

Dette er anden artikel i en serie på tre om NMR-spektroskopiens udvikling.
 Artikel 3 bliver bragt i Dansk Kemi nr. 11.

NMR-spektroskopiens udvikling II

Indførelsen af multidimensional NMR-spektroskopi.

Af Jens Jørgen Led*,
 Kemisk Institut, Københavns Universitet

Mens det første kvantespring inden for NMR-spektroskopi var indførelsen af Puls-Fourier Transformation (Puls-FT)-teknikken, var det andet kvantespring udviklingen af den multidimensionale (to-dimensionale) NMR-spektroskopi med to eller flere frekvensakser.

Den multidimensionale NMR-spektroskopi gjorde det med et slag muligt at forøge opløsningsevnen betydeligt samtidig med, at den gjorde det muligt at identificere (tilordne) de enkelte signaler i komplicerede NMR-spektre af biomakromolekyler, herunder proteiner, og bestemme deres tre-dimensionale struktur i vandig opløsning – hvis biomakromolekylerne har en veldefineret rumlig struktur.

Udviklingen og indførelsen af den multidimensionale NMR-spektroskopi skyldes først og fremmest de to forskere, Richard R. Ernst, som udviklede teknikken [1] og Kurt Wüthrich, som demonstrerede dens anvendelighed til bestemmelse af biomakromolekyler (proteiner) struktur i opløsning [2]. De to forskere, figur 1 og 2, fik Nobelprisen i kemi for deres forskning i henholdsvis 1991 og 2002.

Multidimensional NMR-spektroskopi

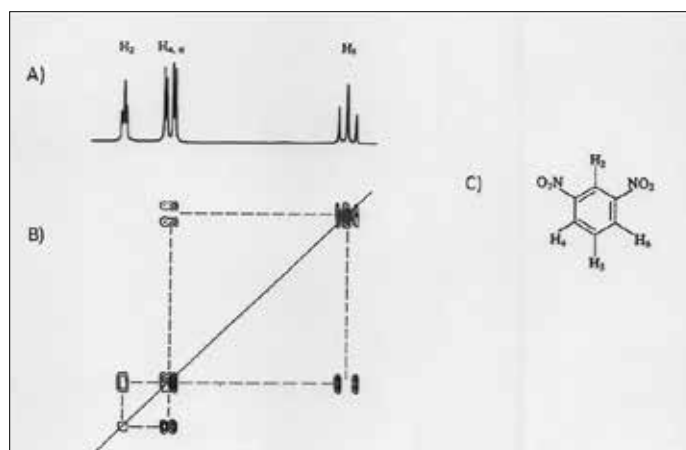
Multidimensional NMR-spektroskopi bygger på to basale eksperimenter: COSY (correlation spectroscopy)-eksperimentet og NOESY (nuclear overhauser enhancement spectroscopy)-



Figur 1. Richard R. Ernst fik Nobelprisen i kemi i 1991 "for his contributions to the development of the methodology of high resolution nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy".



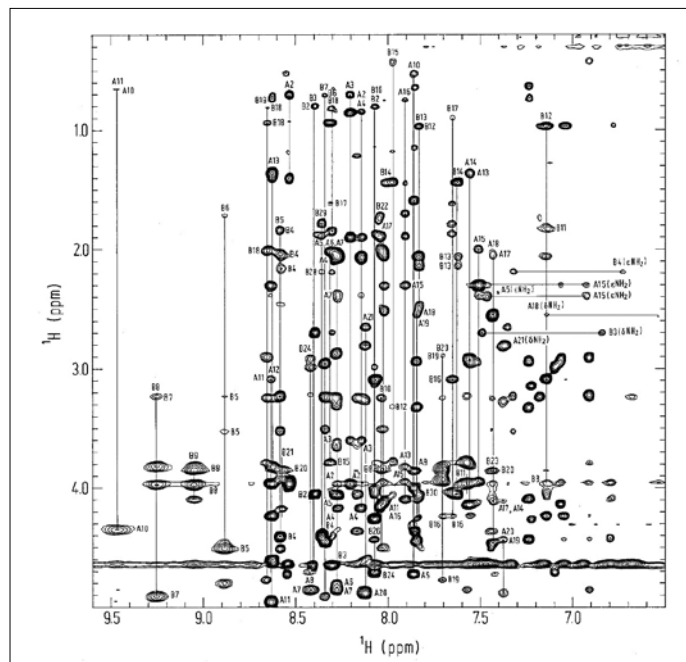
Figur 2. Kurt Wüthrich fik Nobelprisen i kemi i 2002 "for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution".



Figur 3. A) en-dimensionalt ^1H NMR spektrum og B) to-dimensionalt ^1H COSY spektrum af C) 1,3-dinitrobenzen. Selvom signallerne i det en-dimensionale spektrum kan identificeres alene på grundlag af deres koblingsmønstre og chemical shift-værdier, viser det to-dimensionale spektrum den dramatiske ændring af opløsningsevnen og den entydige identifikation af signallerne, som den to-dimensionale teknik medfører. I mere komplicerede spektre af større molekyler, som for eksempel proteiner, vil en identifikation af signallerne kun være mulig ved hjælp af to- eller fler-dimensionale spektre. Kun NOESY-spektre kan afsløre, hvilke kerner der ligger rumligt tæt ved hinanden i molekylet.

eksperimentet. Alle de øvrige multidimensionale eksperimenter er i det væsentlige afledt af disse to. COSY-eksperimentet korrelerer spektrets signaler gennem de kemiske bindinger via spin-spin-koblingerne mellem de kerner, der giver anledning til signallerne. Som vist i figur 3B ses disse korrelationer som signaler uden for diagonalen (cross peaks), mens de oprindelige signaler, som ses i det en-dimensionale spektrum, figur 3A, ligger langs diagonalen i det to-dimensionale spektrum. Tilsvarende vil NOESY-eksperimentet korrelere signallerne gennem rummet via dipol-dipol-koblingerne mellem kernerne. Herefter kan man i princippet, ud fra cross peak'enes intensiteter og et passende regneprogram, bestemme de relative størrelser af afstandene mellem de kerner, der giver anledning til cross peak'ene og herigennem beregne strukturen af molekylet. Det simple COSY-spektrum i figur 3B viser, hvordan teknikken ikke blot forøger den spektrale opløsning dramatisk ved at placere signallerne i et to-dimensionalt plan og ikke kun i én dimension langs en linje, men også direkte afslører hvilke kerner (signaler), der kobler (korrelerer) indbyrdes. Ideen bag den to-dimensionale teknik kan udvides til flere dimensioner, især når der er flere forskellige koblende kerner involveret (^1H , ^{13}C , ^{15}N), og der er tale om store molekyler med komplicerede spektre.

Figur 4. Det 500 MHz spektrometer ved Kemisk Institut, Københavns Universitet, som Protein-NMR Gruppen fik bevilget af Teknologistyrelsen. Operatøren er specialestuderende Danielle Keller.



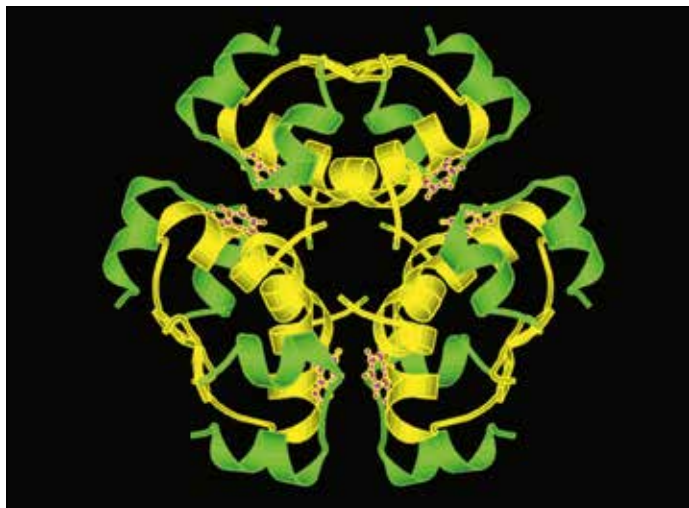
Figur 6. Et udsnit af 500 MHz ^1H - ^1H NOESY-spektret af den monomere insulinmutant, des-[Phe(B25)] insulin, i vand. Udover at demonstrere kompleksiteten af et to-dimensionalt spektrum af et protein viser det konkrete spektrum korrelationerne mellem amidprotonerne og de alifatiske protoner, som danner grundlaget for bestemmelsen af strukturen af den monomere insulinmutant i vandig opløsning. (Jørgensen AMM, Olsen HB, Balschmidt P, Led JJ. *J. Mol. Biol.* **1996**, 257, 684-699).

