



MAX-PLANCK-GESSELLSCHAFT

# NMR-Spektroskopie

Bioanalytik WS 2003/2004

**Dr. Markus Zweckstetter**

Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie

37077 Göttingen

[mzwecks@gwdg.de](mailto:mzwecks@gwdg.de)

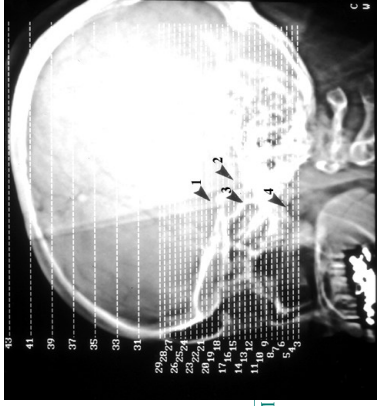
Tel. 0551 / 201 2220

<http://www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/030/zweckstetter>



## Literatur

- <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr>
- <http://www.spectroscopynow.com>
- Cavanagh, Fairbrother, W.J., Palmer, A.G., Skelton, N.J. (1996)  
Protein NMR spectroscopy, Academic Press, San Diego.



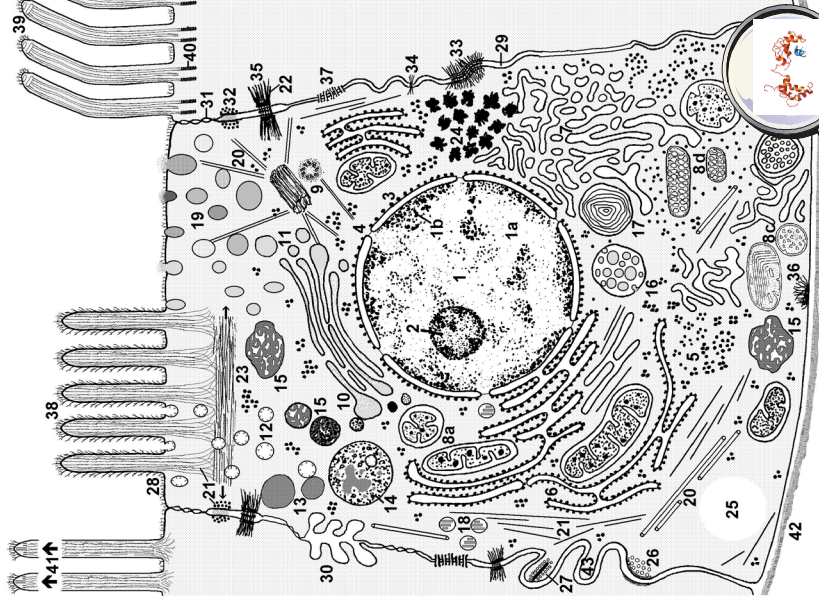
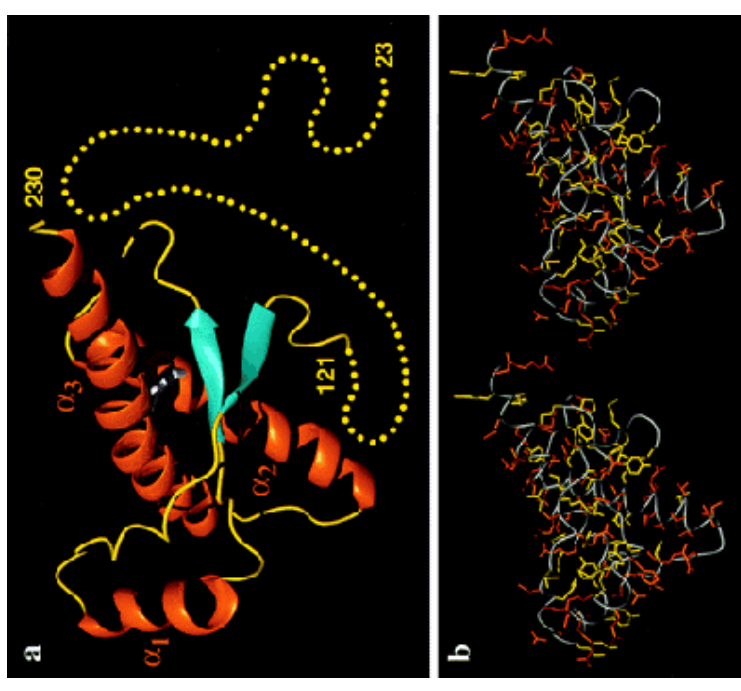
Bildgebende NMR



Vielzeller

# Kernmagnetische Resonanz: NMR

Strukturbiologische NMR



Zelle

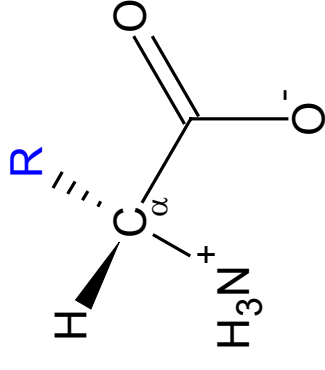
Prionenprotein

Bioanalytik WS 2003/2004



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

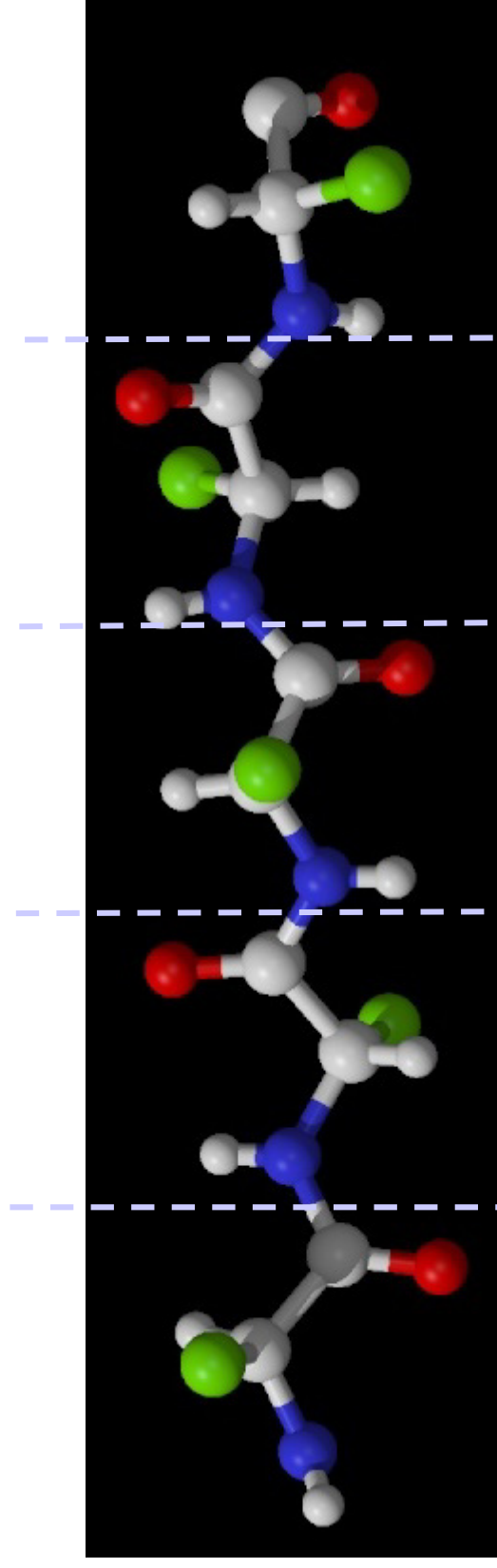
# NMR-basierte Strukturbiologie



Zentrale Frage der Strukturbiologie:

Was ist die dreidimensionale Struktur?

Die Form bestimmt die Funktion



Bioanalytik WS 1003/2004

**3.8 A**

← N-Terminus

C-Terminus →



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Proteinstrukturen mittels NMR

1/2 des Nobelpreises in Chemie 2002



Kurt Wüthrich  
ETH Zürich &  
Scripps Research  
Institute, USA



# Grundlagen der NMR

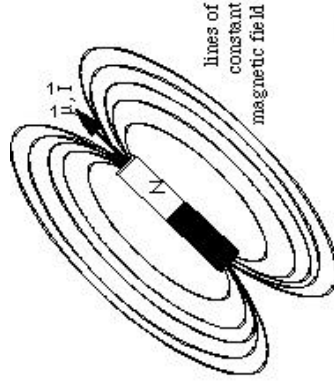
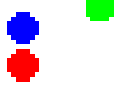
Bloch (1946) und Hahn (1950)

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

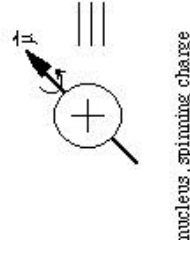
1. Atomkerne mit einer ungeraden Anzahl an Neutronen und/oder Protonen besitzen :

- Einen Eigendrehimpuls (Kernspin)
- ein *magnetisches Moment*  $\mu$ .

● = electron  
● = neutron  
● = proton



tiny bar magnet, with angular momentum ( $\vec{I}$ ) and magnetic moment ( $\vec{\mu}$ )



