

## INEPT und HSQC

In diesem Kapitel werden heteronukleare NMR-Korrelationsexperimente und deren Anwendung am Beispiel des INEPT Transfers und des HSQC Experimentes eingeführt.

### INEPT

Beim INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarisation Transfer) handelt es sich um eine Methode, Magnetisierung von einem empfindlichen Kern (z.B.  $^1\text{H}$ ) auf einen dazu relativ unempfindlichen, skalar meist über eine  $^1\text{J}$ -Kopplung gekoppelten Kern (z.B.  $^{13}\text{C}$  oder  $^{15}\text{N}$ ) zu transferieren. Per Definition bezeichnet I den empfindlicheren Kern, S den relativ dazu unempfindlicheren.

Die theoretisch mögliche Sensitivitätssteigerung, verglichen mit der direkten Anregung des unempfindlichen Nukleus, entspricht dem relativen Verhältnis der gyromagnetischen Verhältnisse  $\gamma_I/\gamma_S$  (z.B. ein Faktor  $\sim 4$  im Falle von  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  bzw.  $\sim 10$  im Falle von  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ ). Für einen INEPT Transfer benötigt man allerdings eine gewisse Zeit, abhängig von der skalaren Kopplung zwischen den beiden Kernen, sodass die theoretische Sensitivitätssteigerung auf Grund von Relaxation nicht immer erreicht wird.

Ein INEPT Transfer wird durch die folgende Pulssequenz erreicht:



Ausgehend von der Gleichgewichtsmagnetisierung  $I_z$  erhält man somit:

$$\begin{aligned}
 I_z &\xrightarrow{90^\circ_x I} -I_y \xrightarrow{\pi J_{IS} \tau} -I_y \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_x S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) \\
 &\xrightarrow{\Omega \tau} -I_y \cos(\pi J \tau) \cos(\Omega \tau) + I_x \cos(\pi J \tau) \sin(\Omega \tau) \\
 &\quad + 2I_x S_z \sin(\pi J \tau) \cos(\Omega \tau) + 2I_y S_z \sin(\pi J \tau) \sin(\Omega \tau) \\
 &\xrightarrow{180^\circ_x I, S} I_y \cos(\pi J \tau) \cos(\Omega \tau) + I_x \cos(\pi J \tau) \sin(\Omega \tau) \\
 &\quad - 2I_x S_z \sin(\pi J \tau) \cos(\Omega \tau) + 2I_y S_z \sin(\pi J \tau) \sin(\Omega \tau)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
&\xrightarrow{\Omega\tau} +I_y \cos(\pi J\tau) \cos^2(\Omega\tau) - I_x \cos(\pi J\tau) \cos(\Omega\tau) \sin(\Omega\tau) \\
&+ I_x \cos(\pi J\tau) \sin(\Omega\tau) \cos(\Omega\tau) + I_y \cos(\pi J\tau) \sin^2(\Omega\tau) \\
&- 2I_x S_z \sin(\pi J\tau) \cos^2(\Omega\tau) - 2I_y S_z \sin(\pi J\tau) \cos(\Omega\tau) \sin(\Omega\tau) \\
&+ 2I_y S_z \sin(\pi J\tau) \sin(\Omega\tau) \cos(\Omega\tau) - 2I_x S_z \sin(\pi J\tau) \sin^2(\Omega\tau)
\end{aligned}$$

$$\longrightarrow +I_y \cos(\pi J\tau) - 2I_x S_z \sin(\pi J\tau), \text{ da gilt } \sin^2 A + \cos^2 A = 1$$

$$\begin{aligned}
&\xrightarrow{\pi J_{IS}\tau} I_y \cos^2(\pi J\tau) - 2I_x S_z \cos(\pi J\tau) \sin(\pi J\tau) \\
&- 2I_x S_z \sin(\pi J_{IS}\tau) \cos(\pi J\tau) - I_y \sin^2(\pi J\tau)
\end{aligned}$$

$$\longrightarrow I_y \cos(2\pi J\tau) - 2I_x S_z \sin(2\pi J\tau), \text{ da gilt } \cos^2 A - \sin^2 A = \cos 2A \text{ und } 2\sin A \cos A = \sin 2A$$

