

Dette er tredje og sidste artikel i en serie om NMR-spektroskopis udvikling. Artikel 1 blev bragt i Dansk Kemi nr. 9 og artikel 2 i Dansk Kemi nr. 10.

NMR-spektroskopis udvikling III

Nye NMR-spektrometre, superfølsomme prøvehoveder, paramagnetisk mærkning af bio-makromolekyler og beregningsmæssige fremskridt.

Af Jens Jørgen Led*, Kemisk Institut, Københavns Universitet

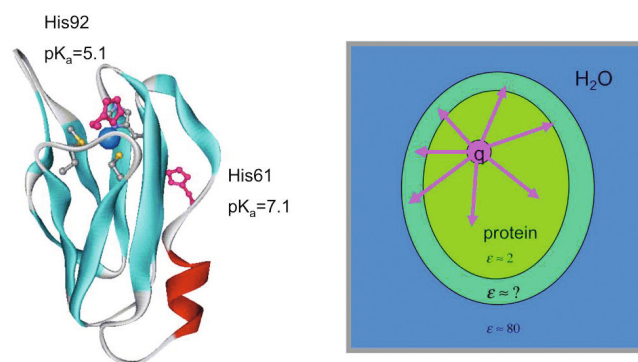
Fra sin indførelse i den analytiske kemi i starten af 1960'erne og frem til begyndelsen af 1990'erne havde NMR-spektroskopien gennemgået en betydelig udvikling og var blevet et vigtigt værktøj inden for stort set alle naturvidenskabelige forskningsområder. Således havde NMR-spektroskopien udviklet sig til et betydeligt og omfattende forskningsområde inden for studier af biomakromolekyler, og i Danmark var der nu etableret dedikerede protein-NMR-forskningsgrupper ved alle landets universiteter, samt ved Carlsberg Laboratorium, Kemisk afdeling.



Figur 1. Ph.d.-studerende Malene Ringkjøbing Jensen, Københavns Universitet, ved det fælles 800 MHz spektrometer ved NMR-centret på Carlsberg Laboratorium.

Den hurtige tekniske udvikling gjorde det imidlertid nødvendigt at opgradere det eksisterende udstyr eller anskaffe helt nyt. Da fire forskningsinstitutioner, inklusiv Protein-NMR gruppen ved Københavns Universitet, i begyndelsen af 1990'erne alle søgte Det Naturvidenskabelige Forskningsråd om midler til nyt NMR-udstyr, besluttede Rådet at bevilge en samlet pakke omfattende udstyr til alle fire grupper. For yderligere at fremme forskningsområdet besluttede Rådet samtidigt at bevilge midler til et fælles udstyr med en magnetfeltstyrke svarende til en protonfrekvens på 800 MHz - den højeste magnetfeltstyrke, der på det tidspunkt var kommercielt tilgængeligt. Det fælles udstyr

blev placeret på Carlsberg Laboratoriet, hvor der blev oprettet et landsdækkende "Instrumentcenter for NMR-spektroskopi af Biologiske Makromolekyler", figur 1. Med sin altruistiske holdning stillede Carlsberg Laboratorium en velegnet bygning til rådighed for udstyret og bevilgede et antal stillinger til udstyrets drift samt forpligtede sig til at afholde de løbende driftsudgifter af 800 MHz spektrometret de første fem år af dets levetid. Den samlede pakke af udstyr skulle være tilgængelig for alle fire grupper. Andre NMR forskningsgrupper tilsluttede sig senere ordningen. Endvidere blev der nedsat en brugergruppe med repræsentanter fra de involverede laboratorier, som aftalte den løbende brug af det samlede udstyr og arrangerede et årligt NMR-symposium med international deltagelse. Endelig blev der nedsat en styringsgruppe med international repræsentation, som sikrede, at udstyret blev udnyttet efter hensigten.