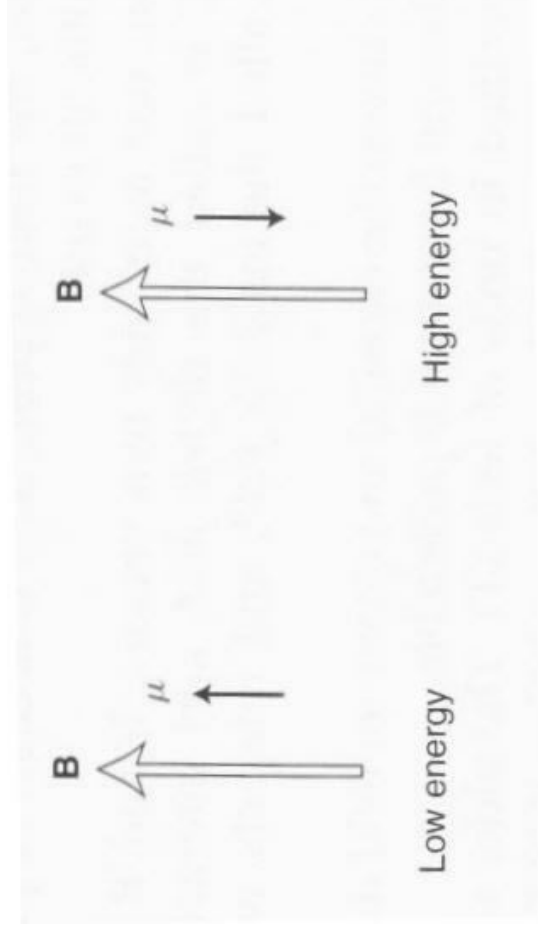
nucleus, spinning charge



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

$$E_{\text{mag}} = -\mu \cdot B$$

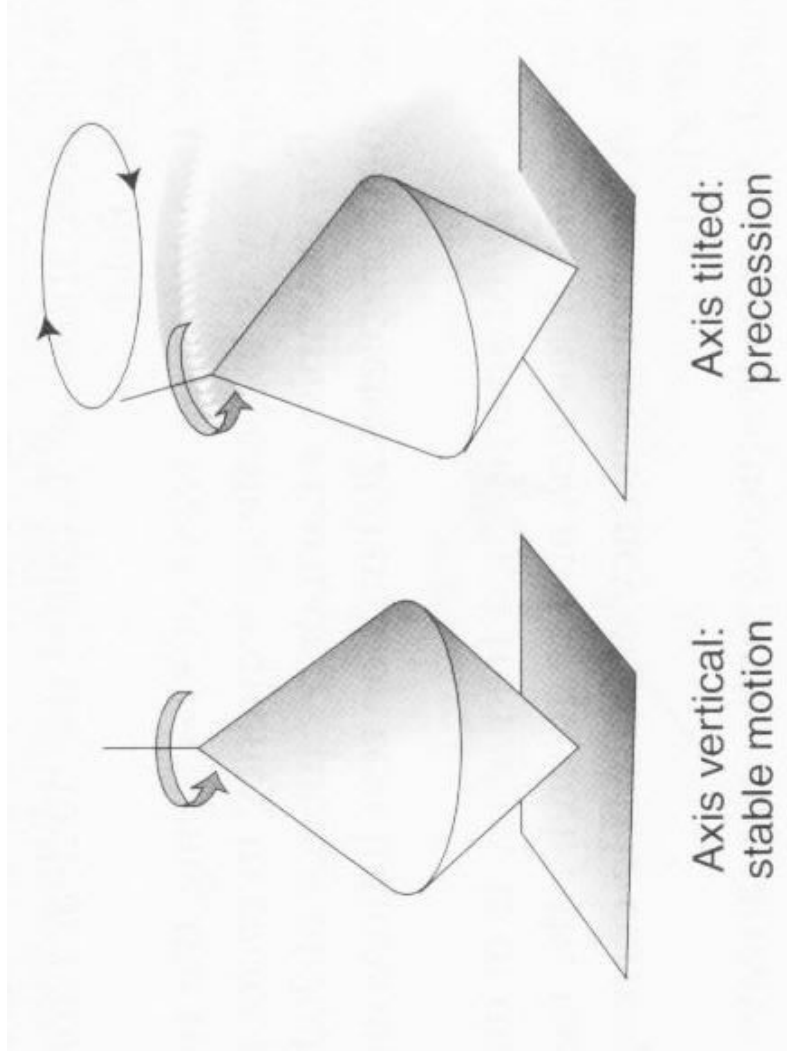
- 2) Energie hängt von der relativen Orientierung von  $\mu$  und  $B$   
→ Magnetische Momente richten sich im Magnetfeld aus (Kompassnadel)





MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Präzession







MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

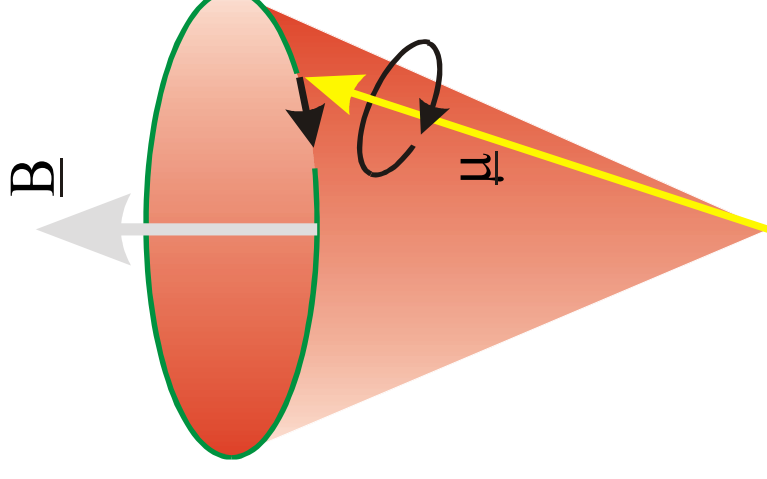
# Spinpräzession

- Magnetischer Kreisel

$$\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} = \gamma \boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{B}$$

Bloch-Gleichung ohne  
Relaxationseffekte

- $\gamma$  = gyromagnetisches Verhältnis
- Präzessionsfrequenz  $\omega = \gamma B$   
(Larmor-Gleichung)
- Für Protonen,  $\gamma = 42.58 \text{ MHz/T}$





MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Grundlagen der NMR

Bloch (1946) und Hahn (1950)

$$\omega = \gamma B$$

Proportionalitätskonstante für  
Kernsorte spezifisch (MHz/Tesla)

Stärke des statischen Magnetfelds  
(14-20 Tesla)

Nuclei	Unpaired Protons	Unpaired Neutrons	Net Spin	$\gamma$ MHz/T
$^1\text{H}$	1	0	1/2	42.58
$^2\text{H}$	1	1	1	6.54
$^{31}\text{P}$	0	1	1/2	17.25
$^{23}\text{Na}$	2	1	3/2	11.27
$^{14}\text{N}$	1	1	1	3.08
$^{13}\text{C}$	0	1	1/2	10.71
$^{19}\text{F}$	0	1	1/2	40.08



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Grundlagen der NMR

Bloch (1946) und Hahn (1950)

- 4) Ausrichtung von magnetischen Momenten (Protonen) entlang des Magnetfelds resultiert in makroskopischer Magnetisierung (Gleichgewichtsmagnetisierung).

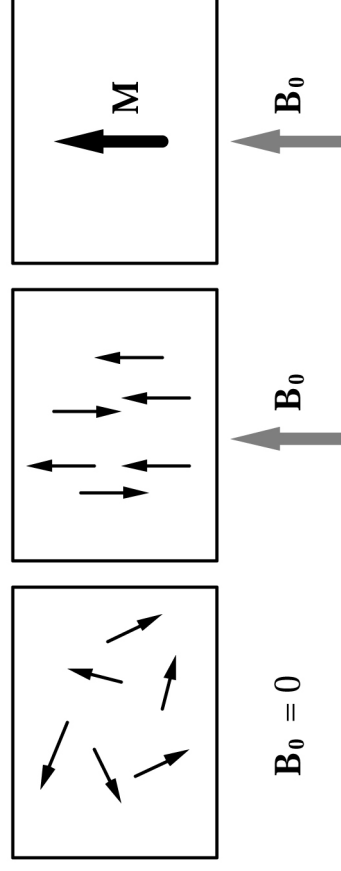


Figure 1. Randomly oriented magnetic moments aligning with an applied magnetic field ( $\mathbf{B}_0$ ) to form a net magnetization.



# Grundlagen der NMR

Bloch (1946) und Hahn (1950)

5. *Anregung – Absorption von Radiowellen in starken Magnetfeldern:*  
Wenn Radiowellen (ein sogenannter *Radiofrequenzpuls*) mit einer geeigneten Frequenz (im UKW-Bereich) auf die Atomkerne eingestrahlt werden, absorbieren die Spins Energie, es kommt zum teilweise Umklappen der Spins. → **makroskopische Magnetisierung präzediert um das statische Magnetfeld**

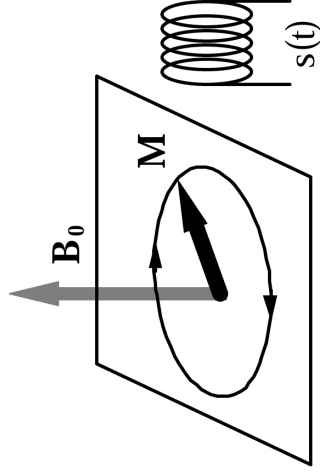
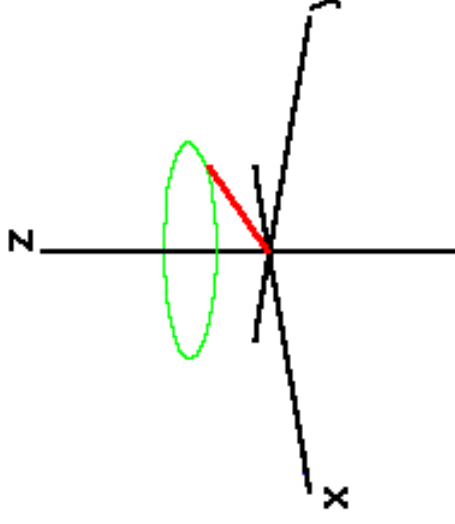


Figure 2. Excited magnetization precessing around the static magnetic field thus inducing a voltage,  $s(t)$ , in a nearby coil.

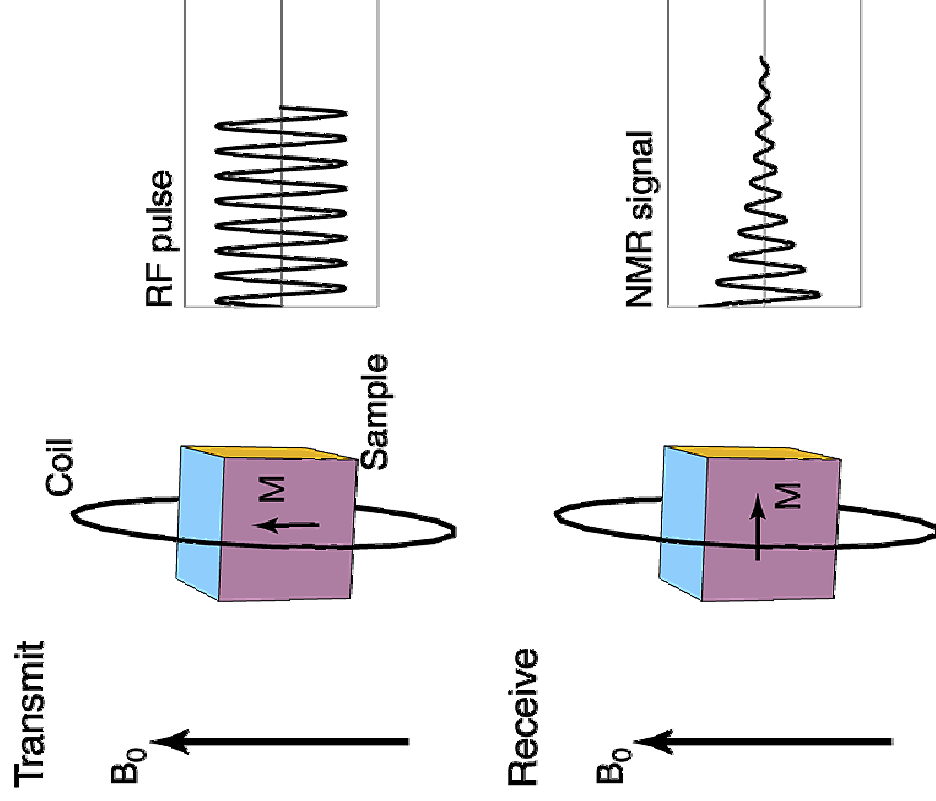
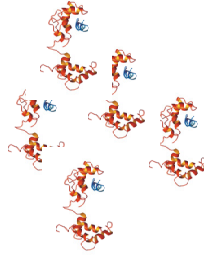


Die präzedierende Magnetisierung kann mittels einer Spule gemessen werden.



