

Vorlesung  
„Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie-  
Grundlagen und Anwendungen in der  
Strukturaufklärung“  
Teil X

# Das Programm

## Beim letztes Mal

Das „dynamic range“ Problem

Proteine

HSQC

3D- und 4D-NMR

$^{15}\text{N}$ -editierte Spektren

Kopplungskonstanten mit dem HSQC

Screening mit NMR

# Das Programm

## Heute

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -Tripelresonanzspektren

Sequenzspezifische Zuordnung in Proteinen (3)

Deuterierung von Proteinen

TROSY

Strukturbestimmung von Proteinen

# Tripelresonanztechniken

## Tripelresonanztechniken

Wir haben gesehen, dass die homonuklearen Spektren NOESY und TOCSY mit Hilfe der heteronuklearen Techniken auf 3D-Spektren erweitert werden können um die Überlagerung zu reduzieren.

Die Strategie der sequentiellen Zuordnung hat sich dadurch aber nicht grundlegend geändert.

Es werden weiter NOESY und TOCSY verwendet, die bessere Auflösung in den 3D-Spektren ermöglicht die Zuordnung größerer Proteine.

## Tripelresonanztechniken

Wenn aber das TOCSY bzw. ein Transfer via Protonen-Kopplungen nicht mehr funktioniert oder sehr ineffizient wird, wie das bei größeren Proteinen der Fall ist, dann versagt die Strategie.

Die sequentielle und Seitenkettenzuordnung muss dann mit Techniken bewerkstelligt werden, die nicht mehr auf Protonen-Kopplungen basieren sondern auf den Kopplungen zwischen den Heterokernen.

## Tripelresonanztechniken

Heteronukleare 3D-NOESY-Spektren werden nur noch für das Bestimmen von Abständen im Molekül verwendet.

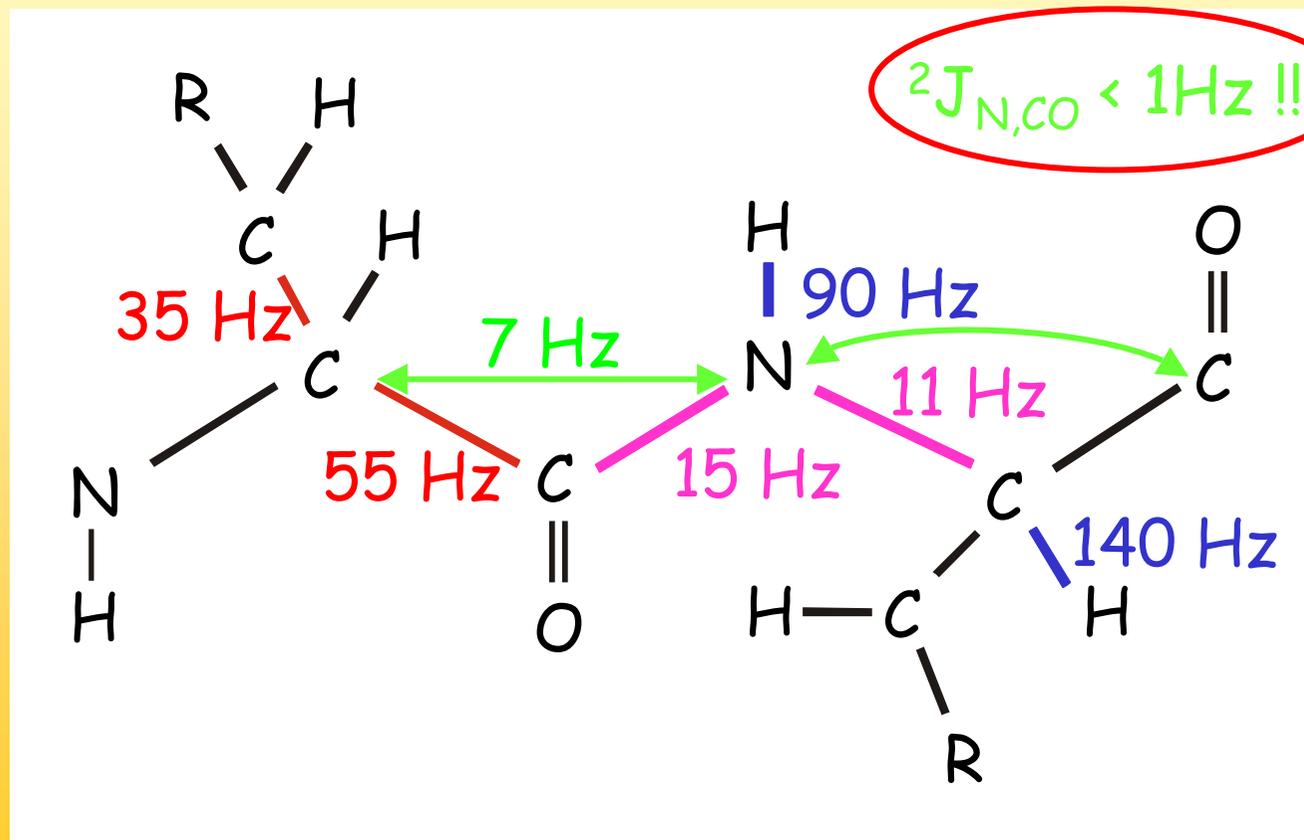
Der Transfer von Magnetisierung über heteronukleare Kopplungen ist auch bei größeren Proteinen noch effektiv.

Man verwendet dabei Proteine die sowohl an  $^{15}\text{N}$  als auch an  $^{13}\text{C}$  markiert sind und die Kopplungen zwischen diesen Kernen.

Da nun  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  verwendet werden spricht man von **Tripelresonanztechniken**

# Tripelresonanztechniken

## J-Kopplungen zwischen Heterokernen in Proteinen



## Tripelresonanztechniken

Wegen der Unterschiede zwischen den aliphatischen und den Carbonyl-Kohlenstoffen betrachtet man die beiden getrennt:

### 1. Chemische Verschiebung

$$\delta_{CO} \sim 170-180 \text{ ppm}$$

$$\delta_{C\alpha/\beta} \sim 10-70 \text{ ppm}$$

### 2. Kohlenstoff-Kohlenstoffkopplung

$$J(CO, C\alpha) \sim 55 \text{ Hz}$$

$$J(C, C) \sim 35 \text{ Hz}$$

### 3. Carbonyle haben keine Protonen gebunden

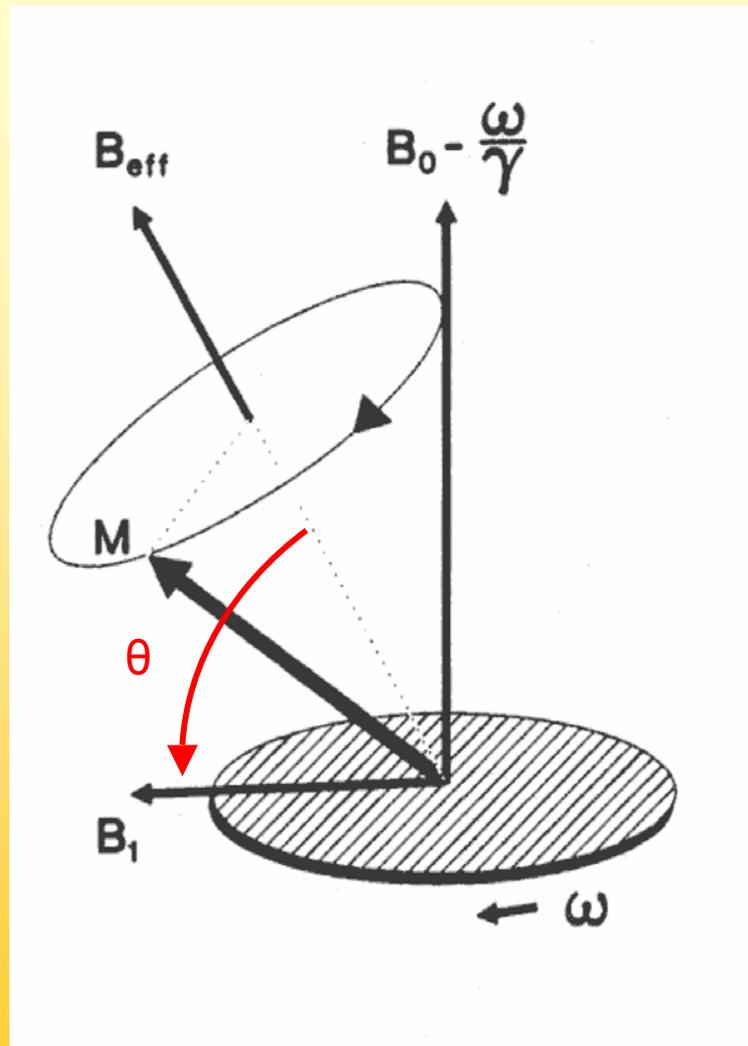
Die Carbonyle sind die „vierte“ Kernsorte

## Tripelresonanztechniken

Will man Carbonyle als vierte Kernsorte betrachten, dann muss man auch Pulse haben, die entweder die Carbonyle oder die aliphatischen Kerne treffen, aber nicht beide. Das kann durch selektiven Pulse mit ausgefeilten Pulsformen geschehen.

Oder mit einem simplen Trick, der darauf basiert, dass das Magnetfeld, das der Puls ausübt, durch „off-resonance“-Effekte größer wird

# Tripelresonanztechniken



$$B_{\text{eff}} = \sqrt{(B_1)^2 + (B_0 - \omega/\gamma)^2}$$

$$\gamma B_{\text{eff}} = \sqrt{(\gamma B_1)^2 + \Omega^2}$$

$$\tan \theta = \frac{(B_0 - \omega/\gamma)}{B_1} = \frac{\Omega}{\gamma B_1}$$

$$B_{\text{eff}} \geq B_1$$

Zudem ist der Weg der Magnetisierung zurück zur z-Achse kürzer

## Tripelresonanztechniken

Wir suchen also nun den Abstand vom Sender, an dem der Puls, der eine Drehung von  $90^\circ$  an der Stelle des Senders bewirkt, eine Drehung von  $360^\circ$  bewirkt, dann hat der Puls keinen Effekt gehabt.

$$\gamma B_{\text{eff}} * \tau_p = 1$$

$$\tau_p = 1/4 * \gamma B_1$$

$$\gamma B_{\text{eff}} = \sqrt{(\gamma B_1)^2 + \Omega^2}$$

$$\sqrt{(\gamma B_1)^2 + \Omega^2} * 1/\gamma B_1 = 4$$

$$\sqrt{1 + \Omega^2/(\gamma B_1)^2} = 4$$

$$\Omega^2/(\gamma B_1)^2 = 15$$

$$\Omega = \sqrt{15} * \gamma B_1$$

## Tripelresonanztechniken

Der Abstand zwischen den Carbonylen und den  $C\alpha$  Kohlenstoffen beträgt ca. 120 ppm.

