMR-Spektren mit einem Zirkoniumoxidrotor erreicht wurde. Durch die Verwendung von Saphirrotoren kann die Verstärkung um zusätzliche 20% erhöht werden, sodass insgesamt eine Verstärkung von $\epsilon = 180$ zu erwarten ist. Außerdem kann das deuterierte SH3 mit einem Protonierungsgrad von 50% auch bei höheren Temperaturen gemessen werden und zeigt dennoch eine deutliche DNP-Verstärkung. Wir erwarten, dass die Verwendung deuterierter Proteine in DNP-MAS-NMR-Experimenten in Zukunft neue Anwendungen bei schwierigen biologischen Systemen ermöglicht.

Experimentelles

Details der Probenpräparation durch Entfaltung, Austausch und Rückfaltung von perdeuteriertem und protoniertem SH3 wurden an anderer Stelle beschrieben.^[28,29] Die Proben für die DNP-MAS-Messungen wurden durch Lösen des Proteins in einer H₂O/D₂O/Glycerol-Mischung (1:3:6 Vol.-%) hergestellt, die eine stabile Glasmatrix bildet und zugleich die Denaturierung des Proteins durch Eiskristalle verhindert.^[30] Zusätzlich wurde das Diradikal Totapol^[31] mit einer Endkonzentration von 20 mM gelöst; dies entspricht einer Radikalkonzentration von 40 mM.

Alle Festkörper-DNP-MAS-NMR-Experimente wurden an einem kommerziellen Bruker-DNP-Spektrometer mit einer ¹H-Frequenz von 400 MHz und einer Mikrowellenfrequenz von 263 GHz durchgeführt. Die Spektren wurden unter Verwendung eines Dreifachresonanz-Niedertemperatur-HCN-DNP-Probenkopfes und von ZrO₂-Rotoren (Durchmesser 3.2 mm) aufgenommen. Cryotemperaturen wurden mithilfe einer Bruker-Niedertemperatur-MAS-Einheit erreicht und kontrolliert. Die Signalverstärkung wurde in situ, direkt im Magnetfeld im Innern des Probenkopfes erzielt. Die Mikrowel-

lenstrahlung im Millimeterbereich, mit einer Energie von rund 5 W, wurde durch einen Bruker-Gyrotron-Oszillator generiert.

Alle ^{13}C -DNP-MAS- und -CP-MAS-Spektren wurden bei einer Rotorfrequenz von $\omega_r/2\pi = 8888\text{ Hz}$ und unter Verwendung von $\pi/2$ -Pulsen mit einer Länge von $4\text{ }\mu\text{s}$ (^1H) bzw. $5\text{ }\mu\text{s}$ (^{13}C) aufgenommen. Die CP-Kontaktzeit betrug 2 ms . Mit einem Saphirrotor war die Signalverstärkung um etwa 20 % höher. Bemerkenswerterweise wurde durch die Mikrowellenbestrahlung die T_1 -Relaxationszeit um rund 30 % reduziert. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf eine zusätzliche Probenenerwärmung zurückzuführen.

Eingegangen am 6. April 2010

Online veröffentlicht am 19. August 2010

Stichwörter: Analytische Methoden ·

Dynamische Kernpolarisation · Festkörper-NMR-Spektroskopie · Hochtemperatur-DNP · Perdeuterierte Verbindungen

- [1] R. G. Griffin, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 508.
- [2] A. E. McDermott, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 554.
- [3] R. Tycko, *Quart. Rev. Biophys.* **2006**, 39, 1.
- [4] C. P. Jaroniec, C. E. MacPhee, V. S. Bajaj, M. T. McMahon, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 711.
- [5] C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier, *Science* **2008**, 319, 1523.
- [6] F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, 420, 98.
- [7] A. J. Nieuwkoop, B. J. Wylie, W. T. Franks, G. J. Shah, C. M. Rienstra, *J. Chem. Phys.* **2009**, 131.
- [8] J. M. Griffiths, K. V. Lakshmi, A. E. Bennett, J. Raap, C. M. Vanderwielen, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10178.
- [9] A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, 92, 411.
- [10] T. R. Carver, C. P. Slichter, *Phys. Rev.* **1953**, 92, 212.
- [11] T. R. Carver, C. P. Slichter, *Phys. Rev.* **1956**, 102, 975.
- [12] R. A. Wind, M. J. Duijvestijn, C. Vanderlugt, A. Manenschijn, J. Vriend, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1985**, 17, 33.
- [13] M. Afeworki, R. A. McKay, J. Schaefer, *Macromolecules* **1992**, 25, 4084.
- [14] L. R. Becerra, G. J. Gerfen, B. F. Bellew, J. A. Bryant, D. A. Hall, S. J. Inati, R. T. Weber, S. Un, T. F. Prisner, A. E. McDermott, K. W. Fishbein, K. E. Kreischer, R. J. Temkin, D. J. Singel, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, 117, 28.
- [15] G. J. Gerfen, L. R. Becerra, D. A. Hall, R. G. Griffin, R. J. Temkin, D. J. Singel, *J. Chem. Phys.* **1995**, 102, 9494.
- [16] M. Rosay, J. C. Lansing, K. C. Haddad, W. W. Bachovchin, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13626.
- [17] A. B. Barnes, G. D. Paëpe, P. C. A. van den Wel, K.-N. Hu, C.-G. Joo, V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *Appl. Magn. Reson.* **2008**, 34, 237.
- [18] D. A. Hall, D. C. Maus, G. J. Gerfen, S. J. Inati, L. R. Becerra, F. W. Dahlquist, R. G. Griffin, *Science* **1997**, 276, 930.
- [19] M. L. Mak-Jurkauskas, V. S. Bajaj, M. K. Hornstein, M. Belenky, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 883.
- [20] V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, M. Belenky, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 9244.
- [21] P. C. A. van der Wel, K. N. Hu, J. Lewandowski, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10840.
- [22] M. M. Rosay, Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, **2001**.
- [23] K. N. Hu, H. H. Yu, T. M. Swager, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10844.
- [24] K.-N. Hu, V. S. Bajaj, M. M. Rosay, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2007**, 126, 044512.
- [25] K.-N. Hu, C. Song, H.-h. Yu, T. M. Swager, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2008**, 128, 052321.
- [26] T. Maly, A.-F. Miller, R. G. Griffin, *ChemPhysChem* **2010**, 11, 999.
- [27] A. Linden, W. T. Franks, U. Akbey, B. J. van Rossum, H. Oschkinat, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [28] U. Akbey, S. Lange, W. T. Franks, R. Linser, K. Rehbein, A. Diehl, B. J. van Rossum, B. Reif, H. Oschkinat, *J. Biomol. NMR* **2010**, 46, 67.
- [29] U. Akbey, H. Oschkinat, B. J. van Rossum, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 17054.
- [30] A. Baudot, L. Alger, P. Boutron, *Cryobiology* **2000**, 40, 151.
- [31] C. Song, K.-N. Hu, C.-G. Joo, T. M. Swager, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11385.