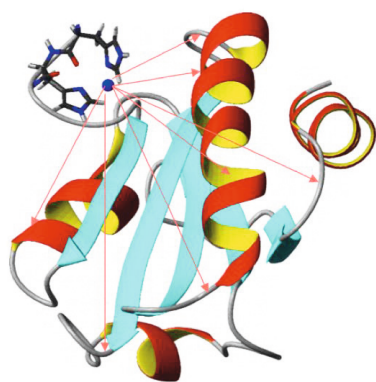
Figur 2. Mens dielectricitetskonstanten (ϵ) i rent vand er ca. 80, er den 2-3 i det indre af et protein. I proteinerne påvirkes ϵ bl.a. af ladede ioner som Cu-ionen i plastocyanin og de titrerbare grupper i proteinet, her His61 og His92 i plastocyanin, der begge ligger tæt ved proteinets overflade. (Hass MAS, Jensen MR, Led JJ. *Proteins* **2008**, 72, 333-343).

Bestemmelse af proteinernes dynamik og elektrostatiske egenskaber

Det nye udstyrs forbedrede elektronik, og det deraf følgende bedre signal/støjforhold, gjorde det muligt ved hjælp af NMR-spektroskopi at bestemme en række af proteinernes andre fysiske egenskaber, herunder deres dynamik og elektrostatiske egenskaber. Disse muligheder blev dramatisk forbedrede efter installationen i 2004 af det superfølsomme cryo-prøvehoved, som Villum Kann Rasmussen Fonden bevilgede Protein-NMR gruppen ved Kemisk Institut, Københavns Universitet. Dette prøvehoved forøgede med et slag signal/støjforholdet på gruppens 500 MHz spektrometer med en faktor 4-5.

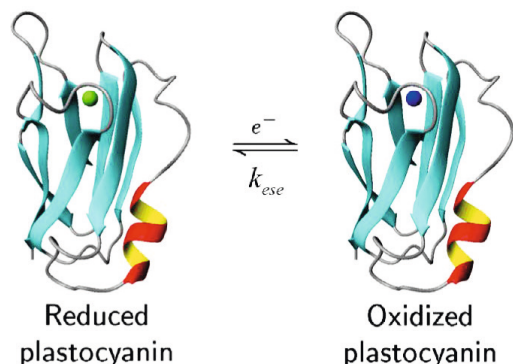
Især til studier af proteinernes dynamiske forhold i vandig opløsning, der er afgørende for proteinernes funktion, har NMR-spektroskopien vist sig velegnet. Det gælder f.eks. dyna- ►

NMR-SPEKTROSKOPI



Figur 3. Langtrækkende strukturinformation frembragt af en paramagnetisk Ni^{2+} -metalion, der er bundet til proteinet Thioredoxin med en His-His-Pro tag. (Jensen MR, Lauritzen C, Dahl SW, Pedersen J, Led JJ. *J. Biomol. NMR*, **2004**, 29, 175–185).

mikken i vandig opløsning af plastocyanin [1–5], pseudoazurin [6] og et Collagen C-Terminal Kunitz Domaine [7,8]. De elektriske felter i proteiner, der skyldes ladede og polære grupper, har også en afgørende indflydelse på proteinernes binding og funktion. Der findes imidlertid kun få teknikker, som giver mulighed for at bestemme disse elektriske felter. En af disse er NMR-spektroskopien, der gør det muligt at bestemme det elektriske felt i specifikke positioner i et protein ud fra ændringer i amidgruppernes ^1H og ^{15}N chemical shift-værdier. Et detaljeret NMR-studium af de elektriske felter i plastocyanin illustrerer disse forhold, figur 2 [9], side 25.



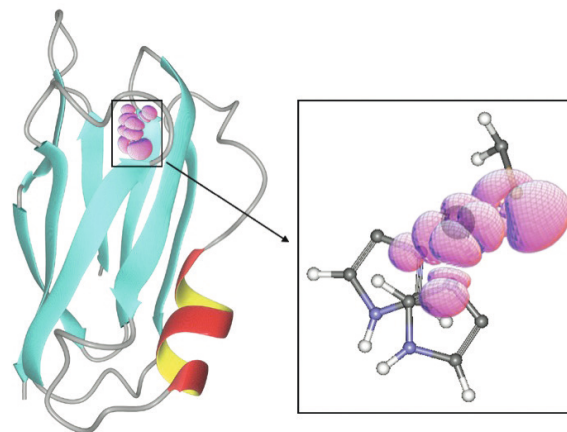
Figur 4. Udveksling af en elektron mellem to plastocyaninmolekyler (self-exchange). (Jensen MR, Hansen DF, Led JJ. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4093–4096, og Ma L, Philipp E, Led JJ. *J. Biomol. NMR* **2001**, 19, 199–208).

