SKRIPT

NMR-Spektroskopie

Biophysikalische Chemie für Biochemiker IV

Prof. Dr. Harald Schwalbe
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

Vorwort

Das vorliegende Manuskript ist aus den Handouts zu den Seminaren der Studenten/innen des Studiengangs Biochemie im WS 2001/2002 entstanden. Die 36 Studenten wurden in drei Gruppen aufgeteilt. In den Zwölfergruppen musste jeder Teilnehmer sich auf ein Thema mit einem Kurzreferat vorbereiten. Folgende Themen wurden in den drei Gruppen bearbeitet:

Erstes Seminar: Grundlagen

Zweites Seminar: Zuordnung

Kurzreferat I: - 1D Resonanzphänomen, chemische Verschiebungen und konformationelle Abhängigkeit.
Kurzreferat II: - J-Kopplungen und ihre konformationelle Abhängigkeit
Kurzreferat III: - NMR in Zellen
Kurzreferat IV: - FT NMR.

Drittes Seminar: 2D NMR und Struktur

Kurzreferat V: - 2D NMR: Resonanzzuordnung mittels TOCSY/COSY/NOESY
Kurzreferat VI: - Struktur: NOESY und Sekundärstrukturvorhersage in Proteinen
Kurzreferat VII: - Markierungsmethoden Protein/RNA
Kurzreferat VIII: - Strukturrechnungen und MD

Viertes Seminar: Dynamische Aspekte der NMR-Spektroskopie

Kurzreferat IX: - 3D NMR
Kurzreferat X: - Chemischer Austausch
Kurzreferat XI: - Ligandwechselwirkung: SAR by NMR
Kurzreferat XII: - Wasserstoffaustauschexperimente und Proteinfaltung

Die Handouts wurden in den drei Gruppen verbessert und in ihre jetzige Form von den Studenten Boris Fürtig, Nico Riffel und Christian Schlörb gebracht. Ohne die drei wäre das Manuskript nicht möglich gewesen, und ich bin den Dreien sehr dankbar. Kapitel 1-12 wurden von mir nur in Ausnahmefällen redigiert. Das Kapitel 0 sowie der Fragenkatalog wurden von mir erstellt.
Die Qualität und Informationsfülle der Kapitel 1-12 ist hervorragend, die von den Studenten geführten Diskussionen in den Seminaren waren auf hohem Niveau. Das Manuskript soll damit eine Vorlage darstellen, auf deren Basis sich die nächsten Studentenjahrgänge der Johann Wolfgang Goethe-Universität auf das Seminar vorbereiten und noch besser direkt im Seminar Fragestellungen diskutieren können.

Frankfurt, Sommer 2002

Harald Schwalbe, schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

Fragenkatalog

Die Formulierung von Fragen zu den einzelnen Kapiteln soll dazu dienen, dass Sie sich überprüfen können, ob Sie die Inhalte der Kapitel verstanden haben. Garantien werden durch diese Fragen nicht gegeben. Manche Fragen kommen zwei Mal vor.

Einleitung: *NMR-Grundlagen*

1.) Erklären Sie das Stern-Gerlach-Experiment? Wie wirkt sich die Erhöhung der Stärke des inhomogenen Magnetfelds auf das detektierte Signal aus?
2.) Welche wichtige NMR-Größe kann man mit Hilfe des Rabi-Experiments messen?
3.) Woher kennen Sie die Bezeichnung Spins in der Chemie?
4.) In welchem funktionalen Verhältnis stehen das magnetische Moment von Kernen und deren Spin? Wie nennt man die Proportionalitätskonstante?
5.) Berechnen Sie die Larmorfrequenz für ^{1}H, ^{13}C, und ^{15}N bei einer Magnetfeldstärke von 21T.
6.) Wie groß ist der Energieunterschied zwischen α- und β-Zustand bei einer Magnetfeldstärke von 21T?
7.) Was ist linear polarisierte elektromagnetische Strahlung, was ist zirkular polarisierte Strahlung? Zum Verständnis welcher optischen Eigenschaft von Molekülen spielt zirkular polarisiertes Licht eine entscheidende Rolle?
8.) Erklären Sie das Prinzip der Fouriertransformation. Diskutieren Sie verschiedene Fälle?
9.) Diskutieren Sie den Unterschied zwischen CW-Spektroskopie und FT-Spektroskopie am Beispiel einer Gitarre. Neben einer Gitarre stehen Ihnen noch ein Mikrophon und ein Oszilloskop zur Verfügung. Das Oszilloskop hat eine eingebaute Fourier-transformationsroutine.
10.) Wieso braucht man zwei phasenempfindliche Detektoren (ADCs)?
11.) Welche Arten von Relaxation unterscheidet man und wie kann man die messen?
12.) Erklären Sie mit einem einfachen Bild, wie skalare Kopplung zustande kommt.

Kapitel 1: *Chemische Verschiebung*

1.) In welche verschiedenen Gruppierungen sollte man die in Aminosäuren vorkommenden Protonen, die an verschiedene Heteroatome gebunden sind, einteilen (Beispiel: aromatisch, aliphatisch, etc.)?
2.) Welche Isotope der in Aminosäuren auftretenden Atome sind NMR-aktiv. Welches Atom kann man nur sehr schwer spektroskopieren (Schauen Sie auch in Einleitung nach)?
3.) Vergleichen Sie die chemische Verschiebung in der homologen Reihe von Alklylhalogeniden (CH_3X mit X=F,Cl,Br,I). Welche Methylgruppe kommt am tieffeldigsten und weshalb?
4.) Was ist hochfeld und was ist tieffeld?
5.) Was ist die Random-Coil-chemische Verschiebung? An welchen Substanzen messen Sie diese Verschiebung und welche Annahme geht in diese Untersuchung ein?
6.) Als ein Indiz, dass Ihr Protein, dessen Struktur Sie mittels NMR-Spektroskopie untersuchen wollen, auch wirklich gefaltet ist, inspizieren Sie den spektralen Bereich

zwischen 0 und -2 ppm. Woher kommt die Resonanzverschiebung in diesen Bereich für Methylgruppen in gefalteten Proteinen?

7.) Ein weiteres Indiz, dass Ihr Protein eine Tertiärstruktur annimmt, ist der Test, ob sich die Intensität von NH-Protonen nicht ändern, wenn man vor Aufnahme des Experiments das Lösungsmittel Wasser gesättigt hat. Wieso (siehe auch Kapitel 4)?
8.) Wieso kann man keine OH-Protonen sehen?
9.) Worauf beruht das Programm TALOS? Wie kann man chemische Verschiebungen zur Vorhersage der Sekundärstruktur nutzen?

Kapitel 2: *Fouriertransformation*

1.) Erklären Sie das Prinzip der Fouriertransformation (siehe Einleitung)
2.) Was ist der Unterschied zwischen *CW*-Spektroskpie und FT-Spektroskopie (siehe Einleitung)?
3.) Was ist ein FID?
4.) Was ist ein ADC? Weshalb braucht man zwei ADCs (siehe Einleitung)?
5.) Wie hängt die Verbesserung des Signal-zu-Rauschen (S/N) von der Anzahl der Experimente n ab?
6.) Was ist weisses Rauschen? Wie würden Sie testen, ob Sie weisses Rauschen vorliegen haben? Wie können Sie Rauschen unterdrücken? (Stichwort: Kryoprobenkopf).
7.) Wie lang ist typischerweise ein harter Protonenpuls. (1μs, 10μs, 1ms)?
8.) Was ist die Akquisitionszeit?
9.) Welche Postakquisitionsprozedur können Sie anwenden, um a.) das S/N ihres Signals zu bessern, oder um b.) die Auflösung zu verbessern. Weshalb geht nicht beides gleichzeitig?
10.) Wie ist die Digitalisierung eines Spektrums definiert?

Kapitel 3: *Skalare J-Kopplung*

1.) Welche Kerne koppeln miteinander?
2.) Welche skalare Kopplungskonstante ist für die Konformationsanalyse am wichtigsten (^{1}J, ^{2}J oder ^{3}J)?
3.) Gibt es skalare Kopplungskonstanten nur zwischen homonuklearen Kernen?
4.) Wie wird die Abhängigkeit der Größe der ^{3}J-Kopplungskonstanten vom Torsionswinkel θ beschrieben? Zeichnen Sie den schematischen Verlauf der K?-Kurve als Funktion des Torsionswinkel auf. Wo finden Sie Maxima und Minima?
5.) Zeigen Sie in einer Newmanprojektion, wie der Torsionswinkel θ definiert ist.
6.) Welche Torsionswinkel definieren das Proteinrückgrat?
7.) Zeichnen Sie ein Ramachandran-Diagramm. In welchen Bereichen liegen die stabilen Sekundärstrukturelemente?
8.) Zwischen welchen Atomen können Sie Kopplungskonstanten bestimmen, um den Winkel ϕ im Proteinrückgrat zu bestimmen. Achtung, wovon hängt das ab?
9.) Wie übersetzt sich ein (statistischer) Fehler in der Bestimmung der Kopplungs-konstanten in die Genauigkeit der Bestimmung der Winkel? Diskutieren Sie diese Frage anhand der Karpluskurve (unter Frage 4). Ist dies für alle Torsionswinkel-bereiche θ gleich?
10.) Nehmen Sie an, Sie haben ein 50%:50% Gleichgewicht um eines Torsionswinkel eines Aminosäurerestes, der eine Torsionswinkel θ =60°, der andere θ =180°. Rechnen Sie unter Verwendung der angegebenen Karplusparameter die gemittelte Kopplungskonstante aus.

Kapitel 4: *Chemischer Austausch*

1.) Was ist chemischer Austausch?
2.) Was ist der Unterschied zwischen einem symmetrischen und einem unsymmetrischen Austausch zwischen zwei Zuständen? Diskutieren Sie dies anhand eines Energie-Reaktionskoordinatendiagramms.
3.) Welche drei Bereiche des Austauschs unterscheidet man. Wovon hängt diese Einteilung ab? Ist die Einteilung abhängig von der Feldstärke, bei der Sie das Austauschphänomen untersuchen?
4.) Nehmen Sie an, Sie untersuchen das Peptide Ac-HWWPWW.
    a. Wieviele NH-Signale beobachten Sie maximal, wenn das Prolin eine langsame cis-trans Isomerisierung durchläuft
    b. Wieviele NH-Signale beobachten Sie maximal, wenn der Austausch schnell ist?
    c. Wieviele NH-Signale beobachten Sie im intermediären Austausch. Gehen alle NH bei der gleichen Temperatur in intermediären Austausch?
    d. Wie können Sie die Reaktionsrate des Austauschs verändern?
    e. Wie können Sie die Gleichgewichtskonstante der chemischen Austauschreaktion bestimmen?
5.) Neben intramolekularem Austausch spielt auch intermolekularer Austausch eine Rolle. Geben Sie Beispiele.
6.) Im biochemischen Beispiel wird ein PPI (Peptidylprolylisomeraseassay) eingeführt. Was ist der Vorteil der chemischen Messung der Isomerisierung? Was ist der Vorteil der NMR-spektroskopischen Messung der Isomerisierung?

Kapitel 5: *Markierung*

1.) Welche Art von Markierung nutzt man in der NMR-Spektroskopie?
2.) Warum ist es vom Vorteil, ^{15}N, ^{13}C-markierte Proteine zu besitzen?
3.) Welchen zusätzlichen Vorteil bietet die Markierung mit ^{2}H?
4.) Welche Information kann man aus einem ^{1}H,^{15}N-HSQC erhalten?
5.) Diskutieren Sie am Beispiel der Konformationsanalyse des Proteinrückgrats auf der Basis von ^{3}J-Kopplungskonstanten, welche Vorteile Isotopenmarkierung bietet.
6.) Wie kann man nicht-kovalente Komplexe z.B. zwischen einem Protein und einer RNA untersuchen. Warum ist Isotopenmarkierung hier von Vorteil?
7.) Diskutieren Sie die Vor- und Nachteile der zellfreien Synthese zur Darstellung von isotopenmarkierten Verbindungen (steht nicht im Text).
8.) Was kann man mit Inteinexpressionprotokollen für NMR-spektroskopische Untersuchungen gewinnen (steht nicht im Text).
9.) Welche Parameter spielen für das S/N von NMR-Experimenten eine Rolle?

Kapitel 6: *2D NMR*

1.) In welcher Weise können Sie 2D-Spektren darstellen? Mit anderen Worten, welche Plots können Sie erstellen?
2.) Erklären Sie, wie eine zweite inkrementierte Zeit zustande kommt?
3.) Aufgrund welcher Wechselwirkung beobachten Sie Kreuzpeaks in den Experimenten COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, HSQC und HMBC?
4.) Sehen Sie in einem COSY Kreuzpeaks zwischen Spins von einer anderen Aminosäure? Wie sieht es bez. der gleichen Frage im HMBC aus?

5.) Wie unterscheidet sich das Vorzeichen des NOEs und des ROEs für kleine und für große Moleküle?
6.) Mit welchem Experiment können Sie die NMR-Resonanzen eines nicht-isotopenmarkierten Peptids zuordnen?
7.) Welche charakteristischen Kreuzpeaks im NOESY erwarten Sie für eine α-Helix und ein β-Faltblatt?

Kapitel 7: *Sekundärstrukturbestimmung mittels NOESY*

1.) Wie hängt die Intensität in einem NOESY-Spektrum vom Abstand zweier Protonen ab?
2.) Normalerweise bestimmen Sie keine absoluten Intensitäten in einem NOESY. Was machen Sie stattdessen, um die Intensitäten in einem NOESY in Abstände zu übersetzen?
3.) Diskutieren Sie anhand eines Helixwheels die charakteristischen Abstände in einer α-Helix.
4.) Zeichnen Sie ein paralleles und ein antiparalleles Faltblatt auf. Wie können Sie mittels NMR die beiden Faltblätter unterscheiden?
5.) Wie weit können zwei Protonen voneinander entfernt sein, so dass Sie immer noch einen NOESY-Kreuzpeak beobachten können?
6.) Im Kapitel ist in einer Abbildung die Identifizierung regulärer Sekundärstrukturelemente des 40 Aminosäure-langen Pheromons E2 gezeigt. Diskutieren Sie die Abbildung. In welcher Weise sprechen die einzelnen NMR-Messparameter für die getroffene Sekundärstrukturen
7.) Was kann man mittels des im Kapitel gezeigten Kontaktplots über die Länge und die Anordnung von Sekundärstrukturelementen aussagen?

Kapitel 8: *3D NMR-Spektroskopie an isotopenmarkierten Proteinen*

1.) Diskutieren Sie die Vorteile und Nachteile der Röntgenstrukturanalyse und der NMR-Spektroskopie. Denken Sie dabei an Größe der Systeme, Aussagen, Genauigkeit, Vielseitigkeit etc.
2.) Wie können Sie 3D und 4D NMR-Spektroskopie auf der Grundlage dessen, was Sie über 2D NMR-Spektroskopie wissen, verstehen?
3.) Was wird ein 3D-NOESY-^{1}H,^{15}N-HSQC-Experiment sein. Welche Art von Kreuzpeaks beobachtet man?
4.) Was ist der Vorteil eines 3D Experiments, was ist der Nachteil?
5.) Wie kann man mittels eines CBCANH und eines CBCA(CO)NH-Experimentes ein isotopenmarkiertes Protein zuordnen? Was ist der Unterschied (Vorteil) gegenüber der Zuordnung mittels homonuklearer Techniken z.B. über NOESY und COSY? Denken Sie dabei an die Abhängigkeit der Kreuzpeakintensität von der Sekundärstruktur im CBCANH Ansatz auf der einen und im NOESY/COSY Ansatz auf der anderen Seite.
6.) Versuchen Sie, die wesentlichen Schritte einer NMR-Strukturbestimmung zusammenzufassen.
7.) Was versteht man unter Präparation, Evolution, Mischung und Detektion?

Kapitel 9: *Molekulare Dynamik*

1.) Was versteht man unter Molekularen Dynamik?
2.) Nennen Sie einige Hauptanwendungen der Molekularen Dynamik?

3.) Beschreiben Sie die wesentlichen Terme des bei der Molekularen Dynamik verwendeten Kraftfelds?
4.) Diskutieren Sie das Lennard-Jones-Potential.
5.) Welche Dielektrizitätskonstante wird bei MD-Simulationen verwendet. Diskutieren Sie die Wahl von D. Ist das sinnvoll und warum?
6.) Was versteht man unter CHARMM, AMBER, CVFF?
7.) Was ist ein Monte-Carlo-Simulationsverfahren?
8.) Wie unterscheidet sich Monte-Carlo von einer ‚normalen' MD-Simulation?
9.) Was ist ein Simulated Annealing und in welcher Weise werden experimentelle NMR-Parameter in der Strukturberechnung genutzt?
10.) Durch welche Faktoren wird die MD-Simulation limitiert?

Kapitel 10: *Protein-Ligand-Wechselwirkungen*

1.) Wie können Sie die Bindung eines Liganden an ein Protein mittels NMR bestimmen?
2.) Was versteht man unter SAR by NMR?
3.) Weshalb ist es von Vorteil, für diese Experimente ^{15}N-markiertes Protein zu verwenden?
4.) Was ist der Vorteil, wenn man zwei allosterische Liganden finden kann, wenn man einen Wirkstoff entwickeln will?
5.) Diskutieren Sie die Vor- und Nachteile der SAR by NMR Methode.
6.) Warum ist der Begriff SAR by NMR missverständlich?
7.) Mit welchen Methoden kann man allgemein Protein-Ligand-Wechselwirkungen untersuchen? Was sind die Vorteile der NMR Methode?
8.) Was versteht man unter einem Transfer-NOE?

Kapitel 11: *Wasserstoffaustauschexperimente zur Untersuchung der Proteinfaltung mittels NMR-Spektroskopie*

1.) Mit welchen Methoden kann man prinzipiell die Kinetik der Proteinfaltung untersuchen? Wie sieht eine Stopped-Flow-Apparatur aus?
2.) Wie können Sie mittels NMR Proteinfaltung untersuchen?
3.) Was ist der Vorteil der Wasserstoffaustauschexperimente gekoppelt mit NMR?
4.) Was versteht man unter der intrinsischen Austauschrate eines Amidprotons?
5.) Erklären Sie das in Abbildung 1 abgebildete Experiment?
6.) Wie unterscheiden Sie die Austauschraten der Amidprotonen im Verlauf des Pulse-Labeling Experiments?
7.) Für das Beispiel Lysozym: Findet man kooperative Faltung? Wenn nicht, mit welchen einfachen Modell kann man die Faltung von Lysozym erklären? Was verstehen Sie unter parallelen Faltungswegen?

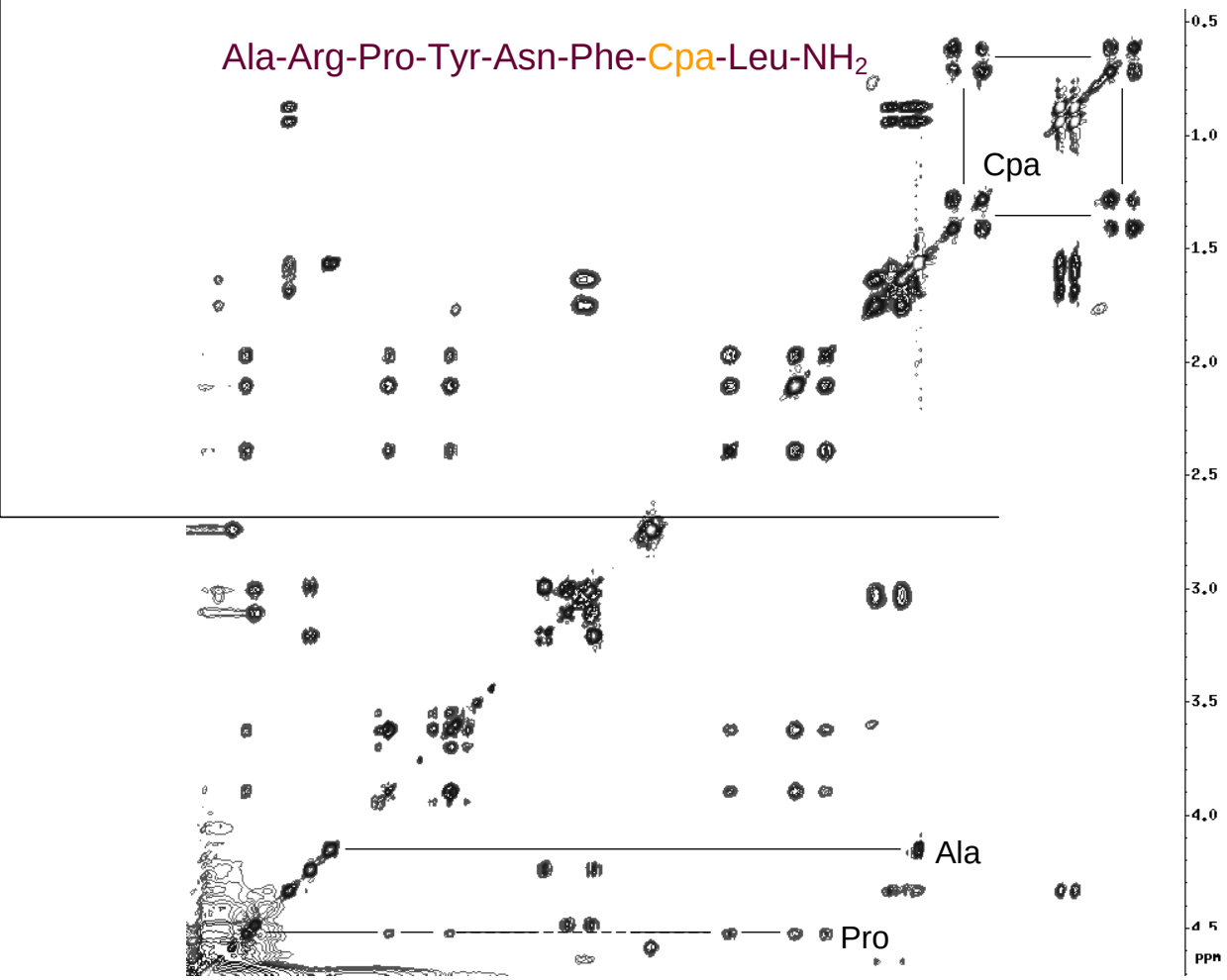
Kapitel 12: *In vivo NMR-Spektroskopie*

1.) Was versteht man unter MRI? Was versteht man unter functional MRI?
2.) Welche Anwendungen kann man sich für in-cell NMR vorstellen?
3.) Was ist ein HSQC-Spektrum?
4.) Welche Fragestellungen lassen sich besonders gut mit der *in-vivo* NMR untersuchen?
5.) Welche grundsätzlichen Probleme ergeben sich bei der *in-vivo* NMR im Gegensatz zur NMR in Lösung?

NMR-Grundlagen

Einleitung

Abbildung 0: NOESY Spektrum eines kleinen Peptides



Weshalb NMR?

In tabellarischer Form sollen einige der Bereiche, in denen NMR eine Rolle spielt, aufgelistet werden:

1.) Analytik: Konstitutionsnachweis und Konformationsanalyse von kleinen und mittelgrossen Molekülen, die synthetisiert und die isoliert wurden.
2.) Dynamik: Dynamische Prozesse können im Gleichgewicht und fern ab vom Gleichgewicht untersucht werden. Dabei können sehr unterschiedliche Zeitskalen der Dynamik untersucht werden.
3.) Strukturbestimmung von Proteinen, Oligonukleotiden, Komplexen, Polysacchariden

4.) Ligand-Protein-Wechselwirkung zur Aufklärung des Mechanismus von Reaktionen, zur Findung von allosterischen Wechselwirkungen, zum Screenen von Liganden
5.) Untersuchung von Proteinen in der Zelle
6.) Funktionalle Untersuchungen am Menschen zum Beispiel zur Untersuchung von Hirnaktivität (fMRI= functional Magnetic Resonance Imaging); Diagnostik z.B. von Krebs.

Viele Grundlagen der magnetischen Resonanzspektroskopie beruhen auf der Quantenmechanik. Diese soll hier nicht im Vordergrund stehen. Stattdessen sollen an einigen Versuchen und uns bekannten Phänomenen die Prinzipien der NMR-Spektroskopie näher gebracht werden, um dann mit den für die Aufklärung von Struktur und Dynamik wichtigen Messgrößen umgehen und sie in ihrer Aussagekraft einschätzen zu können. Die Erklärungen zum Stern-Gerlach-Versuch und zum Rabi-Versuch sind dem Lehrbuch von Feynman (Lectures on Physics, Band II, Kapitel 35) nachempfunden.

Der Stern-Gerlach-Versuch

Der Umstand, dass Elektronen und Kerne einen Eigendrehimpuls besitzen, ist erstaunlich. Die Welt wurde darüber von Frankfurt aus in Atem geschlagen: Stern und Gerlach wiesen 1922 den Eigendrehimpuls von Silberatomen nach. Abbildung 1 zeigt die Versuchsapparatur, die Stern und Gerlach im Physikalischen Institut aufgebaut haben:

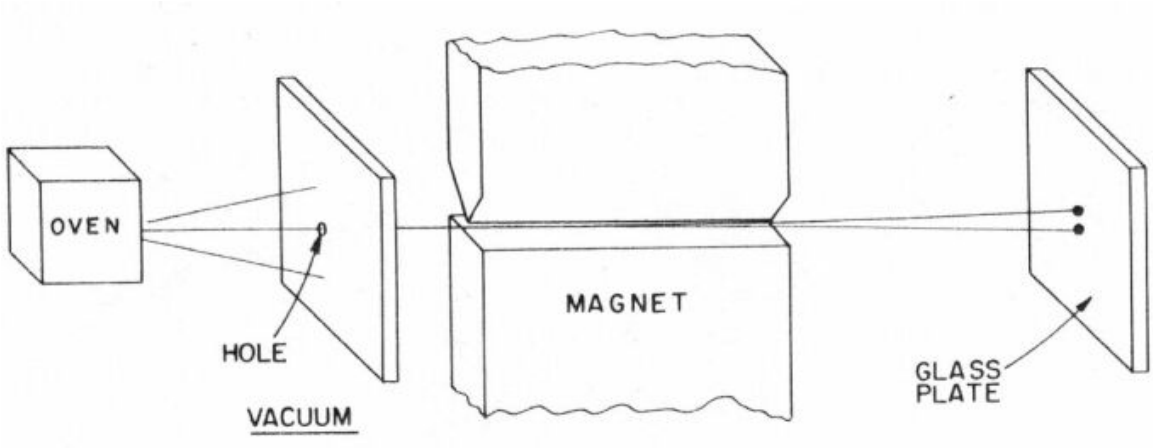


Abbildung 1: Das Experiment von Stern und Gerlach

In dieser Apparatur konnten die magnetischen Momente von Silberatomen gemessen werden. In einem Ofen wurde durch Verdampfung von Silber ein Atomstrahl von Silberatomen erzeugt. Einige dieser Silberatome wurden durch ein Loch herausgelassen. Dieser Strahl von

Silberatomen wird dann durch die Pole eines Magneten gelenkt. Wenn ein Silberatom ein magnetisches Moment μ besitzt (mit dem griechischen Buchstaben μ werden Magnete benannt), dann ist die Energie dieses magnetischen Moments klassisch gegeben durch das Produkt des magnetischen Moments μ und der Stärke des Magnetfelds, für eine Richtung z also $-\mu_z B$. Für alle beliebigen Richtungen ergibt sich die Energie ΔE im Magnetfeld zu $\Delta E = -\mu B \cos\theta$, wobei θ den Winkel zwischen dem Magnetfeld und der Orientierung des magnetischen Dipols beschreibt.

Wenn die Atome aus dem Ofen geschleudert werden, dann zeigen sie in alle Richtungen, θ ist also nicht bestimmt. Wenn wir annehmen, dass das Magnetfeld in dem Versuch sehr schnell in der z-Richtung variiert, mit anderen Worten, wenn das Magnetfeld sehr inhomogen ist, dann hängt die magnetische Energie ΔE von der Position des Atoms im Magnetfeld ab. Je nachdem, ob $\cos\theta$ positiv oder negativ ist (also ob θ größer oder kleiner als 90° ist), werden die Atome entweder nach oben oder nach unten gezogen.

Im Versuchsaufbau von Stern und Gerlach wurde ein stark inhomogenes Magnetfeld aufgebaut. Ein Silberatom, dessen magnetischer Dipol genau horizontal zur Richtung der Inhomogenitätslinien eingerichtet ist ($\cos\theta=0$), würde keine Kraft verspüren, ein Atom, das genau vertikal orientiert ist ($\cos\theta = +1$ oder -1) , würde nach oben oder nach unten gezogen. Die Atome, die aus dem inhomogenen Magnetfeld herausfliegen, sollten eigentlich gemäß ihrer Orientierung in alle Richtung verteilt aus dem Magnetfeld herausfliegen, man sollte auf dem auffangenden Bildschirm einen Punkt beobachten, dessen Intensitätsabfall etwas mit $\cos\theta$ zutun haben sollte, da klassisch alle Orientierungen θ gleich wahrscheinlich sind.

Statt eines Punkts fanden Stern und Gerlach *zwei* Punkte. Der Abstand der Punkte hängt von der Stärke des Magnetfeld B ab. Dieses Experiment war überraschend: Woher wissen die Atome, das sie nur zwei Richtungen einnehmen dürfen? Das Experiment stellt den ersten Nachweis der Quantisierung der magnetischen Momente dar. Es ist ein experimenteller Fakt, dass die Energie eines Atoms eine Reihe von Werten annehmen kann, es ist experimenteller Fakt, dass es halbzahlige und ganzzahlige ***Spins*** gibt.

Dass Spins existieren, ist erstaunlich, und nicht erklärlich. Aber wir haben uns schon lange daran gewöhnt. Die Elemente in unserem Periodensystem klassifizieren wir nach ihren Hauptquantenzahlen (n=1,2,3, etc), nach Nebenquantenzahlen (oder auch Bahndrehimpulsquantenzahlen) (s,p,d,f, etc) sowie den magnetischen Spinquantenzahlen ($m_s=\pm1$), wir haben das als Eigendrehimpuls des Elektrons um die eigene Trägheitsachse akzeptiert und nach der Hundschen Regel wissen wir, dass sich Elektronen zumindest in ihrer magnetischen Spinquantenzahl unterscheiden müssen.

Auch Atomkerne besitzen eine solche magnetische Spinquantenzahl, sie besitzen ein magnetisches Moment (experimentell auch von Stern, nicht aber Gerlach, in den 30er Jahren das erste Mal genau nachgewiesen). Die Energieunterschiede zwischen den Energieniveau von Spins nehmen diskrete Werte. Das ist zwar erstaunlich, aber daran haben wir uns nach der Formel $\Delta E=h\nu$ schon gewöhnt. Isaac Rabi ist es 1943 an der Columbia-University in New York zum ersten Mal gelungen, Übergänge zwischen den Energieniveau anzuregen und damit genau einen Wert für ΔE zu bestimmen.

Der Rabi-Experiment

Wie im Stern-Gerlach-Experiment baut Rabi eine Apparatur mit einem Ofen auf, von dem aus Atome ausströmen (Abbildung 2).

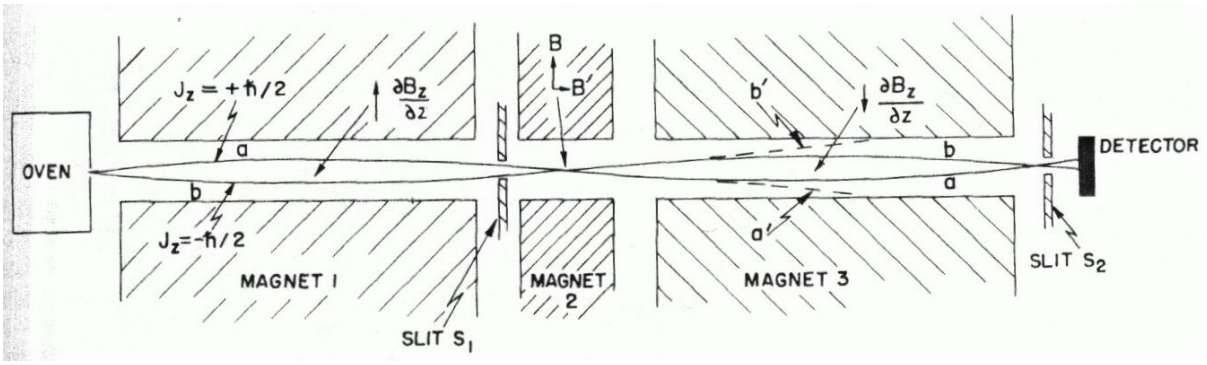


Abbildung 2: Die Rabi-Versuchsapparatur zur Messung des energetischen Übergangs $\alpha-\beta$.

Diese Atome fliegen nun durch drei verschiedene Magnete. Magnet 1 ist ein Magnet, wie ihn Stern und Gerlach gebaut hatten. Nehmen wir an, dieser Magnet 1 besitzen ein inhomogenes Magnetfeld, dass positiv orientiert ist (wie in Abbildung 2 angenommen). Die magnetischen Momente der Atome werden also im magnetisch inhomogenen Feld aufspalten. Der Magnet 2 ist homogen und kommt gleich ins Spiel. Keine Kräfte wirken auf die Atome und sie fliegen weiter wie bisher. Magnet 3 ist genauso inhomogen wie Magnet 1, nur genau umgekehrt gepolt. Das inhomogene Magnetfeld ist hier dann negativ orientiert. Magnet 1 und 3 werden so justiert, dass die Intensität an dem Detektor aufgenommenen Atomen maximal ist.

Im Magnetfeld 2 befindet sich eine Spule, mit deren Hilfe ein kleines transversales (also zur z-Richtung orthogonales) Magnetfeld erzeugt werden kann. Die Frequenz des elektro*magnetischen* Feldes kann variiert werden. Zwischen den Polen des Magnetfelds 2 befindet sich ein starkes konstantes vertikales Magnetfeld B_0 und ein schwaches, oszillierendes und horizontales Magnetfeld B'. Abbildung 3 zeigt die Detektion des

Atomsstrahls in Abhängigkeit der Frequenz des transversalen Feldes B'. Bei einer gewissen Frequenz wird die Resonanzbedingung für den Übergang zwischen α und β getroffen. Also werden Übergänge zwischen den beiden Niveaus angeregt. Tritt Resonanz auf, dann werden die Atome aus ihrer Bahn geworfen, damit werden bei der Resonanzfrequenz weniger Atome detektiert als sonst (Abbildung 3). Mit anderen Worten kann die Energie, die nötig ist, um ein atomares magnetisches Moment anzuregen, gemessen werden.

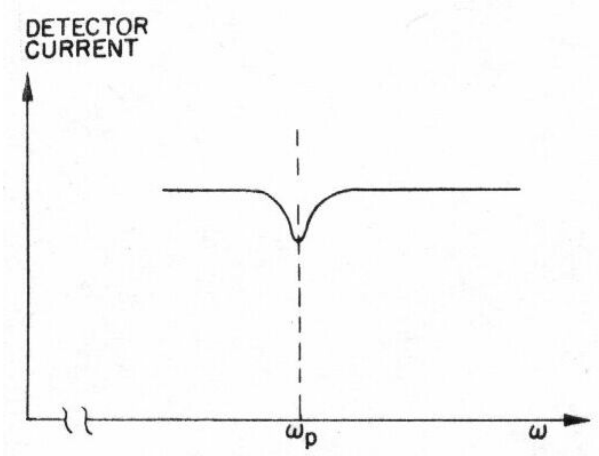


Abbildung 3: Die auf dem Detektor registrierten Atomkerne als Funktion der Frequenz des transversalen Magnetfelds.

Ein wenig Spinquantenmechanik

Der Spin von Atomen, Elektronen und Atomkernen ist zunächst ein experimentelles Faktum. Wir bezeichnen den Spin mit dem Zeichen $\vec{I}$. Man kann mathematisch zeigen, dass der Spin $\vec{I}$ dem magnetischen Moment $\vec{\mu}$ proportional ist. D.h., dass Spin $\vec{I}$ und $\vec{\mu}$ entweder parallel oder antiparallel zueinander stehen. Es gibt eine Proportionalitätskonstante γ, das gyromagnetische Verhältnis (eigentlich müsste man magnetogyrisches Verhältnis sagen):

$$\vec{\mu} = \gamma\hbar\vec{I}$$

Das magnetische Moment von Spins orientiert sich ähnlich wie eine Magnetfeldnadel entlang einem Magnetfeld. γ kann entweder größer (parallele Ausrichtung von $\vec{I}$ und $\vec{\mu}$) oder kleiner (antiparallele Ausrichtung von $\vec{I}$ und $\vec{\mu}$) als null sein. Im weiteren gehen wir davon aus, dass γ größer als null ist. Dann ist die parallele Orientierung von $\vec{\mu}$ und $\vec{I}$ energetisch bevorzugt. Im Gegensatz zu einer Magnetfeldnadel, die jede beliebige Orientierung in bezug auf das

einwirkende Magnetfeld einnehmen kann, haben wir von Stern und Gerlach gelernt, dass Spins nur eine limitierte Zahl von Zuständen einnehmen können. Es gibt Spins mit halbzahligem und Spins mit ganzzahligem Spin (das ist die merkwürdige Beobachtung von Stern und Gerlach). Es gibt 2I+1 Zustände, also für I=1/2 zwei Zustände (m_z=±1/2), für I=1 drei Zustände (m_z=-1,0,1).

Jetzt berechnen wir die Energie eines Spins im Magnetfeld. Wir hatten weiter oben schon eingeführt:

$$E = -\vec{\mu}\vec{B} = -\gamma\hbar\vec{I}\vec{B} = -\gamma\hbar I_z B_{0z}$$

Das äußere Magnetfeld B_0 ist hier parallel zur z-Achse orientiert. Für Spins mit I=1/2 heisst der energetisch günstigere Zustand $\langle I_z\rangle = m_z = +1/2$ α-Zustand und der energetisch ungünstigere Zustand $\langle I_z\rangle = m_z = -1/2$ β-Zustand (Abbildung 4).

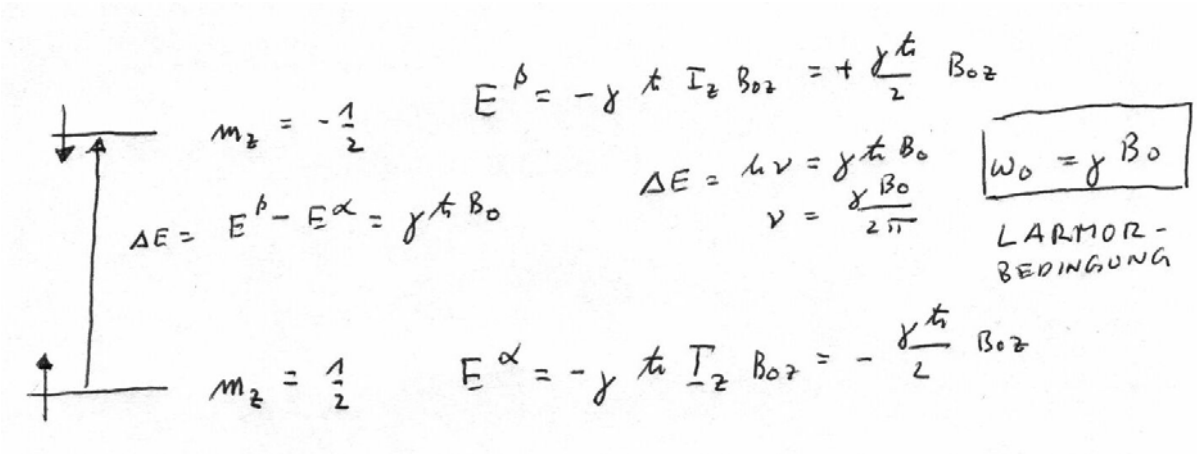


Abbildung 4: Energieniveau für ein Spin ½-Teilchen

Wir rechnen nun die Energien für die beiden Niveaus aus, die Energiedifferenz zwischen beiden Niveaus (und lassen irgendwann den Subskript z wegfallen):

$$E^\alpha = -\gamma\hbar(\tfrac{1}{2})B_{0z}; E^\beta = -\gamma\hbar(-\tfrac{1}{2})B_{0z}$$
$$\Delta E = E^\beta - E^\alpha = \gamma\hbar B_0$$

Wir wollen jetzt die Energiedifferenz zwischen α- und β-Niveau in der Kreisfrequenz ω ausrechnen:

$$\Delta E = h\nu = \gamma\hbar B_0; \nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}; 2\pi\upsilon = \omega_0 = \gamma B_0$$

Die Gleichung $\omega_0 = \gamma B_0$ nennt man die Larmorgleichung der NMR-Spektroskopie. Sie gibt an, bei welcher Kreisfrequenz Resonanz, also Energieübergänge zwischen dem α-Zustand

und dem β-Zustand, erreicht werden kann. Diese Kreisfrequenz wurde von I. Rabi in New York 1943 gemessen.

An dieser Stelle soll auch die Energiedifferenz zwischen dem α-Zustand und dem β-Zustand eines Protons (γ_H=2.675·10^{8}HzT^{-1}) bei einem Magnetfeld von T=14.09T berechnet werden:

$$\Delta E = N_L \gamma \hbar B_0 = 240 mJ / mol$$

Die thermische Energie bei Raumtemperatur ist gegeben durch RT=2.3kJ/mol (!). D.h., dass der Energieunterschied der beiden NMR-Zustände bei Raumtemperatur 10^{-4} kleiner ist als die thermische Energie, die beiden Spinniveaus sind bei Raumtemperatur nahezu gleich besetzt.

Wichtige Kernspins

Atome mit einem Kernspin von I=1/2 sind die wichtigsten Kerne für die NMR-Spektroskopie. Eigenschaften, die man kennen muss, sind das gyromagnetische Verhältnis γ und die natürliche Häufigkeit in % eines Isotopen. Es gibt Reinisotope (z.B. ^{31}P und ^{19}F) und Elemente, für die es mehrere verschiedene Isotope gibt. Die bekannten Isotope des Wasserstoffs sind ^{1}H (99% natürliche Häufigkeit, NMR-Spektroskopiker nennen das falscherweise Proton) und ^{2}H, das Deuteron. Für ‚Biomakromoleküle' sind noch wichtig ^{15}N (0.4% natürliche Häufigkeit) und ^{13}C (1.1% Häufigkeit).

OZ	Isotop	Spin I	nat. Häufigk.	γ [10^{8}HzT^{-1}]
1	^{1}H	½	99.99	2.675
1	^{2}H	1	0.01	0.411
6	^{13}C	½	1.11	0.673
7	^{15}N	½	0.37	-0.724
9	^{19}F	½	100	2.518
15	^{31}P	½	100	1.084
8	^{17}O	5/2	0.04	-0.363

OZ: Ordnungszahl

Für ^{1}H ergibt sich für ein Magnetfeld B_0 von 14.09T eine Resonanzfrequenz ν=14.09T·2.675·10^{8}HzT^{-1}~600MHz, wir sprechen also bei der Klassifizierung unserer NMR-Spektrometer von Frequenzen (und nicht Kreisfrequenzen ω und nicht Magnetfeldstärken).

Das Vektormodell

(Die folgenden Dinge können vertieft in Malcolm Levitt's Buch: Spin Dynamics sowie in Peter Hore's Buch: Nuclear Magnetic Resonance nachgelesen werden).

Der Drehimpuls eines rotierenden Objekts ist ein Vektor. Die Richtung des Vektors ist entlang der Achse, um die das Objekt rotiert. Klassisch kann ein solcher Vektor in alle Richtungen zeigen. Der Drehimpuls eines Spins ist auch ein Vektor. Der Drehimpulsvektor des magnetischen Moments des Spins und des Spins selbst sind wie oben gesagt (aber nicht abgeleitet) parallel: $\vec{\mu} = \gamma\hbar\vec{I}$.

Aufgrund quantenmechanischer Überlegungen können wir zwei Dinge bez. eines Atomspins messen: Wir können die Länge des Vektors messen und die Projektion des Vektors auf eine Achse, normalerweise die z-Achse (Abbildung 5):

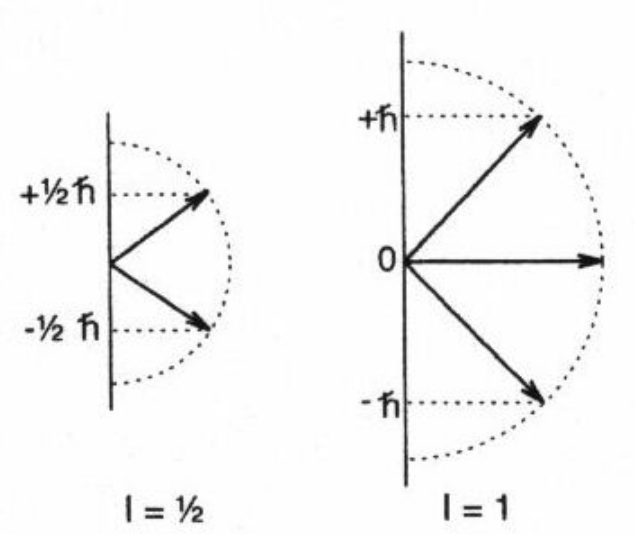


Abbildung 5: Die Beziehung zwischen dem magnetischen Feld B, dem magnetischen Moment $\vec{\mu}$ und der Komponente des magnetischen Moments entlang der z-Achse μ_z.

Aufbauend auf diesen quantenmechanisch korrekten Aussagen kann man ein anschauliches Modell entwickeln, das Vektormodell, mit dessen Hilfe eine Menge NMR verstanden werden kann. Das Modell darf man nicht überstrapazieren, denn gewisse Eigenschaften der Spins, z.B. die skalare J-Kopplung zwischen Spins, können nicht wirklich erklärt werden.

Spin-1/2-Teilchen existieren im starken magnetischen Feld in zwei möglichen Orientierungen mit gleichen, aber entgegengesetzten Projektionen auf die Quantisierungsachse z. Bezüglich der beiden anderen Achsen x und y sind die Phasen der individuellen magnetischen Momente unbestimmt, zufällig, ihre Vektorsumme verschwindet. Dies kann man in zwei Kegeln symbolisieren, die sich dadurch auszeichnen, dass die Projektion auf die z-Achse konstant ist

und dass die Lage des Vektors in der x,y-Achse unbestimmt ist (Abbildung 6). Nun interessiert uns für die Durchführung eines Experiments nur die Überschußmagnetisierung im thermischen Gleichgewicht, wir können also einen Vektor Mz ‚erzeugen', der die Überschußmagnetisierung symbolisiert und gegeben ist durch M^{β}-M^{α}=M_z. Die Magnetisierung einer großen Zahl von Spins in einer NMR-Probe ist eine durch die Boltzmann-Verteilung (s.o.) gegebene Größe, M_z. Auch wenn die einzelnen Spins quantenmechanische Größen sind, kann man die Summe aller Spins über die NMR-Probe, das Ensemble der Spins, für einfache Experimente (1D, T_1-Relaxation, T_2-Relaxation) mit Regeln der klassischen Mechanik beschreiben, deshalb ist das Vektormodell anschaulich und ein guter Einsteig in das Verständnis von NMR-Experimenten.

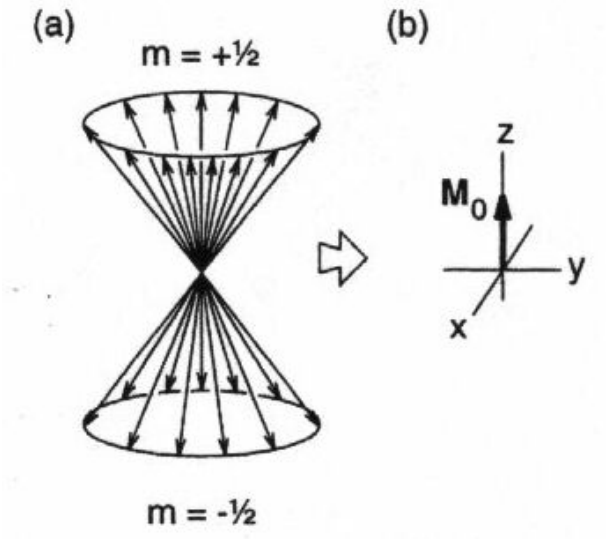


Abbildung 6: Vektormodell für ein Ensemble von Spin-1/2-Kernen im thermischen Gleichgewicht in einem Magnetfeld B_0 entlang der z-Achse.

Das 1D Experiment

Wir wollen ein 1D-NMR-Experiment erklären. Wir stellen uns vor, wir haben eine NMR-Probe, deren Protonenspektrum aus einem einzigen Spin besteht, z.B. Chloroform, $CHCl_3$. Wir können die Resonanzfrequenz des Protons des Chloroforms schon ziemlich genau nach der Larmorfrequenzformel berechnen. Die Formel gibt die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung an, mit der wir einen Übergang zwischen den beiden Spinzuständen induzieren können. Nach dem Vektormodell haben die Spins keine definierte Phase entlang der transversalen Achsen. Man sagt, die Spins präzidieren mit der Larmorfrequenz $\omega_0 = \gamma B_0$ um die z-Achse (dieses Bild ist quantenmechanisch wohl nicht ganz korrekt), d.h. also mit $\gamma B_0 / 2\pi$ Umdrehungen pro Sekunde. Je größer also das Feld B_0 und je höher das

gyromagnetische Verhältnis γ, desto so schneller drehen sich die Spins. In einem NMR-Experiment reagieren die Spins auf die Wechselwirkung mit zwei magnetischen Felder, dem starken statischen Magnetfeld B_0 (z.B. 14T) und einem oszillierenden (also zeitlich abhängigen), senkrecht auf B_0 stehenden, transversalen Magnetfeld $B_1(t)$ (in der Größenordnungen einiger Millitesla). Das Gesamtfeld ist also gegeben durch die Vektorsumme von B_0 und $B_1(t)$.

