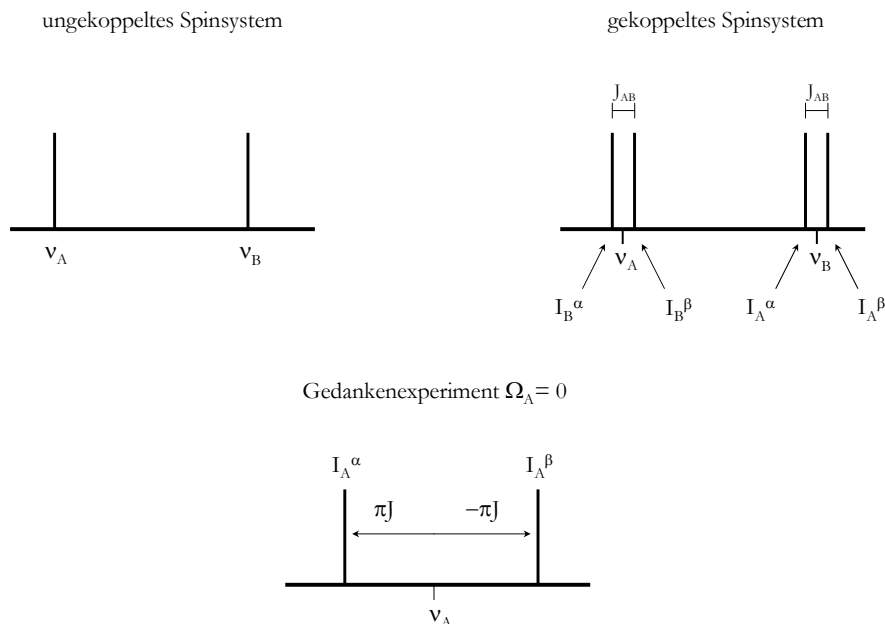


Skalare Kopplungen und das COSY Experiment

In diesem Kapitel wird der Begriff der skalaren Kopplung ${}^nJ(A,B)$ zwischen zwei Kernen A und B, die über n Bindungen miteinander verknüpft sind, eingeführt. Es wird gezeigt, welche strukturellen Informationen sich insbesondere aus ${}^3J(A,B)$ ableiten lassen. Schließlich endet das Kapitel mit einer Darstellung des wohl einfachsten zweidimensionalen Experiments, dem COSY-Experiment, das eine Korrelationen zwischen Spins durch skalare Kopplungen herstellt.

Skalare Kopplung

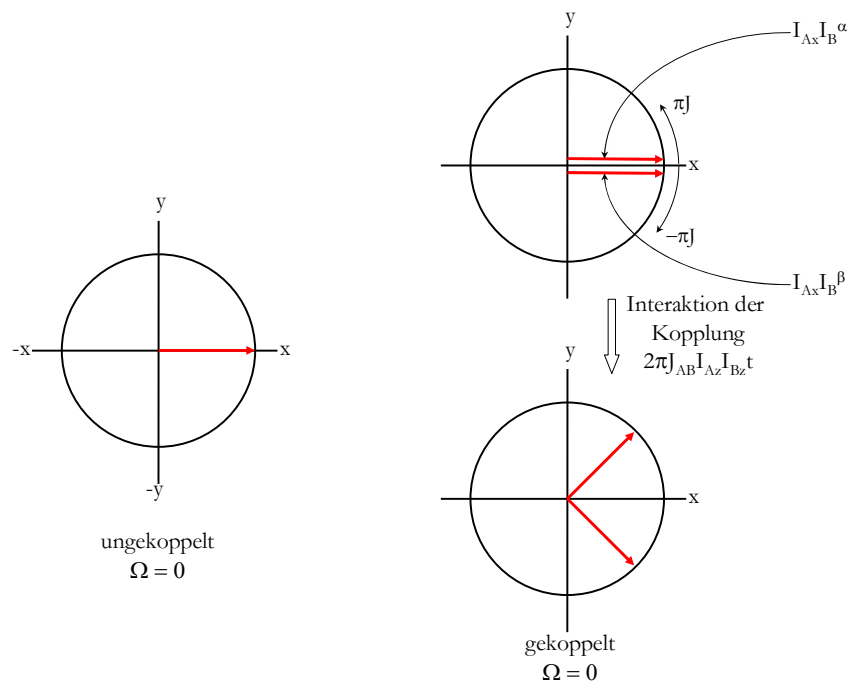
Wie schon in der Einleitung beschrieben, ist die skalare Kopplung verantwortlich für die Feinaufspaltung von Signalen. Sie tritt zwischen benachbarten Spins auf, die über kovalente Bindungen verknüpft sind. Ursache der skalaren Kopplung ist der Zustand des benachbarten Spins. Befindet sich der Nachbarspin im α -Zustand verstärkt sich das lokal wirkende Magnetfeld. So ergibt sich die Rotationsfrequenz des beobachteten Spins aus seiner chemischen Verschiebung plus den Frequenzanteil der skalaren Kopplung. Der Effekt ist genau umgekehrt befindet sich der Nachbarspin im β -Zustand. Die Resonanzfrequenz ergibt sich so aus der chemischen Verschiebung minus dem Anteil der skalaren Kopplung.



