

CHRISTIAN GRIESINGER

## Spionage im Inneren der Moleküle – von Spins bis Parkinson

(Vortrag in der Plenarsitzung am 25. Mai 2007)

In dem vorliegenden Bericht gebe ich einen kurzen Abriss der NMR-Spektroskopie und erlaube mir, da es sich um einen paraphrasierten Vorstellungsvortrag handelt, die eigenen Beiträge durch Zitate zu kennzeichnen.

Die kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) wurde in den 40er Jahren von Bloch und Purcell erfunden und hat sich zu der wichtigsten Methode mit atomarer Auflösung neben der Röntgenkristallographie in der Strukturchemie und Strukturbio-logie entwickelt. Sie fokussiert damit auf Objekte im Nanometerbereich, die etwa neun Größenordnungen kleiner sind als Objekte der Magnetresonanztomographie (MRT oder MRI), die in der Akademie von Prof. Frahm vertreten wird. Die NMR-Spektroskopie beruht auf der

Ausrichtung der magnetischen Kernmomente entlang einem angelegten äußeren Magnetfeld. Die so ausgerichteten Momente erzeugen eine makroskopische Magnetisierung ähnlich wie eine Kompassnadel. Durch kurzzeitig angeschaltete Radiofrequenzfelder (Pulse) kann diese makroskopische Magnetisierung senkrecht zum äußeren Magnetfeld ausgerichtet werden. Sie beginnt dann nach Abschaltung dieser Pulse, um das äußere statische Magnetfeld zu präzedieren. Dieses Signal kann aufgezeichnet und durch die Fouriertransformation in ein Spektrum verwandelt werden. Dieses Puls-Fourierverfahren wurde von Anderson und Ernst eingeführt. Die Präzessionsfrequenzen der Kerne hängen nicht nur von dem gyromagnetischen



Christian Griesinger, Professor für Physikalische Chemie am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen, O. Mitglied der Göttinger Akademie seit 2007

Verhältnis des betrachteten Kerns ab, sondern auch von der chemischen Umgebung des Kerns, so daß leicht unterschiedliche Präzessionsfrequenzen für die gleiche Kernsorte in einem Molekül dadurch zustandekommen, daß die chemische Umgebung der Kerne verschieden ist. Diese sogenannte chemische Verschiebung, die die Kerne sozusagen unterschiedlich anfärbt, ist die Grundlage der Nutzbarmachung der NMR-Spektroskopie für die Strukturchemie und -biologie und wurde wenige Jahre nach der Erfindung der NMR-Spektroskopie von Yu entdeckt. Allerdings kann man die chemische Verschiebung selbst bei bekannter Konstitution und dreidimensionaler Struktur des Moleküls nicht hinreichend genau vorhersagen, um eine bestimmte Resonanzfrequenz einem bestimmten Atom im Molekül zuweisen zu können. Daher müssen mit einem zweiten Trick zuerst die Resonanzlinien des Spektrums den einzelnen Atomen im Molekül zugewiesen oder zugeordnet werden. Diese Zuordnungsaufgabe wird durch mehrdimensionale NMR-Spektren gelöst, in der nun mindestens zwei Kerne miteinander korreliert werden. Die Korrelation der Kerne erfolgt über deren chemische Verschiebungen. Ein „Ausschlag“ oder Signal oder, wie die NMR-Spektroskopiker sagen, Kreuzsignal erscheint dann im zweidimensionalen NMR-Spektrum, wenn zwei Kerne eine bestimmte Wechselwirkung zeigen, an dem Kreuzungspunkt der chemischen Verschiebungen in einer zweidimensionalen Darstellung. Diese Darstellung trägt die zwei Frequenzachsen senkrecht aufeinander auf. Ein Kreuzsignal an der Kreuzungsstelle der Resonanzen der beiden Kerne zeigt dann im Umkehrschluß an, daß die beiden Kerne eine bestimmte magnetische Wechselwirkung unterhalten. Die zwei- oder mehrdimensionalen NMR-Spektren werden durch Abfolgen von Radiofrequenzeinstrahlungen (Pulssequenzen) erzeugt. Von diesen Abfolgen gibt es derzeit einige 1000, die jeweils unterschiedliche Spektrentypen erzeugen. Die zweidimensionale NMR-Spektroskopie wurde erstmals 1971 von Jeener beschrieben und dann von Ernst entwickelt.