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Das NMR-Experiment



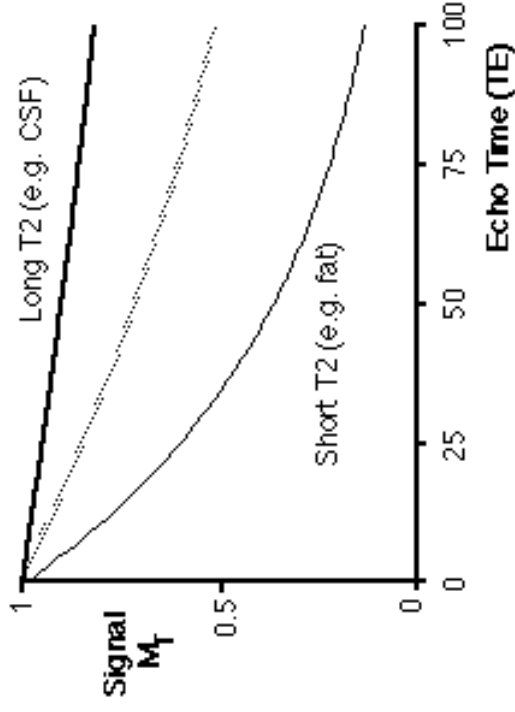
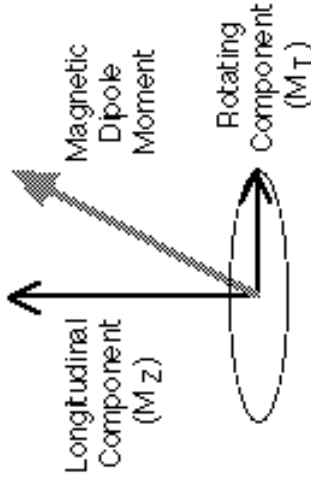


MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Grundlagen der NMR

Bloch (1946) und Hahn (1950)

## 6. Exponentielle Rückkehr zum Gleichgewichtszustand





# Fouriertransformations-NMR-Spektroskopie

In der gepulsten Fouriertransformations-1D-NMR-Spektroskopie wird ein  $90^\circ$  - Puls (Dauer:  $1\ \mu\text{s} - 1\ \text{ms}$ ) auf die Gleichgewichtsmagnetisierung eingestrahlt. Dieser rotiert die Magnetisierung in die transversale Ebene (x,y-Ebene), in welcher die Magnetisierung mit der charakteristischen Larmorfrequenz präzediert.

Messung der x und y Komponente im rotierenden Koordinatensystem ergibt den FID, welcher die Präzessionsfrequenz aller Kerne kodiert.

Fourier-Transformation resultiert in einem 1D NMR-Spektrum mit einem Signal für jeden Kern/Magnetisierung.



MAX-PLANCK-GESSELLSCHAFT

# Fourier-Transformation

- Beispiel: Schall
- Was is Schall? Eine oszillierende Druckwelle in der Luft. Der Druck ist eine Funktion der Zeit  $f(t)$ .
- Wie hören wir? Wir detektieren mit unseren Ohren die Intensität jeder einzelnen Frequenz  $F(v)$ .
- Die mathematische Beziehung zwischen  $f(t)$  und  $F(v)$  nennt sich Fourier-Transformation.





MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



### The Nobel Prize in Chemistry 1991

"for his contributions to the development of the methodology of high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy"



**Richard R. Ernst**

Switzerland

Eidgenössische Technische Hochschule Zürich  
(Swiss Federal Institute of Technology Zürich)  
Zürich, Switzerland

b. 1933



# Biomolekulare NMR-Spektroskopie

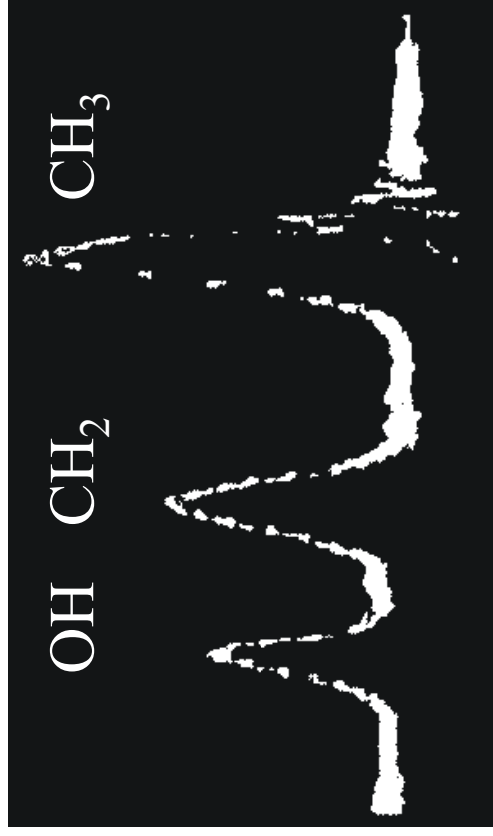
- Energieabsorption
  - Wir beobachten nicht einzelne Atomkerne in der Gasphase.
  - In Materie/Proteinen besitzt jeder Atomkern eine spezifische chemische Umgebung, welche das Magnetfeld, welches am Ort des Atomkerns vorliegt, und damit die Resonanzfrequenz (Larmorfrequenz) des Kerns beeinflusst.



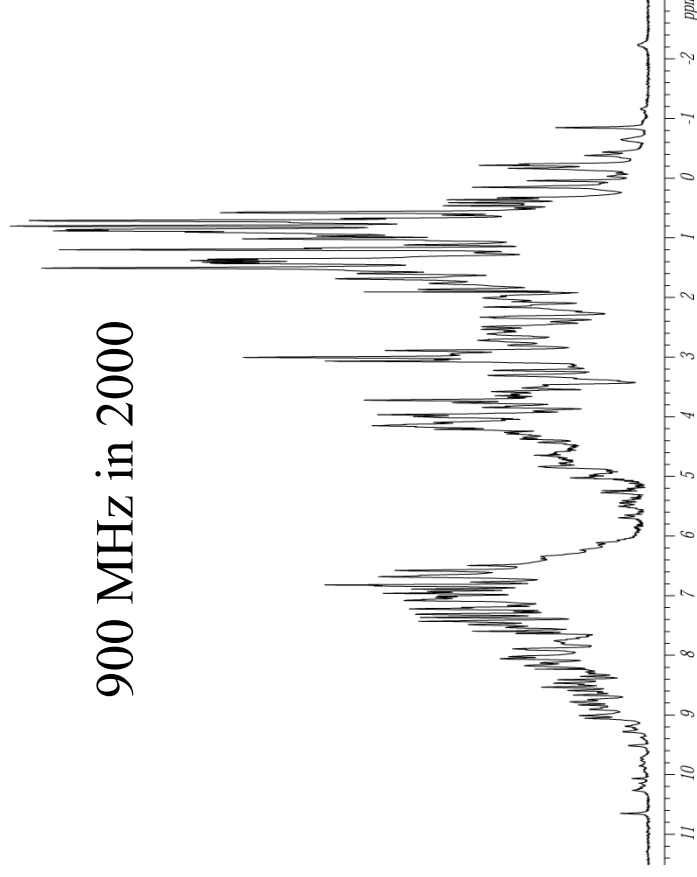
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Jeder Wasserstoffkern (Proton) gibt im NMR Spektrum ein individuelles Signal

Ethanol Protonenspektrum  
30 MHz in 1951



900 MHz in 2000





# 900 MHz NMR Spektrometer

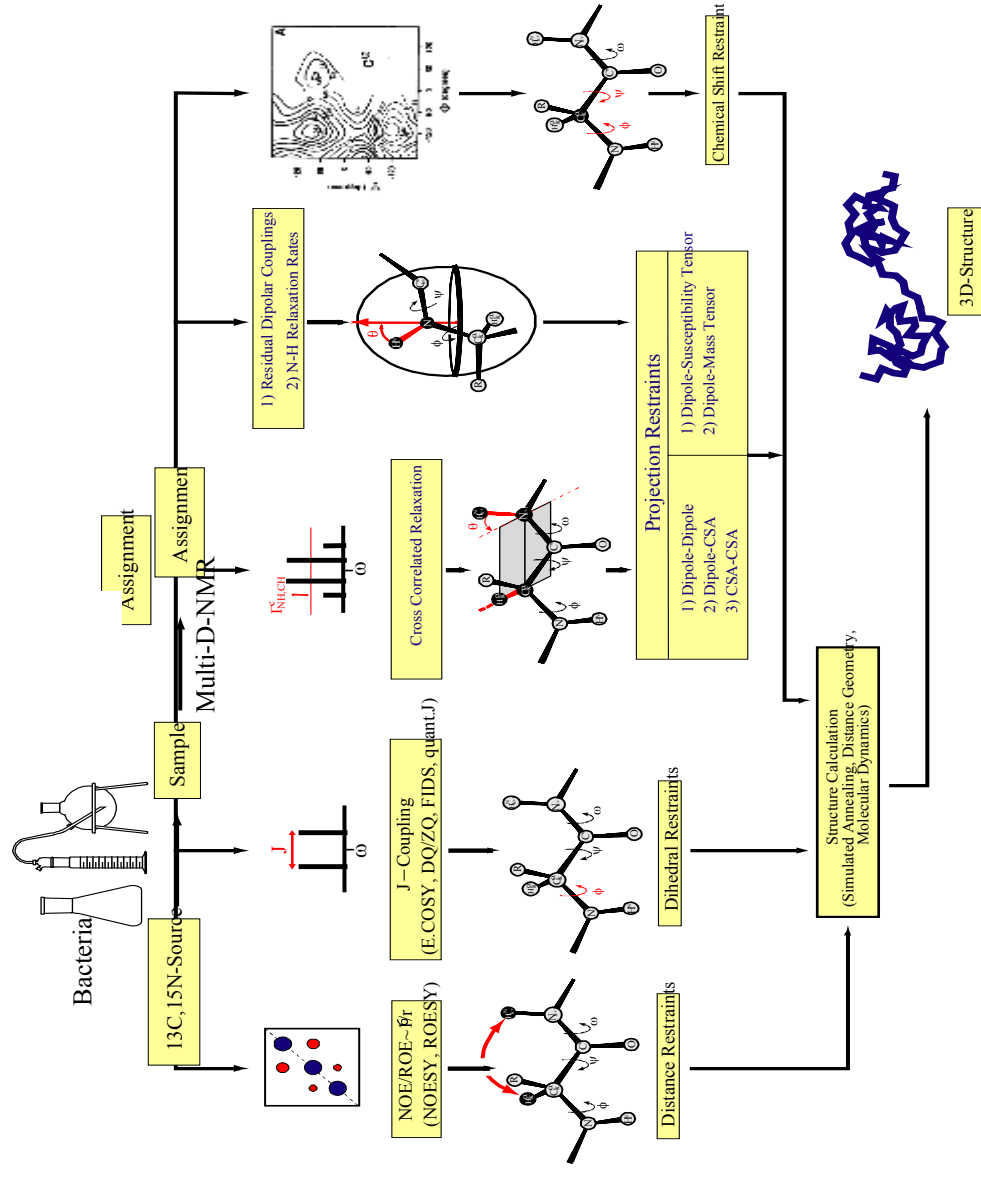
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

**Dafür werden extrem starke Magnetfelder benötigt. Dieser Magnet ist 500 tausend mal so stark wie das Magnetfeld der Erde.**





