

Diss. ETH No. 15993

**Towards Structure and Dynamics of Large and Dynamically Disordered
Biomacromolecules: New Methods in Solution NMR Spectroscopy**

A dissertation submitted to the
Swiss Federal Institute of Technology Zürich
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Beat Vögeli
Dipl. Phys. ETH

born on May 13, 1976
citizen of Bülach (Zürich)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Konstantin Pervushin, examiner
Prof. Dr. Beat Meier, co-examiner

2005

Zusammenfassung

Die in dieser Dissertation zusammengefasste Arbeit präsentiert Beiträge zur Methodik der Kernspinresonanz (NMR), die auf Fortschritten in den Gebieten der Relaxationsoptimierung, dem Gebrauch von ^{13}C -Detektion und der Entwicklung von theoretisch optimalen Experimenten beruht, als auch NMR mit einem ungeordneten Protein.

LTROSY ist eine allgemeine Methode, welche das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis in mehrdimensionalen NMR-Experimenten mittels signifikanter Erniedrigung der longitudinalen Protonenrelaxationszeit um einen Faktor von 2 – 2.5 erhöht. Die Methode basiert auf dem Gebrauch eines riesigen Protonenspinreservoirs. Das TROSY-Prinzip wird in einem HNCA-Experiment verwendet, welches für die Messung von den intraresiduellen und sequentiellen $\text{H}^\alpha\text{-C}^\alpha/\text{H}^{\text{N}}\text{-N}$ Dipol/Dipol- und $\text{H}^\alpha\text{-C}^\alpha/\text{N}$ Dipol/CSA-kreuzkorrelierten Relaxationsraten sowie den mittels E.COSY-Prinzip erhaltenen $^3,4J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ -Kopplungskonstanten entworfen wurde. Daraus erhält man Einschränkungen für die dihedralen Winkel ψ und ϕ .

Es werden Fortschritte in der ^{13}C -Spektroskopie demonstriert. Die Einführung einer dritten Dimension (^1H) in $^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}$ -TOCSY reduziert die Signalüberlappung und erhöht die Sensitivität pro Zeiteinheit, sogar für stark deuterierte (>85%) Proteinproben, was aus dieser Methode ein attraktives Werkzeug macht für die Zuordnung von Seitenketten-H und -C von mittelgrossen Proteinen mit sowohl natürlicher Isotopenhäufigkeit als auch starker Deuteriumanreicherung. Die Experimente werden mit 16 kDa- $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -markiertem nichtdeuteriertem apo-CcmE und 48 kDa-einheitlich $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -markiertem und teilweise (~90%) deuteriertem dimerischem sFkpA ausgeführt. Es wird vorhergesagt, dass diese Methode geeignet sein sollte für die Zuordnung von den ^{13}C und ^1H -chemischen Verschiebungen in Methylgruppen von methylprotonierten und sonst stark deuterierten ^{13}C -markierten Proteinen mit sogar noch höherem molekularem Gewicht. Signifikante Verbesserung in der Auflösung und Vereinfachung der Aufspaltungsmuster in $^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}$ -TOCSY-Spektren von einheitlich deuterierten und $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierten Proteinen und $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierten RNS-Proben wird erreicht durch die Einführung von mehrfach-bandselektiver ^{13}C -Homoentkopplung, angewandt mit gleichzeitiger ^1H - oder ^2H - und ^{15}N -Entkopplung zu allen Zeitabschnitten in mehrdimensionalen Experimenten einschliesslich der Signalaufnahmeperiode. Des Weiteren wurden mehrfache residuelle ^{13}C - ^{13}C -dipolare Kopplungen (RDCs) in einheitlich deuterierten und ^{13}C -markierten Proteinen gemessen. Es wird etabliert, dass unter verschiedenen Breitband-Polarisationstransferschemata die FLOPSY-Familie gebraucht werden kann, um Magnetisierung innerhalb eines J -gekoppelten Spinnetzwerkes auszutauschen unter nahezu vollständiger Entkopplung der dipolaren Wechselwirkungen zwischen diesen Spins. Eine exzellente Korrelation zwischen den gemessenen RDCs und der 3D-Struktur von Ubiquitin wurde beobachtet, was eine

mögliche Verwendung von ^{13}C - ^{13}C -RDCs in der Strukturbestimmung von deuterierten Proteinen anzeigt.