Insulin-forskningssamarbejde med Nordisk Gentofte og Novo Nordisk

Ved Kemisk Institut, Københavns Universitet, blev den nye multi-dimensionale NMR-teknik indført i 1988 ved køb af et Bruker 500 MHz NMR-spektrometer, figur 4 og et VAX regnearbejde, som Teknologistyrelsen bevilgede til et nyt Protein-NMR Videncenter, som blev drevet af Protein-NMR Gruppen ved Institutet med mig som leder. Gruppens forskning samt dens drift af udstyret blev økonomisk støttet af Nordisk Gentofte (Novo Nordisk fra 1989) over en seks-årig periode mod til gengæld, at gruppen, sammen med forskere fra Nordisk Gentofte, skulle studere strukturen og funktionen af en række proteiner, som Nordisk Gentofte og senere Novo Nordisk var interesseret i. Endvidere blev gruppen støttet af det daværende Statens Naturvidenskabelige Forskningsråd og Statens Teknisk-videnskabelige Forskningsråd.

Den forbedrede multidimensionale NMR-teknik gjorde det muligt at bestemme opløsningsstrukturen af en lang række proteiner, som kun vanskeligt lader sig krystallisere. Det gælder f.eks. plastocyanin fra *anabaena variabilis* [3] og Human Relaxin-like Factor [4].

Samarbejdet med Nordisk Gentofte og Novo Nordisk blev særdeles frugtbart. Sammen med forskere fra de to virksomheder publicerede gruppen således i de følgende år mere end 15 videnskabelige artikler i internationale videnskabelige tidsskrifter og mere end 20 artikler med relation til proteiner af interesse for disse virksomheder.



Figur 5. Strukturen af insulinhexameren i vandig opløsning bestemt ved hjælp af NMR-spektroskopi. (Chang X, Jørgensen AMM, Bardrum P, Led JJ, *Biochemistry* **1997**, 36, 9409-9422).

Et væsentligt problem for mange proteiner, som NMR-studierne ved Kemisk Institut kunne kaste lys over, er den selv-associering eller aggregering, der ofte forekommer i vandige opløsninger af proteiner ved de koncentrationer, der normalt forekommer ved produktion, formulering og dosering af proteinerne. Det gælder blandt andet væksthormoner, insulin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1, Liraglutide eller Victoza) og human væksthormon (hGH).

Insulinhexameren er væsentlig for langtidsvirkende insulin. For i detaljer at klarlægge årsagerne til hexamerdannelsen bestemte Protein-NMR Gruppen strukturen af insulinhexameren i vandig opløsning [5,6], figur 5. Omvendt er monomerformen afgørende for hurtigvirkende insuliner og gruppen undersøgte derfor også, i samarbejde med forskere ved Nordisk Gentofte og Novo Nordisk, strukturen og funktionen af en række insulin-mutanter [7-9] for at finde frem til en monomerinsulin, figur 6.

Andre forskningssamarbejder om insulin og relaterede proteiner

Samarbejdet med Novo Nordisk om insulin sluttede i midten af 1990'erne, hvor en insulinforskergruppe ved Novo Nordisk selv ønskede at overtage al insulinforskning. På grundlag af de erfaringer, der var opnået med insulinmutanterne, og gennem et samarbejde med Bartholin Institutet på Rigshospitalet, lykkedes det dog Protein-NMR Gruppen ved Kemisk Institut at fremstille og undersøge en insulinmutant, der både var monomer og ca. 50% mere aktiv end den native monomere insulin [10,11]. Samtidig var mutanten uden en veldefineret struktur i vandig opløsning og antog kun den native insulins struktur i en helixfremmende vandig opløsning af 2,2,2-trifluoroethanol. På det grundlag blev det antaget, at den øgede aktivitet skyldtes den delvist udfoldede tilstand i vandig opløsning – en tilstand som den native insulin må igennem for at binde sig til sin receptor [6], figur 7. Denne antagelse er for nyligt blevet bekræftet af andre forskere [12].

Selvassocieringen af glucagon-like peptide-1 (GLP-1, Victoza) [13,14] og af human Væksthormon (hGH) er også vigtige problemer, som Protein-NMR Gruppen bidrog til opklaring af sammen med forskere fra Novo Nordisk og Nordisk Gentofte samt forskere fra Yale University, USA [15-17]. Især hGH viste sig at være vanskeligt at studere ved hjælp af NMR-spektroskopi. Det skyldtes proteinmolekylets størrelse og dets mange muligheder for svage selvassocieringer. Tilsammen førte dette til komplicerede spektre med relativ brede og overlappende signaler og proteinaggregeringer selv ved proteinkoncentrationer, der set fra et NMR-synspunkt var lave.