Auf einem 600 MHz-Gerät (ca. 150 MHz für  $^{13}C$ ) sind das 18000 Hz

$$\Omega = \sqrt{15} * \gamma B_1$$

also

$$\gamma B_1 = 4647 \text{ Hz und damit ist } \tau_p = 54 \text{ } \mu\text{sec}$$

Damit haben wir einen sehr robusten selektiven Puls

# Tripelresonanztechniken

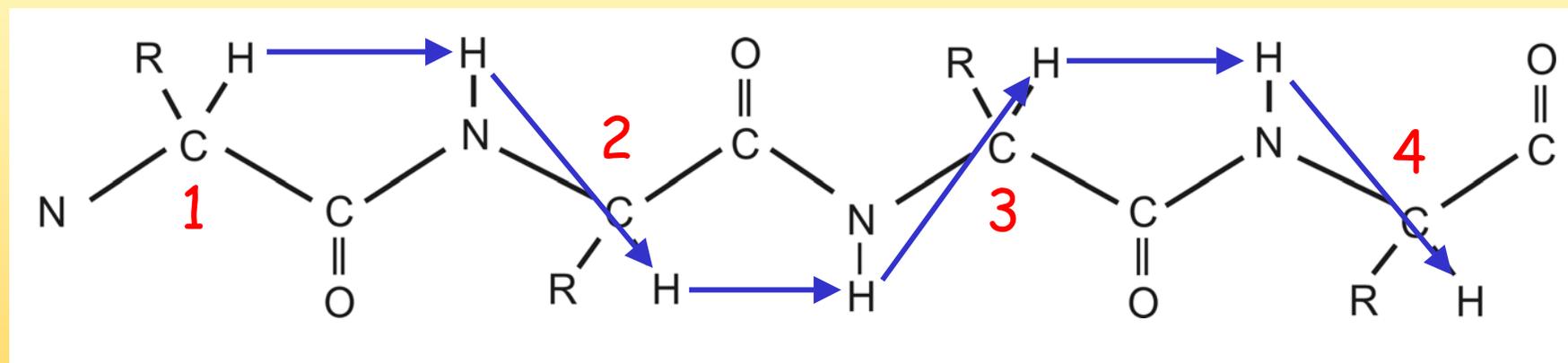
## Sequentielle Zuordnung

Wir müssen mit den Tripelresonanzexperimenten das gleiche erreichen, was mit NOESY/TOCSY bewerkstelligt worden ist.

Im TOCSY gab es nur eine Korrelation vom  $H^N$  zum  $H^\alpha$ , beim NOESY gab es zwei, einmal die gleiche wie im TOCSY, dazu den über das Carbonyl hinweg

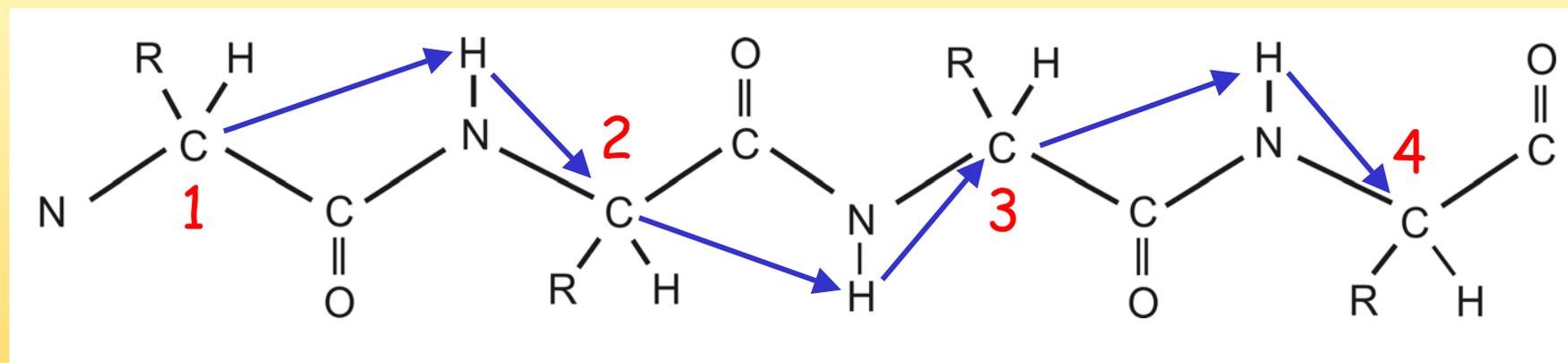
# Sequenzspezifische Zuordnung

So sieht der „sequential walk“ mit homonuklearen Spektren aus



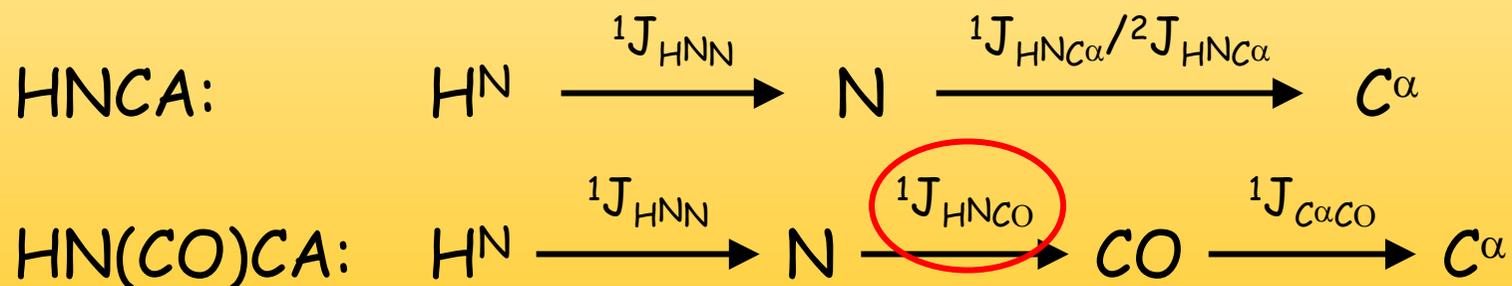
# Sequenzspezifische Zuordnung

Wir machen mit den heteronuklearen Kopplungen auch eine „sequential walk“



## Tripelresonanztechniken

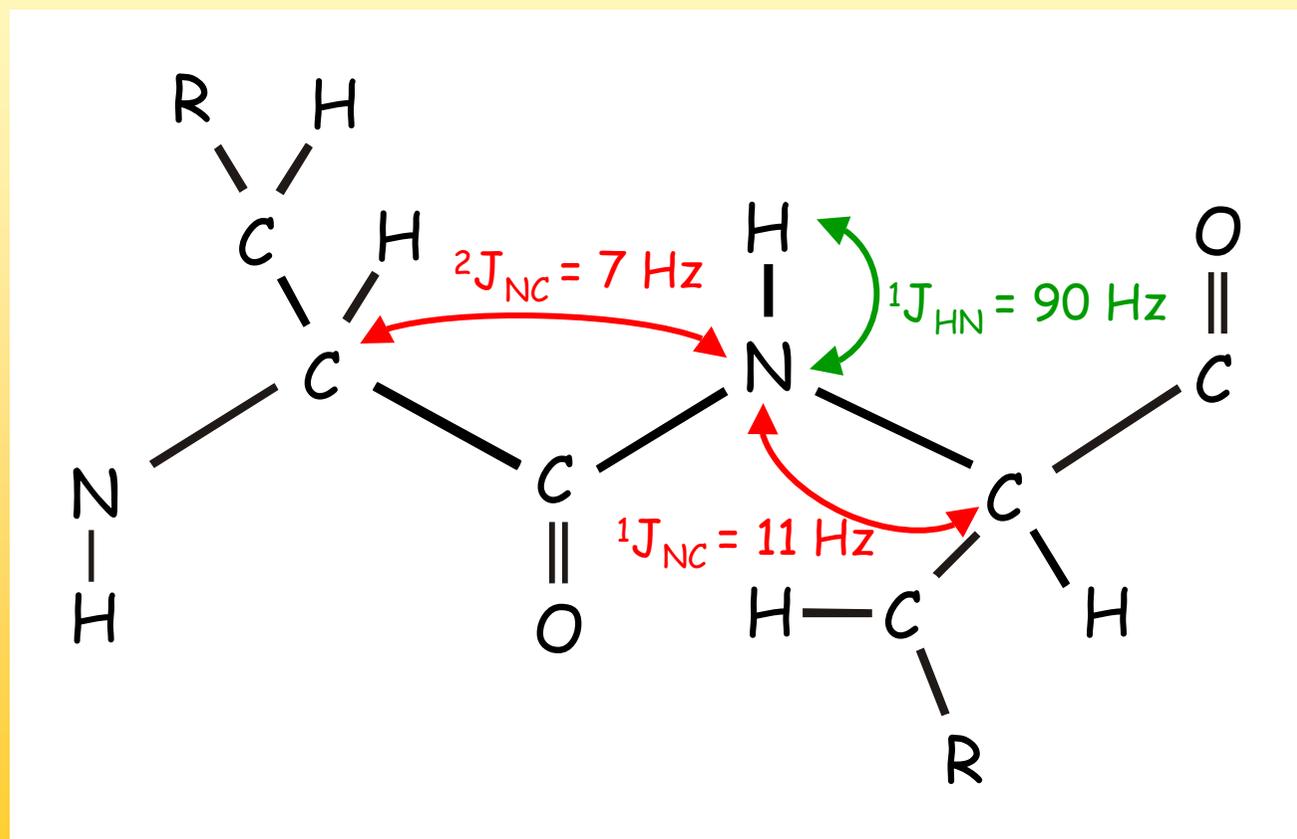
Die Unterscheidung der beiden Signale vom  $H^N$  zum  $C^\alpha$  gelingt uns durch ein Spektrum das eine ähnliche Korrelation ergibt, aber unter Nutzung des Carbonyl. Die beiden Experimente heißen HNCA und HN(CO)CA, wobei der Name schon den Weg der Magnetisierung verrät.