Udnyttelse af paramagnetiske effekter i NMR-spektroskopien

Uparrede elektroner fra paramagnetiske ioner, der enten findes naturligt i molekylerne eller er inkorporeret i dem, har en kraftig indflydelse på de omkringsiddende kerner chemical shifts og relaxationshastigheder. NMR-spektroskopis anvendelighed til opklaring af proteinernes opløsningsstruktur blev således forbedret væsentlig for metallo-proteiner såsom plastocyanin ved at inkorporere strukturinformationen fra de langtrækkende paramagnetiske pseudocontact shifts i strukturbestemmelsen [10], eller ved at binde en paramagnetisk metalion som f.eks. en Ni^{2+} -ion til et protein ved hjælp af et ionbindende molekylfragment (en tag), som ikke ændrer proteinets struktur, figur 3 [11].

De mere præcise data, der blev opnået med de nye spektrometre og den paramagnetiske påvirkning af NMR-signalerne, gjorde det muligt både at bestemme hastigheden for udveksling af elektroner mellem elektronoverførende proteiner [12,13],

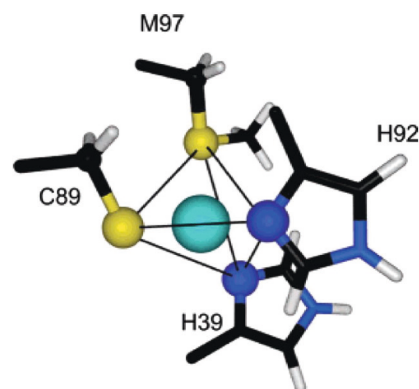
figur 4, og at fastlægge de steder på proteinernes overflade, hvor overførslen finder sted [14]. Ligeledes gav de paramagnetiske relaxationshastigheder information om elektronens vej ud gennem proteinet [15]. Selv elektronernes egne relaxationstid i et paramagnetisk metallo-protein kan bestemmes ved hjælp af NMR-spektroskopi, hvis de eksperimentelle data er tilstrækkelig præcise [16].



Figur 5. Fordelingen af den uparrede elektron omkring Cu^{2+} -ionen i plastocyanin. (Hansen DF, Led JJ. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1247–1252.)

Paramagnetisk NMR-spektroskopi og teoretiske beregninger

En ulempe ved anvendelsen af paramagnetisk NMR-spektroskopi er, at de kraftige paramagnetiske effekter forhindrer en normal NMR-strukturbestemmelse af selve metal-sitet og de nærmeste områder omkring det paramagnetiske center. Som D. Flemming Hansen viste under sit ph.d.-studium ved Protein-NMR gruppen, kan man ved hjælp af teoretiske beregninger relatere de paramagnetiske relaxationsdata både til elektron-

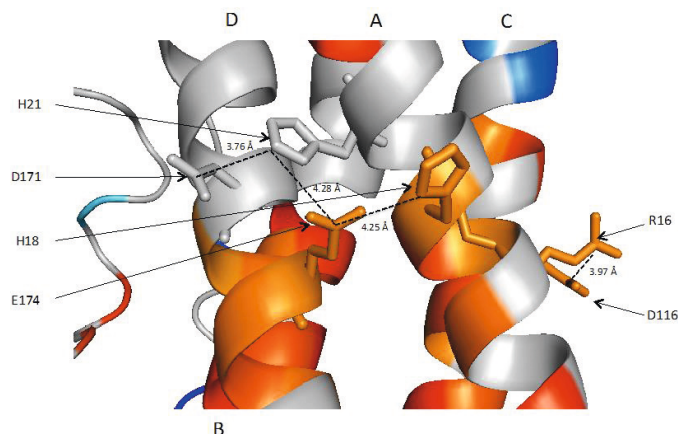


Figur 6. Den geometriske struktur af det aktive metalsite i plastocyanin. (Hansen DF, Led JJ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 1738–1743.)