Für die oben erwähnte Zuordnung werden Pulssequenzen verwendet, die die Kerne über Kopplungen verbinden, die von der dreidimensionalen Struktur (Konformation) der Moleküle nicht abhängen, sondern Kerne miteinander verknüpfen, die nur durch eine Bindung voneinander separiert sind. Durch mindestens vier, häufig aber mehr Experimente kann man auf diese Art und Weise alle Kerne, z. B. in einem Protein, verknüpfen und so zu einer vollständigen Zuordnung kommen. Resultat ist also dann die Zuweisung aller Resonanzen zu dem Atomkern im Molekül, der die Resonanz erzeugt.

Zweidimensionale Spektren haben interessante Eigenschaften. So ist es zum Beispiel möglich, Resonanzen, die sich in einem eindimensionalen

Spektrum untrennbar überlagern (z. B. exakt die gleiche chemische Verschiebung), in zweidimensionalen Spektren zu entzerren (Auflösungsverbesserung). Dies geht so weit, daß Wechselwirkungen von einem Kern zum nächsten, sogenannte Kopplungen, in zweidimensionalen Spektren auch dann gemessen werden können, wenn die Kopplungsstärke deutlich kleiner als die homogene Linienbreite ist.<sup>1</sup> Damit unterschreitet man massiv die vermeintlich durch die Heisenbergsche Unschärferelation gesetzte Grenze. Dieses Verfahren konnte eingesetzt werden, um z. B. Kopplungen von etwa 0,2 Hz bei einer homogenen Linienbreite der Resonanzen von 2 Hz zu messen<sup>2</sup>. Ein weiteres vermeintliches Paradoxon ist die parallele Detektion von Observablen, die durch nicht-kommutierende hermitesche Operatoren dargestellt werden. Diese kombinieren dann zu nicht-hermiteschen Operatoren, die in der NMR als einziger Methode direkt detektiert werden können. Da die Urväter der Quantenmechanik aber die klassischen hermiteschen Operatoren im Fokus hatten, wurden die nicht-hermiteschen Operatoren mathematisch stiefmütterlich behandelt, und ihre mathematischen Eigenschaften wurden erst vor etwa 10 Jahren im Hinblick auf die Optimierung ihrer wechselseitigen Umwandlungen untersucht<sup>3</sup>. Die Anwendung dieser Untersuchungen war das Auffinden von verbesserten Pulssequenzen mit gesteigerter Empfindlichkeit<sup>4</sup>.

Ich habe auf zwei und mehr-dimensionale Spektren hingewiesen. In der Tat können drei<sup>5</sup> und vierdimensionale Spektren aufgenommen werden, indem einfach weitere Frequenzachsen hinzugenommen werden. Eines der ersten so aufgenommenen dreidimensionalen NMR-Spektren ist in Abb. 1 gezeigt. Drei- und vierdimensionale NMR-Spektren erhöhen die Dispersion weiter und sind damit ein unerläßliches Werkzeug des NMR-spektroskopischen Strukturbiologen, der sich mit Proteinen oder Oligonukleotiden beschäftigt, die einige 1000 Resonanzen im eindimensionalen Spektrum vorweisen.<sup>5</sup>

Die bisher beschriebenen Methoden liefern am Ende eine Zuordnung einer jeden Resonanzlinie im NMR-Spektrum mit dem sie verursachenden Kern. Wie kommt man nun weiter, und was für Fragen können beantwortet werden, und wo liegen die Herausforderungen?

NMR als strukturbiologische Methode „muß“ in der Lage sein, Strukturen zu liefern. In der Tat gelingt dies mit einem zugeordneten Spektrum, indem Distanzen zwischen Kernen quantitativ gemessen werden. Eine dreidimensionale Struktur eines Proteins ist ja prinzipiell durch einen Satz von internuklearen Distanzen beschrieben. Diese werden durch den sogenannten NOE quantitativ zugänglich gemacht. In einem zwei- oder höherdimensionalen NOESY erscheinen Kreuzsignale zwischen allen sol-

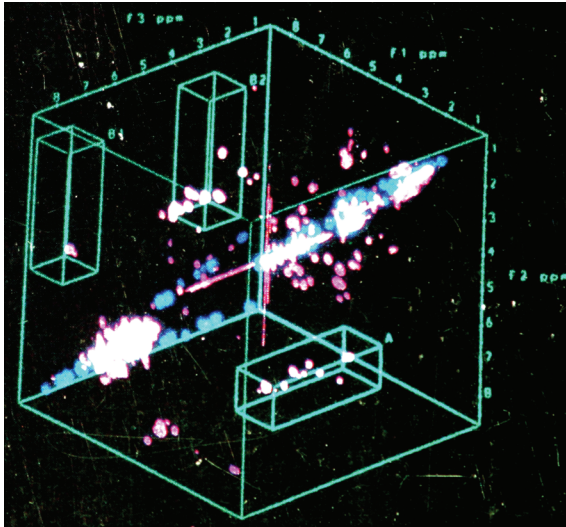


Abbildung 1: Dreidimensionales NMR-Spektrum eines Peptides, in dem drei Wasserstoffresonanzen miteinander korreliert werden.

