



Doctoral Thesis

Low-Temperature Solid-State NMR - A critical investigation of the solvent and protein properties below freezing temperature

Author(s):

Bauer, Thomas Wilhelm

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010703419> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 23422

Low-Temperature Solid-State NMR

A critical investigation of the solvent and protein properties below freezing
temperature

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

Dr. sc. ETH Zurich

presented by

THOMAS WILHELM BAUER

Diplom-Physiker

Technische Universität Dresden

born August 9, 1986

Citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Beat H. Meier, examiner

Prof. Dr. Roland Riek, co-examiner

Dr. Anja Böckmann, co-examiner

2016

Abstract

As a method for structure determination, solid-state NMR relies on a sufficiently high signal-to-noise ratio and spectral resolution to gain important information regarding the structural properties of biological samples. In principle, the signal intensity can be greatly improved by a significant decrease of the sample temperature. However, starting with the freezing of the bulk solvent, the resolution observed in the spectra of biological compounds often suffers severely at low temperatures. This line-broadening effect cancels out all benefits that could be gained from a higher Boltzmann population or signal enhancement techniques such as dynamic nuclear polarization (DNP), and renders most attempts at structure determination experiments at low temperatures futile. The mechanisms leading to a broadening of resonance lines have not been fully understood yet, which is why this work thoroughly examines both the solvent and protein properties at low temperatures on the example of the fibrillar prion domain HET-s (218 - 289).

Since frozen protein samples contain a large amount of ice, the first part of this work focuses on the spectral properties of hexagonal ice between temperatures of 100 K and 273 K. It is demonstrated that the migration of so-called Bjerrum-defects in its crystal lattice leads to rapid reorientations of the water molecules within their overall tetrahedral arrangement. These internal dynamics strongly influence the observed line shape of the spectra, which, in a static sample, covers roughly 90 kHz at temperatures below 200 K and as little as 30 kHz at temperatures slightly below freezing. To simplify the observation of ice, several line-narrowing techniques are applied, including magic-angle spinning (MAS), homonuclear decoupling and isotope dilution. It is shown how all of these techniques become inefficient when the dynamics in ice reach a correlation time that is comparable to the used MAS spinning speed or rf nutation frequency. Still, with a combination of isotope dilution and MAS, the very broad resonance signal can be narrowed to widths between 300 Hz and 1 kHz, a range more feasible for standard proton experiments.

The second part of this work focuses on the temperature-dependent line shapes of uniformly labeled fibrillar HET-s (218 - 289) and the mobile water around it. A close inves-

tigation of their site-specific broadening behavior reveals noticeable differences between the solvent-exposed and solvent-protected residues of the fibril. While residues located in its hydrophobic core and the semihydrophobic pocket broaden only moderately with decreasing temperatures, solvent-accessible residues broaden severely within a much narrower temperature range after the freezing of the bulk. It is shown, that these differences can most likely be attributed to a layer of mobile water which still surrounds the protein after the freezing of the excess water. The amount of mobile water rapidly decreases towards lower temperatures, thereby affecting the solvent-exposed residues.

The mobile water layer and the protein are in direct contact which allows a transfer of polarization by a chemical-exchange of protons between the two components. It is shown that this transfer appears to become faster towards lower temperatures, which poses a violation of the Arrhenius law for chemical exchange phenomena. Using a theoretical transfer model, which combines the spin-diffusion on the fibril, the chemical exchange between protein and the water, as well as the diffusion of water molecules within the layer, an attempt is made to attribute this behavior to the physical shrinking of the water layer around the protein at lower temperatures. The results are not conclusive, with the fitted rate constant initially becoming larger, reaching its maximum around 240 K, and then decreasing towards lower temperatures. It is discussed how this discrepancy could either stem from incorrectly assumed properties of the rather thin and restricted mobile water layer or a problem with the data fitting.

Lastly, the relaxation behavior of quadrupolar ^{17}O is used to study the rotational correlation time of water molecules in the water layer present around frozen HET-s (218 - 289). It is shown how the NMR properties of ^{17}O allow a clear separation of the solid and mobile components of the system. Evaluating both the longitudinal and transversal relaxation of the mobile water component, it can be seen that the rotational correlation time in the layer is in the order of 10^{-8} s, as opposed to the bulk value of $\tau_c = 4 \cdot 10^{-12}$ s at room temperature. Below 273 K, the rotational correlation time slightly decreases and levels off around 240 K. It is discussed, how the significant difference in dynamics between bulk at room temperature and the mobile water layer in the frozen state can possibly be attributed to surface and restriction effects, with the mobile water layer thickness spanning only four to five water molecules at 273 K and the protein and ice as inner and outer boundaries.

The insights gained during the course of this work shed a new light in the properties of biological samples at low temperatures and emphasize the importance of mobile water in the freezing process long after the freezing of the bulk.

Zusammenfassung

Für die Festkörper-NMR sind eine hohe spektrale Auflösung sowie ein bestmögliches Signal-Rauschverhältnis unerlässlich, um die strukturellen Eigenschaften biologischer Systeme zu bestimmen. Im Prinzip könnte die Signalintensität von NMR-Experimenten alleine schon durch ein drastisches Abkühlen der Probe stark vergrößert werden. Unglücklicherweise wird die spektrale Auflösung biologischer Verbindungen durch das Frieren des Lösungsmittels und einer weiteren Verringerung der Temperatur oft stark in Mitleidenschaft gezogen. Dieser Verbreiterungseffekt eliminiert alle Vorteile, die z.B. durch die höhere Boltzmannpopulation oder signalverstärkende Techniken wie DNP erzielt werden könnten, und macht eine Strukturbestimmung bei tiefen Temperaturen meistens unmöglich. Die Mechanismen, die zu einer Verbreiterung von Resonanzlinien führen, sind bis heute nicht vollständig geklärt, weshalb diese Arbeit der sorgfältigen Untersuchung der Protein- sowie der Lösungsmiteileigenschaften bei tiefen Temperaturen gewidmet ist. Als Modellsystem wurde dafür fibrilläres HET-s (218 - 289) gewählt.