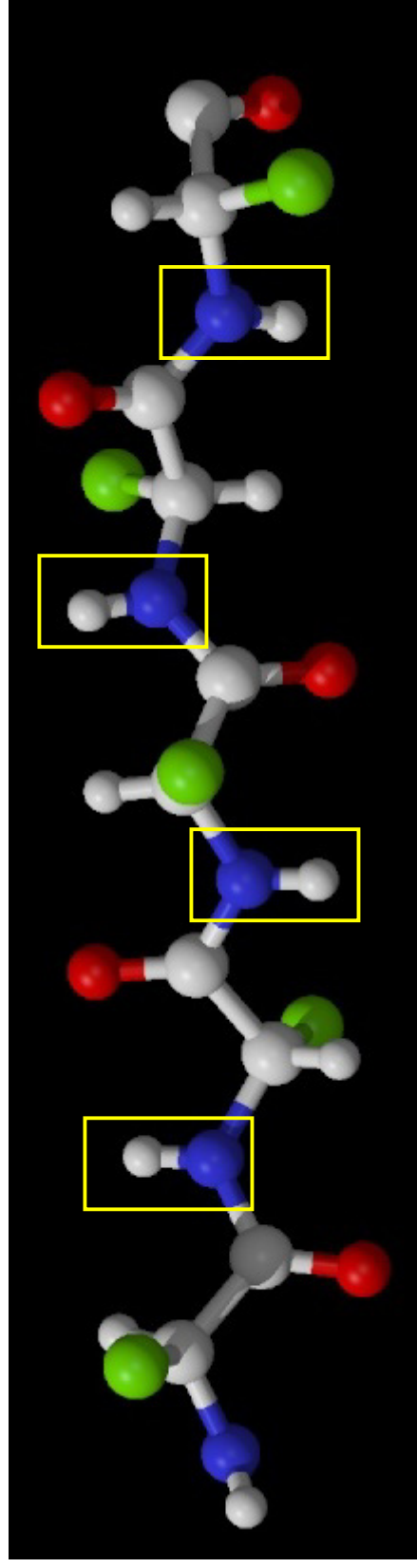
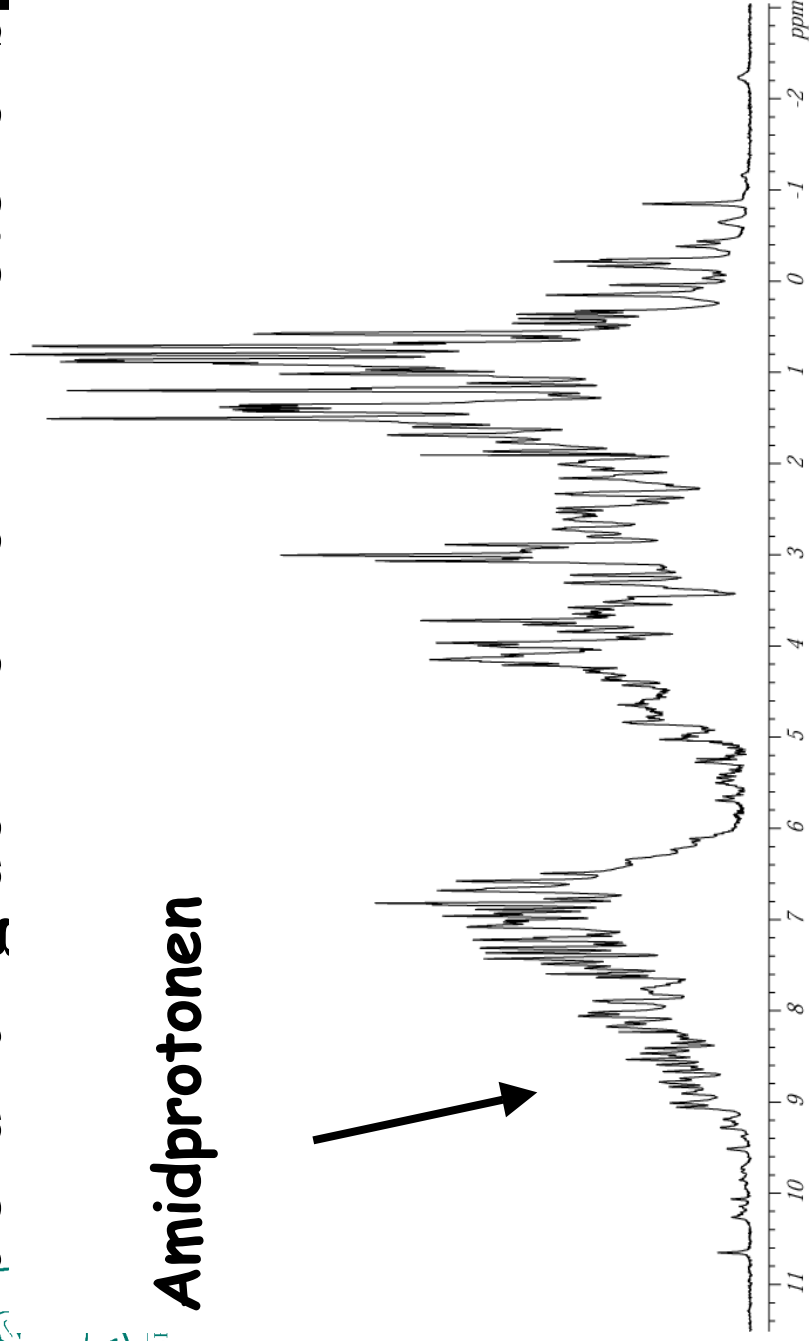
# Strukturbestimmung mittels NMR





# Zuordnung der Kerne im Protonenspektrum

MAX-PLANCK-GES.  
**Amidprotonen**







# NMR Parameter, welche Strukturinformationen liefern

- chemische Verschiebungen
- Dihedrale Winkel im Proteinrückgrat und den Seitenketten auf der Basis von skalaren (J-) Kopplungen
- Distanzvorgaben durch NOEs
- Informationen über Wasserstoffbrücken mittels skalarer Kopplungen
- Orientierungsinformationen aus residualen dipolaren Kopplungen

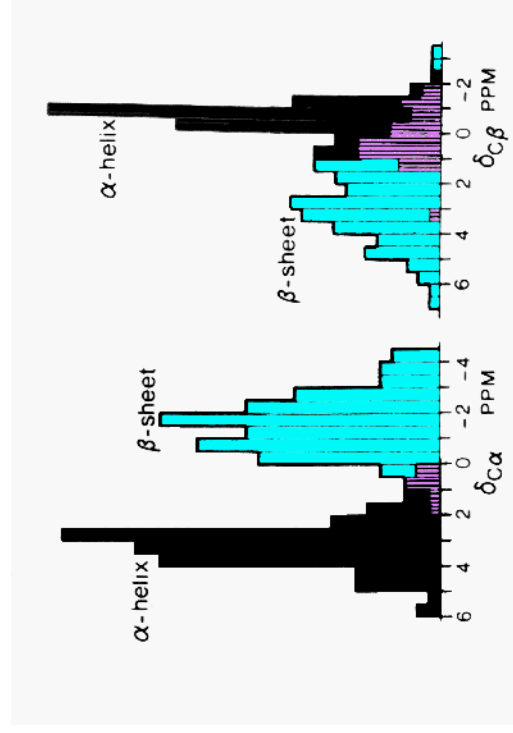




MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Chemische Verschiebungen

The chemical shifts of amino acids in a protein are characteristically affected versus the chemical shifts of the amino acid in an unstructured peptide (random-coil value) depending whether the amino acid under investigation is in an  $\alpha$ -helix or a  $\beta$ -sheet of the protein. A histogram of secondary chemical  $\delta^{\text{sec}} = \delta^{\text{protein}} - \delta^{\text{randomcoil}}$  shifts shows that the secondary chemical shifts of the  $C_\alpha$  ( $C_\beta$ ) are larger (smaller) than 0 for the  $\alpha$ -helix and larger (smaller) than 0 for the  $\beta$ -sheet.

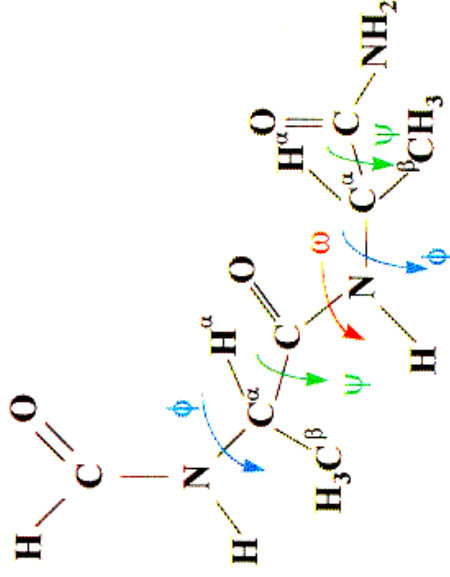




# Skalare (J-) Kopplungen

J-couplings that are observed between protons separated by 3 bonds are called **3J** couplings. They depend on the dihedral angle  $\theta$  between the involved protons with the

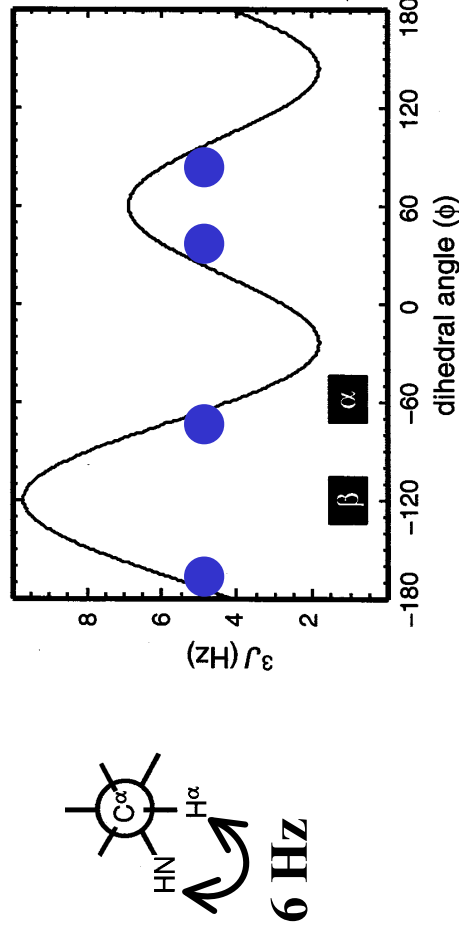
**Karplus-equation:**  ${}^3J = A\cos^2\theta + B\cos\theta + C$





The most important and easiest to measure couplings to be determined in proteins define the protein angle  $\phi$  and  $\chi_1$ . The coupling constants to be measured are the  $3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$  and the  $3J(\text{H}\alpha, \text{H}\beta)$ . The respective Newman projections are given in the figure.

For  $\alpha$ -helix the  $3J(\text{HN}, \text{H}\alpha)$  is around 4 Hz while it is around 10 Hz for the  $\beta$ -sheet. Thus  $\phi$  can be defined by the J-coupling.