Hier gibt es keine  $^2J_{HNCO}$

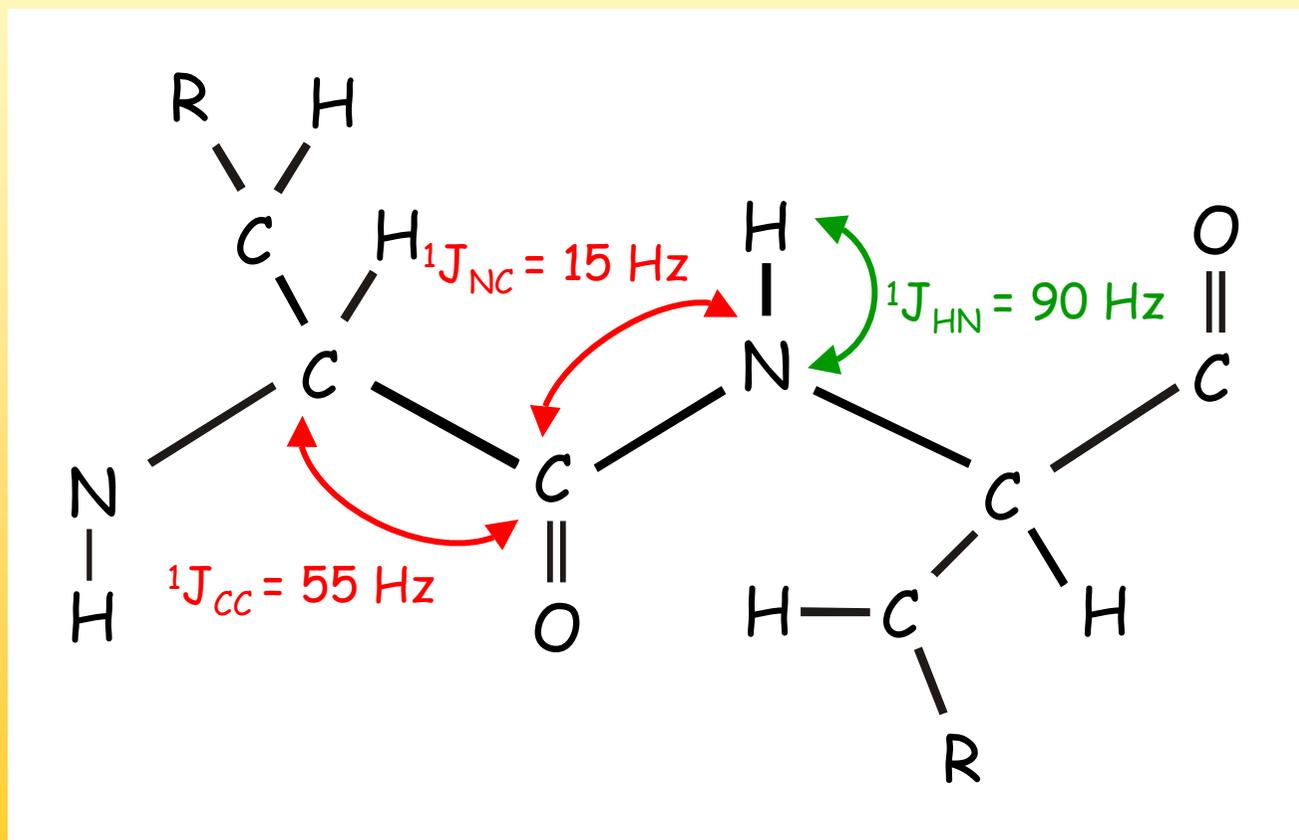
# Tripelresonanztechniken

## HNCA



# Tripelresonanztechniken

## HN(CO)CA



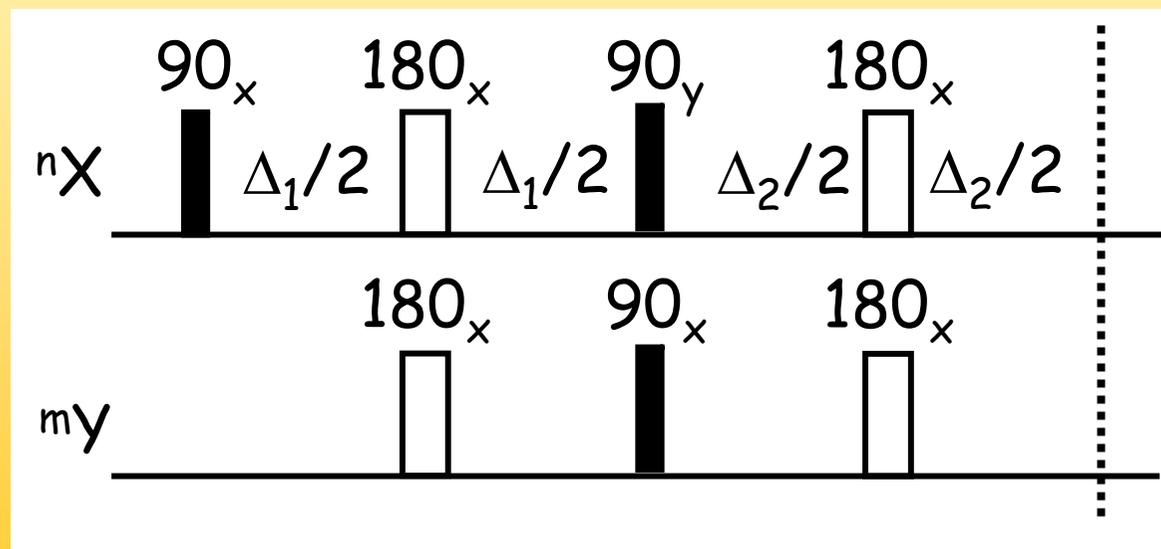
## Tripelresonanztechniken

Protonendetektion ist wie gehabt immer am empfindlichsten, in beiden Fällen geht man nach dem Weg von  $H^N$  zum  $C\alpha$  auch wieder zurück zum  $H^N$  und detektiert dort: „out and back“

Dabei muss immer wieder Magnetisierung von einem Kern zu einem einer anderen Kernsorte transferiert werden, das geht am besten mit dem INEPT-Schritt

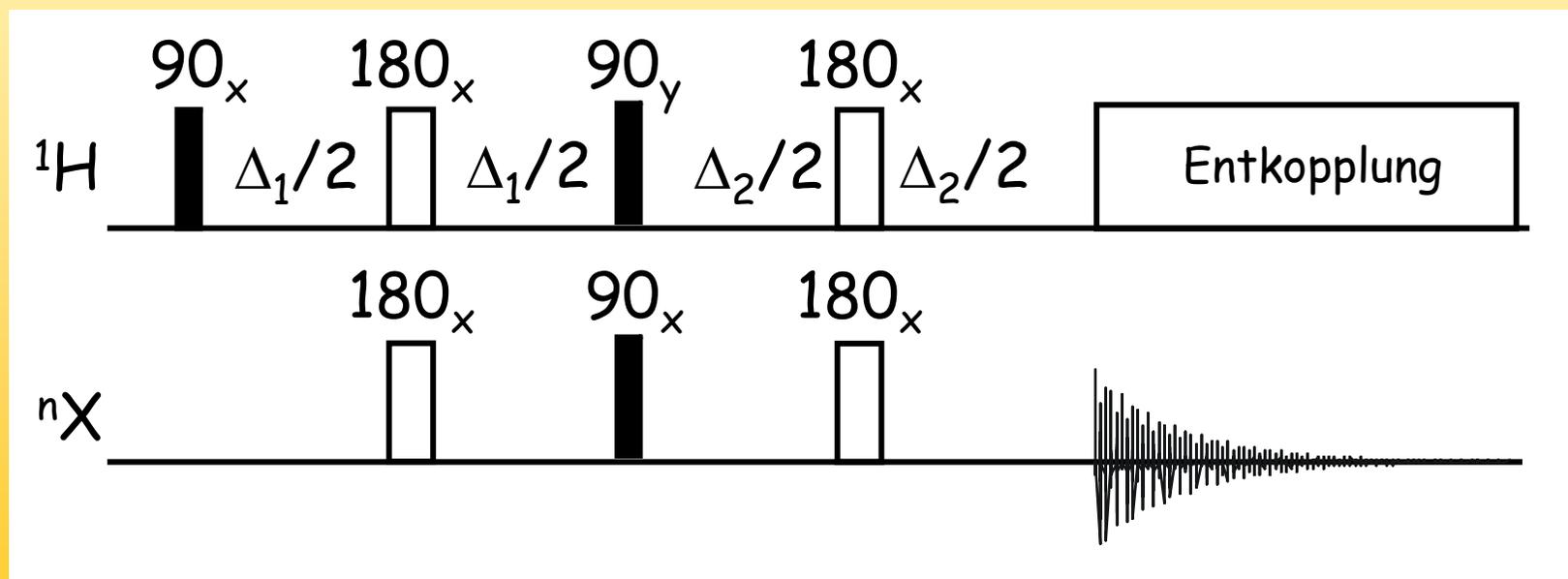
## Tripelresonanztechniken

Der INEPT-Schritt kann dabei ganz allgemein zum Transfer zwischen zwei beliebigen Kernsorten dienen, die Wartezeiten müssen nur an die Kopplungskonstanten angepasst werden



## Tripelresonanztechniken

Bei Protonen haben wir schon gesehen das man bei mehr als einem Kopplungspartner die Wartezeiten nicht auf  $1/2J$  setzen darf sondern kürzer halten muss