chen Kernen, die einen Abstand in der dreidimensionalen Struktur von bis zu etwa 5 oder 6 Å haben. Das Integral  $I$  dieser Kreuzsignale ist dabei quantitativ mit der Distanz  $r$  über eine Relation:  $I \sim r^{-6}$  verbunden. Wertet man alle Kreuzsignale in einem NOESY aus, so erhält man darauf einen Satz von quantitativen Distanzen, mit dessen Hilfe man dann die dreidimensionale Struktur des Proteins oder allgemeiner Biomoleküls bestimmen kann. Dabei werden diese experimentellen „Restrains“ in ein Molekulardynamikprogramm gefüttert. Das Molekulardynamikprogramm findet dann Strukturen, die diese „Restrains“ erfüllt. Dieser Weg der Strukturbestimmung ist erstmals von Kurt Wüthrich besprochen worden. Strukturen sind die Grundlage des Studiums von Dynamik. So kann mit Hilfe der NMR-Spektroskopie die Beweglichkeit von Teilen eines Moleküls direkt bestimmt werden, und zwar sowohl in Bezug auf die Zeitskala als auch in Bezug auf die Amplitude. Die Zeitskalen können dabei von ps bis h variieren. Für jede Zeitskala gibt es bestimmte Parameter und Experimente, Kinetik und Dynamik zu bestimmen. Schnelle Dynamik im Bereich unter etwa 50  $\mu$ s kann dabei nur im Gleichgewicht untersucht werden, während langsamere Dynamik auch mit Hilfe von getriggerten Reaktionen „real time“ verfolgt werden kann.

In meinem Vorstellungsvortrag bin ich auf ein Beispiel eingegangen, an dem die erwähnten Methoden zum Einsatz kamen. Dieses Beispiel be-

zieht sich auf die strukturelle Charakterisierung von  $\alpha$ -Synuklein in seinen verschiedenen Oligomerisierungszuständen.  $\alpha$ -Synuklein ist ein wasserlösliches Protein mit 140 Aminosäuren ohne globuläre Struktur (ein sogenanntes „intrinsically unfolded protein“ oder IUP), das im wesentlichen in der Nähe von Synapsen in Nervenzellen gefunden wurde. Es ist zumindest in Mäusen nicht essentiell und erzeugt keinen Krankheitsphänotyp. Es wird als die Hauptkomponente bei allen Parkinson-Patienten in sogenannten Lewy Bodies gefunden. In Tiermodellen führt eine Überexpression von  $\alpha$ -Synuklein zu einer Reduktion der Überlebenszeit der entsprechenden Tiere, womit das Protein krankheitsrelevant erscheint. Das Protein kommt monomer, in verschiedenen großen Oligomeren und in Polymeren (Fibrillen) vor. Aufgrund des Fehlens globulärer Struktur kann das Protein nicht mit der Röntgenstrukturanalyse untersucht werden. Im NMR-Spektrum erkennt man sofort das Fehlen globulärer Struktur anhand der geringen Dispersion der Signale im Amid-Bereich (N,H-Korrelation). Obwohl das Protein nicht globulär ist, hat es eine bevorzugte dreidimensionale Anordnung. Diese kann zwar nicht durch den oben erwähnten NOE nachgewiesen werden, wohl aber durch Distanzmessungen zwischen einem Spinlabel (Radikal) und einzeln allen Kernen im Protein. Der Spinlabel wird an einem molekularbiologisch hineinmutierten Cystein angebracht. Auf diese Weise erhält man für jede Cystein-Mutante den mittleren Abstand einer jeden der 140 Aminosäuren zu dem Spinlabel<sup>6</sup>. Es gelingt nun mit Hilfe dieser Daten, ein Ensemble zu berechnen, das aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Strukturen besteht, die in ihrer Gesamtheit die experimentellen Distanzparameter erfüllen<sup>7</sup>. Dieses Ensemble ist im Einklang mit Messungen etwa des „Gyrationsradius“ oder von Kleinwinkel-Röntgenstreuungsexperimenten, die keine atomare Auflösung liefern, sondern das Ensemble nur grob beschreiben können. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, daß bestimmte Aminosäuren für die Stabilisierung des Ensembles eine herausragende Rolle spielen. Mutiert man diese in andere Aminosäuren, so entfaltet sich in der Tat das  $\alpha$ -Synuklein stärker, verliert seine teilgefaltete Struktur und aggregiert schneller. Letzterer Befund ist zwar eine Korrelation zweier Eigenschaften, nicht der Nachweis eines kausalen Zusammenhanges, der aber die Vermutung zuläßt, die dann auch durch andere Befunde bestärkt wird, daß ein Verlust der globulären Struktur des monomeren  $\alpha$ -Synukleins die Keimbildung der Aggregation beschleunigt. Der Befund wird von der rein biophysikalischen Ebene in eine medizinisch relevante Ebene gehoben. Man findet nämlich in Parkinson-Tiermodellen, daß derartige Mutanten auch höher toxisch sind als der Wildtyp. So gelingt es zum ersten Mal, basierend auf experimentell