Es ist nun schwierig, sich die Bewegung der Magnetisierung um ein Feld herum vorzustellen, das sich selbst bewegt. Deshalb vereinfachen wir die Betrachtung, indem wir uns selbst als mit der Larmorfrequenz bewegend vorstellen. Dies nennt man das rotierende Koordinatensystem (im Gegensatz zum Laborsystem, in dem wir nur starr zuschauen). Die Analogie ist die eines Karussells: Man kann entweder dem Treiben auf dem Karussell von außen zuschauen: dann drehen sich die Kinder und man sieht sie manchmal. Oder man kann auf dem Karussell mitfahren und Kind und Betrachter bewegen sich relativ zueinander nicht.

Wie wird die Transformation ins rotierende Koordinatensystem tatsächlich bewerkstelligt? Dies soll in einer Nebenbetrachtung jetzt abgeleitet werden.

Transformation ins rotierende Koordinatensystem.

Das oszillierende transversale Magnetfeld $B_1(t)$ ist eine elektromagnetische Schwingung. Diese Schwingung ist linear polarisiert, d.h. die elektromagnetische bewegt sich in eine Richtung (sie propagiert) und schwingt senkrecht zu dieser Propagationsrichtung auf und ab. Die magnetische Komponente dieser Schwingung wird beschrieben durch:

$$\begin{aligned} B_1(t) &= 2B_1 \cos\left(\omega_{rf} t + \phi\right)\vec{i} \\ &= B_1 \cos\left(\omega_{rf} t + \phi\right)\vec{i} + B_1 \sin\left(\omega_{rf} t + \phi\right)\vec{j} \\ &+ B_1 \cos\left(\omega_{rf} t + \phi\right)\vec{i} - B_1 \sin\left(\omega_{rf} t + \phi\right)\vec{j} \end{aligned}$$

wobei B_1 die Amplitude der elektromagnetischen Schwingung ist, ω_{rf} die Kreisfrequenz, ϕ die Phase des Feld und $\vec{i}$ und $\vec{j}$ Einheitsvektoren entlang der x- und y-Achse darstellen. Die mathematische Umformung, die dem zweiten Teil der Gleichung zugrunde liegt, ist in Abbildung 7 noch einmal dargestellt. Man kann jede linear polarisierte elektromagnetische Schwingung in zwei zirkular polarisierte Schwingungen zerlegen, die beiden Darstellungen gehen durch Vektorsummenbildung ineinander über. Die beiden Vektoren, die die zirkular polarisierte Schwingung darstellen, rotieren mit entgegen gesetzter Rotationsfrequenz. Die mit der richtigen Kreisfrequenz ω_{rf} rotierende Komponente tritt nun in Wechselwirkung mit

Magnetisierung entlang z, während die in Gegenrichtung ($-\omega_{rf}$) rotierende Komponente die Spins nur mit (B_1/B_0^2) in Wechselwirkung tritt, was eine sehr kleine Zahl darstellt. (Im Bild des Kreisel: Die Beobachter spalten sich auf, der eine läuft richtig rum mit der Drehrichtung des Kreisels, der andere läuft falsch rum; letzterer sieht noch weniger vom Kind).

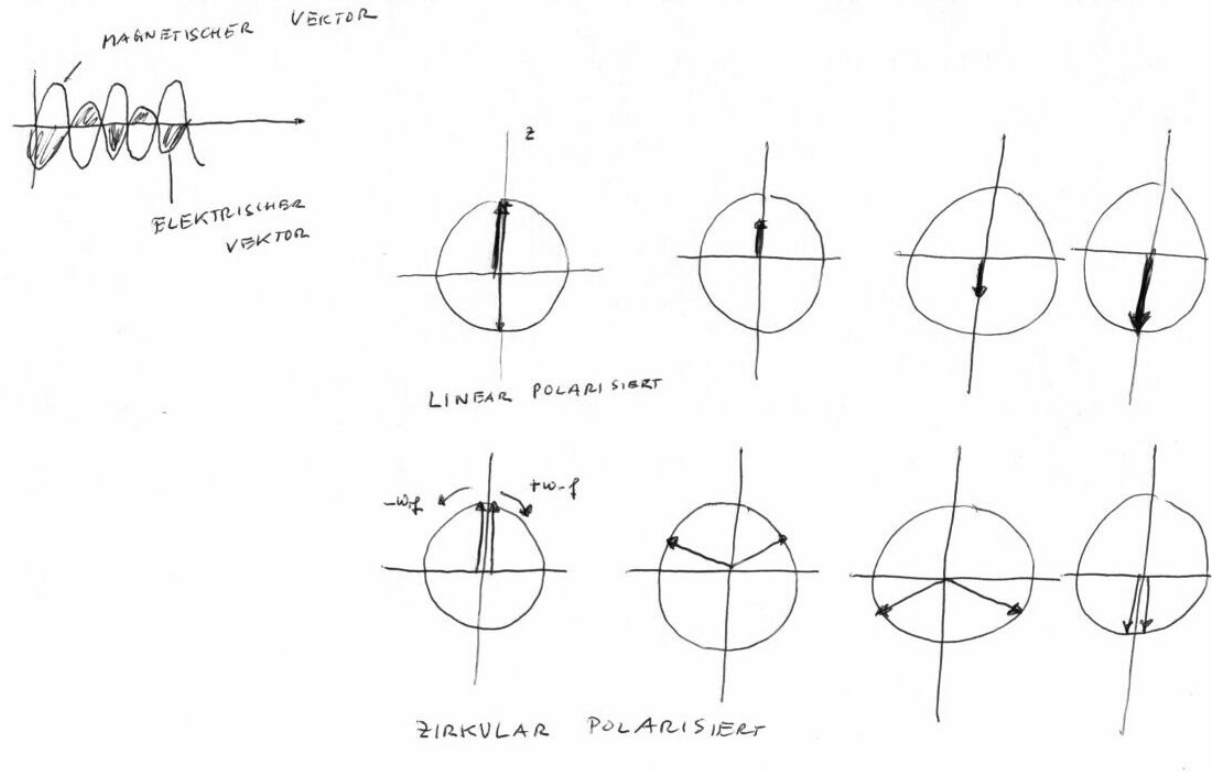


Abbildung 7: Die Zerlegung einer linear polarisierten Schwingung in zwei zirkular polarisierte Komponenten.

Durch die Transformation ins rotierende Koordinatensystem ist die Magnetisierung statisch, d.h. die Magnetisierungsvektoren und das elektromagnetische Feld besitzen keine Relativbewegung. Deshalb spürt im rotierenden Koordinatensystem die Magnetisierung nur das transversale B_1-Feld. Die Magnetisierung M_z dreht sich unter der Einwirkung des transversalen B_1-Feld aus der x-Richtung in der y,z-Ebene (Abbildung 8).

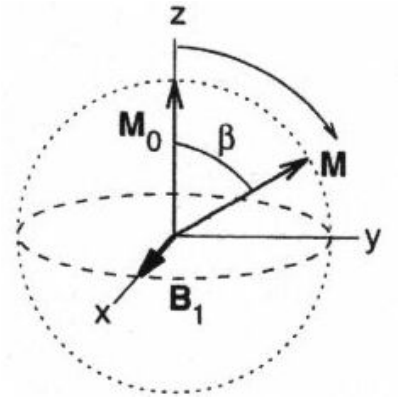


Abbildung 8: Die Wirkung eines Radiofrequenzpulses auf die Magnetisierung entlang z.

Wir wollen das Gesagte nochmal zusammenfassen: Die Magnetisierung kann also mit drei kartesischen Komponenten M_x, M_y, and M_z beschrieben werden. Kurze Radiofrequenzimpulse (die kurze Einwirkung einer elektromagnetischen Schwingung) kann senkrecht zum externen Magnetfeld angelegt werden.

Im Gleichgewicht ist die Magnetisierung entlang der z-Achse. Anwendung eines rf-Feldes der Länge τ_p und der Stärke γB_1 entlang der x-Achse induziert eine Präzessionsbewegung der Magnetisierung in der y,z Ebene mit einer Kreisfrequenz $\omega_1=-\gamma B_1$. Wir führen einen Flipwinkel $\beta_p = 2\gamma B_1 \tau_p$ ein, wobei τ_p die Dauer des Pulses in Sekunden ist und β_p in Radian gemessen wird. Die gebräuchlichsten Pulse sind 90°- und 180°-Pulse. Ein 90°-Puls aus x macht aus M_z-Magnetisierung $-M_y$-Magnetisierung, ein 180°-Puls macht aus M_z-Magnetisierung $-M_z$-Magnetisierung (siehe Abbildung 8, in der Abbildung wurde ein –x-Puls angewendet). Der Flipwinkel hängt also von der Amplitude B_1 des transversalen Impulses ab, typischerweise hat ein 90°-Puls ein Länge von 10μs.

Eine wichtige Voraussetzung für die Fourier-Transform-NMR-Spektroskopie ist die Möglichkeit, einheitlich und gleichzeitig Kerne mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung anzuregen. Für eine Dispersion von 6 kHz (Die Protonen kommen über 10ppm zur Resonanz und 1ppm ist gerade 600 Hz bei 600 MHz) muss eine Feldstärke $\gamma B_1/2\pi >> 6$kHz erreicht werden.

Nach der Anwendung eines 90°-Puls aus x-Richtung ist die Magnetisierung ist entlang der –y-Achse. Wir wollen im folgenden zunächst verstehen, was man mit $-M_y$-Magnetisierung eigentlich erzeugt hat im Sinne des Vektorbilds. Dann gehen wir darauf ein, wie wir mathematisch diese Magnetisierung beschreiben können.

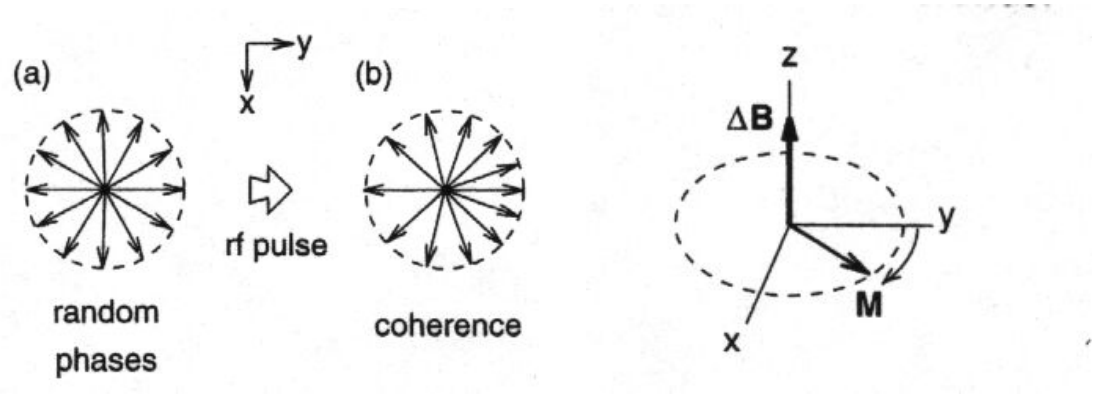


Abbildung 9: Der Effekt eines Radiofrequenzpulses auf die magnetischen Momente der einzelnen Spins einer NMR-Probe (Wir sehen von z aus auf die Probe).

Im Gleichgewicht ist die Phase der einzelnen Vektoren in der x,y-Ebene unbestimmt. Die Gleichgewichtsmagnetisierung ist entlang der z-Achse. Ein Puls erzeugt eine Ungleichgewichtssituation. Die Phase der einzelnen Vektoren wird in der x,y-Ebene ‚gebündelt', diese Bündelung – alle Vektoren zeigen in eine Richtung -, d.h. die Korrelation der einzelnen Phasen nennt man Kohärenz. Ausserdem ist nach einem 90°-Puls die M_z-Komponente der Magnetisierung verschwunden. Der Wiederaufbau einer Gleichgewichtssituation, die Relaxation der Spins, wird weiter unten beschrieben, es handelt sich um sogenannte T_1- (longitudinale) und T_2- (transversale) Relaxation.

Jetzt wird beschrieben, wie sich die Magnetisierung ‚entwickelt' nach Abschalten des Pulses. Wir haben transversale Magnetisierung erzeugt. Das einzige Magnetfeld, das nach Abschalten des Pulses noch vorhanden ist, ist das statische Magnetfeld B_0. Die transversale Magnetisierung $-M_y$ steht senkrecht zur z-Richtung des statischen Magnetfeld B_0. D.h. die Magnetisierung wird im Laborsystem mit der Larmorfrequenz beginnen zu oszillieren, im rotierenden Koordinatensystem mit einer Frequenz, die wir chemische Verschiebung nennen und deren Ursprung unten eingeführt wird.

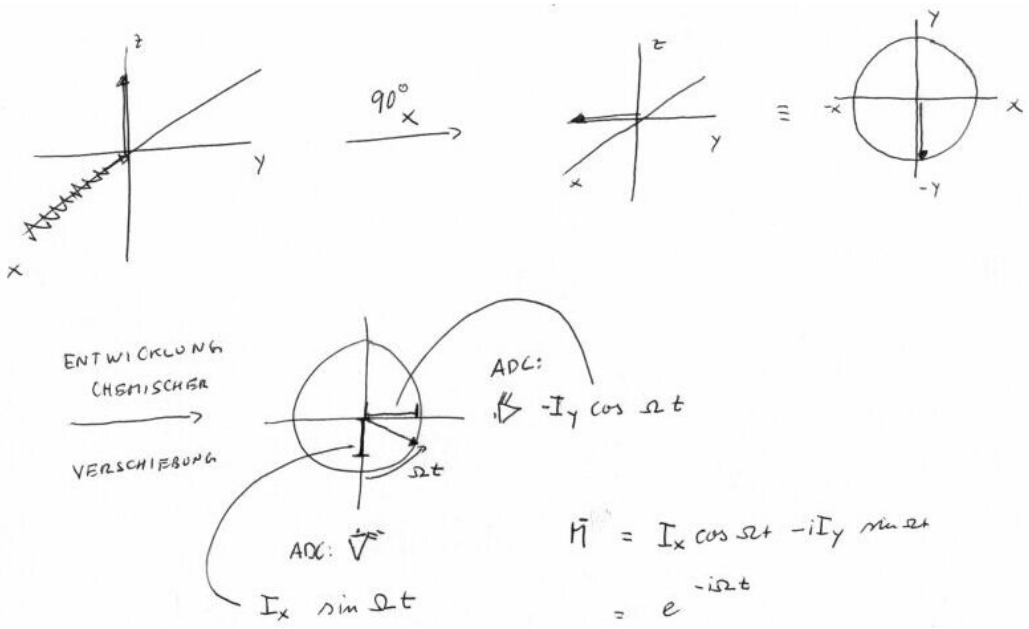


Abbildung 10: Die Magnetisierung präzediert um die z-Achse. Nach einer Zeit kann die Magnetisierung in ihre Komponenten entlang x und y zerlegt werden. Ein phasenempfindlicher Detektor (aus zwei orthogonalen Richtungen) detektiert die beiden Komponenten der Magnetisierung.

Ein phasenempfindlicher Detektor (siehe Abbildung 10) detektiert die beiden Komponenten der Magnetisierung und speichert diese getrennt ab. Danach wird ein komplexes Signal der Form $\exp(i\Omega t) = \cos(\Omega t) + i\sin(\Omega t)$ durch Addition der Komponente des ersten Detektors A und der mit i multiplizierten Komponente des zweiten Detektors B abgespeichert. Ein solches Signal kann Fourier-transformiert werden.

Fouriertransformation (siehe auch Kap. 2)

Wenn wir nur die Komponente des ersten Detektors A anschauen, dann detektieren wir ein oszillierendes Signal $M_y(t) = A\cos\Omega t$ (A ist die Amplitude der Schwingung). Die Fouriertransformation wird durch folgendes Integral beschrieben:

$$I(\omega) = \int_0^\infty My(t)\cos(\omega t)dt$$

Dieses mathematisch abschreckende Integral kann man sich eigentlich einfach verständlich machen (Abbildung 11). Wir multiplizieren das oszillierende Signal $M_y(t) = A\cos\Omega t$ mit cos-Funktionen: $\cos\omega t$. Somit erhalten wir $A\cos\Omega t \cdot \cos\omega t$. Für $\omega \neq \Omega$ gilt: die Funktion oszilliert zwischen negativen und positiven Werten. Wenn man von $0 \leq t \leq \infty$ integriert, ist das Integral gleich null. Für $\omega=\Omega$ erhält man $A\cos^2\Omega t$, diese Funktion ist immer positiv und normiert, so dass das Integral $I(\omega)$ proportional zur Amplitude A ist. Die Fouriertransformation unserer von einem Detektor aufgenommenen Komponente $A\cos\Omega t$ ist, da wir von 0 bis ∞ integrieren, überall ausser für $\pm\Omega$ null. Dass man neben einem Wert für $+\Omega$ auch einen Wert bei $-\Omega$ erhält, liegt an dem Umstand, dass die Cosinusfunktion eine gerade Funktion ist, für die gilt: $f(x)=f(-x)$. Hätten wir die Komponente des zweiten Detektors aufgenommen, dann hätten wir eine Sinusfunktion erhalten. Sinusfunktionen sind ungerade für die gilt $f(x)=-f(-x)$. Kombination beider Komponenten zu einem komplexen Signal $e(i\Omega t)$ liefert die Vorzeichenunterscheidung.

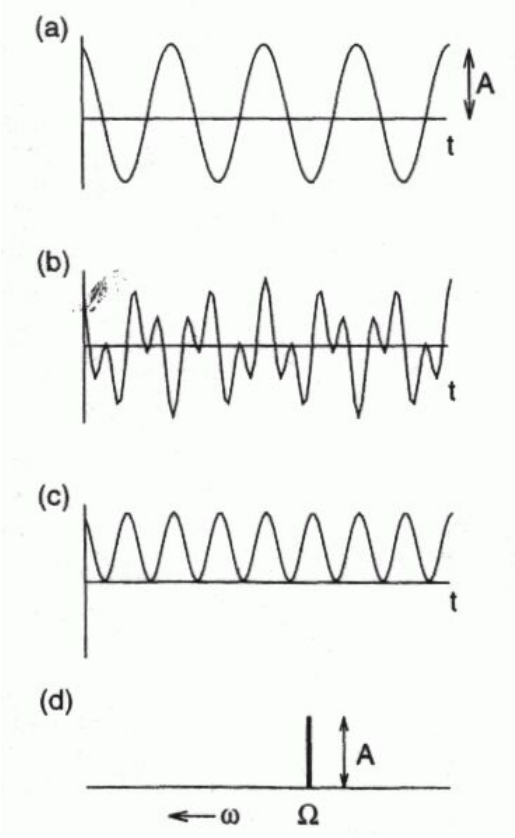


Abbildung 11: Eine bildliche Darstellung der Fouriertransformation. (a) Die oszillierenden Schwingung, wie sie in Detektor 1 aufgezeichnet wird. (b) Das Produkt des detektierten Signals mit einer $\cos\omega t$. Für $\omega \neq \Omega$ gilt: Das Integral ist null. (c) Das Produkt des detektierten Signals mit einer $\cos\omega t$. Für $\omega=\Omega$ findet man Signale bei den Frequenzen $\omega=\pm\Omega$, die Intensität des Signals ist proportional zur Amplitude, die im Detektor 1 aufgezeichnet wurde.

Bisher sind wir immer von einem Spin ausgegangen. Nun wollen wir einen zweiten Spin einführen. Dieser zweite Spin soll eine andere chemische Verschiebung haben, d.h. er kommt an einer anderen Stelle in unserem Spektrum zur Resonanz. Wir werden dann also in unserem ersten Detektor eine Überlagerung (die Summe) zweier Cosinusfunktionen detektieren, die wir daraufhin Fourier-transformieren müssen, um die einzelnen Frequenzen zu rekonstituieren.
Die Fouriertransformation ist eine lineare Operation. D.h. es gilt:

$$FT\left[f(t)+g(t)\right]=FT\left[f(t)\right]+FT\left[g(t)\right]$$

Mit anderen Worten heißt das, jedes Signal $A_i \cos\Omega_i t$ gibt eine Linie mit der Amplitude A_i bei der Frequenz Ω_i.

Weshalb Fouriertransformation?

Spektroskopie wird häufig so eingeführt, dass man mit einer einzigen Wellenlänge in den Energieunterschied einstrahlt. So wurde auch bei der NMR-Spektroskopie angefangen. Man strahlt mit sogenannter kontinuierlicher Einstrahlung (continuous wave=CW) das gesamte Spektrum ab. Nehmen wir an, wir hätten zehn verschiedene Spins, dann muss man 10 verschiedene Experimente machen.
Prof. Ernst hat den Nobelpreis dafür bekommen, diesem mit einer steigenden Anzahl von Spins etwas umständlichen Verfahren ein besseres entgegenzustellen. Man regt mit einem kurzen und starken Puls (hohes B_1-Feld, siehe oben) das ganze Spektrum an und misst mit zwei Detektoren die Überlagerung aller Spins. Die Fouriertransformation extrahiert dann die einzelnen Schwingungen heraus. Dieser Vorteil der gleichzeitigen Anregung aller Resonanzen nennt man den Multiplex- oder Fellgettvorteil.

Relaxation

Wir wollen jetzt diskutieren, wie die Ungleichgewichtsmagnetisierung, die man durch die Anwendung eines Pulses erzeugt hat, wieder zurück ins Gleichgewicht kommt. Hier unterscheidet man zwei unterschiedliche Prozesse: Longitudinale Relaxation und transversale Relaxation.

Longitudinale Relaxation

Longitudinale Relaxation (T_1-Relaxation, Spin-Gitter-Relaxation) beschreibt den (Wieder)aufbau der z-Magnetisierung, also der Magnetisierung, die parallel zum äußeren B_0-Feld ist. Man beobachtet T_1-Relaxation, wenn man eine Probe in ein Magnetfeld hinein bringt und nach der Anregung transversaler Magnetisierung, also Auslenkung der Magnetisierung von der z-Achse. Diskutieren wir erst den ersten Fall: Nehmen wir an, wir haben eine Ensemble von Atomkernen, von denen jeder ein magnetisches Moment μ besitzt. Ohne externes Magnetfeld sind alle magnetischen Momente der Kerne zufällig orientiert. Wenn man nun die Probe ins Magnetfeld einbringt, dann richten sich die Kerne in Richtung des Magnetfelds aus. Diese Ausrichtung wird durch die zufällige Bewegung der Kerne induziert. Aufgrund dieses Zufallsprozesses folgt der Aufbau von Gleichgewichtsmagnetisierung einer Kinetik erster Ordnung (Abbildung 12). $M_z(t) = M_{z0}(1 - e^{-\frac{t}{T_1}})$

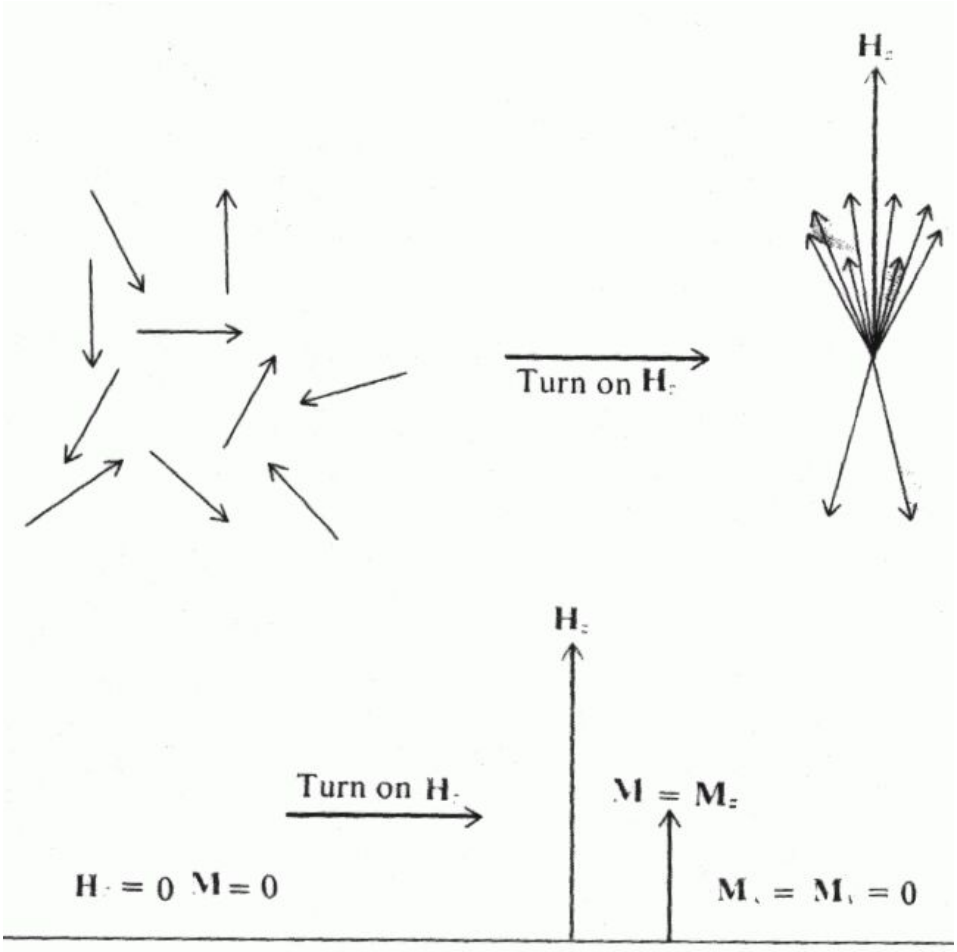


Abbildung 12: Orientierung der anfänglich zufällig angeordneten magnetischen Momente in einem externen Magnetfeld. Das externe Feld H_z (B_{0z}) verursacht eine Nettomagnetisierung M entlang der z-Achse.

Genauso können wir durch Anwendung eines 180°-Pulses M_z-Magnetisierung in $-M_z$-Magnetisierung überführen. Diese relaxiert zurück zur Gleichgewichtsmagnetisierung M_z. Longitudinale Relaxation kann man einfach messen mit folgender Pulssequenz: 180°-τ_{var}-90°-Detektion. Was dabei passiert, ist in Abbildung 13 zusammengefasst.

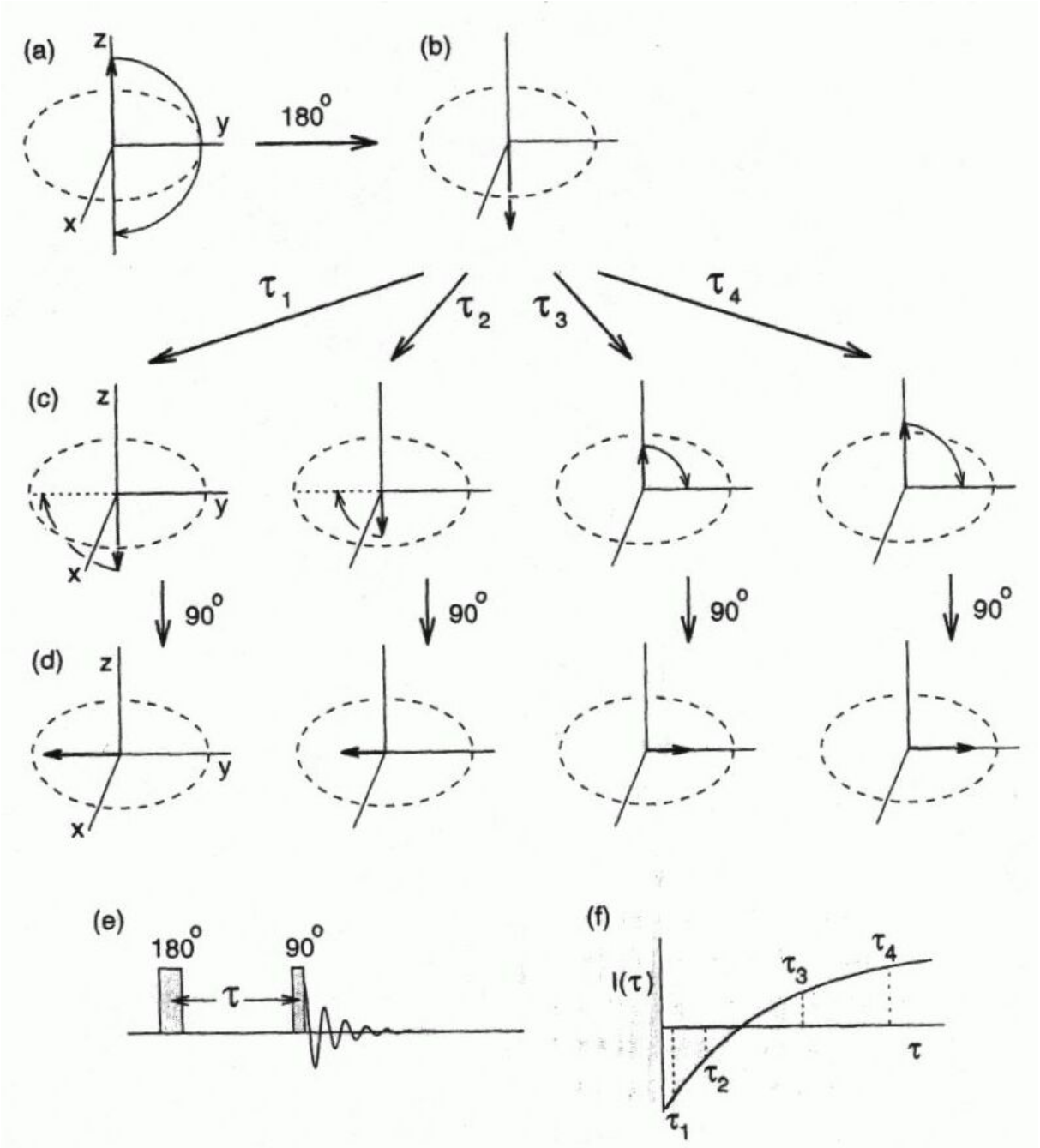


Abbildung 13: Pulssequenz zur Bestimmung von T_1-Zeiten. Diese Pulssequenz nennt man Inversion-Recovery.

Transversale Relaxation

Wir haben diskutiert, dass die Anwendung eines $90_x°$-Pulses zur Erzeugung von Phasenkohärenz führt. Nach Anwendung des $90_x°$-Pulses liegt der Magnetisierungsvektor entlang der –y-Achse, die Komponente entlang der z-Achse ist 0. Beim Prozess der transversalen Relaxation (T_2-Relaxation, Spin-Spin-Relaxation) wird die Phasenkohärenz verloren.

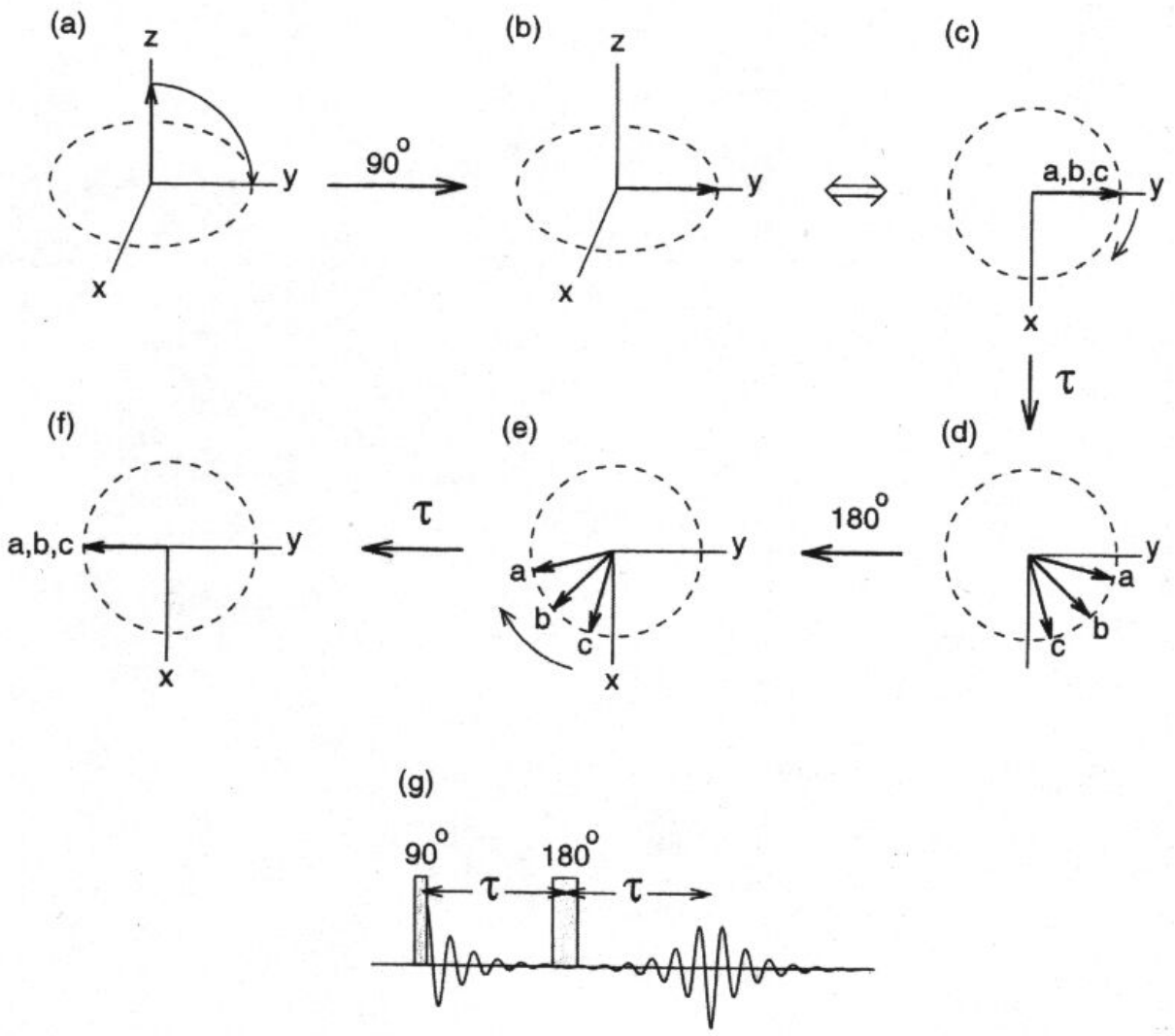


Abbildung 14: Pulssequenz zur Bestimmung von T_2-Zeiten, diese Pulssequenz nennt man Spin-Echo.

Übergang vom Vektorformalismus zum Produktoperatorformalismus

Zur exakten Beschreibung von Spsinsystemen, in denen Spins miteinander koppeln, kann man den Vektorformalismus streng nicht mehr gebrauchen. Deshalb muss man den quantenmechanischen Produktoperatorformalismus einführen. Dazu wird das folgende Korrespondenzprinzip angewendet: Die Magnetisierung **M**, die von einem Ensemble von Spins erzeugt wird, muss ersetzt werden durch Operatoren **I**. I_x^k steht für ein Ensemble von I^k Spins die x-Magnetisierung „besitzen“.

Beschreibung von skalarer (J) Kopplung im Vektorformalismus

Abbildung 15a zeigt das erste Spektrum von Ethanol. Dies hat die Neugierde von Chemikern angeregt: Es gibt drei verschiedene Atomsorten in Ethanol (CH_3, CH_2, OH) und offensichtlich sieht man drei unterschiedliche Resonanzen. Mit etwas Optimismus kann man auch erkennen, dass die Integrale über diese drei Atomgruppierung dem entsprechen, was man erwartet, nämlich 3:2:1.

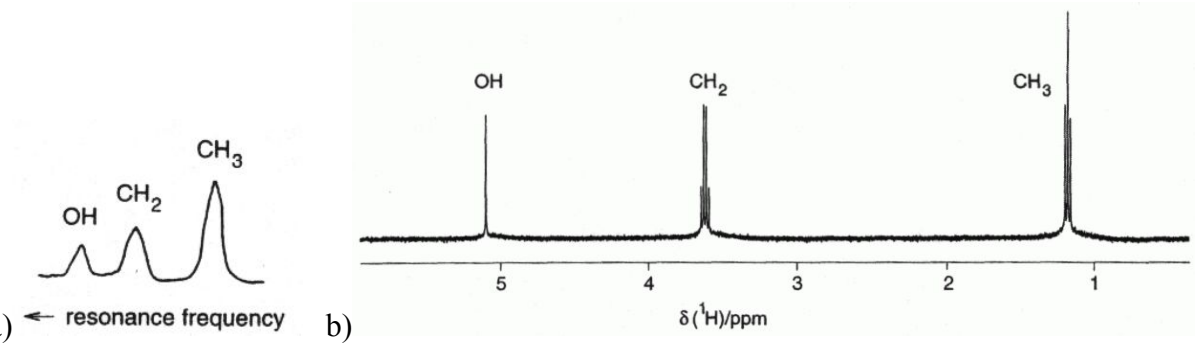


Abbildung 15: a. Das ^{1}H NMR Spektrum von flüssigem Ethanol, CH_3-CH_2-OH, publiziert 1951. b. Das ^{1}H NMR Spektrum von flüssigem Ethanol, CH_3-CH_2-OH auf einem modernen Spektrometer aufgenommen. (Die fehlende Aufspaltung der OH-Gruppe beruht auf intermolekularem Austausch).

Abbildung 15b ist noch spannender. Die Signale der CH_3 und CH_2 zeigen eine Aufspaltung, die NMR-Spektroskopiker skalare Kopplung nennen. Diese Kopplung zeigt an, dass die CH_3- und CH_2-Gruppe dem gleichen Spinsystem angehören, es zeigt also Konnektivität an! Die Multiplizität der aufgespaltenen Kerne und deren Intensität ergibt sich aus dem Pascalschen

Dreieck (siehe Kapitel 3). Im folgenden werden wir die Ursache der skalaren Kopplung diskutieren. Nehmen wir zunächst an, wir würden ein ^{1}H 1D-Spektrum von unmarkiertem Formiat ($^{1}H^{12}CO_2^-$) aufnehmen. Das Protonenspektrum bestünde aus einer einzigen Linie (wir vernachlässigen das von 1.1% herrührende Satellitenspektrum). Das ^{1}H und das ^{13}C 1D-Spektrum von ^{13}C markiertem Formiat ($^{1}H^{13}CO_2^-$) enthält jeweils zwei Linien ($^{1}H^{13}CO_2^-$) der Intensität ½, die beide um 195Hz aufgespalten sind. Es gibt zwei magnetisch aktive Kerne, ^{1}H und ^{13}C, beide haben sind Spin ½-Teilchen. Das ^{1}H-Spektrum ist aufgespalten, weil das magnetische Moment des ^{13}C die Quelle für ein kleines lokales Magnetfeld darstellt, dessen Richtung durch die magnetische Quantenzahl (m=+1/2 oder -1/2) des ^{13}C bestimmt wird. Wenn ^{13}C im m=+1/2 Zustand (hier mit C↑ bezeichnet) ist, dann wirkt es dem externen Feld entgegen und induziert einen Hochfeldshift. Wenn ^{13}C im m=-1/2 Zustand (hier mit C↓ bezeichnet) ist, dann verstärkt es das externe Feld und induziert einen Tieffeldshift. Da die Energiedifferenz zwischen C↑ und C↓ verschwindend klein ist im Vergleich zu kT, sind die beiden Zustände gleich wahrscheinlich und man beobachtet eine Dublettaufspaltung mit Multiplettlinien gleicher Intensität.

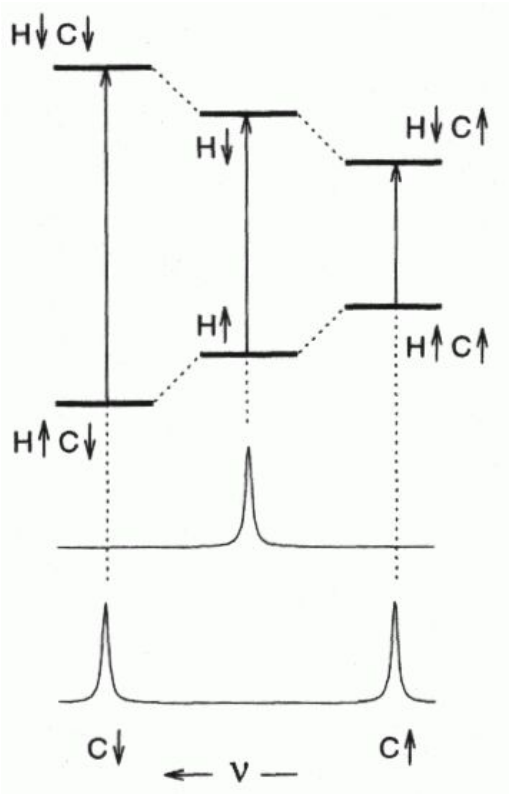
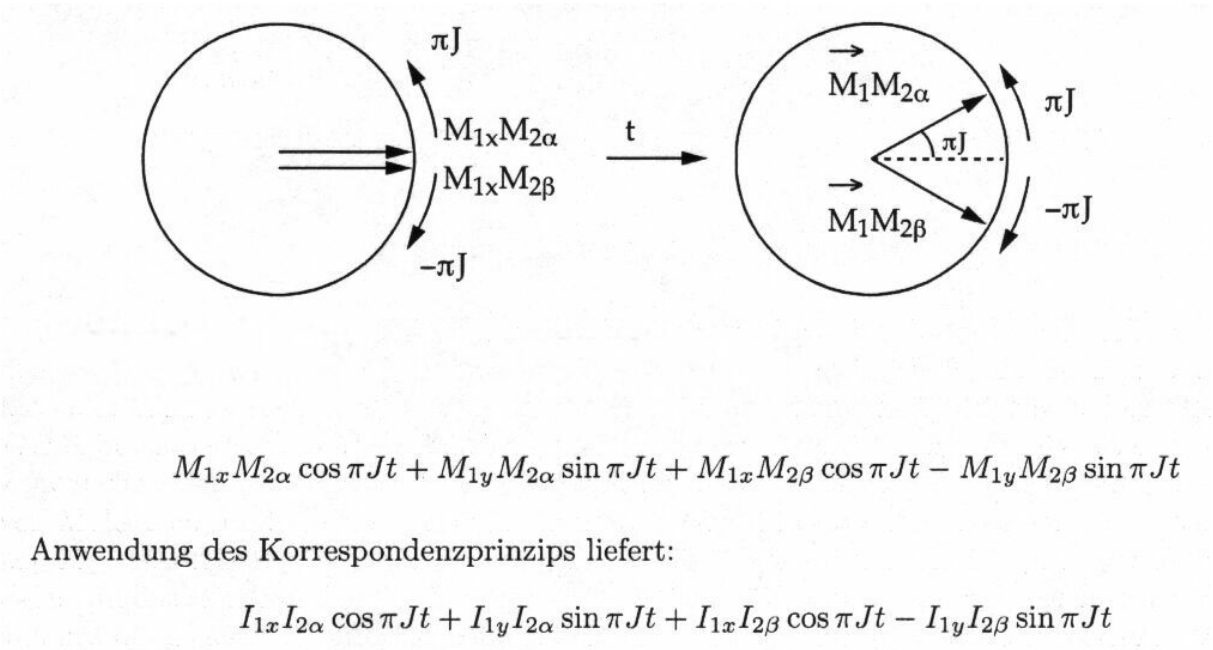


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Effekts der parallelen oder antiparallen Ausrichtung des passiven Spins ^{13}C auf das Spektrum des aktiven Spins ^{1}H. Die Energieniveau, in denen die beiden Spin parallel orientiert sind, werden angehoben, die beiden, in denen die beiden Spin antiparallel orientiert sind, werden stabilisiert. Dies führt zu unterschiedlichen energetischen Unterschieden für die ^{1}H-Linien, je nachdem, ob der ^{13}C up oder down ist.

Im folgenden wollen wir annehmen: wir haben einen Spin, der mit einem zweiten Spin mit einer skalaren Kopplungskonstanten von J = 10 Hz koppelt. Wir wissen, dass das Spektrum eines solchen Spins wie oben diskutiert ein Dublett ergibt. Der FID eines solchen Spins wird oszillieren, das Signal wird nach 50ms verschwunden sein, aber nach 100ms wieder erscheinen.



$$M_{1x}M_{2\alpha}\cos\pi Jt + M_{1y}M_{2\alpha}\sin\pi Jt + M_{1x}M_{2\beta}\cos\pi Jt - M_{1y}M_{2\beta}\sin\pi Jt$$

Anwendung des Korrespondenzprinzips liefert:

$$I_{1x}I_{2\alpha}\cos\pi Jt + I_{1y}I_{2\alpha}\sin\pi Jt + I_{1x}I_{2\beta}\cos\pi Jt - I_{1y}I_{2\beta}\sin\pi Jt$$

Abbildung 17: Beschreibung eines koppelnden Spins im Vektormodell

Im Vektormodell wird das dadurch erklärt, dass man zwei Magnetisierungsvektoren hat, die in unterschiedlicher Richtung mit einer Frequenz von ± 5Hz oszillieren (Abbildung 14). Nach einem ¼-Zyklus sind die Vektoren entweder antiparallel oder in Antiphase orientiert. Dieser Zustand besitzt keine Magnetisierung (man würde kein Signal messen). Aber dieser Zustand ist auch anders als ein Zustand, den man nach Einstrahlen und Sättigung erhalten würde. Denn Magnetisierung wird aus dem Antiphase-Zustand wieder erzeugt. Magnetisierung wird nach einem ½-Zyklus wieder erscheinen. Zustände mit Antiphasekohärenz und nicht detektierbarer Magnetisierung sind wesentlich für NMR-Experimente wie z.B. das COSY und haben zu dem Namen Produktoperatorformalismus geführt: Das Signal des Spins I^1, der mit

Spin I^2 (beide Spin-1/2-Teilchen) koppelt, erscheint als Dublett im Spektrum. Das Dublett des Spins I^1 rührt von zwei unterschiedlichen Molekülen her, einem in dem der Spin I^2 im α-Zustand ist und einem zweiten, in dem I^2 im β-Zustand sich befindet.

Die Frequenz der linken Linie des Spins I^1, das von Molekülen mit I_2 im α-Zustand herrührt, ist gegeben durch $\Omega_1+\pi J$, die rechte Linie des Spins I^1, das von Molekülen mit I^2 im β-Zustand herrührt, ist gegeben durch $\Omega_1-\pi J$. Beide Arten von Molekülen sind nahezu gleich häufig (geringe Energiedifferenz für NMR-Übergänge), so dass das Spektrum des I^1 Spins die Überlagerung der beiden Spektra für jedes Spinisomere des Spin I^2 ist. Die Positionen der beiden Kohärenzen in der x,y-Ebene kann wie folgt abgeleitet werden:

$$\begin{aligned} I_x^1 I_\alpha^2 &\xrightarrow{\Omega^1 I_z^1 t} I_x^1 I_\alpha^2 \cos\left(\Omega^1 + \pi J\right)t + I_y^1 I_\alpha^2 \sin\left(\Omega^1 + \pi J\right)t \\ I_x^1 I_\beta^2 &\xrightarrow{\Omega^1 I_z^1 t} I_x^1 I_\beta^2 \cos\left(\Omega^1 - \pi J\right)t + I_y^1 I_\beta^2 \sin\left(\Omega^1 - \pi J\right)t \end{aligned} \tag{1}$$

Hierzu brauchen wir zwei Regeln:

$$\begin{aligned} I_\alpha^1 + I_\beta^1 &= 1; \\ I_\alpha^1 - I_\beta^1 &= 2I_z^1 \end{aligned} \tag{2}$$

Die erste Gleichung kommt daher, dass die Summe der Wahrscheinlichkeit, Spin 1 entweder im α- oder im β-Zustand zu finden, auf 1 normiert sein muss.

Die zweite Gleichung in (2.2) kann man dadurch erklären, dass eine Populationsdifferenz zwischen α- und im β-Zustand z-Magnetisierung ist. Der Faktor 2 ist ein Normalisierungsfaktor. D.h.: I^1 entwickelt die folgenden Operatoren unter der Wirkung von chemischer Verschiebung und skalarer J-Kopplung:

$$I_x^1 \xrightarrow{(\Omega^1 I_z^1 + 2\pi J I_z^1 I_z^2)t} I_x^1 \cos\Omega^1 t \cos\pi J t + 2 I_y^1 I_z^2 \cos\Omega^1 t \sin\pi J t + I_y^1 \sin\Omega^1 t \cos\pi J t - 2 I_x^1 I_z^2 \sin\Omega^1 t \sin\pi J t \quad (3)$$

1. Chemische Verschiebung

Einleitung

Atomkerne sind von Elektronen umgeben, die um den Kern rotieren und dadurch ein Magnetfeld induzieren (B´). Dieses Magnetfeld ist abhängig von der Art (Orbitale) und Anzahl der Elektronen, die um den Kern rotieren. Das effektive Magnetfeld B_{gesamt}, welches der Kern erfährt, setzt sich aus dem von außen angelegten Magnetfeld B_0 und dem Betrag des induzierten Magnetfeldes B´ zusammen.
Anders ausgedrückt gilt $B_{gesamt} = B_0 (1-\zeta)$, wobei ζ die Abschirmkonstante ist und von den Elektronen, die den Kern umgeben, abhängig ist. Das ist auch der Grund, warum die Protonen einer Probe bei unterschiedlichen Frequenzen zur Resonanz kommen. Ausgedrückt wird dies in der chemischen Verschiebung δ, d.h. ob nun ein Kern tieffeld- (hohe δ, starke Entschirmung) oder hochfeldverschoben (niedrige δ) ist, gemessen gegen eine Referenzsubstanz.

$$\delta = 10^6 \frac{\nu - \nu_{Referenz}}{\nu_{Referenz}} [\text{ppm}]$$

Die chemischen Verschiebungen werden beeinflusst von kovalenten und nicht kovalenten Bindungen, Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel, Wasserstoffbrückenbindungen, Orientierung von aromatischen Ringen, Wirkungen von Carbonylgruppen etc.

Die Verwendung der chemischen Verschiebung zur Strukturaufklärung von Makromolekülen bietet sich an, da sie einer der am genauesten und einfachsten messbaren Parameter bei NMR-Messungen darstellt. Je mehr Informationen über die chemische Verschiebung bekannt sind, desto genauer fällt die mögliche Sekundärstrukturvorhersage aus.