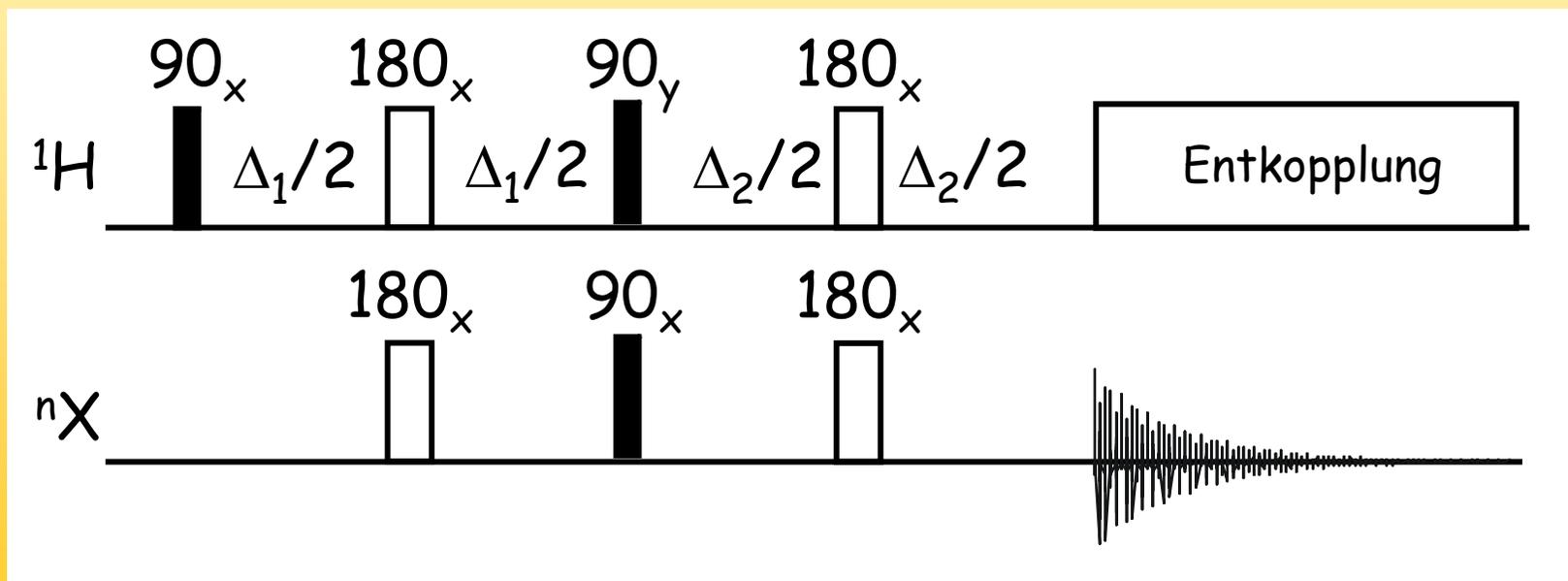


# Tripelresonanztechniken

$$XH: X_x \sin \pi J_{H1X} \Delta_2$$

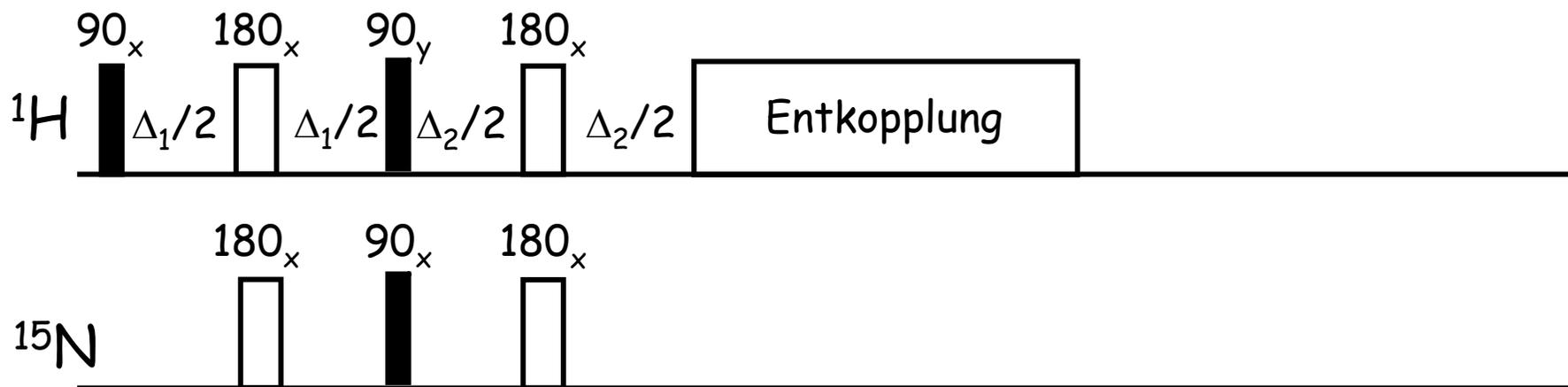
$$XH_2: X_x \sin \pi J_{H1X} \Delta_2 \cos \pi J_{H2X} \Delta_2$$

$$XH_3: X_x \sin \pi J_{H1X} \Delta_2 \cos \pi J_{H2X} \Delta_2 \cos \pi J_{H3X} \Delta_2$$



