Strukturbiologie

Biologische Festkörper-NMR-Spektroskopie in der Strukturbiologie

NILS-ALEXANDER LAKOMEK
INSTITUT FÜR PHYSIKALISCHE BIOLOGIE, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Biological solid-state NMR elucidates the structure and dynamics of biomolecules at physiological temperatures. It provides high-resolution structural information for a wide range of biomolecules and assemblies, from small membrane proteins embedded in a lipid environment, over fibrillar structures up to supramolecular assemblies. Recent developments allow for proton detection at fast magic angle spinning frequencies, which reduces the required sample amounts to a few hundreds of micrograms.

DOI: 10.1007/s12268-021-1561-0
© Der Autor 2021

■ Die biologische Kernspinresonanzspektroskopie oder NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie untersucht die Struktur und Dynamik biologischer Makromoleküle in möglichst physiologischer Umgebung und bei physiologischen Temperaturen. Sie beruht auf der Wechselwirkung des intrinsischen Drehimpulses eines Atomkerns, dem Kernspin, mit einem äußeren Magnetfeld. Mit dem Kernspin ist ein magnetisches Moment, ein winzig kleiner Magnet, verknüpft. Beim Wasserstoffatomkern kann dieser kleine Magnet in einem äußeren Magnetfeld zwei Zustände annehmen, den α -Zustand und den β -Zustand. Wird nun eine elektromagnetische Welle geeigneter Frequenz eingestrahlt, wird ein Übergang vom energieärmeren α -Zustand in den energiereicheren β -Zustand induziert. Man spricht von Kernspinresonanz. Die dazugehörige Frequenz ist die Kernspinresonanzfrequenz. Sie ist charakteristisch für die Art des Atomkerns (z. B. Wasserstoff vs. Kohlenstoff).

Bei der Analyse der Struktur und Dynamik von Molekülen macht man sich zunutze, dass die Kernspinresonanzfrequenz abhängig von der chemischen Umgebung des Atomkerns ist. Denn die Umgebung beeinflusst die Elektronenhülle, die den Atomkern umgibt, und schirmt das lokal am Atomkern wirksame Magnetfeld somit in unterschiedlichem Maße ab. Dadurch verändert sich die

Kernspinresonanzfrequenz minimal, meist nur um wenige Millionstel oder Bruchteile davon (wenige Hertz). Um diese Änderungen der Resonanzfrequenz in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung sehr genau messen zu können, müssen möglichst starke Magnetfelder verwendet werden. In der biologischen NMR-Spektroskopie werden meist Magnete mit einer Stärke zwischen 10 und 20 Tesla eingesetzt, was dem ca. 500.000-Fachen des Erdmagnetfelds entspricht. Dafür müssen Magnetfeldspulen aus Supraleitern (die keinen elektrischen Wider-

stand besitzen) verwendet werden. Die modernsten kommerziellen Geräte können damit sogar Magnetfeldstärken bis zu 28 Tesla erreichen (**Abb. 1**).

Um das Signal in biologischen NMR-Proben zu verstärken, werden diese mit NMR-aktiven ^{13}C und ^{15}N -Isotopen markiert. Diese Isotope sind nicht radioaktiv (!), ihre natürliche Häufigkeit ist jedoch sehr gering und beträgt nur ein Prozent im Fall von ^{13}C Kohlenstoff, bei ^{15}N -Stickstoff sogar unter ein Prozent. Proteine können mit diesen Isotopen markiert werden, indem z. B. ^{13}C -Glucose und ^{15}N -Ammoniumchlorid zu den Expressionsmedien hinzugegeben werden und dann während der Expression in die zu analysierenden Proteine eingebaut werden. Mittels dreidimensionaler NMR-Experimente können seit einigen Jahren nicht nur vollständige Proteinstrukturen, sondern auch RNA-Strukturen oder DNA-Protein-Komplexe aufgeklärt werden. Neben der klassischen Strukturbestimmung ermöglicht NMR-Spektroskopie aber auch die Analyse der inneren Dynamik von Biomolekülen und der dynamischen intermolekularen Wechselwirkungen. Dabei können dynamische Übergänge zwischen verschiedenen Konformationen mit atomarer Auflösung untersucht werden [1].

► **Abb. 1:** Das neue NMR-Spektrometer am gemeinsamen Biomolekularen NMR-Zentrum des Forschungszentrums Jülich und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hat eine magnetische Feldstärke von 28 Tesla. Dies entspricht einer Kernspinresonanzfrequenz der Protonen von 1,2 GHz.

▲ **Abb. 2:** Bei der Magic-Angle-Spinning(MAS)-Methode der Festkörper-NMR-Spektroskopie wird der NMR-Probenbehälter entlang des magischen Winkels von $54,7^\circ$ orientiert und um die eigene Achse gedreht (mittleres Bild). Dadurch können anisotrope Wechselwirkungen, die zu einer starken Linienverbreiterung führen (linkes Bild), teilweise ausgeglichen werden. Somit können deutlich schmalere Linien im Festkörper-NMR-Spektrum erhalten werden (rechtes Bild).

Biologische Festkörper-NMR-Spektroskopie und ihre Anwendungsgebiete

Neben der klassischen biologischen Lösungs-NMR-Spektroskopie, die Biomoleküle in flüssiger Phase untersucht, wurde die biologische Festkörper-NMR-Spektroskopie entwickelt. Dabei ist der Begriff Festkörper eher historisch gewachsen, da Festkörper-NMR-Spektroskopie zunächst an kristallinen Proben durchgeführt wurde, häufig an mikrokristallinen Proben, die nur schlecht beugende Kristalle lieferten und sich daher nicht für eine Untersuchung mittels Röntgenkristallographie eigneten.

Anders als Lösungs-NMR-Spektroskopie besitzt die Festkörper-NMR-Spektroskopie keine Größenlimitierung, die aus der rotatorischen Diffusion (der Drehung um die eigene Achse) der Biomoleküle in Lösung resultiert. Bei der Festkörper-NMR werden die Moleküle in ihre natürliche Umgebung eingebettet, z. B. in Lipidmembranen. Aufgrund der daraus resultierenden eingeschränkten Rotation werden anisotrope Wechselwirkungen (dipolare Wechselwirkungen oder chemische Verschiebungsanisotropie) nicht ausgeglichen. Diese anisotropen Wechselwirkungen liefern wichtige Informationen über die Orientierung, z. B. derjenigen von Membranproteinen relativ zur Lipidmembran [2]. Die anisotropen Wechselwirkungen führen allerdings auch zu einer starken Linienverbreiterung der Resonanzsignale. Um dennoch hochaufgelöste Spektren messen zu können, muss man versuchen, die natürliche Rotation der Biomoleküle in Lösung nachzuahmen (**Abb. 2**). Dies geschieht mithilfe des Magic-Angle-Spinning (MAS), bei dem die

Probe entlang eines bestimmten Winkels relativ zum äußeren Magnetfeld orientiert wird, dem magischen Winkel von $54,7^\circ$. Mittels eines Luftstrahls, der auf einen Propeller gerichtet ist, welcher auf dem NMR-Probenbehälter angebracht ist, wird die NMR-Probe entlang der Achse des magischen Winkels rotiert. Dadurch werden die anisotropen Wechselwirkungen teilweise ausgeglichen und die spektrale Linienbreite wird schmaler, sodass gut aufgelöste Spektren aufgenommen werden können (**Abb. 2**).

Seitdem Anfang der 2000er-Jahre die erste Proteinstruktur mittels Festkörper-NMR aufgeklärt werden konnte [3], ist diese Methode zu immer komplexeren biologischen Fragestellungen vorgedrungen. Aufgrund der nicht vorhandenen Größenlimitierung ermöglicht Festkörper-NMR beispielsweise die Untersuchung von Membranproteinen in einer natürlichen Lipidumgebung und bei physiologischen Temperaturen [2]. Zudem liefert sie wichtige Beiträge zur strukturellen Untersuchung von Amyloidfibrillen [4], die eine zentrale Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen. Interessante Anwendungsmöglichkeiten der Festkörper-NMR ergeben sich auch mithilfe der dynamischen nuklearen Polarisation (DNP), die zur Signalverstärkung eingesetzt wird. Mittels DNP-verstärkter Festkörper-NMR-Spektroskopie konnte u. a. experimentell gezeigt werden, dass intrinsisch ungefaltete Proteine bereits im Grundzustand eine Vielzahl unterschiedlicher - teilweise gefalteter - Konformationen durchlaufen [5]. Auch Photointermediate des Rhodopsins konnten kürzlich mittels DNP charakterisiert werden [6].

Schnelles Magic-Angle-Spinning und Protonendetektion

Da anisotrope Wechselwirkungen durch MAS nur partiell ausgeglichen werden können, sind die Linienbreiten in Festkörper-NMR-Spektren auch mit MAS immer noch breiter als in Lösungs-NMR-Spektren. Dem wird mit der Wahl eines weiteren spektralen Detektionsbereichs begegnet, den der Einsatz von ^{13}C -Kohlenstoff als Detektionskern ermöglicht. Dies führt gleichzeitig aber zu Sensitivitätseinbußen im Vergleich zur Protonendetektion. Um diese Verluste zu vermeiden, ist die Protonendetektion (wie üblich in der Lösungs-NMR-Spektroskopie) auch in der Festkörper-NMR-Spektroskopie erstrebenswert. Zunächst gelang dies über den Einsatz stark deuterierter Proben auch bei langsameren MAS-Frequenzen [7]. In den letzten Jahren haben technische Fortschritte im Bereich der MAS-Probenkopf-Entwicklung immer höhere MAS-Frequenzen ermöglicht, die mit einer höheren spektralen Auflösung einhergehen. Gegenwärtig kommerziell erhältliche MAS-Probenköpfe können eine MAS-Frequenz von gut 100 Kilohertz erreichen. Bei solchen MAS-Frequenzen ist Protonendetektion von vollständig protonierten Proben auch in der Festkörper-NMR-Spektroskopie möglich [8]. Dies führt nicht nur zu einem deutlichen Sensitivitätsgewinn, sondern erlaubt auch den Transfer von Lösungs-NMR-Methoden auf die Festkörper-NMR. So ist es jetzt z. B. möglich, die innere Dynamik des Proteinrückgrats auch mittels Festkörper-NMR zu analysieren. Weiterhin gehen die sehr schnellen MAS-Frequenzen einher mit einer deutlichen Reduktion der Probenmenge. Damit können Spektren bereits von wenigen hundert Mikrogramm Protein aufgenommen werden. Somit werden auch schwierig und kostenintensiv zu exprimierende Biomoleküle, die in nur geringen Mengen hergestellt werden können, für eine strukturelle Analyse mittels Festkörper-NMR zugänglich.

Struktur und Dynamik von Membranproteinen

Diese Fortschritte ermöglichen z. B. die Untersuchung kleinster Mengen von Membranproteinen in einer Lipidumgebung [9]. Ebenso eignen sie sich für in Lipid-Nanodiscs verankerte Proteine (**Abb. 3**, [10]). Die Entwicklung neuer Verfahren zur Untersuchung der Struktur und Dynamik von Membranproteinen in einer natürlichen Lipidumgebung ist ein sehr aktives Forschungsgebiet in der

biologischen Festkörper-NMR-Spektroskopie. Insbesondere neue protonendetektierte Methoden mit sehr schnellen MAS-Frequenzen spielen hier eine wichtige Rolle. Diese Verfahren können in Zukunft, komplementär zur Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM), Einblicke in die Struktur und konformationelle Dynamik von Membranproteinen liefern. Sie eignen sich besonders gut für eine Vielzahl relativ kleiner und dynamischer Membranproteine, die für Kryo-EM nur schwer zugänglich sind. Im Bereich der integrierten Strukturbiologie gibt es erste vielversprechende Arbeiten, die lokale strukturelle und dynamische Information der Festkörper-NMR-Spektroskopie mit globaler Strukturinformation aus der Kryo-EM kombinieren [11, 12]. Somit wird die biologische Festkörper-NMR-Spektroskopie auch in Zukunft wichtige Beiträge zur Lösung komplexer aktueller struktureller biologischer Fragestellungen liefern. ■

Literatur

- [1] Alderson TR, Kay LE (2021) NMR spectroscopy captures the essential role of dynamics in regulating biomolecular function. *Cell* 184: 577–595
- [2] Huster D (2014) Solid-state NMR spectroscopy to study protein-lipid interactions. *Biochim Biophys Acta* 1841: 1146–1160
- [3] Castellani F, van Rossum B, Diehl A et al. (2002) Structure of a protein determined by solid-state magic-angle spinning NMR spectroscopy. *Nature* 420: 98–102
- [4] Meier BH, Riek R, Bockmann A (2017) Emerging structural understanding of amyloid fibrils by solid-state NMR. *Trends Biochem Sci* 42: 777–787
- [5] König A, Scholzel D, Ulu B et al. (2019) Hyperpolarized MAS NMR of unfolded and misfolded proteins. *Solid State Nucl Magn Reson* 98: 1–11
- [6] Maciejko J, Kaur J, Becker-Baldus J, Glaubitz C (2019) Photocycle-dependent conformational changes in the proteorhodopsin cross-protomer Asp-His-Trp triad revealed by DNP-enhanced MAS-NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 8342–8349
- [7] Linser R, Dasari M, Hiller M et al. (2011) Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of fibrillar and membrane proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 4508–4512
- [8] Andreas LB, Jaudzems K, Stanek J et al. (2016) Structure of fully protonated proteins by proton-detected magic-angle spinning NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 9187–9192
- [9] Jirasko V, Lends A, Lakomek NA et al. (2021) Dimer organization of membrane-associated NS5A of hepatitis C virus as determined by highly sensitive ^1H -detected solid-state NMR. *Angew Chem Int Ed Engl* 60: 5339–5347
- [10] Lakomek NA, Frey L, Bibow S et al. (2017) Proton-detected NMR spectroscopy of nanodisc-embedded membrane proteins: MAS solid-state vs solution-state methods. *J Phys Chem B* 121: 7671–7680

► **Abb. 3:** Protonendetektiertes zweidimensionales [^{15}N , ^1H] Spektrum des β -barrel Membranproteins OmpX (Bild der Proteinstruktur, PDB code 2M06, links oben), eingebettet in Lipid-Nanodiscs. Das Spektrum der vollständig protonierten Proteinprobe wurde bei einer MAS-Frequenz von 110 kHz und einer Temperatur von ca. 36 °C aufgenommen [10].

- [11] Zinke M, Sachowsky KAA, Oster C et al. (2020) Architecture of the flexible tail tube of bacteriophage SPP1. *Nat Commun* 11: 5759
- [12] Gremer L, Scholzel D, Schenk C et al. (2017) Fibril structure of amyloid-beta(1–42) by cryo-electron microscopy. *Science* 358: 116–119

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Nils-Alexander Lakomek
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 Institut für Physikalische Biologie
 Universitätsstraße 1
 D-40225 Düsseldorf
 E-Mail: Nils-Alexander.Lakomek@hhu.de
www.ipb.hhu.de/unsere-teams/arbeitsgruppe-lakomek

Forschungszentrum Jülich
 IBI-7: Strukturbiologie
 Wilhelm-Johnen-Straße
 D-52425 Jülich
n.lakomek@fz-juelich.de

AUTOR

Nils-Alexander Lakomek

1999–2008 Studium der Physik und Promotion, Universität Göttingen. 2009–2012 Postdoktorand an den National Institutes of Health (NIH) in Washington D.C., USA. 2012–2014 DFG-Projektleiter am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen. 2014–2019 EU Marie-Curie-Stipendiat und Wissenschaftler an der ETH Zürich, Schweiz. Seit 2020 Gruppenleiter an der Universität Düsseldorf.