# Nuclear Overhauser Enhancement (NOE)

The **NOE** measured in the NOESY experiment is the most important parameter to determine structures for biomolecules with NMR. The NOE is a pairwise effect meaning that the signal of proton  $i$  is enhanced through the spatial proximity of proton  $j$  with the cross relaxation rate  $\sigma_{ij}$ . The distance dependence is  $1/r_{ij}^6$

The cross relaxation rate  $\sigma_{ij}$  for biomacromolecules is given by:

$$\sigma_{ij} = -\frac{\gamma_i^2 \gamma_j^2 \mu_0^2 \tau_c}{160\pi^2 r_{ij}^6}$$

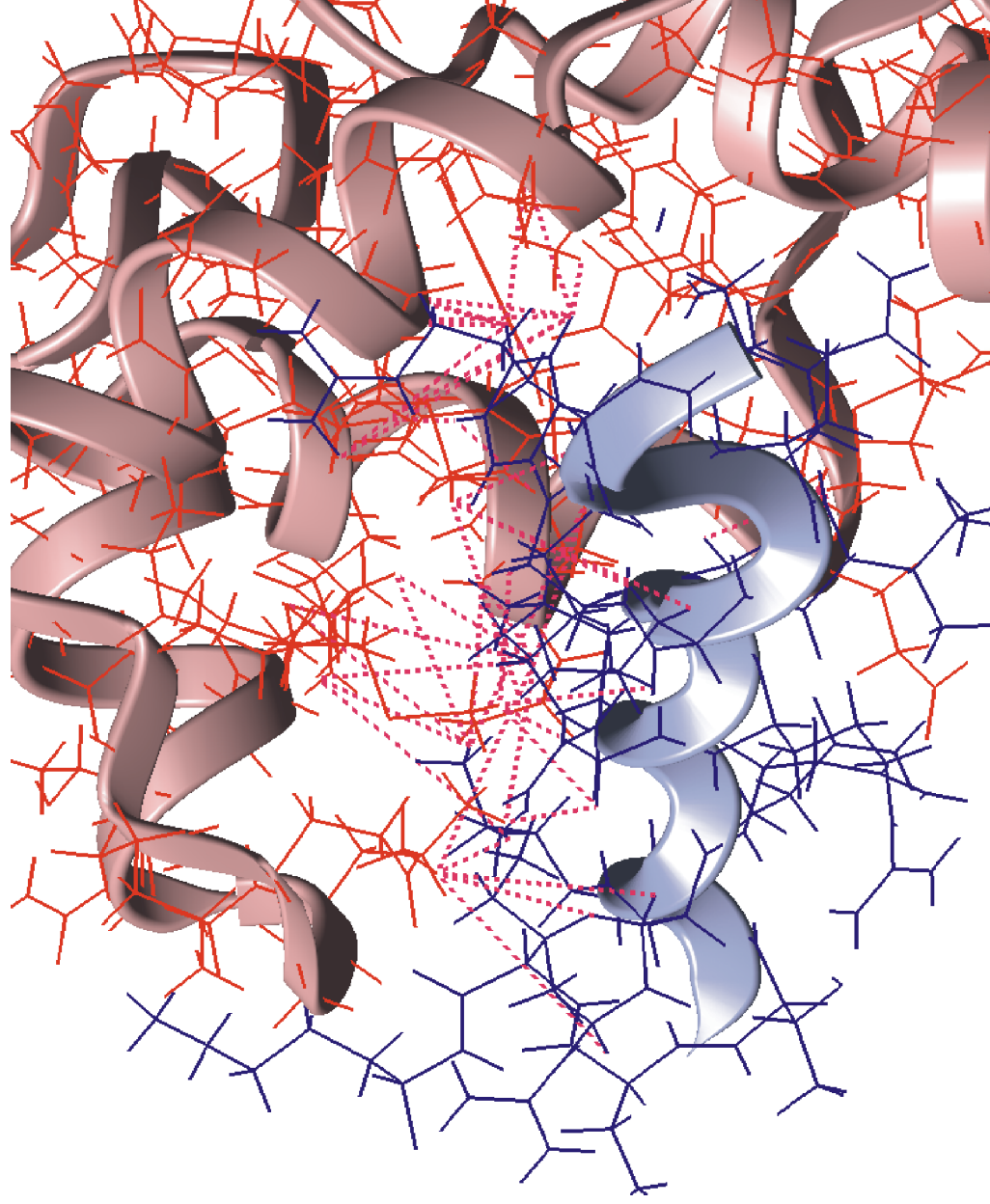
Due to the strong distance dependence of the NOE it is not long reaching. On average, the NOE is limited to approximately 5Å.

By recording all the pairwise NOE's between the protons, up to 30 to 40 such NOE's per amino acid can be collected. The NOE also allows to distinguish between the secondary structure elements.



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

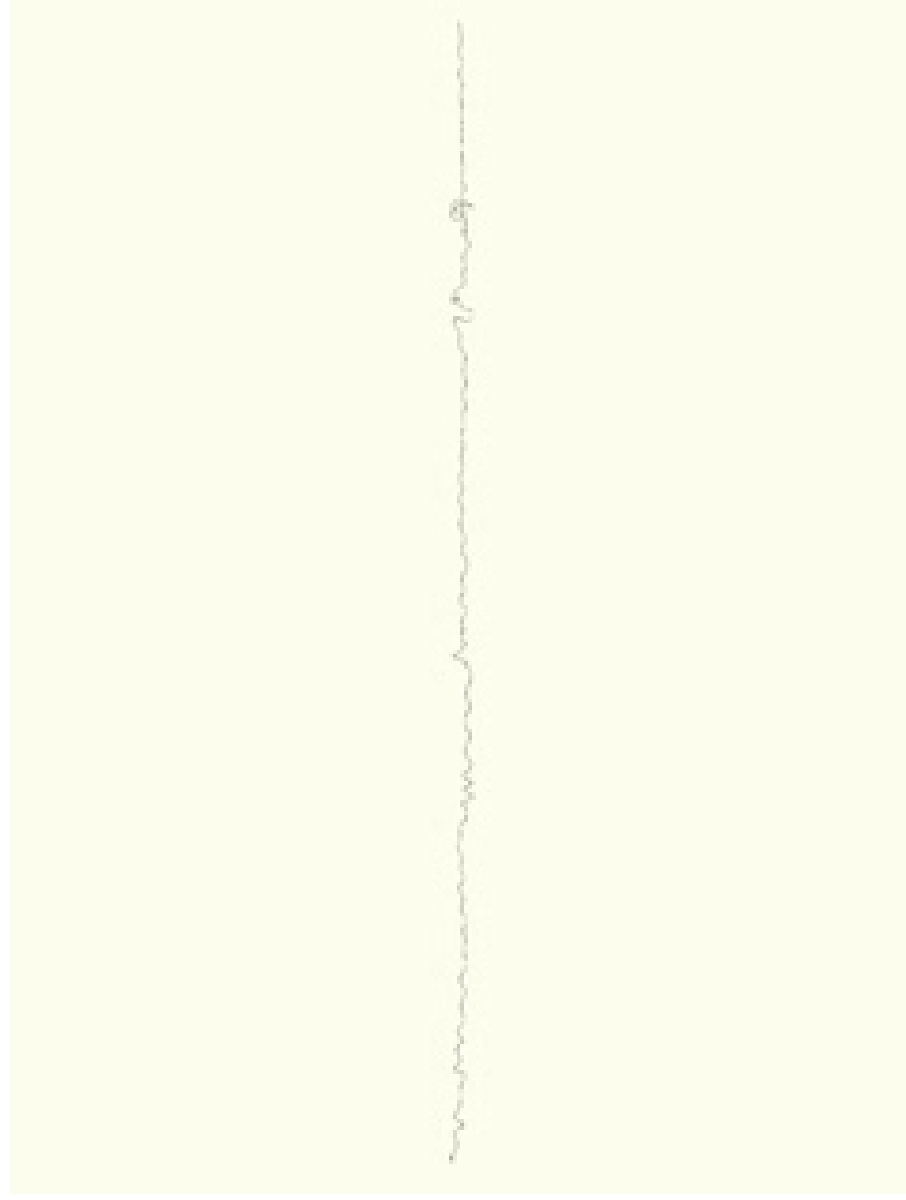
# Distanzvorgaben durch NOEs



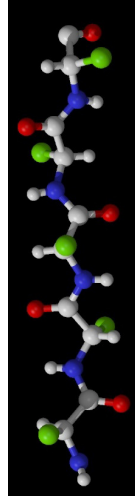


MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# NMR Strukturrechnung



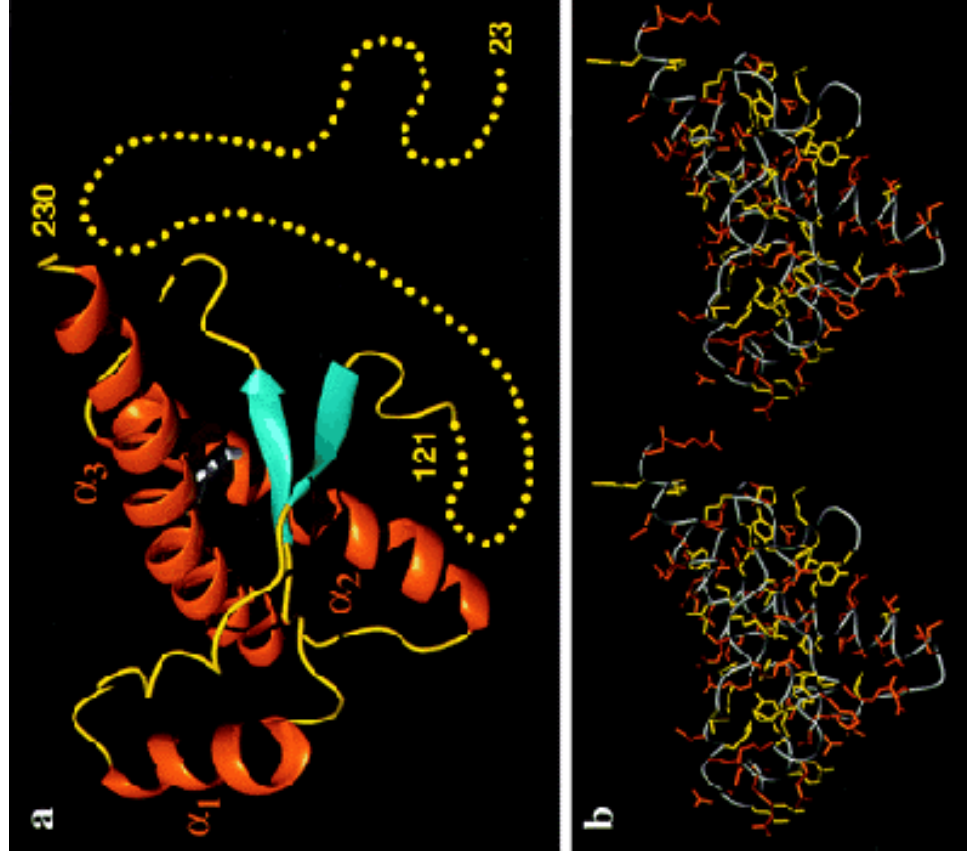
## Molekulardynamik





MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Dreidimensionale Struktur des Prionenproteins





# NMR an Proteinen > 10 kDa

- As one can nicely see, there is a lot of overlap of the peaks in the NOESY experiment especially in the region of the aliphatic to aliphatic protons. Therefore it is necessary to increase the resolution.
- There are two strategies that have been introduced in the late 80's.
- **3D-NMR and 13C and 15N labelling.**
- **3D NMR** resolves by correlating three instead of two frequencies with each other the resonances better, since each frequency dimension has uncorrelated dispersion. It is depicted on the next page showing a 1D, 2D and 3D spectrum.
- **13C and 15N labeling** introduces more nuclei that can be used for the NMR experiment. In addition, the J-interactions are dramatically bigger for  $1J(H,C) = 135 \text{ Hz}$  and  $1J(H,N) = 90 \text{ Hz}$  as compared to the  $3J(H,H)$  couplings that are limited to a maximum of 13 Hz.
- For the heteronuclear labeling, it is required to express the protein and incorporate the  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  label from cheap sources. The cheapest variants are the expression in **E.coli** based on feeding  $^{13}\text{C}$ -glucose and  $^{15}\text{N}$ -ammoniumsulfate as the sole carbon and nitrogen source. A protocol for the expression in minimal medium is attached.
- An alternative is the **cell free expression** from cell free lysate that contains the translational machinery. Here addition of labeled amino acids is required.

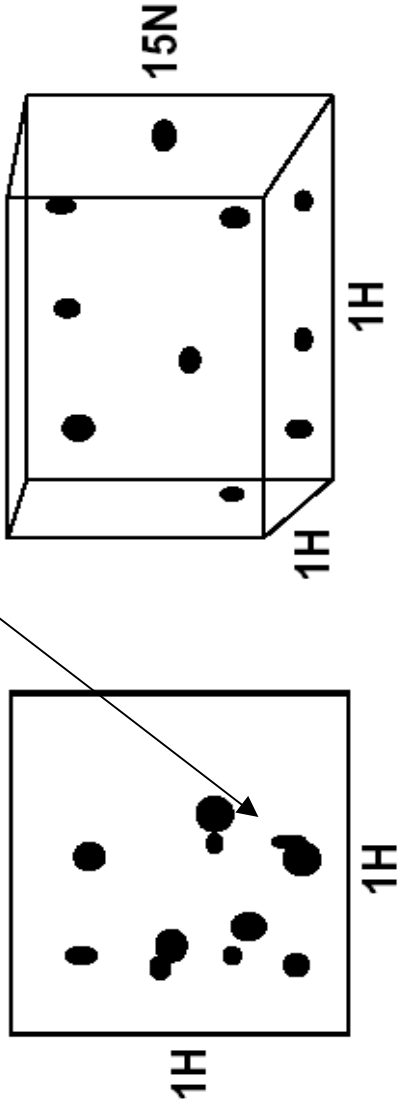
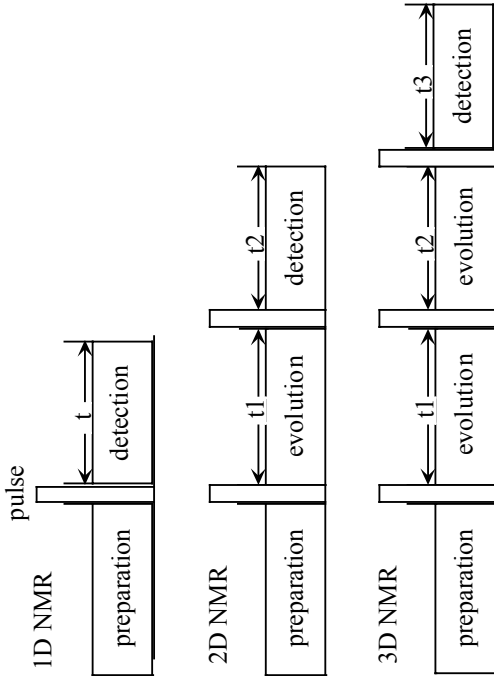
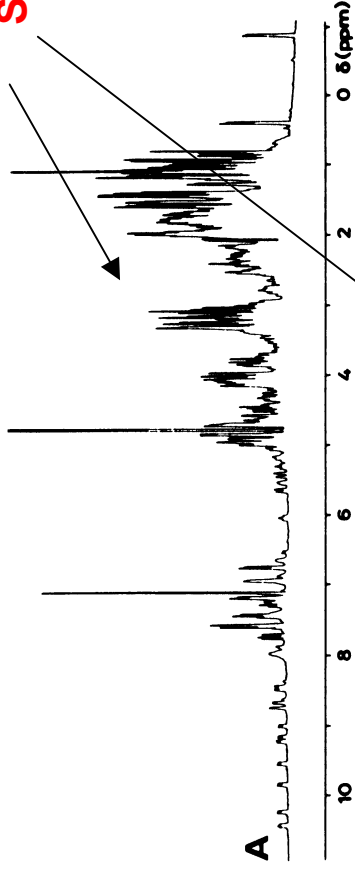




# 3D NMR

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

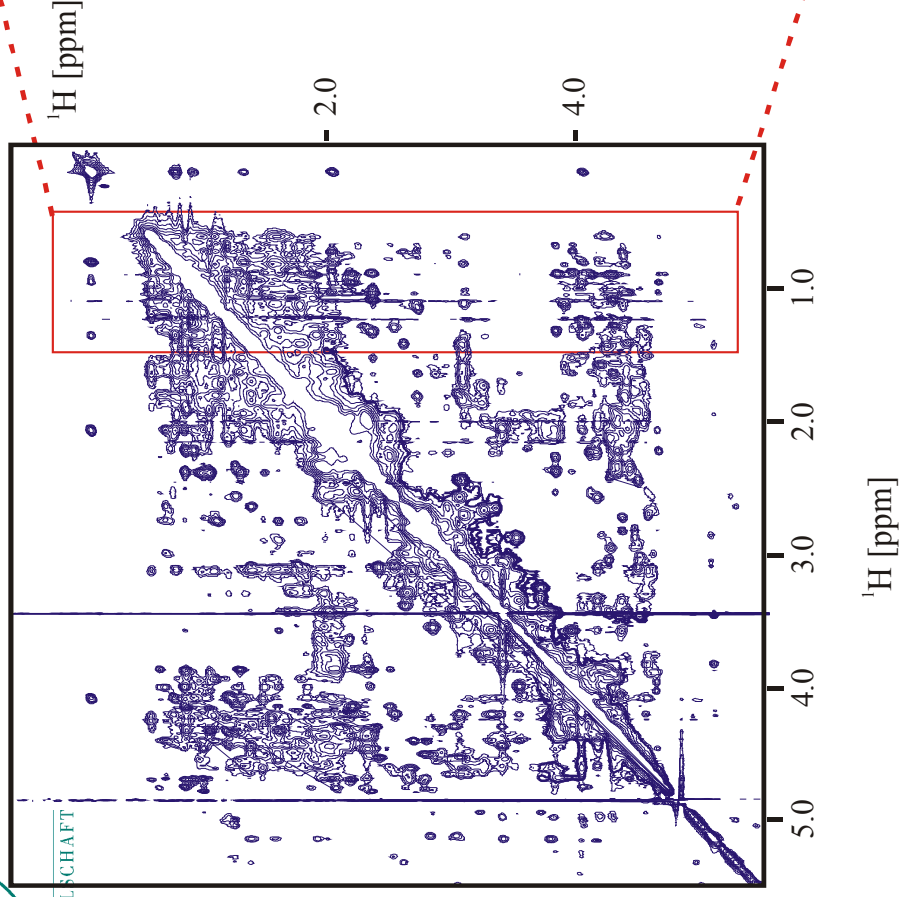
**Signalüberlapp**



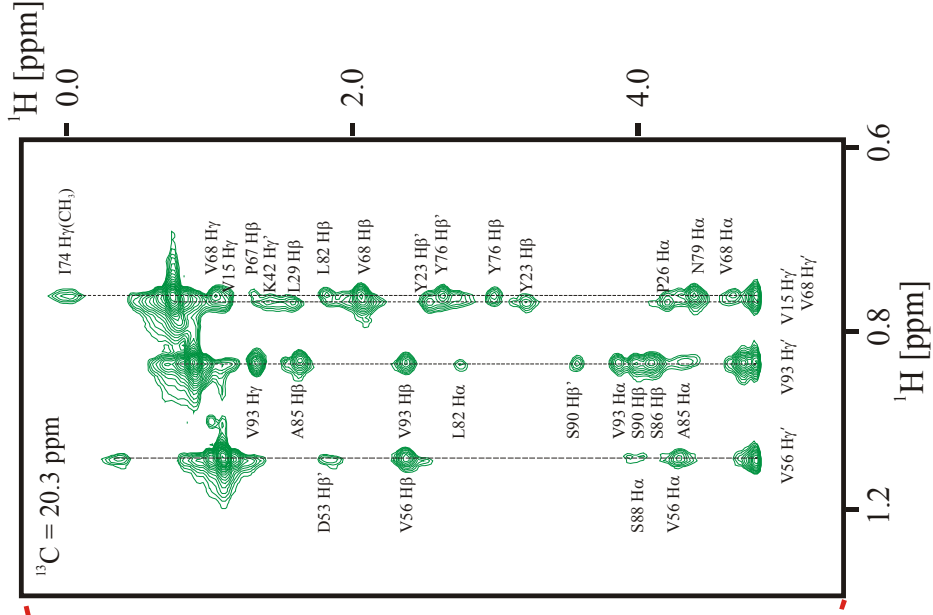


MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

## 2D NOESY



## Slice of 3D NOESY-HSQC

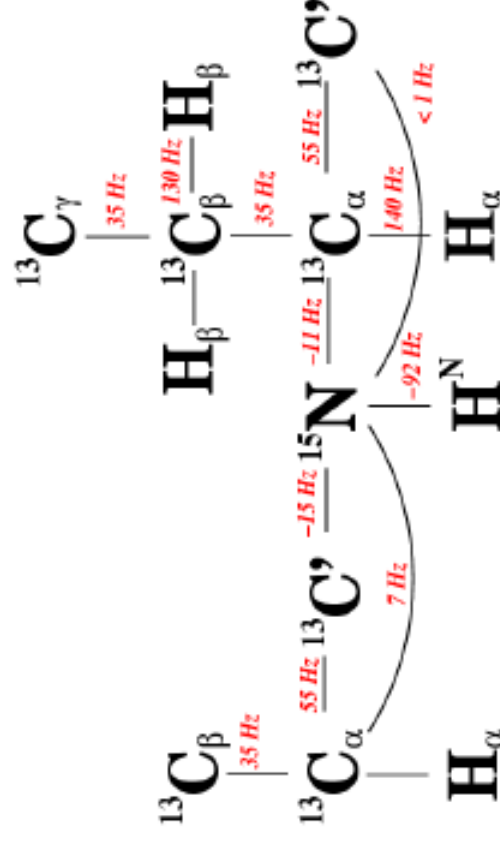


Realistic limit of homonuclear NMR: proteins of 100-120 amino acids; spectra of larger proteins are too crowded



# Heteronuclear NMR exploits 1-bond scalar couplings

## <sup>1</sup>J- and <sup>2</sup>J-couplings in proteins



- 1-bond couplings are large (20-150 Hz) compared to HH couplings (1-10 Hz)  
→ **Mixing is faster so less time for signal to relax**
- They are independent of conformation: no structural insight but wonderful for assignments



# Proteinexpression im Minimalmedium

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

- 1) Transform competent *E. coli* cells for expression (e.g. BL21) with plasmid and plate onto LB agar. Incubate overnight at 37 °C (all plates and liquid media used should contain 2 - 4 g/L of glucose and 50 - 100 µg/ml of ampicillin or carbenicillin).
- 2) Pick colonies from plate and inoculate into 5 ml of LB media and incubate at 37 °C with shaking.
- 3) When the OD600 is at ~ 0.6 - 1, inoculate 50 ml of minimal media (M9 + supplements) with 0.5 ml of culture. Incubate overnight at 30 - 37 °C with shaking. Induce the rest of the LB culture with 0.1 - 0.5 mM IPTG (optional - this is to check that the cells can express the protein of interest).
- 4) Spin down the cells (~200g), remove supernatant and resuspend cells in 10 ml of minimal media. Inoculate into 2 X 500 ml of minimal media. Incubate at 37 °C with vigorous shaking (280 rpm).
- 6) When the OD600 reaches 0.8- 1.0 (3 - 4 hours), induce cells with 0.1 mM IPTG. Alternatively induce cells gently at OD600 of 0.3-0.4 with 0.025 mM IPTG, doubling the IPTG added every hour for the next 3 hours. Harvest cells 4-6 hours after induction or leave overnight.