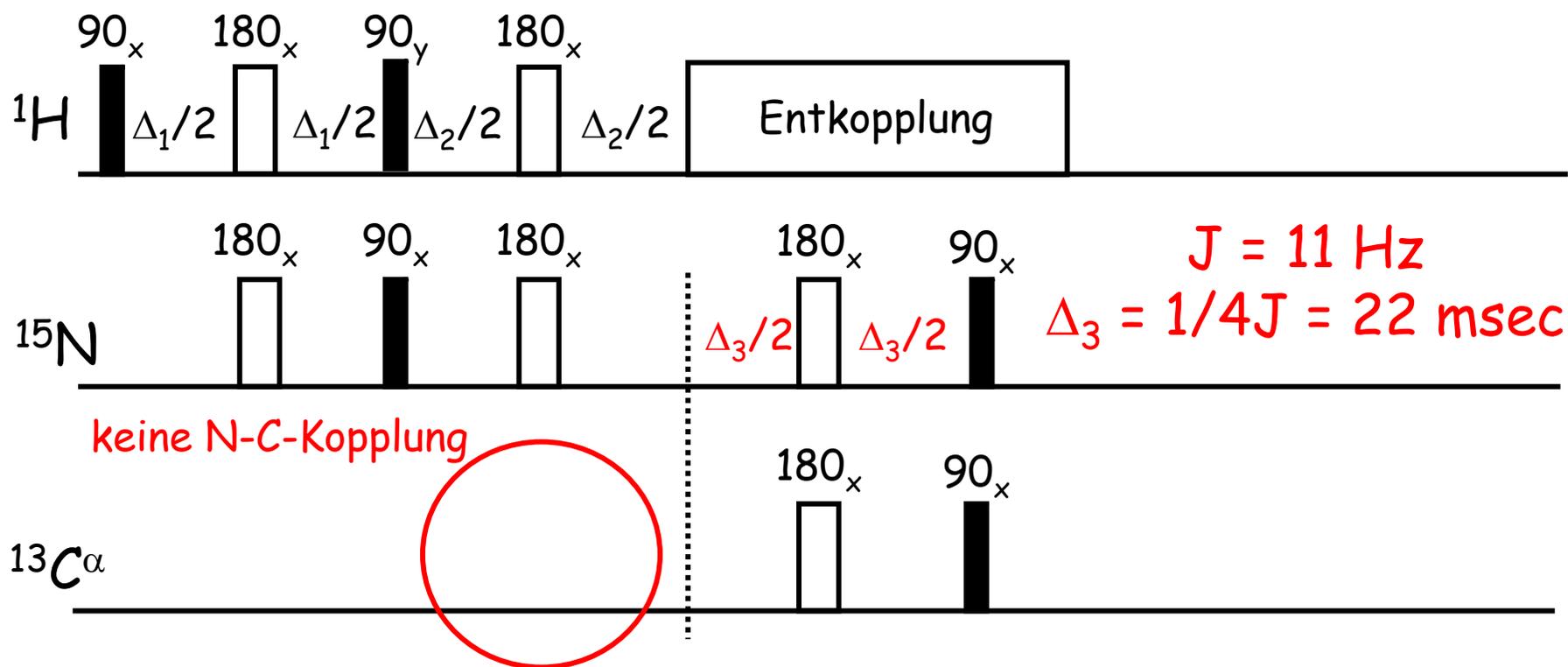
# Tripelresonanztechniken

Dann bauen wir uns unsere Pulssequenz



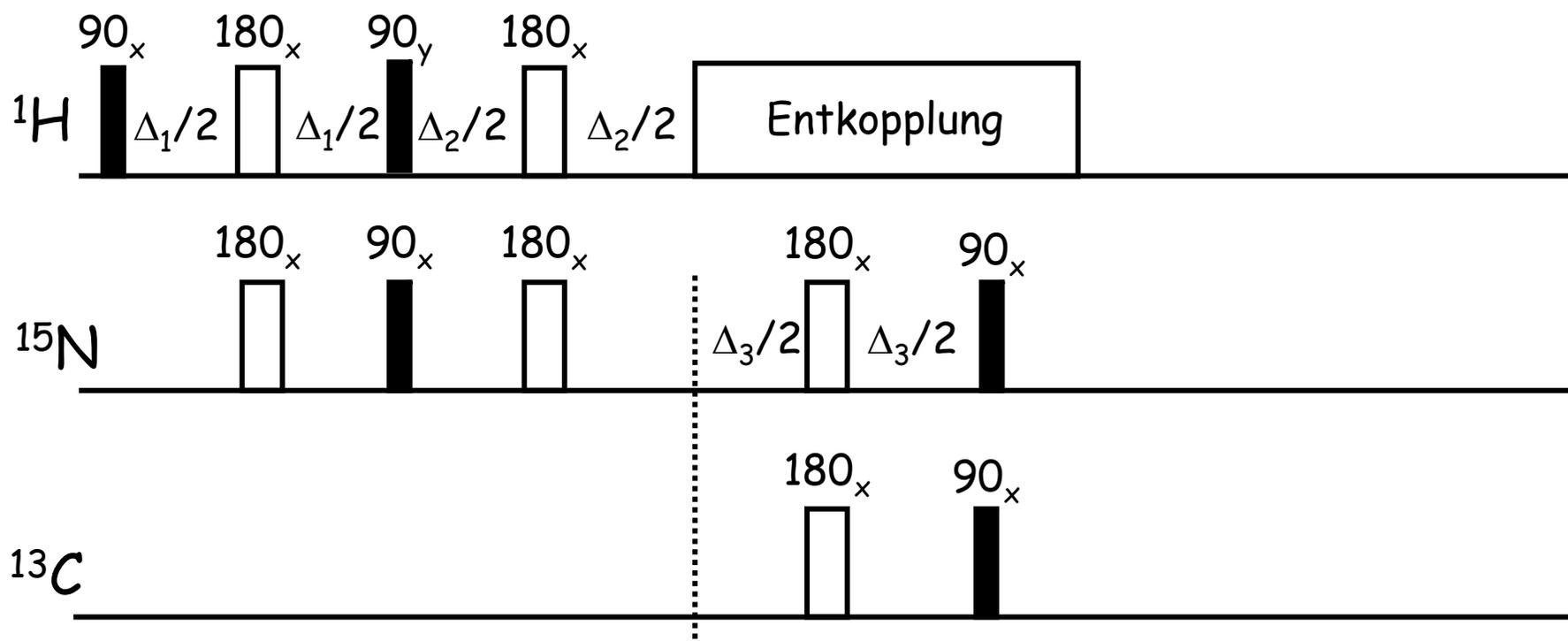
$\Delta_2$  kann hier für den Fall HN eingestellt werden, also genau  $1/2J$  (5.5 msec).  $\text{H}_2\text{N}$  wird dann unterdrückt (Seitenketten von Asn und Gln). **Damit sind wir vom Proton zum Stickstoff gekommen, nun weiter zum Kohlenstoff**

# Tripelresonanztechniken



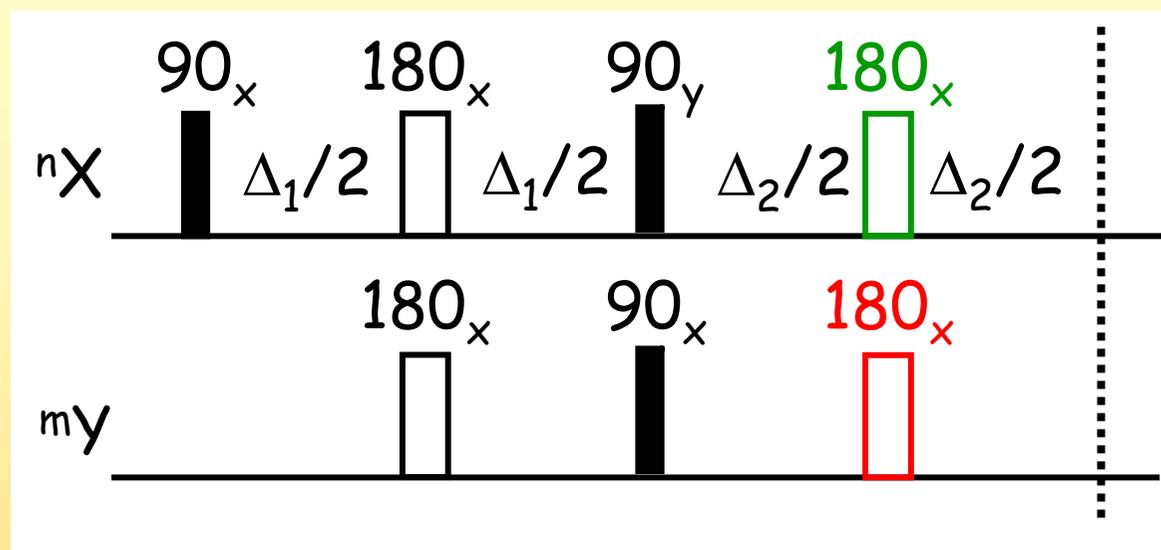
Wir hängen ein weiteres INEPT an, dabei ist zu bedenken, dass der Stickstoff 2 Kopplungen zu  $\text{C}^\alpha$  hat,  $\Delta_3$  ist also nicht  $1/2J$  sondern  $1/4J$

# Tripelresonanztechniken



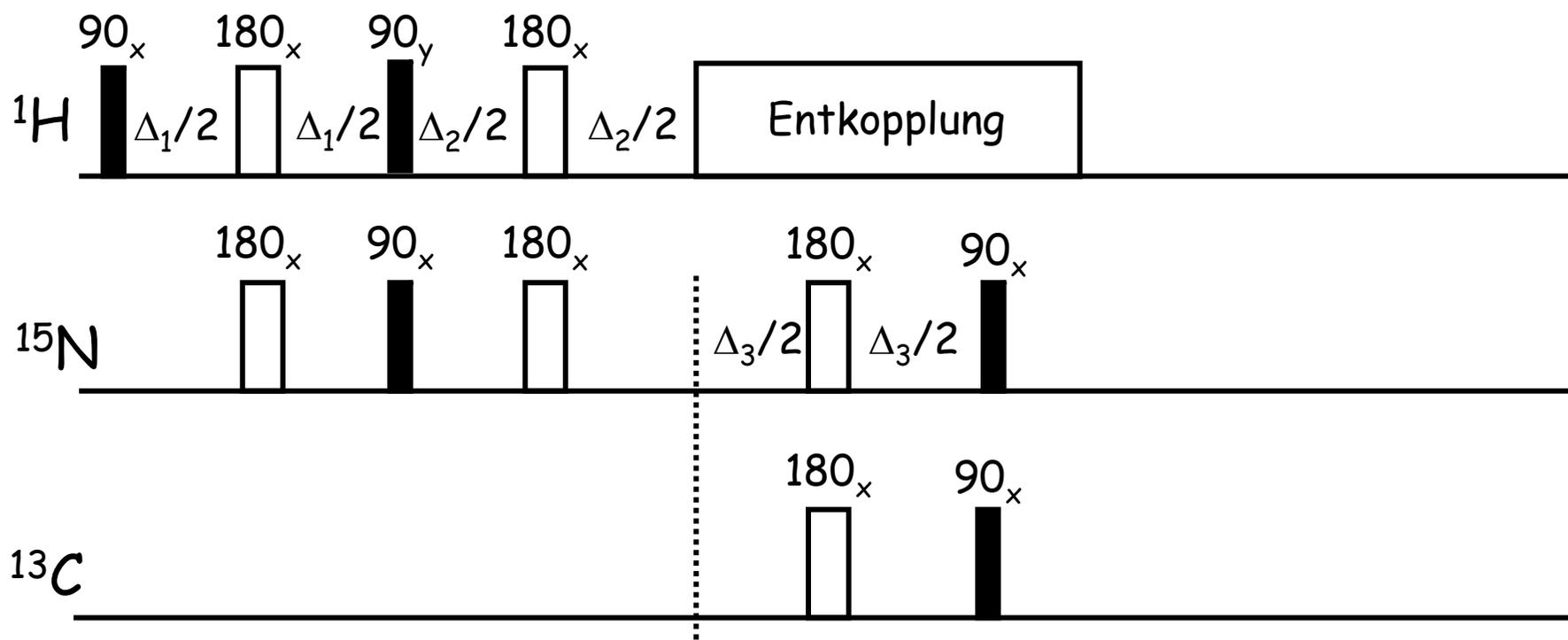
Man stellt aber fest, dass die  $180^\circ$  Pulse überhand nehmen, man muss bedenken wofür man die braucht....

## Tripelresonanztechniken



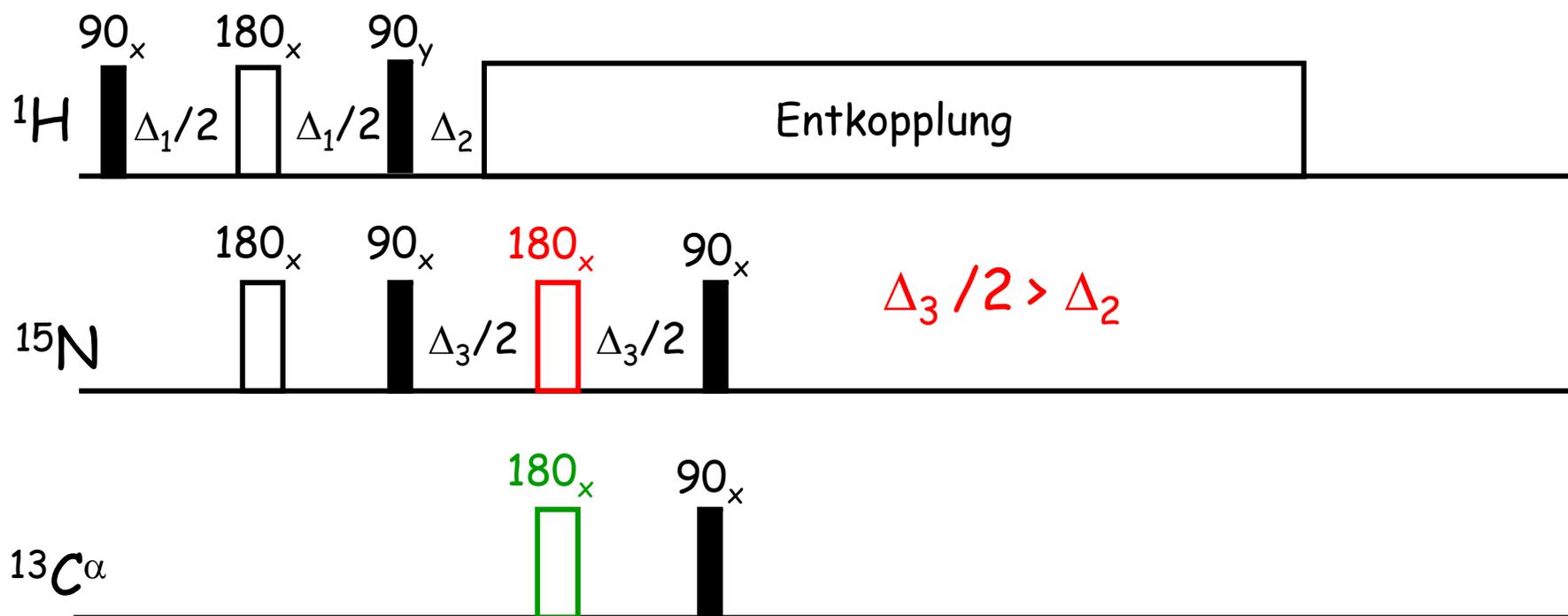
Während  $\Delta_2$  soll die  $J_{xy}$  aktiv sein. Es soll aber keine chemische Verschiebung auf Y entstehen, deshalb der **180° Puls**. Der alleine würde die Kopplung aber refocussieren, also brauchen wir noch den zweiten **180° Puls**. Wäre uns die chemische Verschiebung egal, bräuchten wir keinen Puls.