$$\longrightarrow -2I_x S_z, \text{ f\u00fcr } \tau = \frac{1}{4J_{IS}}$$

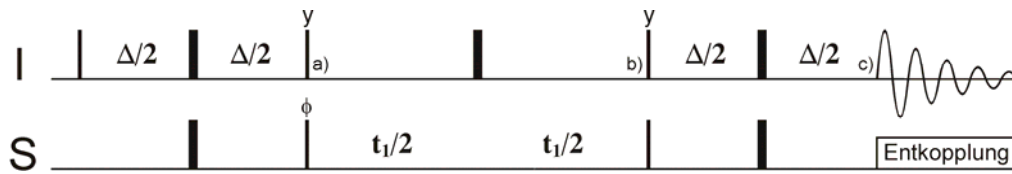
$$\xrightarrow{90^\circ_y, I, 90^\circ_x S} -2I_z S_y$$

Der INEPT Transfer liefert einen Antiphaseoperator der Form  $2I_z S_{x/y}$  durch die Evolution heteronuklearer Kopplung. Die chemische Verschiebung des I Spins ist refokussiert, die heteronukleare Kopplung zwischen verschiedenen I Spins  $J_{II}$  ist in der Regel zu vernachl\u00e4ssigen, da sie klein ist verglichen mit der aktiven heteronuklearen Kopplung  $J_{IS}$ .

## Das HSQC Experiment

Da beispielsweise durch den INEPT Transfer die Verkn\u00fcpfung zweier Kerne durch deren skalare Kopplung m\u00f6glich ist, kann man nun auch Spektren erzeugen, in denen die chemischen Verschiebungen von zwei Kernen miteinander korreliert sind. Man nutzt dabei in den meisten F\u00e4llen die  $^1J$  skalare Kopplung aus, diese besitzt den Vorteil, dass sie erstens gro\u00df und zweitens kaum von der chemischen Umgebung bzw. einer Konformation abh\u00e4ngen (die  $^1J_{NH}$  Kopplung im Peptid- oder Proteinr\u00fcckgrat liegt beispielsweise immer bei etwa 90Hz). So ist es m\u00f6glich, eine Dauer f\u00fcr den INEPT Transfer zu w\u00e4hlen, sodass die Transfereffizienz f\u00fcr alle zu beobachteten  $^1J$  Kopplungen etwa gleich ist.

Wir betrachten im Folgenden das HSQC (Heteronuklear Single Quantum Coherence) Experiment. In der Schreibweise der NMRler:



Zum Zeitpunkt a) besteht, wie bereits diskutiert, der Antiphaseoperator  $-2I_zS_y$  da nur der S Spin transversal ist, gibt es prinzipiell drei mögliche Wechselwirkungen, die während der Zeit  $t_1$  auftreten:

1. Entwicklung chemischer Verschiebung von S
2. Heteronukleare Kopplung  $J_{IS}$
3. Homonukleare Kopplung  $J_{SS}$

Wir gehen im Folgenden davon aus, dass kein weiterer Spin  $S_2$  zum beobachteten Spin  $S_{(1)}$  koppelt (Dies ist beispielsweise der Fall, wenn man  $^{13}\text{C}$  bzw.  $^{15}\text{N}$  bei natürlicher Häufigkeit betrachtet).

Der bereits diskutierte INEPT Transfer liefert am Punkt a) einen Operator der Form  $2I_zS_y$ . Dieser entwickelt nun chemische Verschiebung des Spins S wobei, wie im Folgenden gezeigt, die heteronukleare Kopplung refokussiert wird:

$$-2I_zS_y \xrightarrow{\pi J_{IS}} -2I_zS_y \cos(\pi J t_1/2) + S_x \sin(\pi J t_1/2)$$

$$\xrightarrow{\Omega_s t_1/2} -2I_zS_y \cos(\pi J t_1/2) \cos(\Omega_s t_1/2) + 2I_zS_x \cos(\pi J t_1/2) \sin(\Omega_s t_1/2) + S_x \sin(\pi J t_1/2) \cos(\Omega_s t_1/2) + S_y \sin(\pi J t_1/2) \sin(\Omega_s t_1/2)$$