Da gefrorene Proteinproben grosse Mengen an festem Wasser enthalten, werden im ersten Teil dieser Arbeit die einzigartigen spektralen Eigenschaften von hexagonalem Eis im Temperaturbereich von 100 K bis 273 K untersucht. Es wird dargestellt, dass die Migration von sogenannten Bjerrum-Defekten im Kristallgitter zu einer schnellen Reorientierung der Wassermoleküle innerhalb deren tetraedrischer Anordnung führt. Diese interne Dynamik verursacht eine starke Temperaturabhängigkeit des Eisspektrums. Im Falle einer statischen Messung kann die beobachtete Linienbreite Werte zwischen ca. 90 kHz, unterhalb von 200 K, und ca. 30 kHz, kurz vor dem Schmelzen des Samples, annehmen. Um die Beobachtung des breiten Eisspektrums zu erleichtern, werden mehrere Entkopplungstechniken angewandt, wie z.B. MAS, homonukleare Entkopplung und Isotopenverdünnung. Es wird gezeigt, dass alle diese Techniken an Effizienz verlieren, sobald die Sprungrate der Dynamik in Eis Grössenordnungen erreicht, die mit den eingesetzten MAS-Raten oder rf-Feldstärken vergleichbar sind. Nichtsdestoweniger erweist sich eine Kombination von MAS und Isotopenverdünnung als die effizienteste Technik, welche die beobachtete Linienbrei-

te auf Werte zwischen 300 Hz und 1 kHz verkleinert. Diese Verschmälerung der Linienbreite vereinfacht die Beobachtung von Eis in regulären Experimenten enorm.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit den temperaturabhängigen Eigenschaften von uniform gelabelten, fibrillären HET-s (218 - 289) sowie dessen mobiler Wasserkomponente. Eine nähere Untersuchung des spezifischen Verbreiterungsverhaltens einzelner Residuen zeigt signifikante Unterschiede zwischen den lösungsmittel-exponierten und geschützten Teilen der Fibrille. Während sich die Resonanzlinien von Aminosäuren im hydrophoben Kern sowie der semihydrophoben Tasche mit sinkender Temperatur nur moderat verbreitern, werden Residuen, die dem Wasser mehr ausgesetzt sind, wesentlich stärker vom Frierprozess beeinflusst. Dieser Unterschied kann höchstwahrscheinlich auf die mobile Wasserschicht zurückgeführt werden, welche das Protein auch im gefrorenen Zustand umgibt. Diese Wasserschicht wird mit sinkenden Temperaturen kleiner, wodurch die wasserexponierten Residuen stark beeinflusst werden.

Die mobile Wasserschicht und das Protein stehen in direktem Kontakt, wodurch einen Austausch von Polarisation zwischen beiden Komponenten ermöglicht wird. Es wird gezeigt, dass sich dieser Transfer zu tieferen Temperaturen hin zu beschleunigen scheint. Dies stellt eine direkte Verletzung des Arrhenius-Gesetzes für chemische Austauschphänomene dar. Anhand eines theoretischen Transfermodells, das anhand von Spindiffusion, chemischem Austausch und räumlicher Diffusion die Reservoirgrößen der Austauschpartner in die Betrachtung einbezieht wird ein Versuch unternommen, dieses Verhalten mit der temperaturabhängigen Verkleinerung der Wasserschicht zu erklären. Das Resultat dieser Bemühungen ist jedoch nicht vollständig schlüssig, da die chemische Austauschkonstante selbst in diesem Modell zunächst grösser wird, ihr Maximum bei 240 K erreicht und erst zu niedrigeren Temperaturen wieder abnimmt. Diese Diskrepanz zum eigentlich erwarteten Verhalten könnte zum einen von inkorrekt abgeschätzten Eigenschaften der Wasserschicht, welche im Modell verwendet wurden, stammen oder von einem Problem mit den Ausgangsdaten.

Im letzten Kapitel wird das Relaxationsverhalten von quadrupolarem ^{17}O genutzt, um die Rotationskorrelationszeit von Wassermolekülen in der Wasserschicht um HET-s (218 - 289) zu bestimmen. Es wird gezeigt, wie die spektroskopischen Eigenschaften von ^{17}O eine klare Unterscheidung der festen und mobilen Komponenten im System erlauben. Durch die Auswertung des longitudinalen und transversalen Relaxationsverhaltens des mobilen Wassers kann bestimmt werden, dass die Rotationskorrelationszeit in der Wasserschicht Werte in der Größenordnung von 10^{-8} s annimmt. Dieser Wert unterscheidet sich um

vier Grössenordnungen von dem des Bulkwassers bei Raumtemperatur, welches ein τ_c von $4 \cdot 10^{-12}$ s aufweist. Unterhalb von 273 K nimmt τ_c wieder leicht ab und stabilisiert sich im Temperaturbereich von 240 K. Mit einer Wasserschicht, deren Dicke bei 273 K nur in etwa das Ausmass von vier bis fünf Molekülen umfasst und dem Protein sowie dem Eis, welche als innere und äussere Begrenzung dienen, können diese Eigenschaften womöglich durch Oberflächen- und Begrenzungseffekte erklärt werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse geben neue Einblicke in die Eigenschaften biologischer Systeme bei tiefen Temperaturen und unterstreichen den immensen Einfluss, welchen mobiles Wasser auf den Verbreiterungsprozess von Proteinspektren ausübt.