Die beobachtete chemische Verschiebung setzt sich aus folgenden Effekten zusammen:

- **primär** (intrinsisch): charakteristisch für eine spezielle chemische Gruppe (C<u>H</u>, C<u>H</u>$_2$, O<u>H</u> etc.)
- **sekundär**: kommt durch den Einfluss anderer magnetischer Kerne, die in räumlicher Nachbarschaft liegen. So unterscheiden sich beispielsweise die Spektren eines Proteins im gefalteten vom ungefaltetem Zustand (konformationeller Einfluss auf chemische Verschiebung)

Für die Verlässlichkeit der gemessenen chemischen Verschiebung (relative Werte) ist es nötig, systematische Fehler der Messungen durch schlechte Referenzeinstellungen zu vermeiden.

Es gibt eine direkte und eine indirekte Methode, um die Nullpunkte der Skala der chemischen Verschiebung so festzulegen, daß die erhaltenen Werte vergleichbar sind:

- direkt:

  hier werden die von der IUPAC festgelegten Standards gemessen und deren chemische Verschiebung auf Null ppm gesetzt, z.B.

Kern	**Standard**
^{1}H*	TMS (Tetramethylsilan)
^{13}C*	TMS
^{15}N	Flüss. Ammoniak

  *für diese Kerne wird bei Messungen von biologischen Makromolekülen DSS (2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure) vorgeschlagen, die eine wasserlösliche, pH-insensitive Form von TMS ist.

- indirekt:

  hierbei werden tabellierte, kernspezifische Frequenzverhältnisse (Ξ-Verhältnisse) verwendet. Mithilfe dieser können durch Verwendung der absoluten ^{1}H-Frequenz von DSS die Nullpunkte anderer Kerne festgelegt werden.

  Bsp: Bestimmung der ^{15}N-Referenz:

  1. Bestimmung der ^{1}H-Trägerfrequenz des Spektrometers
  2. Bestimmung der ^{1}H-DSS-Frequenz relativ zur Trägerfrequenz (Die absolute DSS-Frequenz = ^{1}H-Trägerfrequenz - ^{1}H-DSS-Frequenz)
  3. Absolute DSS-Frequenz * ^{15}N = hypothetische ^{15}N-Frequenz des Ammoniaks
  4. Wenn die ^{15}N-Trägerfrequenz bekannt/gemessen ist, ist die Skala voll definiert.

Diese Verfahren müssen wegen Driften des Magnetfeldes und Variation der Spektrometerfrequenz nach jeder Probeneingabe wiederholt werden.

Random-coil-Verschiebungen (primäre Verschiebungen) sind die charakteristischen chemischen Verschiebungen von Aminosäuren (AS) in kurzen, ungeordneten Polypeptiden. Für diese Messungen werden entweder denaturierte Proteine (z. B. durch 8M Harnstoff) oder Polypeptide der Sequenz GG#uGG (G=Glycin, # = Prolin oder G, u = untersuchte AS) verwendet. Die erhaltenen Werte sind in Tabellen zu finden. (Tab II, siehe Referenzen)

Benutzt werden diese Werte bei der Zuordnung von AS-Resten bzw. Spins und zur Bestimmung der **sekundären chemischen Verschiebung** ($\delta\Delta$).
$\delta\Delta$ ist definiert als der Unterschied zwischen der beobachten Verschiebung und dem Random coil Wert: $\delta\Delta = \delta_{total} - \delta_{rc}$

Die sekundäre chem. Verschiebung beinhaltet strukturelle und dynamische Informationen. Sie kann bei der Identifizierung von Sekundärstrukturen, flexiblen Regionen, Wechselwirkungen mit Aromaten und Torsionswinkeleinschränkungen helfen.

Die Werte von Nukleinsäuren sind schwieriger zu verwenden, da deren chem. Verschiebung viel empfindlicher gegenüber Sequenzeffekten ist.

Beeinflussung der chemischen Verschiebung

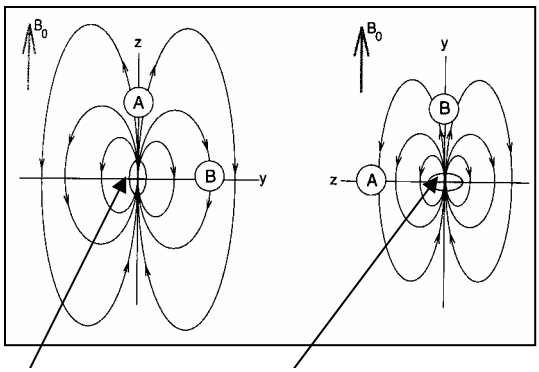
Zur Interpretation der chem. Verschiebung sind hierbei Kenntnisse über die Abschirmung der Probenkerne nötig. Beispielsweise spielt die Beziehung der Abschirmung und der molekularen, elektronischen Struktur eine Rolle. Die chemische Verschiebung nimmt mit steigender Elektronegativität zu.

- Short-range Wechselwirkungen, die zwischen Atomen, die über chemische Bindungen verknüpft sind, stattfinden, beeinflussen die chem. Verschiebung ebenso wie die
- Long-range Effekte. Diese finden zwischen Atomen statt, die nicht über chem. Bindungen verknüpft sind, und können in drei Arten untergliedert werden:
    1. Effekte durch die Magnetisierbarkeit von Nachbargruppen, wobei eine benachbarte Gruppe einen gewissen Beitrag zum induzierten magnetischen Feld leisten kann, z. B. Anisotropien, Ringstromeffekte

Magnet. Anisotropie:

Ein äußeres Magnetfeld B_0 induziert in einer Nachbargruppe des beobachteten Kernes ein magnetisches Moment μ. Dieses magnetische Moment kann unterschiedlich groß sein, je nachdem ob B_0 parallel oder senkrecht zur Symmetrieachse der Nachbargruppe liegt. Wenn die Größe des magnetischen Momentes eines Atoms von der Orientierung des angelegten Magnetfeldes abhängt, so handelt es sich um ein anisotropes Atom. Die Wirkung des Magnetfeldes μ auf nahe Kerne (Protonen) können Tieffeld- oder Hochfeld-verschiebungen sein.

Letztendlich hat die Orientierung einer Nachbargruppe Einfluss auf die chemische Verschiebung des betrachteten Kernes, wenn der Kern der Nachbargruppe ein anisotropes Atom ist.



B_0 verläuft parallel zur Symmetrieachse der Nachbargruppe

B_0 verläuft senkrecht zur Symmetrieachse der Nachbargruppe

Ein Sonderfall des Nachbargruppeneffektes tritt in aromatischen Verbindungen auf. Hier tritt ein Ringstrom in den Orbitalen auf, wobei die Elektronen um den Ring zirkulieren. So werden die Protonen in der Ringebene tieffeldverschoben, hingegen Protonen die sich oberhalb oder unterhalb der Ringebene befinden werden hochfeldverschoben.

2. Effekte des elektrischen Feldes. Hier wird das effektive elektrische Feld direkt am Kern durch Nachbargruppen, die geladen oder Dipole sein können, beeinflusst. Die Ladungen üben einen indirekten Effekt auf die Abschirmung aus, indem sie die Bindungen polarisieren.

3. Close-contact-Wechselwirkungen, die durch Überlappen von Elektronenwolken nicht benachbarter Gruppen mit der des Probenkerns entstehen. Dies tritt besonders bei Lösungsmittelverschiebungen und Wasserstoffbrücken auf und wird wahrscheinlich durch Austausch-Repulsions-Wechselwirkungen bedingt.

Interpretation von chemischen Verschiebung in Proteinen

In Makromolekülen setzt sich die chemische Verschiebung aus folgenden Beiträgen zusammen:

$\delta\Delta = \delta_{total} - \delta_{rc} = \delta_{tor} + \delta_{ring} + \delta_{HB} + \delta_e + \delta_{side} + \delta_{misc}$

(δ_{tor} = torsionale Verteilung, δ_{ring} =Verteilung der Ringströme, δ_{HB} = Verteilung durch Wasserstoffbrücken oder andere nahe Kontakte, δ_e= elektrisches Feld, lokale Ladungsverteilung, δ_{side} = torsionale Verteilung der Seitenketten, δ_{misc} = Einflüsse durch Lösungsmittel, durchschnittliche Bewegung, Effekte durch kovalente Bindungen)

Anteile in % für die jeweiligen Kerne an der Gesamtverschiebung in Proteinen.

	^1H_N	$^1H_\alpha$	^{15}N	$^{13}C_\alpha$
Random coil	0	25	50	50
Torsion (φ/ψ)	0	50	0	25
Torsion (φ/ψ_{i-1})	25	0	25	0
Side chain	5	0	0	5
Side $chain_{i-1}$	5	0	5	0
Wasserstoff-brückenbindungen	25	5	5	5
Ringströme	10	10	0	0
Lokale Ladungen	10	0	0	0
Sonstige	20	10	15	5

Beispiel:

$^1H_\alpha$

δ_{total} steht für die messbare Gesamtverschiebung, wobei δ_{rc} einen Anteil von 25% an der Gesamtverschiebung hat, δ_{tor} einen Anteil von 50% und δ_{ring} einen Anteil von 10-15% von der Gesamtverschiebung

Anhand der Tabelle läßt sich erkennen, daß die $^1H_\alpha$ Verschiebungen die am meisten verlässliche Anzeige für die Änderung der Sekundärstruktur sind. Hingegen ist die ^1H_N Verschiebung kein guter Indikator für Veränderungen in der Sekundärstruktur, sondern eher für Wasserstoffbrückenbindungslängen und Wasserstoffbrückenbindungsenergien.

Einschränkungen von Dihedralwinkeln mittels chemischer Verschiebung (Dihedral angle restraints)

In der Frühphase der Proteinstrukturbestimmung können durch Analyse der chem. Verschiebung von ^{1}H, ^{13}C und ^{15}N (Rückrat-Atome) relativ gute Vorhersagen über die Rückratwinkel (φ/ψ) gemacht werden. Dies ist möglich, da die chemischen Verschiebungen besonders der Cα recht empfindlich gegenüber Änderungen der Torsionswinkel sind. Diese Art der Dihedralwinkelbestimmung heißt „heteronuclear chemical shift index (CSI) method"

Außerdem haben gleiche AS-Sequenzen mit gleichen chemischen Verschiebungen auch die gleichen Rückgratdihedralwinkel. Dies erlaubt eine noch genauere Einschränkung der möglichen Winkel und damit eine genauere Voraussage über die Winkel.
Diese Beobachtungen ermöglichten die Entwicklung von Computerprogrammen, z. B. TALOS oder SHIFTOR.
TALOS (Torsion Angle Likelihood Obtained from Shifts and sequence similarity) kann mithilfe der sekundären chemischen Verschiebungen der Atome des Proteinrückgrats von gegebenen (damit bekannten) Sequenzen die φ - und ψ -Winkel vorhersagen.

Zur Vorhersage benutzt TALOS je ein Aminosäure-Triplett, das es mit gleichen Tripletts aus Proteinen, deren Struktur aufgeklärt ist, vergleicht. Pro Triplett werden 15 Chemische Verschiebungs-Daten berücksichtig (5 Kerne pro AS-Rest; $^{1}H_{\alpha}$, $^{13}C_{\alpha}$, $^{13}C_{\beta}$ ^{15}N, ^{13}CO). Die Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen wird dann bewertet (Maßstab z. B. Unterschiede der Mittelwerte der gemessenen Verschiebungen zu bekannten und anderen Termen, die die Sekundärstruktur berücksichtigen). Anschließend werden die zehn passendsten Strukturen aus der Datenbank ausgewählt und wenn diese nicht zu unterschiedlich sind, wird eine Voraussage für die φ - und ψ -Winkel des Zentralrestes gemacht.

TALOS stützt sich auf eine Datenbank, deren Umfang 20 Proteine (z.B.: HIV-1Protease, Calmodulin, Dehydrase, Interleukin-1b, Lactamase, Ubiquitin u.a.) faßt mit etwa 3000 Tripletts. Die dort als Referenzwinkel angegebenen Daten wurden alle mittels hoch auflösender Röntgenstrukturanalyse ermittelt.
Allerdings kann TALOS zu etwa 20-45% aller Reste im Protein keine Aussage treffen, etwa 3% aller möglichen Voraussagen sind falsch. Die Werte für die angegebnen φ und ψ Winkel variieren zur Röntgenstruktur um etwa 15°.

Ein großer Vorteil allerdings ist, dass nur die AS-Sequenz und die chemischen Verschiebung angegeben werden, um eine relativ gute Aussage für die φ - und ψ –Winkel und somit für die Sekundärstruktur zu erhalten.

Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen

Distance Restraints

Hierbei kann die Distanz zwischen einem Kern und dem Verursacher der Verschiebung bestimmt werden. Ist ein Proton verschoben und ist bekannt durch welchen Effekt (Bsp. aromatischen Ring), kann die Distanz zwischen dem Proton und dem Ring bestimmt werden. Allerdings muß bei dieser Methode die 3-D Struktur bekannt sein, falls mehr als ein Ring für die chemische Verschiebung in Frage käme.

Gerade in α-Helices sind die ^1H_N Verschiebungen sehr empfindlich bei Änderungen von Wasserstoffbrückenbindungslängen. Schon bei einer Änderung um 0,1 Å ändert sich die Chemische Verschiebung des ^1H_N.

Direct chemical shift refinement (paramagnetic shift)

Paramagnetische Metalle (Fe, Co, Lanthanide) führen zu großen (10 ppm) Chemischen Verschiebungen. Gerade in paramagnetischen Proteinen kann so ermittelt werden, wo ein paramagnetisches Metall in diesem Protein sitzt.

Bei anlegen eines Magnetfeldes B_0 wird das Protein magnetisiert. Das magnetische Feld B_0 induziert zirkulierende Ströme im Molekül. Diese Ströme induzieren wiederum ein Magnetfeld, das (normalerweise) B_0 entgegengerichtet ist. Dieses Protein wäre **diamagnetisch**. Wird hingegen B_0 verstärkt, das induzierte Magnetfeld läuft parallel zu B_0, so ist das Protein **paramagnetisch**.

CSI-Plot

Informationen aus $^{1}H_{\alpha}$, $^{13}C\alpha$, $^{13}C_{\beta}$, ^{13}CO Verschiebungen werden zusammengefasst. So erhält man eine hohe Übereinstimmung mit Strukturen, die durch Röntgenstrukturanalyse erfasst wurden.

Deuterium Isotop shifts

Hierbei werden chemische Verschiebungen von ^{13}C und ^{15}N Kernen durch Deuterium Protonen ^{2}H verursacht. Die dadurch auftretenden Verschiebungen sind äußerst klein und bewegen sich im [ppBillion]Bereich. Wird die chem. Verschiebung, ausgelöst durch ^{2}H, der ^{13}C Kerne des Proteinrückgrats beobachtet, so kann anhand der Größe dieser Verschiebung entweder auf eine α-Helix oder eine β-sheet geschlossen werden, da die Verschiebung vom ψ -Dihedralwinkel abhängt.

Chemical Shift Threading

Hierbei werden die ermittelten chemischen Verschiebungsdaten und die As-Sequenz in eine Datenbank gefüttert. Im PC wird nun dies AS-Sequenz einer Struktur zugeordnet. Zu dieser hypothetischen Struktur werden die Chemischen Verschiebungen berechnet und mit den Experimentellen verglichen. Stimmt nun errechnete und experimentelle Verschiebung überein, so stimmt die hypothetische 3-D Struktur mit der eigentlichen Struktur überein. Allerdings muß die ungefähre 3-D Struktur in der Datenbank enthalten sein. Zur Identifizierung von neuen Proteinfaltungen ist diese Methode nicht geeignet.

Literatur

- Use of Chemical Shifts in Macromolecular Structure Determination by D.S. Wishart and D.A.Case, Meth. Enzym. 2001; 3-34
- http://spin.niddk.nih.gov/bax/software/TALOS/info.html

2. FT-NMR

Einleitung

In der NMR-Spektroskopie unterscheidet man zwischen zwei Methoden:

continuous wave NMR (cw NMR) vs *Pulse NMR.*

Bei der cw-NMR regt man mit monochromatischer Strahlung an und sucht nach Absorptionsmaxima. Durch Variation der Frequenz lassen sich alle Resonanzen erfassen. Man erhält ein Spektrum in der Frequenz-Domaine. Dabei muss jede Frequenz über einen gewissen Zeitraum eingestrahlt werden, um eine geeignete Frequenzauflösung zu erhalten. Will man Frequenzen bis zu 1 Hz auflösen, was einer Energiedifferenz von $\Delta E=h$ (Plack'sches Wirkungsquantum; $h=6{,}626176\ 10^{-34}$ Js) entspricht, so benötigt man nach der Heisenberg'schen Energie-Zeit-Unschärfe:

$$\Delta E * \Delta t \approx h$$
$$h * \Delta t \approx h$$
$$\Delta t \approx 1\,\mathrm{sec}$$

eine Messzeit von $\Delta t=1$ sec. Bei einem 100 MHz Spektrometer liegen die Protonensignale über einen Bereich von 10 ppm, bzw. 1000 Hz verteilt. Mit einer Meßgeschwindigkeit von 1Hz/sec benötigt man für ein Spektrum 1000 sec, bzw. 15 min.

Ein generelles Problem bei der NMR-Spekroskopie stellt das unvermeidbare Rauschen dar. Da NMR-Signale vergleichbar geringe Energien haben, die nicht viel größer als das Rauschen sind, spielt das Verhältnis zwischen Signal und Rauschen (*signal-to-noise-ratio*) eine große Rolle. Dieses Verhältnis läßt sich durch mehrere Messungen hintereinander verbessern (*signal averaging*), da mit einer Anzahl von n Messungen die Signale um n verstärkt werden, das Rauschen hingegen aber nur um $\sqrt{n}$, da es zufällig verteilt ist.

Die wiederholte Durchführung der Messung würde bei der cw-Methode die Gesamtdauer noch weiter erhöhen. Diese Methode ist recht zeitaufwendig.

Puls-NMR

Bei der Puls NMR erhält man durch eine einmalige Anregung (monochromatischer Radiofrequenz-Puls) alle Resonanzen auf einmal, was natürlich die Dauer des Experiments enorm verkürzt. Es wird also verständlich, daß die Puls-Methode vorzuziehen ist, da weitaus mehr Messungen in der gleichen Zeit durchgeführt werden können, die das „signal-to-noise-ratio“ verbessern.

Bei der cw-Methode wird ein schwacher Stimulus benutzt, um die Signale zu erzeugen, wohingegen bei Puls-NMR ein stärkerer Stimulus nötig ist. Eine einzige Frequenz muß alle Resonanzen hervorrufen. Die Länge des Pulses hängt dabei von dem gewünschten Frequenzbereich ab, in dem die Signale liegen (z.B. 5000 Hz für Protonen bei 500 MHz). Nach der Heisenberg’schen Energie-Zeit-Unschärfe gilt:

$$\Delta E * \Delta t \approx h \qquad \text{mit} \quad \Delta E = h * \Delta\nu \quad \text{folgt}$$

$$h * \Delta\nu * \Delta t \approx h$$

$$\Delta\nu \approx \frac{1}{\Delta t}$$

Die anregende Strahlung ist also über einen Frequenzbereich $\Delta\nu = (1/\Delta t)$ „unscharf“, wenn der Puls über eine Länge Δt eingestrahlt wird. Die Pulslänge liegt also im Bereich von ms bzw. µs.

Die Schwingungen klingen einige Zeit nach dem Puls ab, man spricht von *Free Induction Decay* (FID), der über einen gewissen Zeitraum hinweg gemessen wird. Daraus ergibt sich, daß die erhaltenen Daten in der Zeitdomäne vorliegen. Die Auswertung würde sich allerdings als recht schwierig erweisen, da der FID die Überlagerung aller Frequenzen darstellt. Diese müssen deshalb in die Frequenzdomäne überführt werden, in der die Frequenzen als einzelne Peaks zu sehen sind. Ein geeignetes Mittel hierfür ist die *Fourier Transformation*:

$$f(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) e^{i\omega t} dt$$

f(ω) ist dabei die Frequenzabhängigkeit der Amplitude eines NMR-Signals und f(t) ist die Zeitabhängigkeit der Amplitude eines NMR-Signals. Wenn der FID exponentiell abnimmt, erhält man mit Hilfe der Fourier Transformation eine charakteristische Linienform, die *Lorentz- Kurve*.

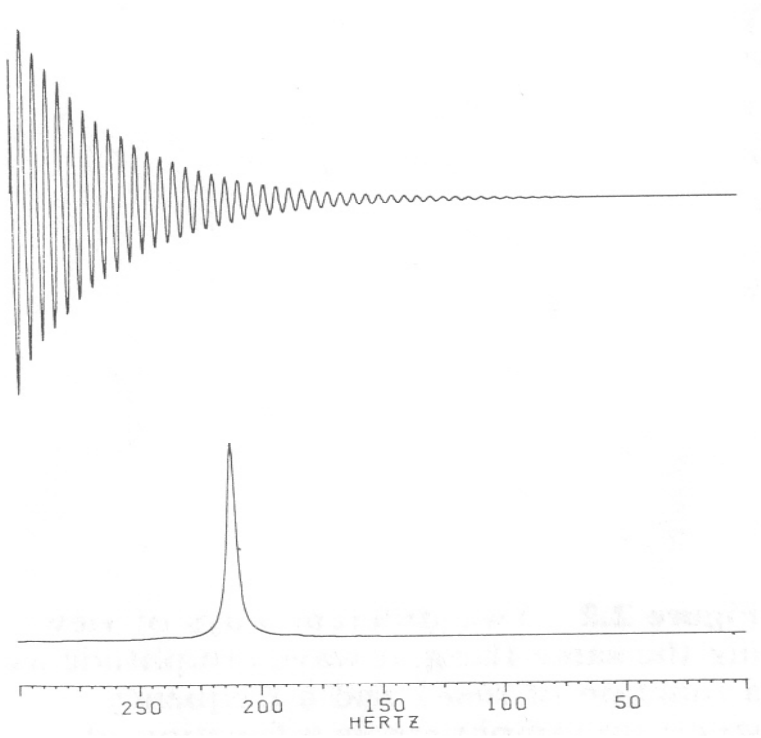


Bild 1: Zeit- und Frequenzspektrum

f(ω) ist eine komplexe Funktion. Sie besteht aus einem Realanteil und einem Imaginäranteil. Beide Formen haben eine Entsprechung im Spektrum und unterscheiden

sich nur in der Form der Lorentz-Kurve. Der reale Teil erscheint als *Absorption*, der imaginäre Teil als *Dispersion*. Es ist dabei einfacher im Spektrum nur den absorptiven Teil darzustellen.

NMR-Signale können sich nicht nur in Intensität und Frequenz unterscheiden, sondern auch in der *Phase*. Phasenunterschiede zwischen Signalen mit gleicher Frequenz und Amplitude spiegeln sich in den zwei Formen der Transformation wieder. Man erhält dann Lorentz-Kurven, die absorbtiven und dispersiven Teil vereinen.

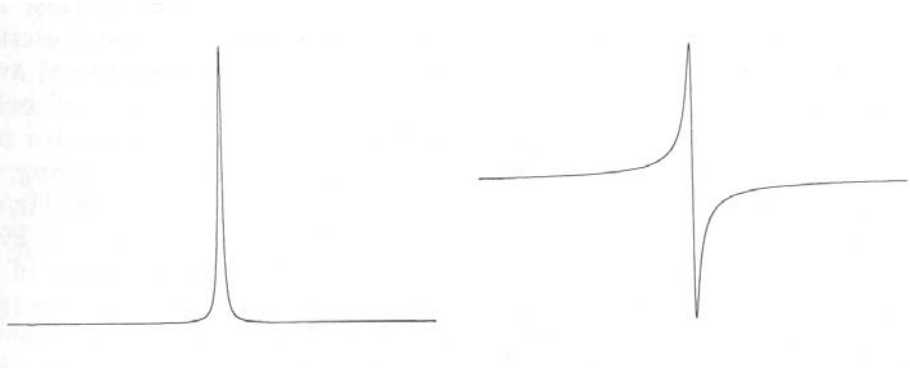


Bild 2: Absorptives und dispersives Signal

Detektion der Signale

Die elektrischen Signale des Spektrometers müssen zunächst in eine binäre Form gebracht werden, damit der Computer sie verarbeiten kann. Dazu dient der „*analogue-to-digital-converter*“ (ADC). Da man sich nur für die Unterschiede der chemischen Verschiebung interessiert, ist es sinnvoll, die Referenzfrequenz (Trägerfrequenz, z.B. 500 MHz) vor der Konvertierung abzuziehen, so daß man nur die chemischen Verschiebungen erhält.

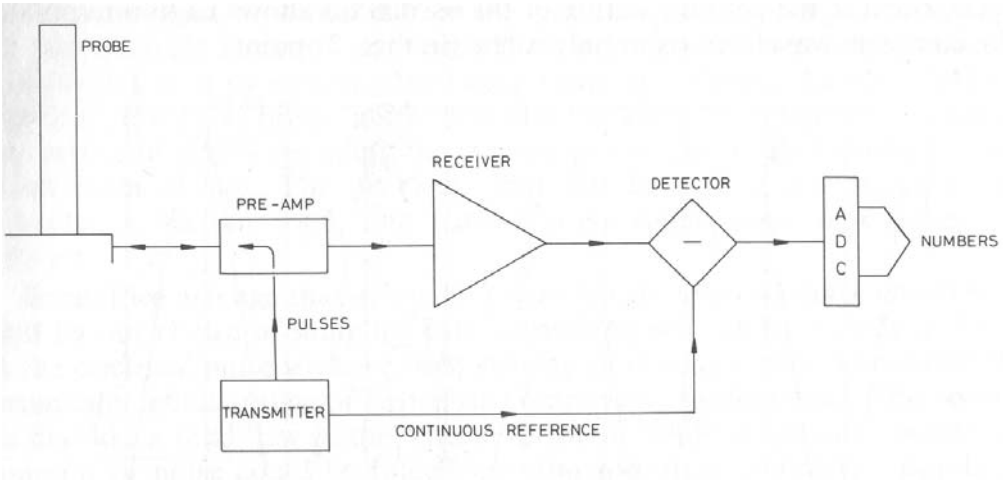


Bild 3: Schematische Darstellung eines Spektrometers

Die Zeitspanne, über die der FID aufgezeichnet wird, bezeichnet man als „*acquisition time*“ A_t. Sie bestimmt, bis zu welcher Frequenz man Signale auflösen kann ($A_t=1/\Delta\nu$)

Wie viele Daten in dieser Zeitspanne aufgenommen werden müssen, wird durch die Spektrenbreite bestimmt. Um eine sinusförmige Schwingung zu charakterisieren braucht man mindestens zwei Meßpunkte pro Schwingung. Die höchste Frequenz, die so (vom ADC) registriert werden kann, wird *Nyquist Frequenz* N (Hz) genannt. Dafür müssen alle

1/2N Sekunden Messwerte ermittelt werden. Der ADC kann alle 3 - 10 µs eine Messung machen. Daraus ergibt sich eine Nyquist-Freqenz von 50 – 150 kHz.

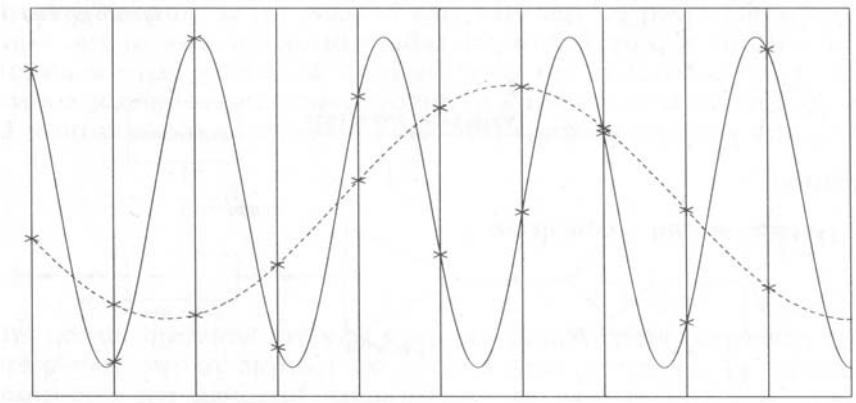


Bild 4: Bedeutung der Nyquistfrequenz

Frequenzen, die größer sind als die Nyquist Frequenz, können nicht mehr richtig beschrieben werden. Sie werden zwar detektiert, ihnen wird aber eine falschen Frequenz zugeordnet. Im Spektrum erscheinen sie an der falschen Stelle (*folded peaks*).

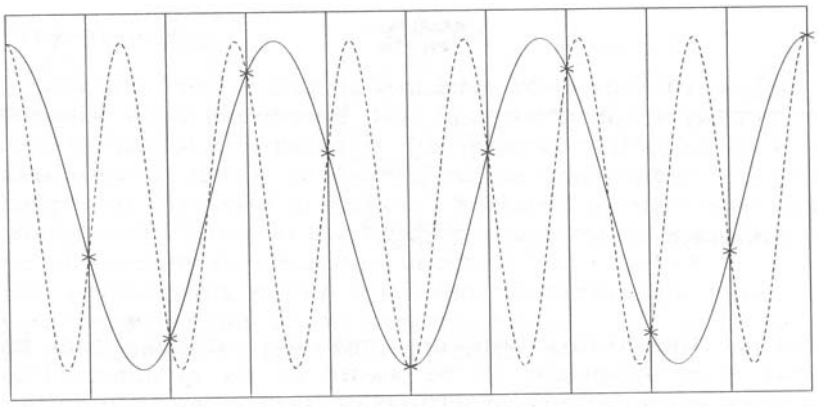


Bild 5: Aufgenommene Frequenz ist größer der Nyquistfrequenz

Es liegen immer Frequenzen außerhalb der Spektrenbreite, wobei es sich um das elektrische Rauschen handelt. Dieses Rauschen wird mit den Bandpass-Filter unterdrückt, da er die elektrische Bandbreite auf ein Minimum reduziert. Er ist wird zwischen Detektor und ADC geschaltet.

Bearbeitung der Daten

Die digitale Auflösung ist wichtig für die Feinstruktur des Spektrums, und sollte kleiner als die Peakbreite sein, damit der Peak ausreichend dargestellt werden kann. Digitale Auflösung bezeichnet dabei das Frequenzintervall zwischen den einzelnen Datenpunkten ($R_d=1/A_t$). Eine verbesserte Auflösung erreicht man beispielsweise durch Erhöhung der Aufnahmedauer (A_t), was allerdings

nicht immer sinnvoll ist, da der FID exponentiell abfällt, und bei einer Verlängerung der Aufnahme kein Signal mehr aufgezeichnet wird.

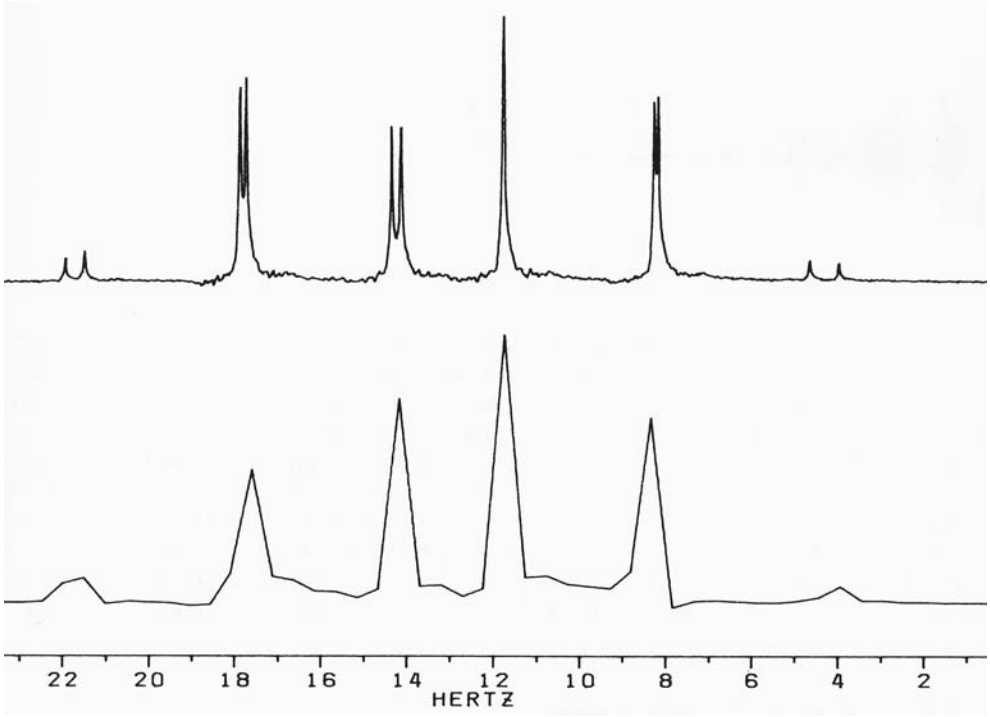


Bild 6: Bedeutung der Auflösung

Eine andere Methode stellt das „*zero-filling*“ dar, wobei Nullen zwischen die Datenpunkte eingeführt werden ohne die Aufnahmedauer zu erhöhen. Es wird also die Zahl der Datenpunkte erhöht (und so das Intervall verkürzt).

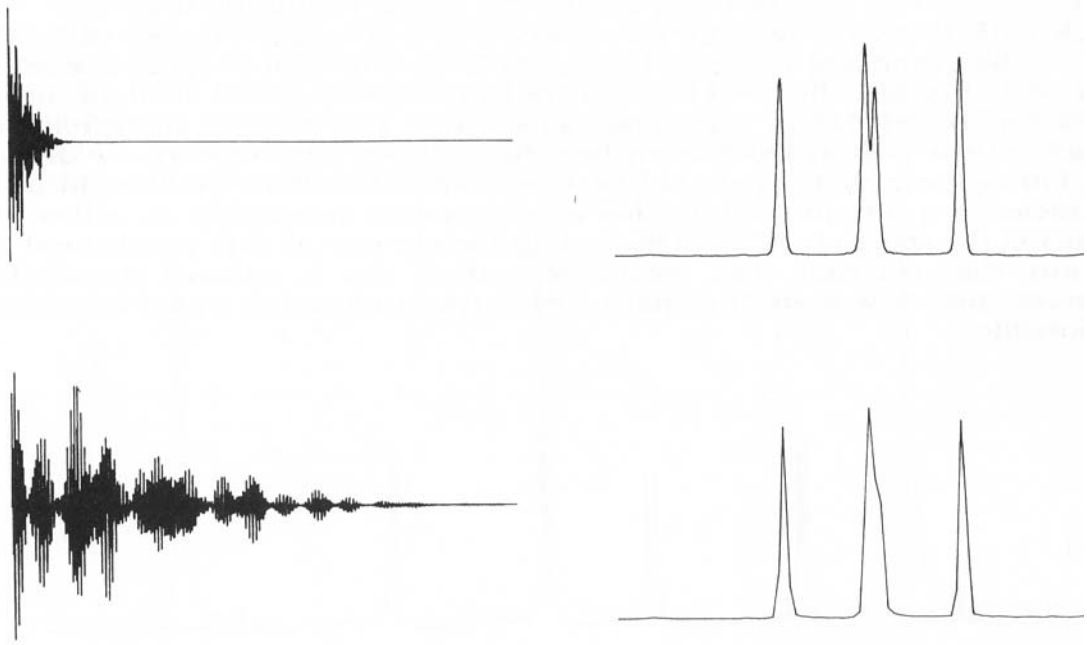


Bild 7: Bedeutung des Zero-fillings

Dabei muss darauf geachtet werden, daß der FID fast auf Null gefallen ist, wenn die Messung beendet ist. Wird die Messung beendet, bevor der FID auf Null gesunken ist, kann es zu „*wiggles*“ kommen. Die erhaltenen Daten erscheinen dann als Produkt des FID und einer Stufenfunktion, wobei bei der Transformation die genannten „*wiggles*“ entstehen, die sich vor allem in der 2D NMR als störend erweisen. Dieses Problem kann umgangen werden, indem man statt einer Stufenfunktion eine andere Funktion über den FID legt (Apodisation). Diese Funktion muß am Ende der Aufnahme gegen Null fallen, und wird als *Window Funktion* bezeichnet.

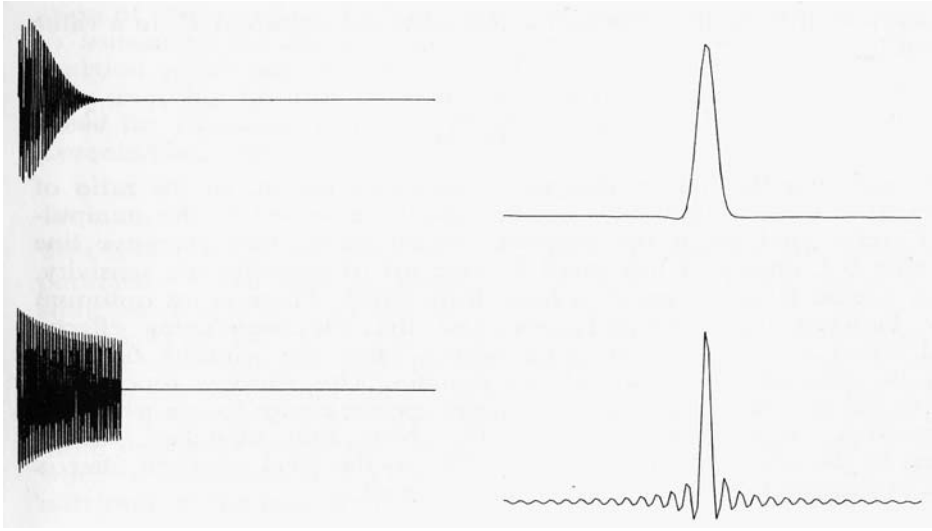


Bild 8

Window Funktionen können nicht nur „*wiggles*“ verhindern. Sie können beispielsweise das „signal-to-noise-ratio“ verbessern. Dafür wird eine fallende Exponentialfunktion E, mit

$$E = e^{-t*\frac{1}{a}}$$

über den FID gelegt. Allerdings führt das dazu, daß die Peaks verbreitert werden. Multipliziert man den natürlichen Abfall S eines Signals mit E so ergibt sich

$$S = A * e^{-t*\frac{1}{T_2}} \qquad * E = e^{\frac{-t}{a}} \text{ liefert}$$

$$\begin{aligned} S * E &= A * e^{-t*\frac{1}{T_2}} * e^{-t*\frac{1}{a}} \\ &= A * e^{\left(-t*\frac{1}{T_2}\right)+\left(-t*\frac{1}{a}\right)} \\ &= A * e^{-t*\left(\frac{1}{T_2}+\frac{1}{a}\right)} \end{aligned}$$

Daraus erkennt man, daß sich die Halbhöhenbreite δν der Lorentz-Linie ändert.

$$\delta\nu = \frac{1}{\pi} * \frac{1}{T_2} \qquad \delta\nu = \frac{1}{\pi} * \left(\frac{1}{T_2}+\frac{1}{a}\right)$$

vorher nachher

Die besten Ergebnisse erzielt man mit einer Funktion, welche die Peakbreite verdoppeln, also $T_2 = a$ ***(„matched filter***“).

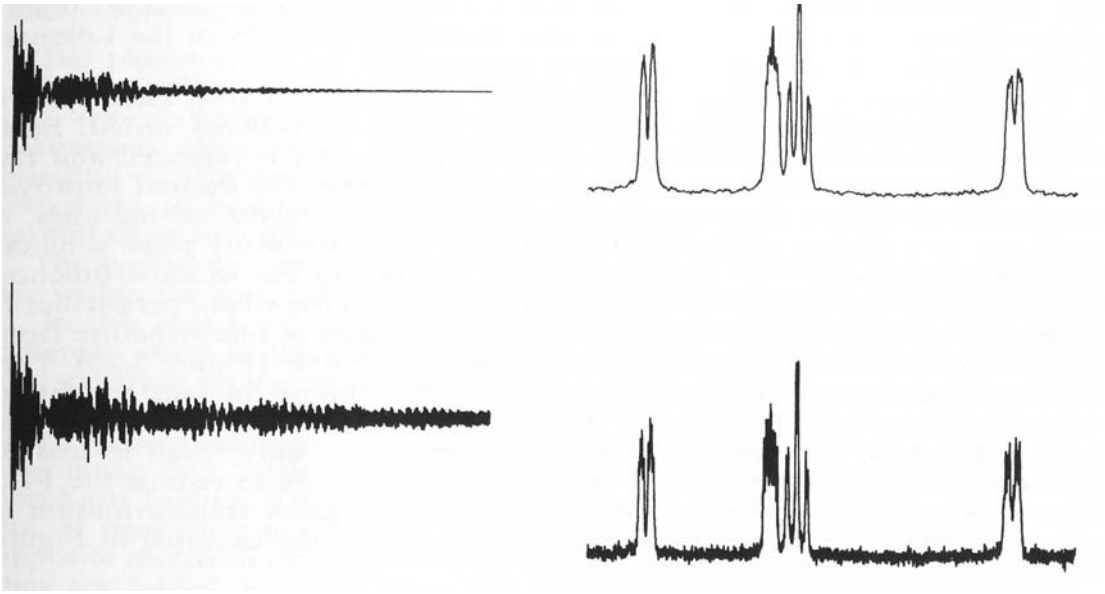


Bild 9: Matched filter

Ein anderes Beispiel für eine Window Funktion ist die ***Lorentz-Gauß-Transformation***. Diese Funktion G verstärkt die Signale im vorderen Bereich des FID und fällt dann gegen Null.

$$G = e^{-\frac{t}{a}} * e^{-\frac{t^2}{b}}$$

Dadurch wird erreicht, daß die Peaks feiner werden (die Auflösung wird verbessert), allerdings wird auch das Rauschen verstärkt, so daß sich das „signal-to-noise-ratio“ verschlechtert.

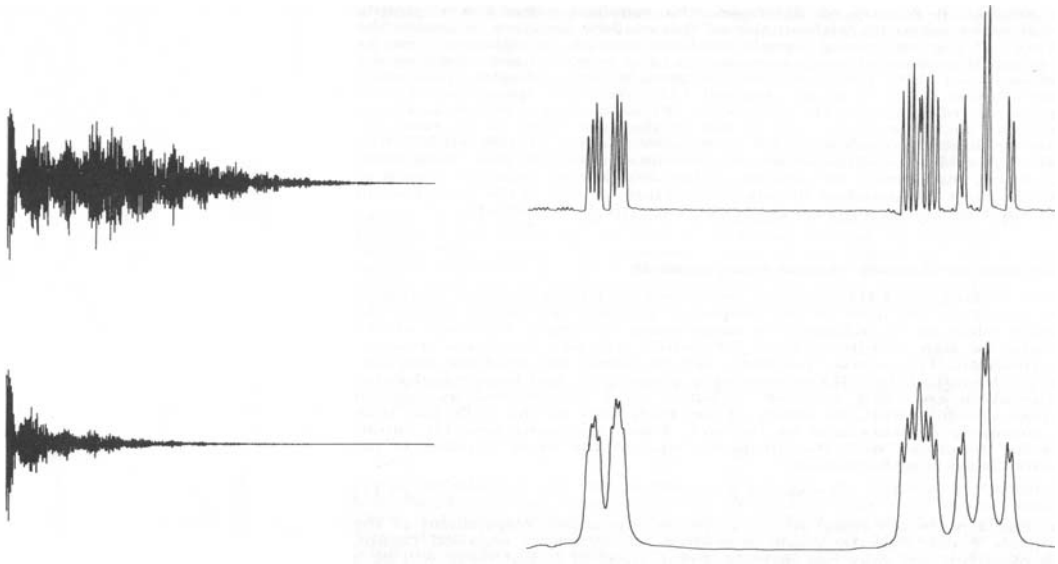


Bild 10: Lorentz-Gauss Transformation

Die Wahl der Window Funktion hängt also im Wesentlichen davon ab, ob man auf Intensitäten oder Feinstruktur Wert legt.

Literatur

Andrew E. Derome, Modern NMR Techniques for Chemistry Research, 1987, Pergamon Press

3. J-Kopplungen und Konformationsuntersuchungen

J-Kopplungen

Im NMR-Experiment ist ein Kern einem äußeren Magnetfeld ausgesetzt, das beeinflusst wird durch die den Kern umgebende Elektronenhülle und andere Kerne in der Umgebung.

Bekanntes über die Spin-Spin-Kopplung

- Spin-Spin-Kopplungen treten auf zwischen nicht magnetisch äquivalenten Kernen, die durch eine (direkt, ^{1}J), zwei (geminal, ^{2}J) oder drei Bindungen (vicinal, ^{3}J) voneinander getrennt sind
- Man unterscheidet die verschiedenen Signalfeinstrukturen: Singuletts, Dupletts, Triplets, Quadrupletts, ..., allgemein nennt man sie Multipletts
- Koppelt ein Kern mit mehr als einer Sorte chemisch äquivalenter Kerne so treten Kombinationen der oben genannten Signalfeinstrukturen auf: Duplett von Duplett, Triplett von Duplett usw.
- Spin-Spin-Kopplungen gibt es zwischen Kernen derselben Sorte (homonuklear) und zwischen Kernen verschiedener Elemente (heteronuklear)
- Eine Spin-Spin-Kopplung bedeutet, dass die Orientierung des Spins eines Kerns A das lokale Magnetfeld am koppelnden Kern X beeinflusst und umgekehrt

Die Kopplungskonstante J

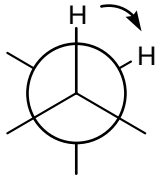
- beschreibt die Größe der Kopplung, die hier direkt aus dem Abstand der beiden X-Linien bzw. dem gleichgroßen Abstand der beiden A-Linien entnommen werden kann. Für Protonen-Protonen-Kopplung liegen die Konstanten etwa zwischen –20 und +20 Hz.
- Die Kopplungskonstanten sind unabhängig vom äußeren Magnetfeld B_0.
- Mit zunehmender Zahl der Bindungen zwischen A und X nimmt $J_{A,X}$ im allgemeinen ab.

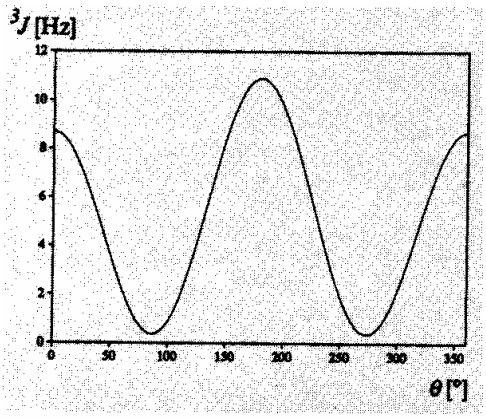
Konformationsuntersuchungen mit Hilfe von J-Kopplungen

Kopplungskonstanten eignen sich zur Festlegung der lokalen Konformation.
Die ^{3}J-Kopplung hängt außer von Substituenteneinflüssen wesentlich vom Molekülbau ab (Bindungslängen, Bindungswinkel und Torsionswinkel).

Bei vicinalen Kopplungen an „frei“ drehbaren (C-C)-Bindungen ändert sich die Größe der Kopplungskonstante mit dem Torsionswinkel θ. Diese Abhängigkeit wird graphisch in der Karpluskurve dargestellt:

Bild 1: a) Torsionswinkel θ b) Karpluskurve





Obwohl die Parameter, welche die jeweilige Karplus-Kurve spezifizieren, von Fall zu Fall verschieden sind, stimmt der Verlauf dieser Kurve bei fast alle Kernkombinationen qualitativ überein:

- lokales Maximum für θ = 0°
- globales Maximum für θ = 180°
- globale Minima für θ = 90° bzw. 270°

Der Verlauf der Kurve wird durch die Karplus-Gleichung beschrieben

$$J = A \cos^2 \theta B \cos \theta + C$$

A,B und C sind empirische Konstanten mit ungefähren Werten von 4 Hz, -0,5Hz und 4,5 Hz. Sie werden je nach Kernkombinationen und Molekülen variiert.

Zusammenhang zwischen der Karplusbeziehung und Sekundärstrukturelementen in Proteinen

Aufgrund des Doppelbindungscharakters der Peptidbindung ist diese relativ starr. Deshalb sind die Torsionswinkel ϕ (Tosionswinkelsequenz C(=O)-N-C^{α}-C(=O))und ψ (N-C^{α}-C(=O)-N) die entscheidenden Parameter, um die Konformation des Peptidrückgrats, speziell jeder einzelnen konformationellen Repetiereinheit einer Polypeptidkette zu beschreiben.

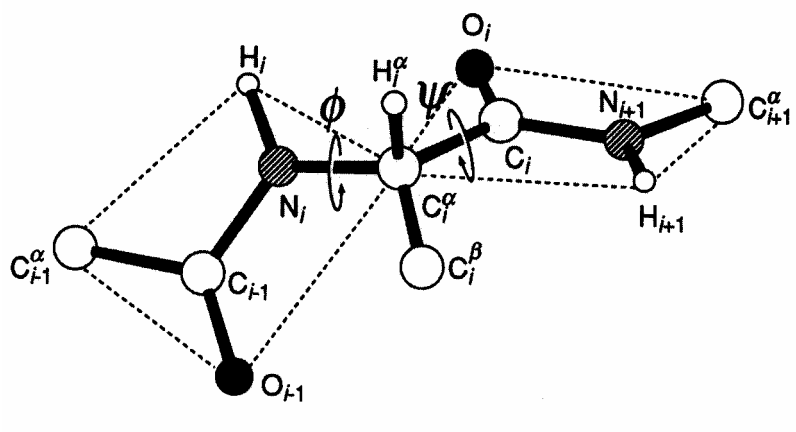


Bild 2: Die entscheidende Teilstruktur bei Polypeptidketten

Anhand des Ramachandran-Plots erkennt man, dass nur bestimmte Werte für den Winkel ϕ und ψ erlaubt, d.h. energetisch günstig sind.