# Tripelresonanztechniken



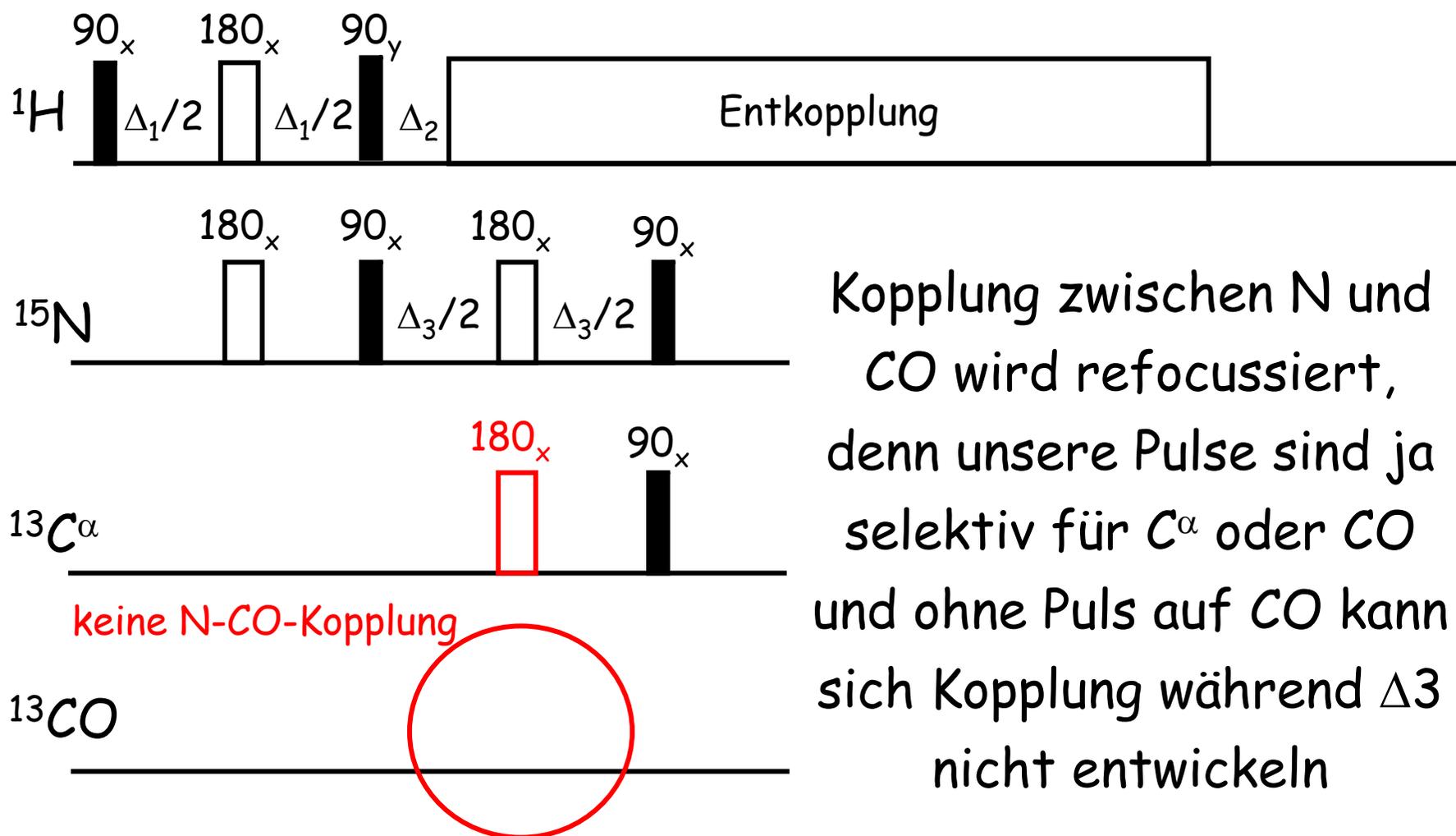
Die Situation haben hier zweimal. Was wir eigentlich aber wollen ist Kopplung während  $\Delta_2$  und  $\Delta_3$  und keine chemische Verschiebung auf  $^{15}\text{N}$

# Tripelresonanztechniken

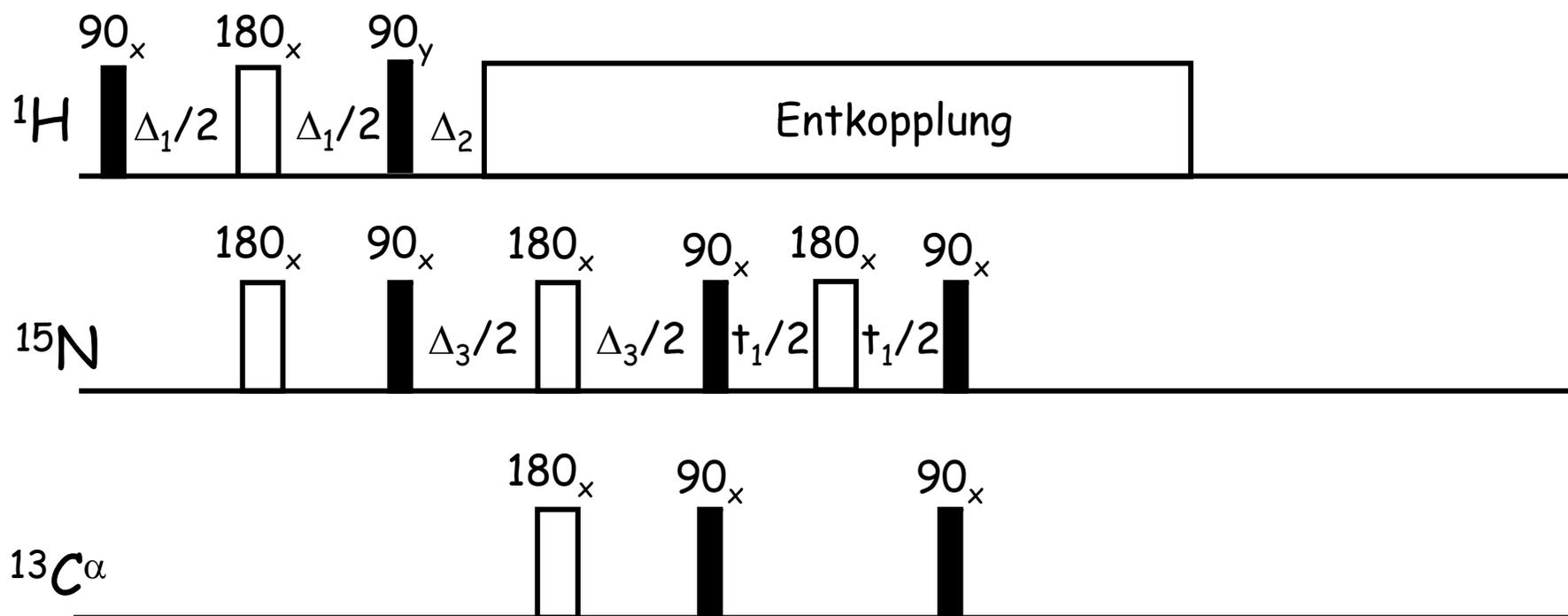


Dann kann man sehr viele streichen.  $\Delta_2$  und  $\Delta_3$  kann man zusammenfassen, ein **180° Puls** muss in der Mitte der  $^{15}\text{N}$ -Evolution sitzen, ein zweiter **180° Puls** ist nötig