$$\xrightarrow{180^\circ_x I} +2I_zS_y \cos(\pi J t_1/2) \cos(\Omega_s t_1/2) - 2I_zS_x \cos(\pi J t_1/2) \sin(\Omega_s t_1/2) + S_x \sin(\pi J t_1/2) \cos(\Omega_s t_1/2) + S_y \sin(\pi J t_1/2) \sin(\Omega_s t_1/2)$$

$$\xrightarrow{\pi J_{IS}} 2I_zS_y \cos^2(\pi J t_1/2) \cos(\Omega_s t_1/2) - S_x \cos(\pi J t_1/2) \sin(\pi J t_1/2) \cos(\Omega_s t_1/2)$$

$$- 2I_zS_x \cos^2(\pi J t_1/2) \sin(\Omega_s t_1/2) - S_y \cos(\pi J t_1/2) \sin(\pi J t_1/2) \sin(\Omega_s t_1/2)$$

$$+ S_x \sin(\pi J t_1/2) \cos(\pi J t_1/2) \cos(\Omega_s t_1/2) + 2I_zS_y \sin^2(\pi J t_1/2) \cos(\Omega_s t_1/2)$$

$$+ S_y \sin(\pi J t_1/2) \cos(\pi J t_1/2) \sin(\Omega_s t_1/2) - 2I_zS_x \sin^2(\pi J t_1/2) \sin(\Omega_s t_1/2)$$

$$\longrightarrow 2I_zS_y \cos(\Omega_s t_1/2) - 2I_zS_x \sin(\Omega_s t_1/2), \text{ da gilt } \sin^2 A + \cos^2 A = 1$$

$$\begin{aligned} &\xrightarrow{\Omega_s t_1/2} 2I_z S_y \cos^2(\Omega_s t_1/2) - 2I_z S_x \cos(\Omega_s t_1/2) \sin(\Omega_s t_1/2) \\ &- 2I_z S_x \sin(\Omega_s t_1/2) \cos(\Omega_s t_1/2) - 2I_z S_y \sin^2(\Omega_s t_1/2) \end{aligned}$$

$$\longrightarrow 2I_z S_y \cos(\Omega_s t_1) - 2I_z S_x \sin(\Omega_s t_1), \text{ da gilt } \cos^2 A - \sin^2 A = \cos 2A \text{ und } 2\sin A \cos A = \sin 2A$$

Am Punkt b) der Pulssequenz liegen also zwei verschiedene Antiphase Operatoren vor, die beide mit der chemischen Verschiebung des S Spins moduliert sind. Wir wollen im Folgenden die beiden Operatoren getrennt betrachten, außerdem berücksichtigen wir, dass wie bereits oben demonstriert, die Entwicklung chemischer Verschiebung refokussiert wird, und deshalb vernachlässigt werden kann:

$$2I_z S_y \cos(\Omega_s t_1) \xrightarrow{90^\circ_x I, S} -2I_y S_z \cos(\Omega_s t_1)$$

$$\xrightarrow{\pi J_{IS} \Delta/2} -2I_y S_z \cos(\Omega_s t_1) \cos(\pi J \Delta/2) + I_x \cos(\Omega_s t_1) \sin(\pi J \Delta/2)$$

$$\xrightarrow{180^\circ_x I, S} -2I_y S_z \cos(\Omega_s t_1) \cos(\pi J \Delta/2) + I_x \cos(\Omega_s t_1) \sin(\pi J \Delta/2)$$

$$\xrightarrow{\pi J_{IS}} -2I_y S_z \cos(\Omega_s t_1) \cos^2(\pi J \Delta/2) + I_x \cos(\Omega_s t_1) \cos(\pi J \Delta/2) \sin(\pi J \Delta/2)$$

$$+ I_x \cos(\Omega_s t_1) \cos(\pi J \Delta/2) \sin(\pi J \Delta/2) + 2I_y S_z \cos(\Omega_s t_1) \sin^2(\pi J \Delta/2)$$

$$\longrightarrow -2I_y S_z \cos(\Omega_s t_1) \cos(\pi J \Delta) + I_x \cos(\Omega_s t_1) \sin(\pi J \Delta), \text{ da gilt } \cos^2 A - \sin^2 A = \cos 2A \text{ und } 2\sin A \cos A = \sin 2A$$

$$\longrightarrow I_x \cos(\Omega_s t_1), \text{ für } \Delta = \frac{1}{2J_{IS}}$$