In einem Gedankenexperiment ergibt sich in einem System aus zwei gekoppelten Spins (System I_A - I_B mit J_{AB}), für einen beobachteten Spin I_A mit der chemische Verschiebung $\Omega_A=0$ ppm ein

Signal bestehend aus zwei Linien. Der Schwerpunkt beider Linien liegt bei $\delta_A=0\text{ppm}$ und ihr Abstand beträgt $2\pi J_{AB}$.

Betrachtet man sich das zugehörige Vektormodell, so liegen dort zu Beginn der Evolutionszeit zwei Vektoren parallel in transversaler Ebene. Auf beide wirkt nun gleichermaßen der Operator der chemischen Verschiebung (ist in unserem Gedankenexperiment aber null!!). Es wirkt aber zusätzlich noch ein Operator der skalaren Kopplung, aber nicht gleichförmig auf beide Vektoren, sondern auf einen in Form einer Bewegung im Uhrzeigersinn und im anderen Fall entgegen dem Uhrzeigersinn. Erster Vektor repräsentiert alle Spins I_A , die einen benachbarten Spin I_B im α -Zustand besitzen, der zweite Vektor steht für alle Spins I_A , die einen benachbarten Spin I_B im β -Zustand besitzen.



Nach einer gewissen Zeit t lassen sich die beiden Spins durch folgende Operatoren beschreiben:

$$I_{Ax} \xrightarrow{2\pi J_{AB} I_{Az} I_{Bz} t} \begin{aligned} & I_{Ax} I_B^\alpha \cos \pi J_{AB} t + I_{Ay} I_B^\alpha \sin \pi J_{AB} t \\ & I_{Ax} I_B^\beta \cos \pi J_{AB} t - I_{Ay} I_B^\beta \sin \pi J_{AB} t \end{aligned}$$

Dabei beschreibt die Gleichung der Evolution der Kohärenz I_{Ax} unter dem (Hamilton)Operator $2\pi J_{AB} I_{Az} I_{Bz}$ der skalaren Kopplung. Die Stärke der skalaren Kopplung ist J_{AB} . Um die Formulierung I^α und I^β zu umgehen und stattdessen mit bekannten Operatoren I_x, I_y, I_z arbeiten zu können, müssen folgende Transformationsregeln angewendet werden:

$$I^\alpha + I^\beta = 1$$

$$I^\alpha - I^\beta = 2I_z$$

Die erste Gleichung besagt, dass ein Spin entweder im α - oder im β -Zustand sich befinden kann und dass die Summe dieser beiden Zustände gleich 1 ist. Die zweite Gleichung besagt, dass die Differenz zwischen α - oder im β -Zustand gerade gleich der Magnetisierung I_z ist. Der Faktor zwei ist ein Normierungsfaktor, der später erklärt wird.