fordelingen omkring det paramagnetiske site [17], figur 5, og til sitets geometriske struktur [18], figur 6. Med forbedrede teoretiske modeller (Natural Bonding Orbitals) var det endvidere muligt at bestemme både sitets struktur og dets dynamik ud fra de paramagnetiske NMR-data [19].

NMR-studier af selv-associerende proteiner ved højt magnetfelt

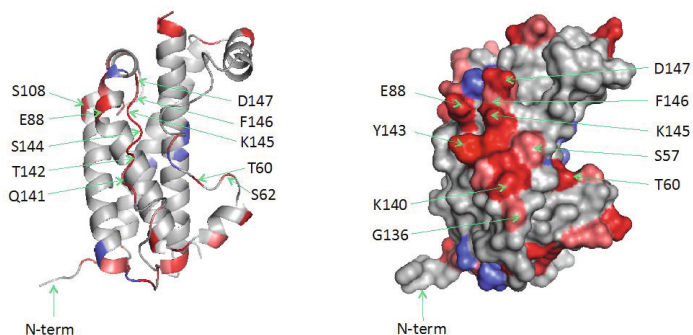
Der er betydelige fordele ved at studere selv-associerende proteiner ved et så højt magnetfelt som muligt. Ikke blot adskiller det høje magnetfelt bedre de forbrede signaler, som selv-associeringen medfører. Den større følsomhed, som følger af



Figur 7. Den centrale del af hGH's "four-helix-bundle" med netværket af saltbroer, H18-E174-H21-D171, som stabiliserer proteinet ved pH 2.7 og vokser i styrke med voksende temperatur fra 24°C til 40°C. (Vinther JM, Kristensen SM, Led JJ. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 271-278.).

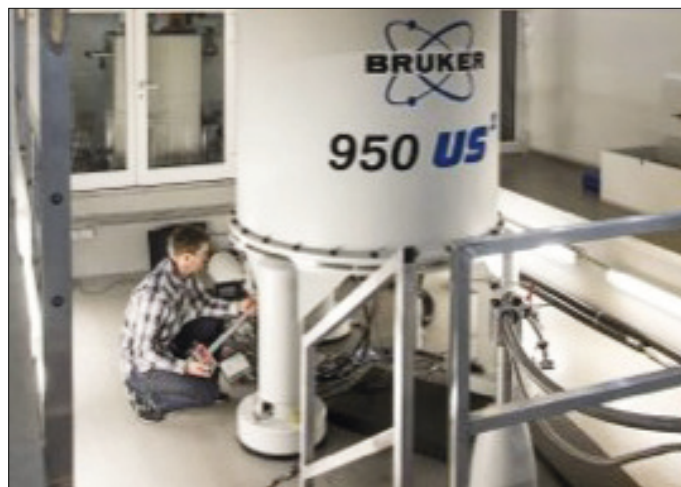
det høje magetfelt, tillader også brugen af lavere proteinkoncentrationer og deraf følgende mindre selv-associering og mindre forbredning af signalerne. Det sidstnævnte medfører umiddelbart en bedre adskillelse af signalerne, men kan også medføre et bedre signal/støjforhold trods den lavere koncentration.