## Minimal(fish) Media

(adapted from M9 with added supplements)

Per litre:

6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0.5 g NaCl  
1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.7g if NH<sub>4</sub>Cl is used)

pH adjusted to 7-7.4 and autoclaved. The following are then filtered sterilised and added:

2 ml 1M MgCl (use MgSO<sub>4</sub> if NH<sub>4</sub>Cl is used as nitrogen source)  
10 µl 1M CaCl<sub>2</sub>  
1 ml 0.01 M FeSO<sub>4</sub> (make fresh)  
10 ml 20% glucose (or 2 g)  
1 ml Vitamins solution  
1 ml micronutrients

## Micronutrients

1000X concentration  
3 X 10<sup>-6</sup> M Amm. Molybdate  
4 X 10<sup>-4</sup> M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
3 X 10<sup>-5</sup> M CoCl<sub>2</sub>  
1 X 10<sup>-5</sup> M CuSO<sub>4</sub>  
8 X 10<sup>-5</sup> M MnCl<sub>2</sub>  
1 X 10<sup>-5</sup> M ZnSO<sub>4</sub>

## Vitamins Supplements

Per litre (1000X concentration):  
0.4 g Choline chloride  
0.5 g Folic acid  
0.5 g Pantothenic acid  
0.5 g Nicotinamide  
1.0 g Myo-inositol  
0.5 g Pyridoxal HCl  
0.5 g Thiamine HCl  
0.05 g Riboflavin  
1.0 g Biotin



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Was heute mit NMR möglich ist

räumliche Struktur von Proteinen bis zu einer molaren Masse von 50 Kilodalton mittels NMR gelöst werden

die Interaktion zwischen zwei Proteinen oder eines Proteins mit einem Liganden kann im atomaren Detail aufgeklärt werden

der Faltungsprozess von Proteinen kann untersucht werden

Proteine können direkt in Zellen untersucht werden

den ETH-Forschern um *Wüthrich* gelang es kürzlich, die Bindung von GroES an GroEL, einem 900-Kilodalton Proteinkomplex, mittels  $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -Korrelationsexperimenten zu untersuchen

Bisher wurden ca. 2700 mit NMR Spektroskopie bestimmte Proteinstrukturen in der Protein-Daten-Bank (PDB), [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org).

Strukturelle Genomik

Metabonomik

Bioanalytik WS 2003/2004

37



# Festkörper-NMR

NMR-Spektroskopie ist jedoch nicht auf lösliche Proteine beschränkt. Sie eignet sich in gleicher Weise zur strukturellen Charakterisierung von Nucleinsäuren, Zuckern und Naturstoffen.

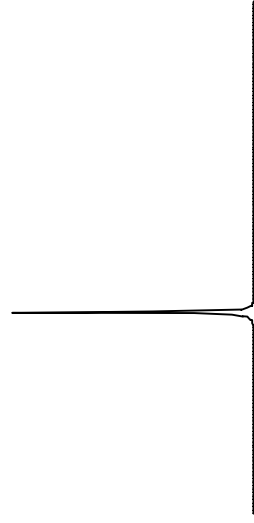
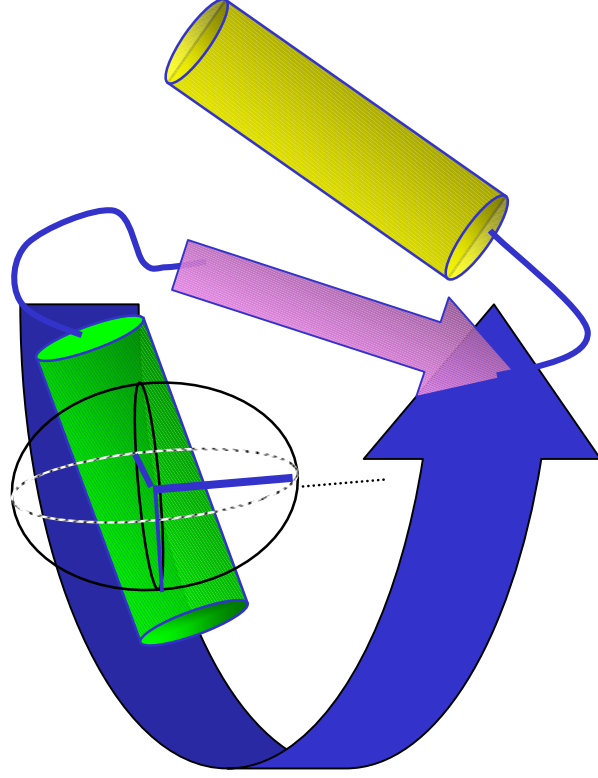
Von besonderer Bedeutung ist weiterhin die Strukturbestimmung von Membranproteinen. Etwa ein Drittel unserer Gene kodiert Proteine, welche an Membranen gebunden sind. Diese Proteine sind aus pharmakologischer Sicht besonders interessant, da hierzu Kanal- und Transportproteine ebenso wie Rezeptoren für Neurotransmitter und Hormone zählen. Membranproteine lassen sich jedoch nicht in Wasser lösen und sind zudem äußerst schwer zu kristallisieren (für eine mögliche Röntgenstrukturanalyse). Daher sind bis heute nur wenige, räumliche Strukturen von Membranproteinen bekannt.

Für Untersuchungen mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie ist keine reguläre Anordnung der Proteine, das heißt keine Kristallisation, erforderlich. Die Proteine können in ihrer natürlichen Umgebung betrachtet werden

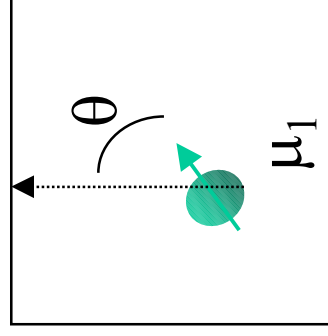


MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

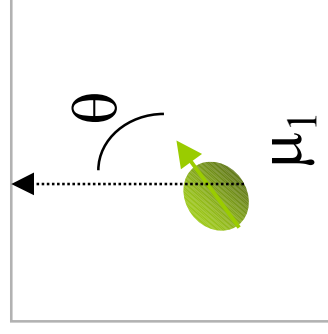
# NMR in Lösung: Isotrope Wechselwirkungen



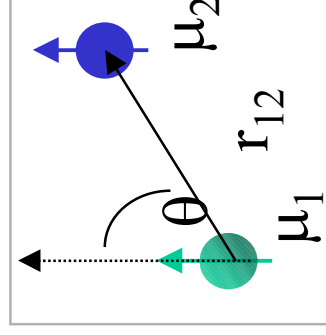
Chemical shift



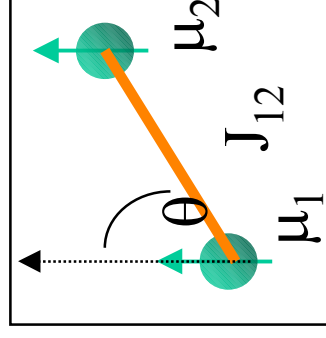
quadrupolar coupling



Dipolar coupling



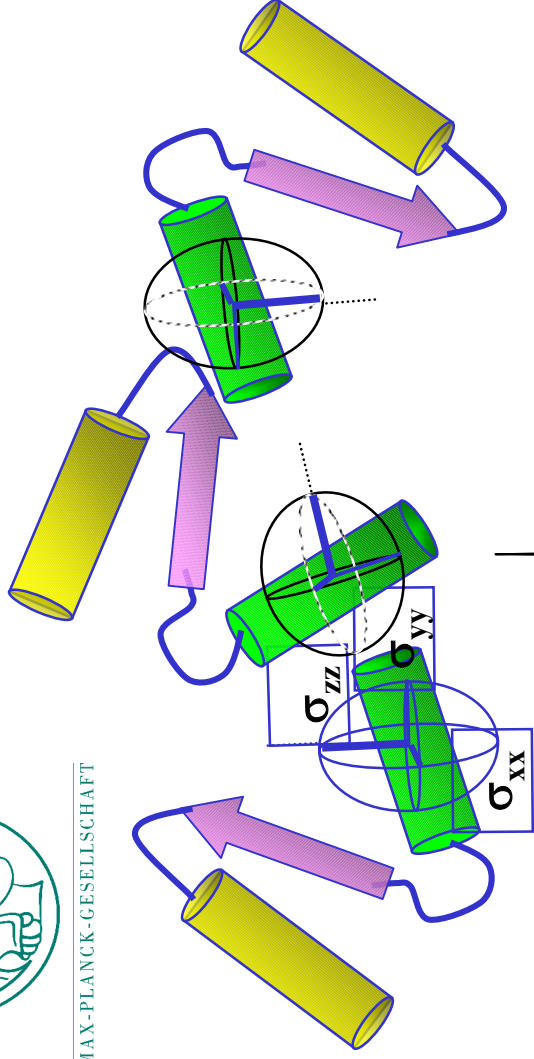
Scalar coupling



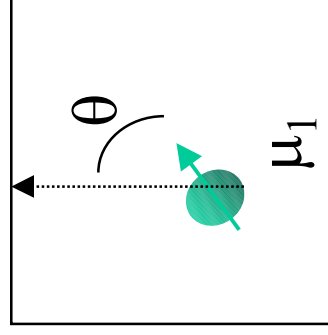


MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

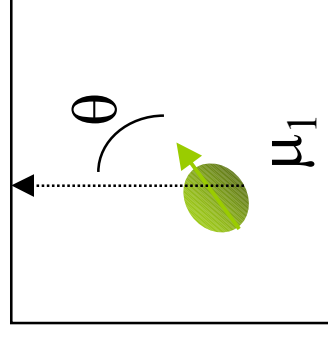
# Festkörper-NMR: Anisotropie Wechselwirkungen