Der Term wird also in detektierbare Inphase Magnetisierung überführt, die in der Zeitdomäne  $t_1$  mit der chemischen Verschiebung von S moduliert ist. Während der Detektion für die Zeit  $t_2$  entwickelt dieser Operator nun chemische Verschiebung der Spins I, die heteronukleare Kopplung  $J_{IS}$  wird durch die angewendete Entkopplung unterdrückt.

$$I_x \cos(\Omega_s t_1) \xrightarrow{\Omega_I t_2} I_x \cos(\Omega_s t_1) \cos(\Omega_I t_2) + I_x \cos(\Omega_s t_1) \sin(\Omega_I t_2)$$

Für den zweiten Term nach  $t_1$  gilt:

$$-2I_z S_x \cos(\Omega_s t_1) \xrightarrow{90^\circ_x I, S} 2I_y S_x \cos(\Omega_s t_1)$$

Hierbei handelt es sich um einen Multiquanten Operator. Da I und S transversal sind, kann sich keine skalare Kopplung entwickeln. Die chemische Verschiebung der Spins I und S wird ebenfalls refokussiert, zum Zeitpunkt c) liegt daher ein Operator der Form  $2I_y S_x$  vor, dieser ist nicht detektierbar.

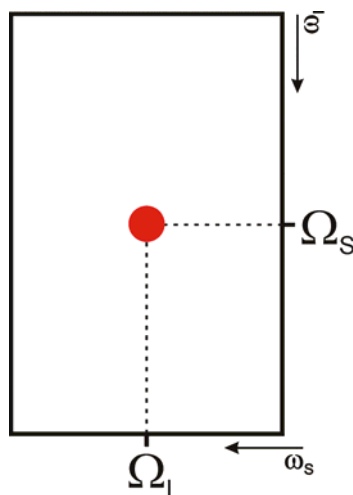
Der einzige detektierbare Term lautet somit:

$$I_x \cos(\Omega_s t_1) \cos(\Omega_I t_2) + I_y \cos(\Omega_s t_1) \sin(\Omega_I t_2).$$