Disse forhold blev udnyttet i et studium af lav-pH formen af human væksthormon (hGH). Omkring pH 3 danner hGH en fleksibel form, der trods sin fleksibilitet har samme struktur som den native form af hGH ved pH 7. Formen ved pH 3 er imidlertid karakteriseret ved en voksende stabilitet med stigende temperatur op til omkring 40°C ligesom thermophile



Figur 8. hGH-molekylet med båndstrukturen til venstre og overfladestrukturen til højre. Den røde farve angiver områder, der er involveret i selv-associeringen, den blå farve angiver områder, der ikke er involveret i selv-associeringen og den grå farve angiver områder med aminosyrerester, der ikke er tilordnet. Enkelte af de aminosyrerester, der er involveret i selv-associeringen er angivet ved deres symboler. (Johansson H, Jensen MR, Gesmar H, Meier S, Vinther JM, Keeler C, Hodsdon ME, Led JJ. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 10277-10286.).

proteiner. Samtidig har pH 3-formen en noget mindre selv-associeringstendens end den native form. I et 800 MHz NMR studium af hGH ved pH 2.7 blev det påvist, at årsagen til den voksende stabilitet er dannelsen af intramolekylære saltbroer, figur 7, hvis stabilitet vokser med stigende temperatur og dermed øger hGH-molekylets stabilitet op til ca. 40°C [20]. Samtidigt blev det sandsynliggjort, at det samme gælder for andre thermophile proteiner, der generelt er karakteriseret ved et større antal saltbroer end deres nærmeste mesophile homologer. Den native hGH ved pH 7 har væsentlig større aggregeringstendens end formen ved pH 2.7. Det ville derfor have været nærliggende at studere den med anvendelse af det superfølsom-



Figur 9. 950 MHz NMR-spektrometret ved "Danish Center for Ultra-high Field NMR Spectroscopy" ved Aarhus Universitet.

me cryo-prøvehoved, som 500 MHz spektrometret på Kemisk Institut, Københavns Universitet var blevet udstyret med. Imidlertid besluttede ledelsen på Kemisk Institut i 2008 at nedlægge Protein-NMR gruppen i forbindelse med min fratrædelse på grund af alder. Samtidig blev 500 MHz overdraget til brug for organisk kemisk interesserede, og da ledelsen ikke mente, at den kunne vedligeholde det superfølsomme cryo-prøvehoved, blev dette desværre afmonteret og skrottet og spektrometret ført tilbage til sin oprindelige tilstand til brug for mere rutinemæssige opgaver for Kemisk Instituts øvrige ansatte.

Til alt held havde jeg og en tilbageværende ph.d.-studerende fortsat adgang til det Danske NMR Centers 800 MHz spektrometer på Carlsberg Laboratorium, og da dette samtidig var blevet udstyret med et superfølsomt cryo-prøvehoved var de bedst tænkelige betingelser til stede for at kunne foretage de nødvendige NMR-målinger, så undersøgelserne af selv-associeringen af den native pH7-form af hGH kunne gennemføres. Samtidig kunne forskergruppen ved Yale University, som vi samarbejdede med, levere den række af isotopmærkede hGH-prøver, som studierne krævede.

Resultatet af studierne var overraskende [21]. Med det meget følsomme NMR-udstyr var det muligt at opnå pålidelige relaxationsmålinger selv ved meget lave hGH-koncentrationer (< 0.2 mM), på grund af en væsentlig mindre selv-associering. Disse målinger viste, at hGH's selvassociering først og fremmest skyldes et antal svage intermolekylære, elektrostatiske og hydrofobe vekselvirkninger samt hydrogenbindinger, som dækker en stor del af proteinets overflade, figur 8.

Fremtidige højfelts-NMR-studier i Danmark

Med nedlæggelsen af protein-NMR gruppen ophørte de biofysiske protein NMR-studier ved Kemisk Institut, Københavns Universitet. Forskningsområdet er dog fortsat i fokus ved Biologisk Institut, Københavns Universitet og andre danske universiteter, ikke mindst ved Aarhus Universitet, hvor man for nyligt har fået installeret Nordeuropas største og mest avancerede NMR-spektrometer, figur 9.

E-mail:

Jens Jørgen Led: led@chem.ku.dk

* Jens Jørgen Led er ph.d. og Dr. Scient. Han blev ansat ved Kemisk Institut, Københavns Universitet i 1968, hvor han har været leder af Protein-NMR forskningsgruppen fra 1986 til 2008. Han er i dag docent emeritus samme sted.

Referencer til artiklen på nedenstående link:

<http://www.danskkemi-online.dk/29910-2>