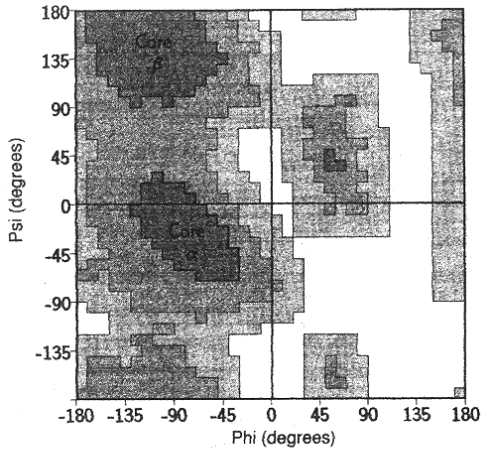


Figure 3. Ramachandran plot showing the core (right-handed) α and β regions as defined by Morris *et al.* (1992).

Bild 3: Ramachandran-Plot

Die beiden Torsionswinkel ϕ und ψ stehen nach Karplus in direkter Beziehung zu den entsprechenden Kopplungskonstanten. Aufgrund der Karplusbeziehung kann man ausgehend von Kopplungskonstanten Sekundärstrukturelemente (über Torsionswinkel) voraussagen. Unter Ausnutzung dieser Beziehung ist es ebenfalls möglich anhand von Torsionswinkeln, die über Röntgenstrukturanalyse ermittelt wurden, die Kopplungskonstanten zu errechnen.

Bild 4(links): Karplusbeziehung zwischen dem Torsionswinkeln ϕ bzw. ψ und $^3J_{NH\alpha}$

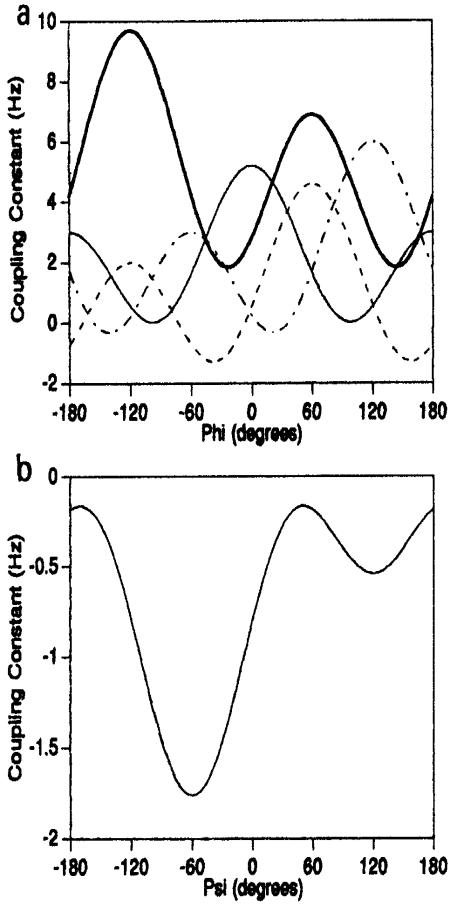


Figure 1. Graphs showing the relationship, predicted by the Karplus equation, between (a) the ϕ torsion angle and $^3J_{HN\alpha}$ (bold line), $^3J_{HNCO}$ (thin line), $^3J_{HNC\beta}$ (dot-dash line) and $^3J_{Ci-1Hai}$ (broken line) coupling constants. (b) the ψ torsion angle and the $^3J_{NiHai-1}$ coupling constant. The graphs were calculated using the parameters for the Karplus equation given in the Methods section. The ϕ and ψ torsion angles are defined according to the IUPAC-IUB convention (1970), ϕ referring to the torsion angle sequence of atoms C(*i* – 1), N*i*, Cα*i*, C*i*, and ψ to the sequence N*i*, Cα*i*, C*i*, N(*i* + 1).

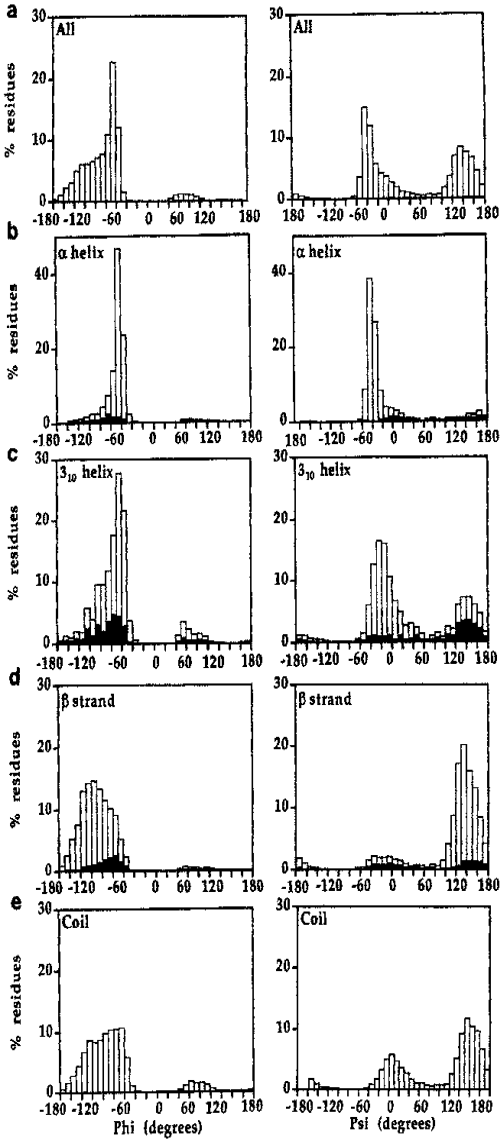


Figure 2. Histograms showing the distribution of ϕ and ψ torsion angles for residues in 85 high resolution structures. a, All residues; b, α helices; c, 3_{10} helices; d, β strands; e, no secondary structure (coil residues). The values for terminal residues in the secondary structure regions are shown in black in the distributions.

Bild 5(rechts): Gemessene ϕ und ψ Winkel aus hochaufgelösten Röntgenkristallstrukturen (Auflösung > 2,0 A und R > 0,20) von 85 Proteinen

Bestimmte Werte des Winkels ϕ sind mit bestimmten Sekundärstrukturelementen verknüpft.

	Theoretische Werte:	Durchschnittswerte aus Bild 5
α-Helix:	ϕ = -57°	ϕ = -64,7°
3_{10}-Helix	ϕ = -49°	ϕ = -62,8°
Paralleles β-Faltblatt:	ϕ = -119°	ϕ = -112,6°
Antiparalleles ß-Faltblatt:	ϕ = -139°	

ϕ und ψ-Winkel bilden ein breites Spektrum in allen drei Sekundärstrukturelementen. Sterische Kriterien und Attraktionskräfte können auch bei irregulären Strukturen ausreichend erfüllt werden, beispielsweise geknickte oder gekrümmte α-Helix, da jede Aminosäure eine unterschiedliche lokale Umgebung hat. Diese Abweichungen sind insbesondere für die Aminosäuren am Anfang oder Ende eines Sekundärstrukturelements groß (terminale Reste der Sekundärstrukturelemente sind in Bild 3 schwarz dargestellt).

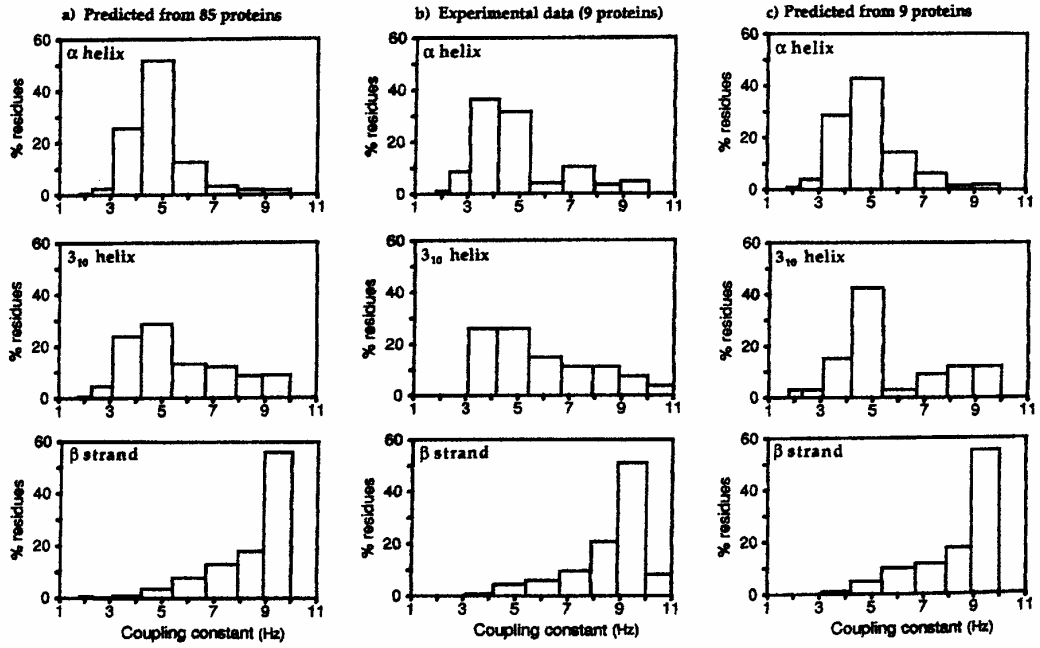


Figure 4. Histograms showing the distribution of $^3J_{HN\alpha}$ coupling constants for residues recognised from hydrogen bond criteria to be in α helices, 3_{10} helices and β strands. The terminal residues are not included in calculating these distributions. a, Coupling constants predicted from the ϕ angles of residues in the data base of 85 crystal structures; b, experimental coupling constants that are available for the nine proteins listed in the Methods section; c, coupling constants predicted from ϕ angles in the structures of the nine proteins whose experimental data are shown in b.

Bild 6: $^3J(H^N,H_\alpha)$-Kopplungskonstanten in Sekundärstrukturelementen

a) berechnet aus den ϕ Winkeln von 85 Röntgenkristallstrukturen
b) gemessen bei 9 Proteinen
c) berechnet aus den ϕ Winkeln der Strukturberechnung dieser 9 Proteine

Terminale Reste, die nicht charakteristisch für Sekundärstrukturen sind, wurden nicht in die Kalkulation miteinbezogen.

Der Vergleich zwischen den gemessenen und berechneten Kopplungskonstanten bei den gleichen Proteinen (b und c) zeigt, dass die Berechnung von J mit der Karplus-Gleichung und den hier verwendeten empirischen Parametern recht zuverlässig ist. Es zeigt sich auch, dass anhand des Wertes der Kopplungskonstante zwischen dem Amid- und C_α-Protons recht gut zwischen α-Helix, ß-Faltblatt und Coil-Strukturen unterschieden werden kann.

Die dafür normalerweise verwendeten Parameter führen zu einer richtigen Identifikation von ca. 70 - 80% der Sekundärstrukturen im Falle von α-Helices und ß-Faltblättern.

$^3J(H^N,H_\alpha) < 6$ Hz	α Helix
$^3J(H^N,H_\alpha) > 8$ Hz	ß Faltblatt
$6Hz < {}^3J(H^N,H_\alpha) > 8$ Hz	Coil Strukturen

Wegen des großen Bereichs an ϕ Winkeln und somit auch $^3J(H^N,H_\alpha)$-Kopplungen, die in einer 3_{10}-Helix vorkommen, kann man dieses Sekundärstrukturelement nur schwer anhand von $^3J(H^N,H_\alpha)$-Kopplungen identifizieren (58 %).

Dies spiegelt sich auch in den Kopplungskonstanten berechnet aus 85 Proteinkristallstrukturen und aus theoretischen, idealisierten Sekundärstrukturelementen wider:

	Aus 85 Proteinen ermittelt	aus idealisierten Elementen ermittelt
α-Helix	4,8 Hz	3,9 Hz
3_{10}-Helix	5,6 Hz	3,0 Hz
ß-Faltblatt	8,5 Hz	8,9 Hz (antiparallel) bzw. 9,7 Hz (parallel)

Diese Werte unterscheiden sich signifikant, stimmen aber gut mit erhaltenen NMR-Daten von den 9 Proteinen überein. Generell kann man die Kopplungskonstante als Basis für die Analyse von Sekundärstrukturen nativer und ungeordneter Protein verwenden.

Literatur

Biochemistry 1994, 33, 5481-5492, Schwalbe and Griesinger: Conformation of Valine Side Chains in Ribonuclease T_1 Determined by NMR Studies of Homonuclear and Heteronuclear ^3J Coupling Constants.

J.Mol.Biol. 1996, 255, 494-506, Smith, Bolin, Schwalbe: Analysis of Main Chain Torsion Angles in Proteins: Prediction of NMR Coupling Constants for Native and Random Coil Conformations.

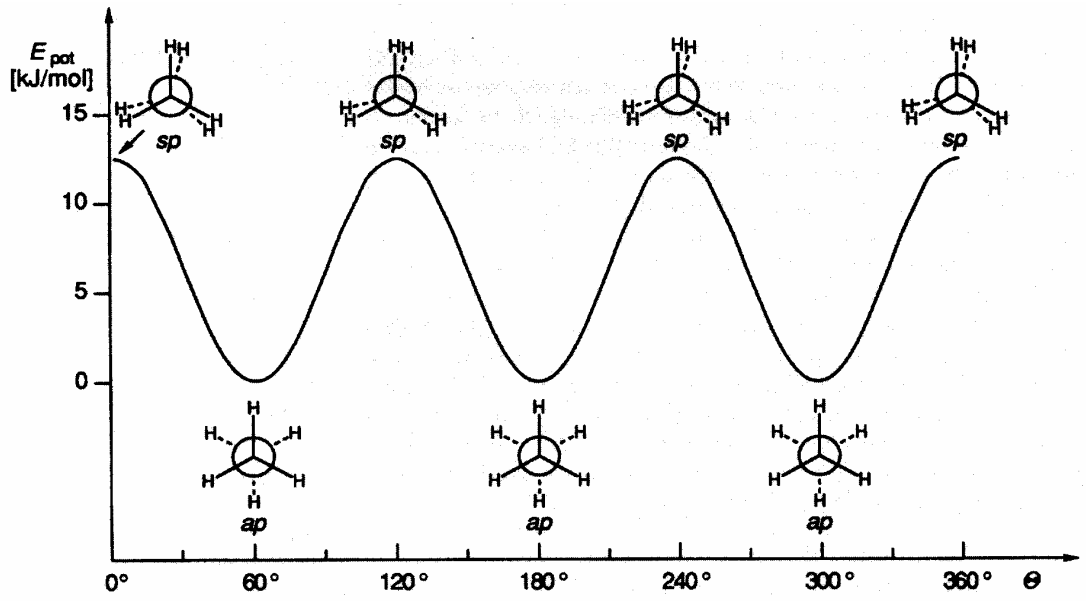
Quinkert, Griesinger: Aspekte der organischen Chemie, VCH Weinheim, 1995.

Hesse, Meier, Zeeh: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1991

Bestimmung des χ_1-Winkels von Valin Seitenketten bei Ribonuclease T_1

Anhand eines Energiediagramms für Torsionswinkel sieht man, dass die gestaffelten Konformationen energetisch bevorzugt sind.

Bsp. Ethan: Die innere Rotationsenergie des Ethans (der beiden Methylgruppen gegeneinander) beschreibt eine Sinuskurve. Die Barriere der inneren Rotation beträgt ca. 12 kJ/mol. Die gestaffelten Konformationen liegen in den Energieminima vor, während die ekliptische Konformation maximale Energie benötigt. Man spricht von Torsionsspannung oder Pitzer-Spannung.



Für den χ_1-Winkel, der Seitenkette von Valin sehen die gestaffelten Rotamere wie folgt aus:

(Erinnerung: Die Bindungen der Seitenketten werden von χ_1 bis χ_n durchnummeriert.)

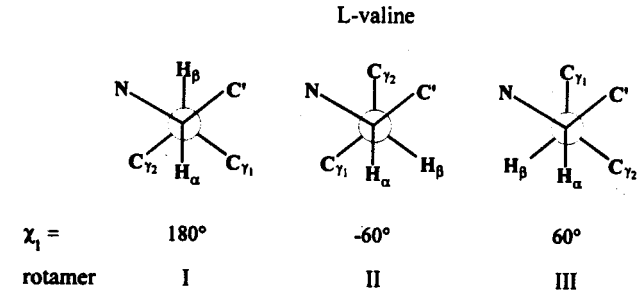


Bild2: gestaffelte Seitenkettenkonformationen von L-Valin

	relative Häufigkeit der Rotamere		
	I	II	III
α-Helix	87	3	10
nicht α o. β	56	15	29
β-Faltblatt	69	17	14

In der günstigsten χ_1-Konformation (180°) für Valin vermeiden die beiden Cγ-Atome die sterisch ungünstige Position Zwischen N und C.

Für Proteine ist die energieminimalste gestaffelte Konformation nicht völlig korrekt. Zum einen können nicht gestaffelte Rotamere auftreten, weil das Potentialminimum eines Torsionswinkels durch Wechselwirkungen in der Proteinmatrix verschoben wird, beispielsweise durch Wasserstoffbrückenbindungen. In kristallographischen Untersuchungen wurde sogar schon ekliptische Konformationen entdeckt. Zweitens verfügen Proteine über ein hohes Mass an lokaler Mobilität in dem Rückgrat sowie den Seitenketten. Winkelfluktuationen bis zu +-15° konnten über Relaxationsuntersuchungen und MD Simulationen nachgewiesen werden.

Kristallographische Konformationsuntersuchungen haben den Vorteil, dass das Protein in Kristallen die energieminimalste Konformation einnimmt. Existieren mehrere davon, werden sie in statistischer Verteilung detektiert:

$$J^{beob} = x\,J^{I} + y\,J^{II} + (1-x-y)\,J^{III} \qquad x = y = 1/3$$

Probleme bei NMR-Konformationsuntersuchungen der Valin-Seitenkette treten auf, da sie nicht notwendigerweise in nur einer Konformation vorliegt. Der Wechsel zwischen zwei Konformationen erfolgt schnell gegenüber einer typischen NMR-Zeitachse. Das bedeutet eine gemessene vicinale Kopplungskonstante gibt den Mittelwert der Verteilung zwischen allen möglichen Konformationen an. Dies erschwert die Zuordnung der Kopplungskonstanten auf einen Torsionswinkel nach der Karplusbeziehung.
Ohnehin liefert die Karplusbeziehung für einen gegebenen ^{3}J-Wert bis zu 4 verschiedene Torsionswinkel, so dass unterschiedliche Messungen der Kopplunskonstanten vorgenommen werden müssen.

Die meisten Ansätze zur Untersuchung von Torsionswinkeln nehmen neben den ^{3}J-Daten kristallographische Koordinaten oder NOE Distanzen hinzu.

Bei der Ribonuklease T1 wurde versucht, die Konformationen der Valinseitenketten ausschliesslich über die ^{3}J-Kopplungskonstanten aufzukären. Dabei kommen folgende in Frage:

$^3J_{H\alpha H\beta}$, $^3J_{NH\beta}$, $^3J_{C'H\beta}$, $^3J_{H\alpha C\gamma 1}$, $^3J_{H\alpha C\gamma 2}$, $^3J_{C'C\gamma 1}$ und $^3J_{C'C\gamma 2}$

Mittels E.COSY (Exclusive Correlation Spectroscopy nach Griesinger) multidimensionalen homonuklearen (^{1}H, ^{1}H und ^{13}C, ^{13}C) und heteronuklearen (^{1}H, ^{15}N und ^{1}H, ^{13}C) NMR-Techniken wurden die oben genannten Kopplungskonstanten untersucht und in den Torsionswinkel χ_1 übersetzt. Die Ergebnisse wurden mit NOE Abstandsinformationen sowie der Kristallstruktur der Ribonuklease T_1 verglichen.

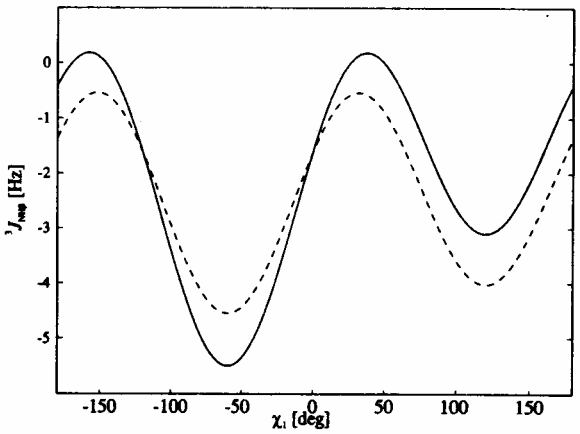


Bild3: ^{3}J(N,H$_ß$)-Kopplungskonstante in Bezug zum χ_1-Winkel

Es wurden 3 verschiedene Modelle zur Durchschnittsbildung von Kopplungskonstanten verwendet, mit denen der Torsionswinkel χ_1 drei der ^{3}J-Kopplungskonstanten zugeordnet werden ($^3J_{H\alpha H\beta}$, $^3J_{NH\beta}$, $^3J_{C'H\beta}$) konnte.

Bei 2 Valin-Seitenketten (Val33 und Val78) in Ribonucleasse T_1 wurde ein Gleichgewicht zwischen gestaffelten Rotameren festgestellt. Bei vier Valinresten (Val16, Val67, Val79, Val101) wurden nur einfache Rotamere identifiziert. Abgesehen von Val52 und Val78 stimmten die vorherrschenden Rotamere, die über die ^{3}J-Kopplung erhalten wurden, mit der Konformation der Kristallstruktur der Ribonuklease T_1 überein. Die Analyse hing stark von den verwendeten Karplusparametern ab.

4. Chemischer Austausch

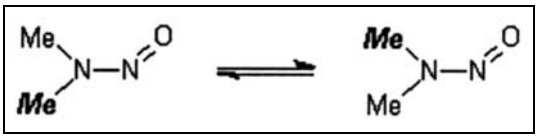
Theoretische Grundlagen

Chemischer Austausch und seine Folgen

Beim chemischen Austausch werden zwei Kerne mit unterschiedlicher Resonanzfrequenz, ν_A und ν_B miteinander vertauscht (Bindungsbruch) oder ineinander überführt (Konformationsänderung). In Abhängigkeit der Frequenz bewirkt der chemische Austausch die Veränderung des Erscheinungsbildes (Aufspaltung und Lage) von NMR-Peaks. Selbst die Auslöschung eines Signals ist möglich.

Beispiel: Dimethylnitrosamin

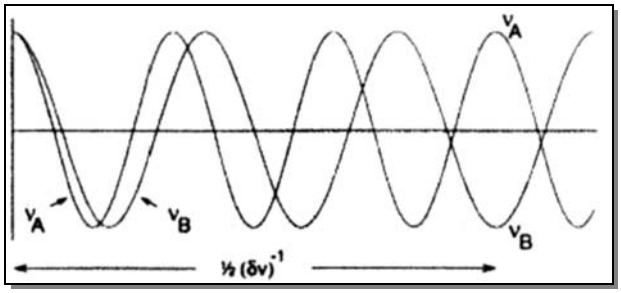
Eines der einfachsten Beispiele für den chemischen Austausch ist Dimethylnitrosamin:



Die beiden Konformationen sind energetisch identisch, aber die chemische Verschiebung der Methylgruppen unterscheiden sich voneinander. Durch Rotation um die NN-Bindung können die beiden Methylgruppen ineinander überführt werden. Hierdurch tauschen beide ihre chemische Umgebung und somit ihre chemische Verschiebung. Es kommt zum chemischen Austausch. Die Protonen beider Gruppen besitzen einmal die Resonanzfrequenz ν_A und nach einer 180° Drehung die Resonanzfrequenz ν_B.

Phasendifferenz – Grundlage der Detektion

Um mit Hilfe der NMR zwei getrennte Signale detektieren zu können, müssen zwei Kerne im Verlauf der Messung zu einer Phasendifferenz ihrer Resonanzfrequenz kommen. Ist keine eindeutige Phasendifferenz zwischen ν_A und ν_B vorhanden, so werden die Signale – mehr oder weniger – als ‚ein' Signal wahrgenommen.



Die Zeit die zwei Frequenzen benötigen, um zu einer Phasendifferenz von 180° zu gelangen, ist proportional des Frequenzunterschieds.

Nach einer Zeit $t = \frac{1}{2}(\nu_A - \nu_B)^{-1} = \frac{1}{2}(\delta\nu)^{-1}$ beträgt die Phasendifferenz 180°.

Unterteilung des chemischen Austausches aufgrund der exchange-rate

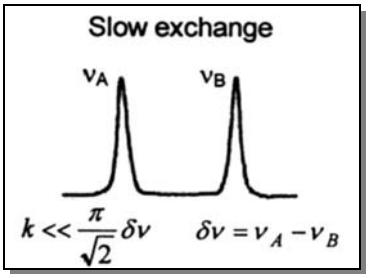
Man unterteilt den chemischen Austausch in langsamen, mittleren und schnellen Austausch (engl.: *slow exchange*, *intermediate exchange* bzw. *fast exchange*).

In Beispiel des Dimethylnitrosamin besitzt die NN-Bindung einen partiellen Doppelbindungscharakter. Daher ist die Rotation energetisch gehindert und ihre Frequenz stark temperaturabhängig. Mit zunehmender Temperatur verändert sich der chemischer Austausch somit vom *slow exchange*, über den *intermediate exchange* zum *fast exchange*.

„slow exchange“

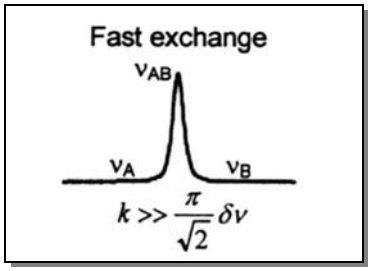
Findet innerhalb der Messzeit (der Zeit die den Resonanzfrequenzen verbleibt eine Phasendifferenz aufzubauen) kein bzw. wenig Austausch statt, so sind zwei getrennte Peaks für die beiden Kerne detektierbar.

Die *Austauschrate k* ist deutlich kleiner als die Differenz der Resonanzfrequenzen.

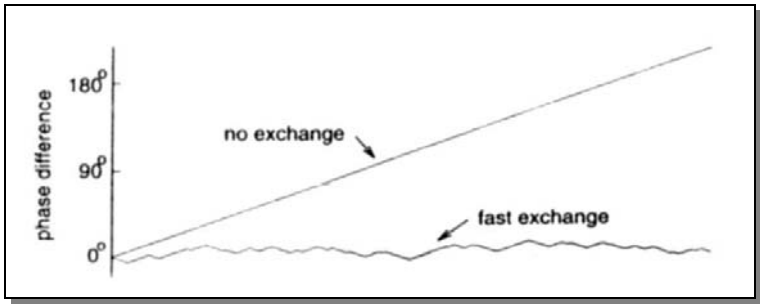


„fast exchange“

Kommt es während der Zeit die zum Erreichen der Phasendifferenz benötigt wird zu häufigem Austausch der chemischen Umgebung, so mitteln sich die beiden Frequenzen zu einer Durchschnittsfrequenz n_{AB}. Die Austauschrate k ist hier wesentlich größer als die Differenz der Resonanzfrequenzen.



Der Grund für diese Phänomen kann leicht beschrieben werden. Betrachtet man ein System mit chemischen Austausch über eine längere Zeitperiode, so ergibt sich folgender Zusammenhang für Phasendifferenz und Zeit:

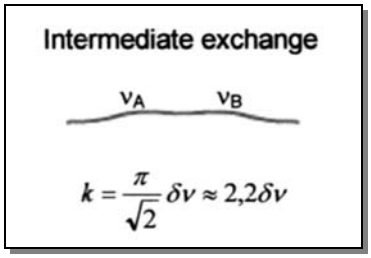


Im System mit geringer Austauschrate k verweilen die Kerne relativ lange in den unterschiedlichen chemischen Umgebungen A und B. Dadurch haben ihre Resonanzfrequenzen einen entsprechend hohen Anteile von n_A bzw. n_B. Die zwei Kerne können somit getrennt detektiert werden. Je kleiner die Austauschrate – je länger der Aufenthalt in den unterschiedlichen Umgebungen – , desto schneller wächst die Phasendifferenz mit der Zeit.
Besitzt das System hingegen eine hohe Austauschrate k, so mitteln sich die Aufenthaltszeiten der Kerne für die Umgebung A und B. Durch dieses ‚Mitteln' kommt es zu einer entsprechenden ‚Anpassung' der Resonanzfrequenz beider Kerne. Je schneller der Austausch zwischen den beiden Systemen erfolgt, um so besser gleichen sich die Resonanzfrequenzen für Kern A und B an und gehen schließlich in einen gemeinsamen Peak entsprechender Intensität über. Die Phasendifferenz bleibt daher nahezu 0.

intermediate exchange

Den Übergang zwischen slow- und fast-exchange wird als intermediate exchange bezeichnet. Er verläuft fließend, ohne eindeutige Grenzen. Hierbei kommt es zu einem Übergang von den zwei getrennten Peaks des slow-exchange zum Peak des fast-exchange. Man bezeichnet dieses Phänomen als KOALESZENZ.

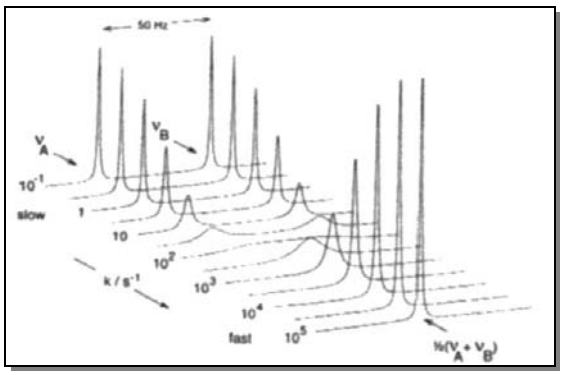
Es tritt auf, wenn die Austauschrate k ungefähr der Differenz der Resonanzfrequenzen n_A und n_B entspricht:



Lifetime-broadening oder uncertainty broadening

In den zwei Extreme (kein Austausch und Austausch mit k $\rightarrow \infty$) zeigen die Peaks eine sehr geringe Linienbreite. Steigt die Austauschrate ausgehend von geringen k, so kommt es zu einer Linienverbreiterung. Je schneller der Austausch, desto breiter, bzw. unschärfer werden die Peaks. Da der Austausch jedoch noch langsam genug ist, sind eindeutig zwei Peaks zu erkennen. Mit der Verbreiterung geht eine Abnahme in der Höhe und eine Annäherung beider Peaks einher.

Im Fall der Koaleszenz, weißt das Spektrum ein flaches Plateau auf. Steigt k weiter an, so erhebt sich nach und nach aus der Mitte dieses Plateaus ein neuer Peak, der mit steigender Austauschrate an Schärfe und Höhe gewinnt. Für große k resultiert somit ein einziger scharfer Peak.



Im langsamen Austausch ist die Linienverbreiterung Δn direkt proportional zur Austauschrate k:

$$\Delta\nu = \frac{k}{\pi}$$

Im schnellen Austausch ist sie umgekehrt proportional zur Austauschrate:

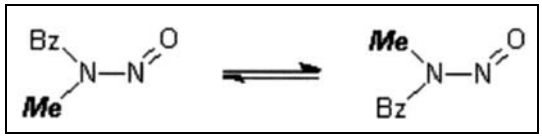
$$\Delta\nu = \frac{\pi \cdot (\delta\nu)^2}{2} \cdot \frac{1}{k}$$

Δν ist dabei nicht zu verwechseln mit δν!! Δν ist nicht die Differenz aus νA und νB, sondern die Differenz der Peakbreite auf halber Höhe. Nicht nur chemischer Austausch beeinflusst die Linienbreite. Auch dipolare und quadrupolare Kopplungen und Relaxationen verändern die Linienbreite. Im Experiment führt dies oft zu Problemen, da nicht genau unterschieden werden kann, welcher Faktor gerade der ausschlaggebende für die Verbreiterung ist.

Symmetrischer und asymmetrischer Austausch

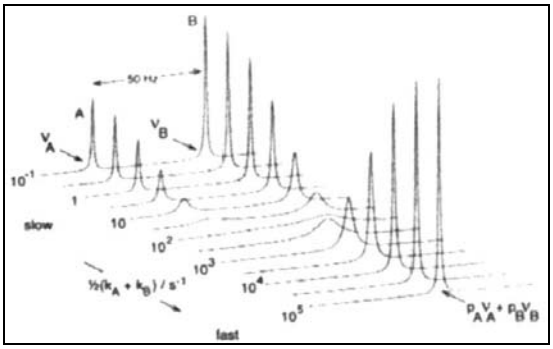
Wenn die Konformationen eines chemischen Austausches energetisch identisch sind, so sind beide Zustände gleich populiert und die Peaks dementsprechend symmetrisch. Findet nun aber ein chemischer Austausch zwischen energetisch ungleichen Zuständen statt, so sind diese ungleichmäßig populiert und die Peaks verhalten sich asymmetrisch zueinander.

Beispiel: Benzylmethylnitrosamin:



Die erste Konformation diese Moleküls ist energetisch günstiger und dadurch stärker populiert. Die Resonanzfrequenzen sind daher ebenfalls verschieden intensiv. Es ergibt sich somit ein NMR-Signal mit verschieden großen Peaks (langsam), bzw. einem gemittelten Peak mit gewichteter Resonanzfrequenz (schnell). Die Gewichtung hierbei entspricht:

$$\nu_{AB} = p_A\nu_A + p_B\nu_B$$



NMR-time-scale

Ein wichtiger Aspekt des chemischen Austauschs ist der sog. NMR-time-scale. Ein Austausch ist langsam bezüglich der NMR-Zeitskala, wenn man noch beide Signale erkennt, intermediate, beim Erscheinen der Koaleszenz und schnell, wenn man nur noch ein Signal für beide Kerne erhält.

Die Zeitskala selbst ist geräteabhängig. Ein Austausch der auf einem 100 MHz Spektrometer schon als ein schneller Austausch erscheint, kann oftmals auf einem 500 MHz Gerät noch als langsamer Austausch aufgelöst werden.

Beispiel:

Der Abstand zweier Signale betrage 1 ppm. Für ein 100 MHz Spektromer ergibt sich daher, nach Verwendung der Gleichung für die Koaleszenz, eine Austauschrate von 220sec^{-1}. Auf einem 500 MHz Gerät erscheint die Koaleszenz erst bei einer Austauschrate von 1100sec^{-1}.

Beispiele für Systeme mit chemischen Austausch

- Protonen an Alkoholgruppen
- Amidprotonen
- ATP in Gegenwart oder Abwesenheit von Mg^{2+}
- Rotation von aromatischen Seitenketten in Proteinen
- Cis/Trans Isomerie von Prolin

Arbeiten mit Spektren des chemischen Austauschs

Da es nicht möglich ist aus der Komplexität eines experimentellen Spektrums hinreichende Schlüsse über den chemischen Austausch und die Dynamik des Moleküls zu extrahieren, geht man bei der Untersuchung solcher Moleküle den entgegengesetzten Weg:

Man erarbeitet eine Hypothese, berechnet eine Reihe theoretischer Spektren und vergleicht diese mit dem experimentellen Werten. Der Vergleich führt zur Falsifizierung oder Verifizierung der Spektren. Das Spektrum, welches alle Randbedingungen erfüllt und am besten passt (fitted), wird ausgewählt. Die dem Spektrum zu Grunde liegende These und Parameter werden als zutreffend angenommen.

Dynamische NMR-Spektroskopie: Cis/Trans Isomerie von Prolin

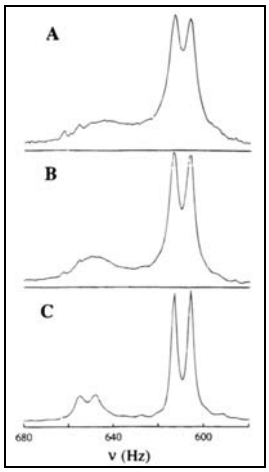
Cyclophilin (Cyp18) ist ein cytosolisches Enzym, welches die cis/trans Isomerisierung von Peptid-Prolin Bindungen katalysiert - es gehört damit zu den Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerasen (PPIasen). PPIasen sind pharmazeutisch interessante Enzyme, da sie als Bindungspartner für einige Immunsuppresiva dienen und da Cyclophilin maßgeblich an der Bildung von infektiösen HIV-Partikeln beteiligt zu sein scheint.
Um wirkungsvolle Arzneimittel herstellen zu können, die an PPIasen angreifen können, muss der Katalysemechanismus der PPIasen verstanden werden. Mit Hilfe von NMR-spektroskopischen Methoden konnte der Mechanismus von Cyp18 weiter aufgeklärt werden, als dies mit den klassischen Aktivitäts-Assays möglich war.

Der klassische PPI-Assay

Eine spezifische Protease kann das (4-)Nitroanilid von N-Succinyl-Ala-Phe-Pro-Phe-(4-)-nitroanalid abspalten, wenn Prolin sich in trans-Konformation befindet. Die Konzentrationsänderung kann photometrisch bestimmt werden. Man kann also kinetische Untersuchungen in cis $\rightarrow$ trans-Richtung durchführen. Die Rückreaktion kann nicht untersucht werden, da die trans-Konformation stetig abgebaut wird. Es kann sich bei diesem Assay auch kein Gleichgewicht zwischen cis und trans einstellen, da dieses ständig durch die Protease gestört wird. Es können also keine Gleichgewichtskonstanten bestimmt werden.

Line-Shape-Analysis

Es können nun NMR-Spektren aufgenommen werden, in denen die Konzentrationen von Enzym und Substrat verändert werden. - Für einige Protonen treten getrennte Peaks für cis und trans Konformation auf, d. h. der chemische Austausch ist langsam, bezogen auf die NMR-Zeitskala.
Eine niedrige Substratkonzentration kann noch relativ schnell umgesetzt werden, man hat breite Peaks. Gibt man nun mehr Substrat hinzu, so wird der Austausch insgesamt langsamer da das Enzym bereits gesättigt ist. Man hat einen größeren Poo1 an cis und trans Isomeren, die nicht am Austausch beteiligt sind. Daher kommt es zu schärferen Peaks. (Siehe Abbildung: Methylprotonen des Alanins. Steigende Substratkonzentration von A nach C bei konstanter Enzymkonzentration. - Die Substratkonzentration in A liegt bereits über K_M!)

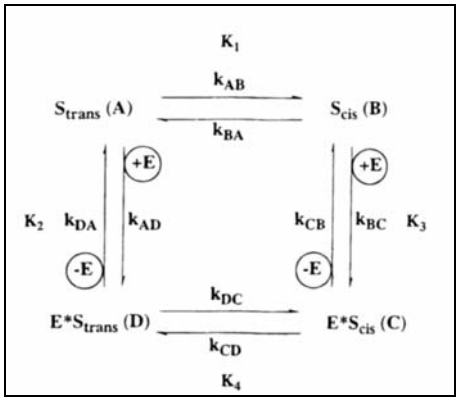


Man pickt nun bestimmte, dem Substrat zugehörige, Bereiche aus dem Spektrum heraus mit denen man später arbeitet. Im vorliegenden Versuch , wurden u.a. die Methylprotonen des Alanins und die Amidprotonen der Phenylalanine gewählt. Diese haben in cis und trans Konformation des Proteins unterschiedliche chemische Verschiebungen.
Nun wird versucht mit einigen Arbeitshypothesen Spektren zu simulieren, die mit den experimentellen Spektren übereinstimmen. Dazu wird eine Matrix erstellt, die als Basis für ein Computerprogramm zur Berechnung eines Spektrums dient. In dieser Matrix sind folgende Parameter enthalten:

- Geschwindigkeitskonstanten
- Chemische Verschiebungen
- Transversale Relaxationsraten
- Kopplungskonstanten

Nicht alle diese Parameter sind bekannt. Chemische Verschiebung, Relaxation und Kopplungskonstanten für die freien cis und trans Isomere können in Abwesenheit des Enzyms gemessen werden, da ohne Enzym kein Austausch stattfindet.
Die restlichen Parameter werden ‚mit Bedacht' angenommen bzw. durch Iteration berechnet. Der Computer verändert die Parameter Stück für Stück so, dass am Ende eine Kurve entsteht die dem experimentellen Spektrum so gut wie möglich ähnelt. Man spielt nun so lange mit den Parametern, bis nicht nur jedes Spektrum einzeln gut simuliert - werden kann, sonder alle experimentellen Spektren mit einem Satz von Parametern simuliert werden können.

Für ein two-site und three-site-exchange-model konnte keine gute Übereinstimmung von simulierten und experimentellen Spektren erzielt werden.
Als geeignetes Modell erscheint das four site-exchange-model. Dabei liegen die cis und trans Isomere frei und Enzymgebunden vor. Es gibt also vier Zustände und vier Gleichgewichtsreaktionen. Mit diesem Modell wurden übereinstimmende Spektren simuliert. Allerdings kommt man mit verschiedenen Ausgangsparametern oftmals zu ähnlich guten Ergebnissen. Man muss daher überprüfen ob die Ausgangsparameter innerhalb zulässiger Grenzen liegen. (Methylprotonen haben definitiv eine chemische Verschiebung zwischen 0 und 2 ppm, usw.)

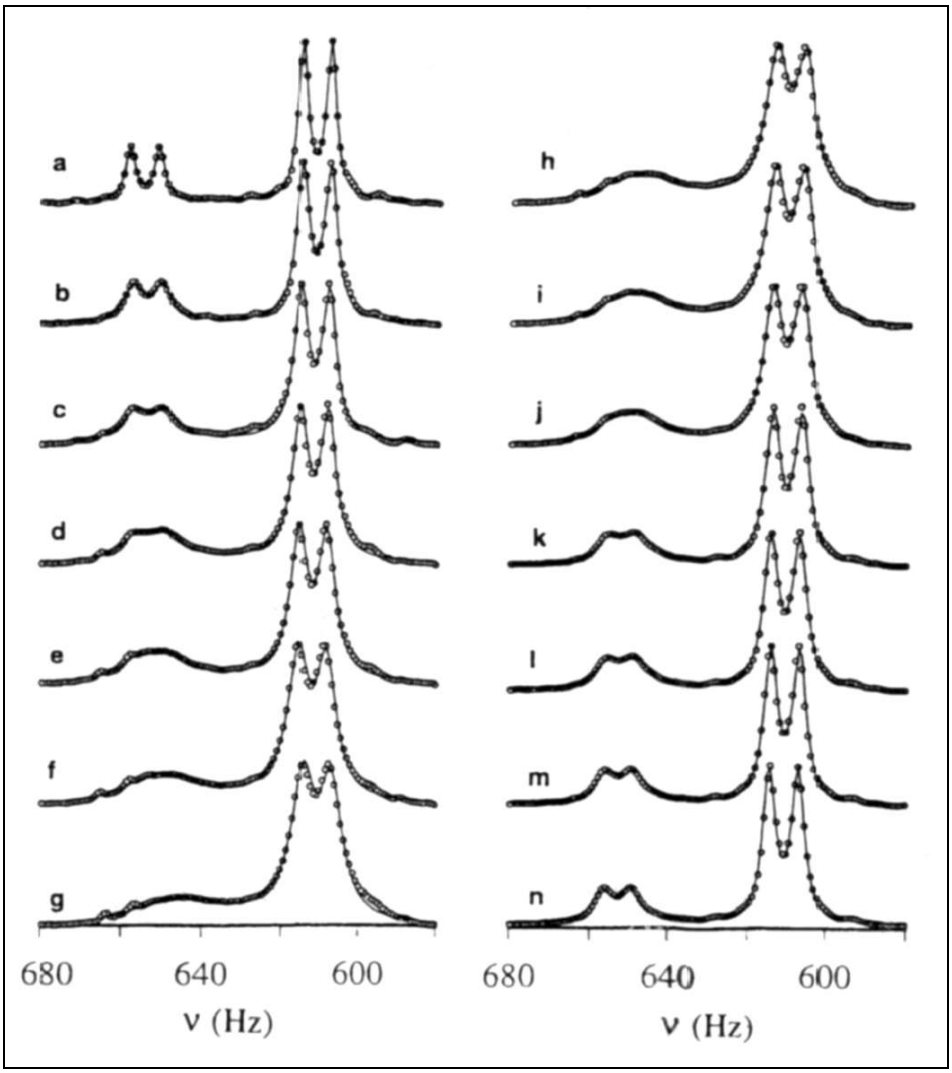


Wählt man nun die Spektren mit realistischen Parametern, so reduzieren sich die möglichen Lösungen.

Kombiniert man nunmehr die Ergebnisse der Line-Shape Analysis mit den kinetischen Daten aus dem klassischen proteolytischen Assay so kommt man zu einem einzigen Ergebnis.
Aus beiden Untersuchungen können k_{cat} und K_M, für die cis $\rightarrow$ trans Isomerisierung berechnet werden. Nur ein Parametersatz liefert dieselben Werte, wie der Assay.

Da mit keinem Parametersatz für das two- / three-site-exchange-model befriedigende Ergebnisse erzielt werden konnten und nach allen Einschränkungen mit einem Parametersatz für das four-site-exchange-model die experimentellen Werte gut simuliert werden konnten, kann man davon ausgehen, dass die Geschwindigkeitskonstanten für alle vier Gleichgewichte im four-site-exchange-model realistisch sind.

In der folgenden Abbildung sieht man wie gut die simulierten Spektren (-) mit den experimentellen (o) übereinstimmen. In der linken Spalte wurde die Enzymkonzentration schrittweise erhöht. In der rechten Spalte wurde wieder Substrat zugegeben.



Literatur

- HORE, PETER *Nuclear Magnetic Resonance – Chapter 4: 'Chemical exchange'*; Oxford University Press, page 44-50
- KERN, D. (1995) *Kinetic Analysis of Cyclophilin Catalysis by NMR*; Biochemistry 34(41): 13594-602
- GREINER, PETER (2001) *Chemischer Austausch* ; Vortrag im Rahmen des BPC IV Seminar – NMR der JWGU Frankfurt / Main

5. Markierungsmethoden in der NMR-Spektroskopie

Die NMR-Strukturbestimmung von Biomakromolekülen beruht auf der Expression von isotopenmarkierten Proteinen und der in-vitro Translation von RNA und DNA.

Bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen, vor allem größerer Proteine, treten vielfach Probleme auf, die eine detaillierte Analyse der Struktur und Dynamik erschweren. Bei kleineren Proteinen können bereits 2D-Spektren zur Vereinfachung beitragen. Da die Anzahl der Signale jedoch überproportional mit der Größe des Proteins ansteigt, kommt es vielfach zu Überlagerungen und somit zu einer schlechten Auflösung der Signale. Dadurch ist dann eine sequenzspezifische Zuordnung der Signale kaum möglich.

Bei der Strukturauflösung größerer Proteine kommen deshalb zum einen 3D-Spektren, zum anderen heteronukleare NMR-Experimente zur Anwendung.

NMR-aktive Atomkerne

Neben dem ^{1}H-Isotopen des Wasserstoffs enthält ein Protein weitere NMR-aktive Atomkerne. Bei der Strukturaufklärung spielen vor allem ^{15}N- und ^{13}C-Kerne eine wichtige Rolle. Jedoch ist ihre natürliche Häufigkeit sehr gering. ^{15}N-Kerne kommen nur mit einer Häufigkeit von 0,3% und ^{13}C-Kerne mit einer Häufigkeit von 1,1% vor. Neben diesem Nachteil weisen diese Isotope auch noch ein wesentlich kleines gyromagnetisches Verhältnis auf, was ihre relative Intensität bezogen auf Protonen stark vermindert. Auf der anderen Seite bietet die Isotopenmarkierung in einer Reihe von Punkten Vorteile:

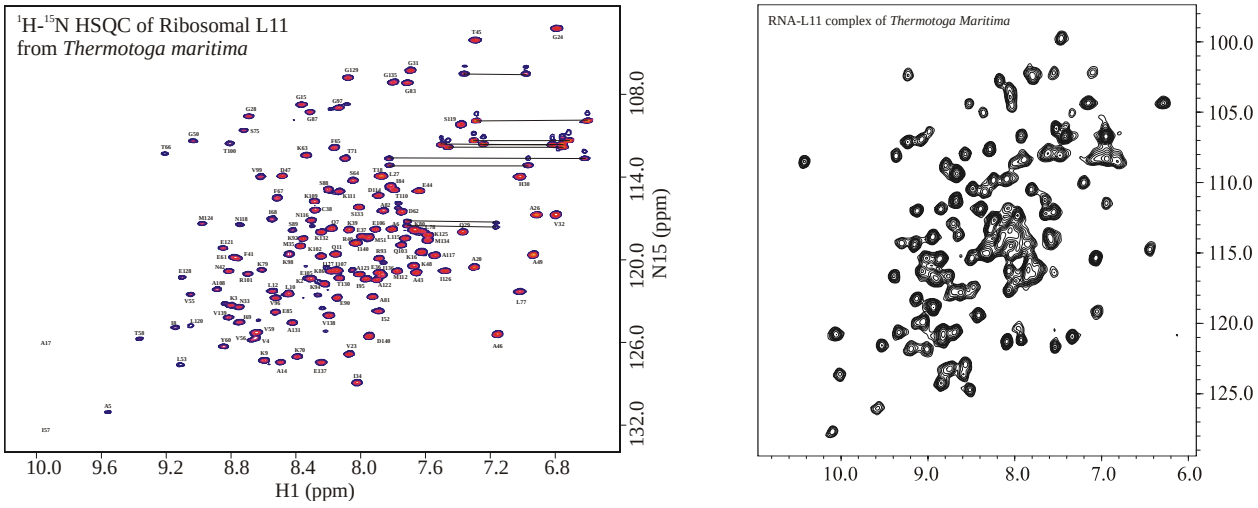


Abbildung 1: ^{1}H,^{15}N-Korrelationsspektrum eines RNA-bindenden freien Proteins (links) und des RNA-Protein-Komplexes (rechts). Das Protein hat 150 Aminosäuren, die RNA besteht aus 60 Nukleotiden. Das Protein ist ein ribosomales Protein.