Formt man nun obigen Term um, der die Evolution der skalaren Kopplung beschreibt, so erhält man:

$$I_{Ay} (I_B^\alpha - I_B^\beta) = 2I_{Ay} I_{Bz}$$

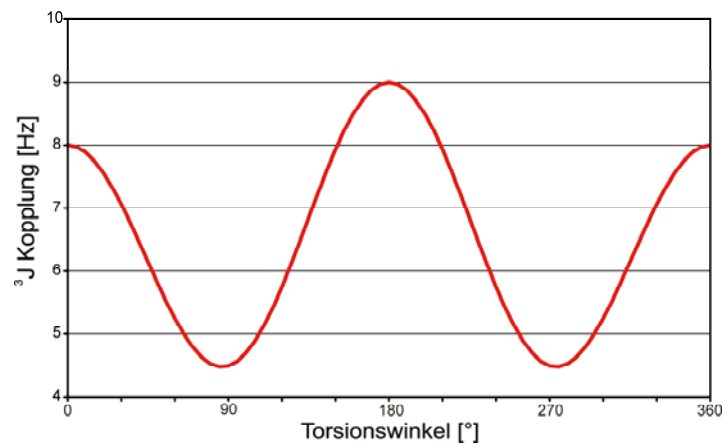
$$I_{Ax} (I_B^\alpha + I_B^\beta) = I_{Ax} 1$$

Diese Ableitung ist allgemeingültig und somit resultieren folgende Rechenregeln für die Beschreibung von skalarer Kopplung im Produktoperatorformalismus:

I_{Ax}	$\xrightarrow{2\pi J_{AB} I_{Az} I_{Bz} t}$	$I_{Ax} \cos \pi J_{AB} t + 2I_{Ay} I_{Bz} \sin \pi J_{AB} t$
I_{Ay}	$\xrightarrow{2\pi J_{AB} I_{Az} I_{Bz} t}$	$I_{Ay} \cos \pi J_{AB} t - 2I_{Ax} I_{Bz} \sin \pi J_{AB} t$
$2I_{Ax} I_{Bz}$	$\xrightarrow{2\pi J_{AB} I_{Az} I_{Bz} t}$	$2I_{Ax} I_{Bz} \cos \pi J_{AB} t + I_{Ay} \sin \pi J_{AB} t$
$2I_{Ay} I_{Bz}$	$\xrightarrow{2\pi J_{AB} I_{Az} I_{Bz} t}$	$2I_{Ay} I_{Bz} \cos \pi J_{AB} t - I_{Ax} \sin \pi J_{AB} t$

Skalare Kopplungen sind wichtige Parameter zur Strukturbestimmung, sie eignen sich zur Festlegung der lokalen Konformation. So hängt die 3J -Kopplung außer von Substituenteneinflüssen wesentlich vom Molekülbau ab (Bindungslängen, Bindungswinkel und Torsionswinkel).

Bei vicinalen Kopplungen 3J an „frei“ drehbaren (C-C)-Bindungen ändert sich die Größe der Kopplungskonstante mit dem Torsionswinkel θ . Diese Abhängigkeit wird graphisch in der Karpluskurve dargestellt:



Obwohl die Parameter, die 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 $\theta = 0^\circ$
- globales Maximum für $\theta = 180^\circ$
- globale Minima für $\theta = 90^\circ$ bzw. 270°

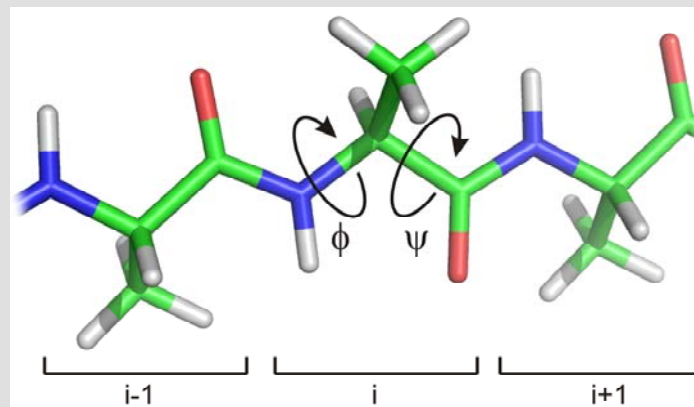
Der Verlauf der Kurve wird durch die Karplus-Gleichung beschrieben

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

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.