# Tripelresonanztechniken

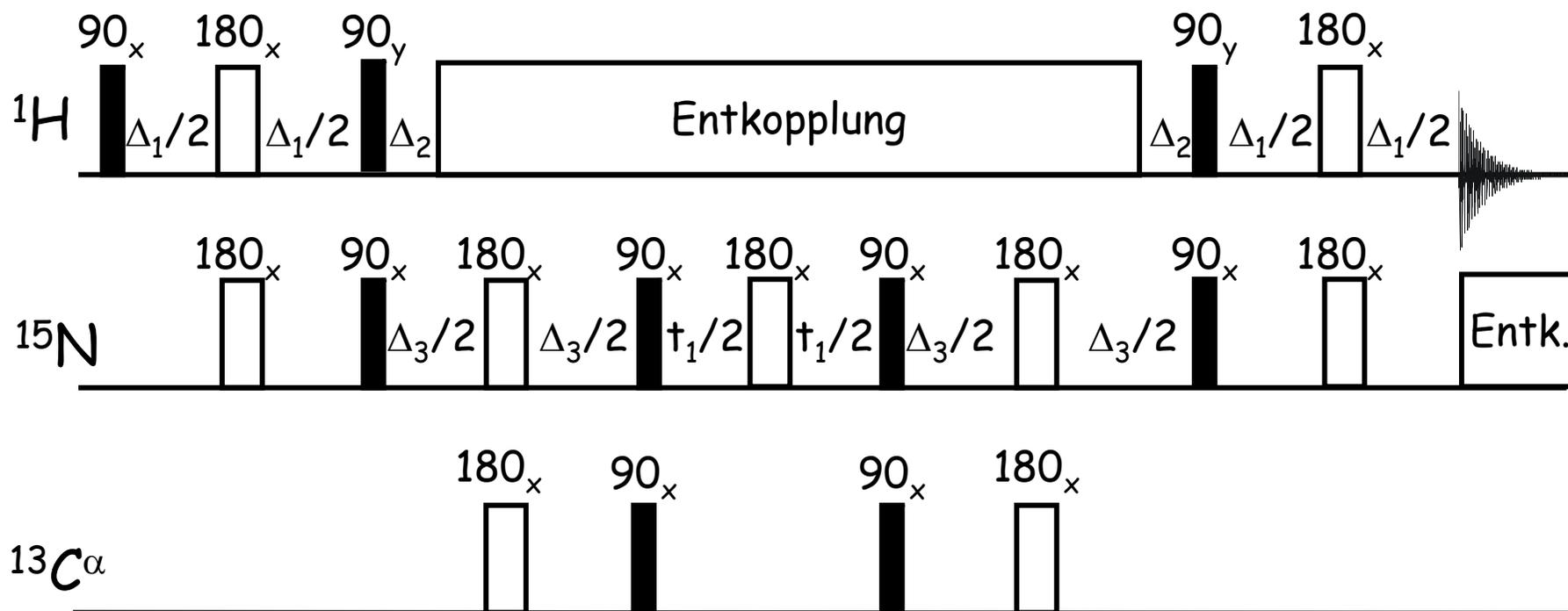


# Tripelresonanztechniken



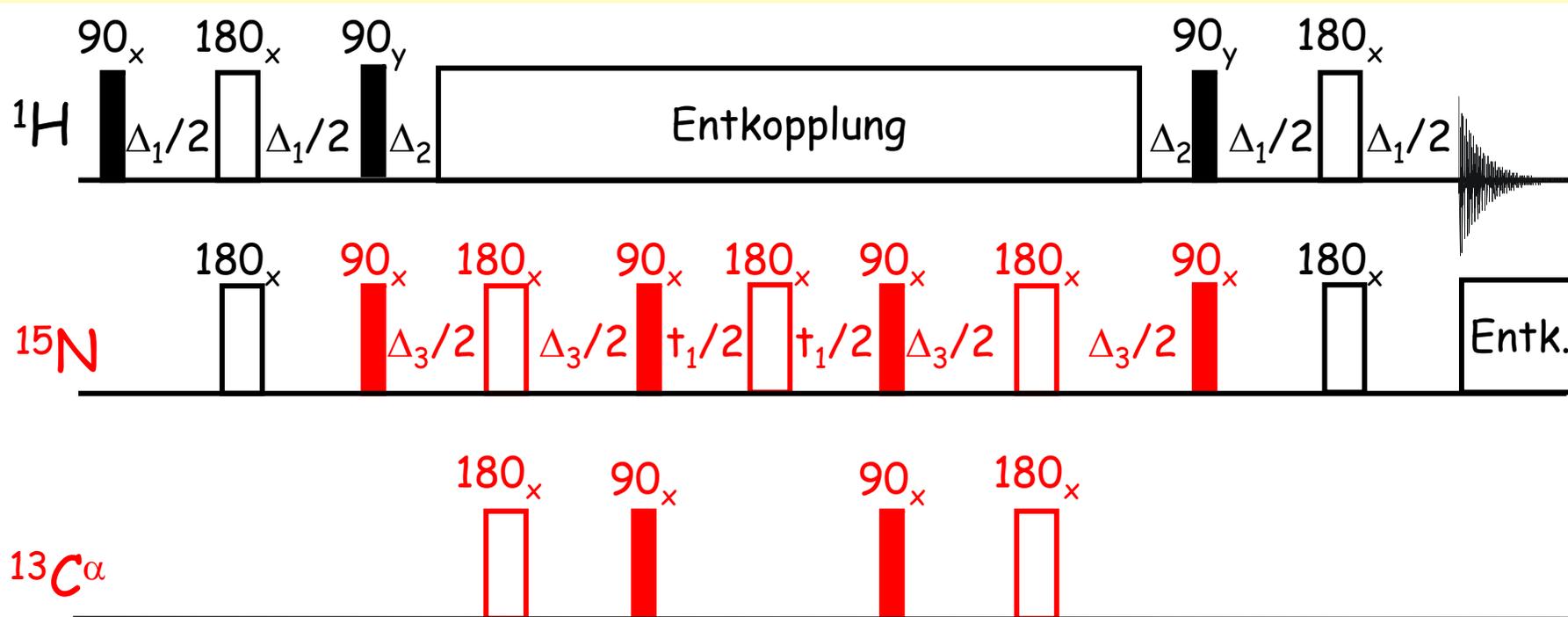
Nach dem zweiten INEPT-Transfer wird nicht refocussiert sondern wie beim HSQC nur die chemische Verschiebung des zweiten Kerns detektiert

# Tripelresonanztechniken



Dann geht's wieder zurück zum Stickstoff und dann zum Proton und dann wird mit  $^{15}\text{N}$ -Entkopplung detektiert

# Tripelresonanztechniken

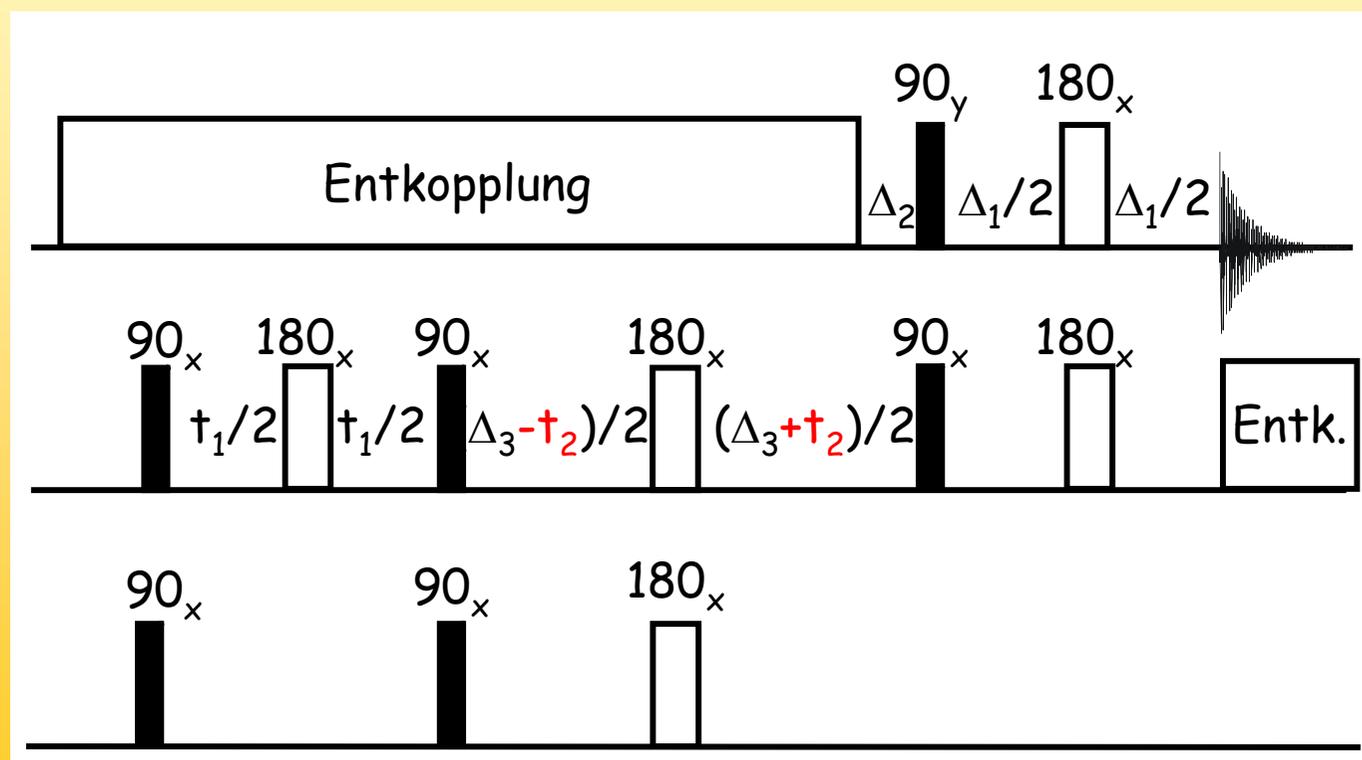


In der Mitte der Pulssequenz haben wir ein  
 $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}^\alpha$ -HSQC durchgeführt