- Durch die Durchführung von Experimenten, in denen z.B. NH Wasserstoffatom mit dem direkt gebundenen ^{15}N korreliert wird, erhält man ein sogenanntes $^{1}H,^{15}N$ HSQC. Jeder einzelne Peak ‚steht' somit für eine Aminosäure. Damit können Änderungen der Proteinkonformation oder Lösungsmittelzugänglichkeit oder auch die Wechselwirkung des Proteins mit einem Liganden (kleines Molekül, Ion, Protein, RNA, etc., siehe Abbildung 1, rechts) kartiert werden.
- In einem $^{1}H,^{15}N,^{13}C$-markiertem Protein gibt es entlang der Polypeptidkette eine ungebrochene Kette von NMR-aktiven Kernen (siehe Kapitel 8). Damit kann man Korrelationsspektren aufnehmen, in denen jeder Korrelation für eine kovalente Bindung ‚steht'. Zum Beispiel ist ein HNCO Experiment ein Experiment, in dem das Amidproton mit dem Amidstickstoff mit dem Carbonylsauerstoff verknüpft wird. Für diese HNCO Korrelation werden die folgende ^{1}J-skalaren Kopplungen ausgenutzt: $^{1}J(N,H)\sim90Hz$, $^{1}J(N,C')\sim15Hz$. Diese skalaren Kopplungen sind nur in sehr geringem Masse von der Konformation abhängig, so dass im Gegensatz zum Sequenzierungsansatz mittels NOESY/COSY/TOCSY (siehe Kapitel 5) die Kreuzpeakintensität nicht selbst von der Sekundärstruktur abhängt. Dies ist ein sehr grosser Vorteil.
- Durch die Einführung von NMR-aktiven Kernen können sehr viel mehr konformationsrelevante Parameter bestimmt werden. Zum Beispiel können statt einer einzigen Kopplungskonstanten ($^{3}J(H^{N},H\alpha)$) insgesamt neun verschiedene ^{3}J-Kopplungskonstanten um den Winkel ϕ gemessen werden.
- In Komplexen z.B. aus einem Protein und einer RNA kann man eine der beiden Komponenten markiert, die andere der Komponenten unmarkiert einsetzen. Dies ermöglicht, wie unten erläutert, die eindeutige Erkennung des Ursprungs der Signale.
- In größeren Komplexen wird die T_2-Relaxation immer stärker, so dass man immer breitere Linien beobachtet. Die T_2-Relaxation wird von ^{1}H-^{1}H Wechselwirkungen ausgelöst. Man kann durch selektive oder vollständige Deuterierung der nicht-austauschenden Wasserstoffe und Rückaustausch der austauschenden Wasserstoffatome (Amid, OH, …) die Relaxation sehr stark unterdrücken. Dies ermöglicht die Spektroskopie an größeren Systemen.
- Der Rekord einer NMR-Zuordnung ist die Zuordnung des Chaperones GroEL. Dies ist nur möglich durch die Anwendung spezieller, hier nicht näher besprochenen Pulssequenzen (TROSY), Deuterierung sowie hohen Magnetfeldstärken (900 MHz).

Markierung von Proteinen

In diesem Beispiel soll die Markierung beispielhaft für das Bakteriophagen T4 Lysozym (18,7 kDa) mit ^{15}N besprochen werden. Die Anwendungen lassen sich jedoch auch auf ^{2}H, ^{13}C oder ^{113}Cd und andere Proteine übertragen.

- Ziel ist eine bis zu 200fache Anreicherung des Isotops. Dazu müssen einige Milligramm Protein exprimiert werden. Dies gelingt durch Expression in einem bakteriellen Wirt mit high-level-Expressionssystem.

Markierung von RNA

Markierte Ribonukleotidtriphosphate dienen als Ausgangsmaterial für die Synthese einer beliebigen Sequenz. Um die gewünschten NTPs zu erhalten können die folgenden Methoden gewählt werden:

Möchte man etwa ^{13}C-makierte NTPs, verwendet man für die Synthese ^{13}C-Methanol als Kohlenstoffquelle und *Methylophilus methylotrophus* als Wirt.

Möchte man ^{15}N markierte NTPs erhalten, kann ^{15}N-Ammoniumchlorid und E.coli als Wirt verwenden. Eine kombinierte Anreicherung kann mit beiden Quellen in *M. metylotrophus* erreicht werden. Der Vorteil von *M. methylotrophus* zur Synthese von ^{13}C-makierte NTPs ist, daß das Methanol über den Ribosemonophosphatweg eingebaut wird.

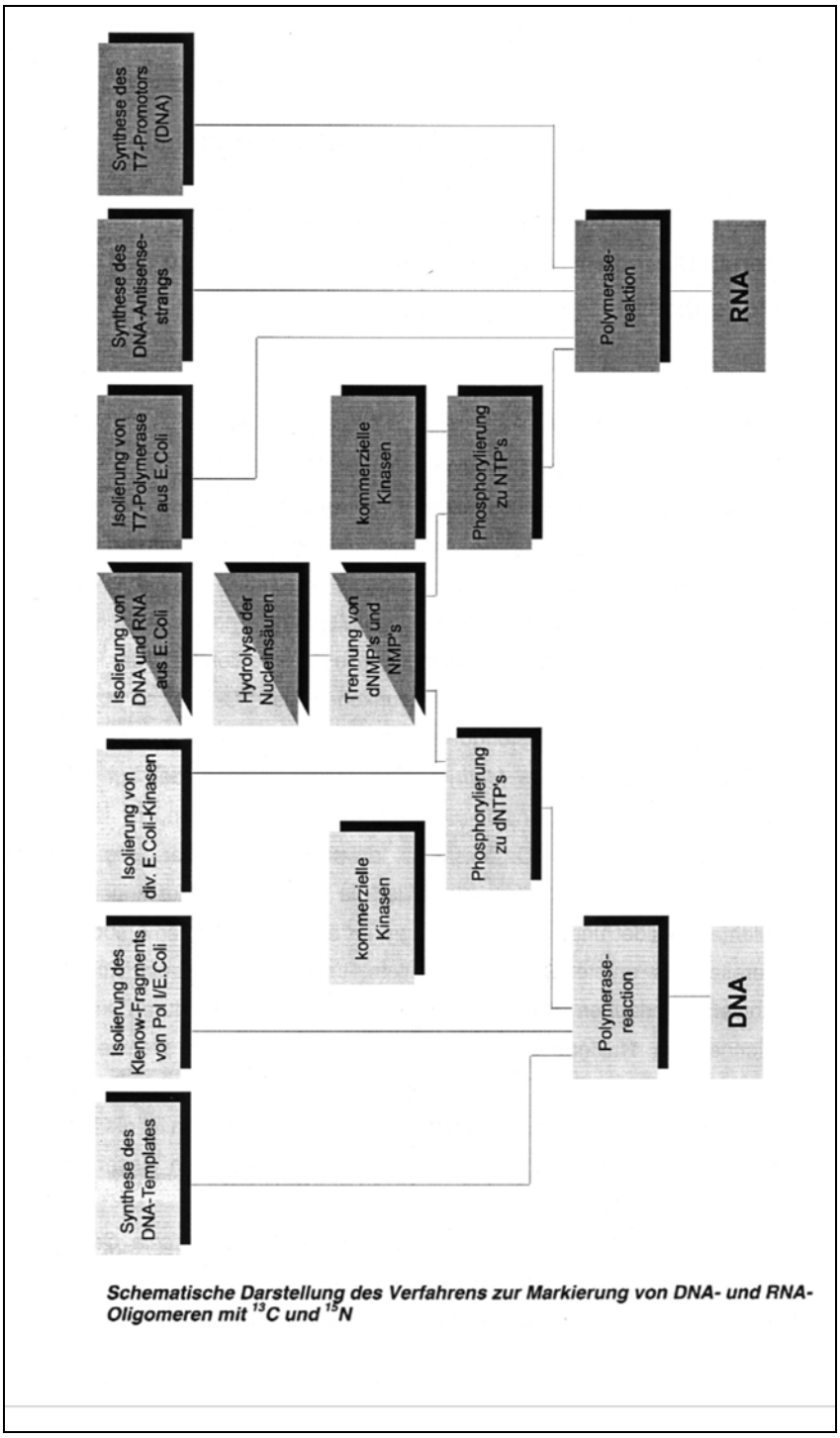
3 Methanol → 3-Phosphoglycerat

Da dazu keine CO_2-Aufnahme notwendig ist, kommt es nur zu einer geringen Isotopenverdünnung.

Nach der Anzucht der Zellen geht man folgendermaßen vor:

- Bakterien werden geerntet, lysiert und alle Proteine mit einer Phenol/Chlorophorm Extraktion entfernt.
- Nukleinsäuren werden mit Isopropanol präzipitiert
- Es folgt eine Hydrolyse mit P1 zu NMPs, diese werden dann über eine Affinitätssäule separiert.
- Danach eine enzymatische Phosphorylierung zu NTPs.
- Nun ist das Reinigen und Entsalzen der NTPs notwendig.
- Über HPLC kann man dann die 4-NTP-Fraktionen trennen und anschließend lyophilisieren.

So können die NTPs für eine *in vitro* RNA-Synthese verwendet werden.



Schematische Darstellung des Verfahrens zur Markierung von DNA- und RNA-Oligomeren mit ^{13}C und ^{15}N

Anwendungsbeispiele: Das HSQC-Experiment

Das Signal-zu-Rauschen (S/N) eines NMR-Experiments hängt von einer Menge von Faktoren ab:

$$\text{„S/N“} = N\gamma_{exc}(\gamma_{det})^{1.5}(B_0)^{1.5}(NS)^{0.5}T_2/T$$

N	=	Zahl der Spins (Konzentration der Probe)
γ_{exc}	=	gyromagnetisches Verhältnis des angeregten Spins
γ_{det}	=	gyromagnetisches Verhältnis des detektierten Spins
B0	=	äußeres Feld [T]
NS	=	Zahl der aufgenommenen Transienten (Scans)
T_2	=	Linienbreite des NMR-Signals [Hz]
T	=	Temperatur der Probe

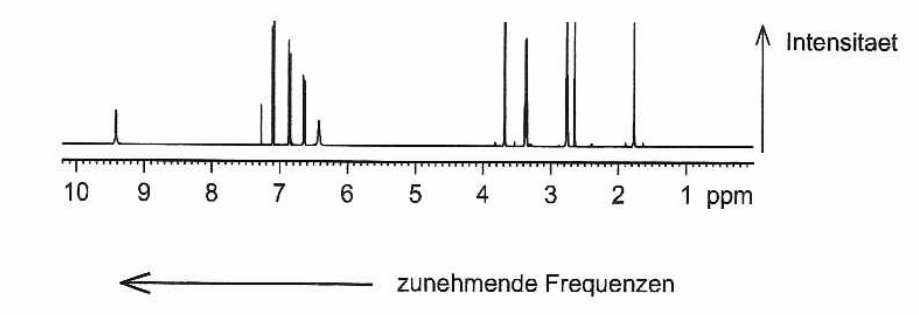
Damit ergibt sich für ein Experiment, bei dem man die chemischen Verschiebungen von ^{1}H-Atomen mit denen von Heterokernen korrelieren will, dass man Protonen anregt und Protonen detektiert. Dies gelingt in dem HSQC-Experiment.

Literatur:

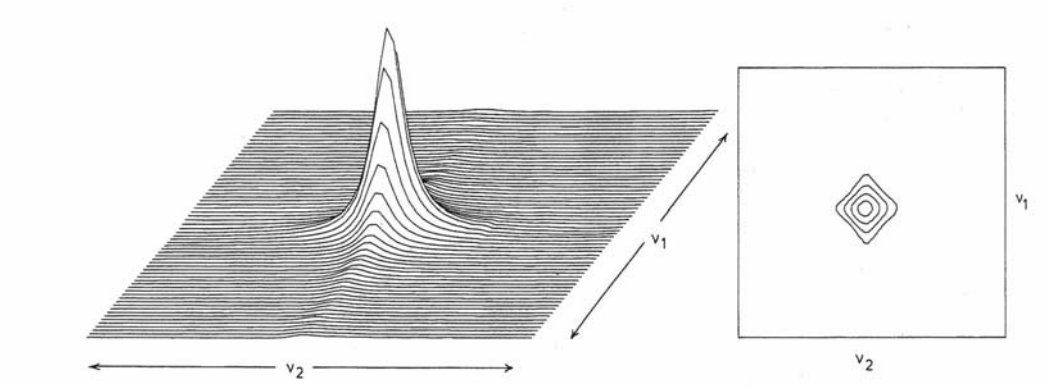
- Meth. Enzym. Vol. 177 Part B, 44-73
- Meth. Enzym. Vol 261, 300-322

6. 2D-NMR-Spektroskopie

Ein 1D-NMR Spektrum hat eine Achse auf der die Frequenz und eine auf der die Intensitäten aufgetragen sind:

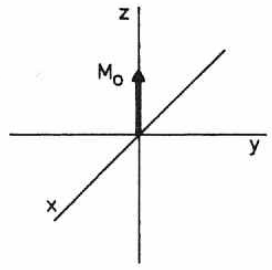


Ein 2 D NMR-Spektrum hat dagegen 2 Frequenzachsen. Die Intensitäten entsprechen der dritten Dimension und werden als 3D-Peaks oder Konturlinien dargestellt (vergl. Landkarte, wobei die Abstände jedoch logarithmisch sind)



Wie kommt solch ein Spektrum zustande ?

Es wird eine Probe betrachtet, die im Spektrum nur eine Resonanzlinie aufweist (z.B. Chloroform).

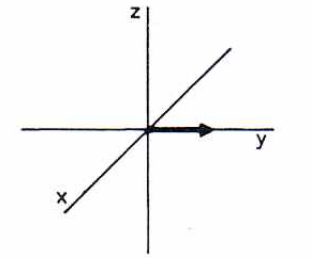


Aus dem Besetzungsunterschied (n_α-n_β) resultiert eine geringe Überschußmagentisierung M_0 in z-Richtung.

⇓

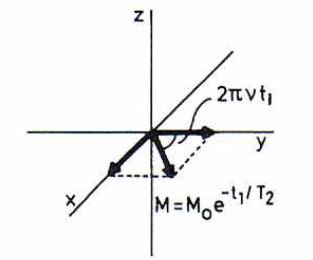
Anlegen eines 90˚ Pulses

⇓



Der Vektor liegt jetzt auf der y-Achse.

⇓



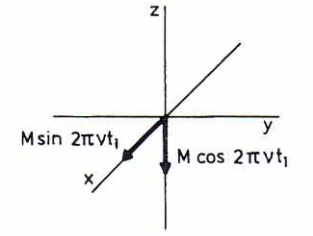
Während der Zeit t_1 präzediert er um das statische Feld B_0 in z-Richtung, d.h. er bewegt sich in der x,y-Ebene. Dadurch erhält die Magnetisierung eine Komponente in x- und eine in y-Richtung:

Während t_1 bewegt sich der Vektor um den Winkel $2\pi\upsilon t_1$. Bei der Länge des Vektors M beträgt die Komponente der Magnetisierung in y-Richtung M cos $2\pi\upsilon t_1$ und in x-Richtung M sin $2\pi\upsilon t_1$.

⇓

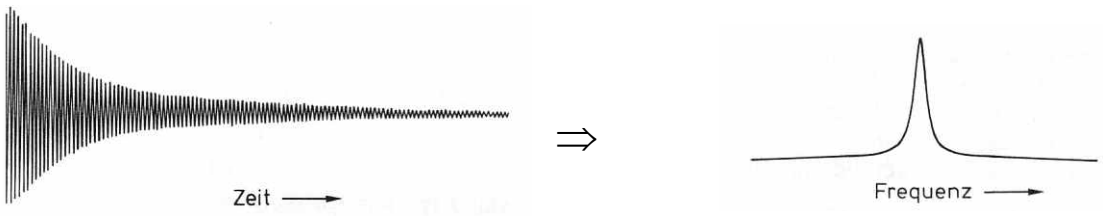
Anlegen eines 2. 90º Pulses

⇓



Die y-Achsen Komponente der Magnetisierung wird durch den 90º Puls auf die z-Achse rotiert und ist nicht detektierbar.
Die x-Achsen Komponente verbleibt in der x,y-Ebene und wird detektiert.

Während t_2 erfolgt die Aufnahme des FID und eine anschließende Fouriertransformation (FT) :



Anschließend wird dieses Experiment mehrmals wiederholt wobei t_1 variiert (inkrementiert) wird:

Nach FT erhält man eine Reihe von Peaks an der selben Stelle. Die Höhe der Peaks variiert mit t_1, sie oszilliert sinusförmig mit der Frequenz υ.

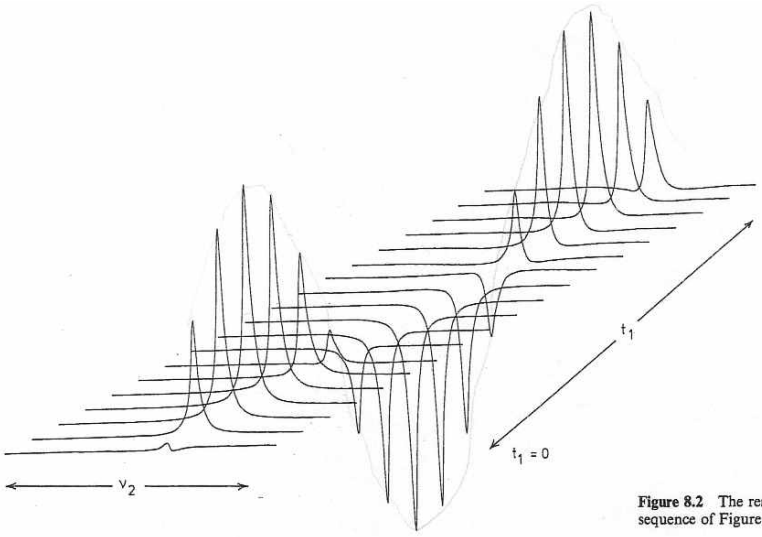
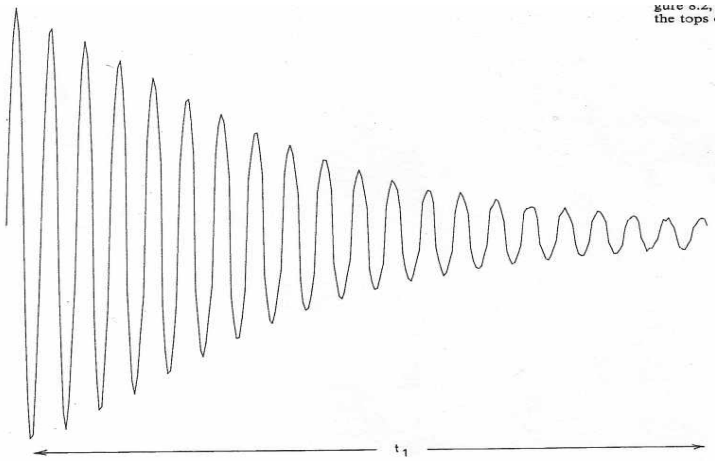
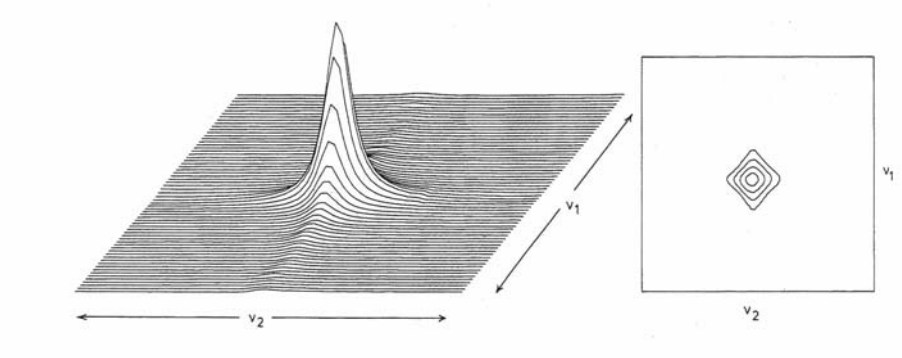


Figure 8.2 The result of performing the sequence of Figure 8.1 with variable t_1.

Verbindet man die Spitzen (bzw. Datenpunkte) der Peaks miteinander, so erhält man ein Schaubild der Amplitude des ursprünglichen Signals, die mit der Frequenz υ oszilliert.

Dies ist  das „zweite“ FID

(Interferogramm). Nach Fouriertransformation erhält man so ein zweidimensionales Spektrum.



Es wird also in 2 Richtungen fouriertransformiert:

1. $t_2 \rightarrow \upsilon_2$ (real-time)

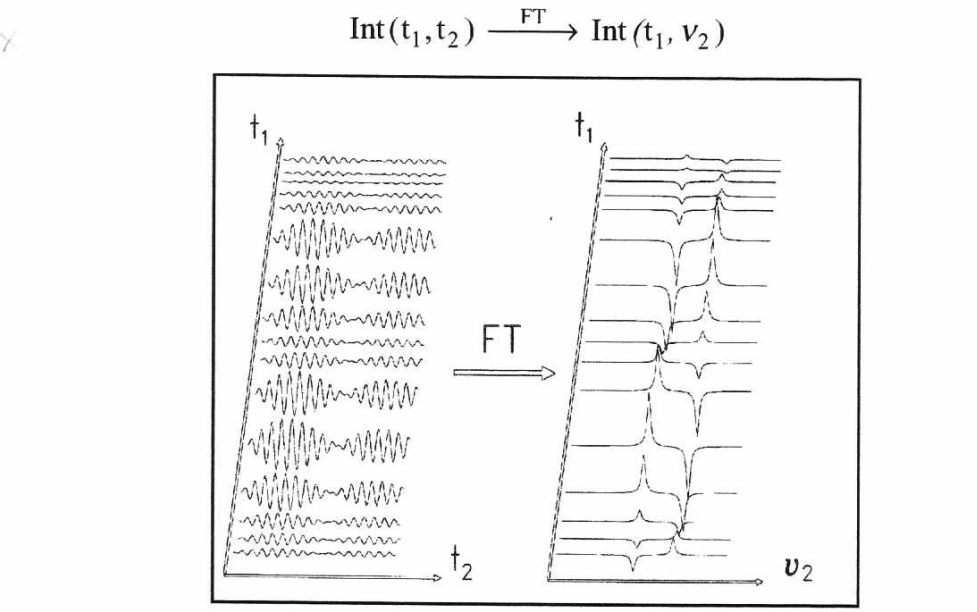


Abbildung: Schematische Darstellung des ersten Schritts einer zweidimensionalen Fouriertransformation [aus: van de Ven, F.J.M., Multidimensional NMR in Liquids]

2. $t_1 \rightarrow \upsilon_1$ (Inkrementierung von t_1)

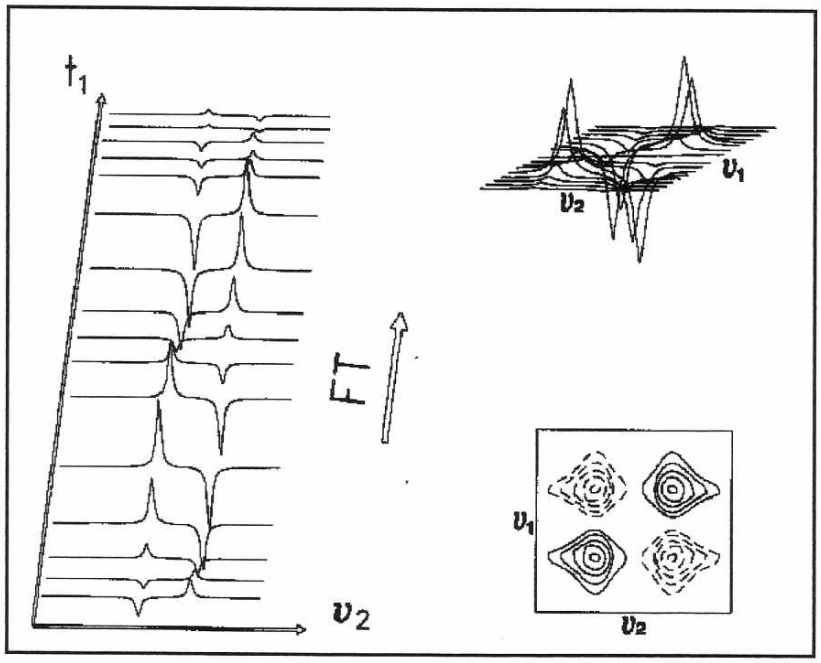
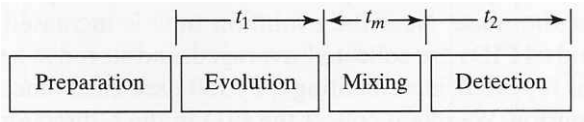
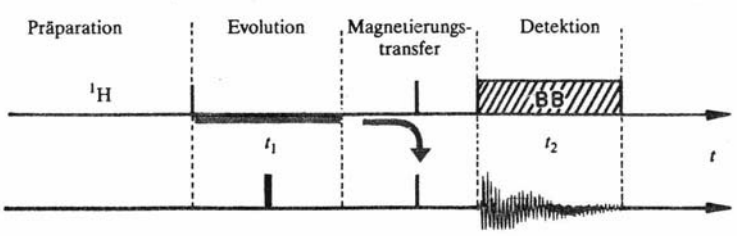


Abbildung: Schematische Darstellung des zweiten Schritts einer zweidimensionalen Fouriertransformation. Der Kreuzpeak (ν_1, ν_2) ist dargestellt als a) "stacked plot" der positiven und negativen Signale, b) "contour plot". [aus: van de Ven, F.J.M., Multidimensional NMR in Liquids]

Im Beispielspektrum wurden 2 90 °-Pulse gegeben und anschließend detektiert, dieses Experiment wird als *COSY* bezeichnet. Allen 2D-Experimenten liegt eine bestimmte Pulssequenz zugrunde, die sich stets aus folgenden Elementen zusammensetzt:

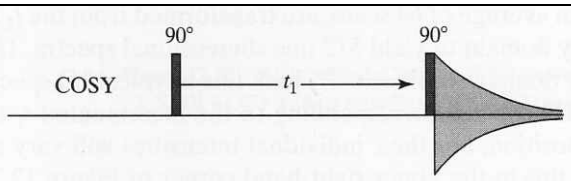
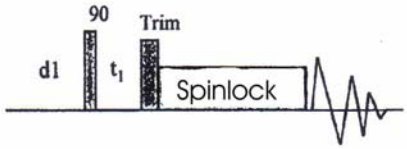
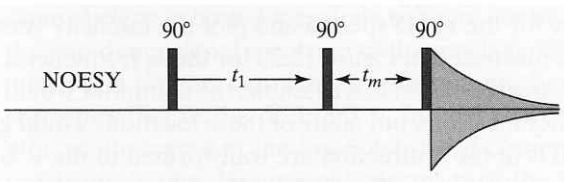
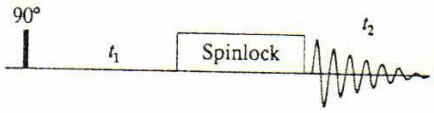


In unserem Beispielspektrum ist nicht mehr Information enthalten, als in einen 1D Spektrum. Grund: Sowohl während t_1 als auch während t_2 erfährt die Magnetisierung die gleiche Modulation (Präzession mit ihrer Lamorfrequenz).



Wird dagegen während der Mischungszeit Magnetisierung zwischen skalar oder dipolar koppelnden Kernen übertragen (im COSY während der Dauer des 2. 90°-Pulses) , so entwickeln sich υ_1 und υ_2 *unterschiedlich*.
Dadurch liegt der resultierende Peak nicht auf der Diagonalen ($\upsilon_1 = \upsilon_2$) sondern abseits. Man bezeichnet solche Peaks als Crosspeaks, sie geben Aufschluß über die Kopplung der Kerne. Man spricht hier auch von „Frequency Labeling“, da während t_1 mit einer bestimmten Frequenz gelabelt wurde, die sich während t_2 anders entwickelt.

Welche Protonen miteinander koppeln hängt von der Art der Mischsequenz im 2D-NMR-Experiment ab, dies führt zu einer enormen Vielfalt an 2D-NMR-Experimenten, einige der wichtigsten sind:

	Pulssequenz	Art der Kopplung
COSY **Co**rrelation **S**pectroscop**y**		J-Kopplung über 2-3 Bindungen (vergl. 1D-Spektrum)
TOCSY **To**tal **C**orrelation **S**pectroscop**y**		Kopplung aller verbundenen Protonen eines Spinsystems
NOESY **N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**y**		Kopplung von Protonen, die in räumlicher Nähe sind (Abstand < 5 Å)
ROESY **R**otating **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**y**		Kopplung von Protonen, die in räumlicher Nähe sind (Abstand < 5 Å)
HSQC **H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence		Kopplung von X-^{1}H über eine Bindung ^{1}J(XH)

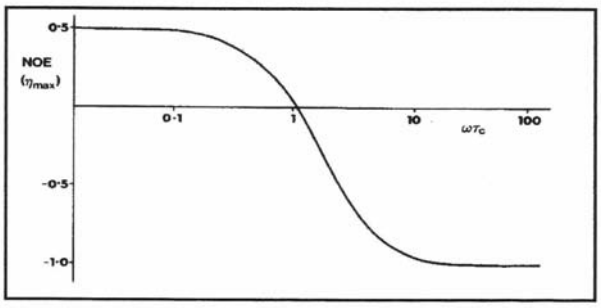
HMBC **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**oherence		Kopplung von ^{13}C-^{1}H über mehrere Bindungen ^{n}J (CH)

Das NOESY-Experiment

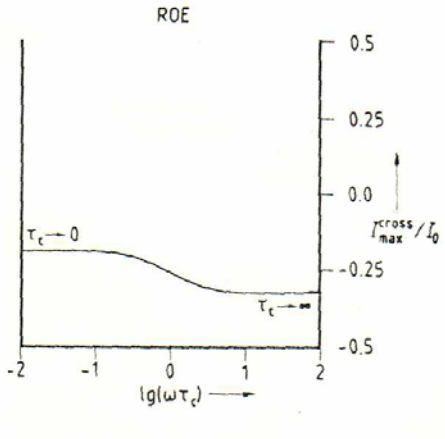
beruht auf dem Kern-Overhauser-Effekt (NOE): Die Intensität des Signals eines Kerns ändert sich nach Störung der Population der Spinzustände eines anderen Kerns. Der NOE ist abstandsabhängig. Die Signalphase der Kreuzpeaks im NOESY ist abhängig vom Vorzeichen des NOEs.

Faustregel:

NOE ist für kleine Moleküle positiv, für große negativ und für mittlere Moleküle befindet er sich gerade im Bereich des Vorzeichenwechsels und ist deshalb klein oder null.



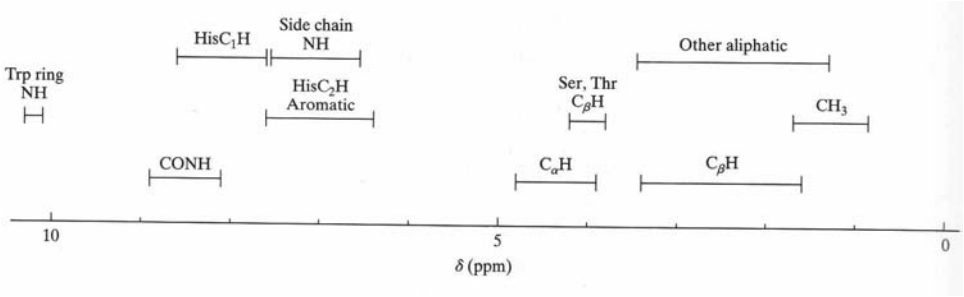
Abhängigkeit des homonuklearen Kern-Overhauser-Effekts zwischen Protonen vom Produkt aus Resonanzfrequenz ω und molekularer Korrelationszeit τ_c[8] [aus: Neuhaus, D., Williamson, M., The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis]



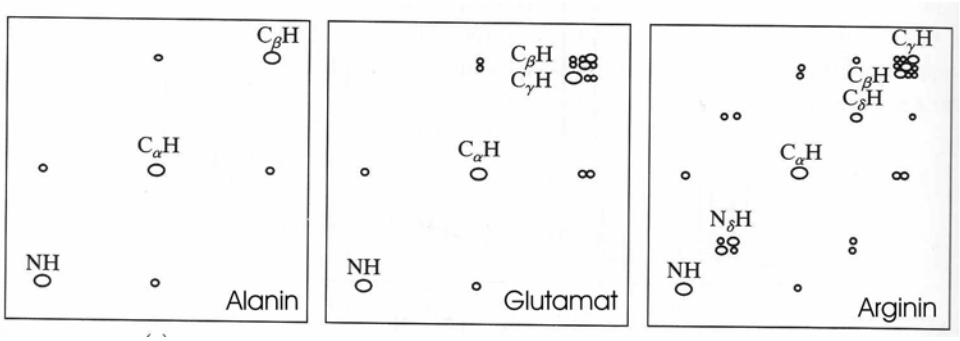
d.h. manche Moleküle lassen sich im NOESY nicht detektieren. Für diese Moleküle lässt sich das ROESY verwenden: der ROE ist stets positiv , d.h. auch mittlere Moleküle sind im ROESY detektierbar. Außerdem spielt der ROE ein Rolle bei der Detektion von chemischen Austäuschen

Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe von 2D-NMR

Die chemischen Verschiebungen der verschiedenen Protonen in Aminosäuren sind bekannt:



Außerdem gibt jede der 20 AS ein spezielles Muster aus Kreuzpeaks im COSY, damit können jeder AS die Resonanzen zugeordnet werden.



Da oftmals mehrere Aminosäuren ein ähnliches Muster ergeben und sich im COSY nicht unterscheiden lassen, kann man diese durch sequentielle Zuordnungen (NOESY) bestimmen: Dort ergeben sich zusätzliche Crosspeaks zwischen $C_\alpha H$ der Aminosäure *i* und dem Amid NH der Aminosäure *i+1*, dadurch lassen sich bei Kenntnis der Sequenz die Spinsysteme zuordnen.

Diese Grundprinzipien der 2DFT NMR lassen sich auch bei längeren Peptiden oder Proteinen anwenden.

Problem: Je mehr AS, desto schwieriger wird die Zuordnung der Spinsysteme
Lösung: NOESY-COSY- Verbindungsdiagramm:

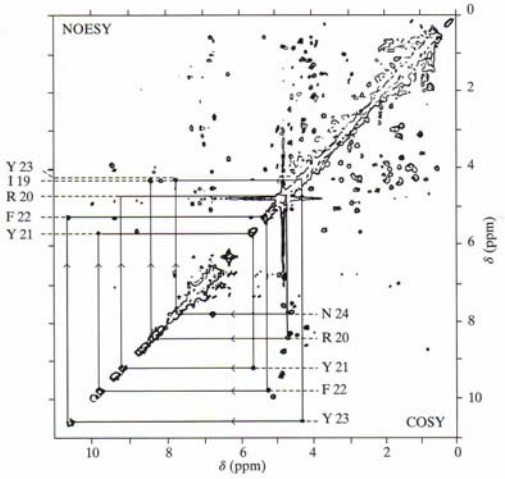


Figure 12.30 A NOESY-COSY connectivity diagram for sequential ^{1}H NMR assignments of BPTI. [Reprinted from G. Wagner, Anil-Kumar, and K. Wüthrich (1981), *Eur. J. Biochem.* **114**, 375–384, copyright 1981 by FEBS.]

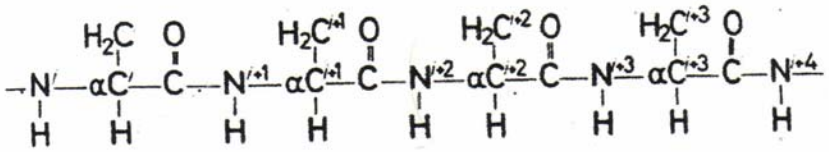
1. NOESY : Kopplung von $C_\alpha H$ *i* mit NH *i+1*
2. COSY: Kopplung von NH von *i+1* mit $C_\alpha H$ *i+1*
3. NOESY : Kopplung von $C_\alpha H$ *i+1* mit NH *i+2*
4. COSY.....

So hangelt man sich durch die Spinsysteme der einzelnen AS.

Das NOESY gibt außerdem Aufschluss über die Struktur:

Strukturbestimmung

Sieht man im NOESY Kreuzpeaks zwischen Protonen, die in der Sequenz weit entfernt sind, so kann man daraus schließen, dass sie sich in räumlicher Nähe befinden.



Sekundärstrukturen lassen sich leicht über Crosspeaks des Proteinrückgrats identifizieren:

-α-Helix:

Starke Crosspeaks zwischen NH *i* und NH *i+1* (Entfernung beträgt dort 0,28 nm)

Crosspeaks zwischen $C_\alpha H$ *i* und NH *i+3* (Entfernung beträgt dort 0,32 nm)

-β-Faltblatt:

Starke Crosspeaks zwischen $C_\alpha H$ i und NH *i+1* (Entfernung beträgt dort 0,22 nm)

Auch Kopplungskonstanten können zur Strukturfindung beitragen: Sie geben Aufschluss über Torsionswinkel in der Sekundärstruktur.

Computerprogramme verarbeiten die konformationellen Informationen und berechnen daraus die Struktur des Proteins.

Literatur

- Andrew E. Derome: Modern NMR Techniques for Chemistry Resaerch, Vol. 6, pp.183-187, Pergamon Press, Oxford 1987

7. NOESY Sekundärstrukturbestimmung

Der Nuclear Overhauser Effect (NOE)

Der NOE ist ein Signal, das durch den Transfer von Magnetisierung zwischen Kernen zustande kommt. Im NOESY Spektrum beobachtet man Kopplungen durch den Raum.
Es kann ein maximaler Abstand zwischen koppelnden Protonen von 4,5 Å beobachtet werden.
Die Signalintensität ist proportional zu r^{-6} (r ist die Distanz zwischen den Kernen). Mit Referenzdistanzen lässt sich eine gemessene Intensität umrechnen:

$$I_{ref} \propto r^{-6}{}_{ref}$$

$$I_{?} \propto r^{-6}{}_{?}$$

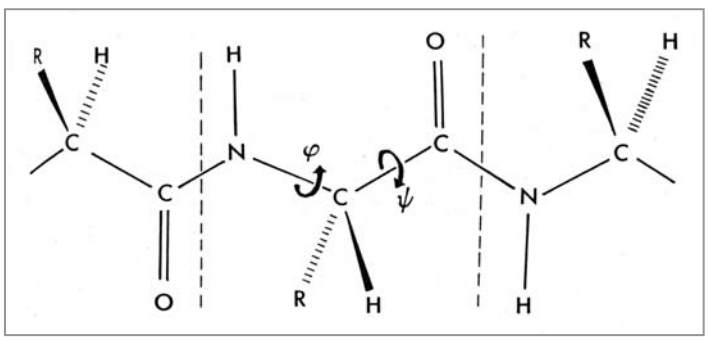
$$\rightarrow \quad \frac{I_{ref}}{I_{?}} = \frac{r^{6}{}_{?}}{r^{6}{}_{ref}}$$

$$\rightarrow \quad r^{6}{}_{?} = \frac{I_{ref}}{I_{?}} \cdot r^{6}{}_{ref}$$

Da alles bis auf r^6 bekannt ist, lässt sich der unbekannte Abstand errechnen.
Der Abstand bestimmter Protonen ist in verschiedenen Sekundärstrukturen unterschiedlich. Daher lassen sich bereits ohne die aufwendigen Struktur-Berechnungen im Voraus Aussagen über die Sekundärstruktur treffen.

Winkelbetrachtungen

Die Peptidkonformation wird durch die Rückgratwinkel φ und ψ beschrieben. Zusätzlich können auch die Winkel der Seitenketten χ_1, χ_2, ... berücksichtigt werden.



Der Winkel φ beschreibt die Rotation um die N-C^{α}-Bindung (zu betrachten sind die Atome C_{i-1} – N_i – C^{α}_i – C_i).
Der Winkel ψ beschreibt die Rotation um die C^{α}-C-Bindung (zu betrachten sind die Atome N_i – C^{α}_i – C_i – N_{i+1}).

Berechnet man die Energie eines Peptids als Funktion von φ und ψ, so findet man nur einige wenige Konformationen, die energetisch erlaubt sind und grob denen von α-Helix und β-Faltblatt entsprechen. Erlaubte Winkel-Kombinationen sind im Ramachandran-Plot wiedergegeben.

Wichtige Sekundärstrukturen

Struktur	φ	ψ
α-Helix	-57°	-47°
3_{10}-Helix	-60°	-30°
β-Faltblatt parallel	-119°	+113°
β-Faltblatt antiparallel	-139°	+135°

Strukturbestimmung verschiedener Peptidformen

Der Ansatz hängt stark von Größe und Form des Moleküls ab:

Kleine zyklische Peptide

Solche Peptide besitzen, zumindest was das Rückgrat angeht, eine starre Konformation, da aufgrund des Zyklus die konformationelle Freiheit stark eingeschränkt ist. Die Zuordnung ist hier demnach relativ einfach. Hier spielen NOEs eine untergeordnete Rolle; statt dessen werden Kopplungskonstanten und Austauschraten der Amidprotonen berücksichtigt.

Kleine azyklische Peptide

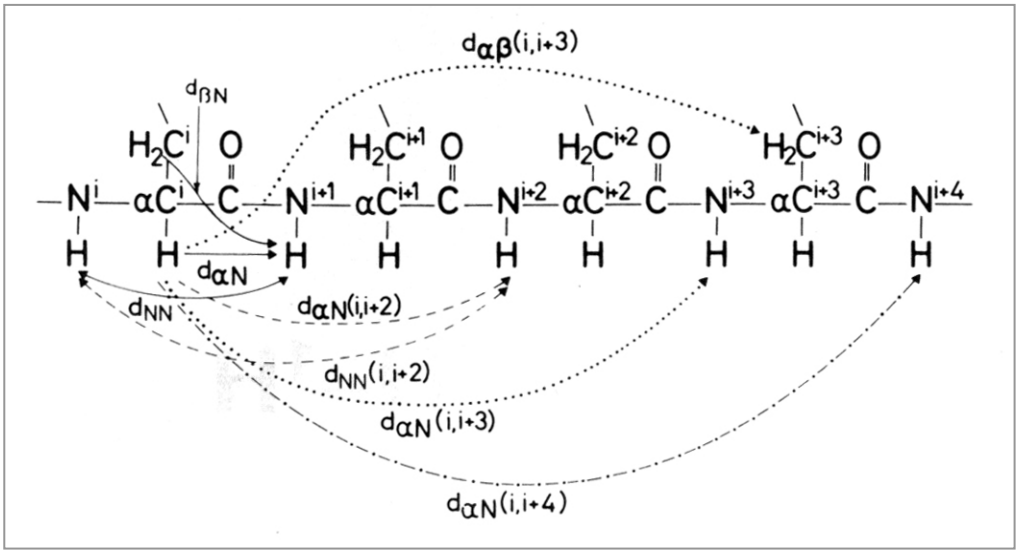
Diese sind im Gegensatz zu den zyklischen Peptiden nicht starr, haben aber oft signifikante Sekundärstrukturen. Diese sind nicht statisch, sondern in einem ständigen Austausch mit random coils. Es ist daher unsinnig, von solchen Peptiden eine einzige detaillierte Struktur bestimmen zu wollen. Die NOEs spielen hierbei eine sehr wichtige Rolle.

Kleine globuläre Proteine

Aufgrund seiner Faltung besitzt das Protein eine größtenteils festgelegte Konformation, so dass Proteine wesentlich besser zu beschreiben sind als die kleineren azyklischen Peptide. Die lokalen Konformationen sind jedoch weniger starr. Auch hier spielen NOEs eine wichtige Rolle.

Welche Protonenkontakte können beobachtet werden?

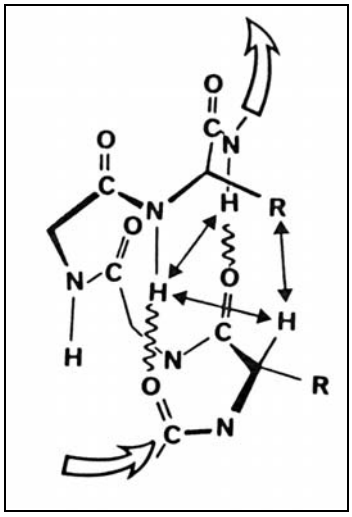
Vicinale Distanzen innerhalb einer Aminosäure ($d_{\alpha N}$, $d_{\alpha\beta}$, $d_{\beta\gamma}$, ...) sind immer kurz und bilden den Großteil der NOEs. Auch $d_{\beta N}$ ist gewöhnlicherweise kurz.
Sequentielle Distanzen: $d_{\alpha N}$ (i, i+1), d_{NN} (i, i+1) und $d_{\beta N}$ (i, i+1), kurz $d_{\alpha N}$, d_{NN} und $d_{\beta N}$.
Räumliche Distanzen:



Sekundärstrukturen und ihre charakteristischen Distanzen

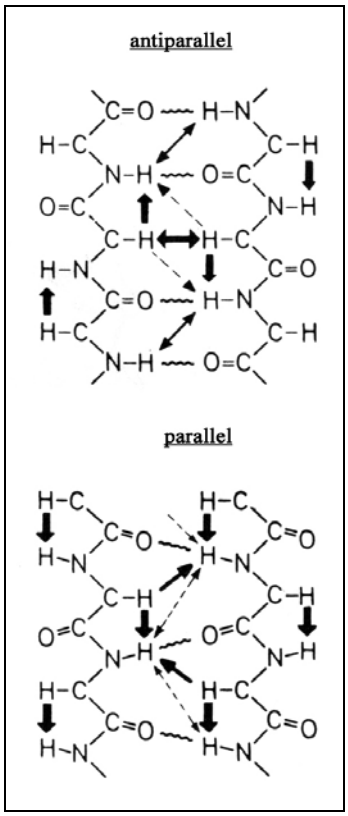
α-Helices

In einer regulären α-Helix gibt es ein dichtes Netzwerk kurzer ^1H-^1H Distanzen innerhalb eines Segmentes vier sukzessiver Aminosäuren und zusätzlich eine einzige Distanz zu einer fünften Aminosäure $d_{\alpha N}$ (i, i+4). Alle Distanzen, die sechs oder mehr Sequenzen entfernt liegen, sind zu lang, um beobachtet zu werden.
Charakteristisch sind die kurzen Distanzen d_{NN}, $d_{\alpha N}$ (i, i+3) und $d_{\beta N}$ (i, i+3).



β-Faltblätter

Alle ^1H-^1H Distanzen innerhalb eines Stranges sind bis auf sequentielle Aminosäuren nicht zu erkennen. Es gibt hier aber zusätzliche long-range Kontakte zwischen benachbarten Strängen, die für eine Beobachtung kurz genug sind. Charakteristisch sind die kurzen Distanzen $d_{\alpha N}$, $d_{\alpha N}$ (i, j), d_{NN} (i, j) und $d_{\alpha\alpha}$ (i, j). Die Anwesenheit von $d_{\alpha\alpha}$ (i, j) läßt auf antiparallele β-Faltblätter schließen.

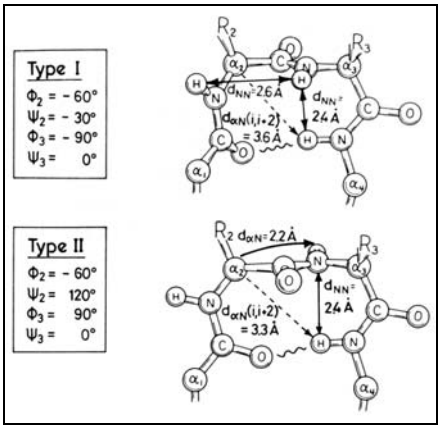


Distance†	β Antiparallel ($\phi = -139°$, $\psi = 135°$)	β Parallel ($\phi = -119°$, $\psi = 113°$)
$d_{\alpha N}$	2·2	2·2
$d_{N\alpha}$	4·7	4·8
d_{NN}	4·3	4·2
$d_{\alpha\alpha}$	4·3	4·3
$d_{\alpha\beta}(^{\beta}H$	4·0 5·6	4·2 5·7
$(^{\beta}H_2$	4·0 5·2	4·2 5·3
$(^{\beta}H_3$	4·0 4·4	4·2 4·6
$d_{\beta\alpha}(^{\beta}H$	4·2 5·7	4·4 5·8
$(^{\beta}H_2$	4·2 5·4	4·4 5·5
$(^{\beta}H_3$	4·2 4·6	4·4 4·8
$d_{N\beta}(^{\beta}H$	4·6 6·4	4·8 6·6
$(^{\beta}H_2$	4·6 6·0	4·8 6·2
$(^{\beta}H_3$	4·6 5·1	4·8 5·3
$d_{\beta N}(^{\beta}H$	3·2–4·5	3·7–4·7
$(^{\beta}H_2$	3·2 4·2	3·7 4·4
$(^{\beta}H_3$	3·2 3·6	3·7 4·0
$d_{\alpha N}(i, j)$‡	3·2	3·0
$d_{NN}(i, j)$‡	3·3	4·0
$d_{\alpha\alpha}(i, j)$‡	2·3	4·8

Tight Turns

Unterschieden werden zwei Typen von Turns.

Diese Strukturen werden durch die Torsionswinkel φ_2, ψ_2, φ_3 und ψ_3 bestimmt. Es existiert ein dichtes Netzwerk kurzer ^{1}H-^{1}H Distanzen innerhalb des Tripeptid-Segments 2 bis 4 in beiden Typen. Zusätzlich kann $d_{\alpha N}$ (i, i+3) zwischen den Aminosäuren 1 und 4 beobachtet werden.



Welche Protonenkontakte werden für die Charakterisierung verwendet?

Ein großer Teil der Kreuzpeaks ist auf kurze Distanzen innerhalb einer Aminosäure und sequentielle ^{1}H-^{1}H Distanzen zurückzuführen. Verwendet man die Informationen für kurze, mittlere und lang-reichende Kontakte, so kann eine systematische Suche nach Signalen beginnen, die charakteristisch für bestimmte Sekundärstrukturen sind.