En nærmere undersøgelse af aggregeringen af hGH måtte derfor afvente endnu et kvantespring inden for NMR-spektroskopien i form af de superfølsomme og superkølede prøvehoveder, de såkaldte cryoprober, som beskrives nærmere i den tredje artikel i Dansk Kemi om NMR-spektroskopis historie.

Udvikling af NMR-metodikken

Sideløbende med de mange studier af proteinstrukturer fandt der en udvikling af selve NMR-metodikken sted. Her fokuserede Protein-NMR gruppen især på metoder, der kunne forbedre den kvantitative bestemmelse af de NMR-parametre, der er nødvendige for proteinstudierne. Det gælder således bestemmelsen af de meget hurtige relaxationstider for kerner, der sidder tæt ved paramagnetiske ioner [18], og som er af betydning ved paramagnetiske studier af proteiner, som vil blive nærmere omtalt i den tredje artikel i denne serie. Ligeledes blev der fokuseret på præcise bestemmelser af NMR-signalernes intensiteter i proteinspektrene [19], der er afgørende for strukturbestemmelsen af proteiner ud fra NOESY-spektrene, og på nøjagtige bestemmelser af udvekslingshastighederne af protei-

ners amidprotoner [20,21], der også er vigtige for opklaring af proteins struktur og funktion i vandig opløsning.

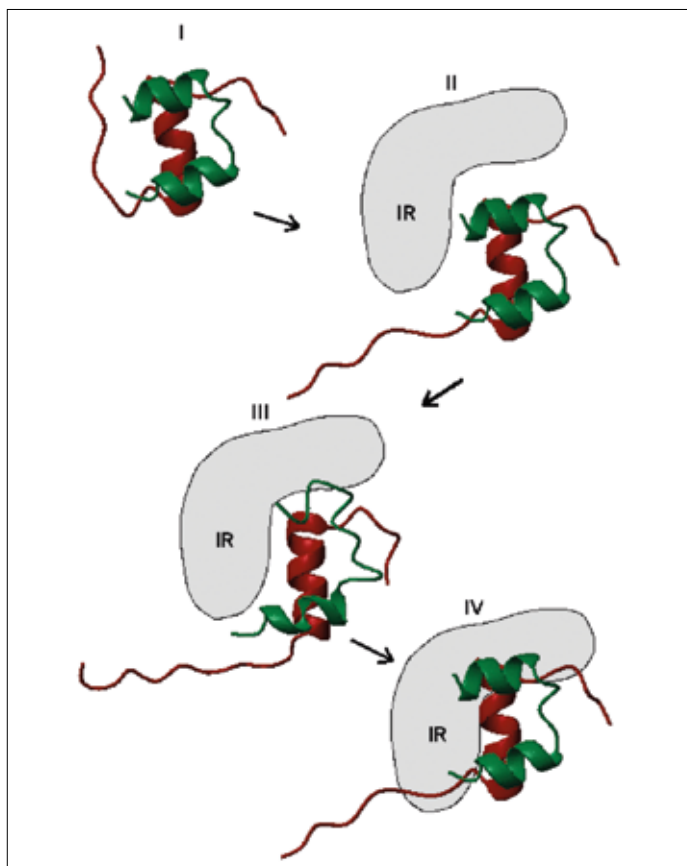
E-mail:

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

1. Aue WP, Bartholdi E, Ernst RR, Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys* **1976**;64: 2229-2246.
2. Zuiderweg ERP, Kaptein R, Wüthrich K, Secondary structure of the lac repressor DNA-binding domain by two-dimensional ¹H nuclear magnetic resonance in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **1983**; 80: 5837-5841.
3. Badsberg U, Jørgensen AMM, Gesmar H, Led JJ, Hammerstad JM, Jespersen LL, Ulstrup J. Solution Structure of Reduced Plastocyanin from the Blue-Green Alga *Anabaena variabilis*. *Biochemistry* **1996** 35, 7021-7031.
4. Büllsbach EE, Hass MAS, Jensen MR, Hansen DF, Kristensen SM, Schwabe C, Led JJ. Solution Structure of a Conformationally Restricted Fully Active Derivative of the Human Relaxin-like Factor. *Biochemistry* **2008**, 47, 13308-13317.
5. Chang X, Jørgensen AMM, Bardrum P, Led JJ. Solution structures of the R6 human insulin hexamer. *Biochemistry* **1997**, 36, 9409-9422.
6. O'Donoghue SI, Chang X, Abseher R, Nilges M, Led JJ. Unraveling the symmetry ambiguity in a hexamer: Calculation of the R6 human insulin structure. *J. Biomol. NMR* **2000**, 16, 93-108.
7. Kristensen SM, Jørgensen AMM, Led JJ, Balschmidt P, Hansen FB. Proton Nuclear Magnetic Resonance Study of the B9(Asp) Mutant of Human Insulin. Sequential Assignment and Secondary Structure. *J. Mol. Biol.* **1991**, 218, 221-231.
8. Jørgensen AMM, Kristensen SM, Led JJ, Balschmidt P. Three-Dimensional Solution Structure of an Insulin Dimer. *J. Mol. Biol.* **1992**, 227, 1146-1163.
9. Jørgensen AMM, Olsen HB, Balschmidt P, Led JJ. Solution structure of the superactive monomeric Des-[Phe(B25)] human insulin mutant: Elucidation of the structural basis for the monomerization of Des-[Phe(B25)] insulin and the dimerization of native insulin. *J. Mol. Biol.* **1996**, 257, 684-699.
10. Keller D, Clausen R, Josefsen K, Led JJ. Flexibility and Bioactivity of Insulin: an NMR Investigation of the Solution Structure and Folding of an Unusually Flexible Human Insulin Mutant with Increased Biological Activity. *Biochemistry* **2001**, 40, 10732-10740.
11. Clausen C, Jørgensen TG, Jørgensen KH, Johnsen AH, Led JJ, Josefsen K. The (ProB27, ThrB28) human insulin analogue is more potent and more rapidly absorbed from subcutis than human insulin. *Eur. J. Endocrinology* **2002** 147, 227-233.
12. Menting JG, et. al. Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, 111, E3395- E3404.
13. Chang X, Keller D, Bjørn S, Led JJ. Structure and folding of glucagon-like peptide-1-(7-36)- amide in aqueous trifluoroethanol studied by NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, 39, 477-483.
14. Chang X, Keller D, O'Donoghue SI, Led JJ. NMR studies of the aggregation of glucagon-like peptide-1: formation of a symmetric helical dimer. *FEBS Lett.* **2002**, 515, 165-170.
15. Abildgaard F, Jørgensen AMM, Led JJ, Christensen T, Jensen EB, Junker F, Dalbøge H. Characterization of Tertiary Interactions in a Folded Protein by NMR Methods: Studies of pH-Induced Structural Changes in Human Growth Hormone. *Biochemistry* **1992**, 31, 8587-8596.
16. Kasimova MR, Kristensen SM, Howe PWA, Christensen T, Matthiesen F, Petersen J, Sørensen HH, Led JJ. NMR Studies of the Backbone Flexibility and Structure of Human Growth Hormone: A Comparison of High and Low pH Conformations. *J. Mol. Biol.* **2002**, 318, 679-695.
17. Jensen MR, Kristensen SM, Keeler C, Christensen HEM, Hodsdon ME, Led JJ. Weak self-association of human Growth Hormone investigated by nitrogen-15 NMR relaxation. *Proteins* **2008**, 73, 161-172.
18. Hansen DF, Led JJ. Measuring the Longitudinal NMR Relaxation Rates of Fast Relaxing Nuclei Using a Signal Eliminating Relaxation Filter. *J Magn Reson* **2001**; 151: 339-346.
19. Gesmar H, Nielsen PF, Led JJ. Simple Least-Squares Estimation of Intensities of Overlapping Signals in 2D NMR spectra. *J Magn Reson Ser B* **1994**;103: 10-18.
20. Olsen HB, Gesmar H, Led JJ. Slow Amide Proton Exchange Rates from the Line Widths in a Single Two-Dimensional ¹H NMR Spectrum. *J Am Chem Soc* **1993**; 115: 1456-1460.
21. Moss R, Gesmar H, Led JJ. A New Linear Prediction Model Method for the Determination of Slow Amide Proton Exchange Rates from a Series of One-Dimensional ¹H NMR Spectra. *J Am Chem Soc* **1994**;116: 747-749.



Figur 7. Skitse, der viser udfoldningen af insulinmolekylet og bindingen af det udfoldede molekyle til insulinreceptoren. (Keller D, Clausen R, Josefsen K, Led JJ. *Biochemistry* **2001**, 40, 10732-10740).