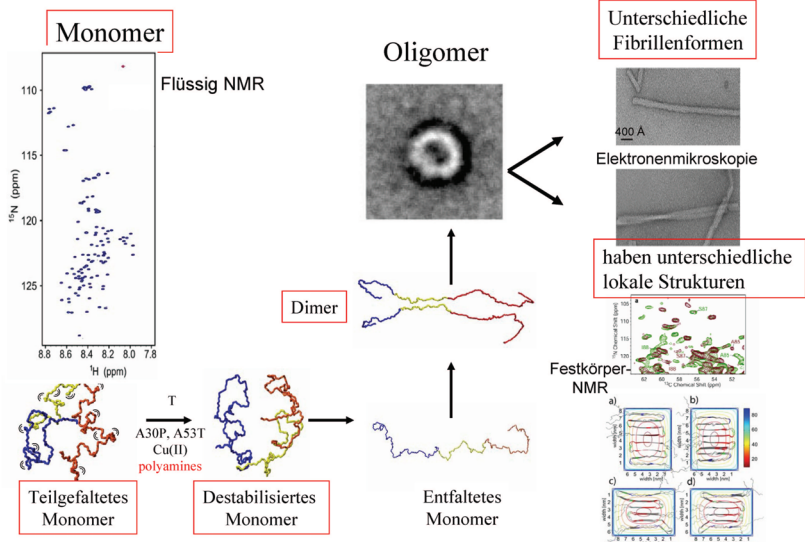


Abbildung 2: Strukturbiologische Sicht der Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein: Das Monomer wird mit Lösungs-NMR, die Fibrille mit Festkörper-NMR untersucht. Repräsentative Strukturen sind angedeutet.

*in vitro* bestimmten Strukturenssembles eines IUPs, korrekte Vorhersagen für das *in-vivo*-Verhalten zu machen. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in fester Phase gelingt es auch, Strukturmodelle in der fibrillären Form zu gewinnen. Diese sogenannte Festkörper-NMR-Spektroskopie unterscheidet sich von der NMR-Spektroskopie in Lösung im wesentlichen dadurch, daß die schnelle rotatorische Diffusion von löslichen Proteinen hier nicht auftritt, z. B. weil eine Fibrille ein viel zu hohes Molekulargewicht hat und unlöslich ist. Man kompensiert die fehlende Rotation dann durch eine schnelle Rotation um den magischen Winkel ( $54^\circ$ ), erhält dann wieder sehr scharfe Resonanzlinien auch in Proteinen und wendet adaptierte, verwandte Techniken für die Zuordnung und die Distanzmessungen an. Die Festkörper-NMR liefert also Strukturmodelle für die Fibrillen von  $\alpha$ -Synuclein. Wiederum hier der Hinweis, daß mittels der Röntgenstrukturanalyse derartige Fibrillen wegen der strukturellen Heterogenität nicht untersucht werden können. Mit Hilfe der NMR konnten also die beiden „Grenzstände“ des  $\alpha$ -Synucleins untersucht werden, das Monomer und das Polymer oder die Fibrille (Abb. 2). Beim Monomer konnten schon zutreffende Vorhersagen formuliert werden, nämlich die beschleunigte Aggregation bei Destabilisierung des Monomers. Auch aus der nun bekannten

Struktur der Fibrille haben wir Mutanten vorhergesagt, die in der Tat keine Fibrillen mehr bilden. Interessanterweise reicht der Austausch einer Aminosäure aus.

Diese Mutanten erlauben nun die Untersuchung der nächsten krankheitsrelevanten Frage, nämlich, was die toxische Spezies ist. Für den Fall, daß Fibrillen toxisch sind, sollte die Mutante *in vivo* gut vertragen werden. Für den Fall, daß die Fibrillen nicht-toxische Abfallformen des aggregierenden Proteins sind, sollte die Toxizität im Tiermodell gesteigert sein. In der Tat wird letzteres gefunden. Zusammenfassend kann man sagen, daß auf diese Weise die NMR-basierte Strukturbiologie Toxizitätsmodelle von Aggregopathien aufstellen kann. Durch die Befunde bewegt sich der Fokus des Interesses nun auch auf die oligomeren Spezies des  $\alpha$ -Synuclein, den Mechanismus der Toxizität der Oligomere und die Beeinflussung dieses Mechanismus. Diese Arbeiten mit dem Ziel der Frühdiagnostik und Therapie sind derzeit im Gange.

Ich habe Aspekte der Dynamik von Biomolekülen schon erwähnt, die mit Hilfe der NMR-Spektroskopie charakterisiert werden können. Diese führen zu einem immer detaillierteren Bild der Verbindung zwischen Funktion und Dynamik von Proteinen. Auch werden immer komplexere Proteine, insbesondere Membranproteine, der NMR-spektroskopischen Untersuchung zugänglich.

Herausforderungen der nächsten Jahre in der NMR-Spektroskopie sind die Untersuchung größerer Biomoleküle und Komplexe in möglichst nativen Umgebungen und die Korrelation mit Funktion. Die Bestimmung der Dynamik innerhalb von Proteindomänen und von Domänen gegeneinander und die Beschreibung von Strukturensambles stellen große Herausforderungen dar. Schließlich ist die NMR im wesentlichen durch das frequenzbedingt schwache Signal limitiert, so daß weltweit an der Steigerung der Empfindlichkeit gearbeitet wird. Von Ergebnissen auf diesen verschiedenen Feldern wird sicherlich bei der einen oder anderen Akademiesitzung zu berichten sein.

### Anmerkungen

- <sup>1</sup> „Correlation of Connected Transition by Two-Dimensional NMR Spectroscopy“, C. Griesinger, O. W. Sørensen, and R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 85, 6837–6851 (1986)
- <sup>2</sup> „Practical Aspects of the E.COSY Technique, Measurement of Scalar Spin-Spin Coupling Constants in Peptides“, C. Griesinger, O. W. Sørensen and R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 75, 474–492 (1987)



- <sup>3</sup> „Unitary Control in Quantum Ensembles: Maximizing Signal Intensity in Coherent Spectroscopy“, S. J. Glaser, T. Schulte-Herbrüggen, M. Sieveking, O. Schedletsky, N. C. Nielsen, O. W. Sørensen, and C. Griesinger, *Science* 280, 421–424 (1998)
- <sup>4</sup> „Novel Pulse Sequences with Sensitivity Enhancement for In-Phase Coherence Transfer Employing Pulsed Field Gradients“, M. Sattler, P. Schmidt, J. Schleucher, O. Schedletsky, S. J. Glaser, and C. Griesinger, *J. Magn. Reson. B* 108, 235–242 (1995)
- <sup>5</sup> „A Practical Approach to Three-Dimensional NMR Spectroscopy“, C. Griesinger, O. W. Sørensen, and R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 73, 574 (1987); „Three Dimensional NMR Spectroscopy of a Protein in Solution“, H. Oschkinat, C. Griesinger, P. J. Kraulis, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, A. Gronenborn, and G. M. Clore, *Nature*, 332, 374–376 (1988)
- <sup>6</sup> „Release of long-range tertiary interactions potentiates aggregation of natively unstructured  $\alpha$ -synuclein“ C. W. Bertocini, Y.-S. Jung, C. O. Fernandez, W. Hoyer, C. Griesinger, T. M. Jovin, M. Zweckstetter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1430–1435 (2005)
- <sup>7</sup> „Defining Long Range Order and Local Disorder in Native  $\alpha$ -Synuclein using Residual Dipolar Couplings“, Pau Bernadó, Carlos W. Bertocini, Christian Griesinger, Markus Zweckstetter and Martin Blackledge, *J Am Chem Soc.* 127(51):17968–9 (2005)