Die Konstruktion von Pulssequenzen für die Auswahl von individuellen Übergängen in Methylgruppen wird umrissen. Unmittelbare Anwendung beinhaltet quantitative Messung von ^1H - ^1H - und ^1H - ^{13}C -RDCs und kreuzkorrelierter Relaxation zwischen ^1H - und ^{13}C -chemischer Verschiebunganisotropie und ^1H - ^{13}C - und ^1H - ^1H Dipol/Dipol-Wechselwirkungen. Die Optimierung von Kohärenztransfer-Pulssequenzelementen erreicht Sensitivität nahe am theoretischen Maximum (unter Vernachlässigung der Relaxation) innerhalb der kürzest möglichen experimentellen Zeit und unterdrückt aktiv ungewünschte Signale. Basierend auf der Anwendung von Molekularer Dynamik im Raum der Pulssequenzvariablen, hat die Methode allgemeinen Charakter.

NMR-Spektroskopie ist eine von wenigen Informationsquellen über ungeordnete Proteine und ihren Faltungsprozess. mMjCM, eine hoch aktive, monomerische Chorismatmutase, erhalten durch topologisches Redesign eines dimerischen Helixbündel-Proteinzyns von *Methanococcus jannaschii*, wird untersucht mit TROSY-NMR. Obwohl strukturelle Unordnung im Allgemeinen für inkompatibel mit effizienter Katalyse gehalten wird, besitzt das Monomer, im Gegensatz zu seinem natürlichen Gegenstück, alle Charakteristika eines „Molten Globule“-Proteins. Globales konformationelles Ordnen, beobachtet nach Bindung eines Übergangszustandanalogs (TSA), zeigt, dass Faltung mit Katalyse gekoppelt werden kann unter minimalem Energieaufwand. Eine strukturelle und dynamische Analyse von monomerischem MjCM wird präsentiert. Die Prädominanz von α -helikaler Struktur in monomerischem MjCM bestätigt das durch Homologiemodellierung erhaltene Motif bestehend aus vier α -Helices. Durch den Einbau eines Turns aus sechs Residua in die Helix H1 des Dimers klappt deren obere Hälfte, die zum N-Terminus des Monomers wird, nach unten und bildet die aktive Stelle zusammen mit der zweiten Hälfte. TSA-gebundenes mMjCM unterliegt grossem globalem Austausch. Des Weiteren zeigt die Relaxationsanalyse von ungebundenem mMjCM, dass die räumliche Bindungseinschränkung nieder ist. Obwohl die Bindung von TSA strukturelle Ordnung einführt und die Beweglichkeit der Bindungen einschränkt bis auf das Ausmass eines regulären Proteins, erlaubt das TSA-Bindungs-gleichgewicht globalen Austausch auf einer Zeitskala, die so schnell ist, dass sie nicht messbar ist mit NMR-Spektroskopie.

Summary

The work summarized in this thesis represents contributions to Nuclear Magnetic Resonance (NMR) methodology based on the recent progress in the directions of relaxation optimization, use of ^{13}C detection, development of theoretically optimal NMR experiments, as well as NMR with a disordered protein.

LTROSY is a general method yielding a factor 2 - 2.5 increase of the maximal signal-to-noise ratio of multidimensional NMR experiments via significant reduction of the longitudinal proton relaxation times. The method is based on the use of vast pools of “thermal bath” ^1H spins. The TROSY principle is introduced into an HNCA experiment, which is designed for measurements of the intraresidual and sequential $\text{H}^\alpha\text{-C}^\alpha/\text{H}^{\text{N}}\text{-N}$ dipole/dipole and $\text{H}^\alpha\text{-C}^\alpha/\text{N}$ dipole/CSA cross-correlated relaxation rates as well as $^{3,4}J_{\text{H}\alpha\text{HN}}$ -coupling constants obtained in an E.COSY manner. Therefrom, conformational restraints are obtained for the ψ and ϕ angles.

