

# NMR-Spektroskopie

## 1. Theorie der NMR-Spektroskopie

### ALLGEMEINES

Die im Jahre 1946 durch Bloch<sup>[3]</sup> und Purcell *et al.*<sup>[4]</sup> entdeckte kernmagnetische Resonanz ist die Grundlage der NMR-Spektroskopie<sup>[5]</sup>. Diese beruht auf dem Zeeman-Effekt<sup>[6]</sup> und damit auf der Aufspaltung der Energie der Kernspins in  $2 \cdot I + 1$  ( $I \dots$  Spinquantenzahl des betrachteten Kerns) Energieniveaus, wenn man ein statisches Magnetfeld  $B_0$  auf sie einwirken läßt. Im klassischen Sinn bedeutet dies eine Ausrichtung der Kernspins im Magnetfeld, wobei für einen einzelnen Kern mit  $I = 1/2$  genau zwei Zustände  $\alpha$  (in Richtung  $B_0$ , spin-up) und  $\beta$  (entgegen  $B_0$ , spin-down) existieren. Die Spins präzedieren dabei mit der Larmor-Frequenz  $\nu_L = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi}$  (mit  $\gamma =$  gyromagnetisches Verhältnis des Kerns) auf einem Doppelkegel mit einem Öffnungswinkel von  $54,73^\circ$  um die Achse des äußeren Magnetfeldes  $B_0$ . Da eine Ausrichtung entgegen  $B_0$  (spin-down) energetisch ungünstiger ist, besitzt der  $\beta$ -Zustand demzufolge eine höhere Energie als der  $\alpha$ -Zustand (Abb. 2.1).

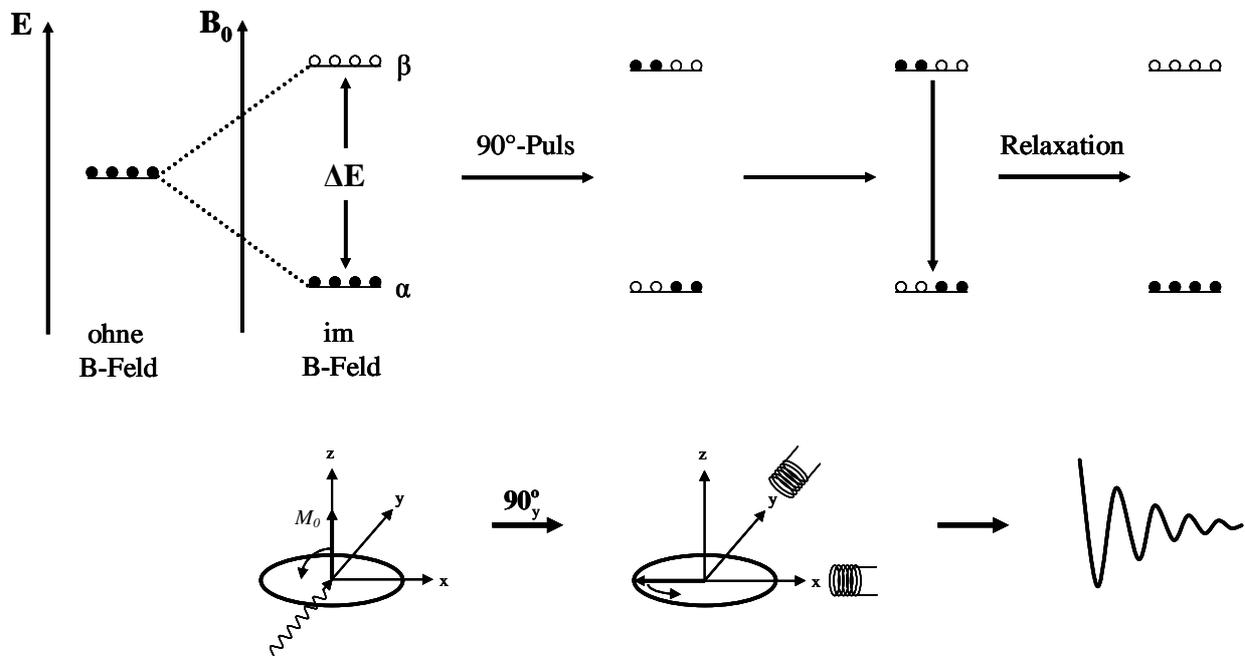


Abb. 2.1: Schematische Beschreibung der NMR-Spektroskopie

Der energetische Unterschied beider Zustände ( $\Delta E$ ) ist abhängig vom angelegten äußeren Magnetfeld bzw. der Kernsorte und beträgt

$$\Delta E = h \cdot \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi} = \hbar \cdot \gamma \cdot B_0 \quad (2.1)$$

(mit  $h$  ... Planck'sches Wirkungsquantum;  $\gamma$  ... gyromagnetisches Verhältnis des Kerns;  $B_0$  ... Flußdichte des äußeren Magnetfeldes)

Die Gleichgewichts-Population der beiden Niveaus hängt nach Boltzmann zum einen von dieser Energiedifferenz, also von der Magnetfeldstärke und dem betrachteten Kern, und zum anderen von der Temperatur ab und beträgt

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{k_B T}} = e^{-\frac{\hbar \cdot \gamma \cdot B_0}{k_B T}} \quad (2.2)$$

(mit  $N_\alpha, N_\beta$  ... Besetzungszahl des  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Niveaus;  $k_B$  ... Boltzmann-Konstante)

Da das  $\alpha$ -Niveau stärker populiert ist, als das  $\beta$ -Niveau, resultiert daraus als Summe aller in einer Probe vorkommenden Spins eine makroskopische Magnetisierung  $M_0$  in Richtung  $B_0$  (z-Achse). Dieser Besetzungsunterschied ist sehr klein und beträgt z. B. für ein Magnetfeld mit einer Flußdichte von  $B_0 = 7,05$  T nur  $N_\beta = 0,99995 \cdot N_\alpha$  <sup>[5]</sup>. Absorption von senkrecht zum  $B_0$ -Feld eingestrahler elektromagnetischer Strahlung mit einer Energie, die  $\Delta E$  entspricht, führt nun zu einer Besetzung der Energieniveaus, die von diesem Boltzmann-Gleichgewicht abweicht. Diese Abweichung ist nach Gleichung 2.3 von der Dauer des elektromagnetischen Pulses abhängig:

$$\beta = \gamma B_1 \tau \quad (2.3)$$

(mit  $\beta$  ... Drehwinkel der Magnetisierung;  $\gamma$  ... gyromagnetisches Verhältnis des Kerns;  $B_1$  ... Feldstärke des senkrecht zu  $B_0$  eingestrahltten Impulses;  $\tau$  ... Dauer des Impulses)

Die makroskopische Magnetisierung wird somit aus der  $B_0$ -Richtung gedreht. Ein  $90^\circ$ -Impuls würde  $M_0$  um  $90^\circ$  (Gleichbesetzung des  $\alpha$  und  $\beta$ -Niveaus mit Phasenkohärenz der

Einzel spins) und ein  $180^\circ$ -Puls, der zweimal der Dauer eines  $90^\circ$ -Pulses entspricht, um  $180^\circ$  (Inversion der beiden Niveaus) gegenüber  $B_0$  drehen. Der nach einem Puls vorhandene Anteil an Magnetisierung  $M$  in der  $xy$ -Ebene präzediert dabei um  $B_0$ . Dieses rotierende Magnetfeld kann nun eine Spannung in einer Spule induzieren, sodaß es meßbar wird, wobei zu beachten ist, daß nur Magnetisierung in der  $xy$ -Ebene (Einquantenkohärenz) direkt beobachtbar ist. Nach der Einwirkung des Pulses relaxiert das System, um wieder den Gleichgewichtszustand zu erreichen. Die Magnetisierung entlang der  $z$ -Achse steigt nun an, während sie in der  $xy$ -Ebene abnimmt. Startet man zu diesem Zeitpunkt die Messung, ergibt sich daraus eine Wechselspannung mit abnehmender Amplitude, der sogenannte Freie Induktionsabfall (engl.: Free Induction Decay, FID). Die Zeit, mit der  $M$  entlang  $B_0$  anwächst wird dabei als longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxationszeit ( $T_1$ ), während die Zeit in der  $M$  in der  $xy$ -Ebene abfällt als transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit ( $T_2$ ) bezeichnet wird.  $T_1$  ist abhängig von der den betrachteten Kern umgebenden Matrix, d. h. anderen Kernen im selben Molekül oder auch Kernen in den Lösungsmittelmolekülen, während  $T_2$  von der Homogenität des am untersuchten Kern wirkenden äußeren Magnetfeldes abhängt. Diese Homogenität hängt zum einen von der Justierung (Shim) des  $B_0$ -Feldes ab und auf molekularer Ebene von Einflüssen, verursacht durch andere magnetische Kerne. Die Fourier-Transformation des FIDs ergibt schließlich ein NMR-Spektrum.

Für die Strukturanalytik von Molekülen ist die NMR-Spektroskopie deshalb so attraktiv, da sich die im zu untersuchenden Molekül befindlichen Elektronen und NMR-aktiven Kerne gegenseitig, aber auch die Kerne untereinander beeinflussen und man somit Aussagen über vorhandene Molekülfragmente treffen kann. Messbar werden diese Wechselwirkungen als chemische Verschiebung  $\delta$  und als skalare bzw. dipolare Kopplung. Durch die geschickte, teilweise sehr komplexe Anordnung von Pulsen und Pausen (Delays) lassen sich mit der NMR-Spektroskopie viele Phänomene messen, wobei zum Verständnis der jeweiligen Methode Puls-Sequenzen den Ablauf des Experiments visualisieren. NMR-Experimente können ein- aber auch mehrdimensional durchgeführt werden. Im Folgenden werden ein- und zweidimensionale Methoden angewandt. Bei 2D-Experimenten wird nur eine Dimension direkt gemessen ( $t_2$ ), die zweite wird indirekt über ein inkrementiertes Delay ( $t_1$ ) erhalten.

Alle 1D- und 2D-Experimente besitzen dabei im Allgemeinen immer denselben in Abb. 2.2 gezeigten Aufbau.

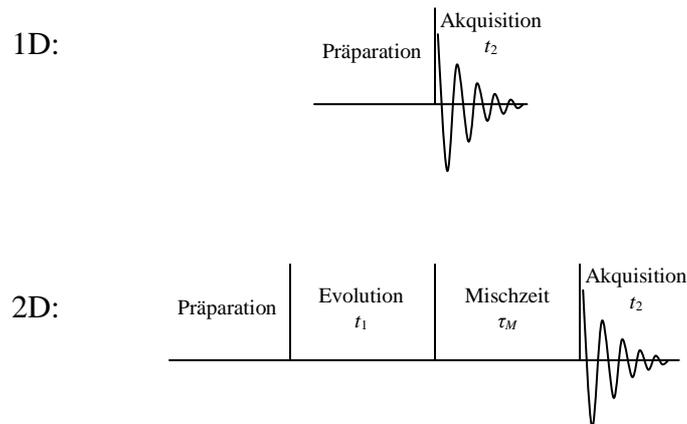


Abb. 2.2: Grundlegender Aufbau von NMR-Experimenten

## DIE CHEMISCHE VERSCHIEBUNG

Bei der chemischen Verschiebung handelt es sich um die Abweichung der Resonanzfrequenz  $\nu_1$  eines Kerns von der durch das äußere Magnetfeld bestimmten Frequenz einer per Definition vorgegebenen Referenzsubstanz ( $\nu_R$ ). Durch die Wechselwirkung der magnetischen Momente der den Kern umgebenden Elektronen mit dem magnetischen Moment des Kerns ist das am Kernort wirkende effektive Magnetfeld  $B_{eff}$  kleiner oder manchmal auch größer als  $B_0$ . Dieser Effekt lässt sich mathematisch folgendermaßen ausdrücken:

$$B_{eff} = B_0 \cdot (1 - \sigma) \quad (2.3)$$

wobei  $\sigma$ , die Abschirmkonstante, diesen elektronischen Einfluß quantitativ beschreibt und die Resonanzfrequenz des betrachteten Kerns beträgt folglich

$$\nu_1 = \frac{\gamma \cdot B_{eff}}{2\pi} = \frac{\gamma \cdot B_0}{2\pi} \cdot (1 - \sigma) \quad (2.4)$$

Die Frequenzdifferenz, also die chemische Verschiebung berechnet sich dann nach

$$\delta = \frac{\nu_1 - \nu_R}{\nu_R} \cdot 10^6 \quad (2.5)$$

und wird als dimensionslose Größe üblicherweise in ppm angegeben. Da entsprechend der betrachteten Kerne die Frequenzskala mehrere ppm beträgt, muß ein eingestrahelter nicht-selektiver Impuls diesen kompletten Frequenzbereich abdecken, um jeden Kern in der Probe zur Resonanz bringen zu können. Dies wird dadurch erreicht, indem man hinreichend kurze Pulse mit hoher Intensität verwendet (hard pulses). Um demgegenüber selektiv einen kleinen Frequenzbereich anzuregen, benötigt man längere Pulse mit geringer Intensität (soft pulses).

#### DIE SKALARE KOPPLUNG

Bei der skalaren Kopplung handelt es sich um eine vom äußeren Magnetfeld unabhängige, über die Bindungselektronen vermittelte gegenseitige Wechselwirkung der magnetischen Momente NMR-aktiver Kerne im Molekül. Diese Wechselwirkung läßt sich über den Fermi-Kontakt-Mechanismus für ein kovalent gebundenes Spinpaar A–X (mit  $I_A = I_X = \frac{1}{2}$ ) anschaulich beschreiben. Dazu wird im folgenden davon ausgegangen, daß eine antiparallele Orientierung eines Kern- und eines Elektronenspins energetisch günstiger ist, als die parallele Ausrichtung.

Die Elektronen in der kovalenten Bindung sind nach dem Pauli-Prinzip antiparallel orientiert. Wenn die beiden Kernspins nun, wie in Abb. 2.3 links gezeigt, ebenfalls antiparallel zueinander ausgerichtet sind, entsteht durch den Fermi-Kontakt eine energetisch günstige Wechselwirkung zwischen ihnen und dem jeweils in der Nähe befindlichen Bindungselektron. In dieser Anordnung besitzen die Kerne, aufgrund des durch diese Wechselwirkung verursachten Energiegewinns, eine gegenüber dem isolierten Fall veränderte Resonanzfrequenz. Für den Fall, daß die Kernspins parallel orientiert sind (Abb. 2.3 rechts), besitzt nur der Spin des Kerns A eine zum nächstgelegenen Elektron günstige antiparallele Ausrichtung. Die Gesamtanordnung ist energetisch ungünstig, was wiederum eine Änderung der Resonanzfrequenz bewirkt.

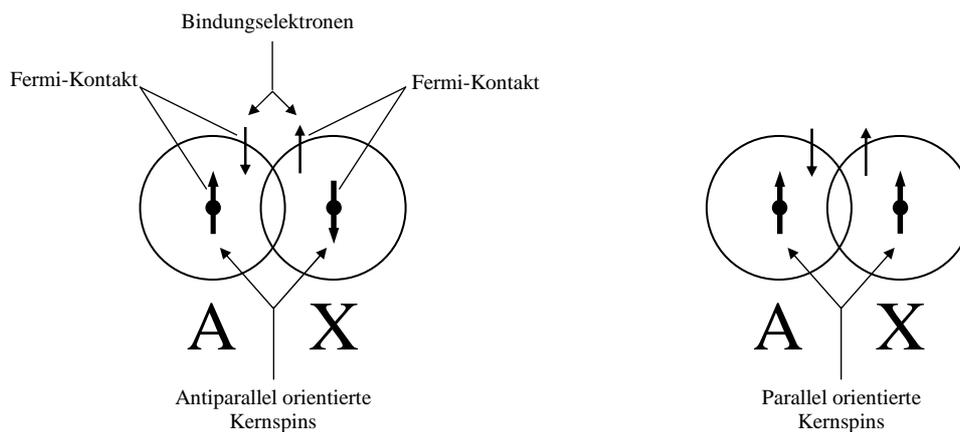


Abb. 2.3: Graphische Darstellung des Fermi-Kontakts zweier Kerne A und X (nach [7])

Da in einer Probe die Wahrscheinlichkeit, mit der die beiden möglichen Spinorientierungen auftreten, nahezu gleich groß ist, ist die Wahrscheinlichkeit, den Kern X im  $\alpha$ -Zustand anzutreffen nahezu gleich groß, wie für den  $\beta$ -Zustand. Demzufolge befindet sich die Hälfte der Kerne A in der energetisch günstigeren zu X antiparallelen und die andere Hälfte in der ungünstigeren zu X parallelen Orientierung. Im Spektrum spaltet das für einen isolierten Kern A beobachtete Singulett symmetrisch in zwei Signale mit fast identischer Intensität auf. Dies gilt umgekehrt in gleicher Weise für den Kern X. Da in der Realität allerdings nicht immer nur zwei Kerne miteinander koppeln, müssen für diesen Fall alle Kombinationen der für einen Spin- $\frac{1}{2}$ -Kern möglichen zwei Zustände berücksichtigt werden. Für diesen Fall ergibt sich die Anzahl der Linien des entstehenden Multipletts für den beobachteten Kern nach  $M = n + 1$  (mit  $n$  ... Anzahl der koppelnden Nachbarn), wobei die Intensitäten dieser Linien sich entsprechend der Koeffizienten der Binomialreihe verhalten, die durch das Pascal'sche Dreieck gegeben sind<sup>[5]</sup>. Für Kerne mit  $I > \frac{1}{2}$  ergibt sich die Multiplizität aufgrund der größeren Anzahl an Spinorientierungen nach  $M = 2 \cdot I \cdot n + 1$ . Desweiteren erfolgt die skalare Kopplung nicht nur, wie hier gezeigt, über eine Bindung, sondern kann als weitreichende Kopplung über mehrere Bindungen nachweisbar sein.

Der Abstand der durch Kopplung aus dem ursprünglichen Signal gebildeten Peaks ist die Kopplungskonstante  $J$ . Diese wird in Hertz (Hz) angegeben und hängt vom Bindungsabstand der miteinander koppelnden Kerne, den Bindungsverhältnissen und der Molekülgeometrie ab. So lässt sich z. B. über die vicinale Kopplungskonstante zweier Protonen ( ${}^3J_{H,H}$ ) eine Aussage

über den zwischen den Kernen existierenden Torsionswinkel treffen. Diese Abhängigkeit wurde erstmals von Karplus beschrieben<sup>[8], [9]</sup> und ist durch Gleichung 2.6 gegeben:

$${}^3J_{H,H} = A + B \cdot \cos \phi + C \cdot \cos(2\phi) \quad (2.6)$$

(mit  $A, B, C \dots$  empirische Parameter;  $\phi \dots$  Torsionswinkel zwischen den Protonen)

## DIE DIPOLARE KOPPLUNG

Die dipolare Kopplung, also die direkte Wechselwirkung zweier kernmagnetischer Momente über den Raum hinweg ist, anders als im Festkörper, in der hochauflösenden Flüssig-NMR-Spektroskopie nur indirekt über Relaxationsprozesse als Nuclear Overhauser Effect (siehe Kap. 2.1.2.1) erfassbar. Sie wird allerdings als dipolare Restkopplung (residual dipolar coupling, RDC) dann messbar, wenn man einen Teil der Moleküle im Magnetfeld ausrichtet. Dies wird im Kapitel 2.1.3.1 näher beschrieben.

## GEPULSTE FELDGRADIENTEN

Viele NMR-Experimente bedienen sich heute sogenannter gepulster Feldgradienten (engl.: Pulsed Field Gradients, PFGs) um Kohärenz zu erzeugen oder zu beseitigen.

Dabei handelt es sich um eine definierte ortsabhängige lineare Störung des äußeren  $B_0$ -Feldes, die meistens in z-Richtung erfolgt. Das resultierende Feld ( $B_{res}$ ) ergibt sich dabei als Summe aus dem  $B_0$ -Feld und dem Magnetfeld des Gradienten ( $B_g$ ), das von der Gradientenstärke ( $G_z$ ) und der Position in z-Richtung abhängt:

$$B_{res}(z) = B_0 + B_g = B_0 + G_z \times z \quad (2.7)$$

Zum einfacheren Verständnis kann man sich die Probe in mikroskopisch kleine Scheiben entlang  $B_0$  aufgeteilt vorstellen. Nach einem  $90^\circ$ -Puls ohne nachfolgenden z-Gradienten sind die Magnetisierungsvektoren aller Scheiben parallel in der xy-Ebene angeordnet (Abb. 2.4 links). Bei einem unmittelbar auf den  $90^\circ$ -Puls folgenden z-Gradienten erfährt nun jede Scheibe ein anderes von ihrer Position in z-Richtung abhängiges Magnetfeld, was eine Änderung der Larmorfrequenz ( $\nu_L$ ) der Spins in jeder Scheibe nach Gleichung 2.8 bewirkt.

$$v_L = \frac{\gamma \cdot B_{res}(z)}{2\pi} = \frac{\gamma \cdot (B_0 + G_z \times z)}{2\pi} \quad (2.8)$$

Die Magnetisierungsvektoren die sich zum Zeitpunkt des Gradienten in der xy-Ebene befanden, fächern nun entlang der z-Achse auf (Abb. 2.4 mitte). Ein Start der Akquisition zu diesem Zeitpunkt hätte eine minimale bis überhaupt keine Signalintensität zur Folge, da sich die Magnetisierungsvektoren der Gesamtprobe zu Null addieren. Ein zweiter Gradient gleicher Stärke und Dauer wie der erste, aber mit umgekehrtem Vorzeichen, hebt die Wirkung des ersten Gradienten auf und die ursprüngliche Magnetisierung in der xy-Ebene wird wieder hergestellt (Abb. 2.4 rechts).

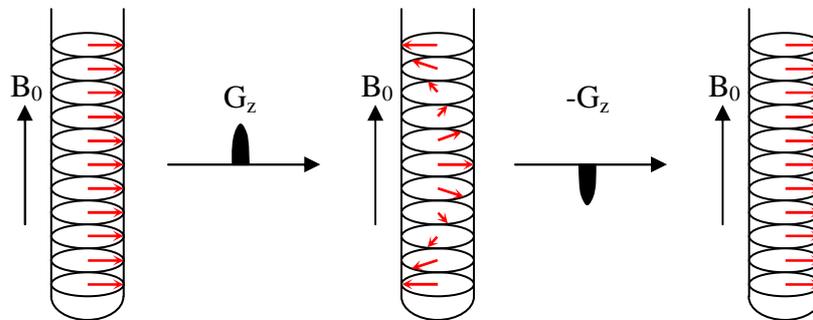


Abb. 2.4: Wirkung eines z-Gradienten auf die xy-Magnetisierung in einer Probe

Der Winkel ( $\Phi_z$ ) mit dem die Magnetisierung bedingt durch den Gradienten um die z-Achse rotiert wird, hängt ab von der Dauer des Gradienten ( $\tau_g$ ), dem Gradientenfeld ( $B_g$ ) und der Kohärenzordnung ( $p$ ) der Magnetisierung<sup>[10]</sup>:

$$\Phi_z = p \cdot \gamma \cdot B_g(z) \cdot \tau_g \quad (2.9)$$

Der Winkel, mit dem also Doppelquantenkohärenz rotiert wird, ist demzufolge zweimal so groß, wie bei Einzelquantenkohärenz, während Nullquantenkohärenz durch Gradienten nicht beeinflusst wird. So läßt sich durch die richtige Wahl der Gradientenstärke und -dauer bzw. durch mehrere aufeinander abgestimmte Gradienten gezielt gewünschte Kohärenz selektieren, bzw. unerwünschte Kohärenz beseitigen.

## 2. Standard NMR-Methoden

### 2.1 NUCLEAR OVERHAUSER EFFECT SPECTROSCOPY (NOESY)

#### *Theorie*

Die NOESY<sup>[11]-[14]</sup> ist eine Methode, mit deren Hilfe sich räumlich nahe Kerne bis zu einem maximalen Abstand von ca. 4 Å identifizieren lassen. Der diesem Experiment zugrunde liegende Effekt ist der Kern-Overhauser-Effekt (Nuclear Overhauser Effect, NOE). Dabei handelt es sich um die indirekte Änderung des Besetzungszustands eines Kernes  $S$  bei direkter Beeinflussung der Gleichgewichts-Population eines zweiten zu  $S$  räumlich nahe liegenden Kernes  $I$  über Kreuzrelaxationsprozesse. Die Sättigung des Kernes  $I$  würde also eine Intensitätsänderung des Signals von  $S$  mit sich bringen. Dieses Phänomen lässt sich anhand des Energieniveau-Schemas (Abb. 2.5) für ein homonukleares Zweispin-System erklären.

In diesem System existieren drei verschiedene Übergangsmöglichkeiten für die Spins  $I$  und  $S$ :

- 1) zwei Einquantenübergänge mit den Übergangswahrscheinlichkeiten  $W_{IS}$  und  $W_{II}$
- 2) ein Nullquantenübergang mit der Übergangswahrscheinlichkeit  $W_{0IS}$
- 3) ein Doppelquantenübergang mit der Übergangswahrscheinlichkeit  $W_{2IS}$

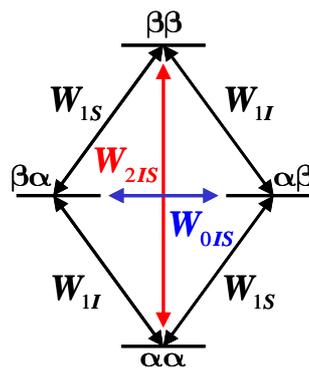


Abb. 2.5: Mögliche Übergänge in einem homonuklearen Zweispin-System

Im Gleichgewichtszustand sieht die Besetzung der vier unterschiedlichen Energieniveaus wie folgt aus (●...Spinüberschuß, ○...Spindefizit):

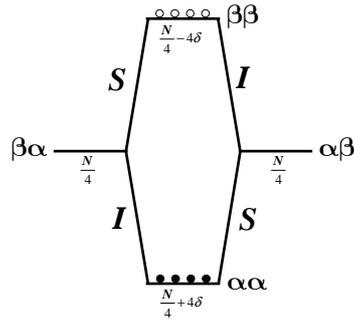


Abb. 2.6: Besetzung der Energieniveaus im Gleichgewichtszustand (nach [15])

Eine Sättigung des Spins  $I$  bedeutet eine Gleichbesetzung der Energieniveaus  $\alpha\alpha$  und  $\beta\alpha$  bzw.  $\alpha\beta$  und  $\beta\beta$  entlang der beiden Einquantenübergänge für  $I$ :

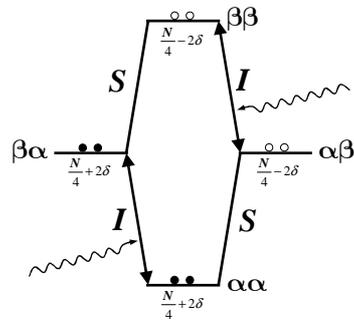


Abb. 2.7: Besetzung der Energieniveaus bei Sättigung des Spins  $I$  (nach [15])

Das so angeregte System hat nun bei andauernder Sättigung des Spins  $I$  die Möglichkeit, über die Null- bzw. Doppelquantenübergänge zu relaxieren. Falls  $W_{2IS} \gg W_{0IS}$ , die Relaxation also fast ausschließlich über den Doppelquantenübergang erfolgt, sähe die Besetzung der Energieniveaus dann wie in Abb. 2.8 links, bei  $W_{0IS} \gg W_{2IS}$ , also Relaxation über den Nullquantenübergang, wie in Abb. 2.8 rechts gezeigt aus.

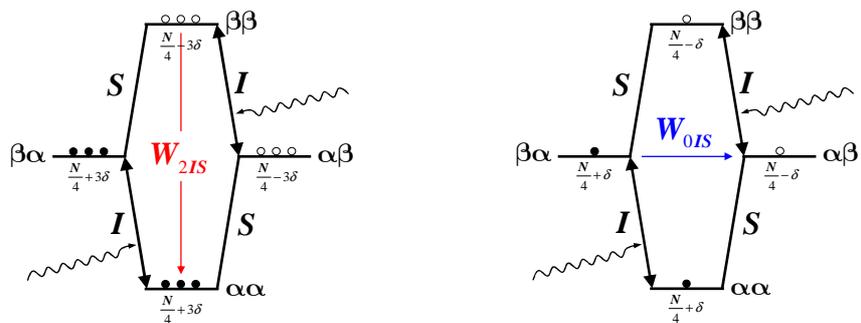


Abb. 2.8: Besetzung der Energieniveaus nach Relaxation über den Doppelquantenübergang (links) oder den Nullquantenübergang (rechts)

Für den linken Fall entspräche der Besetzungsunterschied für den Spin  $S$

$$N_{\alpha\alpha} - N_{\alpha\beta} = N_{\beta\alpha} - N_{\beta\beta} = \frac{N}{4} + 3\delta - \left( \frac{N}{4} - 3\delta \right) = 6\delta, \text{ während sich für den rechten Fall}$$

$$N_{\alpha\alpha} - N_{\alpha\beta} = N_{\beta\alpha} - N_{\beta\beta} = \frac{N}{4} + \delta - \left( \frac{N}{4} - \delta \right) = 2\delta \text{ ergibt. Im Gleichgewicht sieht dieser}$$

Unterschied wie folgt aus:

$$N_{\alpha\alpha} - N_{\alpha\beta} = N_{\beta\alpha} - N_{\beta\beta} = \frac{N}{4} + 4\delta - \left( \frac{N}{4} \right) = 4\delta$$

Für  $S$  ergibt sich also aus der Niveau-Besetzung nach Relaxation über den Pfad  $\beta\beta \rightarrow \alpha\alpha$  (Doppelquantenübergang) und dem Gleichgewichtszustand eine Differenz von  $2\delta$ , was einer Signalverstärkung für  $S$  entspricht. Für die Relaxation  $\beta\alpha \rightarrow \alpha\beta$  (Nullquantenübergang) bedeutet dies mit einer Differenz von  $-2\delta$  demzufolge eine Intensitätsabnahme des Signals von  $S$ . Über welchen der beiden gezeigten Pfade die Relaxation stattfindet, hängt von der Korrelationszeit  $\tau_c$  der Spins und der Larmorfrequenz  $\omega$ , d. h. dem Magnetfeld  $B_0$  ab, in dem sich beide Spins befinden. Die Energiedifferenz für den Doppelquantenübergang entspricht genau der Summe der beiden Einquantenübergänge, während  $\Delta E$  für den Nullquantenübergang sehr viel kleiner bzw. im vorliegenden Falle annähernd Null ist. Ein Übergang ist nun dann besonders wahrscheinlich, wenn die reziproke Korrelationszeit  $\tau_c^{-1}$  ungefähr der Frequenz dieses Übergangs entspricht, d. h. für kleine Moleküle mit großer Beweglichkeit und kleinen Korrelationszeiten gilt  $W_{2IS} \gg W_{0IS}$ , während für große Moleküle mit großen Korrelationszeiten  $W_{0IS} \gg W_{2IS}$  gilt. Die im homonuklearen Fall maximal mögliche NOE-Verstärkung  $\eta_{max}$  in Abhängigkeit von  $\omega\tau_c$  lässt sich graphisch folgendermaßen darstellen:

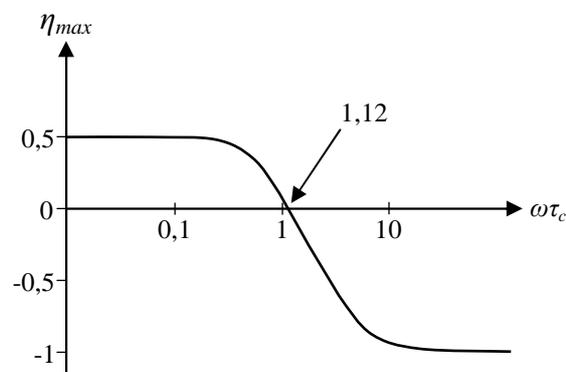


Abb. 2.9: Maximale NOE-Verstärkung in Abhängigkeit von  $\tau_c$  bzw.  $\omega$  (nach [11])

Für den Fall, daß  $\omega\tau_c \ll 1$  nimmt  $\eta_{max}$  einen maximalen Wert von 0,5 an, für den entgegengesetzten Fall  $\omega\tau_c \gg 1$  wird  $\eta_{max}$  -1. Der Bereich für  $\omega\tau_c \ll 1$  wird auch als das „Extreme Narrowing Limit“ bezeichnet. Hier berechnet sich  $\eta_{max}$  allgemein nach  $\eta_{max} = \frac{\gamma_S}{2\gamma_I}$ .

Mathematisch lässt sich der NOE über die Solomon-Gleichung beschreiben, die für den hier gezeigten Fall, also die Sättigung des Spins  $I$ , wie folgt aussieht:

$$\frac{dS_z}{dt} = (S_z^0 - S_z)(W_{0IS} + 2W_{1S} + W_{2IS}) + (I_z^0 - I_z)(W_{2IS} - W_{0IS}) \quad (2.10)$$

Der Term  $W_{0IS} + 2W_{1S} + W_{2IS}$  stellt hierbei die Autorelaxationsrate  $\rho$  des Spins  $S$  und  $W_{2IS} - W_{0IS}$  die Kreuzrelaxationsrate  $\sigma$  der Spins  $I$  und  $S$  dar.  $\sigma$  hängt, neben der Korrelationszeit auch vom Abstand  $r$  der beiden Spins ab, wobei die sich daraus ergebende NOE-Verstärkung proportional zu  $r^{-6}$  ist. Diese NOE-Verstärkung wird in Gleichung 2.10 durch den Summanden  $(I_z^0 - I_z)(W_{2IS} - W_{0IS})$  beschrieben und wird negativ, wenn  $W_{0IS} \gg W_{2IS}$  bzw. positiv, wenn  $W_{2IS} \gg W_{0IS}$  und Null, wenn  $W_{2IS} = W_{0IS}$  (bei  $\omega\tau_c = 1,12$ ). So lässt sich das bereits graphisch Dargestellte auch mathematisch zeigen.

Die Puls-Sequenz für ein gradienten-selektiertes (gs) 2D-NOESY-Experiment ist in Abb. 2.10 gezeigt. Die Störung der Gleichgewichtsbesetzung wird hier über die Pulsfolge  $90^\circ-t_1-90^\circ$  realisiert, was einer Invertierung der zu  $I$  bzw.  $S$  gehörenden Energie-Niveaus nach der Zeit  $t_1$  entspricht.  $\tau_M$  ist dabei die Zeit, innerhalb der sich die NOEs während des Experiments entwickeln. Diese sog. Mischzeit sollte im Bereich  $\ln 2 \cdot T_1$  für die interessierenden Protonen liegen. Durch die beiden Gradienten und den  $180^\circ$ -Puls während der Mischzeit  $\tau_M$  werden Artefakte, d. h. nicht erwünschte Restmagnetisierung in der  $xy$ -Ebene, beseitigt.

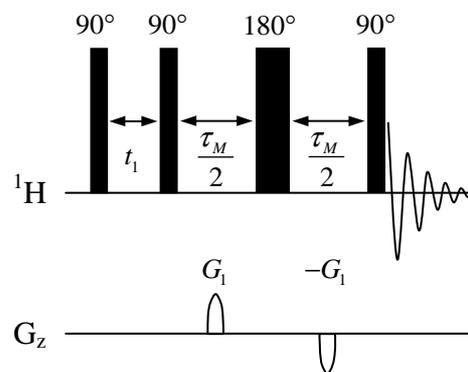


Abb. 2.10: Pulssequenz eines zweidimensionalen gs-NOESY-Experiments

Die NOEs erscheinen im Experiment als Kreuzpeaks zwischen Protonen, die einen Abstand von max. 4 Å zueinander besitzen. Da diese Kreuzsignale jedoch auch durch Austauschprozesse oder skalare Kopplung (COSY-Peaks) entstehen können, ist das NOESY-Experiment phasensensitiv durchzuführen. Positive NOEs besitzen dann die entgegengesetzte Phase zu COSY- bzw. Austauschpeaks.

### *Zwei-Spin-Approximation*

Bei Kenntnis des zwischen zwei Spins auftretenden NOEs ( $NOE_{ref}$ ) und dem dazugehörigen Abstand ( $r_{ref}$ ) läßt sich aus einem zweiten NOE ( $NOE_{IS}$ ) ein unbekannter Abstand ( $r_{IS}$ ) nach der Zweispin-Approximation (Gleichung 2.11) bestimmen. Die zum Referenzabstand gehörenden Spins sollen dabei nicht stark miteinander koppeln oder sich in einem flexiblen Teil des Moleküls befinden, was andernfalls zu einer fehlerhaften Kalibrierung der NOE-Intensität führt. Desweiteren führen die bei NOESY-Experimenten üblichen Mischzeiten ( $\tau_M > 50$  ms) bei dieser Methode, bedingt durch Spindiffusion oder Relaxationsprozesse, häufig zu falschen Abständen. Um diese Effekte zu minimieren, sollte für Abstandsbestimmungen bei kleinen Mischzeiten gearbeitet werden, wobei diese wiederum von den mittleren Korrelationszeiten im untersuchten Systems abhängig sind<sup>[11]</sup>.

$$\frac{NOE_{IS}}{NOE_{ref}} = \left( \frac{r_{IS}}{r_{ref}} \right)^{-6} \rightarrow r_{IS} = r_{ref} \cdot \sqrt[6]{\left( \frac{NOE_{ref}}{NOE_{IS}} \right)} \quad (2.11)$$

## 2.2 H,H-CORRELATION SPECTROSCOPY (H,H-COSY)

Die H,H-COSY<sup>[16]</sup> (Abb. 2.11) stellt die wohl einfachste 2D-NMR-Methode dar. Mit ihr lassen sich skalar miteinander koppelnde Protonen in einem 2D-Spektrum darstellen, d. h. im Spektrum ergeben diejenigen Spinpaare einen Kreuzpeak, die eine  ${}^n J_{H,H}$ -Kopplung aufweisen (wobei  $2 \leq n \leq 5$ ). Im allgemeinen werden nur die großen  ${}^2 J_{H,H}$ - und  ${}^3 J_{H,H}$ -Kopplungen beobachtet. Weitreichendere Kopplungen werden nur selten ohne Abänderung der gezeigten Pulssequenz dargestellt.

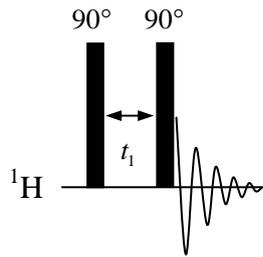


Abb. 2.11: Pulssequenz eines H,H-COSY-Experiments

Eine Variante des o. g. Experiments stellt die Doppelquanten-gefilterte (engl.: Double Quantum Filtered, DQF) COSY dar. Da hier sowohl Diagonal- als auch Kreuzpeaks rein absorptive Signale ergeben, liefert sie Spektren, die besser phasen-korrigiert werden können als die der konventionellen COSY. Desweiteren kann Doppelquantenkohärenz nur dann entstehen, wenn eine Kopplung zwischen zwei Spins existiert, sodaß Signale, die nicht diesen Ursprungs sind (z. B. Singulets), herausgefiltert werden.

## 2.3 HETERONUCLEAR SINGLE QUANTUM COHERENCE (HSQC)

### Allgemeines

Beim Heteronuclear Single Quantum Coherence (auch: Correlation) (HSQC)-Experiment werden Protonen mit Heteroatomen (hier:  $^{13}\text{C}$ ) korreliert<sup>[17]</sup>. Zwischen einem Kern I und einem Heterokern S entsteht im Spektrum genau dann ein Peak, wenn diese über eine  $^1J_{I,S}$ -Kopplung miteinander wechselwirken, d. h. mit der HSQC lassen sich beispielsweise die Bindungspartner einer C-H-Bindung identifizieren. Die Pulssequenz des Experiments ist in Abb. 2.12 gezeigt.

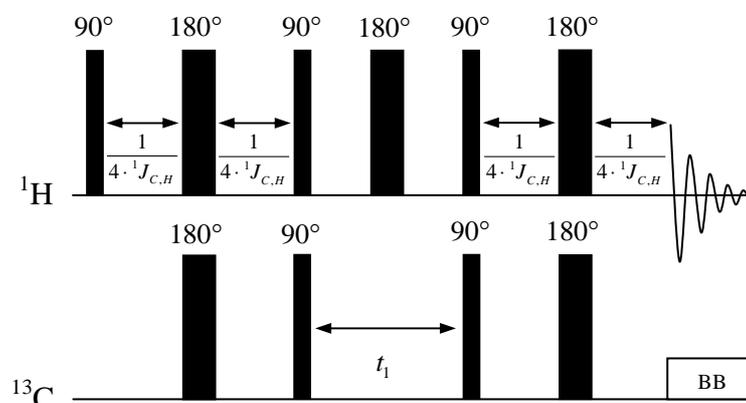


Abb. 2.12: Pulssequenz eines HSQC-Experiments

Es zählt zu den inversen heteronuklearen NMR-Methoden, d. h. die Detektion findet auf dem Protonenkanal und nicht, wie bei konventionellen heteronuklearen Experimenten üblich, auf dem  $^{13}\text{C}$ -Kanal statt. Die Magnetisierung wird über einen INEPT-Transfer (siehe nächstes Kapitel) vom Proton auf den Heterokern übertragen. Die chemische Verschiebung dieses Kerns entwickelt sich dann während  $t_1$  und anschließend wird die Magnetisierung über einen zweiten INEPT-Transfer wieder auf das Proton zurückübertragen. Die Detektion findet schließlich unter  $^{13}\text{C}$ -Breibandentkopplung (BB) auf dem  $^1\text{H}$ -Kanal statt. Diese Vorgehensweise hat einen enormen Gewinn an Empfindlichkeit zur Folge (Tab. 2.1).

*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer (INEPT)*

Unter einem INEPT-Transfer versteht man die meist über die skalare  $^1J_{X,H}$ -Kopplung vermittelte Kohärenz-Übertragung in einem heteronuklearen System (üblicherweise gilt:  $X = ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ ). Mit diesem Transfer ist eine Verstärkung der Signalintensität des unempfindlicheren Heterokerns verbunden. Die dabei maximal mögliche Steigerung der Empfindlichkeit und die Verstärkungsfaktoren sind in Tab. 2.1 gezeigt und können durch die Art der Detektion (direkt oder invers) nochmals erhöht werden.

Tab. 2.1: Vergleich der Empfindlichkeiten von heteronuklearen NMR-Experimenten in Abhängigkeit von der Art der Anregung und Detektion (aus [18])

Experiment	S/N	Vergleichsfaktor	$^{13}\text{C}$	$^{15}\text{N}$
<b>a) Direkte Observation</b>	$\gamma_X (\gamma_X)^{3/2}$		1.0	1.0
<b>b) INEPT</b> verglichen mit a)	$\gamma_H (\gamma_X)^{3/2}$	$(\gamma_H / \gamma_X)$	4.0	9.9
<b>c) Inverses INEPT</b> verglichen mit a) verglichen mit b)	$\gamma_X (\gamma_H)^{3/2}$	$(\gamma_H / \gamma_X)^{3/2}$ $(\gamma_H / \gamma_X)^{1/2}$	7.9 2.0	31.0 3.1
<b>d) Inverse Verschiebungskorrelation</b> verglichen mit a) verglichen mit b)	$\gamma_H (\gamma_H)^{3/2}$	$(\gamma_H / \gamma_X)^{5/2}$ $(\gamma_H / \gamma_X)^{3/2}$	31.6 7.9	306.0 31.0

## 2.4 HETERONUCLEAR MULTIPLE BOND CORRELATION (HMBC)

Beim Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC)-Experiment<sup>[19]-[23]</sup> werden Protonen mit Heteroatomen (hier:  $^{13}\text{C}$ ) korreliert. Zwischen einem Kern I und einem Heterokern S entsteht im Spektrum genau dann ein Peak, wenn diese über eine  $^2J_{I,S}$ - oder  $^3J_{I,S}$ -Kopplung miteinander wechselwirken. Die Pulssequenz des gs-HMBC-Experiments ist in Abb. 2.13 gezeigt. Um Signale einer  $^1J_{I,S}$ -Kopplung zu unterdrücken, fungiert der zweite  $^{13}\text{C}$ -Puls als Filter.

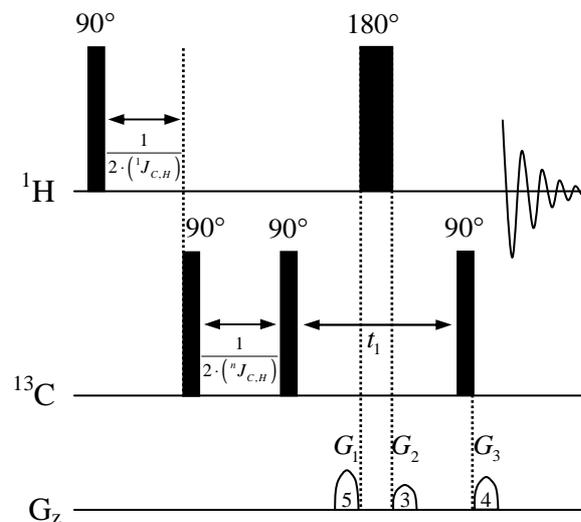


Abb. 2.13: Pulssequenz eines gs-HMBC-Experiments

Da dieser allerdings nicht alle unerwünschten Signale gleich gut unterdrückt, wird das HMBC-Experiment üblicherweise ohne  $^{13}\text{C}$ -Entkopplung durchgeführt, sodaß diese Signale als Dubletts im Spektrum erscheinen und somit von den eigentlichen HMBC-Signalen unterschieden werden können.

### 3 Spezielle NMR-Methoden

#### 3.1 DIPOLARE RESTKOPPLUNG (RDC) UND DAS CLIP-HSQC-EXPERIMENT

##### *Theorie*

Die dipolare oder direkte Kopplung zweier Spin-1/2-Kerne I und S lässt sich mathematisch folgendermaßen darstellen<sup>[24]</sup>

$$D_{IS} = -\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right) \frac{\gamma_I \gamma_S h}{2\pi^2 \langle r_{IS}^3 \rangle} \left\langle \frac{3\cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle \quad (2.12)$$

wobei  $\mu_0$  die magnetische Feldkonstante,  $\gamma_I$  bzw.  $\gamma_S$  das gyromagnetische Verhältnis des Kerns I bzw. S,  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum,  $r_{IS}$  der Abstand der beiden betrachteten Kerne und  $\theta$  der Winkel zwischen dem äußeren Magnetfeld  $B_0$  und dem internuklearen Vektor sind (Abb. 2.14). Die eckigen Klammern stellen einen Kollektivmittelwert dar, also einen Wert der sich aus der Mittelung aller in Lösung vorherrschenden molekularen Bewegungen ergibt.

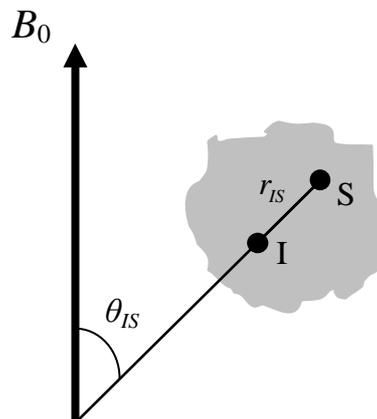


Abb. 2.14: Beschreibung der in Gleichung 2.12 verwendeten Variablen

In Flüssigkeiten sind dipolare Wechselwirkungen magnetischer Kerne nur indirekt über Kreuzrelaxationsprozesse als NOE messbar, da sich der Term  $\langle 3\cos^2 \theta - 1 \rangle$  durch die Molekülbewegungen zu Null mittelt und  $D_{IS}$  demzufolge ebenfalls diesen Wert annimmt. Wenn es allerdings gelingt, die gelösten Moleküle auszurichten, wird  $D_{IS}$  messbar. Da die

direkte Kopplung sehr viel größer als die skalare Kopplung ist, muß beachtet werden, daß die Anzahl der ausgerichteten Moleküle nicht zu groß werden darf, da ansonsten die Auflösung der NMR-Spektren abnimmt. Für die Bestimmung der RDC-Werte kommen verschiedene Ausrichtungsmedien (alignment media) in Frage<sup>[25]</sup>.

Anders als in Festkörpern ist für partiell orientierte Moleküle die Gleichung 2.12, aufgrund der unbekanntenen Molekülorientierung im Magnetfeld, unbrauchbar. Um dennoch eine Auswertung zu ermöglichen, wird ein willkürliches Koordinatensystem ( $M_x$ ,  $M_y$ ,  $M_z$  in Abb. 2.15) gewählt, in dem die Lage des internuklearen Vektors zweier Spins (hier: C-H) durch die Winkel  $\phi_x$ ,  $\phi_y$  und  $\phi_z$  beschrieben werden kann.

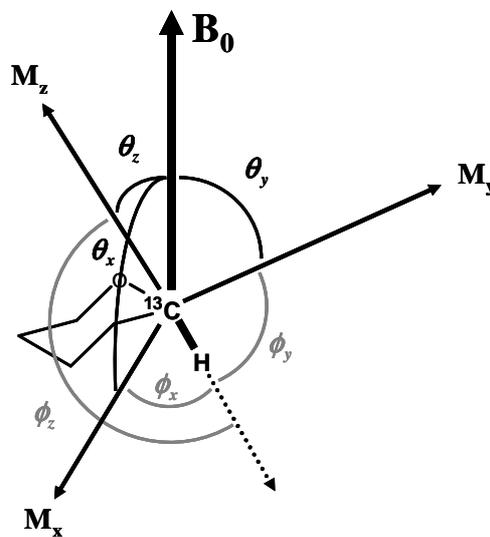


Abb. 2.15: Orientierung des willkürlich gewählten Molekülkoordinatensystems im Magnetfeld  $B_0$  (aus [26])

Die Orientierung dieses Koordinatensystems im äußeren Magnetfeld ( $B_0$ ) wird nun durch Berechnen einer Orientierungsmatrix  $S_{kl}$  bestimmt<sup>[27]</sup>. Gleichung 2.12 wird dazu in Matrixform neu formuliert<sup>[28]</sup>, was zu Gleichung 2.13 führt.

$$D_{IS} = \frac{D_{\max IS}}{r_{IS}^3} \sum_{k,l} S_{kl} \cos \phi_k \cos \phi_l \quad (2.13)$$

(mit  $D_{\max IS}$  ... maximal möglicher  $D_{IS}$ -Wert bei einem Kernabstand  $r_{IS}$  von 1 Å und

Orientierung des internuklearen Vektors entlang  $B_0$ ;  $k, l \dots x, y, z$ ;  $S_{kl} = \begin{bmatrix} S_{xx} & S_{yx} & S_{zx} \\ S_{xy} & S_{yy} & S_{zy} \\ S_{xz} & S_{yz} & S_{zz} \end{bmatrix}$  und

$\phi_k, \phi_l$ ...Winkel zwischen dem internuklearen Vektor und der  $k$ - bzw.  $l$ -Achse des willkürlich gewählten Koordinatensystem (Abb. 2.15))

Die einzelnen Elemente der Orientierungsmatrix  $S_{kl}$  sind gegeben durch

$$S_{kl} = \left\langle \frac{3 \cos \theta_k \cos \theta_l - \delta_{kl}}{2} \right\rangle \quad (2.14)$$

(mit  $k, l \dots x, y, z$ ;  $\theta_k, \theta_l \dots$  Winkel zwischen der  $k$ - bzw.  $l$ -Achse des willkürlich gewählten Koordinatensystems und dem  $B_0$ -Feld;  $\delta_{kl} \dots 0$  für  $k \neq l$ ,  $1$  für  $k = l$  (Kronecker-Delta))

Da die Orientierungsmatrix symmetrisch und die Summe ihrer Diagonalelemente Null ist, besitzt diese für jeden  $D_{IS}$ -Wert nur fünf unabhängige Elemente. Bei Kenntnis von wenigstens fünf linear unabhängigen  $D_{IS}$ -Werten läßt sich das resultierende Gleichungssystem lösen und die Elemente der Orientierungsmatrix sind somit bestimmbar. Für zusätzliche strukturelle Informationen werden mindestens sechs unabhängige  $D_{IS}$ -Werte benötigt.

Die Richtigkeit einer zuvor berechneten Struktur wird nun durch Vergleichen der experimentellen mit den aus dieser Struktur und besagter Orientierungsmatrix erhaltenen RDC-Werte bestimmt. Die Berechnung ist als korrekt zu bewerten, wenn alle Werte in einem zuvor festgelegten Fehlerbereich liegen. Bei flexiblen Molekülen werden die experimentellen  $D_{IS}$ -Werte über alle in Lösung auftretenden Konformationen gemittelt, sodaß diese bei der Berechnung berücksichtigt werden müssen. Moderne Programme zur Auswertung von  $D_{IS}$ -Werten (z. B. REDCAT<sup>[29]</sup>) erlauben eine Berücksichtigung<sup>[29]</sup> von intramolekularer Moleküldynamik.

### *Messen von RDC-Werten*

Die für die Strukturanalyse kleiner Moleküle wichtigsten RDC-Werte stellen die dipolaren  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten über eine Bindung ( $^1D_{IS}$ ) dar. Diese lassen sich am einfachsten über gekoppelte HSQC-Experimente bestimmen, wobei es die Möglichkeit der  $F_1$ - und  $F_2$ -Kopplung gibt. Beim  $F_1$ -gekoppelten HSQC-Experiment wurde der  $180^\circ$ -Refokussierungspuls auf dem  $^1\text{H}$ -Kanal entfernt, was dazu führt, daß die C-H-Kopplung durch Aufspaltung der Peaks in  $F_1$ -Richtung sichtbar wird. Beim  $F_2$ -gekoppelten HSQC-Experiment wurde die Entkoppler-Sequenz auf dem  $^{13}\text{C}$ -Kanal während der Aufnahme

entfernt, was zur Aufspaltung der Peaks in F<sub>2</sub>-Richtung durch die C-H-Kopplung führt. Beim konventionellen HSQC-Experiment ist während der Aufnahme Antiphase-Magnetisierung vorhanden, die zu einer Verzerrung der Peaks führt. Dies lässt sich mittels Produkt-Operator-Formalismus (POF)<sup>[30], [31]</sup> am einfachsten zeigen. Die in Abb. 2.16 gezeigte Gleichung beschreibt die Entwicklung des Spinsystems während des im Pulsprogramm rot eingetragenen Zeitraums ( $\Delta = \frac{1}{2 \cdot {}^1J_{C,H}}$ ).

$$2I_z S_x \sin(\pi J \Delta) \exp(i\omega t_1) \rightarrow I_x \sin(\pi J \Delta) \exp(i\omega t_1) \sin(\pi J \Delta) + 2I_y S_z \sin(\pi J \Delta) \exp(i\omega t_1) \cos(\pi J \Delta)$$

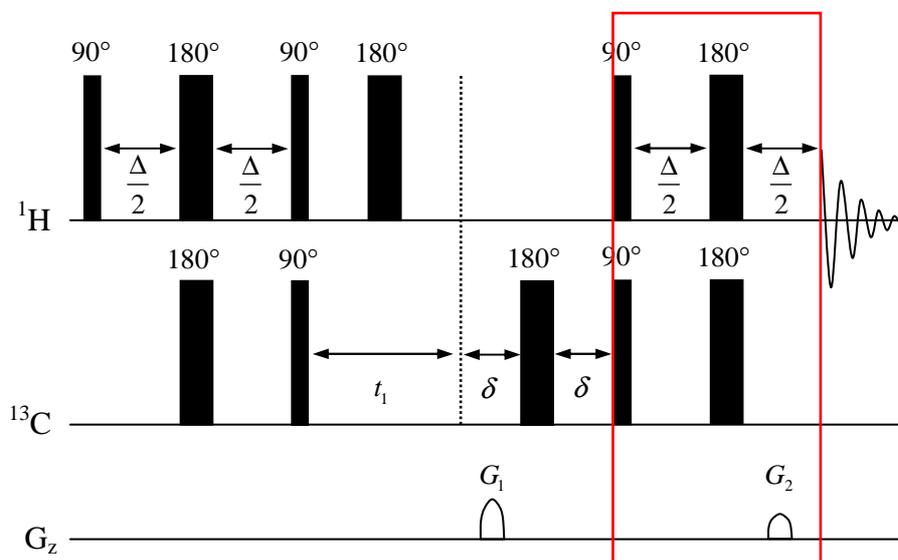


Abb. 2.16: POF-Beschreibung und Pulssequenz des HSQC-Experiments (aus [32])

Der rote markierte Teil der Gleichung stellt die Antiphase-Magnetisierung dar, die während der Spektren-Aufnahme vorliegt. Luy *et al.*<sup>[32]</sup> zeigten u. a., daß die Einführung eines 90°-Pulses auf dem <sup>13</sup>C-Kanal (roter Puls in Abb. 2.17) direkt vor der Akquisition dazu führt, daß dieser Antiphase-Anteil in Doppelquantenkohärenz umgewandelt wird und nun nicht mehr meßbar ist (POF-Gleichung in Abb. 2.17). Das Resultat stellt das sog. clean in-phase (CLIP)-HSQC-Experiment dar, das in dieser Arbeit ebenfalls eingesetzt wurde. Aus den so aufgenommen Spektren erhält man dann für den isotropen Fall die skalare Kopplung  ${}^1J_{C,H}$  und für den anisotropen Fall die Summe aus skalarer und dipolarer Kopplung  ${}^1J_{C,H} + {}^1D_{C,H}$ . Die Differenz beider Spektren ergibt den Wert für die dipolare Kopplung  ${}^1D_{C,H}$ .

$$2I_z S_x \sin(\pi J \Delta) \exp(i\omega t_1) \rightarrow I_x \sin(\pi J \Delta) \exp(i\omega t_1) \sin(\pi J \Delta) + 2I_y S_z \sin(\pi J \Delta) \exp(i\omega t_1) \cos(\pi J \Delta)$$

$$\xrightarrow{90_x^{13C}} I_x \sin(\pi J \Delta) \exp(i\omega t_1) \sin(\pi J \Delta) + 2I_y S_y \sin(\pi J \Delta) \exp(i\omega t_1) \cos(\pi J \Delta)$$

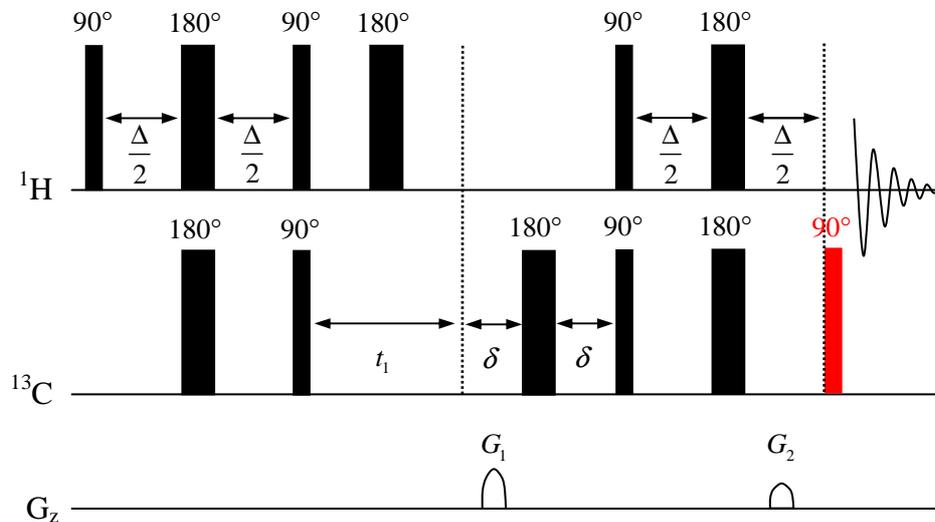


Abb. 2.17: POF-Beschreibung und Pulssequenz des CLIP-HSQC-Experiments (aus [32])

### 3.2 TRANSFERRED NOESY (TR-NOESY)

Beim Tr-NOESY-Experiment<sup>[26], [33]-[35]</sup> handelt es sich um eine NMR-spektroskopische Methode zur Ermittlung der Struktur eines Substrats im protein-gebundenen Zustand über den Nuclear Overhauser Effect (siehe Kap. 2.1.2.1). Dabei werden, wie beim Standard-NOESY-Experiment, sich räumlich nahe liegende Protonen als Kreuzpeaks im Spektrum sichtbar. Das Tr-NOESY-Experiment wird mit derselben Pulssequenz wie die NOESY durchgeführt, die allerdings auf ein Protein(P)/Substrat(S)-System angewandt wird, das eine dynamische Austauschreaktion  $P + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} PS$  vollzieht. Das untersuchte System muß hierzu über den gesamten Zeitraum der Messung stabil sein, d. h. unverändert vorliegen. Enzymatische Untersuchungen bei denen das Substrat unter Bildung neuer Produkte reagiert, sind für die Tr-NOESY nicht geeignet. Der Ligand liegt dabei im Überschuß vor und die Tr-NOEs werden, für den Fall, daß o. g. Austauschprozess schnell bezogen auf den Kreuzrelaxationsprozess abläuft, als Änderung der Intensitäten der Signale des freien Substrats detektiert. Für große Moleküle, die eine langsame Bewegung in Lösung ausführen, wird, wie in Kap. 2.1.2.1 gezeigt, der Nullquantenübergang favorisiert, sodaß die resultierenden NOEs negativ sind, bzw. die gleiche Phase wie die Diagonal-Peaks besitzen.

Dadurch läßt sich auf einfache Art und Weise visualisieren, ob eine Bindung zwischen Substrat und Protein stattfindet. Die Basis für die Tr-NOESY bildet die Tatsache, daß die Kreuzrelaxationsrate für große Moleküle mit langen Korrelationszeiten sehr viel größer ist, als die für kleine Moleküle. Falls also das Substrat an das Protein bindet, werden die gemessenen NOEs von der Kreuzrelaxationsrate im gebundenen Zustand ( $\sigma_B$ ) dominiert, die gemittelte detektierbare Kreuzrelaxationsrate  $\langle\sigma\rangle$  berechnet sich dann zu:

$$\langle\sigma\rangle = X_F\sigma_F + X_B\sigma_B \quad (2.15)$$

(mit  $X_F$ ...Anteil an freiem Substrat,  $X_B$ ...Anteil an gebundenem Substrat,  $\sigma_F$ ...Kreuzrelaxationsrate in freiem Zustand,  $\sigma_B$ ...Kreuzrelaxationsrate in gebundenem Zustand)

Die Bedingung  $X_F\sigma_F \ll X_B\sigma_B$ , die für ein erfolgreiches Tr-NOESY-Experiment erfüllt sein muß, hängt im allgemeinen von den Korrelationszeiten im freien und gebundenen Zustand, dem Abstand der beobachteten Kerne und der Gleichgewichtskonstanten  $K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[PS]}{[P][S]}$  der o. g. Austauschreaktion ab. Falls die Bindung zwischen Protein und Substrat zu schwach ist, wird  $X_B$  zu klein und der Tr-NOE verschwindet. Der kleinste benötigte Wert für  $K$  hängt dabei von  $\sigma_B$  und  $\sigma_F$  ab und variiert in Abhängigkeit vom untersuchten System. Auf der anderen Seite darf die PS-Bindung auch nicht zu stark sein, da der Tr-NOE von der Austauschrate zwischen freiem und gebundenem Zustand abhängt, sodaß zusätzlich noch die Bedingung  $k_{-1} \gg \sigma_B$  erfüllt sein muß. Da nun einerseits der Komplex stabil genug sein muß, andererseits aber nicht zu stabil sein darf, ist die Tr-NOESY nur in einem bestimmten Bereich für  $k_{-1}$  anwendbar, der wiederum vom Protein/Substrat-Verhältnis abhängt.

### 3.3 SATURATION TRANSFER DIFFERENCE (STD)

Das STD-Experiment<sup>0</sup> ist eine NMR-spektroskopische Methode zur Ermittlung der relativen räumlichen Anordnung eines Substrats im protein-gebundenen Zustand, dem so genannten Bindungsepitop. Dabei werden die dem Protein am nächsten liegenden Substrat-Protonen über einen Sättigungstransfer vom Protein auf das Substrat ermittelt. Wie beim Tr-NOESY-Experiment darf auch hier keine enzymatische Reaktion durch das Protein induziert werden, die eine Umwandlung des Substrats zur Folge hat. Des Weiteren darf der

bei der ablaufenden Gleichgewichtsreaktion  $P + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} PS$  gebildete Protein/Substrat-Komplex ( $PS$ ) nicht zu stabil sein, d. h. der Grad der Sättigung hängt von  $k_{-1}$  ab, da ansonsten schnell alle Bindungsstellen am Protein abgesättigt sind und dementsprechend die Anzahl der während der Resonanz-Sättigung gebundenen Substrat-Moleküle zu gering ist. Der ohnehin schon geringe Intensitätsunterschied der Substratsignale im gebundenen bzw. freien Zustand würde noch kleiner werden bzw. verschwinden. Das Protein:Substrat-Verhältnis beim STD-Experiment liegt üblicherweise im Bereich 1:100 bis max. 1:50. Die Pulssequenz des 1D- $^1\text{H}$ -STD-Experiments ist in Abb. 2.18 gezeigt.

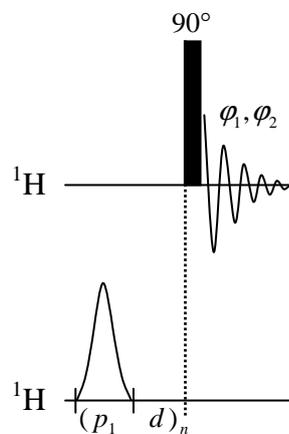


Abb. 2.18: Pulssequenz des 1D- $^1\text{H}$ -STD-Experiments

Es wird mittels mehrerer selektiver Pulse  $p_1$  die Sättigung des Signals am Protein gebundener Protonen erreicht. Durch Spindiffusion breitet sich diese Sättigung während der Pulsdauer, die üblicherweise 1 bis 3 s beträgt, über das gesamte Protein aus. Während dieser Zeit an das Protein bindende Substrate können nun einen Teil dieser Sättigung durch dipolare Wechselwirkungen übernehmen, wobei diejenigen Substrat-Protonen die größte Sättigung erfahren, die dem Protein im gebundenen Zustand am nächsten liegen. Die Differenz der Spektren, die sich aus ungesättigten und gesättigten Protein ergeben, führt zu einem Spektrum, in dem nur Substrat-Protonen mit im gebundenen Zustand geringerer Signalintensität erscheinen (Abb. 2.19). Für diese Differenzbildung werden zwei sich abwechselnde STD-Experimente an ein und derselben Probe, bestehend aus Substrat und Protein, durchgeführt. Im ersten Experiment wird eine Sättigung des Proteins durch entsprechendes Einstellen des selektiven (On-Resonanz) Pulses realisiert. Im zweiten Experiment wird dieser Puls in einen Bereich des Spektrums verschoben, in dem sich weder Protein-, noch Substrat-Protonen befinden (Off-Resonanz-Bereich), wodurch eine Sättigung

des Proteins ausgeschlossen ist. Die Differenz des Off- und On-Resonanz-Spektrums wird schließlich mittels zweier um  $180^\circ$  versetzter Phasenzyklen realisiert. Die sich ergebenden absoluten Intensitäten der STD-Signale hängen dabei u. a. von der Sättigungsdauer und der Konzentration des Substrats bzw. Proteins ab, während die relativen Signalintensitäten das Bindungsverhalten des Substrats am Protein widerspiegeln (Abb. 2.19).

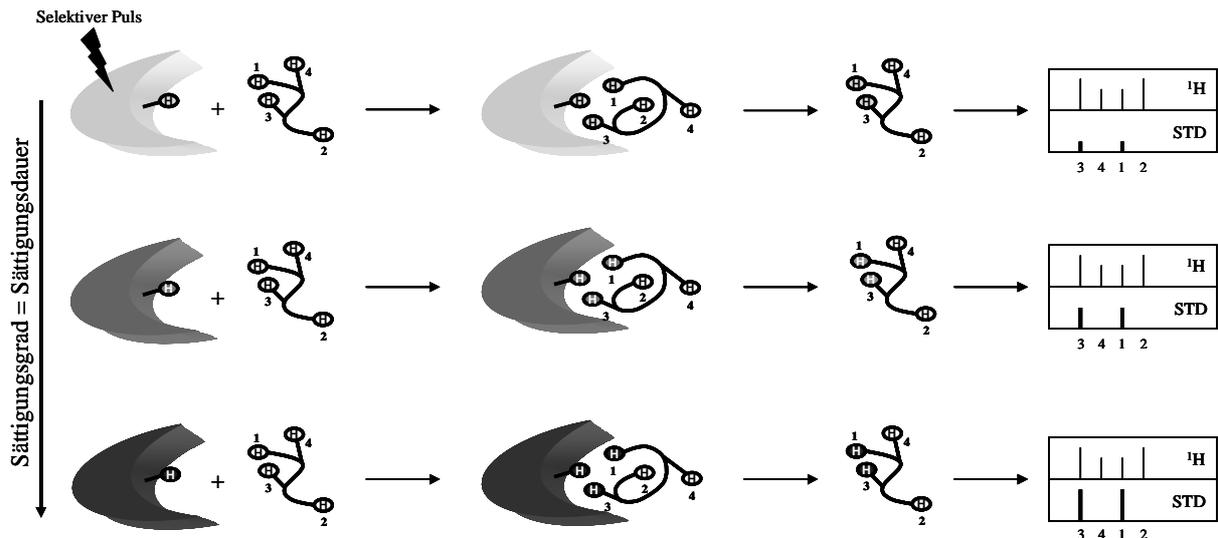


Abb. 2.19: Schematische Beschreibung des STD-Experiments

### 3.4 DIFFUSION ORDERED NMR-SPECTROSCOPY (DOSY)

Die DOSY<sup>[36], [37]</sup> ist eine NMR-spektroskopische Methode, die zur Separation der Signalsätze der in einer Mischung vorliegenden Substanzen entwickelt wurde. Diese Methode wird daher häufig auch als chromatographische NMR-Spektroskopie bezeichnet. Die Auftrennung erfolgt dabei über die unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten ( $D$ ) der Einzelkomponenten im Gemisch. Für sphärische Partikel hängt  $D$  nach der Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 2.16) von der Temperatur ( $T$ ), der Viskosität des Gemisches ( $\eta$ ) und dem hydrodynamischen Radius ( $r_H$ ) des betrachteten Partikels ab:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r_H} \quad (2.16)$$

Zur Messung von DOSY-Spektren bedient man sich NMR-spektroskopischer Methoden mit gepulsten Feldgradienten (siehe Kap. 2.1.1). Die einfachste Puls-Sequenz, die für diesen Zweck eingesetzt wird, ist das Carr-Purcell-Spin-Echo (Abb. 2.20).

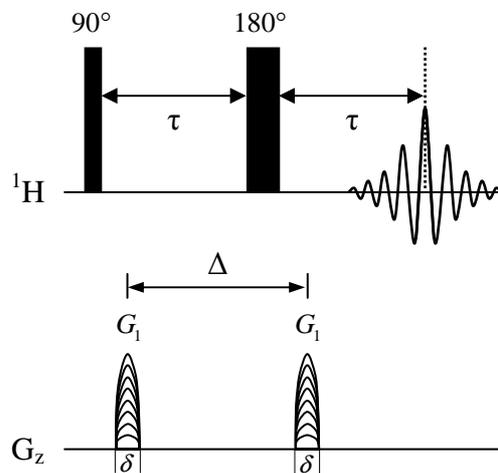


Abb. 2.20: Pulssequenz des Carr-Purcell-Spin-Echo-Experiments

Der  $90^\circ$ -Puls dreht den Magnetisierungsvektor  $M_0$  in die  $xy$ -Ebene, anschließend wird die Phasenkohärenz der Einzelspins durch einen Gradientenpuls in  $z$ -Richtung ( $G_1$ ) zerstört. Da es sich bei dem Gradienten um eine definierte lineare Störung des Magnetfeldes entlang der  $z$ -Achse handelt, addiert sich zum  $B_0$ -Feld also noch das ortsabhängige  $B$ -Feld des Gradienten, befinden sich die Spins innerhalb der Probe entsprechend ihrer Position entlang der  $z$ -Achse für die Dauer des angelegten Gradienten alle in einem anderen Magnetfeld. Dadurch besitzen sie unterschiedliche Larmor-Frequenzen, sodaß der Gradient eine Auffächerung der Spins mit Helix-Struktur in  $z$ -Richtung bewirkt (Abb. 2.4). Innerhalb der Zeitspanne  $\Delta$  (Diffusionszeit) findet, aufgrund der Selbstdiffusion der Moleküle, eine Bewegung der Spins statt. Der  $180^\circ$ -Puls innerhalb dieser Zeitspanne bewirkt die Invertierung aller Spins, sodaß der anschließend erneut angewendete  $z$ -Gradient  $G_1$  eine Refokussierung der vorher aufgefächerten Spins bewirkt. Fände während der Diffusionszeit  $\Delta$  keine Selbstdiffusion statt, würde sich die Wirkung der Pulsfolge  $G_1$ - $180^\circ$ - $G_1$  gerade gegenseitig aufheben und die Magnetisierung  $M$  bliebe erhalten. Da dies in Lösung nicht der Fall ist, nimmt  $M$  entsprechend der Größe der Diffusion und der Stärke des angewandten Gradienten ab.

Die Intensität  $I$  eines Signals ist dabei gegeben durch Gleichung 2.17:

$$I = I_0 \cdot e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\frac{\Delta - \delta}{3}\right)} \quad (2.17)$$

(mit  $D$ ...Diffusionskoeffizient;  $\gamma$ ...gyromagnetisches Verhältnis;  $g$ ...Gradientenstärke;  $\delta$ ...Gradientendauer und  $\Delta$ ...Diffusionszeit)

$\delta$  und  $\Delta$  werden vor dem jeweiligen Experiment optimiert und währenddessen konstant gehalten, sodaß in der o. g. Gleichung 2.17  $D$  die einzige Unbekannte darstellt. Führt man nun mehrere Experimente mit verschiedenen, meist linear ansteigenden Gradientenstärken durch und stellt die gemessenen Signalintensitäten (oder -flächen) gegen die Gradientenstärke graphisch dar, ergibt sich im Idealfall bei korrekt gewähltem  $\delta$  und  $\Delta$  der in Abb. 2.21 gezeigte Intensitätsverlauf. Ein Kurvenfit unter Zuhilfenahme der Gleichung 2.17 ergibt schließlich den Diffusionskoeffizienten  $D$ .

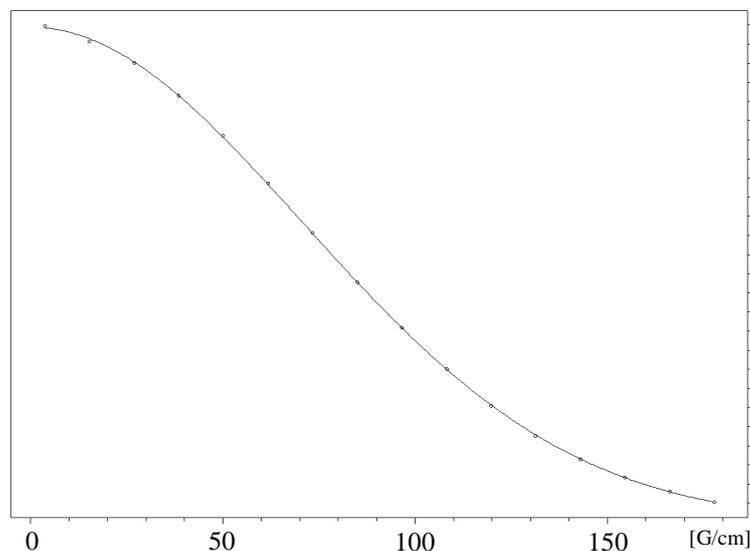


Abb. 2.21: Graphische Darstellung der Signalintensität mit steigender Gradientenstärke ( $g$ )

Führt man diese Prozedur für jedes im Spektrum vorhandene Signal durch und stellt die  $D$ -Werte gegen die chemische Verschiebung graphisch dar, wird das Ergebnis als DOSY-Spektrum bezeichnet. Zur Berechnung dieser Spektren kommen heutzutage verschiedene Algorithmen zum Einsatz, die in jeder gängigen NMR-Auswertesoftware

implementiert sind. Da die zweite Dimension dieser Spektren sich, anders als bei den üblichen 2D-NMR-Experimenten, nicht aus der Fourier-Transformation in  $F_1$ -Richtung ergibt, also keine chemische Verschiebung darstellt, sondern für jedes Signal nach der bereits gezeigten Methode extra berechnet werden muß, wird die DOSY auch als Pseudo-2D-NMR-Methode bezeichnet.

Um das Diffusionsverhalten größerer Moleküle studieren zu können, werden sehr starke Gradienten benötigt. Diese bewirken allerdings das Entstehen von Wirbelströmen (engl.: eddy currents) im Probenkopf, die wiederum eine Verzerrung der Signale nach sich ziehen. Zur Minimierung dieser Wirbelströme werden heutzutage Alternativen zur in Abb. 2.20 gezeigten Puls-Sequenz verwendet. Diese bedienen sich z. B. bipolarer Gradienten und beinhalten ein kurzes Delay, das das Abklingen dieser Wirbelströme vor der Akquisition erlaubt.

## Literaturverzeichnis

- [1] Meyer M., Maier, B., *Angew. Chem.* 111 (1999) 1902.
- [2] Clore, G. M., Gronenborn, A., *J. Magn. Reson.* 53 (1983), 423-442.
- [3] Bloch, F., *Phys. Rev.* 70 (1946), 460-474.
- [4] Purcell, E. M., Torrey, H. C., Pound, R. V., *Phys. Rev.* 69 (1946), 37.
- [5] Friebolin, H., *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 4. Auflage, 2006, Wiley VCH.
- [6] Zeeman, P., *Nature* 55 (1897), 347.
- [7] Lambert, J. B., Mazzola, E. P., *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2004, Pearson Education Inc.
- [8] Karplus, M., *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963), 2870-2871.
- [9] Karplus, M., *J. Chem. Phys.* 30 (1959), 11-15.
- [10] Claridge, T. D. W., *High Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition, 2009, Elsevier.
- [11] Neuhaus, D., Williamson, M. P., *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, 2. Edition, 2000, Wiley-VCH.
- [12] Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., Ernst, R. R., *J. Chem. Phys.* 71 (1979), 4546-4553.
- [13] States, D. J., Haberkorn, R. A., Ruben, D. J., *J. Magn. Reson.* 48 (1982), 286-292.
- [14] Bodenhausen, G., Kogler, H., Ernst, R. R., *J. Magn. Reson.* 58 (1984), 370-388.
- [15] Jacobsen, N. E., *NMR Spectroscopy Explained*, 2007, Wiley-VCH.
- [16] Aue, W. P., Bartholdi, E., Ernst, R. R., *J. Chem. Phys.* 64 (1975), 2229-2246.
- [17] Bodenhausen, G., Ruben, D. J., *Chem. Phys. Lett.* 69 (1980), 185-189.
- [18] Kessler, H., Gehrke, M., Griesinger, C., *Angew. Chem.* 100 (1988), 507-554.
- [19] Bax, A., Summers, M. F., *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986), 2093-2094.
- [20] Willker, W., Leibfritz, D., Kerssebaum, R., Bermel, W., *Magn. Reson. Chem.* 31 (1993), 287-292.
- [21] Ruiz-Cabello, J., Vuister, G. W., Moonen, C. T. W., van Gelderen, P., Cohen, J. S., van Zijl, P. C. M., *J. Magn. Reson.* 100 (1992), 282-302.
- [22] Araya-Maturana, R., Delgado-Castro, T., Cardona, W., Weiss-Lopez, B. E., *Current Organic Chemistry* 5 (2001), 253-263.
- [23] Reynolds, W. F., Enríquez, R. G., *J. Nat. Prod.* 65 (2002), 221-244.

- [24] J. A. Losonczy, M. Andrec, M. W. F. Fischer, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* 138 (1999), 334-342.
- [25] G. Kummerlöwe, B. Luy, *Annu. Rep. NMR Spectro.* 68 (2009), 193-230.
- [26] Jiménez-Barbero, J., Peters, T., *NMR Spectroscopy of Glycoconjugates*, 2003, Wiley-VCH.
- [27] Saupe, A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 7 (1968), 97.
- [28] Prestegard, J. H., Yi, X., "Structure and Dynamics of Carbohydrates using Residual Dipolar Couplings" in: *NMR Spectroscopy and Computer Modeling of Carbohydrates*, ACS Symposium Series 930 (ed. J. F. G. Vliegthart, R. J. Woods), 2006, 40-59, American Chemical Society and Oxford University Press.
- [29] Valafar, H., Prestegard, J. H., *J. Magn. Reson.* 167 (2004), 228-241.
- [30] Sørensen, O. W., Eich, G. W., Levitt, M. H., Bodenhausen, G., Ernst, R. R., *Prog. NMR Spectrosc.* 16 (1983), 163-192.
- [31] Ernst, R. R., Bodenhausen, G., Wokaun, A., *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, 1987, Oxford University Press.
- [32] A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, *J. Magn. Reson.* 2008, 192, 314-322.
- [33] Bothner-By, A. A., Gassend, R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 222 (1973), 608-614.
- [34] Albrand, J. P., Birdsall, B., Feeney, J., Roberts, G. C. K., *Int. J. Biol. Macromol.* 1 (1979), 37-41.
- [35] Clore, G. M., Gronenborn, A., *J. Magn. Reson.* 53 (1983), 423-442.
- [36] K.F. Morris, C.S. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 3139.
- [37] D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson, *J. Magn. Reson. A* 115 (1995) 260.