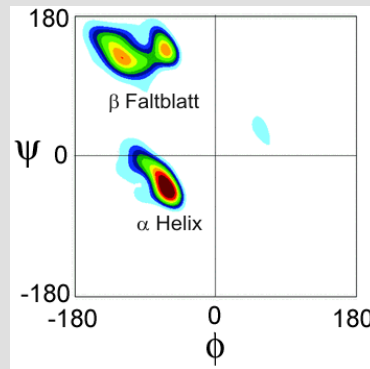
Zusammenhang zwischen der Karplusbeziehung und Sekundärstrukturelementen in Proteinen

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

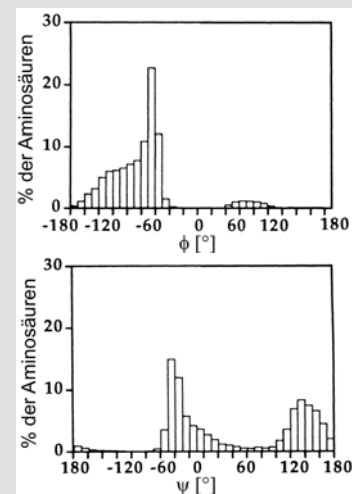
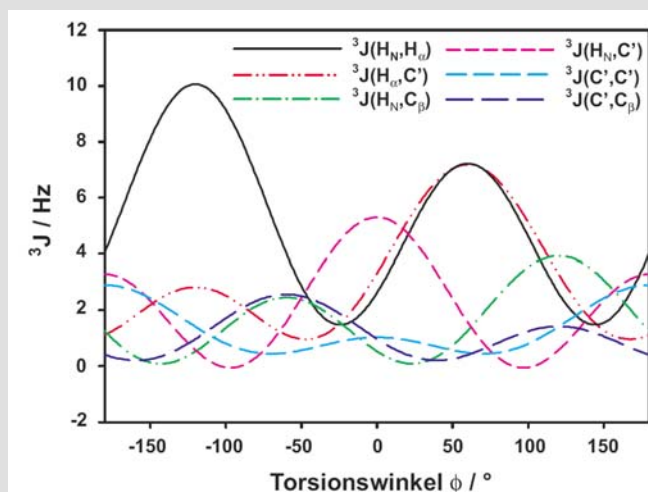


Die entscheidende Teilstruktur bei Polypeptidketten

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



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.

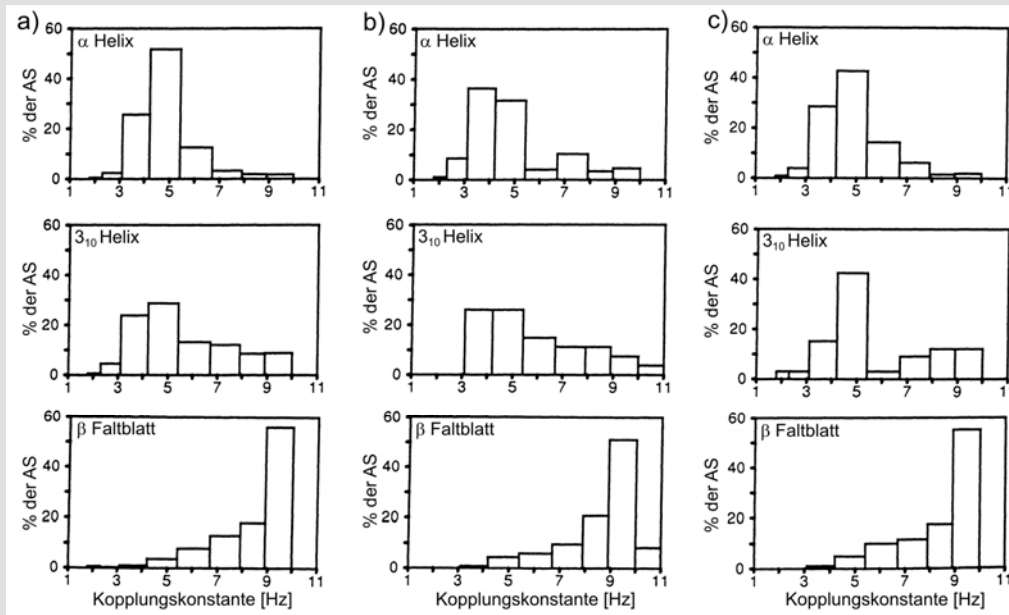


links: Karplusbeziehung zwischen dem Torsionswinkeln ϕ bzw. ψ und ${}^3J_{\text{NH}\alpha}$
 rechts: Gemessene ϕ und ψ Winkel aus hochaufgelösten Röntgenkristallstrukturen
 (Auflösung > 2,0 Å und R > 0,20) von 85 Proteinen