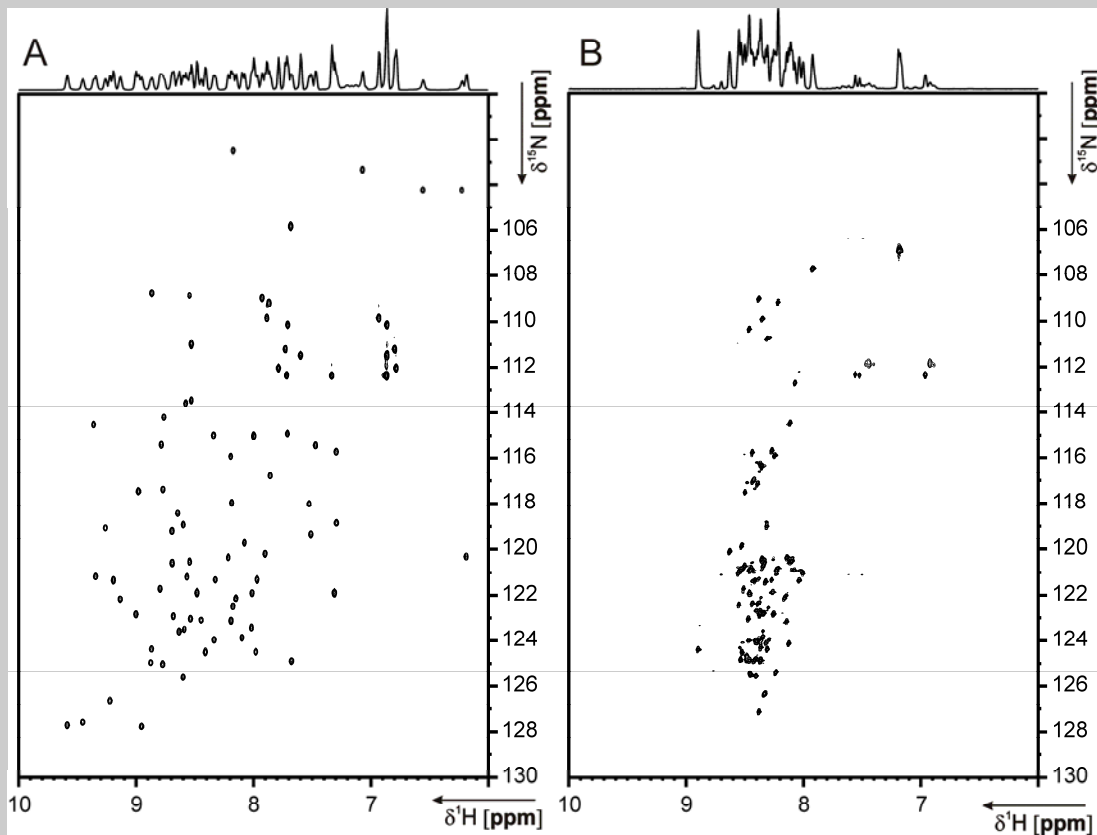
Durch die Verwendung von zwei Detektoren, analog zum 1D Experiment, wird eine Vorzeichenunterscheidung in der direkten Dimension  $t_2$  bzw. nach Fourier Transformation  $\omega_2$  möglich. Um eine Vorzeichenunterscheidung auch in der indirekten Dimension  $t_1$  zu ermöglichen, wird die mit  $\phi$  bezeichnete Phase um  $90^\circ$  verschoben, woraufhin man analog zur durchgeführten Rechnung die jeweiligen Terme erhält, die in der Zeitdomäne  $t_1$  mit dem Sinus der chemischen Verschiebung von S moduliert sind:

$$I_x \sin(\Omega_s t_1) \cos(\Omega_I t_2) + I_y \sin(\Omega_s t_1) \sin(\Omega_I t_2)$$

Nach Fourier Transformation der beiden Zeitdomänen erhält man ein Signal, dass in zwei Frequenzdomänen mit den chemischen Verschiebungen zweier verschiedener Kerne moduliert ist:



## HSQC Spektren von Biomolekülen



Amid Region des  $\{^1\text{H},^{15}\text{N}\}$ -HSQC Spektrums von gefaltetem Ubiquitin (A) und entfaltetem Ubiquitin (B).

Das HSQC ist eines der meist gebrauchten Experimente. Mit dem HSQC Spektrum alleine ist keine Zuordnung möglich, da es keine Konnektivität über die  $^1\text{J}$  Kopplung hinaus zeigt. Das oben gezeigte HSQC Spektrum zeigt ein Signal für jede Aminosäure, mit Ausnahme der N-terminalen Aminosäure, sowie Prolin, da dieses kein Proton am Rückgrat Stickstoff trägt.

Das HSQC Experiment ist in der Lage den Signalüberlapp in der Protonendimension aufzulösen. Aus diesem Grund basieren viele mehrdimensionale Experimente im Wesentlichen auf dem HSQC Experiment. So ist beispielsweise das 2D NOESY Spektrum eines Proteins wenig übersichtlich. In der Regel geht man über zu einem 3D-NOESY-HSQC, einem dreidimensionalen Spektrum dessen zweidimensionale Projektionen ein NOESY und ein HSQC Spektrum sind. Die vielen Signalüberlagerungen in der NOESY Ebene lassen sich so durch eine zusätzliche Stickstoff Dimension auflösen.

Wie oben zu sehen ist, unterscheiden sich die HSQC Spektren von ge- und entfaltenen Proteinen deutlich. Die chemische Verschiebung sowohl in der  $^{15}\text{N}$  als auch in der  $^1\text{H}$  Dimension wird durch die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur beeinflusst. Im Fall eines entfaltenen Proteins liegen die chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren alle relativ nah an den „random coil“ chemischen Verschiebungen, wodurch die Dispersion des Spektrums verloren geht.