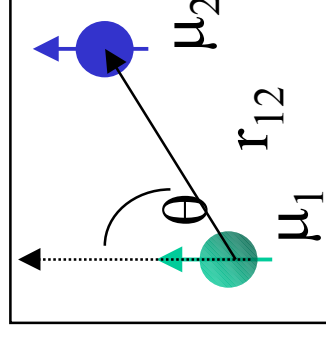
Chemical shift



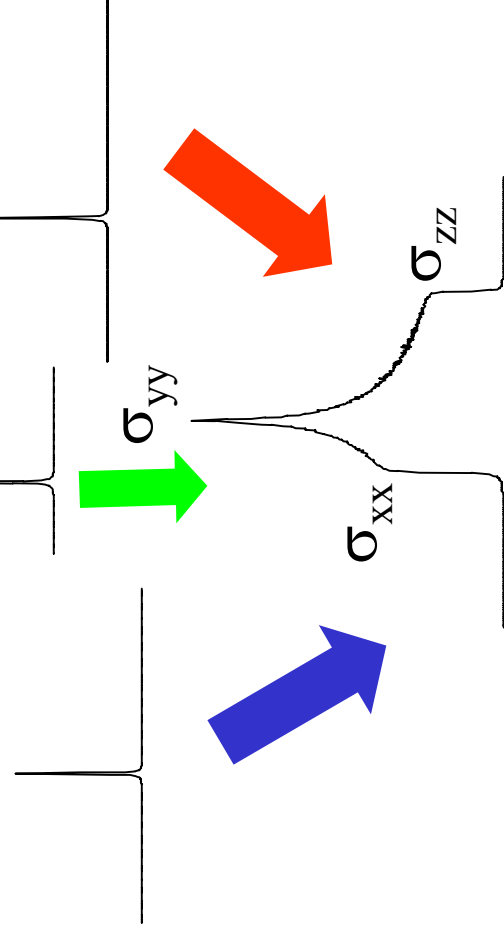
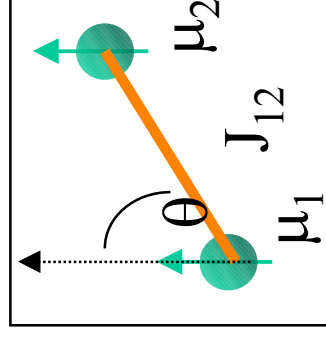
quadrupolar coupling



Dipolar coupling



Scalar coupling

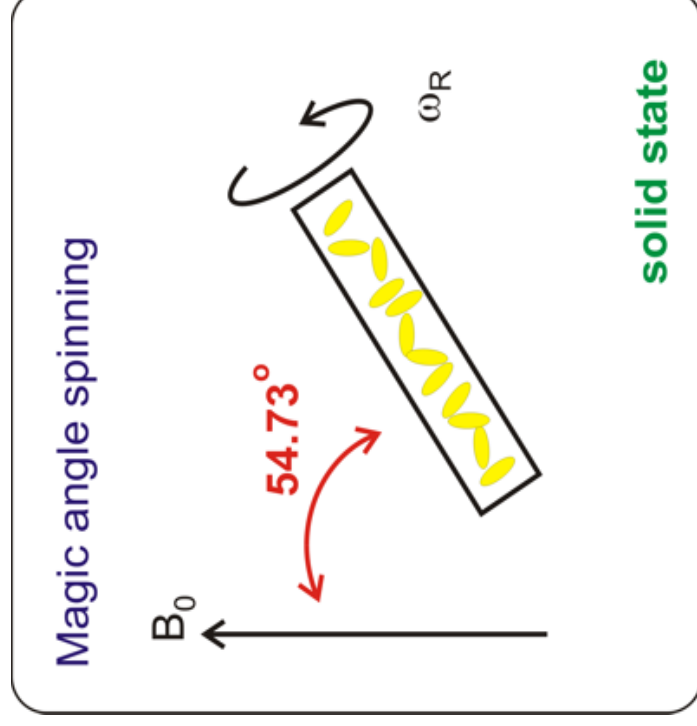
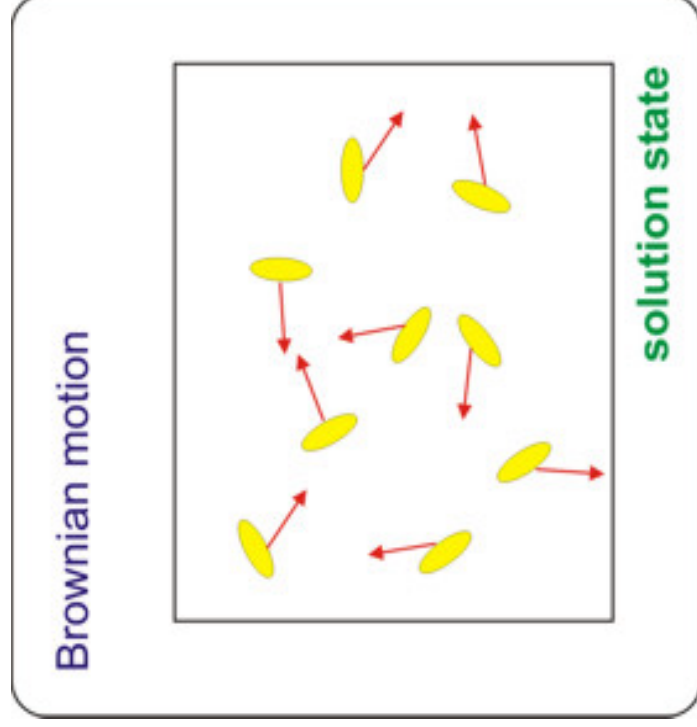


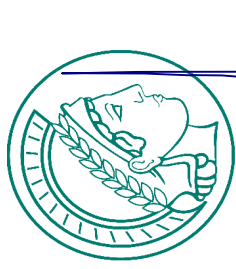




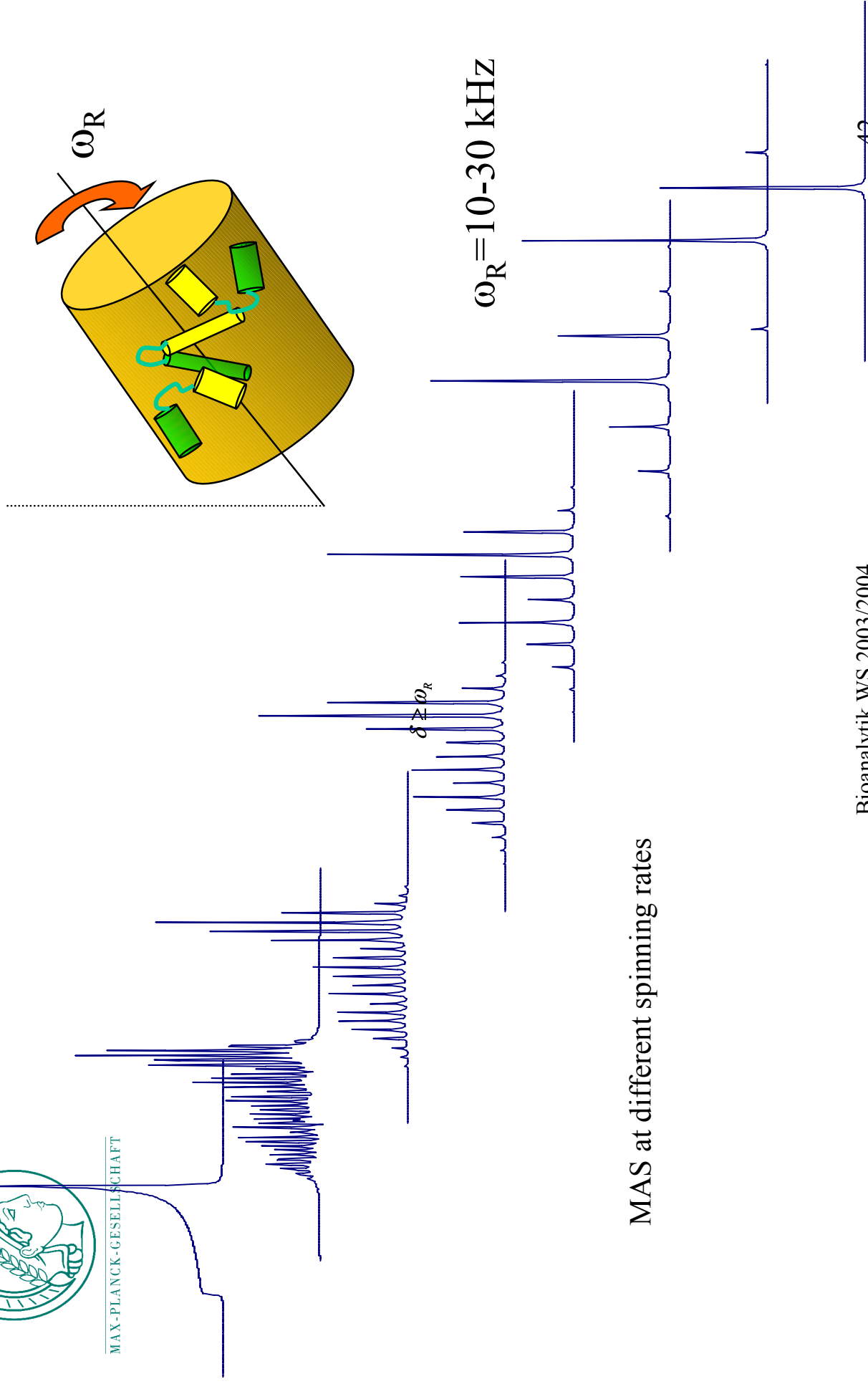
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Hochauflösung in der Festkörper- NMR: MAS





MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



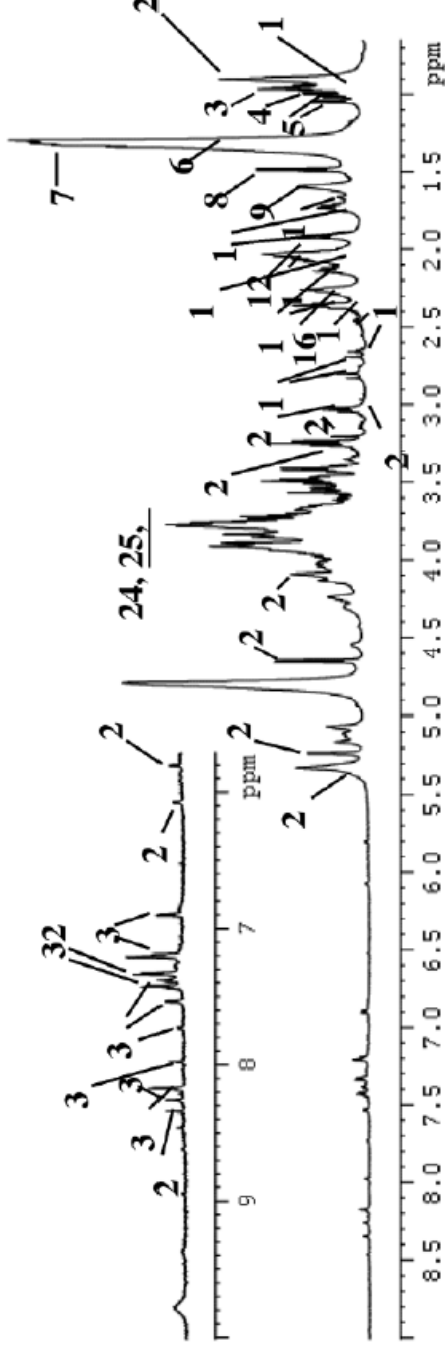
MAS at different spinning rates



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Metabonomik

Nachweis aller Metaboliten in Gewebeextrakten oberhalb einer gewissen Schwellenkonzentration ( $\sim 10 \mu\text{M}$ )





MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT

# Metabonomik

- Zuverlässige Datenauswertung (Mustererkennung)
- Erhöhte Sensitivität -> Cryo-Probenköpfe
- Erhöhte Auflösung
  - $^{13}\text{C}$ -NMR
  - Zweidimensionale NMR
- Untersuchungen an intaktem Gewebe mittels MAS NMR