Bestimmte Werte des Winkels ϕ sind mit bestimmten Sekundärstrukturelementen verknüpft.

	Theoretische Werte:	Durchschnittswerte aus Bild 5
α -Helix:	$\phi = -57^\circ$	$\phi = -64,7^\circ$
3_{10} -Helix	$\phi = -49^\circ$	$\phi = -62,8^\circ$
Paralleles β -Faltblatt:	$\phi = -119^\circ$	$\phi = -112,6^\circ$
Antiparalleles β -Faltblatt:	$\phi = -139^\circ$	

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.



$^3J(H^N, H_\alpha)$ -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 Berechnung 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, β -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 β -Faltblättern.

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

Wegen des großen Bereichs an ϕ Winkeln und somit auch ${}^3J(\text{H}^{\text{N}},\text{H}_{\alpha})$ -Kopplungen, die in einer ${}_{3_{10}}$ -Helix vorkommen, kann man dieses Sekundärstrukturelement nur schwer anhand von ${}^3J(\text{H}^{\text{N}},\text{H}_{\alpha})$ -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
β -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: Lorna J. Smith, Kimberly A. Bolin, Harald Schwalbe, Malcolm W. MacArthur, Janet M. Thornton, and Christopher M. Dobson, "Analysis of Main Chain Torsion Angles in Proteins. Predictions of NMR Coupling Constants for Native and Denatured Conformations", J.Mol.Biol. 255, 494-506 (1995).

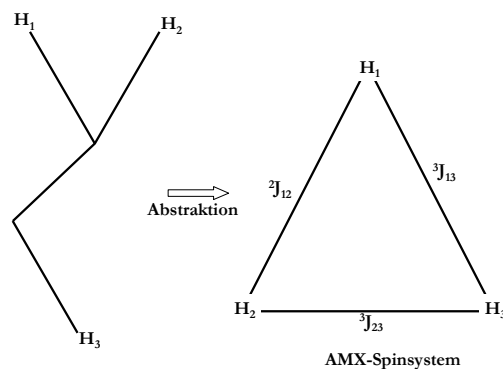
COSY

Ein einfaches zweidimensionales Experiment, das Kerne mittels ihrer skalaren Kopplung korreliert ist das in den siebziger Jahren von J. Jeener und R. Ernst implementierte COSY Experiment. COSY ist das Acronym für correlation spectroscopy.

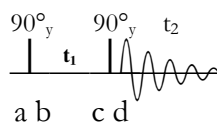
Im Experiment werden magnetische Wechselwirkungen beobachtet bzw. zum Magnetisierungstransfer ausgenutzt. Anders gesagt evolviert die Kohärenz unter den Hamiltonoperatoren der chemischen Verschiebung H_{CS} und der skalaren Kopplung H_J .

1. chemische Verschiebung; $H_{CS} = \Omega_{A_z} I_{A_z} + \Omega_{B_z} I_{B_z}$

2. skalare Kopplung ${}^n J_{mn}$; $H_J = 2\pi J_{AB} I_{A_z} I_{B_z}$



Das Experiment ist, den Aufbau der Pulssequenz betreffend, eines der einfachsten 2D Experimente.