- Sequentielle Distanzen sind solche zwischen Aminosäuren (i, i+1).
- Medium range Distanzen sind alle nicht sequentiellen und nicht innerhalb einer Aminosäure liegenden Abstände in einem Fragment von 5 Aminosäuren.
- In long range Distanzen liegen Protonen mehr als 5 Aminosäuren auseinander.

Nützliche Distanzen sollten kurz genug sein, um sie im NOESY beobachten zu können (kleiner als 4,5 Å) und sollten sich in verschiedenen Sekundärstrukturen unterscheiden. Daher sind die folgenden sieben sequentiellen und medium range Distanzen von Interesse: $d_{\alpha N}$, $d_{\alpha N}$ (i, i+2), $d_{\alpha N}$ (i, i+3), $d_{\alpha N}$ (i, i+4), d_{NN}, d_{NN} (i, i+2) und $d_{\alpha\beta}$ (i, i+3).
Zusätzliche nützliche Distanzen für β-Strukturen sind diejenigen zwischen verschiedenen Strängen: $d_{\alpha N}$ (i, j), d_{NN} (i, j) und $d_{\alpha\alpha}$ (i, j)

Nützliche ^{1}H-^{1}H-Distanzen für die Identifizierung von Sekundärstrukturen:

Short Distances Found in Protein Structures[a]

Distance[b]	α-Helix[c]	3_{10} helix	β-Antiparallel sheet	β-Parallel sheet	Type I turn	Type II turn
$d_{\alpha N}(i, i)$	2.7	2.7	2.8	2.8	2.7/2.8	2.7/2.2
$d_{\alpha\beta}(i, i)$[d]	2.2–2.9	2.2–2.9	2.2–2.9	2.2–2.9	2.2–2.9	2.2–2.9
$d_{\beta N}(i, i)$[d]	2.0–3.4	2.0–3.4	2.4–3.7	2.6–3.8	2.0–3.5	2.0–3.4/3.2–4.0
$d_{\alpha N}(i, i+1)$	3.5	3.4	2.2	2.2	3.4/3.2	2.2/3.2
$d_{NN}(i, i+1)$	2.8	2.6	4.3	4.2	2.6/2.4	4.5/2.4
$d_{\beta N}(i, i+1)$[d]	2.5–3.8	2.9–4.0	3.2–4.2	3.7–4.4	2.9–4.1/3.6–4.4	3.6–4.4
$d_{\alpha N}(i, i+2)$	4.4	3.8			3.6	3.3
$d_{NN}(i, i+2)$	4.2	4.1			3.8	4.3
$d_{\alpha N}(i, i+3)$	3.4	3.3			3.1–4.2	3.8–4.7
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$[d]	2.5–4.4	3.1–5.1				
$d_{\alpha N}(i, i+4)$	4.2					
$d_{\alpha N}(i, j)$[e]			3.2	3.0		
$d_{NN}(i, j)$[e]			3.3	4.0		
$d_{\alpha\alpha}(i, j)$[e]			2.3	4.8		

Bestimmung der Verteilung kurzer ^{1}H-^{1}H Distanzen für helikale, β-Faltblatt-, tight turn- und random coil-Segmente im Trypsin-Inhibitor

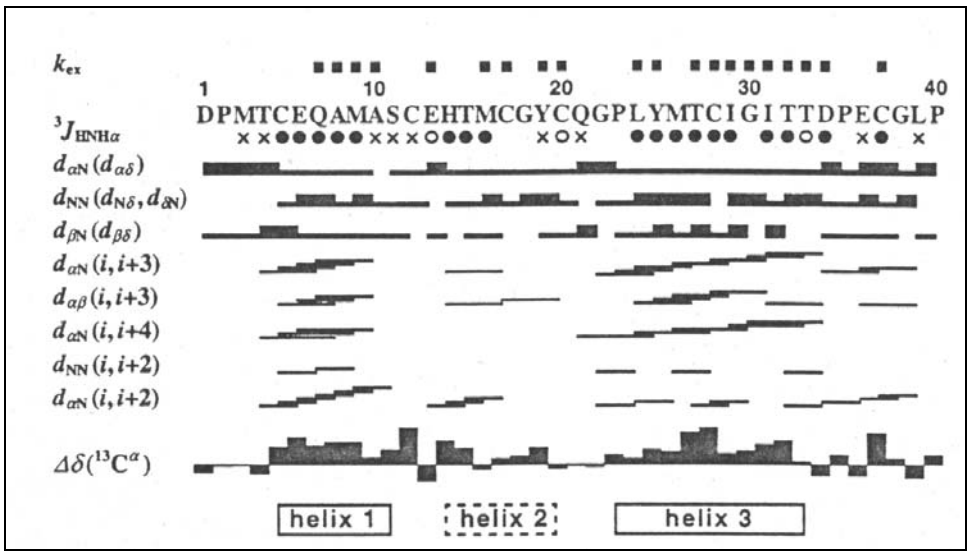
Von Interesse sind Ausmaß und Einzigartigkeit der Identifizierung von Sekundärstrukturen durch bestimmte spezifizierte Abstände. So werden β-Strukturen durch sehr kurze Distanzen $d_{\alpha N}$ identifiziert; allerdings ist $d_{\alpha N} \leq 2{,}5$ Å nicht einzigartig für β-Faltblätter, da dieser Abstand auch in random coil-Segmente und tight turns vorkommt. In ähnlicher Weise sind die helicalen Aminosäuren durch kurze Distanzen d_{NN} verbunden; $d_{NN} \leq 3{,}0$ Å kommt aber wiederum auch in random coil-Segmenten und tight turns vor. Daher liefern Muster verschiedener Distanz-Werte eine verläßlichere, aber nicht einzigartige Identifizierung von β-Faltblättern oder helicaler Strukturen. Dagegen liefern die Distanzen $d_{\alpha\beta}$ (i, i+3) und $d_{\alpha N}$ (i, i+4) < 4,5 Å eine einzigartige Identifizierung für helicale Strukturen; das Ausmaß, mit dem helicale Aminosäuren erkannt werden, liegt aber nur bei 50%.

Die Tabelle gibt die totale Anzahl eines Typs von ^{1}H-^{1}H Distanz wieder, die in einer bestimmten Sekundärstruktur der 19 Proteine vorkommt, und die Prozentzahl dieser Distanzen (3,0, 3,6 und 4,4 Å), die kürzer als drei spezifizierte Grenzen sind. Die Distanzgrenzen wurden aus folgendem Grund gewählt: 4,4 Å repräsentiert ungefähr die längste Distanz, die im NOESY beobachtet werden kann, 3,6 Å entspricht dem längsten stereochemisch erlaubten Wert für die sequentielle Distanz $d_{\alpha N}$ und 3,0 Å entspricht dem längsten Wert für die Distanz innerhalb einer Aminosäure $d_{N\alpha}$.
In den 19 gewählten Proteinen wird die totale Anzahl an Distanzen, die kürzer sind als die angegebenen Grenzen, gezählt. Die Einzigartigkeit wird dann durch die Prozentzahl relativ zur totalen Zahl der kurzen Distanzen bestimmt.

^{1}H-^{1}H contact	α-Helix + 3_{10} helix: Total no.	Short distances (%) ≤3·0 Å	≤3·6 Å	≤4·4 Å	β-Sheets: Total no.	Short distances (%) ≤3·0 Å	≤3·6 Å	≤4·4 Å
$d_{\alpha N}$	796	4	99	100	767	98	100	100
d_{NN}	796	86	98	99	767	2	3	52
$d_{\alpha N}(i, i+2)$	698	0	7	55	614	0	0	2
$d_{\alpha N}(i, i+3)$	600	3	52	94	461	0	0	0
$d_{\alpha N}(i, i+4)$	502	0	6	65	341	0	0	0
$d_{NN}(i, i+2)$	698	0	2	72	614	0	0	0
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$	486	44	74	90	319	0	0	0

Turns + bends: Total no.	Short distances (%) ≤3·0 Å	≤3·6 Å	≤4·4 Å	Random coil: Total no.	Short distances (%) ≤3·0 Å	≤3·6 Å	≤4·4 Å	Mixed: Total no.	Short distances (%) ≤3·0 Å	≤3·6 Å	≤4·4 Å
818	41	99	100	824	87	100	100				
818	57	70	82	802	14	20	50	--	--	--	--
478	4	19	53	420	1	4	13	973	1	8	32
239	3	13	26	216	0	0	0	1645	0	2	8
123	2	4	11	112	0	0	0	2083	0	1	2
478	3	9	38	401	0	0	2	970	0	3	11
96	9	20	32	106	0	0	0	1880	2	4	8

Methoden für die Identifizierung regulärer Sekundärstrukturen am Beispiel des 40 Aminosäure-Pheromons Er-2

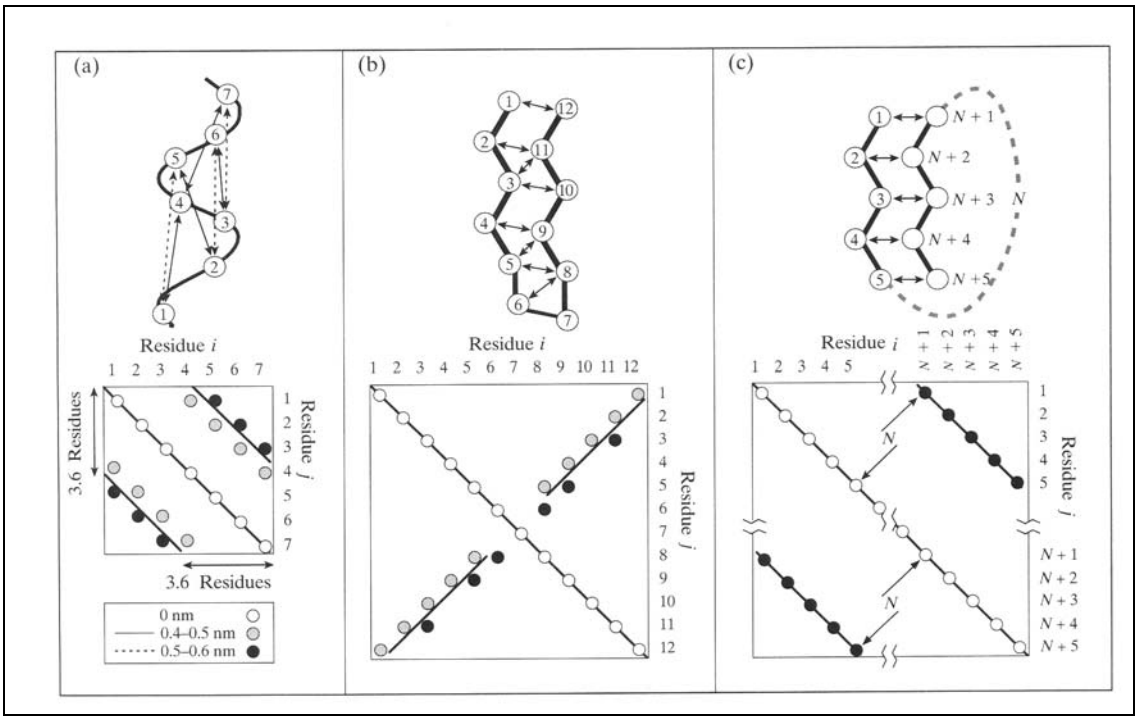


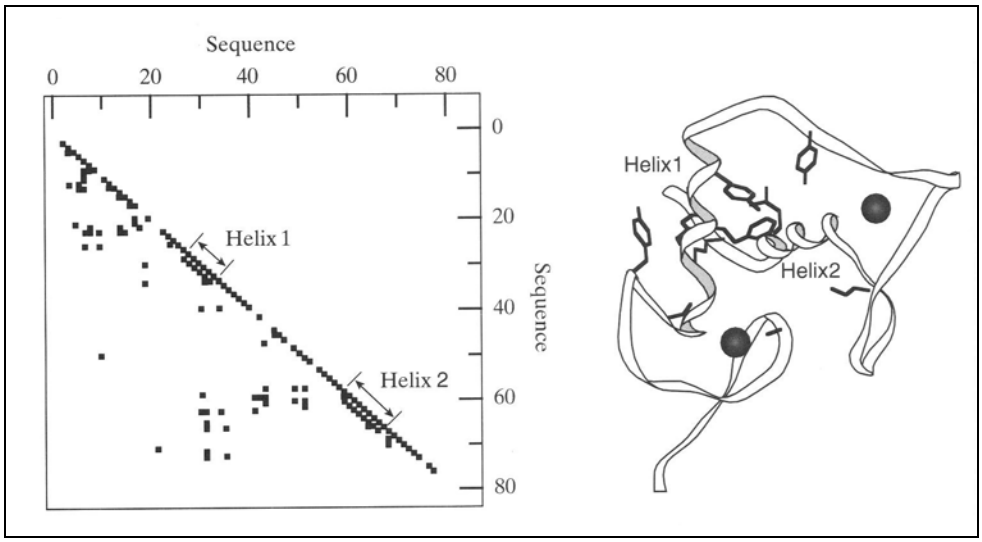
- Quadrate repräsentieren Aminosäuren mit geringer Protonen-Austauschrate am Rückgrat-Amid.
- Aminosäure-Sequenz: gefüllte Kreise: $^3J_{HNH\alpha} < 6{,}0$ Hz → lokale α-Konformation
  - o offene Kreise: $^3J_{HNH\alpha} > 8{,}0$ Hz → ausgestreckte Kette
  - o Kreuze: $^3J_{HNH\alpha} = 6{,}0 – 8{,}0$ Hz

- Für sequentielle ^{1}H-^{1}H Distanzen gilt: dicke Linien repräsentieren starke, dünne Linien schwache NOEs.
- Für medium range-Distanzen sind die koppelnden Protonen durch Linien verbunden.
- Zusätzliche long range Daten sind aber für die Identifizierung von β-Faltblättern nötig.

Diagonalplot zur Identifizierung von Sekundärstrukturen.

Die NOE-Daten sind hier in Form eines Diagonal-Plots präsentiert. Signale innerhalb einer Aminosäure und sequentielle Signale erscheinen entlang der Diagonalen. Auch die kurzen (i, i+3)-Kontakte, die charakteristisch für Helices sind, erscheinen auf der Diagonalen, während Kontakte zwischen Strängen außerhalb der Diagonalen liegen. Antiparallele β-Faltblätter erscheinen im rechten Winkel zur Diagonalen, parallele β-Faltblätter liegen dagegen parallel zur Diagonalen.





Die Tertiärstruktur errechnet man mit Hilfe eines Distanz-Geometrie-Algorithmus. Die erhaltene Struktur muss einen Zustand möglichst geringer Energie besitzen (φ und ψ müssen im Ramachandran-Plot in erlaubte Regionen fallen) und darf die van der Waals-Abstände nicht verletzen.

Zusammenfassung

Für alle Sekundärstrukturen gilt, dass die Identifizierung aufgrund der NOE-Daten fast ausschließlich auf den Distanzen beruht, die mit den Amidprotonen zusammenhängen.
Da sowohl α-Helices als auch β-Faltblätter ein dichtes Netzwerk an kurzen ^{1}H-^{1}H Distanzen aufweisen, beruht die Identifizierung auf einer Kombination aller möglichen Distanzparameter.
Nur ein kleiner Teil an kurzen Distanzen ist nötig, um eine Helix zu identifizieren. Die Verlässlichkeit steigt allerdings mit zunehmender Zahl an Distanzen.
Die Möglichkeiten, α-Helices und 3_{10}-Helices zu unterscheiden, sind eher beschränkt. Es können aber aufgrund der Periodizität beider Strukturen Aussagen getroffen werden. So besitzt die 3_{10}-Helix kurze $d_{\alpha N}$ (i, i+2), während die α-Helix kurze $d_{\alpha N}$ (i, i+4) besitzt. Ferner weist die Anwesenheit kurzer $d_{\alpha\beta}$ (i, i+3) auf die Anwesenheit α-helicaler Strukturen hin.
Für die Identifizierung der Polarität von β-Faltblättern reicht die Beobachtung von zwei kurzen Interstrang-Abständen aus. Die Beobachtung kurzer $d_{\alpha\alpha}$ (i, j) gilt als unabhängiges Kriterium für antiparallele Strukturen.
Am besten lassen sich Tight Turns in den Haarnadelschleifen antiparalleler Faltblätter identifizieren, da sich sowohl die sequentiellen als auch die medium range ^{1}H-^{1}H Distanzen unterscheiden. Hier kann man auch zwischen verschiedenen Typen von Turns unterscheiden.

Dagegen ist es schwierig, Tight Turns am Ende helicaler Strukturen zu identifizieren, da sich die lokalen Distanzen sehr ähnlich sind.

Literatur

1. D. Neuhaus, M. Williamson The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis. pp. 451-474
2. Wuethrich et al. J. Mol. Biol. (1984) 180:715-740. Polypeptide secondary structure determination by nuclear resonance observation of short proton-proton distances
3. John L. Markley, Ad Bax, Yoji Arata, C. W. Hilbers, Robert Kaptein, Brian D. Sykes, Peter E. Wright and Kurt Wuethrich. Pure & Appl. Chem., Vol. 70, No. 1, pp 117-142, 1998. Recommendations for the presentation of nmr structures of proteins and nucleic acids
4. Jennifer J. Ottesen and Barbara Imperiali. Nature Structural Biology, Vol. 8, No. 6, pp 535-539 (june 2001). Design of a discretely folded mini-protein motif with predominantly β-strucure.

Sequentielle Resonanzzuordnung in Proteinen mit 1H-NMR

Problem:

Die Spinsysteme von Aminosäuren können meist durch J-Kopplungen identifiziert werden.
Wie erhält man jedoch die Aminosäuresequenz ?

Zusätzlich zu den J-Kopplungsinformationen können Abstandsinformationen aus dem NOESY-Spektrum verwendet werden, um Aminosäuresequenzen unabhängig von der Struktur des Peptids zu bestimmen, wenn zwischen Protonen von benachbarten Aminosäuren Kopplungen im NOESY beobachtet werden können, d.h. wenn die Abstände der Protonen klein genug sind (<3Å).

Kleine Abstände zwischen Protonen, die sich im NOESY detektieren lassen, können sowohl zwischen in der Sequenz benachbarten, als auch zwischen räumlich nahen Protonen beobachtet werden. Die Häufigkeit, mit der kleine Abstände zwischen sequentiell benachbarten und zwischen räumlich nahen Protonen auftritt, ist ein Maß für die Zuverlässigkeit und wird mithilfe von statistischen Analysen der 1H-1H-Abstände in Röntgenstrukturen ermittelt.

Nach Kalkulation der Abstände zwischen allen verschiedenen Protonen in benachbarten Resten i und i+1, sowie nach Ermittlung der Häufigkeit mit der kurze Distanzen zwischen benachbarten und nicht-benachbarten Resten in der Kristallstruktur auftreten, zeigt sich, dass sequentielle 1H-Resonanzzuordnungen durch NOE-Messungen auf den Distanzen d_1 ($\alpha CH_i \leftrightarrow NH_{i+1}$), d_2 ($NH_i \leftrightarrow NH_{i+1}$) und d_3 ($\beta CH_i \leftrightarrow NH_{i+1}$) beruhen sollten.
Unabhängig vom Polypeptidrückgrat ist stets einer dieser drei Proton-Proton Abstände so kurz, dass sich ein starker NOE zeigt.
Die statistischen Analysen zeigen, dass kurze Distanzen von d_1, d_2, und d_3 fast ausschließlich in benachbarten Resten auftreten.

Keine der drei Distanzen stellt jedoch alleine ein universelles Kriterium für sequentielle Zuordnungen durch NOEs dar, da jeder der Abstände nur Teile der sterisch erlaubten Regionen im Ramachandran repräsentiert.
Durch Kombination von zwei Distanzen erhält man jedoch ein verlässliches Kriterium für die sequentielle Zuordnung mittels NOEs.

In der folgenden Tabelle sind statistische Daten der Proton-Proton-Abstände für benachbarte und nicht-benachbarte Aminosäuren eingetragen.

TABLE 2

Statistics of the distances $d_1(i, j)$, $d_2(i, j)$ *and* $d_3(i, j)$ *in the 19 protein structures of Table 1*

	d(Å)	n† $j-i=1$	n† $j-i \neq 0, 1$	% $j-i=1$
$d_1(i,j)$	≤ 2·4	1194	23	98
	≤ 2·6	1491	68	96
	≤ 2·8	1615	137	92
	≤ 3·0	1722	237	88
	≤ 3·2	1895	435	81
	≤ 3·4	2206	750	75
	≤ 3·6	3068	1219	72
$d_2(i,j)$‡	≤ 2·4	289	18	94
	≤ 2·6	550	45	92
	≤ 2·8	965	101	91
	≤ 3·0	1231	160	88
	≤ 3·2	1343	232	85
	≤ 3·4	1420	317	82
	≤ 3·6	1459	415	78
$d_3(i,j)$	≤ 2·4	261	69	79
	≤ 2·6	484	128	79
	≤ 2·8	740	207	78
	≤ 3·0	1005	310	76
	≤ 3·2	1231	457	73
	≤ 3·4	1478	621	70
	≤ 3·6	1690	876	66

† n, The frequency with which the value for d indicated in the first column occurs between the 3224 amino acid residues of the proteins in Table 1.

‡ Because of the symmetry of $d_2(i, j)$ with respect to the chain direction (Fig. 1), only d_2 values with $j > i$ were counted.

Der Tabelle ist zu entnehmen, wie oft die Abstände kleiner als die Limits in der 1. Spalte sind. Kurze Distanzen treten hauptsächlich zwischen benachbarten Resten (j-i = 1) auf.

⇒ Die sequentielle Zuordnung durch NOE ist verlässlich

Es ist zu erkennen, dass d1 der geeignetste Abstand ist. da 98 % aller Abstände d1, die kleiner als 2,4 Å sind, Abstände zwischen benachbarten Aminosäuren sind.

Die einzelnen Statistiken für die Abstände d_1, d_2 und d_3 lassen sich außerdem miteinander kombinieren. Es wird schließlich deutlich, dass die Kombination von d_1 und d_2 ein universelles und verlässliches Kriterium für die sequentielle Resonanzzuordnung ist.

Literatur

- Billeter et al.: Sequential resonance assignments in protein 1H NMR spectra. Computation of sterically allowed proton-proton distances and statistical analysis of proton-proton distances in single crystal protein conformations. J Mol Biol. 1982; 155(3):321-46

8. Strukturbestimmung großer Proteine mittels NMR - Heteronukleare und mehrdimensionale Spektroskopie

Was bisher geschah...

Um die biologische Funktion eines Makromoleküls z.B. eines Proteins auf atomarer Ebene zu verstehen, ist es unerlässlich die Struktur des Moleküls zu kennen. Der heutigen Wissenschaft stehen zwei generelle Wege zur Strukturbestimmung großer Moleküle zur Auswahl. Der eine Weg besteht darin eine Röntgenstrukturuntersuchung an einem Einkristall vorzunehmen, der andere Weg besteht in der Lösung der Struktur mittels Kernmagnetischer-Resonanz-Spektroskopie. Während man auf dem ersten Weg zur Struktur die Hürde der Kristallisation nehmen muss –dies ist nur in seltenen Fällen trivial– ermöglicht der zweite Weg via NMR-Spektroskopie einen direkteren Zugang zur Molekülstruktur. Doch auch die Techniken der NMR-Spektroskopie sind nicht ohne Limitationen auf biologische Fragen anzuwenden.

Zu Beginn der Achtziger des 20. Jahrhunderts hat man mittels zweidimensionaler homonuklearer NMR-Experimente die Strukturen von kleinen Proteinen erfolgreich gelöst, es wurden in den späten Jahren dieser Dekade sogar Strukturen von Proteinen mit bis zu hundert Aminosäureresten gelöst. Jenseits dieser Größe jedoch ist die Lösung von Strukturen mit homonuklearer 2D NMR-Spektroskopie nicht möglich, die Auflösung der Spektren ist für deren Komplexität zu gering. Homonukleare Kopplungen, egal ob skalar, wie im COSY oder durch den Raum, wie im NOESY sind im Vergleich zur Linienbreite klein und werden nicht erkannt.

Um Strukturen von Molekülen jenseits der Grenze von 100 Aminosäuren lösen zu können, mussten neue Experimente entwickelt werden, welche die Limitationen der homonuklearen 2D NMR-Spektroskopie zu überwinden vermochten.

Was nun zu machen ist...

Hinter jeder Vier stehen drei Zweier...

Die Lösung der o.g. Probleme lag in der Entwicklung der multidimensionalen (3D und 4D...) heteronuklearen NMR-Experimente. Die höhere Mehrdimensionalität der Spektren erlaubt

eine höhere Auflösung und durch die Heteronuklearität kann man die erhöhte Linienbreite durch die größeren heteronuklearen Kopplungen umgehen.

Wie ist nun ein multidimensionales NMR-Experiment aufgebaut? Ganz einfach, nämlich aus mehreren zweidimensionalen Experimenten.
Normalerweise besteht ein 2D-Experiment aus den Teilen «Präparation, Evolution, Mischen, Detektion». Die Präparation dient zur Generierung transversaler Magnetisierung, in der Evolutionszeit gibt man den Spins die Möglichkeit chemische Verschiebung zu entwickeln, während der Mischperiode werden die Spins in irgendeiner Weise miteinander korreliert um schließlich detektiert zu werden. Die Mehrdimensionalität entsteht, in dem die Evolutionsperiode zeitlich inkrementiert wird. 3D-Experimente werden nun ganz analog hierzu gemacht, man kombiniert zwei 2D-Experimente, auf die Art und Weise, dass man die Detektion eines ersten 2D-Experimentes durch eine zweites 2D-Experiment ersetzt, dessen Präparation man weglässt. Man erhält nun ein Experiment mit zwei voneinander unabhängigen inkrementierten Evolutionsperioden mit zwei Mischperioden und einer Detektionsperiode. So erhält man eine dreidimensionale Datenmatrix $S(t_1, t_2, t_3)$, die mit Hilfe der FT in ein 3D Frequenzspektrum umgewandelt werden kann.
Für ein 4D-Experiment werden in gleicher Weise drei 2D-Experimente kombiniert.

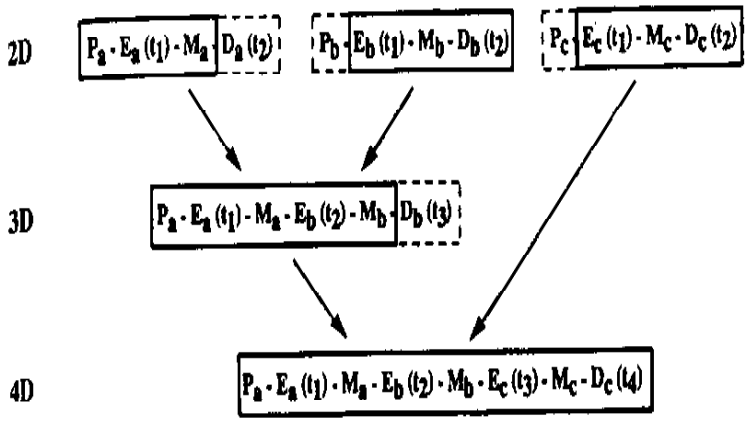


Abb.1: Genereller Aufbau multidimensionaler NMR-Experimente (P: Präparation; E: Evolution; M: Mischung; D: Detektion)

Trotz der Einfachheit der prinzipiellen Vorgehensweise stellen sich nicht-triviale Fragen: Welche 2D-Eperimente kombiniert man? Welche Pulssequenzen erzeugen Artefakte in den Spektren und welche nicht?

Am gezeigten Bespiel erkennt man die Vorteile der multidimensionalen NMR-Experimente in puncto Auflösung:

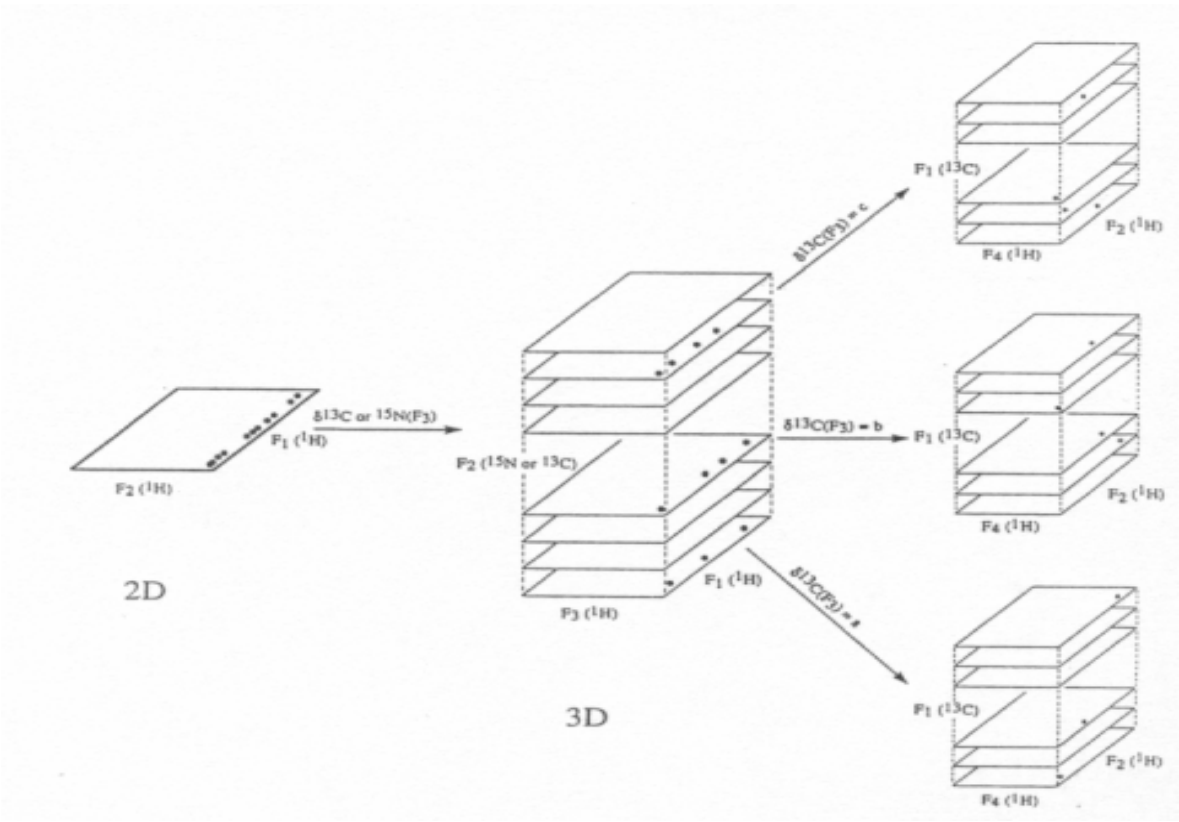


Abb. 2: Schematische Darstellung eines 4D-Spektrums

Mit einem konkreten Beispiel erkennt man sofort den Vorteil der multidimensionalen NMR-Experimente:

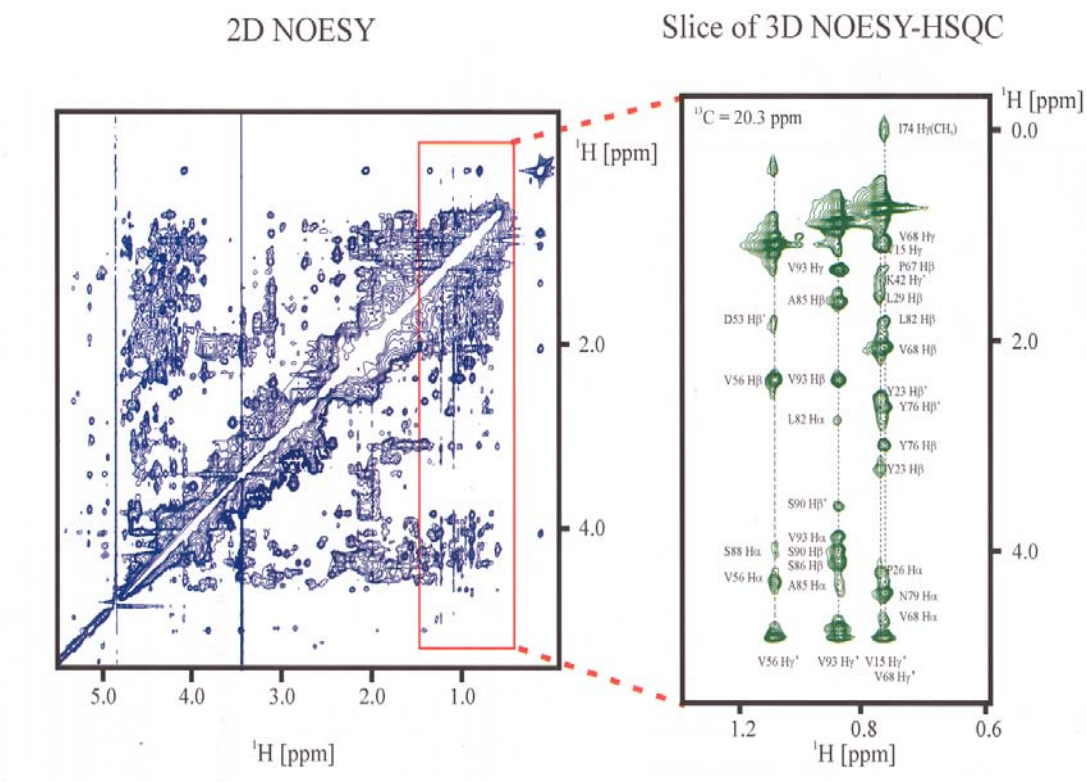


Abb.3: Beispielspektrum 2D und 3D NOESY

Heteronukleare Experimente erfordern, dass die in der NMR-Spektroskopie unsichtbaren (inaktiven) Kerne ^{14}N und ^{12}C mit den Spins I=1 und I= 0 durch die NMR-aktiven Kerne ^{15}N und ^{13}C mit je Spin I=½ ersetz werden. Die bei solchen Experimenten nutzbaren Kopplungen sind groß.

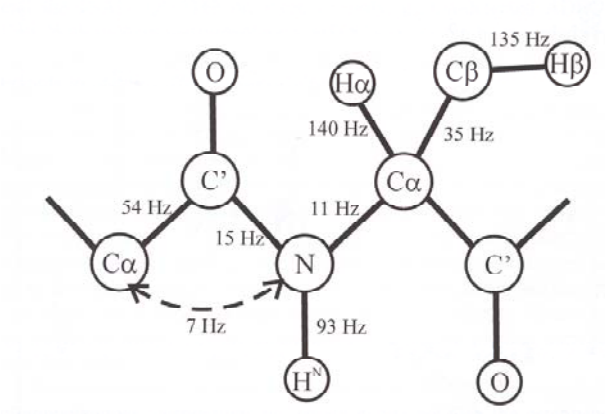


Abb.4: Kopplungen im Peptid

Dies kann man, wie im folgenden beschrieben, dann bei der Anwendung der Experimente auf biologische Makromoleküle anwenden. Die Autoren Clore und Gronenborn dazu: „…heteronuclear 3D and 4D NMR experiments [...] yield important information in the form of ^{15}N and ^{13}C chemical shifts.”[1]

Strategie und Durchführung

Bei der NMR-Spektroskopie liegt das zu untersuchende Molekül in Lösung vor, hierbei müssen einige Punkte erfüllt sein. Die Konzentration des Proteins liegt bei ca. 1mM, das Gesamtvolumen bei 0,3-0,5ml. Das Protein muss gelöst sein und es darf auch nach einem längeren Zeitraum nicht aggregieren; es ist bei Raumtemperatur über mindestens Wochen stabil. Das Protein ist mit $^{15}N/^{13}C$ markiert.

Da der Versuch meist doppelt aufgenommen wird liegt einmal das Protein in 100% D_2O vor, einmal in 95%H_2O/5% D_2O. Hierdurch kann man die austauschenden von den nicht-austauschenden Protonen unterscheiden und erhält so zusätzliche Information über die räumliche Struktur.

Für manche Experimente kann spezifisches Labeln sinnvoll sein z.B. kann man den Bakterien, denen nur markierter N/O als Quelle zur Verfügung stehen, die aromatischen Aminosäuren fertig und unmarkiert zugeben. Sie werden dann genauso eingebaut.

Ist die Probe in geforderter Weise präpariert, dann beginnt die eigentliche Strukturbestimmung mittels NMR. Die Strategie, mit der bei der Auswertung der Spektren vorgegangen ist in der folgenden Abbildung dargestellt. Dabei ist laut Clore/Gronenborn: „a key aspect of any NMR structure determination is the requirement to assign each resonance to an individual proton and then uniquely identify each pair wise through-space NOE interaction“. [1]

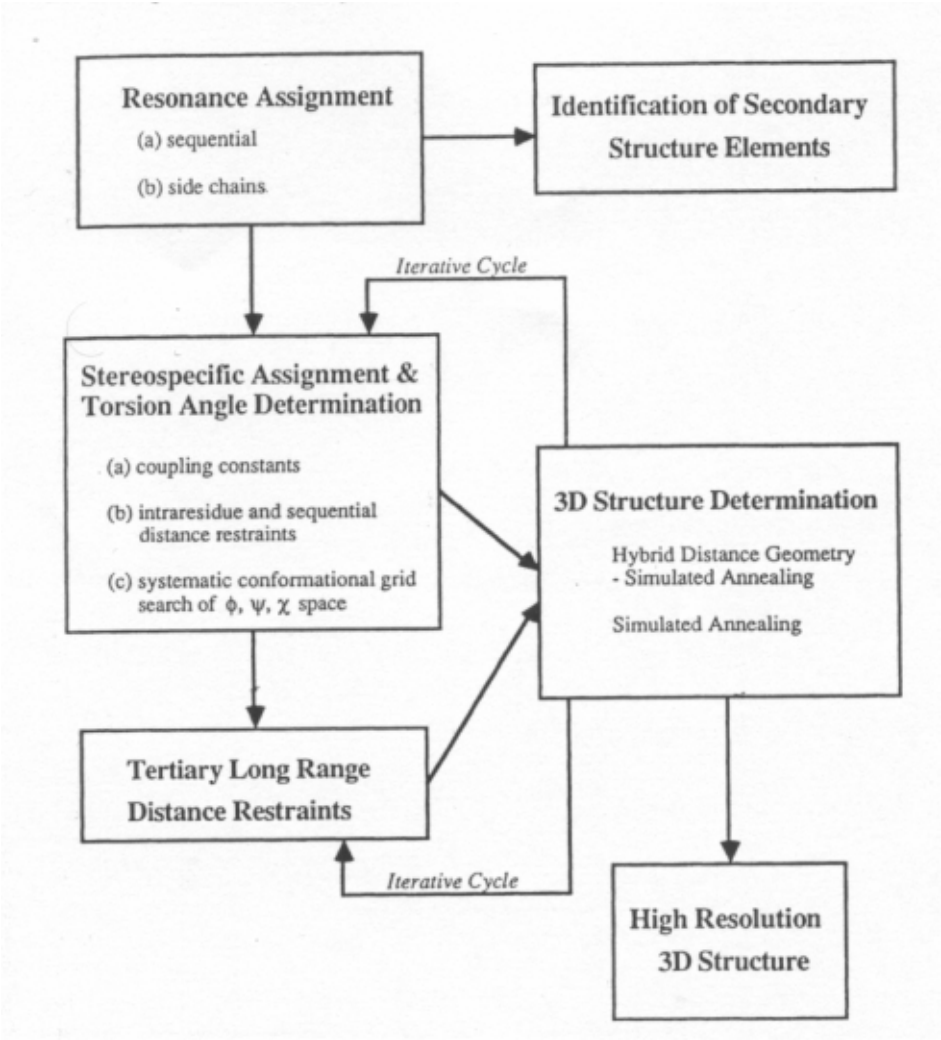


Abb. 5: Strategie der Strukturbestimmung

Die Strategie beginnt in einem ersten Schritt mit der Zuweisung (=deutsch für assignment) der Resonanzen, zuerst sequentiell, das meint für das Polypeptidrückgrat und anschließend für die Seitenketten. Hierzu nutzt man heteronuklearen multidimensionale Experimente aus.
So erfolgt das sequentielle zuordnen über zwei Experimente –die nach den Atomen benannt wurden, welche sie korrelieren– CBCANH und CBCA(CO)NH

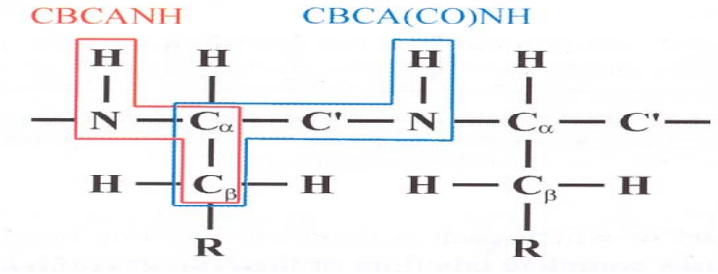


Abb.6: Korrelationen im CBCANH und CBCA(CO)NH

Zuerst wählt man in einem HSQC-Experiment die entsprechenden ^{15}N chemischen Verschiebungen aus, auf diesen chem. Verschiebungen basierend untersucht man dann die Korrelationen der o.g. Atome.

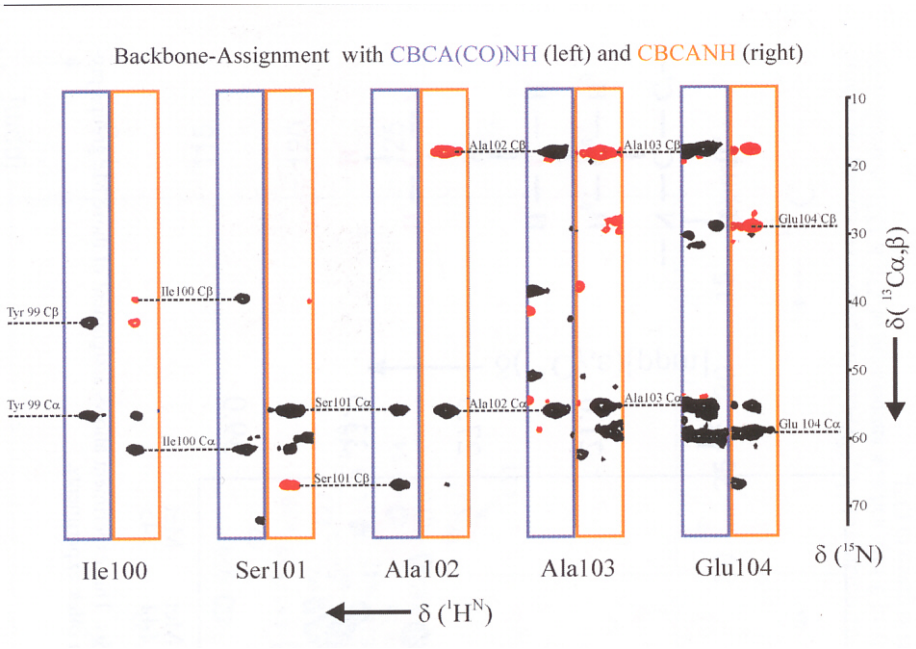


Abb.7: Strips aus CBCANH + CBCA(CO)NH Experimenten an Calmodulin

Die nach dem „sequential assignment“ erfolgende Resonanzzuordnung der Seitenkettenatome wird unter zu Hilfename von TOCSY-HSQC, HCCH-COSY und HCCH-TOCSY durchgeführt.

Im zweiten Schritt werden Kupplungskonstanten und sowohl sequentielle als auch intraresiduale NOE-Signale bestimmt. Die daraus erhaltenen Informationen –Diederwinkel, Atomabstände– können zusammen mit den im ersten Schritt erhaltenen Informationen einen Überblick über die Sekundärstrukturelemente geben.

Im dritten Schritt werden interresiduale NOE-Signale und dipolare Kopplungen zur Bestimmung der globalen Struktur ausgewertet.

Die Berechnung der Struktur erfolgt in einem vierten Schritt mittels Kraftfeldern, denen die Restraints aus den NMR-Abstands, Kopplungs- und Winkelmessungen beigefügt wurden.

Was sein wird...

Die Größengrenze von 100 Aminosäureresten fiel durch die Einführung der hier beschriebenen Experimente. Nun sind der Strukturuntersuchung mittels NMR-Spektroskopie Proteine mit einer Größe von bis zu 60kDa zugänglich. Durch eine weitere Verbesserung der jetzt bestehenden Experimente, einer weiteren Erhöhung der Magnetstärken und vielleicht der Einführung neuer Experimente wird sich diese Größengrenze möglicherweise weiterhin nach oben verschieben.

Literatur

- G. Marius Clore, Angela M. Gronenborn; *Science, Vol. 252*,p1390-1399, 1991
- G. Marius Clore, Angela M. Gronenborn; *Biological Magnetic Resonance, Vol.16: Modern Techniques in Protein NMR*, p3-26, 1999
- Christian Griesinger; *Essays in Contemporary Chemistry: From Molecular Structure towards biology*,p35-106, 2001

9. Molekulare Dynamik

Molekulare Dynamik ist die Simulation der Bewegungen eines Systems von Partikeln.
Bei diesen Partikeln kann es sich beispielsweise um die Sterne einer Galaxie oder die Atome eines Proteins oder DNA-Moleküls handeln.
Aufgrund von vereinfachenden Näherungen lassen sich die Bewegungen der Partikel mit dem Computer effizient berechnen.

Bei der Betrachtung von Bewegungen eines Moleküls ist eine häufig verwendete Vereinfachung die Anwendung der Newtonschen Gleichungen der Mechanik auf die Bewegungen der Atome. (Im Gegensatz zur quantenmechanischen Beschreibung!)

Weitere Näherungen betreffen die dafür benötigte Energiefunktion, welche die Gesamt-Energie des Moleküls in Abhängigkeit der Molekülgeometrie beschreibt.

Biologische Anwendungen der Molekularen Dynamik:

- ∇ Bestimmung von Proteinstrukturen aus NMR-spektroskopischen Daten
- ∇ Verfeinerung von Proteinstrukturen, die mit Hilfe der Röntgenkristallographie ermittelt wurden
- ∇ MD zur Berechnung der Änderung der freien Enthalpie bei:
  - Ligandenbindung an Proteine
  - oder Proteinmutationen
- ∇ Simulation der internen Dynamik eines Proteins (z.B. über 100ns)

Wie funktioniert die Simulation der Atombewegungen?

Potentielle Energiefunktion

Grundlage der Simulation ist stets eine mehrdimensionale Energiefunktion, die die Gesamtenergie des Moleküls (oder allgemein des Systems aus Partikeln) in Abhängigkeit der Atom (bzw. Partikel-) Koordinaten R im kartesischen Koordinatensystem beschreibt.

Für kleinere Moleküle kann diese Funktion quantenmechanisch berechnet werden, für Proteine muss diese Funktion jedoch empirisch bestimmt werden.

Eine häufig verwendete Energiefunktion ist:

$$E(R) = \frac{1}{2}\sum_{bonds} K_b\left(b - b_0\right)^2 + \frac{1}{2}\sum_{\substack{bond\\angles}} K_\Theta(\Theta - \Theta_0)^2 + \frac{1}{2}\sum_{torsional} K_\phi\left[1 + \cos\left(n\phi - \delta\right)\right] + \sum_{nbpairs}\left(\frac{A}{r^{12}} + \frac{B}{r^6} + \frac{q_1 q_2}{rD}\right)$$

Der **erste** Term der Energiefunktion beschreibt die Abweichung von der idealen Bindungslänge b_0 (welche man z.B. aus Mikrowellen-spektroskopischen Daten erhält). Diese Abweichung gehorcht dem Hookschen-Gesetz und kann daher als harmonische Schwingung beschrieben werden.

K_b ist die Federkonstante, sie bestimmt die Flexibilität der Bindung (ermittelt aus quantenmechanischen Berechnungen oder infrarot-Spektroskopischen Daten).

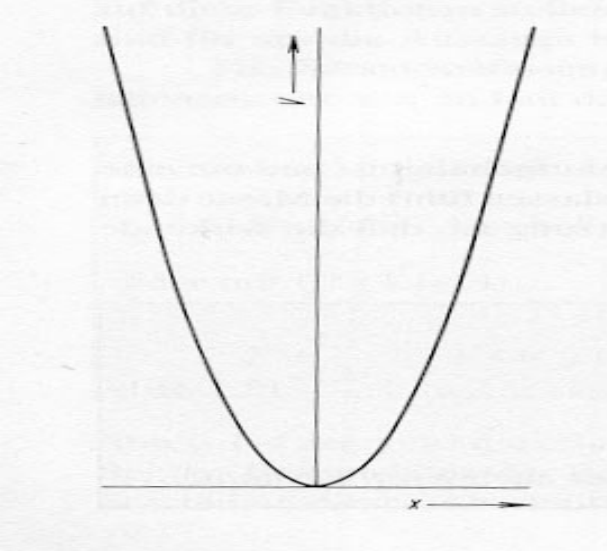


Bild 1: Harmonisches Potential

Der **zweite** Term steht für den Einfluss der Bindungswinkel θ und kann ebenfalls als harmonisches Potential wiedergegeben werden.

Der **dritte** Term gibt die Energieänderung bei Rotation um die Bindungswinkel wieder. (Torsionswinkel, Dihedral-winkel).

Da sich die Energie bei dieser Rotation periodisch ändert, kann die Energieänderung durch eine Cosinusfunktion beschrieben werden.

Der **vierte** und letzte Term der Energiefunktion beschreibt alle nicht-bindungsabhängigen Parameter, wie Van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Kräfte, welche von den Abständen zwischen den Atomen abhängen:

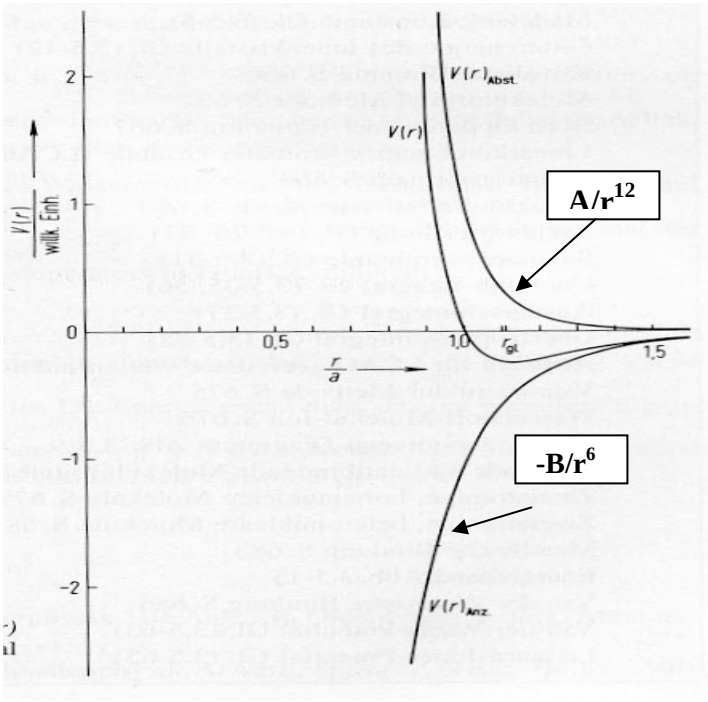


Bild 2: Lennard-Jones-Potential

A/r^{12} steht für die repulsiven Kräfte, welche nur eine relativ kurze Reichweite haben und daher schnell mit zunehmendem Abstand r der Atome abnehmen.

$-B/r^6$ beschreibt die attraktiv wirkenden Londonschen Dispersionskräfte, die eine etwas weitere Reichweite haben.

Graphisch zusammen dargestellt liefern diese beiden Terme das sog. Lennard-Jones-Potential.

Der Term $\frac{q_1 q_2}{Dr}$ ist das Coulombsche Gesetz ,

das die elektrostatische Wechselwirkung zwischen 2 Atomen mit den Partialladungen q_1 und q_2 beschreibt.

D ist die Dielektrizitätskonstante und r der Abstand der beiden Atome .(D ~ 1-5)

Je nach Parametrisierung ergeben sich aus dieser Energie-Funktion verschiedene Kraftfelder z.B. CHARMM, AMBER, CVFF.

Die Qualität dieser Kraftfelder hängt stark davon ab, wie gut die aus Studien an Modellsystemen wie Aminosäuren gewonnenen Parameter die Verhältnisse bei Makromolekülen wie Proteinen wiedergeben.

Was liefert die Energiefunktion?

Statisch

Mit Hilfe bestimmter Minimierungsalgorithmen (steepest descent, conjugated gradient) lassen sich die molekularen Strukturen berechnen, die die geringste Gesamtenergie haben.
(Geometrische Optimierung)

Dynamisch

Anhand der Energiefunktion lassen sich Molekulare Dynamik-Simulationen durchführen:

$$E = W = F \; s$$

Aus der ersten Ableitung dieser Energiefunktion nach dem Weg s können die Kräfte, die auf die Atome des Moleküls wirken, bestimmt werden:

$$\frac{dE}{ds} = F$$

Simulationstechniken

Es gibt im Prinzip zwei verschiedene Methoden, die eine Simulation der Molekülbewegungen (basierend auf der Energiefunktion) ermöglichen:

Molekulare Dynamik-Methode (MD)

Monte-Carlo-Methode (MC)

Molekulare Dynamik-Methode

Die detailiertesten und exaktesten Informationen erhält man in MD-Simulationen,
bei denen die Newtonschen Bewegungsgleichungen für die Atome des Systems (und das umgebende Lösungsmittel) gelöst werden.

$s = v\,t$ (Bewegung mit konstanter Geschwindigkeit

$s = \frac{1}{2}\,a\,t^2$ (beschleunigte Bewegung mit konstanter Beschleunigung a)

Die Position r_i eines Atoms mit der Geschwindigkeit v_i und der Beschleunigung a_i ergibt sich für den Zeitpunkt $t = t + \Delta t$ daher aus:

$$r_i (t + \Delta t) = r_i (t) + v_i \Delta t + \tfrac{1}{2} a_i (\Delta t)^2$$

Die Ausgangspositionen r_i der Atome (Koordinaten) erhält man aus den Daten einer NMR-Messung oder aus Röntgenkristallographischen Daten.

(Eine Verfeinerung dieser Ausgangsstruktur erhält man mithilfe eines iterativen Minimisierungsalgorithmus.
Dadurch werden lokale Energiemaxima, die durch Atomüberlappungen oder verzerrte Bindungswinkel zustande kommen, ausgeglichen.)

Die Ausgangsgeschwindigkeiten v_i der Atome entnimmt man einer Maxwellverteilung bei niedriger Temperatur.

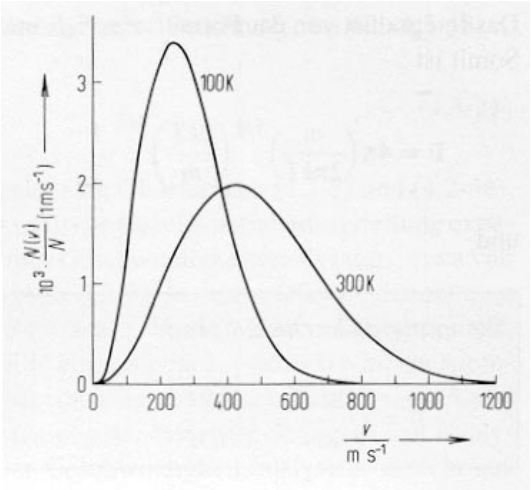


Bild 3: Maxwell-Verteilung

Die Beschleunigungen a_i ergeben sich nach der Newtonschen Grundgleichung der Mechanik F = m a aus den Kräften F_i, die auf die einzelnen Atome wirken. (Die Kräfte werden wie gesagt aus der ersten Ableitung der Energiefunktion nach dem Weg gewonnen.)

Da man in dieser Gleichung vereinfachender Weise von einer im Zeitraum Δt konstanten Beschleunigung ausgeht, muss Δt möglichst klein gewählt werden (10^{-15}s).
(Theoretisch ist die Beschleunigung a nämlich nur für unendlich kleine Δt gegeben, was unendlich viele Simulationsschritte bedeuten würde.)

Obige Gleichung kann von schnellen Computern für alle Atompositionen r_i eines Moleküls gleichzeitig gelöst werden.

Man erhält so eine zeitliche Abfolge von Koordinatensätzen, welche man als Trajektorie bezeichnet.

Ein einzelner Simulationsschritt benötigt bei einem Protein wie z.B. Myoglobin ungefähr 0,2s Computer-Rechenzeit.
Eine MD-Simulation dauert ca. 100ps, d.h. es setzt sich aus 100 000 Simulationsschritten (à 1fs) zusammen und benötigt daher um die 6 h Rechenzeit am Computer!

Oft werden die Rechenzeiten noch größer, da die das Protein umgebende Hydrathülle aus einigen Hundert Wassermolekülen in die Simulation miteinbezogen werden muss.
Aus diesem Grund beschränkt man sich bei den MD-Simulationen von Proteinen häufig auf kleinere Bereiche des Proteins, wie z.B. auf das aktive Zentrum eines Enzyms.

Eine MD-Simulation beginnt mit einer Äquilibrierungsphase, in der den Atomen zunächst willkürlich Geschwindigkeiten einer Maxwellverteilung bei niederer Temperatur zugewiesen werden.
Mit diesen Geschwindigkeiten wird für einige Picosekunden eine Simulation durchgeführt.(also einige tausend Simulationsschritte à 1fs).

Danach werden den Atomen bei jedem Simulationsschritt neue Geschwindigkeiten zugeordnet, und zwar jeweils aus Maxwellverteilungen zunehmend höherer Temperaturen. Dazwischen liegen Intervalle einer dynamischen Relaxation.

Die Äquilibrierungsphase gilt als beendet, wenn die Temperatur des Systems über ca. 10 ps konstant bleibt.

Die Temperatur T des Systems hängt direkt von der aus den Geschwindigkeiten aller Atome quadratisch gemittelten Geschwindigkeit v_i^2 ab:

$$\frac{1}{2}\sum_{i=1}^{N} m_i \left\langle v_i^2 \right\rangle = \frac{3}{2} N k_b T$$

N= number of atoms in the system

mit $v_i (t+\Delta t) = v_i (t) + a_i (\Delta t)$

Außerdem muss die Gesamtheit aller Atomgeschwindigkeiten einer Maxwellverteilung gleichen.
Nach Einstellen dieses Gleichgewichts erhält man die Atomkoordinaten und die

Geschwindigkeiten der Atome durch Summation über die Bewegungsgleichungen der einzelnen Atome.

Monte Carlo-Verfahren

In der Monte-Carlo-Methode wird die PES (Potentialhyperfläche = potential energy surface) nach statistischen Kriterien abgetastet.
Dies geschieht unter Verwendung von Zufallszahlen, die erstmals aus einer Tabelle entnommen wurden, in der die Roulette-Ergebnisse des Spielcasinos in Monte Carlo aufgezeichnet waren.
Daher spricht man von Monte-Carlo-Verfahren.

Man beginnt mit einer willkürlichen Startstruktur des Partikel-Systems und
verwendet dann zufällige Zahlen, um lokal kleine Veränderungen des Systems
(z.B. Verschiebung eines Atoms oder Veränderung eines Torsionswinkels) zu generieren.

Nach jedem Schritt wird die Energie des neuen Zustands berechnet. Dann kann entschieden werden, ob der Veränderungsschritt zugelassen oder verworfen wird (hit-or-miss-Prinzip):

Ist der neue Zustand energieärmer, wird er übernommen, d.h.
die nächste zufällige Variation startet von diesem Zustand aus.

Ist die Energie des neuen Zustands jedoch höher, wird der neue Zustand nicht zwangsläufig verworfen.
Dies ist durchaus sinnvoll, da dadurch verhindert wird, dass das System in einem lokalen Minimum „hängen bleibt“.

Um zu entscheiden, ob bei einer Energieerhöhung der Schritt zugelassen wird oder nicht, berechnet man den sogenannten Boltzmannfaktor f, der die thermische Energie bei der jeweiligen Simulations-Temperatur berücksichtigt:

$$f = \exp (-E_{new}/kT - E_{old}/kT)$$

Wenn der berechnete f-Wert kleiner ist als der des vorhergehenden Veränderungsschrittes, wird der neue Zustand übernommen, ist er jedoch größer,
wird er verworfen.

Der Bolzmannfaktor beschreibt also die Übergangswahrscheinlichkeit für einen Zustand höherer Energie. Er hängt nur von dem direkt vorhergehenden Zustand ab.

Beim Monte-Carlo-Verfahren wird also der Konformationsraum des Systems zufällig nach Zuständen geringer Energie durchsucht.
Diese Art von „random walk“ wird auch Markov chain genannt.

Da hierbei nur die lokale Gesamtenergie interessant ist, müssen keine Kräfte berechnet werden und es können daher in einer MC-Untersuchung bei gleichem numerischen Aufwand mehr Punkte der PES untersucht werden als in einer MD.

Strukturrechnung in der NMR-Spektroskopie

Es ist unmöglich, allein aufgrund der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) und den empirischen Energietermen wie Bindungslänge, -winkel, vdW- und Coulombkräfte
(constraints) die dreidimensionale Struktur eines Proteins durch MD-Simulation zu berechnen.

Ohne zusätzliche Abstandsinformationen (bzw. Torsionswinkelinformationen), die beispielsweise aus NMR-spektroskopischen Experimenten gewonnen werden können,
(NOE-Kreuzsignale, Karplus-Beziehung) stehen dem Proteinrückgrat aufgrund der freien Drehbarkeit um die N-Cα-Bindung (φ-Winkel) und die Cα–CO -Bindung
(ψ -Winkel) außerordentlich viele Konformationen zur Verfügung.
Die Gesamtheit all dieser möglichen Konformationen nennt man den Konformationsraum des Proteins.
Dieser soll durch möglichst viele Randbedingungen (restraints) so weit wie möglich eingeschränkt werden.
Die Anzahl der Abstandsrandbedingungen ist dabei wichtiger als die Genauigkeit, mit der die Kernabstände angegeben werden, so dass eine grobe Einteilung der Abstände in 3 Gruppen (3,4 und 5 A) ausreichend genau ist.
Zur Berücksichtigung dieser zusätzlich experimentell bestimmten Randbedingungen wird der Term E_{eff} in die Energiefunktion $E_{tot}(R)$ eingeführt:

$$E_{tot}(R) = E_{emp} + E_{eff}$$

$$E_{eff} = \Sigma (E_{NOE} + E_{torsion})$$

Der Term für die Abstandsrandbedingungen beschreibt ebenfalls ein harmonisches Potential.

Simulated Annealing

Zur Berechnung einer Struktur möglichst geringer Gesamtenergie verwendet das Computerprogramm üblicherweise ein Verfahren, das man als Simulated Annealing (SA) bezeichnet.

Bei diesem Verfahren nutzt man einen Algorithmus, der die Berechnung globaler Minima einer Funktion (hier: der mehrdimensionalen Energiefunktion) ermöglicht.
Bei anderen Ansätzen tritt häufig das Problem auf, dass man bei der Energieminimierung in lokalen Energieminima „hängenbleibt".
Dies wird beim SA-Verfahren dadurch verhindert, dass nach der ersten Energieminimierung der Startstruktur eine Hochtemperaturphase folgt, bei der das System auf einige tausend Kelvin gebracht wird.
Diese hohe Temperatur verleiht den Atomen der Startstruktur eine hohe thermische Beweglichkeit , wodurch Energiebarrieren zwischen nebeneinanderliegenden Minima
überwunden werden können.

Nach ca. 6000 Simulationsschritten bei hoher Temperatur werden die Geschwindigkeiten der Atome in einer Vielzahl von Schritten à 50 K langsam reduziert.
Während dieser Abkühlphase, die ca. 150 Simulationschritte umfasst, werden die Kraftkonstanten der experimentellen Abstandsrandbedingungen erhöht, um diese Randbedingungen stärker zu gewichten.

Da der Algorithmus theoretisch aber nur für unendlich viele Abkühlungsschritte das Erreichen des globalen Energieminimums garantiert, werden für die Strukturrechnung
20 verschiedene Ausgangsstrukturen verwendet.

Diese werden solange in voneinander unabhängigen MD-Simulationen verändert, bis keine Verringerung der globalen Energie mehr beobachtet werden kann und die Strukturen im Konformationsraum konvergieren.

Man erhält daher am Ende von NMR-Strukturrechnungen keine exakt definierte Struktur, sondern ein Strukturensemble.

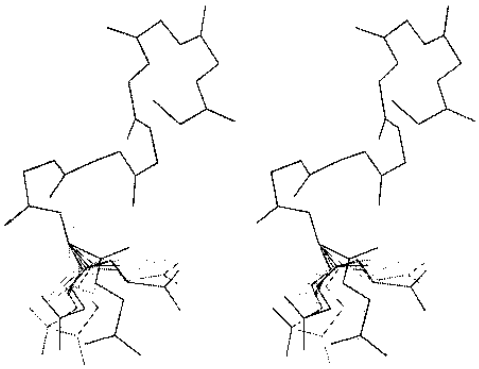


Bild 4: Strukturensemble

Ein Maß für die Qualität der aus NMR-Daten berechneten Struktur ist der sogenannte RMSD-Wert. (Root Mean Square Deviation)

Er gibt die mittlere Abweichung der einzelnen Strukturen von einer aus den Einzelstrukturen errechneten Mittelwertstruktur an.

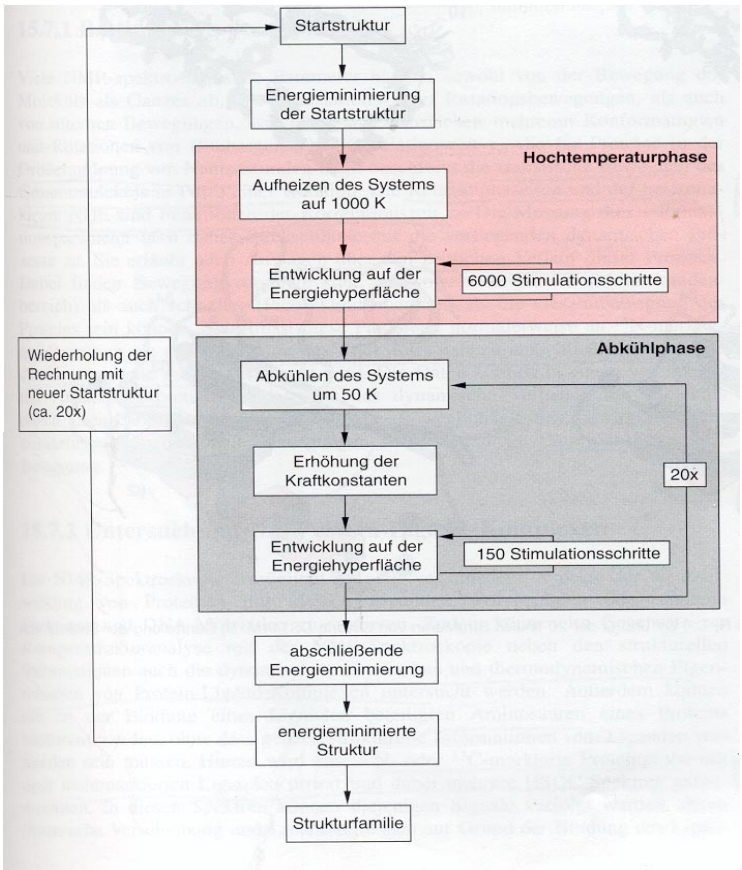


Bild 5: Schema des Simulated Annealing

Bedeutung interner Molekülbewegungen

Viele Molekülbewegungen haben eine wichtige funktionelle Bedeutung:

- Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin (pos. Kooperativität)
- Bindung von ATP an Hexokinase (Induced fit)

Daher vermutet man, dass die Dynamik eines Proteins genau wie die Struktur einem evolutionärem Selektionsdruck unterliegt

Das Spektrum an Konformationen, das man aus MD-Simulationen von Myoglobin einer Spezies erhält, ähnelt dem Spektrum evolutionärer Strukturvariationen.

Vorteil der Molekularen Dynamik-Simulationen

Liefert größere Strukturvariationen als verschiedene röntgenkristallographisch gewonnene Strukturen.
Letztere entsprechen lokalen Minima im multidimensionalen Potentialtopf und repräsentieren deswegen nur einen kleinen Anteil (Untermenge) der möglichen Strukturen.

Grenzen der MD-Simulation

MD-Simulationen werden vor allem durch 2 Faktoren limitiert:

A Näherungen in der potentiellen Energiefunktion führen zu systematischen Fehlern
Man versucht, durch Verwendung komplexerer Bindungsterme und durch Berücksichtigung von long-range elektrostatischen Wechselwirkungen, Lösungsmitteleffekten, sowie quantenmechanischen Effekten, diese systematischen Fehler zu minimieren.

B Dauer der Simulationen führt zu statistischen Fehlern
Für die meisten Anwendungen sind Simulationen von 100ps ausreichend.

Längere Simulationszeiten werden benötigt, um Relaxationsphänomene zu untersuchen, da diese im Nanosekundenbereich ablaufen.

Literatur

G. Petsko und M. Karplus, Nature (1990) 347 631-9

10. Die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen mit Hilfe von NMR-Methoden

Einleitung

Mit der NMR-Spektroskopie kann man viele Aspekte von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Liganden (z.B. Arzneimittel, Peptide, Proteine, DNA/RNA) untersuchen. Neben strukturellen Informationen lassen sich mit der NMR im Gegensatz zur Röntgenkristallographie auch dynamische, kinetische und thermodynamische Eigenschaften von Protein-Ligand-Komplexen bestimmen. Die NMR-Spektroskopie eignet sich im Gegensatz zu fluoreszenz-spektroskopischen Untersuchungen auch zur Untersuchung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen mit niederaffinen Bindungskonstanten.

Je nach experimentellen Anforderungen (Größe und Art der Moleküle, Bindungs-Gleichgewichtskonstante, Geschwindigkeit der Reaktion, Stöchiometrie und Symmetrie, verwendete Kerne) und gesuchten Parametern einer Ligandenwechselwirkung können verschiedene NMR-Methoden eingesetzt werden. Dabei lassen sich z.B. die folgenden Parameter untersuchen:

1. chemische Verschiebungs-Änderungen
2. Änderung der Linienbreiten
3. Austausch
4. intermolekulare NOEs
5. Transfer-NOEs
6. Relaxations- und Diffusionsraten

Biophysikalische Grundlagen – Berechnung der Bindungsaffinität

Die Bindung eines Liganden an ein Protein kann man in einem Fall ohne Übergangszustand wie folgt beschreiben:

$$[L] + [P] \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightarrow}} [LP]$$

Die Dissoziationskonstante ist definiert als:

$$K_D = \frac{[P][L]}{[LP]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Gemessenen Parameter aus den NMR-Spektren (in diesem Beispiel die chemische Verschiebung δ eines Kernes) lassen sich miteinander in Verbindung setzten:

$$\delta_{obs} = f_f \delta_f + f_b \delta_b$$

(δ_{obs}: beob. chem. Versch.; f_f: Anteil ungeb. Prot.; δ_f: chem. Versch. beim vollst. ungeb. Prot.; f_b: Anteil geb. Prot.; δ_b: chem. Versch. beim vollst. geb. Prot.)
So ergibt sich folgende Gleichung (unter der Annahme, daß viel mehr freies Protein vorliegt, als gebundenes):

$$\delta_{obs} = \delta_f + \frac{[L]_{ges}(\delta_b - \delta_f)}{[P]_{ges} + K_D}$$

Analog zu Enzymkinetiken nach Michaelis-Menten ergibt sich durch geeignete Auftragung der Werte bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen die gesuchte Dissoziationskonstante.

Beispiel: Beobachtung der chemischen Verschiebungs-Änderungen bei der Titration eines Phosphopeptides zur Phosphotyrosine Binding Domain des Adaptorproteins Shc:

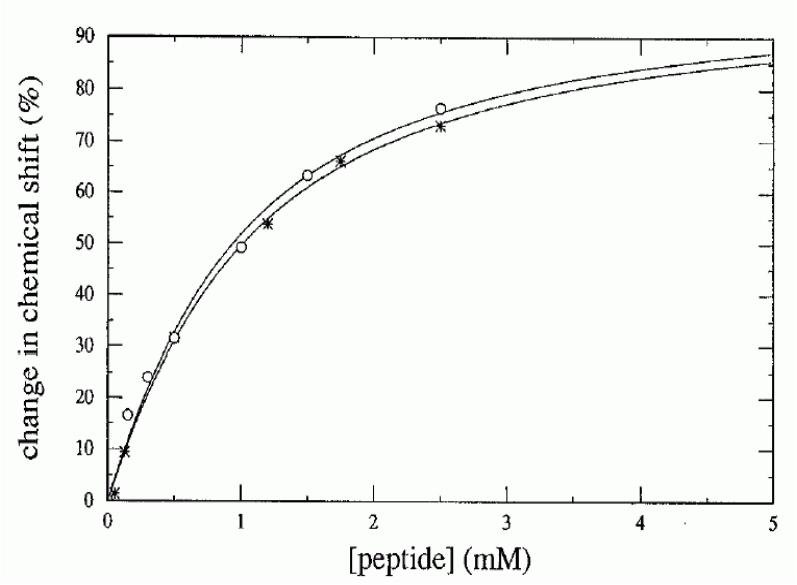


Abbildung 1: Titration eines Phosphopeptides zur Phosphotyrosine Binding Domain des Adaptorproteins Shc (aus: J Biol Chem 271(52) pp. 31119-31123, 1996)

SAR-by-NMR

Mitte der 1990er Jahre etablierte eine Gruppe um Stephen W. Fesik von den Abbott Laboratories eine Methode, um mit Hilfe von NMR-Untersuchungen niederaffine Liganden von Proteinen zu identifizieren und schließlich daraus hochaffine Liganden zu entwickeln. Das Ganze nannten sie etwas irreführend „Structure Activity Relationship by Nuclear Magnetic Resonance“, kurz SAR-by-NMR.

Man kann diese Technik in fünf grundlegende Schritte unterteilen (s. Abb. 2):

Zunächst werden Substratbibliotheken aus niedermolekularen, nicht ^{15}N-markierten, organischen Stoffen in einem 2D-^{15}N-HSQC-Experiment nach Wechselwirkungen mit dem betreffenden, ^{15}N-markierten Protein gescreent. In einem solchen ^{15}N-HSQC-Spektrum werden nur die Kreuzsignale von Stickstoffatomen mit den dazugehörigen Wasserstoffatomen aufgenommen (Backbone, Arg, Asn, Gln, His, Trp). Durch Wechselwirkungen (schwache Bindung reicht aus) von Protein und Ligand ändert sich die chemische Verschiebung der betroffenen Kerne, was im HSQC-Spektrum zu beobachten ist (Abb. 2).

Durch einfache chemische Modifikationen wird ein interessanter Ligand optimiert.

Anschließend wird ebenfalls im ^{15}N-HSQC nach einem Liganden gescreent, der in der Nähe des ersten Liganden bindet.

Dieser zweite Ligand wird ebenfalls optimiert.

In Röntgen- oder NMR-Strukturbestimmungen wird untersucht wie die beiden Liganden zu einander stehen und ob sie gleichzeitig binden. Mit diesen Informationen wird ein geeigneter Linker gewählt, um die beiden relativ niederaffinen Liganden so zu verknüpfen, dass sie zusammen einen hochaffinen Liganden ergeben.

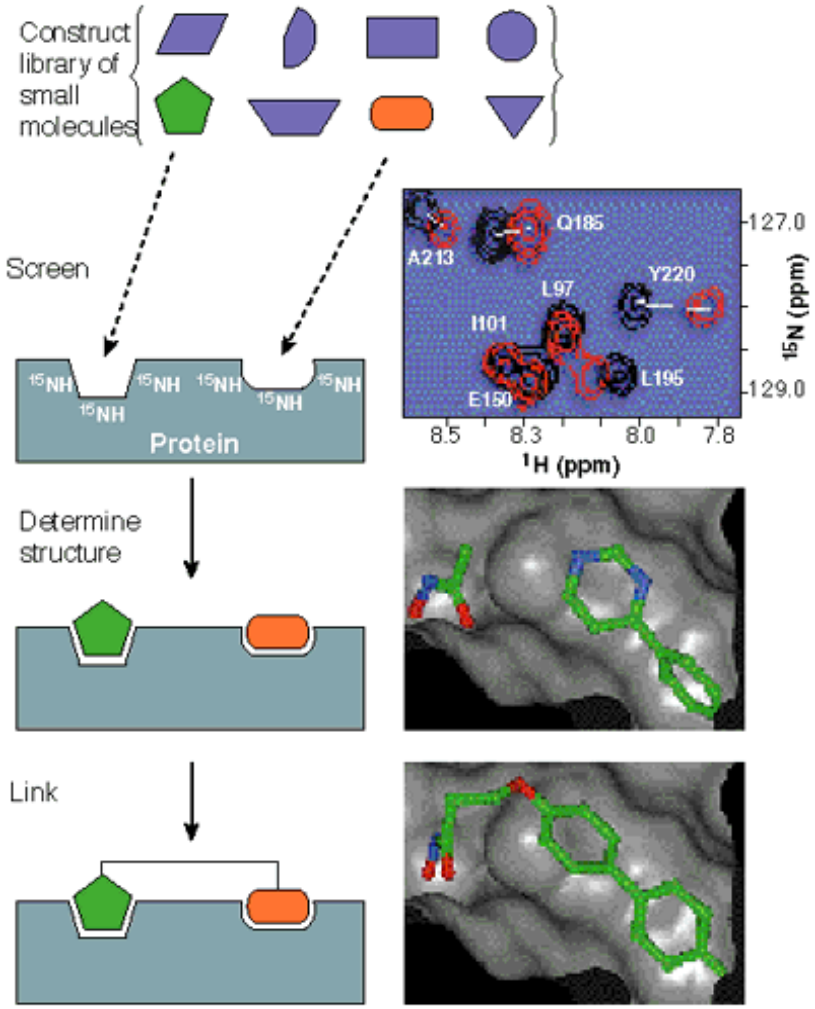


Abbildung 2: SAR-by-NMR (aus: Science 278 (5337): 497)

Diese Methode wurde von Shuker et al. (1996) am FKBP12 (FK506 binding protein) angewandt. FKBP12 spielt eine Rolle als Target für Immunsuppressiva, da es im Komplex mit diesen auf unterschiedlichen Wegen (mit FK506 über die Phosphatase Calcineurin, mit Rapamycin über die Kinase mTOR) die T-Zell-Proliferation hemmen kann. Dabei wurde aus zwei niederaffinen Ausgangssubstanzen (2 µM und 0,1 mM) ein hochaffiner Ligand (19 nM) erzeugt.

Diese enorme Erhöhung der Affinität lässt sich thermodynamisch durch die Addition der Bindungsenergien (abzüglich der schwächenden Energien, z.B. durch Torsionskräfte) erklären, die dazu führt, dass die Affinität des kombinierten Liganden im Idealfalle das Produkt aus den Einzelaffinitäten wäre:

$$K_A K_B = e^{-\frac{\Delta G_A + \Delta G_B}{RT}}$$

Vorteile der SAR-by-NMR-Methode im Vergleich zu anderen Methoden

Untersuchung von niederaffinen Liganden möglich, da die dadurch erforderliche höhere Konzentration des Liganden nicht das Hintergrundsignal beeinflusst (nur Protein ist ^{15}N-markiert). Bei fluorimetrischen und colorimetrischen Techniken wäre das Hintergrundsignal zu hoch (Bsp.: K_D = 10 mM und Proteinkonzentration 0,2 mM ergibt bei einer Ligandenkonzentration von 0,1 mM eine Population des Komplexes von nur ca. 2 % der Gesamtpopulation).

Hohe Durchsatzrate: 1.000 bis 10.000 potentielle Liganden können pro Tag mit einem Kryoprobenkopf getestet werden.

Unterscheidung zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung möglich.

Genaue Identifizierung der Bindungsstellen ist möglich.

Verhinderung von falsch positiven Liganden.

Strukturelle und thermodynamische Daten fließen mit ein.

Genaue Kenntnis der Funktion des Proteins nicht nötig, keine aufwendigen Funktionsassays müssen entwickelt werden.

Die Ligandenbibliotheken müssen nicht allzu groß sein (eine reale Bibliothek von 10^4 Substanzen entspräche bei der Verwendung von 10 verschiedenen Linkern einer „virtuellen“ Bibliothek von 10^9 Substanzen).

Nachteile dieser Methode

Proteingröße (oder Domänengröße) eingeschränkt auf MW < 30 kDa

Große Mengen an Protein (> 200 mg), sowie hohe Konzentrationen in Lösung nötig (>300-500 µM; Wasserlöslichkeit)
Hochfeldspektrometer nötig (evtl. incl. Kryoprobenköpfen)

Prinzipiell kann diese Methode auch zur Bindungsstudien bei DNA und RNA durchgeführt werden.

Messung der Änderung von Relaxations- und Diffusionsraten

Die Wechselwirkung zwischen Makromolekül und Ligand kann nicht nur über Beobachtung von Veränderungen der chemischen Verschiebung des Proteins im ^{15}N-HSQC erfolgen, sondern auch durch Beobachtung von Veränderungen von Relaxationsraten oder Diffusionsraten des Liganden.
Mit der Messung von Relaxations- oder Diffusionsraten kann zwar nicht die Bindungsstelle am Biomakromolekül identifiziert werden, jedoch sind etliche andere Vorteile damit verbunden: Das Protein muss nicht ^{15}N-markiert sein, kann sehr groß sein (je größer desto besser), geringere Konzentrationen sind nötig (50-100 µM), große Bibliotheken können schnell gescreent werden, da mehrere Substanzen gleichzeitig gescreent werden. Es handelt sich dabei um ^{1}H-1D-NMR-Experimente, es werden nur die ungebundenen Komponenten gemessen und Differenzspektren aufgenommen.

Relaxationsraten

Die T_2 Relaxation und die Änderung der chemischen Verschiebung verbreitern meist die Signale der Kerne des Liganden bei der Bindung an ein Makromolekül, deshalb kann aus einer Veränderung der Linienbreite im NMR-Spektrum auf eine Bindung geschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion einer Ligandenwechselwirkung ergibt sich durch das Anlegen eines sog. spin-lock-Feldes, welches die Signale des Proteins und gebundener Komponenten stark abschwächt oder ganz auslöscht (je länger die spin lock - Zeit ist, umso mehr), während die Signale eines ungebundenen Stoffes nur leicht abgeschwächt werden; durch ein Differenzspektrum können dann Liganden identifiziert werden.

Diffusionsraten

Große Makromoleküle wie Proteine (und an sie gebundene Stoffe) diffundieren deutlich langsamer durch eine Lösung als kleine Moleküle (vgl. Stokes-Einstein-Beziehung). Durch die Aufnahme von sog. pulsed-field-gradient-stimulated-echo-Spektren (PFG-STE-NMR) können so bei hohen Gradienten die Signale von kleinen Molekülen eliminiert werden, da diese durch die Diffusion nicht richtig refokussieren können.
Durch Aufnahme von Differenzspektren können auch hier bindende Substanzen identifiziert werden.

Transfer-NOE Experimente

Die Intensität eines NOE Signals ist abhängig vom Molekulargewicht (je größer, desto intensiver). Bindet ein Ligand an ein Makromolekül, können sich auch innerhalb des Liganden starke NOE-Signale ausbilden. Ist nun der Ligand in einem schnellen Austausch mit dem Protein (d.h. schwache Bindung), beobachtet man im Spektrum auch diese Signale (transfer-NOEs) innerhalb des Liganden (der gebundene Zustand des Liganden dominiert den ungebundenen), während nicht-bindende Substanzen nicht sichtbar sind. Bei hochaffinen Bindungen (niedrige k_{off}-Rate) können auch die intermolekularen NOEs zwischen Protein und Ligand beobachtet werden und somit die Struktur des Komplexes bestimmt werden.

Austauschexperimente

Auch die Messung von Austauschraten von Wasserstoff durch Deuterium kann zur Untersuchung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen benutzt werden, da die Austauschrate von der Zugänglichkeit des Protons durch das Lösungsmittel abhängig ist. In Kontaktregionen kann die Austauschrate deshalb durch die Ligandenbindung (Unzugänglichkeit, Ausbildung von Wasserstoffbrücken) vermindert sein.

Literatur

Lottspeich F, Zorbas H: Bioanalytik. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin 1998

Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW: Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. Science 274 (5292): 1531

Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW: Discovering High-Affinity Ligands for Proteins. Science 278 (5337): 497

Otting G: Experimental NMR techniques for studies of protein-ligand interactions. Curr Opin Struct Biol 3, 760

Hajduk PJ, Olejniczak ET, Fesik SW: One-Dimensional Relaxation- and Diffusion-Edited NMR Methods for Screening Compounds That Bind to Macromolecules. J Am Chem Soc 119, 12257

Campbell, pp. 156-159

11. Wasserstoffaustauschexperimente zur Untersuchung der Proteinfaltung mittels NMR-Spektroskopie

Warum NMR?

Während der Faltung eines Proteins erfahren alle Atome Veränderungen ihrer chemischem Umgebung. Eine Methode, die sowohl atomare als auch zeitliche Auflösung ermöglicht, ist deshalb erforderlich, um den Prozess der Proteinfaltung untersuchen zu können. Die NMR-Spektroskopie wird diesen Anforderungen gerecht.

Anmerkung:
Für alle weiteren Betrachtungen sei darauf verwiesen, dass von kleinen, globulären Proteinen ausgegangen wird.

Gleichgewicht oder nicht Gleichgewicht?

So lange man die Faltung von Proteinen unter Gleichgewichtsbedingungen untersucht, sind Faltungsintermediate kurzlebig und nur marginal populiert, da Faltungs-Entfaltungs-Übergänge allgemein hoch kooperativ ablaufen; dies erschwert die Gewinnung von Informationen über die Proteinfaltung.
Deshalb hat man eine größere Chance, Einblicke in die Struktur von Intermediaten und ihre zeitliche Abfolge zu erhalten, wenn man die Rückfaltung (Renaturierung) des betreffenden Proteins weitab vom Gleichgewicht der erwähnten Übergänge untersucht, wo partiell gefaltete Intermediate mit größerer Wahrscheinlichkeit stabil und damit für Untersuchungen zugänglich sind.

Problem!

Der NMR-Spektroskopie innewohnende Eigenschaften sind fehlende Schnelligkeit und mangelnde Sensitivität, sodass sie *nicht direkt* angewendet werden kann, um transiente Proteinkonformationen zu untersuchen.

Lösungsansatz:
Schnelle Mischmethoden (stopped flow) werden mit Wasserstoffaustausch kombiniert, wodurch transiente Konformationen, die während der Rückfaltung auftreten, gelabelt werden können. Ihre Detektion erfolgt anschließend NMR-spektroskopisch (NMR als *indirekte* Methode).

Methoden

Bei den nun vorgestellten Methoden bedient man sich ^{1}H-NMR-Experimenten. Protonen eignen sich deshalb sehr gut als konformationelle Sonden, da sie für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken als zentralem Struktur gebendem Element essentiell sind. Man konzentriert sich hierbei auf die Amidprotonen des Proteinrückgrats und der Seitenketten, da sie

1. über das ganze Protein verteilt sind und
2. wichtige Aspekte der Proteinstruktur reflektieren (α-Helices, β-Faltblätter).

Wasserstoffaustauschraten, d.h. der Austausch von Protonen gegen Deuteronen (und umgekehrt; Protonen sind NMR-aktiv, Deuteronen NMR-inaktiv), sind im Wesentlichen determiniert durch die intramolekularen Wasserstoffbrücken, die während der Faltung eines Proteins ausgebildet werden. Die Wasserstoffbücken werden unterschiedlich schnell ausgebildet. So werden sich Wasserstoffbrücken, die für die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen verantwortlich sind schneller entstehen als solche, die für die Erlangung der nativen Tertiärstruktur ausgebildet werden müssen. Dabei wird davon ausgegangen, dass Protonen, bzw. Deuteronen, die Bestandteil einer Wasserstoffbrücke sind, nicht mehr mit dem Lösungsmittel austauschen können. Je schneller also ein Proton (oder Deuteron) durch eine Wasserstoffbrücke geschützt ist, desto kleiner wird seine Austauschrate sein.
Wasserstoffaustauschraten sind des weiteren pH-abhängig.

Pulse Labeling

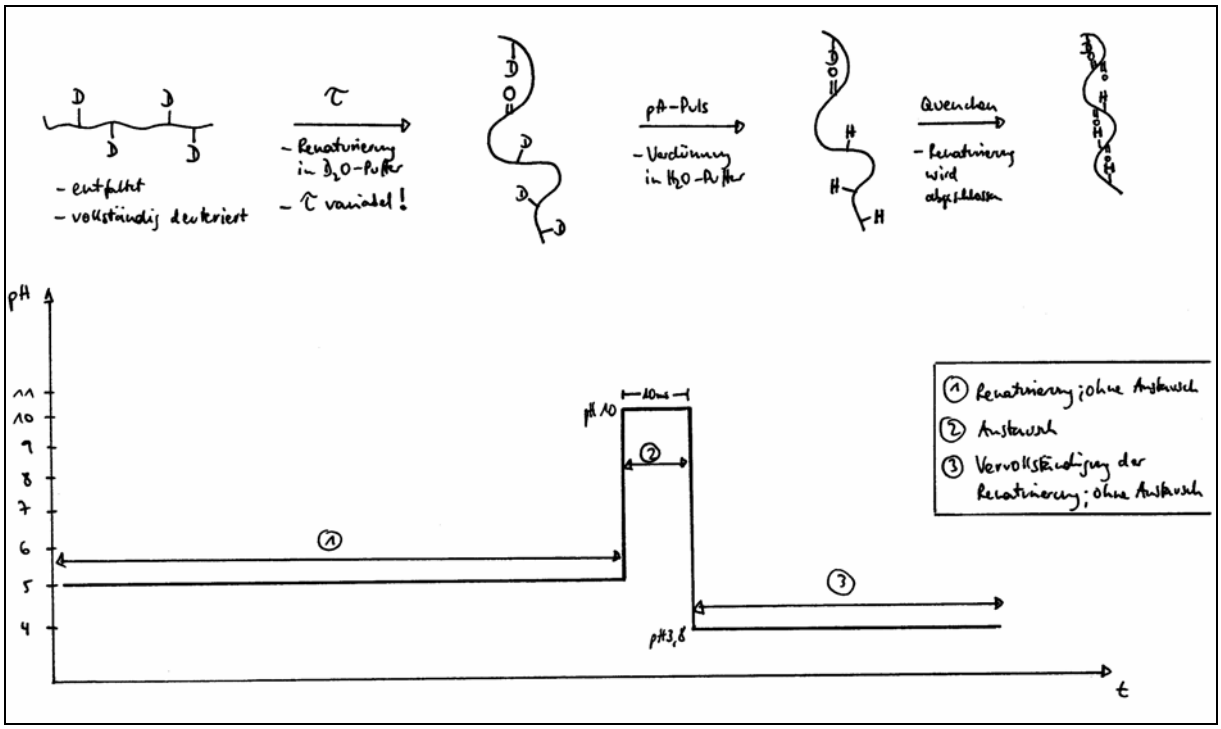


Abb.1 Pulse Labeling (die angegebenen pH-Werte und Zeiten sind exemplarisch und hängen von den Versuchsbedingungen ab)

Bei dieser Methode startet man mit einem entfalteten (z.B. durch 8 M Harnstoff) und vollständig deuterierten Protein. Zunächst leitet man die Rückfaltung ein, indem das Denaturierungsreagenz durch einen D_2O-Puffer verdünnt wird. Nach einer Zeit τ wird durch die Hinzugabe eines H_2O-Puffers der pH-Wert schlagartig angehoben. Es kann nun ein basenkatalysierter Wasserstoffaustausch stattfinden. Es werden aber nur die Amide mit den NMR-aktiven Protonen gelabelt, die zu dem Zeitpunkt des pH-Pulses noch nicht durch eine Wasserstoffbrücke vor dem Austausch mit dem Lösungsmittel geschützt sind. Nach einer kurzen Zeit (10-50 ms) wird der pH-Wert durch Zugabe eines Quenchpuffers stark abgesenkt, sodass der Wasserstoffaustausch vollständig zum Erliegen kommt.

Nachdem die Faltung abgeschlossen ist, wird die Probe für eine anschließende NMR-Analyse vorbereitet. Das erhaltene Spektrum wird mit einem Referenzspektrum verglichen. So erhält man Einblicke über den Fortgang der Faltung zum Zeitpunkt des pH-Pulses. Dies setzt voraus, dass man die native Konformation des untersuchten Proteins zuvor bestimmt und alle Protonen eindeutig zugeordnet hat.

Durch die Variation von τ ist es möglich, Informationen über jedes Stadium der Proteinfaltung zu gewinnen. Der große Vorteil dieser Methode besteht demnach darin, dass sie neben strukturellem auch zeitlichen Informationsgehalt bietet.

Siehe auch Beispiel-Kasten.

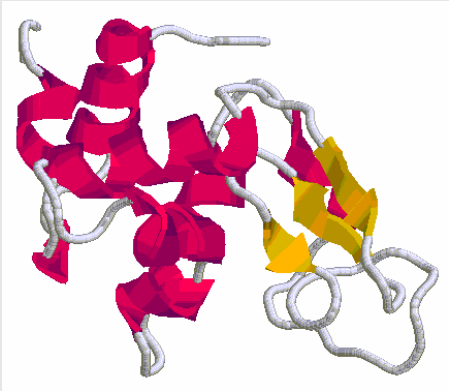
Literatur:

- Roder, H.: Structural Characterization of Protein Folding Intermediates by Proton Magnetic Resonance and Hydrogen Exchange, *Methods in Enzymology*, Vol. 176, pp. 446-473, 1989

Beispiel: Lysozym aus Hühnereiweiß

- klein (129 AS)
- annähernd globulär
- 2 Domänen
    - α-Domäne
    - β-Faltblatt-Domäne
- erfolgt Faltung hoch kooperativ?

Abb.1: Struktur des Lysozym aus Hühnereiweiß



Um die Frage zu klären, ob die Faltung dieses Proteins hoch kooperativ erfolgt, wurden Untersuchungen basierend auf der Pulse Labeling-Methode durchgeführt.

Ergebnisse:

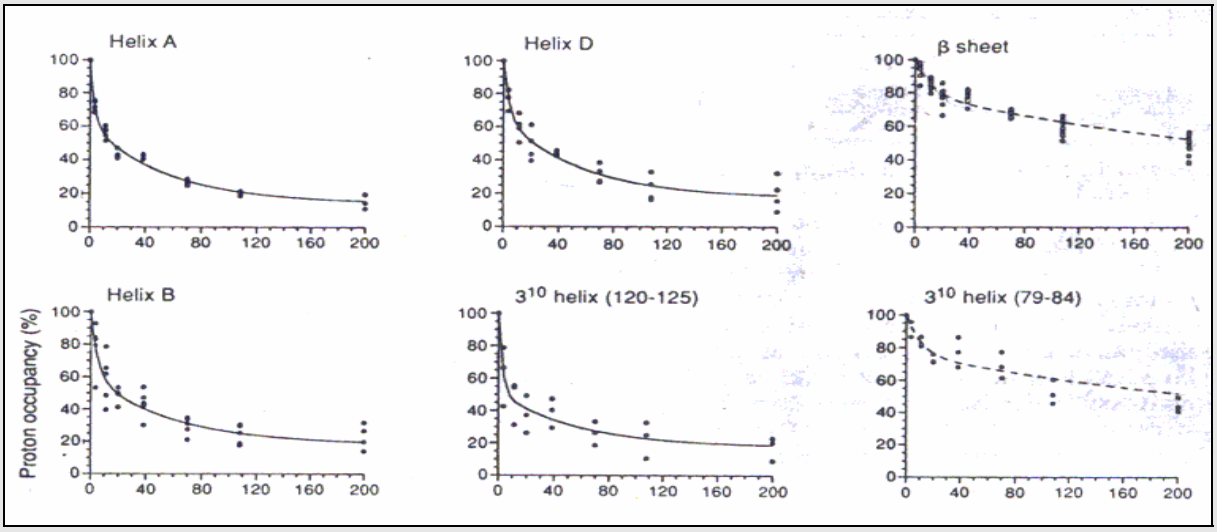


Abb. 2: Aufgetragen ist die Protonenbesetzung (d.h. Austauschrate) gegen τ für 6 Sekundärstrukurelemente des Lysozym (Helices A, B, D und 3^{10}-Helix (120-125) sind Bestandteil der α-Domäne; das β-Faltblatt und die zweite 3^{10}-Helix (79-84) gehören zur β-Faltblatt-Domäne)

Würde die Faltung des Lysozym hoch kooperativ ablaufen, so sollte die Austauschrate für alle Sekundärstrukturelemente gleichermaßen mit der Zeit abnehmen; man würde übereinstimmende Kurvenverläufe erwarten. Da dies nicht der Fall ist, müssen während der Faltung partiell strukturierte Intermediate populiert sein.

TABLE 1 Protection of amide hydrogens during the refolding of lysozyme

Residue	Fast phase Amplitude (%)	Fast phase Time constant (ms)	Slow phase Amplitude (%)	Slow phase Time constant (ms)	Structural context
8	47.2	3.90	38.3	69.8	Helix A
10	39.5	4.41	50.6	64.3	
11	43.6	3.39	41.5	54.1	
12	33.9	2.61	51.5	53.4	
13	44.5	6.33	44.0	79.1	
17	43.6	9.09	39.7	89.5	Irregular
23	48.5	7.76	35.9	83.3	
27	66.3	12.7	22.5	492	Helix B
28	42.1	4.83	42.1	59.7	
29	58.3	2.40	28.1	59.4	
31	36.9	4.39	48.6	68.7	
34	40.3	8.00	45.5	97.7	
36	24.5	6.68	53.5	53.1	
37	19.4	11.5	56.8	475	Irregular
38	16.6	11.2	69.7	350	
39	18.2	9.33	56.1	296	
40	22.2	7.14	59.6	451	Small β-sheet
42	26.5	8.76	66.0	531	Large β-sheet
44	14.2	6.29	48.2	151	
50	24.0	10.6	40.4	188	
52	33.1	9.29	52.7	238	
53	25.6	8.80	62.4	349	
56	17.7	15.7	63.7	375	
58	17.8	16.8	67.4	392	
61	17.5	9.29	58.5	247	Loop (irregular
63	60.0	2.45	25.4	63.9	
64	43.2	3.67	37.4	60.4	
65	39.7	15.7	44.7	241	
75	23.5	23.5	63.8	354	
76	25.4	8.60	54.2	215	
78	59.2	1.87	21.0	48.8	
82	26.2	8.56	65.6	788	3^{10} Helix
83	29.0	9.53	52.5	282	
84	26.1	9.81	48.3	262	
92	29.6	3.54	56.6	52.8	Helix C
93	34.9	9.11	35.5	76.0	
94	22.2	4.93	57.7	64.0	
95	28.8	3.29	61.0	63.5	
96	19.4	1.43	74.8	53.5	
97	32.7	7.08	51.7	61.6	
99	28.1	2.07	56.4	40.5	
108	34.9	3.73	47.5	87.5	Helix D
111	48.0	3.89	38.1	68.4	
112	28.2	3.04	47.9	49.8	
115	44.7	8.13	42.7	51.6	
123	46.7	3.42	35.0	65.2	3^{10} Helix
124	67.0	2.00	17.8	33.3	
125	43.1	4.95	40.4	108	

The time courses of change in proton occupancies were fitted to the sum of two exponentials of the form $y = A\,e^{(-k_1 t)} + B\,e^{(-k_2 t)} + C$ (where A and B are the fractional amplitudes of the two phases and K_1 and K_2 are their rate constants; C is the apparent fractional amplitude of a third phase too slow to be followed in our experiments). The last column gives the secondary structural context of each amide in the native state.

Abb. 3: Schützung der Amidprotonen während der Rückfaltung von Lysozym

Die Daten der Kurven aus Abbildung 3 lassen sich mit einer bi-exponentiellen Kinetik folgender Form fitten:

$$y = Ae^{-k_1 t} + Be^{-k_2 t} + C$$

Der erste Term beschreibt die schnelle Phase, der zweite Term die langsame Phase der Kinetik (bzgl. Term 3 s. Legende der Originalarbeit).

Die Tabelle in Abbildung 4 gibt nun an, welches Sekundärstrukturelement nach Abschluss der jeweiligen Phase zu welchem Prozentanteil in der Proteinprobe korrekt ausgebildet vorliegt.

Stark vereinfacht lässt sich die Kernaussage dieser Tabelle folgendermaßen darstellen:

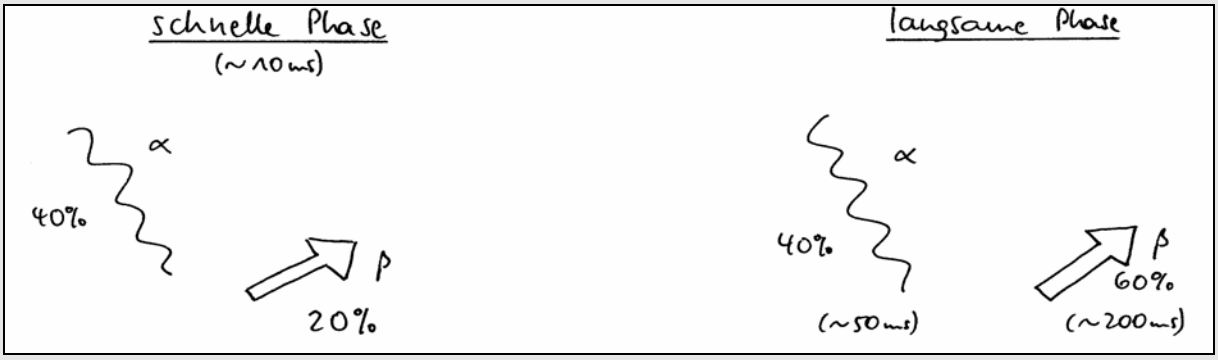


Abb.4: Vereinfachende Zusammenfassung der in Abbildung 4 dargestellten Ergebnisse

Nach Beendigung der schnellen Phase weisen 40 % der Proteine eine korrekt gefaltete α-Domäne und 20 % der Proteine eine intakte β-Faltblatt-Domäne auf. Würde die Faltung hoch kooperativ verlaufen, so müssten die Prozentsätze gleich sein (ganz davon abgesehen, dass dann gerade einmal 40 % aller Proteine eine hoch kooperative Faltung aufwiesen).
Vielmehr vollzieht sich in 60 % der Proteine die Ausbildung der α-Domäne und in 80 % der Proteine die Ausbildung der β-Faltblatt-Domäne auf andere Art und Weise. Das bedeutet, dass parallele Faltungswege existieren.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

- Die Faltung von Lysozym erfolgt nicht kooperativ, d.h. es existieren partiell strukturierte Intermediate.
- Bei der Faltung werden parallele Faltungswege beschritten.

Literatur:

1. Miranker A. et al.: Demonstration by NMR of folding domains in lysozyme, *Nature*, Vol. 349, pp. 633-636, 1991
2. Radford, S.E. et al.: The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways, *Nature*, Vol. 358, pp. 302-307, 199

12. *IN VIVO* NMR-SPEKTROSKOPIE

Einleitung

Bereits seit der Mitte des 19. Jahrhunderts ist bekannt, dass in lebenden Zellen spezifische chemische Reaktionen stattfinden. Seit dieser Zeit versucht man zu verstehen, wie die Vielzahl einzelner Metabolite, die man mittlerweile aus Zellen isoliert hat, in das komplexe Reaktionsnetzwerk eingebunden sind, bzw. wie diejenigen chemischen Umwandlungen ermöglicht werden, zu denen Zellen fähig sind. Da es sich bei den Untersuchungen zur Aufklärung der Stoffwechselwege bisher um *in vitro* Experimente handelte, blieb stets die Frage, ob das was im Reagenzglas zu beobachten war auch tatsächlich so in der lebenden Zelle abläuft. Die Frage nach der Übereinstimmung von experimentell erhaltenen Daten mit der Realität ist noch um ein vielfaches schwieriger zu beantworten, wenn es sich um die Strukturbestimmung von Makromolekülen handelt. So werden beispielsweise bei den Kristallisationsansätzen für die Röntgenbeugung die Pufferzusammensetzungen aus bekannten Gründen nicht auf physiologische Bedingungen hin optimiert, sondern auf das Wachstum geeigneter Kristalle.

Von allen zur Zeit verfügbaren Methoden, die in der Lage sind auch hochauflösende Strukturen von biologischen Makromolekülen zu liefern, ist die NMR-Spektroskopie die einzige, die diese Informationen unter (quasi-)physiologischen Bedingungen liefern kann. Bei der bisher durchgeführten, klassischen (*in vitro*-) NMR-Spektroskopie kommen jedoch ebenfalls isolierte, aufgereinigte Proteine bzw. Metabolite in einem Puffer zum Einsatz, der in erster Linie den experimentellen Erfordernissen angepasst ist. Gerade bei Proteinen können diese Abweichungen von der natürlichen Umgebung die Struktur und Dynamik erheblich beeinflussen. Des weiteren werden hierdurch mögliche Konformationsänderungen durch Wechselwirkung mit anderen zellulären Makromolekülen sowie posttranslationale Modifikationen nicht berücksichtigt.

In den letzten zwanzig Jahren wurden Techniken entwickelt, die es nun erlauben, **lebende Systeme** - von der Bakteriensuspension bis zum Menschen - zu untersuchen. Hierdurch erschließen sich sowohl der Forschung als auch der klinischen Medizin völlig neue Anwendungsgebiete in Form der ***in vivo* NMR** (auch als in-cell NMR bezeichnet) und des **magnetic resonance imaging** (**MRI**). Während sich MRI mit makroskopischen Objekten und Ereignissen wie etwa der Morphologie von Organen und deren Durchblutung befasst, liefert die *in vivo* NMR Informationen über das Verhalten von Molekülen in lebenden Organismen und Zellen.

Anwendungsmöglichkeiten der *in vivo* NMR

Während man sich bei der klassischen NMR-Spektroskopie den physiologischen Bedingungen bestenfalls annähern kann und dadurch die bereits angesprochenen Auswirkungen auf Struktur und Dynamik akzeptieren muss, erforscht die *in vivo* MNR die Proteine direkt in ihrer physiologischen Umgebung, d.h. in der lebenden Zelle. Das große Potential der *in vivo* MNR liegt hierbei nicht in der de novo Bestimmung von Strukturen, sondern vielmehr in der Beobachtung von Struktur*änderungen* biologischer Makromoleküle und deren Interaktion mit anderen zellulären Bestandteilen. Die exakte chemische Verschiebung eines Kerns ist eine sehr empfindliche Funktion seiner magnetischen Umgebung. Veränderungen dieser Umgebung, etwa durch posttranslationale Modifikationen, Konformationsänderungen oder Bindungsereignisse führen dementsprechend zu einer Änderung der chemischen Verschiebung (siehe Abb. 1). Die Anwendung der NMR-Spektroskopie auf lebende Zellen wird durch einige grundlegende Probleme erschwert, die im folgenden Abschnitt angesprochen werden.

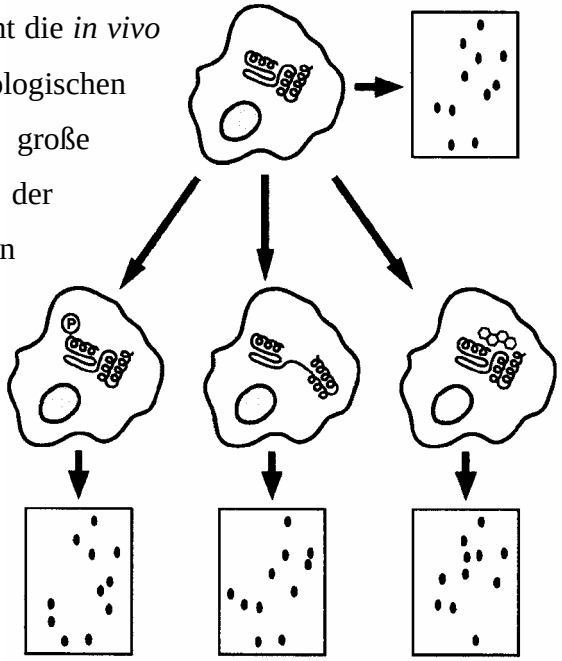


Abb. 1: Anwendungsmöglichkeiten der in vivo MNR. Posttranslationale Modifikationen (links), Konformationsänderungen (mitte) und Bindungsereignisse (rechts) können relativ zum unveränderten Protein (oben) verfolgt werden

Praktische Aspekte der in vivo NMR

Um ein bestimmtes Protein in einer lebenden Zelle beobachten zu können, müssen zwei Hauptprobleme gelöst werden: ① Zum einen muss man eine Methode finden, um die Signale der interessierenden Proteinspezies von denen aller anderer Proteine, Nukleinsäuren und übriger Zellbestandteile zu unterscheiden. ② Zum anderen muss sich das Protein frei in der Zelle bewegen können und seine Rotations-Korrelationszeit muss sich in einem Bereich bewegen, der die Aufnahme hinreichend scharfer Spektren erlaubt.

① Die selektive Beobachtung eines Proteins in lebenden Zellen: Während das zu untersuchende Protein bei der klassischen *in vitro* NMR in einen homogenen, wässrigen Puffer vorliegt, befinden sich die Proteine in lebenden Zelle in einer äußerst inhomogenen Umgebung, die eine sehr große Anzahl anderer Proteine sowie Lipide und Nukleinsäuren

enthält. Wie in Abb. 2A zu erkennen, ist das eindimensionale ^{1}H-Spektrum einer Suspension aus lebenden *E. coli*-Zellen extrem überlagert. Die Identifizierung von Resonanzsignalen eines spezifischen Makromoleküls unter denen aller übriger Zellbestandteile beruht auf zwei Aspekten: Da die meisten Proteine nur in sehr geringen Konzentrationen in der Zelle vorkommen und daher unter der Nachweisgrenze liegen, ist eine entsprechende Überexpression erforderlich. Zum anderen muss eine selektiven Markierung des zu beobachtenden Makromoleküls mit NMR-aktiven Isotopen geringer natürlicher Häufigkeit erfolgen, um die Signale dieser Isotope unter allen übrigen Signalen identifizieren zu können. Als nichtradioaktive Isotope eignen sich hierfür insbesondere ^{15}N und ^{13}C, wobei die natürliche Häufigkeit 0,2% bzw. 1,1% beträgt. Bei der Untersuchung von Stoffwechselvorgängen spielt der ^{31}P-Kern mit einer natürlichen Häufigkeit von 100% eine entscheidende Rolle, da Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen an den meisten energieübertragenden Prozessen beteiligt sind. Abb. 2B zeigt ein ^{15}N-gefiltertes eindimensionales Spektrum der selben Probe wie in 2A. Die Signaldichte ist drastisch reduziert und das deutliche Signal bei 4,5 ppm kann dem überexpremierten, ^{15}N-markiertem Protein (NmerA, siehe Anwendungsbeispiele) zugeordnet werden.

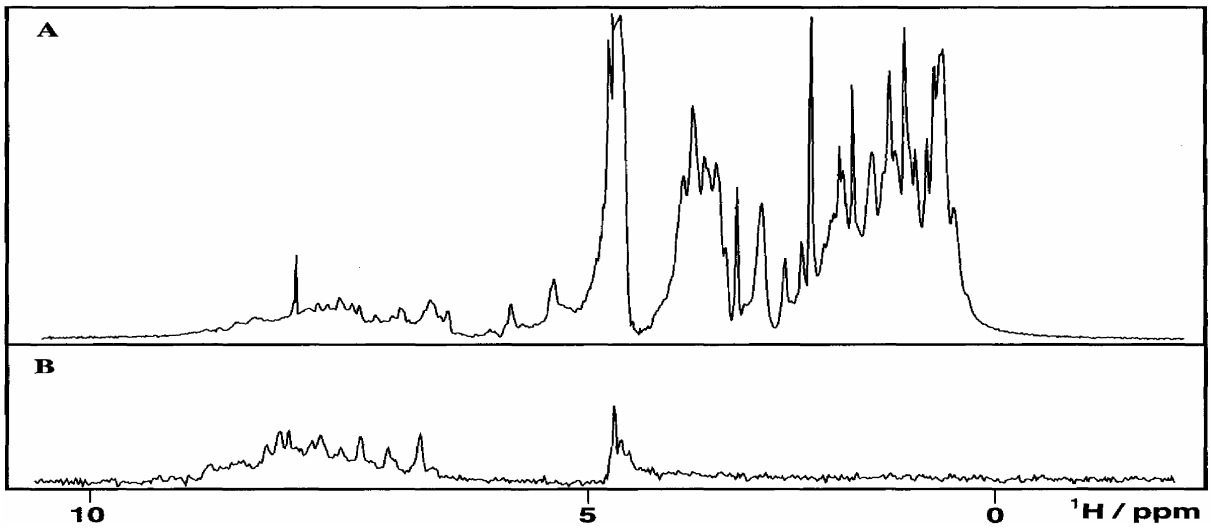


Abb. 2: (A) ungefiltertes, eindimensionales ^{1}H Spektrum einer Suspension lebender *E. coli*-Zellen. (B) ^{15}N-gefiltertes eindimensionales Spektrum der selben Kultur, vier Stunden nach Induktion der Überexpression von NmerA in ^{15}N-markiertem Minimalmedium.

Im Gegensatz zur *in vitro* NMR muss hier Proteinbiosynthese und Isotopenmarkierung des Proteins gleichzeitig innerhalb der Zelle erfolgen. Ursprünglich befürchtete man, dass sich ein sehr hoher Hintergrund ausbildet, wenn man die Zellen in markiertem Medium wachsen lässt, da die markierten Aminosäuren in alle neu synthetisierten Proteine eingebaut werden könnten. Es wurden daher eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um die optimalen Anzucht- und Expressionsbedingungen herauszufinden. Erstaunlicherweise zeigten diese Experimente, dass der Hintergrund generell sehr niedrig ist und das verwendete Inkubationsprotokoll kaum

einen Einfluss auf diesen hat. In Abb. 3 sind drei *in vivo* HSQC-(*heteronuclear single-quantum coherence*)-Spektren wiedergegeben, bei denen die Zellkulturen jeweils nach unterschiedlichen Protokollen vorbereitet wurden: Bei A wurden die Bakterien in ^{15}N markiertem Minimalmedium bis zu einer optischen Dichte von 0,8 inkubiert. Durch Zugabe von IPTG wurde anschließend im selben Medium die Überexpression des Proteins NmerA gestartet und nach 4 Stunden direkt das Spektrum aufgenommen. Bei B erfolgte zunächst ebenfalls Wachstum bis OD=0,8 in ^{15}N markiertem Minimalmedium. Dann wurden die Bakterien jedoch durch Zentrifugation geerntet, in frischem ^{15}N markiertem Minimalmedium resuspendiert und mit IPTG induziert (Spektrenaufnahme stets 4 h nach Induktion). Im letzten Fall (C) erfolgte das Wachstum bis OD=0,8 in unmarkiertem LB-Medium, dann Zentrifugation, resuspendieren in ^{15}N markiertem Minimalmedium und Induktion der Überexpression.

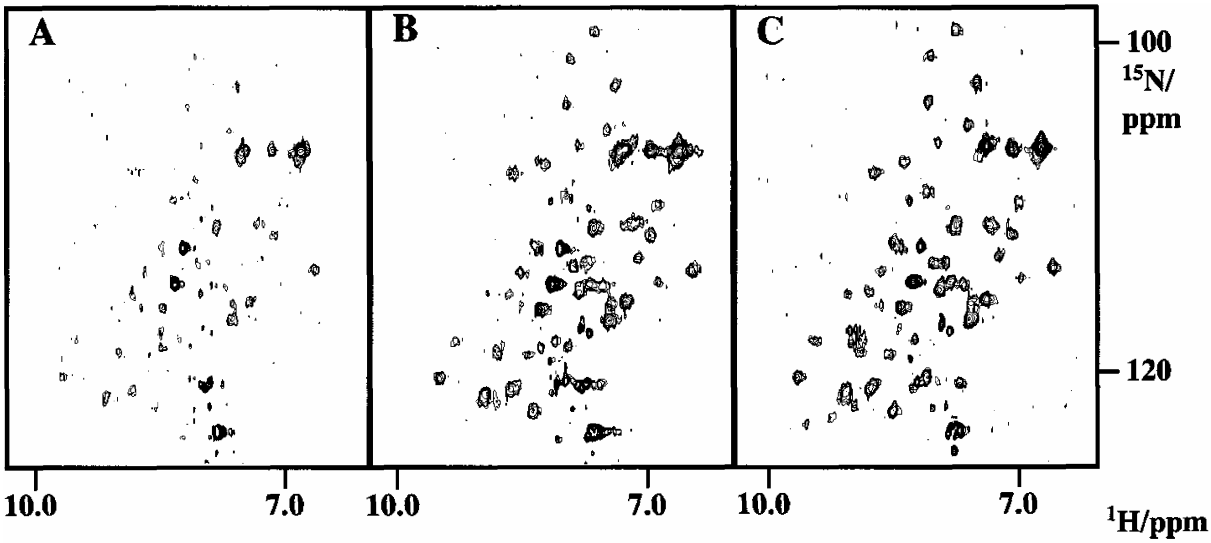


Abb. 3: Auswirkung verschiedener Anzuchtprotokolle auf die Qualität der resultierenden *in vivo* HSQC-Spektren von NmerA. (A) Wachstum, Induktion und Überexpression im selben ^{15}N markiertem Minimalmedium. (B) Wachstum in ^{15}N markiertem Minimalmedium, Überführung in frisches ^{15}N markiertes Minimalmedium, Induktion. (C) Wachstum in unmarkiertem LB-Medium, Überführung in ^{15}N markiertes Minimalmedium, Induktion. Spektrenaufnahme jeweils 4 h nach Induktion.

Da alle drei Spektren ein sehr ähnliches Ausmaß an Hintergrundsignalen zeigen, lässt sich schließen, dass ein Wechsel des Kulturmediums vor der Induktion einen vernachlässigbaren Effekt auf den Hintergrund hat. Die Spektren unterschieden sich jedoch deutlich in der Intensität der eigentlichen Proteinsignale: Die beiden Spektren, bei denen vor der Induktion ein Wechsel des Mediums erfolgte (B und C), zeigen eine vielfach höhere Intensität der Proteinsignale, die auf eine stärkere Überexpression zurückgeführt werden kann.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der entscheidende Faktor für die Qualität der Spektren nicht wie erwartet die Hintergrundsignale sind, sondern der Grad der erreichten Überexpression.

Diese starke Abhängigkeit der Spektrenqualität von der Stärke der Überexpression lässt sich direkt zeigen, wenn man von der selben Bakterienkultur mehrere Spektren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion der Überexpression aufnimmt (siehe Abb. 4).

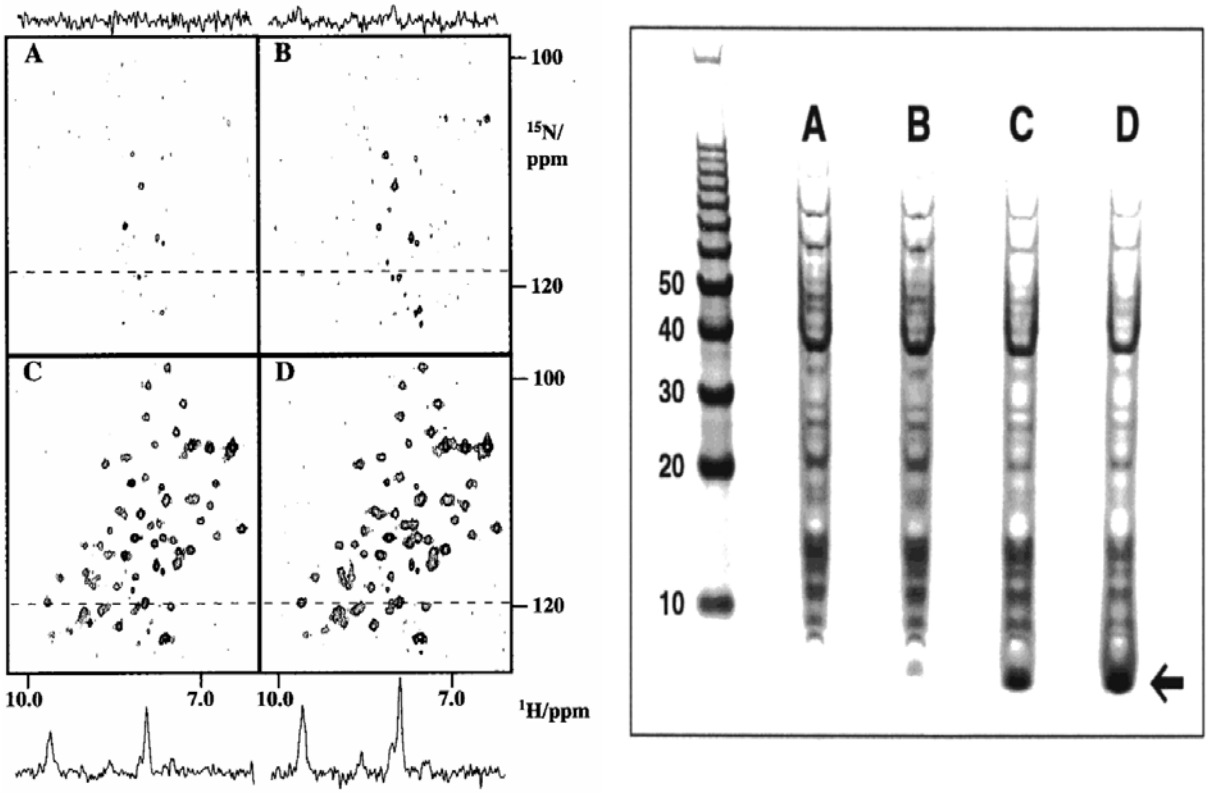


Abb. 4 Rechts: Vergleich von *in vivo* HSQC-Spektren von NmerA, aufgenommen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion in ^{15}N markiertem Minimalmedium. (A) 10 min nach Induktion, (B) nach 30 min, (C) nach 1h und (D) nach 2 h. Die eindimensionalen Querschnitte entlang der gestrichelten Linie zeigen den Anstieg der Signalintensität besonders deutlich. **Links**: Zugehörige Quantifizierung der NmerA-Konzentration mittels SDS-Gel. Die Buchstaben entsprechen jenen der Spektren. Die Lage von NmerA wird durch den Pfeil markiert.

Bereits 30 min nach der Induktion sind schwache Proteinresonanzen in HSQC-Spektrum zu erkennen und eine schwache Bande auf dem SDS-Gel wird sichtbar. Eine Stunde nach Induktion sind sämtliche Proteinresonanzen sichtbar, nach 2 h hat sich deren Intensität deutlich erhöht. Anhand der eindimensionalen Schnitten entlang der gestrichelten Linie lässt sich die Verbesserung des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses mit zunehmender Überexpression besonders deutlich verfolgen.

② **Die Rotations-Korrelationszeit von Proteinen in Zellen:** Die Korrelationszeit beeinflusst ganz entscheidend die Sensitivität von NMR-Experimenten, da eine langsamere Reorientierung der Moleküle zu einer Verbreiterung der Resonanzsignale führt und diese im Extremfall unkenntlich werden lässt. Die Rotationsgeschwindigkeit wiederum ist eine Funktion der Viskosität des Mediums, in dem sich das Makromolekül befindet. Daher ist die intrazelluläre Viskosität selbst ein entscheidender Parameter für die *in vivo* NMR.

Entsprechende Messungen in verschiedenen Zelltypen (Bakterien, Hefen, Säugerzellen) haben ergeben, dass sich die Werte für die cytoplasmatische Viskosität jedoch nur zwischen dem 1,2 und 2-fachen Wert von reinem Wasser bewegen. Aufgrund der linearen Abhängigkeit zwischen Viskosität, Korrelationszeit und Molekulargewicht eines Proteins führt eine Verdopplung der Viskosität „nur“ zu einer Verdopplung des *apparenten* Molekulargewichtes. Die Einführung neuer Techniken (insbesondere TROSY, *transverse relaxation optimized spectroscopy*) hat in letzter Zeit zu einer erheblichen Erweiterung des zugänglichen Molekulargewichtsbereichs geführt. Die intrazelluläre Viskosität stellt daher praktisch keine (zusätzliche) Limitierung gegenüber der klassischen NMR dar.

Dies ändert sich jedoch dramatisch, sobald Interaktionen zwischen dem zu untersuchenden Makromolekül und anderen zellulären Bestandteilen auftreten. Insbesondere durch Bindung an große Zellkomponenten wie etwa die Membran oder DNA werden die Korrelationszeiten derart vergrößert, dass keine Resonanzsignale mehr beobachtetet werden können.

Anwendungsbeispiele

Wie in der Einleitung bereits angesprochen, ist es mit der *in vivo* NMR zunächst einmal möglich, niedermolekulare Substanzen in lebenden Zellen zu detektieren bzw. deren Metabolisierung zu analysieren (siehe Abb. 5).

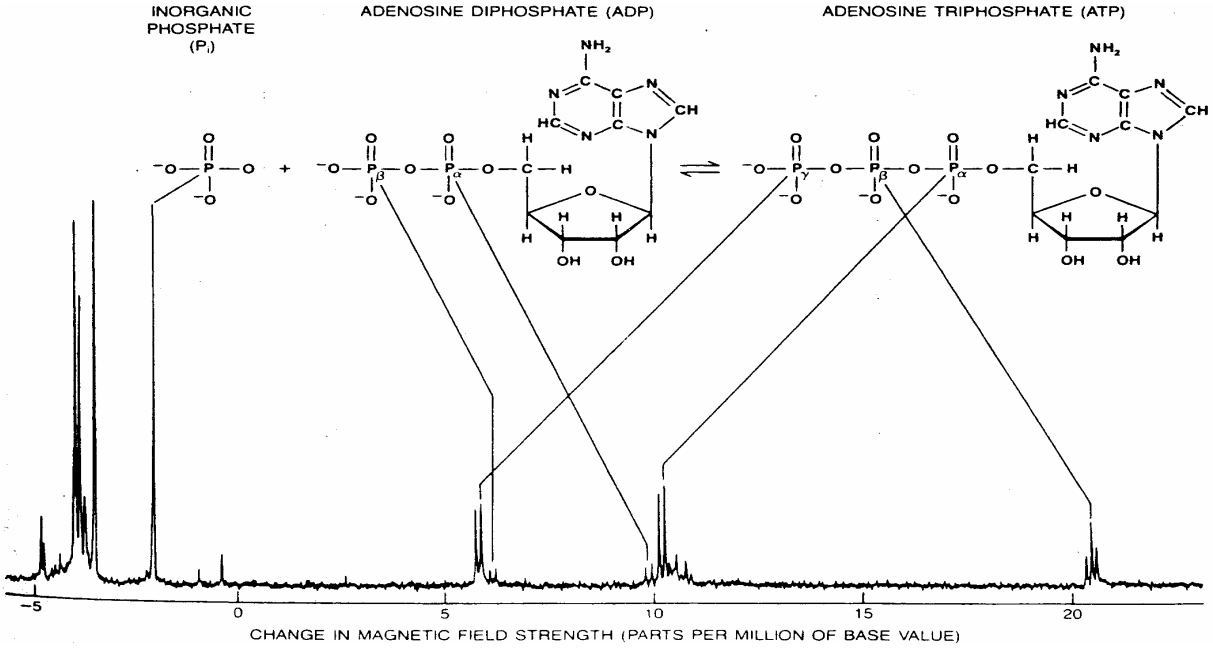


Abb. 5: ^{31}P-Spektrum einer Tumorzellsuspension (Maus). Der Grossteil der auftretenden Signale kann den oben dargestellten Molekülen des Energiestoffwechsels zugeordnet werden.

Da sich in Bakteriensuspensionen die Nährstoffbedingungen besonders leicht kontrollieren und variieren lassen, sind diese für Untersuchungen des Metabolismus besonders geeignet. So lässt sich z.B. der Ablauf der Glykolyse untersuchen, indem man zu einer „ausgehungerten“ Bakteriensuspension Glucose zugibt und die Veränderungen im NMR-Spektrum beobachtet. Spektrum A in Abb. 6 stammt von einer *E. coli*-Suspension, deren Nährmedium keine Glucose enthält. Es ist zu erkennen, dass die Energieladung der Zelle niedrig ist: der Spiegel an anorganischem Phosphat (P_i) ist hoch, der von ATP hingegen unter der Nachweisgrenze. In dem binnen vier bis sechs Minuten nach Glucosezugabe aufgenommenen Spektrum B zeigt sich hingegen das Bild einer normalisierten Energieladung: die drei zu ATP gehörenden Peaks (vergleiche Abb. 5) sind jetzt sehr deutlich. Des weiteren kann man das Auftreten eines Glykolyseintermediates, das Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), direkt verfolgen. Interessanterweise ist für das anorganische Phosphat jetzt eine Aufspaltung des Signals zu beobachten (intrazelluläres und extrazelluläres P_i). Diese Aufspaltung kommt dadurch zustande, dass die Zellen die mittels Glykolyse gewonnene Energie u.a. zum Aufbau eines Protonengradienten über die Membran verwenden. Hierdurch steigt der intrazelluläre pH-Wert über den der Umgebung und der Protonierungsgrad von intrazellulärem und extrazellulärem P_i unterscheiden sich. Unterschiedliche Protonierung bedeutet unterschiedliche chemische Umgebung in Bezug auf das Phosphoratom und damit auch unterschiedliche chemische Verschiebung. Im Umkehrschluss folg hieraus, dass man mit *in vivo* NMR den intrazellulären pH-Wert nichtinvasiv sehr genau messen kann. Man benötigt lediglich eine Referenzsubstanz (z.B. P_i), bei der die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom herrschenden pH-Wert bekannt ist.

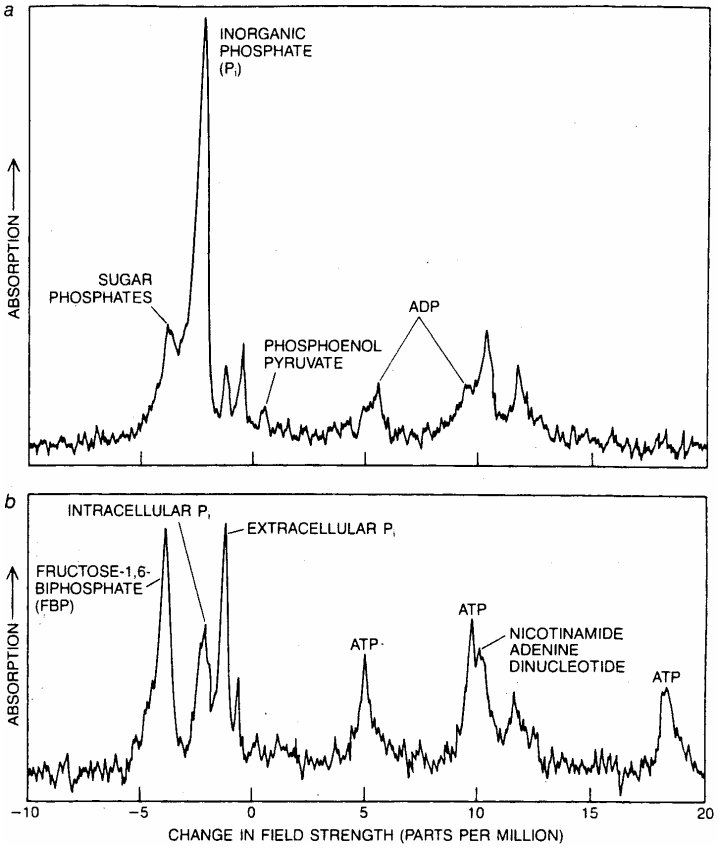


Abb. 6: ^{31}P-Spektrum einer *E. coli*-Suspension. (A) ohne Glucose im Medium. (B) 4-6 min nach Glucosezugabe.

Analog zur Glykolyse in der Bakteriensuspension lässt sich mittels *in vivo* NMR auch der Stoffwechsel in intakten Organen untersuchen. So lassen sich z.B. Änderungen sowohl der Konzentrationen verschiedener Metabolite als auch die des pH-Wertes in einem arbeitenden Muskels analysieren. Hierbei ist zu erwarten, dass sich nach längerer Muskeltätigkeit anaerobe Bedingungen ausbilden und die Regenerierung von ATP nur noch über die Glykolyse und Phosphocreatin erfolgt, was zu einer Ansammlung von Milchsäure und damit zu einem Abfall des pH-Wertes führen sollte. In Abb. 7 sind ^{31}P-Spektren eines menschlichen Unterarmmuskels wiedergegeben, die zu verschiedenen Zeiten vor, während und nach Belastung aufgenommen wurden.

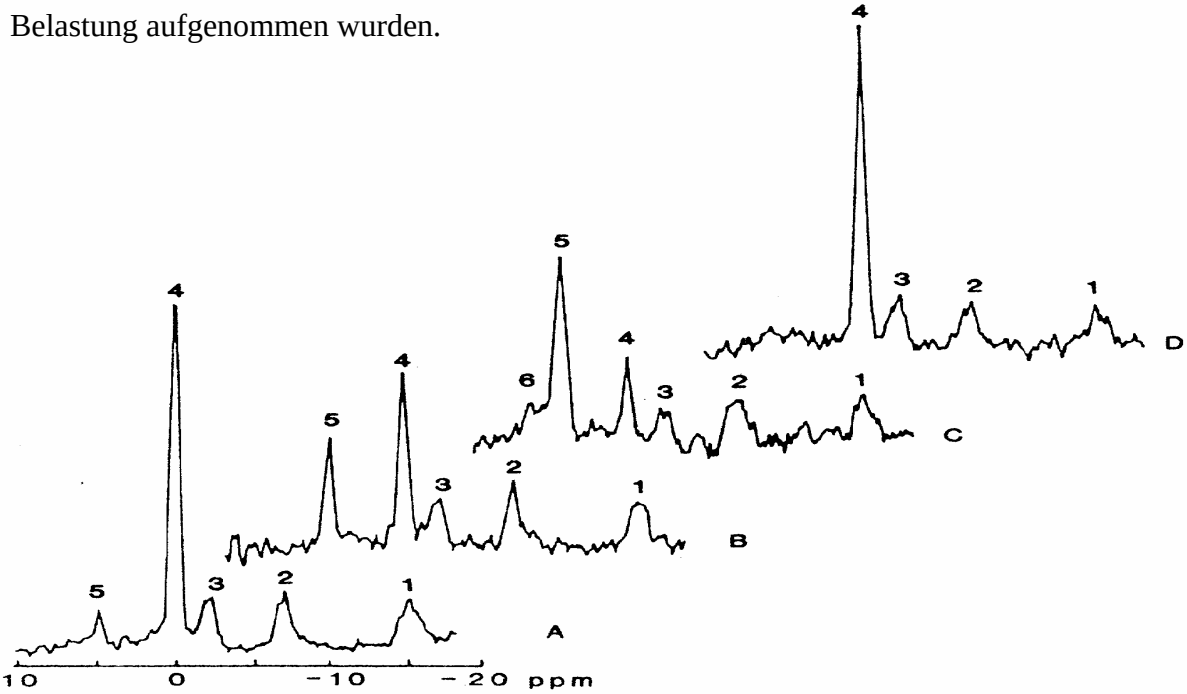


Abb. 7: ^{31}P-NMR-Spektren eines menschlichen Unterarmmuskels, aufgenommen zu verschiedenen Zeitpunkten: (A) vor Beginn der Belastung, (B) nach 1 min Belastung, (C) nach 19 min Belastung und (D) 5 min nach beendeter Belastung. Jeweilige Zuordnung der markierten Peaks: 1, β-Phosphat des ATP; 2, α-Phosphat des ATP; 3, γ-Phosphat des ATP; 4, Phosphocreatin (PCr); 5, anorganisches Phosphat (P_i); 6, Phosphomonoester. Der Peak des PCr wurde auf 0 ppm gesetzt.

In dem vor Beginn der Belastung aufgenommenen Spektrum (7A) lässt ich eine hohe Energieladung der Muskelzellen erkennen: die drei zu ATP gehörenden Peaks sind sehr deutlich zu erkennen, die P_i-Konzentration ist niedrig. Ferner lässt sich eine hohe Konzentration an Phosphocreatin nachweisen. Mit Beginn der Belastung (7B) nimmt die PCr-Konzentration rasch ab, da dieses nun für die Regeneration des ATP verwendet wird. Während die ATP-Konzentration durch diese Regeneration selbst nach 19 min Belastung (7C) nahezu unverändert bleibt, steigt die Konzentration des P_i in dieser Zeit deutlich an. Bereits 5 min nach Beendigung der Belastung (7D) sind die Ausgangsverhältnisse praktisch wieder erreicht. Analog zum vorherigen Beispiel der Bakteriensuspension kann man auch hier eine Veränderung der Lage der P_i-Resonanz während der Muskeltätigkeit feststellen. Die zu

beobachtende Rechtsverschiebung zeigt eine Absenkung des pH-Wertes in den Muskelzellen während der Belastung an, verursacht durch die Ansammlung von Milchsäure. Hat man durch Untersuchung einer Vielzahl gesunder Probanden einen Normalbereich für diese pH-Absenkung im arbeitenden Muskel definiert, so kann man derartige Untersuchungen auch zur nichtinvasiven Diagnose von Störungen des Energiestoffwechsels einsetzen. Bei der in Abb. 8 wiedergegebenen Untersuchung konnte bei einem Patienten auf diese Weise das sog. McArdele's Syndrom diagnostiziert werden. Dieser Erkrankung liegt ein genetischer Defekt zu Grunde, der zu einer nichtfunktionalen Glykogen-Phosphorylase führt. Aufgrund dieses Defektes steht entsprechend wenig Glucose für die Glykolyse zur Verfügung und der Energiemangel unter anaeroben Bedingungen führt zu einer schnellen Erschöpfung der Patienten bei körperlicher Belastung. Da sich Aufgrund der extrem eingeschränkten Glykolyse keine Milchsäure anreichern kann, sollte die für den gesunden Muskel typische Azidifizierung ausbleiben.

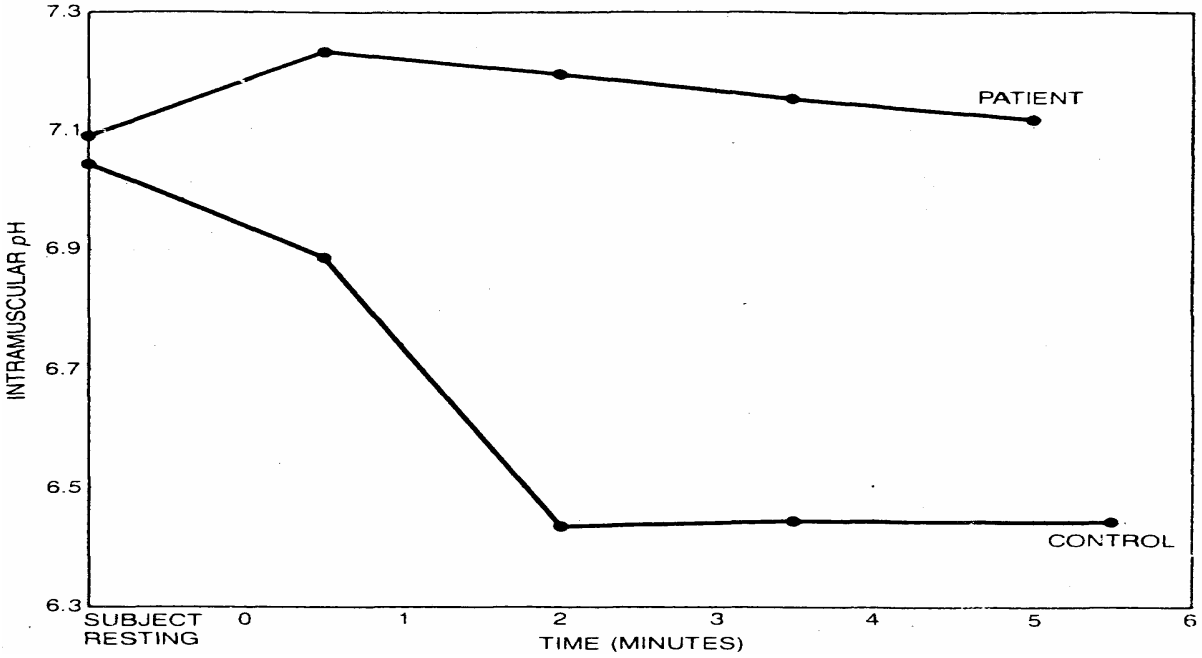


Abb. 8: Auswirkung von Belastung auf den intramuskulären pH-Wert. Bei gesunden Personen findet Aufgrund der Ansammlung von Milchsäure eine rasche Absenkung des pH-Wertes statt. Bei Patienten, die am McArdele's Syndrom leiden, verhindert der gestörte Ablauf der Glykolyse diese Ansäuerung.

Die experimentellen Daten bestätigen diese Annahmen: Bei gesunden Probanden kommt es durch die Ansammlung von Milchsäure zu einer raschen Absenkung des intramuskulären pH-Wertes von ~7,1 auf ~6,4. Leidet die Testperson hingegen am McArdele's Syndrom, so ist keine Ansäuerung zu beobachten, der pH-Wert steigt zu Beginn der Belastung sogar über den Ausgangswert.

Wie bereits angesprochen, dient die *in vivo* NMR bei der Anwendung auf Makromoleküle nicht zur Aufklärung neuer Strukturen, sondern vielmehr zu Detektion von Strukturänderungen, die z.B. durch posttranslationale Modifikationen, Konformationsänderungen oder aber Bindungsereignisse (verg. Abb. 1) hervorgerufen werden können.

Das in Abb. 9A wiedergegebene *in vivo* [^{15}N, ^{1}H]-HSQC Spektrum von **Calmodulin** wurde in einer Suspension lebender *E. coli*-Zellen aufgenommen. Um die Anzahl der Signale zu verringern, wurden lediglich die Lysinreste des Calmodulins ^{15}N- markiert. Abbildung 2B zeigt das *in vitro* Spektrum der selben Probe nach Lyse der *E. coli*-Zellen.

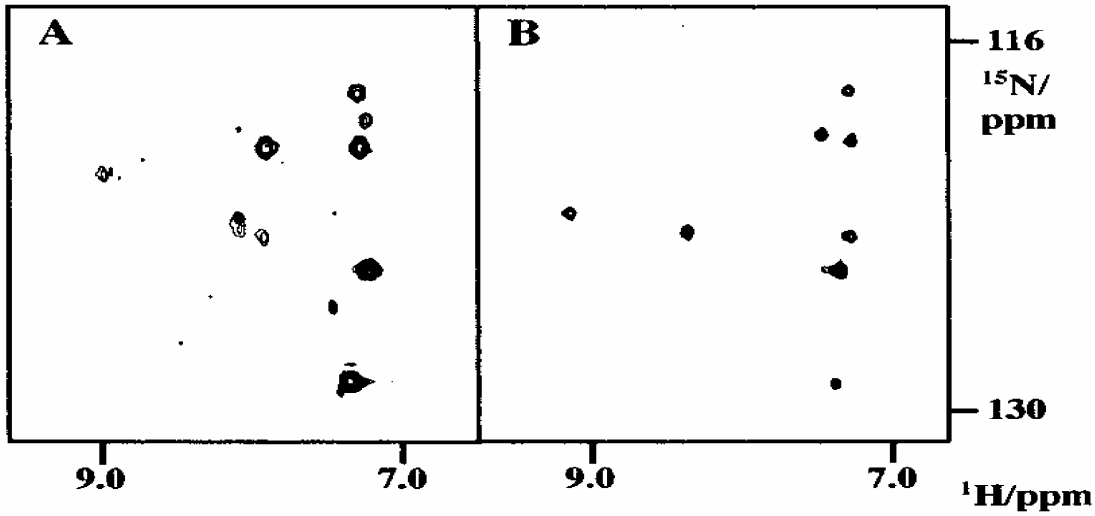


Abb. 9: [^{15}N, ^{1}H]-HSQC Spektren von Calmodulin, nur die Lysinreste sind ^{15}N-markiert. (A) *in vivo* Spektrum einer Suspension lebender *E. coli*-Zellen. (B) *in vitro* Spektrum der selben Probe nach Lyse der Zellen.

Während einige Resonanzpositionen identisch sind, zeigen mehrere Peaks sehr unterschiedliche chemische Verschiebungen unter den beiden Bedingungen. Des weiteren zeigt das in-cell Spektrum mehr als die zu erwartenden acht Signale der acht Lysine im Calmodulin. Das deutet darauf hin, dass in der lebenden *E. coli*-Zelle mehrere verschiedene Konformationen des Calmodulins existieren. Aller Wahrscheinlichkeit nach beruhen die unterschiedlichen Konformationen der *in vivo*- und *in vitro*-Proben auf unterschiedlichen Besetzungen der vier Calcium-Bindungsstellen des Proteins. Während man in der *in vitro*-Probe aufgrund der hohen Calciumkonzentration nach Zellaufschluss den vollbesetzten Zustand vorliegen hat, sind bei den *in vivo*-Konformationen die Calcium-Bindungsstellen nur teilweise besetzt. Diese Annahme stützt sich auf die bekanntermaßen strikte Regulation der Calciumkonzentration in lebenden Zellen.

Ein weiteres Beispiel für unterschiedliche Ergebnisse bei *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen in Bezug auf Struktur und Dynamik liefert das Protein **NmerA**. Bei NmerA handelt es sich um die N-terminale, 7 kDa große Domäne des Proteins MerA, das Bakterien zur Detoxifikation

von Quecksilberverbindungen befähigt. Die N-terminale Domäne dient hierbei der Bindung der Quecksilberionen mittels zweier Cysteine und transferiert diese zum C-terminal gelegenen katalytischen Zentrum. In Abb. 10A ist ein Ausschnitt aus einem *in vivo* [^{15}N, ^{1}H]-HSQC Spektrum von NmerA wiedergegeben. Abbildung 10B zeigt den selben Ausschnitt, jedoch *in vitro* mit aufgereinigtem Protein aufgenommen.

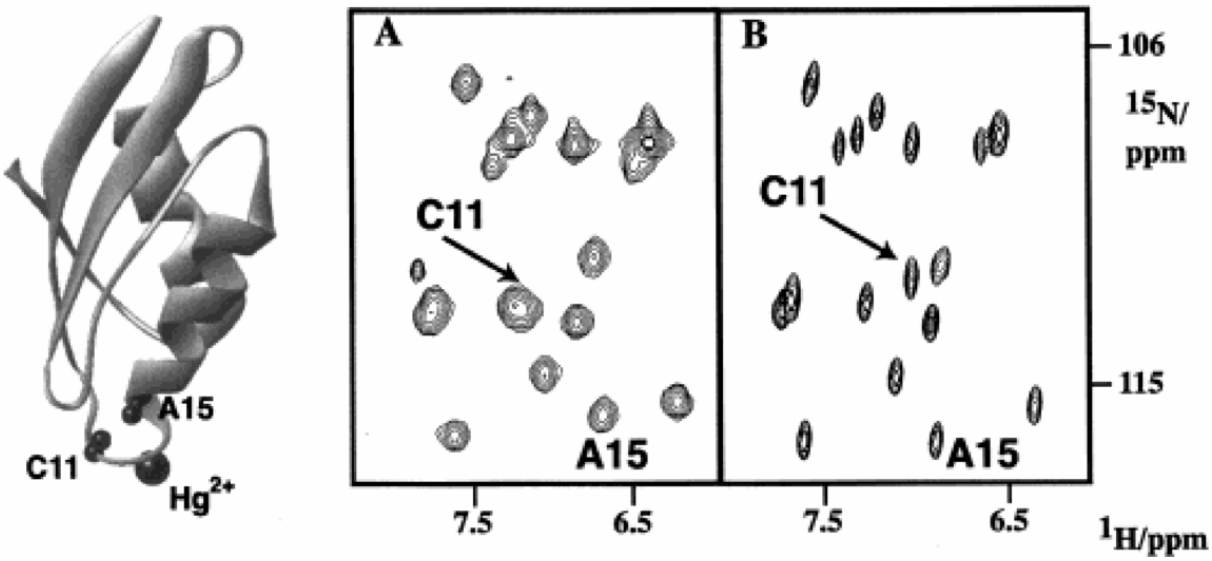


Abb. 10: Rechts: Struktur von NmerA. Links: Ausschnitt aus einem [^{15}N, ^{1}H]-HSQC Spektrum von NmerA. (A) in-cell Spektrum. (B) *in vitro* Spektrum von aufgereinigtem Protein. Die in der Metallbindungsschleife gelegenen Reste Cystein 11 und Alanin 15 sind jeweils markiert.

Während die chemischen Verschiebungen der umgebenden Aminosäuren praktisch unverändert bleiben, ist bei den markierten Resten Cystein 11 und Alanin 15 eine signifikante Änderung zu beobachten. Da diese Reste genau in der Metallbindungsschleife liegen, wird davon ausgegangen, dass die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen auf eine biologisch relevante Veränderung der Dynamik hinweisen. Die Art und Auswirkung dieser postulierten unterschiede in der Proteindynamik müssen jedoch noch durch weitere Experimente aufgeklärt werden.

Verwendete Literatur

- NMR Spectroscopy in Living Cells, R.G. Shulman, Sci. Amer. 248, 76-83 (1989)
- The Use of NMR Spectroscopy for the Understanding of Disease, G.K. Radda, Science 233, 640-645 (1986)
- Evaluation of Parameters Critical to Observing Proteins Inside Living *Escherichia coli* by In-Cell NMR Spectroscopy, Volker Dötsch, J. Am. Chem. Soc. 123, 8895-8901 (2001)
- In-Cell NMR Spectroscopy, Volker Dötsch, Biochemistry Vol. 40 Nr. 48 14317-14323 (2001)