Progress in ^{13}C spectroscopy is demonstrated. Introduction of a third dimension (^1H) to 2D ^{13}C , ^{13}C -TOCSY reduces the peak overlap and increases the sensitivity per unit time, even for highly deuterated (>85%) protein samples, which makes this new method an attractive tool for the side-chain H and C assignment of average sized proteins with natural isotope abundance as well as large partially deuterated proteins. The experiments are demonstrated with a 16 kDa ^{15}N , ^{13}C -labeled non-deuterated apo-CcmE and a 48 kDa uniformly ^{15}N , ^{13}C -labeled and fractionally (~90%) deuterated dimeric sFkpA. It is predicted that this method should be suitable for the assignment of methyl ^{13}C and ^1H chemical shifts of methyl protonated, highly deuterated and ^{13}C -labeled proteins with even higher molecular weight. Significant resolution improvement and simplification of the splitting pattern in ^{13}C , ^{13}C -TOCSY spectra of uniformly deuterated and ^{13}C , ^{15}N -labeled protein and ^{13}C , ^{15}N -labeled RNA samples is achieved by introduction of multiple-band-selective ^{13}C homodecoupling applied simultaneously with ^1H or ^2H , and ^{15}N decoupling at all stages of multidimensional experiment including signal acquisition period. Furtheron, multiple residual ^{13}C - ^{13}C dipolar couplings (RDCs) in uniformly deuterated and ^{13}C -labeled proteins were measured. It is established that, among different broadband polarization transfer schemes, the FLOPSY family can be used to exchange magnetization within a J -coupled network of spins while largely decoupling dipolar interactions between these spins. An excellent correlation between measured RDCs and the 3D structure of Ubiquitin was observed indicating a potential use of the ^{13}C - ^{13}C RDCs in structure determination of perdeuterated proteins.

Construction of pulse sequences for selection of individual transitions in methyl groups is outlined. Immediate applications include quantitative measurements of ^1H - ^1H and ^1H - ^{13}C RDCs and cross-correlated relaxation between ^1H and ^{13}C chemical shift anisotropy and ^1H - ^{13}C and ^1H - ^1H

dipole/dipole interactions. Optimization of coherence-transfer pulse-sequence elements achieves sensitivity close to its theoretical maximum (in the absence of relaxation) in the shortest possible experimental time and features active suppression of undesired signals. Based on the application of molecular dynamics in the space of pulse-sequence variables, the method constitutes general character.

NMR spectroscopy is one of the few sources for information on disordered proteins and their folding processes. mMjCM, a highly active, monomeric chorismate mutase, obtained by topological redesign of a dimeric helical bundle enzyme from *Methanococcus jannaschii*, is investigated by TROSY NMR. Although structural disorder is generally considered to be incompatible with efficient catalysis, the monomer, unlike its natural counterpart, possesses all of the characteristics of a molten globule. Global conformational ordering, observed upon binding of a transition state analog, indicates that folding can be coupled to catalysis with minimal energetic penalty. Structural and dynamical analysis of the monomeric TSA-bound MjCM are presented. The predominance of α -helical structure in monomeric MjCM confirms the four α -helix-bundle motif obtained by homology modeling. By engineering of the six-residue turn into the H1 helix of the dimer, the upper half becoming the N-terminus of the monomer folds down and forms the active site together with the second half. TSA-bound mMjCM undergoes large global exchange. Furthermore, relaxation analysis of unbound mMjCM shows that the spatial bond restriction is low. Although ligation of TSA introduces structural order and restricts spatial bond mobility to a level of regular protein, the TSA binding equilibrium allows for global exchange on a timescale faster than is detectable by NMR spectroscopy.