Im Folgenden werden nun die Spins zu den indizierten Zeitpunkten betrachtet. In der Beschreibung wird ab Punkt b nur der Spin 1 weiter verfolgt. Nichts desto trotz gilt die gleiche Entwicklung auch für Spin 2!!!

a) Start mit Gleichgewichtsmagnetsierung

$$I_{1z} + I_{2z}$$

b) Überführung in transversale Magnetsierung mittels 90° -Puls

$$I_{1x} + I_{2x}$$

c) Entwicklung von chemischer Verschiebung und skalarer Kopplung während t_1

$$\begin{aligned} &\xrightarrow{\Omega_1 t_1} I_{1x} \cos \Omega_1 t_1 + I_{1y} \sin \Omega_1 t_1 \\ &\xrightarrow{2\pi J_{12} I_{1z} I_{2z} t_1} \begin{aligned} &\cos \Omega_1 t_1 (I_{1x} \cos \pi J_{12} t_1 + 2I_{1y} I_{2z} \sin \pi J_{12} t_1) \\ &\sin \Omega_1 t_1 (I_{1y} \cos \pi J_{12} t_1 - 2I_{1x} I_{2z} \sin \pi J_{12} t_1) \end{aligned} \end{aligned}$$

Wir können die Reihenfolge, in der wir die Entwicklung der chemischen Verschiebung und der skalaren Kopplung betrachten, frei wählen, da die Hamiltonoperatoren der beiden Wechselwirkungen miteinander vertauschen: $[H_J, H_{CS}] = 0$.

d) Anwendung des zweiten 90° -Pulses:

$$\xrightarrow{90^\circ_y} \begin{aligned} &\cos \Omega_1 t_1 (-I_{1z} \cos \pi J_{12} t_1 + 2I_{1y} I_{2x} \sin \pi J_{12} t_1) \\ &\sin \Omega_1 t_1 (I_{1y} \cos \pi J_{12} t_1 + 2I_{1z} I_{2x} \sin \pi J_{12} t_1) \end{aligned}$$

An dieser Stelle ist es sinnvoll die einzelnen Terme zu bewerten, um möglichst Operatoren, die in nicht detektierbarer Magnetisierung resultieren, nicht weiter zu verfolgen.

- A. $-I_{1z}$ longitudinale Magnetisierung, führt zu keinem Signal, da nur transversale Magnetisierung von der Spule aufgenommen werden kann.
- B. $2I_{1y}I_{2x}$ DQ-ZQ-Term: nicht detektierbar.
Die Frage, weshalb dieser Doppelquantenterm nicht detektiert werden kann, wird erst später klar, und kann an diesem Punkt nur phänomenologisch erklärt werden: Eine Kohärenz I_{1y} stellt den kohärenten Übergang eines Quants zwischen α - und β -Zustand eines Spins dar. Eine Kohärenz $I_{1y}I_{2y}$ stellt einen kohärenten Übergang zwischen α - und β -Zustand zweier Spins dar. Solche Terme zwischen zwei oder noch mehreren Spins sind mittels NMR-Spektroskopie zwar anregbar, aber nicht detektierbar.
- C. I_{1y} detektierbar: wird zu Diagonalpeak (Inphaseterm)
- D. $2I_{1z}I_{2x}$ detektierbar: wird zu Kreuzpeak (Antiphaseterm)

Es werden im Weiteren nur die Terme C. und D. betrachtet, da nur diese zu einer detektierbaren Magnetisierung führen:

$$\sin \Omega_1 t_1 \left(I_{1,y} \cos \pi J_{12} t_1 + 2 I_{1,z} I_{2,x} \sin \pi J_{12} t_1 \right)$$

Auf diese Operatoren wirkt während t_2 nun zum einen die chemische Verschiebung der jeweiligen Kerne und natürlich auch die skalare Kopplung:

$$\begin{aligned} &\xrightarrow{\Omega_1 t_2} \sin \Omega_1 t_1 \left(I_{1,y} \cos \pi J_{12} t_1 \cos \Omega_1 t_2 - I_{1,x} \cos \pi J_{12} t_1 \sin \Omega_1 t_2 \right) \\ &\quad \left(2 I_{1,z} I_{2,x} \sin \pi J_{12} t_1 \cos \Omega_2 t_2 + 2 I_{1,z} I_{2,y} \sin \pi J_{12} t_1 \sin \Omega_2 t_2 \right) \\ &\xrightarrow{2\pi J_{12} I_{1,z} I_{2,z} t_2} \sin \Omega_1 t_1 \left(\begin{aligned} &\text{a } \left(I_{1,y} \cos \pi J_{12} t_1 \cos \Omega_1 t_2 \cos \pi J_{12} t_2 - 2 I_{1,x} I_{2,z} \cos \pi J_{12} t_1 \cos \Omega_1 t_2 \sin \pi J_{12} t_2 \right) \\ &\text{b } \left(I_{1,x} \cos \pi J_{12} t_1 \sin \Omega_1 t_2 \cos \pi J_{12} t_2 + 2 I_{1,y} I_{2,z} \cos \pi J_{12} t_1 \sin \Omega_1 t_2 \sin \pi J_{12} t_2 \right) \\ &\text{c } \left(2 I_{1,z} I_{2,x} \sin \pi J_{12} t_1 \cos \Omega_2 t_2 \cos \pi J_{12} t_2 + I_{2,y} \sin \pi J_{12} t_1 \cos \Omega_2 t_2 \sin \pi J_{12} t_2 \right) \\ &\text{d } \left(2 I_{1,z} I_{2,y} \sin \pi J_{12} t_1 \sin \Omega_2 t_2 \cos \pi J_{12} t_2 - I_{2,x} \sin \pi J_{12} t_1 \sin \Omega_2 t_2 \sin \pi J_{12} t_2 \right) \end{aligned} \right) \end{aligned}$$

Betrachtet man die Inphaseterme (in blau und grün), so erkennt man, dass man nach Addition von a und b, sowie von c und d ein komplexes Signal in t_2 generieren kann:

$$\text{a + b:} \quad \sin \Omega_1 t_1 \cos \pi J_{12} t_1 e^{i\Omega_1 t_2} \cos \pi J_{12} t_2$$

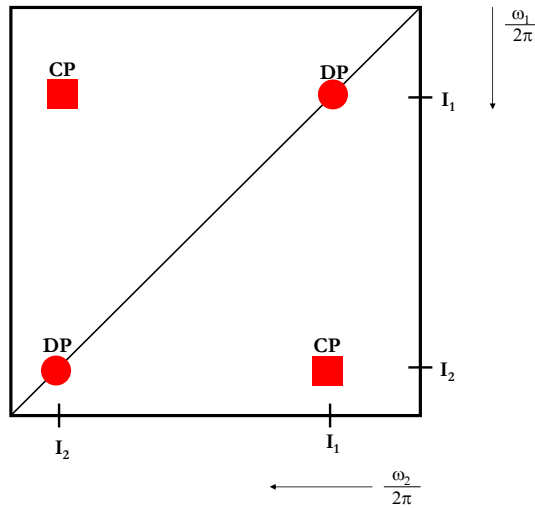
$$\text{c + d:} \quad \sin \Omega_1 t_1 \sin \pi J_{12} t_1 e^{i\Omega_2 t_2} \sin \pi J_{12} t_2$$

Um nun auch noch ein komplexes Signal in t_1 zu erhalten, muß man nach „Ruben-States-Haberkorn“ die Phasen der Pulse schieben, d.h. in einem zweiten Experiment werden die Pulse aus +x und +y angewendet (vormalig +y/+y).

Es ergibt sich so folgende Beschreibung der Magnetisierung:

$$\begin{aligned} &e^{i\Omega_1 t_1} \cos \pi J_{12} t_1 e^{i\Omega_2 t_2} \cos \pi J_{12} t_2 \\ &e^{i\Omega_1 t_1} \sin \pi J_{12} t_1 e^{i\Omega_2 t_2} \sin \pi J_{12} t_2 \end{aligned}$$

Hierbei beschreibt der erste Term den Diagonal- und der zweite Term den Kreuzpeak des Spektrums. Da sich das gleiche auch für den Spin I_2 ergibt (siehe Punkt b in der Pulssequenz und der Beschreibung) ergibt sich ein zweidimensionales Spektrum mit folgender Grobstruktur:



Betrachtet man nun nochmals die resultierenden Terme, so ist zu erkennen, dass der Diagonalpeak sowohl in t_1 als auch in t_2 mit $\cos \pi J_{12}$ moduliert ist und der Crosspeak in beiden Zeitdimensionen eine Modulation mit $\sin \pi J_{12}$ aufweist. So ergibt sich folgende Feinstruktur der Peaks:

