

# Festkörper-NMR-Spektroskopie: Untersuchung von molekularer Struktur und Organisation auf atomarer Ebene

Marc Baldus\*

## Stichwörter:

Fasern · NMR-Spektroskopie · Polymorphie · Röntgenbeugung · Zeolithe

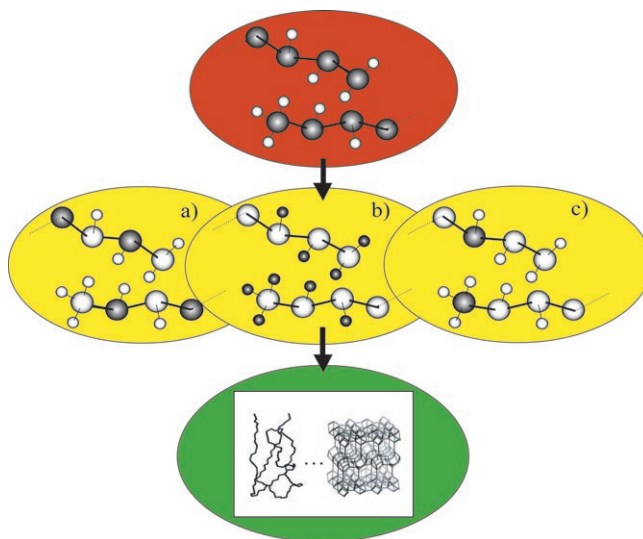
Ein zentrales Ziel in der modernen Strukturbiologie und Nanotechnologie ist das Verständnis der strukturellen Anordnung in dicht gepackten Molekülverbänden. Die Festkörper(FK)-NMR-Spektroskopie ist eine ideale Methode, um Struktur und Dynamik solcher Systeme auf atomarer Ebene zu bestimmen. FK-NMR-spektroskopische Methoden wurden z.B. umfassend genutzt, um zu verstehen, warum kleine Moleküle in unterschiedlichen festen Formen auftreten können. Solche polymorphen Systeme können oft durch spezifische FK-NMR-Resonanzfrequenzen charakterisiert werden.<sup>[1]</sup> Anwendung findet die Festkörper-NMR-Spektroskopie auch bei der Bestimmung von Ringstromeffekten und Wasserstoffbrücken, die entscheidenden Einfluss auf die supramolekulare Struktur und Organisation haben können.<sup>[2]</sup>

Empfindliche Hochfeld-FK-NMR-Instrumente sowie Fortschritte bei den Messmethoden, der Probenpräparation und der Isotopenmarkierungstechnik haben die Anwendungsbreite der Festkörper-NMR-Spektroskopie deutlich vergrößert. Eine besondere Herausforderung ist die Ermittlung einer vollständigen dreidimensionalen Molekülstruktur aus Festkörperdaten unter

MAS-Bedingungen (MAS: magic angle spinning<sup>[3]</sup>), wenn nur eine einzige oder einige wenige Proben untersucht werden können. Schwierigkeiten ergeben sich dabei aus dem dominierenden Einfluss der Dipol-Dipol-Wechselwirkungen benachbarter Atome. Diese Wechselwirkungen sind in der Regel von geringer Relevanz für die dreidimensionale Struktur, verhindern aber die präzise Messung schwächerer Wechselwirkungen, die die entscheidenden Informationen über die dreidi-

mensionale Anordnung des Moleküls liefern.

Kürzlich wurden komplementäre Ansätze entwickelt, um diese Hindernisse zu überwinden. Zunächst kann durch Frequenz-selektive Pulse<sup>[4]</sup> oder maßgeschneiderte chemische Synthese<sup>[5,6]</sup> eine Ausdünnung des Spinnnetzwerkes erreicht werden (Abbildung 1 a). Auch durch die direkte<sup>[6,7]</sup> oder indirekte<sup>[8]</sup> Detektion von Proton-Proton-Wechselwirkungen (Abbildung 1 b) sind strukturelle Randbedingungen zugäng-



**Abbildung 1.** Drei Ansätze zur Bestimmung von dreidimensionalen Strukturen mittels hochauflösender Festkörper-NMR-Spektroskopie für materialwissenschaftliche Anwendungen oder die Proteinstrukturbestimmung. Um die Dominanz starker, dipolarer Kopplungen zu überwinden, hilft eine Ausdünnung des Spinnnetzwerkes. Dies wird durch spezifische Synthese oder durch selektive FK-NMR-Pulssequenzen erreicht (a); grau: NMR-aktive Kerne. Darüber hinaus geben Proton-Proton-Wechselwirkungen Auskunft über die dreidimensionale Struktur (b). Levitt und Mitarbeiter<sup>[10]</sup> zeigten vor kurzem, dass Molekülstruktur und supramolekulare Organisation auch von Dipolwechselwirkungen in einem natürlich verdünnten Spinnnetzwerk abgeleitet werden können (c).

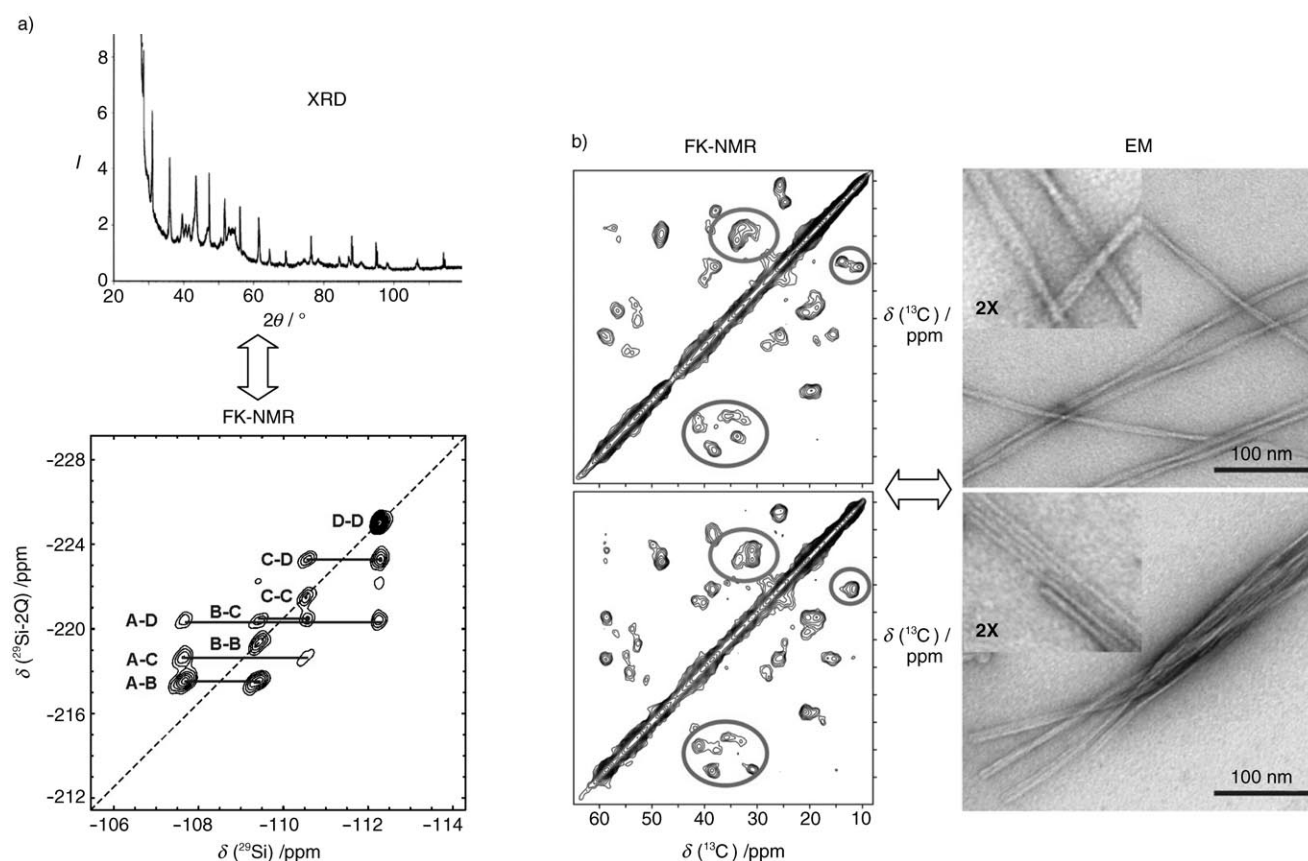
[\*] Dr. M. Baldus  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Abteilung für NMR-basierte Strukturbiologie  
37077 Göttingen (Deutschland)  
Fax: (+49) 551-201-2212  
E-mail: maba@mpibpc.mpg.de

lich, die nützlich für die Bestimmung einer vollständigen dreidimensionalen Molekülstruktur sind. Falls die Monomerkonformation bekannt ist, kann auch die supramolekulare Organisation<sup>[9]</sup> mit diesen Methoden untersucht werden.

Idealerweise sollte die Festkörper-NMR-Spektroskopie gleichzeitig Informationen über die lokale Molekülkonformation und die makromolekulare Anordnung eines zu untersuchenden Systems liefern. Levitt und Mitarbeiter<sup>[10]</sup> haben vor kurzem gezeigt, dass in einem natürlich verdünnten Spinnetzwerk beide Aspekte analysiert werden können (Abbildung 1c). Zu diesem Zweck wurden Zeolith-Gitterstrukturen mittels hochauflösender zweidimensionaler  $^{29}\text{Si}$ -FK-NMR-Spektroskopie untersucht. Üblicherweise werden dipolar gekoppelte Spinpaare in einem Doppelquanten(2Q-)Korrelations-Experiment detektiert, das FK-NMR-Si-

gnale von Spinpaaren in räumlicher Nähe selektiert.<sup>[11]</sup> Da die natürliche Häufigkeit von  $^{29}\text{Si}$  bei 4.7% liegt, tritt über den gesamten Zeolith-Kristall verteilt eine signifikante Zahl isolierter  $^{29}\text{Si}$ - $^{29}\text{Si}$ -Spinpaare auf. Anders als im Falle eines dichten Spinnetzwerkes, wo die Spindynamik von der stärksten Wechselwirkung bestimmt wird, lässt sich aus der Intensität eines Doppelquantensignals bei einer vorgegebenen Mischzeit direkt die Verteilung der Si-Si-Abstände ableiten. Während die 2Q-Signale bei kurzen Mischzeiten vornehmlich von  $^{29}\text{Si}$ -O- $^{29}\text{Si}$ -Paaren stammen, resultieren die 2Q-Intensitäten bei Mischzeiten von 10–32 ms aus den größeren Abständen (bis zu 8 Å, siehe Lit. [10]). Mithilfe einer Reihe von zweidimensionalen 2Q,1Q-Korrelationsexperimenten lässt sich die Verteilung der Si-Si-Abstände für jede 2Q,1Q-Korrelation ableiten.

Zunächst zeigten Levitt und Mitarbeiter,<sup>[10]</sup> dass die  $^{29}\text{Si}$ -2Q-Aufbaukurven stark abhängig vom Abstand der Si-Si-Atome sind und verlässlich simuliert werden können, wenn die supramolekulare Anordnung bekannt ist. Basierend auf diesen Befunden wurde diskutiert, wie man solche Korrelationen mit pulverdiffraktometrischen Daten (kristallographische Elementarzelle und Raumgruppe) kombinieren kann, um dreidimensionale Strukturen von Zeolith-Netzwerken zu lösen (Abbildung 2a). Der entsprechende Algorithmus ist darauf zugeschnitten, einen Satz von Si-Atomkoordinaten in der asymmetrischen Einheit zu finden, der Abweichungen simulierter 2Q-Kurven von experimentellen 2Q-Kurven minimiert. Teststrukturen werden durch Hinzufügen jeweils eines Si-Atoms, dessen Position und Bindungsverhalten in Einklang mit den Daten für die asymmetrische Einheit ist, generiert und nach



**Abbildung 2.** a) Komplementärer Gebrauch von  $^{29}\text{Si}$ -2Q-FK-NMR-Spektroskopie und Pulverdiffraktometrie (XRD) zur Lösung der Struktur von Modellen für Zeolith-Gitterstrukturen; A–D entsprechen den beobachtbaren FK-NMR-Resonanzen.<sup>[10]</sup> b) Kombination von hochauflösender FK-NMR-Spektroskopie und Elektronenmikroskopie, beschrieben von Petkova et al.<sup>[12]</sup> Diese Studien ergaben nicht nur einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Morphologie der Fibrillen und der Molekülstruktur, sondern könnten auch zum besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen Fibrillenstruktur und Neurotoxizität beitragen. Die Graphiken wurden freundlicherweise von M. H. Levitt (a) und R. Tycko (b) zur Verfügung gestellt.

der Methode der kleinsten Quadrate gegen die experimentellen 2Q-Daten optimiert. Diese Methode wurde in zwei Fällen, für die Röntgendaten verfügbar waren, erfolgreich getestet. Die  $^{29}\text{Si}$ -FK-NMR-Spektroskopie von Zeolithen kann bei günstigeren Bedingungen als die FK-NMR-Spektroskopie anderer Kerne ausgeführt werden, d.h. bei verbesserter spektraler Auflösung und ohne dass Umgebungen aus stark gekoppelten Protonen auftreten. Es ist zu erwarten, dass diese Methode auch auf andere anorganische oder isotonenangereicherte Moleküle übertragen werden kann.

Das Verständnis der Organisation von Makromolekülen ist auch im Zusammenhang mit Amyloid-Fibrillen von außerordentlicher Bedeutung. Diese durch Selbstorganisation gebildeten Molekülaggregate werden von Peptiden und Proteinen mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen gebildet und spielen unter anderem bei der Proteinfehlfaltung in der Alzheimerschen oder Parkinsonschen Krankheit eine wichtige Rolle. Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)- und Rasterkraftmikroskopie(AFM)-Aufnahmen haben gezeigt, dass Amyloid-Fibrillen unterschiedliche Morphologien aufweisen können. Basieren diese Morphologien auf unterschiedlichen Molekülstrukturen? Und: Welcher Zusammenhang besteht zwischen biologischer Aktivität und der Molekülstruktur?

Hochauflösende FK-NMR-Methoden wurden vor kurzem angewendet, um diese Fragen für das 40 Aminosäuren lange  $\beta$ -Amyloidpeptid  $\text{A}\beta_{1-40}$ , das mit der Alzheimerschen Krankheit in Zusammenhang steht, zu beantworten. Petkova et al.<sup>[12]</sup> präparierten zunächst unter zwei verschiedenen Wachstumsbedingungen Fibrillen, die an spezifischen Resten isotonenmarkiert waren. Die so erhaltenen „stillen“ und „erregten“ Fibrillen wurden als Keime verwendet, um Fibrillen der ersten und zweiten Folgegeneration unter vergleichbaren Bedingungen zu erhalten. TEM-Bilder von negativ angefärbten  $\text{A}\beta_{1-40}$ -Fibrillen zeigten, dass nur die Morphologie der „stillen“ Fibrillen durch eine periodische Verdrehung (als Spirale) beschrieben werden kann und dass die Unterschiede in den beiden Folgegenerationen bestehen bleiben.

Zur Untersuchung der Molekülstruktur wurde eine Reihe von hochauflösenden 2D- $^{13}\text{C}$ -FK-NMR-Spektren an Fibrillen aller drei Generationen aufgenommen (Abbildung 2b), wobei überall die gleichen spezifischen Aminosäurereste isotonenmarkiert waren. Die Kreuzkorrelationen im 2D-FK-NMR-Spektrum enthalten Informationen über die lokale Struktur und die Konformation der Umgebung. Die 2D-Spektren der stillen und erregten Fibrillen zeigen ausgeprägte Unterschiede im Spektrum (in Abbildung 2b durch Kreise markiert), die sich bei den folgenden Generationen fortsetzen. Zusätzliche FK-NMR-Daten bestätigen, dass den Fibrillenmorphologien unterschiedliche Molekülkonformationen und eine andere supramolekulare Organisation zugrunde liegen. Eine solche Polymorphie auf der Molekülebene und ein solcher Zusammenhang zwischen Molekülstruktur und Fibrillenmorphologie wurden auch für andere Proteinaggregate festgestellt, die eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen.<sup>[13]</sup>

Beide hier diskutierten Berichte sind Beispiele, wie sich bildgebende Verfahren, Beugungsmethoden und Festkörper-NMR-Spektroskopie bei der Untersuchung von Molekülkomplexen ergänzen können. Die erhaltenen Informationen helfen nicht nur bei der Optimierung materialwissenschaftlicher Anwendungen, wie im Falle sich selbst organisierender Nanomaterialien mit neuartigen elektronischen oder optischen Eigenschaften, sondern geben auch neue Einblicke in biologische Systeme: Im Falle von  $\text{A}\beta_{1-40}$  führen die verschiedenen Morphologien zu erheblich unterschiedlicher Toxizität in Kulturen neuronaler Zellen. Einen weiteren Hinweis, dass Neurotoxizität eng mit den Details der Fibrillenstruktur zusammenhängt, liefert auch eine kürzlich vorgestellte Studie zur Struktur des HET-s-Prion-Proteins.<sup>[14,15]</sup> Wieder lieferte die FK-NMR-Spektroskopie entscheidende Einblicke in die Struktur von Prionenprotein-Aggregaten. Mutationen innerhalb der zentralen  $\beta$ -Faltblattregion dieser Fibrillen, die durch hochauflösende FK-NMR-Spektroskopie bestimmt wurden, scheinen Einfluss auf die Ansteckungsfähigkeit der Prionen zu haben.<sup>[15]</sup> Wie diese Beispiele

zeigen, lässt sich mithilfe der hochauflösenden Festkörper-NMR-Spektroskopie eine wichtige Verbindung zwischen Mikroskopie- und Kristallographiebildern einerseits und der Molekülfunktion andererseits herstellen.

- [1] R. K. Harris in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* (Hrsg.: D. M. Grant, R. K. Harris), Wiley, Chichester, **1996**, S. 3734–3740.
- [2] J. S. Waugh, R. W. Fessenden, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 846–849; B. Berglund, R. W. Vaughan, *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 2037–2043; G. A. Jeffrey, Y. Yeon, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1986**, *42*, 410–413; R. K. Harris, P. Jackson, L. H. Merwin, B. J. Say, G. Hagele, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* **1988**, *84*, 3649–3672.
- [3] E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659.
- [4] K. Nomura, K. Takegoshi, T. Terao, K. Uchida, M. Kainosho, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4064–4065; C. P. Jaroniec, B. A. Tounge, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3507–3519.
- [5] F. Castellani, B. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat, *Nature* **2002**, *420*, 98–102; S. G. Zech, A. J. Wand, A. E. McDermott, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8618–8626.
- [6] B. Reif, C. P. Jaroniec, C. M. Rienstra, M. Hohwy, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **2001**, *151*, 320–327; E. K. Paulson, C. R. Morcombe, V. Gaponenko, B. Dancheck, R. A. Byrd, K. W. Zilm, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14222–14223.
- [7] S. P. Brown, H. W. Spiess, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 4125–4155; B. Elena, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9140–9146.
- [8] A. Lange, S. Luca, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9704–9705; A. Lange, S. Becker, K. Seidel, K. Giller, O. Pongs, M. Baldus, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 2125–2129; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2089–2092.
- [9] V. Percec, M. Glodde, T. K. Bera, Y. Miura, I. Shivanovskaya, K. D. Singer, V. S. K. Balagurusamy, P. A. Heiney, I. Schnell, A. Rapp, H.-W. Spiess, S. D. Hudson, H. Duan, *Nature* **2002**, *419*, 384–387; I. de Boer, J. Matysik, M. Amakawa, S. Yagai, H. Tamiaki, A. R. Holzwarth, H. J. M. de Groot, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13374–13375; R. Tycko, Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6606–6607; M. Etzkorn, A. Böckmann, A. Lange, M. Baldus, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14746–14751.
- [10] D. H. Brouwer, P. E. Kristiansen, C. A. Fyfe, M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.*



- 2005, 127, 542–543; D. H. Brouwer, R. J. Darton, R. E. Morris, M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10365–10370.
- [11] A. Bax, R. Freeman, S. P. Kempell, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 4849–4851; M. Munowitz, A. Pines, *Adv. Chem. Phys.* **1987**, 66, 1–152.
- [12] A. T. Petkova, R. D. Leapman, Z. Guo, W.-M. Yau, M. P. Mattson, R. Tycko, *Science* **2005**, 307, 262–265.
- [13] P. Chien, J. S. Weissman, A. H. DePace, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 617–656; S. B. Prusiner, M. R. Scott, S. J. DeArmond, F. E. Cohen, *Cell* **1998**, 93, 337–348; H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 15871–15876.
- [14] A. B. Siemer, C. Ritter, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2494–2497; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2441–2444.
- [15] C. Ritter, M.-L. Maddelein, A. B. Siemer, T. Luhrs, M. Ernst, B. H. Meier, S. J. Saupe, R. Riek, *Nature* **2005**, 435, 844–848.

# Chemie

## rund um die Uhr

### Das Buch zum Jahr der Chemie

Das offizielle Buch der Gesellschaft Deutscher Chemiker und des BMBF ist ein wahrer Lesespaß und Augenschmaus.



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

Wiley-VCH, Kundenservice  
Postfach 10 11 61, 69451 Weinheim  
Tel.: +49 (0) 6201 606-400, Fax: +49 (0) 6201 606-184  
E-Mail: service@wiley-vch.de, www.wiley-vch.de



Mädfessel-Herrmann, K. /  
Hammar, F. /  
Quadbeck-Seeger, H.-J.  
Herausgegeben von der  
Gesellschaft Deutscher  
Chemiker  
2004. X, 244 Seiten, mehr  
als 300 Abbildungen kom-  
plett in Farbe. Gebunden.  
€ 19,90 / sFr 32,-  
ISBN 3-527-30970-5

WILEY-VCH

15792411\_gu