

DOI: 10.1002/ange.200600328

**Ultrahochaufgelöste  $^1\text{H}$ -MAS-Festkörper-NMR-Spektren unter Verwendung von hohen Deuterierungsgraden\*\****Veniamin Chevelkov, Kristina Rehbein, Anne Diehl und Bernd Reif\**

Die Strukturanalyse biologischer Festkörper durch hochaufgelöste MAS-Festkörper-NMR-Spektroskopie hat sich in den vergangenen Jahren rasant entwickelt und führte zur vollständigen Strukturbestimmung mehrerer kleiner Peptide und Proteine.<sup>[1–4]</sup> Die erfolgreiche Zuordnung der NMR-Resonanzen und die Ermittlung struktureller Zwangsbedingungen in vollständig isopenangereicherten Peptiden und Proteinen (hauptsächlich  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ ) ist jedoch immer noch durch die Auflösung der Resonanzen und die Empfindlichkeit der Experimente limitiert. Eine höhere Empfindlichkeit in der Festkörper-NMR-Spektroskopie kann durch direkte Detektion von Protonen erzielt werden. Hierbei macht man sich das hohe gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$  der Protonen zunutze, das andererseits aber zu breiten Resonanzlinien führt. Es wurden mehrere experimentelle Ansätze vorgeschlagen, in denen die Linienverbreiterung durch homonukleare Entkopplungssequenzen unterdrückt wird. Solche Sequenzen, bei denen jeweils stroboskopisch zwischen den Radiofrequenz(RF)-Pulsen detektiert wird,<sup>[5,6]</sup> ergeben skalierte  $^1\text{H}$ -Linienbreiten von 140 bis 400 Hz. Der Ansatz erfordert aber eine große Empfängerbandbreite, die wiederum zu einem stärkeren Rauschen führt und letztlich das maximal erreichbare Signal-Rausch-Verhältnis verkleinert. Weiterhin führt die Anwendung einer Mehrfachpulssequenz zu einer Skalierung der  $^1\text{H}$ -chemischen Verschiebung. In jüngerer Zeit wurden Hochgeschwindigkeits-MAS-Techniken entwickelt, die es ermöglichen, den Probenrotor mit einer Frequenz von 35–60 kHz zu rotieren.<sup>[7–9]</sup> Allerdings werden dipolare Wechselwirkungen bei homogen verbreiterten Linien selbst bei diesen sehr hohen MAS-Rotationsfrequenzen bei vollständig protonierten Proben nicht vollständig ausgemittelt.

Ein anderer Ansatz zur Verschmälerung der  $^1\text{H}$ -Linienbreiten ist die gezielte Verdünnung des Protonenspinreservoirs<sup>[10–14]</sup> durch Perdeuterierung der Probe und anschließende Substitution der austauschenden Deuteronen mit

[\*] V. Chevelkov, K. Rehbein, Dr. A. Diehl, Prof. Dr. B. Reif  
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)  
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 30-9479-3199  
E-mail: reif@fmp-berlin.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die DFG (Geschäftszeichen Re1435) unterstützt. Die Autoren danken H. Oschkinat für hilfreiche Diskussionen und Unterstützung dieses Projekts. MAS = magic-angle spinning.



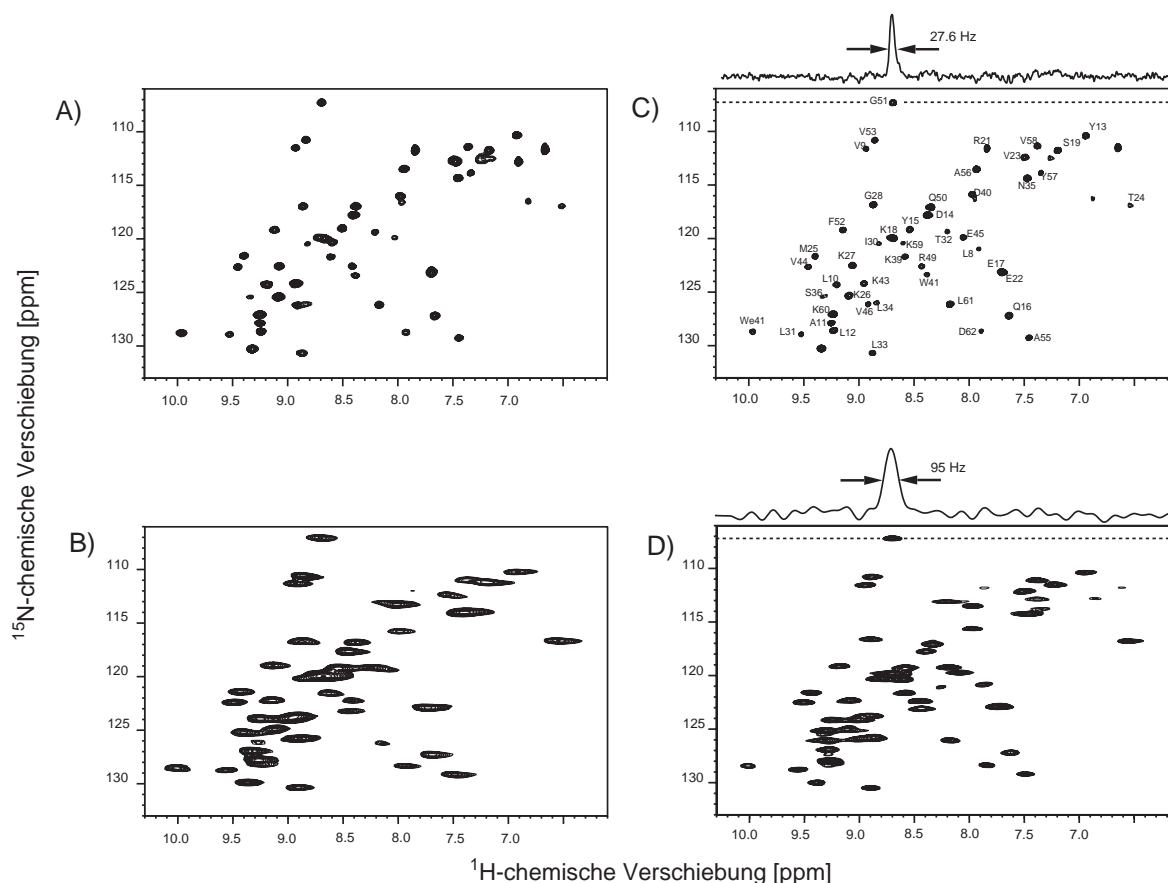
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Protonen. Selbst bei moderaten MAS-Rotationsfrequenzen von 10 bis 20 kHz lassen sich damit  $^1\text{H}$ -Linienbreiten von 150–250 Hz bzw. 80–150 Hz erzielen (ohne bzw. mit  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -homonuklearer Entkopplung). Diese Markierungsstrategie ermöglicht zudem die Quantifizierung von Weitbereichs- $\text{H}^{\text{N}}$ - $\text{H}^{\text{N}}$ -Entfernungen,<sup>[12,15,16]</sup> die Detektion von dynamischen Wassermolekülen in der Proteinstruktur<sup>[16,17]</sup> und die Charakterisierung der Proteinseitenkettendynamik.<sup>[18,19]</sup>

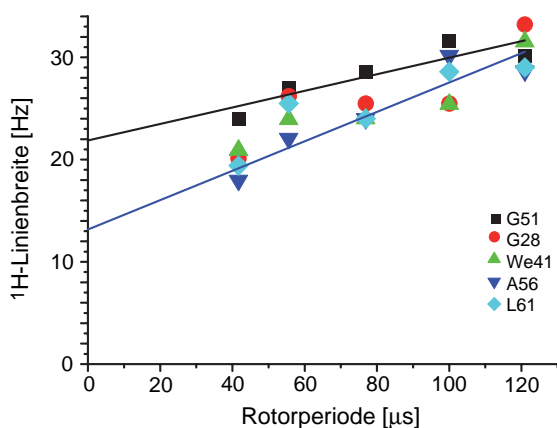
Wir zeigen hier, dass eine weitere Erhöhung des Deuterierungsgrades durch Umkristallisation aus einem  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Gemisch im Verhältnis 10:90 deutlich schmalere Protonenlinienbreiten ermöglicht, ohne dass es zu Empfindlichkeits-einbußen kommt. Experimentell können  $^1\text{H}$ -Linienbreiten von 17 bis 35 Hz bei moderaten Rotationsfrequenzen von 8 bis 24 kHz ohne Anwendung homonuklearer Entkopplungssequenzen erzielt werden. Die Experimente wurden am Beispiel einer  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markierten, mikrokristallinen Probe der SH3-Domäne von  $\alpha$ -Spectrin ausgeführt. Die Korrelationspektren sind unseres Wissens die am höchsten aufgelösten  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren, die bislang von einer Festkörperprobe erhalten wurden.

Abbildung 1 zeigt die  $2\text{D-}^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Korrelationspektren der Referenzprobe (Abbildung 1 B,D) und der  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten Probe (Abbildung 1 A,C). Die  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -detektierenden Experimente (Abbildung 1 A bei 400 MHz, Abbildung 1 C bei 600 MHz) wurden mit der in Abbildung 4 A bzw. B gezeigten NMR-Pulssequenz ausgeführt (siehe *Experimentelles*). Die MAS-Rotationsfrequenzen wurden für die  $^1\text{H}$ -Experimente auf 13 kHz und für die  $^{15}\text{N}$ -Experimente auf 10 kHz gesetzt. Es wurde gezeigt, dass die  $^1\text{H}$ -Linienbreite in der indirekten Dimension nicht stark von der MAS-Rotationsfrequenz abhängt,<sup>[6,20]</sup> solange eine induzierte Linienverbreiterung durch Interferenz zwischen der MAS-Frequenz und der Periodizität der Entkopplungssequenz vermieden wird.<sup>[20]</sup> Die Auflösung in der Protonendimension ist bei der  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten Probe eindeutig besser, und ein vollständig aufgelöstes  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrum kann bereits bei 400 MHz erhalten werden.

Abbildung 2 zeigt die  $^1\text{H}$ -Linienbreite als Funktion der Rotorperiode für einige ausgewählte Aminosäurereste. Die Linienbreite verhält sich indirekt proportional zur Rotationsfrequenz, was mit früheren Untersuchungen übereinstimmt.<sup>[7,21]</sup> Insbesondere fanden Rienstra und Mitarbeiter<sup>[22]</sup>



**Abbildung 1.** A,C)  $^1\text{H}$ -detektierende  $2\text{D-}^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren der  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten Probe (deutiertes SH3, 10%  $^1\text{H}$  an austauschenden Positionen), aufgenommen bei 400 MHz (A) und 600 MHz (C) (64 Scans pro Inkrement,  $t_1^{\text{max}}(^{15}\text{N}) = 26.4$  ms,  $t_2^{\text{max}}(^1\text{H}) = 100.0$  ms, Experimentierzeit = 3.8 h). B,D)  $^{15}\text{N}$ -detektierende  $2\text{D-}^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren der Referenzprobe (deutiertes SH3, 100%  $^1\text{H}$  an austauschenden Positionen), aufgenommen bei 400 MHz (B) und 600 MHz (D) (8 Scans pro Inkrement,  $t_1^{\text{max}}(^1\text{H}) = 17.2$  ms,  $t_2^{\text{max}}(^{15}\text{N}) = 37.0$  ms, Experimentierzeit = 0.6 h). Die Aufnahme einer größeren Zahl von Punkten in der indirekten  $^1\text{H}$ -Dimension bringt keine bessere Auflösung in dieser Dimension mit sich. Alle Spektren wurden durch Faltung mit einer Exponentialfunktion (5 Hz) in beiden Dimensionen apodisiert.



**Abbildung 2.** Abhängigkeit der  $^1\text{H}$ -Linienbreite von der inversen MAS-Rotationsfrequenz für einige ausgewählte Aminosäurereste der perdeutierten,  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten SH3-Domäne.

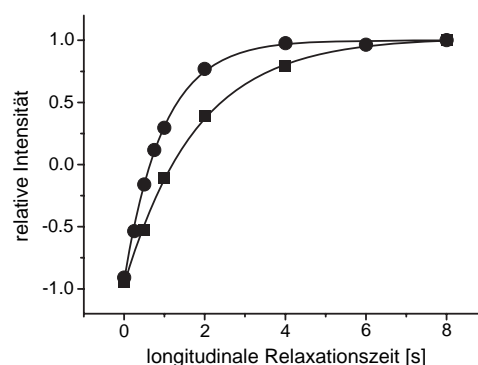
bei der Untersuchung von protoniertem Alanin in einer deuterierten Alanin-Matrix, dass die Steigung der von der MAS-Frequenz abhängigen  $^1\text{H}$ -Linienbreite nur von der mittleren Protonenkonzentration in der Probe abhängig ist und je nach Deuterierungsgrad zwischen  $6728$  und  $970\text{ Hz ms}^{-1}$  variiert. Wir beobachten für  $\text{G51H}^{\text{N}}$  und  $\text{A56H}^{\text{N}}$  eine Steigung von  $80.8$  bzw.  $144\text{ Hz ms}^{-1}$ . In Spinsystemen, in denen der Hamilton-Wechselwirkungsoperator nach Maricq und Waugh<sup>[23]</sup> rein inhomogen ist, sollte die  $^1\text{H}$ -Linienbreite nicht von der MAS-Rotationsfrequenz abhängen, solange  $\omega_r$  ähnlich oder größer als die entsprechende Wechselwirkung ist. Steigungen ungleich null deuten demnach darauf hin, dass  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -dipolare Kopplungen trotz des hohen Deuterierungsgrades nicht vollständig unterdrückt sind.

Die Ausgleichsgeraden in Abbildung 2 schneiden die y-Achse oberhalb des Ursprungs, was darauf hindeutet, dass selbst bei unendlicher Rotationsfrequenz eine Restlinienbreite verbleibt. Mögliche Ursachen für dieses Verhalten sind in der inhärenten transversalen Relaxationszeit  $T_2$ , der Heterogenität der Probe oder der Inhomogenität des statischen magnetischen Feldes (ca.  $7\text{ Hz}$ , entsprechend der Linienbreite einer Wasserprobe, die zum Shimmen des Probenkopfes verwendet wurde) zu suchen. Die erzielbare Auflösung macht für die Zukunft eine wesentliche Verbesserung der Hardware-Stabilität, insbesondere des Lock-Systems, erforderlich. Wir führen die Tatsache, dass unterschiedliche Aminosäurereste unterschiedliche  $^1\text{H}$ -Linienbreiten, y-Achsenabschnitte und Steigungen haben, auf Unterschiede in der Protonendichte und der lokalen Rückgratdynamik des Proteins zurück.<sup>[24,25]</sup>

Die  $^1\text{H}$ -Linienbreite für die  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnte Probe liegt im Bereich von  $17$  bis  $35\text{ Hz}$ , während die effektive Linienbreite der Referenzprobe unter phasenmodulierten Lee-Goldburg-Bedingungen (PMLG) etwa  $80$  bis  $150\text{ Hz}$  beträgt (unter Berücksichtigung der Skalierung der  $^1\text{H}$ -chemischen Verschiebung bei PMLG). Die Auflösung in der Protonendimension ist damit um einen Faktor  $4$  bis  $5$  verbessert. Die  $^{15}\text{N}$ -Linienbreite liegt bei beiden Experimenten zwischen  $20$  und  $30\text{ Hz}$  und ist durch die verwendete Akquisitionszeit limitiert. Beim  $^{15}\text{N}$ -detektierenden Experiment wurde eine Zweipuls-

phasenmodulations(TPPM)-Entkopplung während  $30$ – $37\text{ ms}$  in jedem Scan angewendet. Die RF-Einstrahlung führt zu einer signifikanten Erwärmung und somit zu einer kürzeren effektiven Lebenszeit der Probe, selbst bei aktiver Kühlung und langen Repetitionszeiten.<sup>[26]</sup> Die hier vorgestellten  $^1\text{H}$ -detektierenden NMR-Experimente mit  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten Proben benötigen weder homo- noch heteronukleare Entkopplungssequenzen und umgehen somit das Erwärmungsproblem. Zudem werden Falschkalibrierungen vermieden und die nötigen Implementierungszeiten minimiert. Darüber hinaus wird die  $^1\text{H}$ -chemische Verschiebung nicht skaliert, was sich bei Experimenten mit homonuklearer Entkopplung oft als problematisch erweist.

Abbildung 3 zeigt die experimentellen Daten für  $^1\text{H}$ - $T_1$ -Messungen. Typische  $^1\text{H}$ - $T_1$ -Zeiten der Referenzproben und der  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten Proben liegen bei  $0.98\text{ s}$  bzw.  $1.76\text{ s}$ . Die



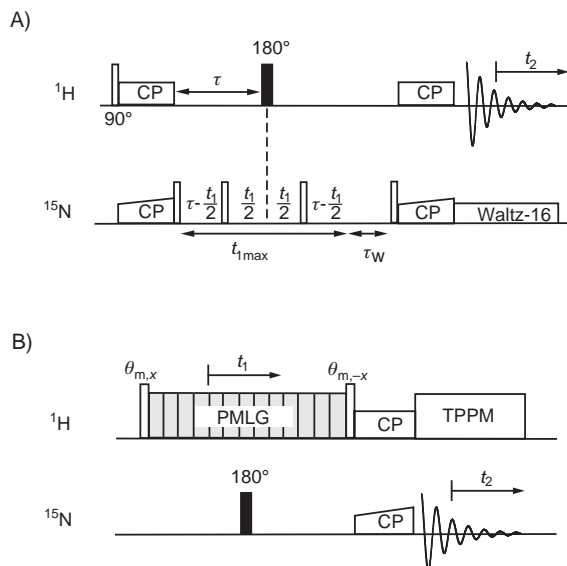
**Abbildung 3.** Experimentelle Daten eines  $^1\text{H}$ - $T_1$ -Experiments:  $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Resonanzen der  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten Probe (■;  $^1\text{H}$ - $T_1 = 1.76\text{ s}$ ) und der Referenzprobe (●;  $^1\text{H}$ - $T_1 = 0.98\text{ s}$ ).

$^1\text{H}$ - $T_1$ -Zeiten der  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten Probe sind überraschend kurz und ermöglichen eine Wiederholrate des Experiments von  $2.2\text{ s}$ . Im Fall der Referenzprobe wurde eine Repetitionszeit von  $2.3\text{ s}$  gewählt, um die Dissipation der induzierten Wärme sicherzustellen und einem Abbau der Probe vorzubeugen. Die  $^1\text{H}$ -Linienbreite der  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten Probe ist um einen Faktor  $4$  bis  $5$  geringer. Diese Verbesserung wird durch eine Verringerung der Boltzmann-Magnetisierung um einen Faktor  $10$  erkauft, bei gleichzeitig verlängerter longitudinaler  $^1\text{H}$ - $T_1$ -Relaxationszeit. Diese Nachteile werden kompensiert durch die Verwendung von Protonen zur Detektion, was einen Empfindlichkeitsgewinn um den Faktor  $5$  bis  $9$  mit sich bringt.<sup>[21]</sup> Die experimentellen Signal-Rausch-Verhältnisse für die  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -detektierenden Varianten betragen  $10.4:1$  bzw.  $25.3:1$  (entsprechend einer Spur durch das Korrelationssignal G51 entlang der  $^1\text{H}$ -Dimension, wie in Abbildung 1C und D dargestellt). Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Probenmengen und Experimentierzeiten ist das normalisierte Signal-Rausch-Verhältnis der  $\text{H}^{\text{N}}$ -verdünnten Probe um lediglich einen Faktor  $1.2$  geringer als das der Referenzprobe. Die Experimente belegen damit, dass ein hoher Deuterierungsgrad zu ultrahocho aufgelösten Protonenspektren im Festkörper führen kann, die bislang in dieser Qualität trotz zahlreicher Verbesserungsvorschläge für homonukleare Entkopplungssequenzen nicht erzielt werden

konnten. Wir erwarten, dass die vorgeschlagene Methode die Resonanzzuordnung im Festkörper vereinfachen wird, da hiermit ein weiterer Kern mit hoher Dispersion im Proteinrückgrat zur Verfügung steht.

## Experimentelles

Die 2D-NMR-Pulssequenzen mit  $^1\text{H}$ -Detektion sind in Abbildung 4A dargestellt. Die im Spektrum dominierende Wasser-Resonanz wurde durch ein modifiziertes Constant-Time(CT)-Experiment



**Abbildung 4.** Verwendete NMR-Pulssequenzen für A)  $^1\text{H}$ -detektierende und B)  $^{15}\text{N}$ -detektierende  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Korrelationsexperimente.

nach Zilm und Mitarbeitern<sup>[14]</sup> wirksam unterdrückt. Nach Magnetisierungstransfer von  $^1\text{H}$  zu  $^{15}\text{N}$  wird die Polarisation entlang der z-Achse für eine variable Zeit  $\tau - t_1/2$ , die der  $^{15}\text{N}$ -Evolutionsperiode  $t_1$  vor- bzw. nachgelagert ist, zwischengespeichert. Die variablen Zeiten sind notwendig, um die skalare J-Kopplung in der indirekten Evolutionsperiode zu entkoppeln und das Experiment zeitlich konstant hinsichtlich der Wasser-Magnetisierung zu halten. Die feste Zeit  $\tau_w$  (60–120 ms), die der CT-Zeit folgt, wurde zur Unterdrückung der Wasser-Resonanz optimiert. Nach dem Rücktransfer der Magnetisierung zu  $^1\text{H}$  wird das Signal mithilfe der Waltz-16-Sequenz ( $\omega_1 = 1.6$  kHz) zur Entkopplung der heteronuklearen skalaren Kopplung aufgenommen.<sup>[14]</sup>

Abbildung 4B zeigt die Pulssequenz, die zur Aufnahme der  $^{15}\text{N}$ -detektierenden  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren verwendet wurde. Zur wirksamen Entkopplung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -dipolaren Wechselwirkungen wurde die PMLG-9-Sequenz<sup>[27]</sup> in der indirekten  $^1\text{H}$ -Evolutionsperiode implementiert ( $\omega_1 = 81$  kHz). Ein  $180^\circ$ -Puls auf dem  $^{15}\text{N}$ -Kanal in der Mitte von  $t_1$  dient zur Refokussierung der heteronuklearen J-Kopplung. Während der Akquisition werden Protonen mit TPPM entkoppelt ( $\omega_1 = 90$  kHz).

Eingegangen am 25. Januar 2006

Online veröffentlicht am 28. April 2006

**Stichwörter:** Festkörper-NMR-Spektroskopie · Linienbreite · Magic-Angle-Rotation · Perdeuterierung · Proteine · Strukturanalyse

- [1] F. Castellani, B.-J. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, 420, 98.
- [2] C. M. Rienstra, L. Tucker-Kellogg, C. P. Jaroniec, M. Hohwy, B. Reif, M. T. McMahon, B. Tidor, T. Lozano-Pérez, R. G. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 10260.
- [3] S. G. Zech, A. J. Wand, A. E. McDermott, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8618.
- [4] A. Lange, S. Becker, K. Seidel, K. Giller, O. Pongs, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2125; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2089.
- [5] E. Vinogradov, P. K. Madhu, S. Vega, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, 354, 193.
- [6] A. Lesage, D. Sakellariou, S. Hediger, B. Elena, P. Charmont, S. Steuernagel, L. Emsley, *J. Magn. Reson.* **2003**, 163, 105.
- [7] C. Filip, S. Hafner, I. Schnell, D. E. Demco, H. W. Spiess, *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 423.
- [8] Y. Ishii, R. Tycko, *J. Magn. Reson.* **2000**, 142, 199.
- [9] M. Ernst, M. A. Meier, T. Tuherm, A. Samoson, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4764.
- [10] A. E. McDermott, F. J. Creuzet, A. C. Kolbert, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **1992**, 98, 408.
- [11] L. Zheng, K. W. Fishbein, R. G. Griffin, J. Herzfeld, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6254.
- [12] B. Reif, C. P. Jaroniec, C. M. Rienstra, M. Hohwy, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **2001**, 151, 320.
- [13] V. Chevelkov, B. J. van Rossum, F. Castellani, K. Rehbein, A. Diehl, M. Hohwy, S. Steuernagel, F. Engelke, H. Oschkinat, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7788.
- [14] E. K. Paulson, C. R. Morcombe, V. Gaponenko, B. Dancheck, R. A. Byrd, K. W. Zilm, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15831.
- [15] B. Reif, B. J. van Rossum, F. Castellani, K. Rehbein, A. Diehl, H. Oschkinat, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1488.
- [16] E. K. Paulson, C. R. Morcombe, V. Gaponenko, B. Dancheck, R. A. Byrd, K. W. Zilm, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14222.
- [17] V. Chevelkov, K. Faelber, A. Diehl, U. Heinemann, H. Oschkinat, B. Reif, *J. Biomol. NMR* **2005**, 31, 295.
- [18] M. Hologne, K. Faelber, A. Diehl, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127.
- [19] M. Hologne, Z. Chen, B. Reif, *J. Magn. Reson.* **2006**, 179, 20.
- [20] E. Vinogradov, P. K. Madhu, S. Vega, *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 329, 207.
- [21] B. Reif, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **2003**, 160, 78.
- [22] D. H. Zhou, D. T. Graesser, W. T. Franks, C. M. Rienstra, *J. Magn. Reson.* **2006**, 178, 297.
- [23] M. M. Maricq, J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **1979**, 70, 3300.
- [24] N. Giraud, A. Böckmann, A. Lesage, F. Penin, M. Blackledge, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11422.
- [25] N. Giraud, M. Blackledge, M. Goldman, A. Böckmann, A. Lesage, F. Penin, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 18190.
- [26] J. A. Stringer, C. E. Bronnimann, C. G. Mullen, D. H. H. Zhou, S. A. Stellfox, Y. Li, E. H. Williams, C. M. Rienstra, *J. Magn. Reson.* **2005**, 173, 40.
- [27] E. Vinogradov, P. K. Madhu, S. Vega, *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 314, 443.