

Development and application of techniques for improving resolution in solid state NMR of fully labelled biomolecules

Doctoral Thesis

Author(s):

Straus, Suzana Katarina

Publication date:

1998

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001915490>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

ex. B

Diss. ETH No 12587

Development and Application of Techniques for Improving Resolution in Solid State NMR of Fully Labelled Biomolecules

DISSERTATION

submitted to the

EIDGENÖSSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE
ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

Suzana Katarina Straus

B.Sc. McGill University

born October 17, 1971

Montreal, QC., Canada



041E

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Richard R. Ernst, examiner
Prof. Dr. Malcolm H. Levitt, co-examiner

Zürich, 1998

Abstract

In this work, techniques to improve the resolution of solid state NMR spectra of fully labelled samples are presented. With the higher resolution, achieved by using an optimized heteronuclear decoupling sequence (TPPM) and homonuclear J decoupling, it is possible to assign spectra of peptides and proteins, and to study interesting aspects of the structure and dynamics of these systems.

In Chapter 2, the sources of linebroadening in unlabelled, fully ^{13}C -labelled and fully $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled samples are quantified in terms of two model amino acids, L-threonine and L-arginine hydrochloride. To start, the effect of magic angle sample spinning (MAS) and ^1H decoupling on the linewidths is examined. Subsequently, the role of magnetic susceptibility and hydration are analyzed, using antamanide and ubiquitin as examples. The linebroadening which arises when the ^{13}C - ^{14}N residual dipolar coupling is not averaged is also examined. Linebroadening arising as a result of full ^{13}C - and $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelling, i.e. as a result of interactions between the heteronuclei, and some remedies are presented on a general basis.

In a fully ^{13}C - or $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled system where MAS and ^1H decoupling are used, one of the principle contributions to linebroadening is the ^{13}C - ^{13}C scalar interaction. In Chapter 3, homonuclear J decoupling by means of a π (selective)- π (non. selective) pulse scheme is presented. Examples on fully $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labelled threonine and arginine are demonstrated, using a Gaussian selective pulse. Interference effects between MAS and the selective pulse, which arise when the spinning speed is smaller than the magnitude of the anisotropic interactions, are also considered. Alternative schemes are presented and discussed in terms of the advantages and disadvantages over the π (selective)- π (non. selective) scheme.

In Chapter 4, the methods presented in the previous Chapter are

applied to the cyclic decapeptide antamanide [-Val¹-Pro²-Pro³-Ala⁴-Phe⁵-Phe⁶-Pro⁷-Pro⁸-Phe⁹-Phe¹⁰]. With the improved resolution afforded by heteronuclear ¹H decoupling and homonuclear J decoupling, assignment of most of the ¹³C resonances was possible. The assignment includes the stereospecific assignment of the valine side-chain, which was found to coexist in two rotameric forms in the solid state. Due to the static disorder found for the valine side-chain, a relaxation study was undertaken. It was found that the methyl groups are sensitive to their local environment, as seen from the measured jump correlation times. To try to pinpoint the differences in the local environments, a molecular dynamics simulation was run and the X-ray crystal structure was carefully analyzed. The influence of the valine side-chain conformation on the chemical shift values for C^{γ1} and C^{γ2} was also examined using DFT chemical shift calculation methods.

Finally, an assignment strategy is proposed in Chapter 5 allowing larger sized peptides to be studied, using ubiquitin, a 76 amino acid residue protein as a model. It was found that a combined approach, which relies on ¹³C-¹³C and ¹³C-¹⁵N correlation experiments, can be useful. The necessary pulse sequences are presented and discussed in terms of signal-to-noise (S/N) considerations. The prospect of using higher dimensional correlation spectra is also discussed, using ubiquitin as an example.

To conclude, prospects for future resolution improvement and the study of fully labelled biological systems by solid state NMR will be briefly touched upon.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden Methoden zur Verbesserung der Auflösung von Festkörper Kernresonanzspektren vollständig Isotopenmarkierter Proben vorgestellt. Aufgrund der verbesserten Auflösung, erreicht durch eine optimierte heteronukleare Entkopplungssequenz (TPPM) und homonukleare J-Entkopplung, ist es möglich, Protein- und Peptidspektren zuzuordnen und damit interessante Eigenschaften der Struktur und Dynamik dieser Systeme zu untersuchen.

In Kapitel 2 werden die Quellen der Linienverbreiterung in unmarkierten, in voll- ^{13}C -markierten und in $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Proben anhand von zwei Aminosäuren, L-Threonin und L-Arginin, festgestellt. Zuerst wird der Einfluss von MAS und ^1H -Entkopplung auf die Linienbreite untersucht. Ferner wird die Rolle der magnetischen Suszeptibilität und der Hydratation in den Modellsystemen Antamanid und Ubiquitin beschrieben. Die aus der nicht ausgemittelten ^{13}C - ^{14}N -dipolaren Kopplung resultierende Linienverbreiterung wird ebenfalls diskutiert. Linienverbreiterung, die wegen der zusätzlichen skalaren Wechselwirkung in ^{13}C - und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten Systeme entsteht, und allgemeine Lösungsansätze für deren Beseitigung werden vorgestellt.

Hauptverantwortlich für Linienverbreiterung in mit MAS und ^1H Entkopplung untersuchten Systemen ist die ^{13}C - ^{13}C skalare Wechselwirkung. In Kapitel 3 wird homonukleare J-Entkopplung mittels eines π (selektiv)- π (nicht selektiv) Pulssandwiches beschrieben. Dessen Verhalten wird anhand der Beispiele von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem Threonin und Arginin aufgezeigt. Interferenzeffekte zwischen MAS und den verwendeten selektiven Pulsen die auftreten, wenn die Rotationsgeschwindigkeit kleiner als die Grössenordnung der anisotropen Wechselwirkungen sind, werden diskutiert. Alternative Methoden werden im Vergleich zum π (selektiv)- π (nicht selektiv) Pulssandwich vorgestellt.

In Kapitel 4 werden die in dem vorangehenden Kapitel entwickelten Methoden auf das zyklische Dekapeptid Antamanid [-Val¹-Pro²-Pro³-Ala⁴-Phe⁵-Phe⁶-Pro⁷-Pro⁸-Phe⁹-Phe¹⁰-] angewandt. Mit der verbesserten Auflösung ist es möglich, den Grossteil der ¹³C Resonanzen zuzuordnen. Die Zuordnung schliesst die stereospezifische Zuordnung der Valinseitenkette mit ein, die im Festkörper in zwei Rotameren vorkommt. Die Relaxation der Methylgruppen der Valinseitenkette wurden ebenfalls untersucht. Es wurde anhand der Sprungkorrelationszeiten festgestellt, dass die Rotationsgeschwindigkeit der Methylgruppen stark von ihrer lokale Umgebung beeinflusst wird. Um die Unterschiede in der lokalen Umgebung ausfindig zu machen, wurde ein Vergleich mit einer Molekulardynamiksimulation und der Röntgenkristallstruktur durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss der Konformation der Valinseitenkette auf die chemischen Verschiebungen der C^{γ1}- und C^{γ2}-Kohlenstoffe mittels DFT-Rechnungen untersucht.

In Kapitel 5 wird eine Zuordnungsstrategie die die Untersuchung von grösseren Peptiden erlaubt, vorgeschlagen und auf Ubiquitin, ein Protein von 76 Aminosäuren, angewandt. Es wurde festgestellt, dass die Anwendung von ¹³C-¹³C in Verbindung mit ¹³C-¹⁵N Korrelationsexperimenten nützlich sind. Die dafür notwendigen Pulssequenzen werden vorgestellt und in Bezug auf das Signal/Rauschen (S/N) Verhältnis diskutiert. Als Ausblick wird die Möglichkeit umfangreicherer Proteinzurordnung mittels höherdimensionaler Korrelationsexperimente diskutiert.

Zum Abschluss werden weitere Verbesserungsmöglichkeiten der Auflösung und Zukunftsperspektiven für die Untersuchung der Struktur und Dynamik biologischer Systeme mittels Festkörper Kernspinresonanz aufgezeigt.

Résumé

Dans ce travail, de nouvelles techniques en résonance magnétique nucléaire (RMN) des solides appliquées à des systèmes biologiques sont présentées. Elles permettent d'obtenir des spectres de haute résolution en utilisant une combinaison de découplage hétéronucléaire et homonucléaire, sous rotation à l'angle magique (MAS) de l'échantillon. Avec ces méthodes, il est possible de faire une attribution des spectres de peptides et de protéines en phase solide, afin d'étudier la structure et la dynamique de ces biomolécules.

Dans le deuxième chapitre, les interactions affectant la résolution dans les systèmes non-marqués, marqués au ^{13}C et enfin marqués au ^{13}C et au ^{15}N sont identifiés et leurs contributions à la largeur de raie quantifiés. Deux acides aminés sont utilisées comme modèles: L-thréonine et L-arginine. Dans une première partie, l'effet sur la largeur de raie de la rotation sous l'angle magique et du découplage des ^1H est discuté. Le rôle de la susceptibilité magnétique et de l'hydratation est illustré par des exemples sur l'antamanide et l'ubiquitine. La contribution à la largeur de raie due au couplage dipolaire résiduel entre les ^{13}C et les ^{14}N présent dans les systèmes non-marqué en ^{15}N est discutée. Finalement, les contributions spécifiques aux protéines entièrement enrichies en ^{15}N et/ou en ^{13}C sont présentées.

La rotation à l'angle magique de l'échantillon marqué au ^{13}C - ou au $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, et le découplage des ^1H éliminent les interactions dipolaires homonucléaires et hétéronucléaires. Dans cette situation, une des contributions résiduelles les plus importantes à la largeur de raie est le couplage scalaire entre les ^{13}C . Une séquence permettant de refocaliser ce couplage est présentée dans le chapitre 3. Elle est composée d'une impulsion sélective de 180 degrés, suivi par une impulsion non-sélective. Cette séquence est démontrée sur les acides aminés thréonine et arginine enrichies en $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$, en utilisant une impulsion sélective de forme gaussienne. Lorsque la vitesse de rotation de l'échantillon est

plus petite que la largeur des interactions anisotropiques, un effet d'interférence entre la MAS et l'impulsion sélective se produit. Cet effet est discuté dans le contexte d'une impulsion gaussienne. Finalement, des séquences alternatives pour le découplage scalaire entre les ^{13}C sont présentées et comparées à la séquence π (sélectif)- π (non sélectif) nouvellement proposée dans ce travail.

Dans le chapitre suivant, la séquence π (sélectif)- π (non sélectif), présentée dans le chapitre 3 est appliquée au decapeptide cyclique antamanide [-Val¹-Pro²-Pro³-Ala⁴-Phe⁵-Phe⁶-Pro⁷-Pro⁸-Phe⁹-Phe¹⁰]. Avec la meilleure résolution que nous ayons pu obtenir, il est possible d'attribuer la plupart des déplacements chimiques ^{13}C , y compris l'attribution stéréospécifique de la chaîne latérale de valine, présente en phase solide sous deux formes rotamériques. L'étude de la relaxation des groupes CH_3 du valine montre que ces groupes sont affectés par leur environnement local. Les différences dans les valeurs de relaxation mesurées peuvent être expliquées sur la base d'une simulation de la dynamique moléculaire et de la structure cristallographique par diffraction des rayons X. L'étude des déplacements chimiques $C^{\gamma 1}$ et $C^{\gamma 2}$ (calculés avec la méthode DFT) en fonction de l'angle χ_1 dans la chaîne latérale de valine indique que ces groupes sont non seulement affectés par leur environnement local, mais aussi par la conformation de la chaîne.

Dans le dernier chapitre, une stratégie pour l'attribution des résonances RMN de protéines enrichies dans les solides est présentée, en utilisant l'ubiquitine, une protéine de 76 acides aminés. Contrairement au cas de l'antamanide, où une stratégie basée uniquement sur des expériences homonucléaires de corrélation ^{13}C est suffisante pour l'attribution de la plupart des résonances, des expériences hétéronucléaires supplémentaires (^{13}C - ^{13}C et ^{13}C - ^{15}N) sont nécessaires pour de plus gros peptides. Quelques expériences utiles sont présentées, en tenant compte de leur sensibilité (S/N) respective.

Finalement, les possibilités d'améliorer davantage la résolution de spectres d'échantillons enrichis sont brièvement discutées.