## Tripelresonanztechniken

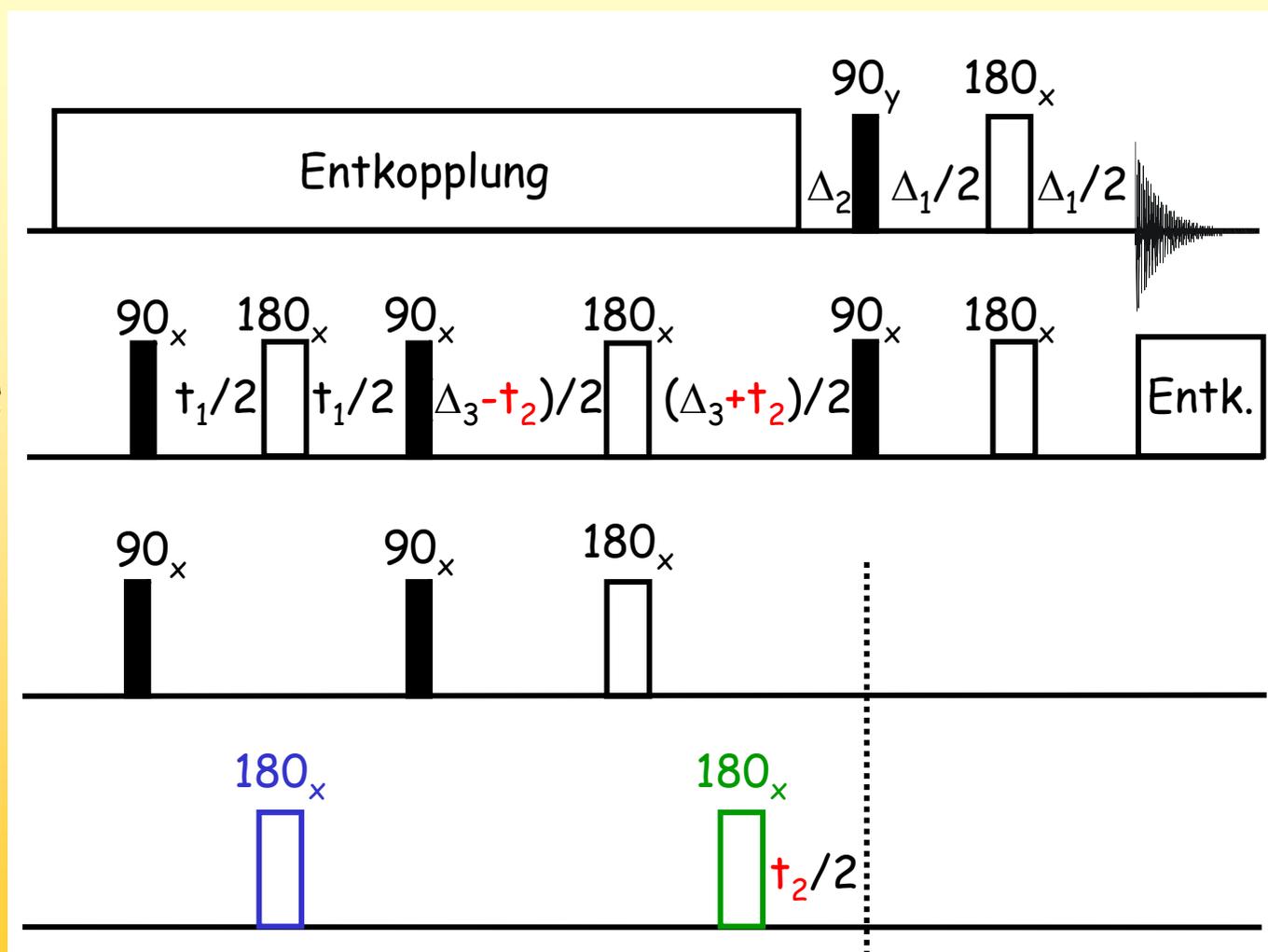
Damit haben wir das **HNCA** gebaut, es wird normalerweise als 3D-Spektrum aufgenommen, mit den chemischen Verschiebungen von  $C^\alpha$ , N und  $H^N$  auf den 3 Achsen.

Die chemische Verschiebung der  $^{15}N$ -Kerne wird in einem constant-time Experiment detektiert



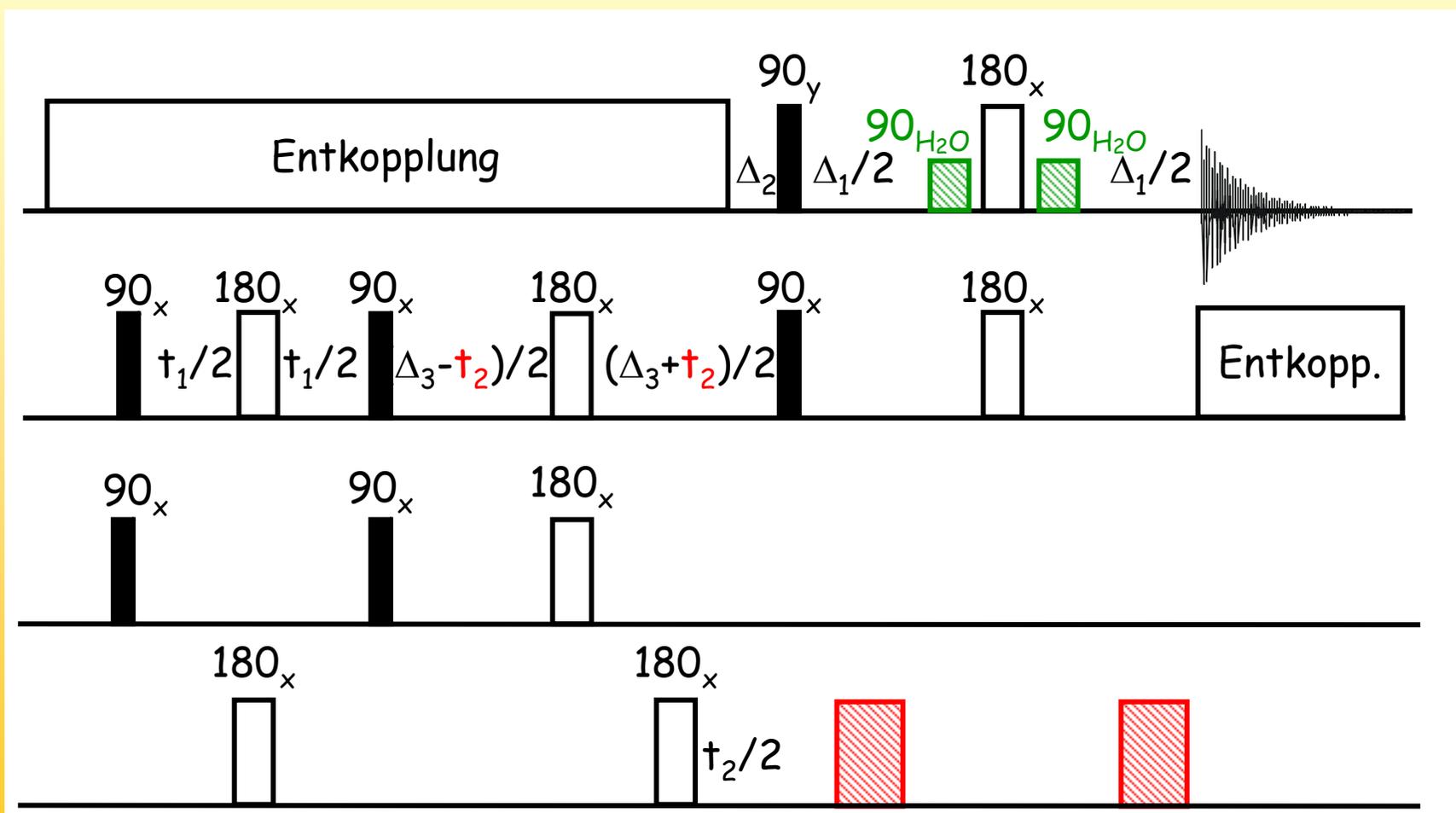
# Tripelresonanztechniken

Dann müssen wir aber wegen der Kopplung von N zu CO etwas unternehmen und einen **Entkopplungspuls** einbauen, den brauchen wir auch in  $t_1$



# Tripelresonanztechniken

Die Wasserunterdrückung machen wir mit WATERGATE

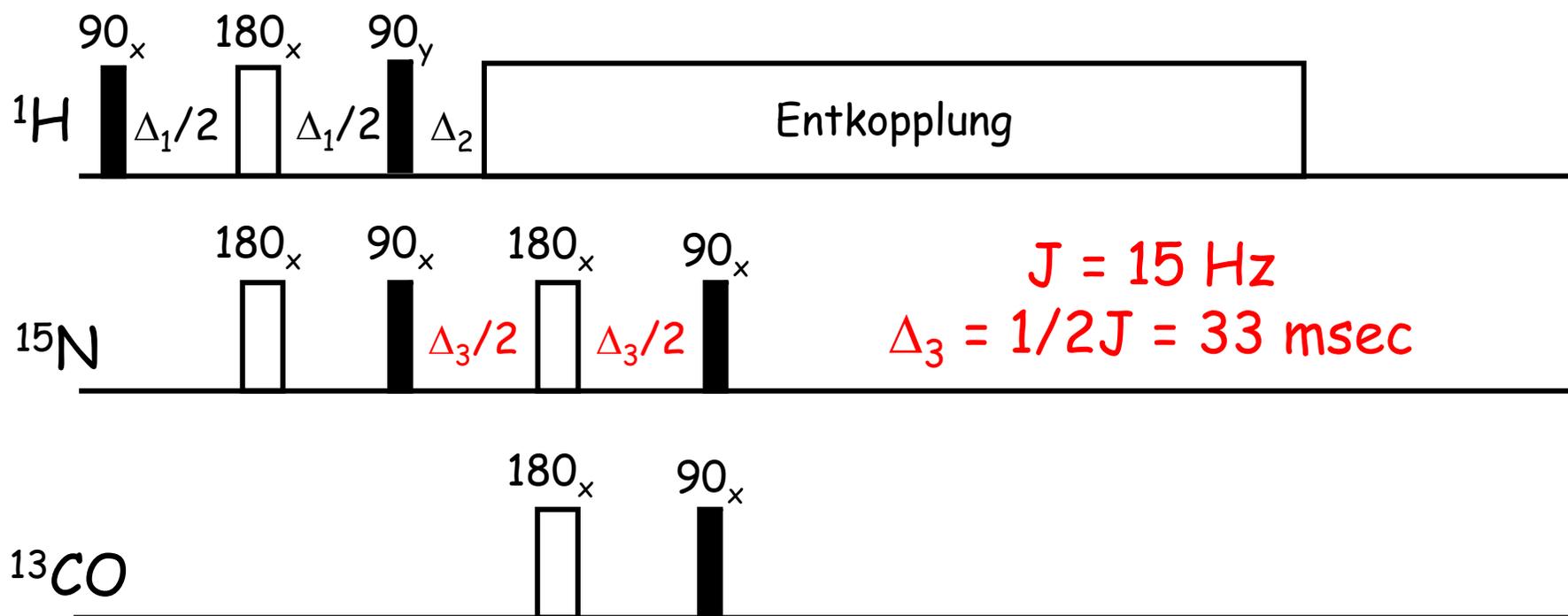


## Tripelresonanztechniken

Da der Stickstoffkern mit zwei  $C^\alpha$  koppelt bekommen wir auch jeweils zwei Korrelationen, die für eine sequentielle Zuordnung reichen, wenn wir sie denn unterscheiden können.

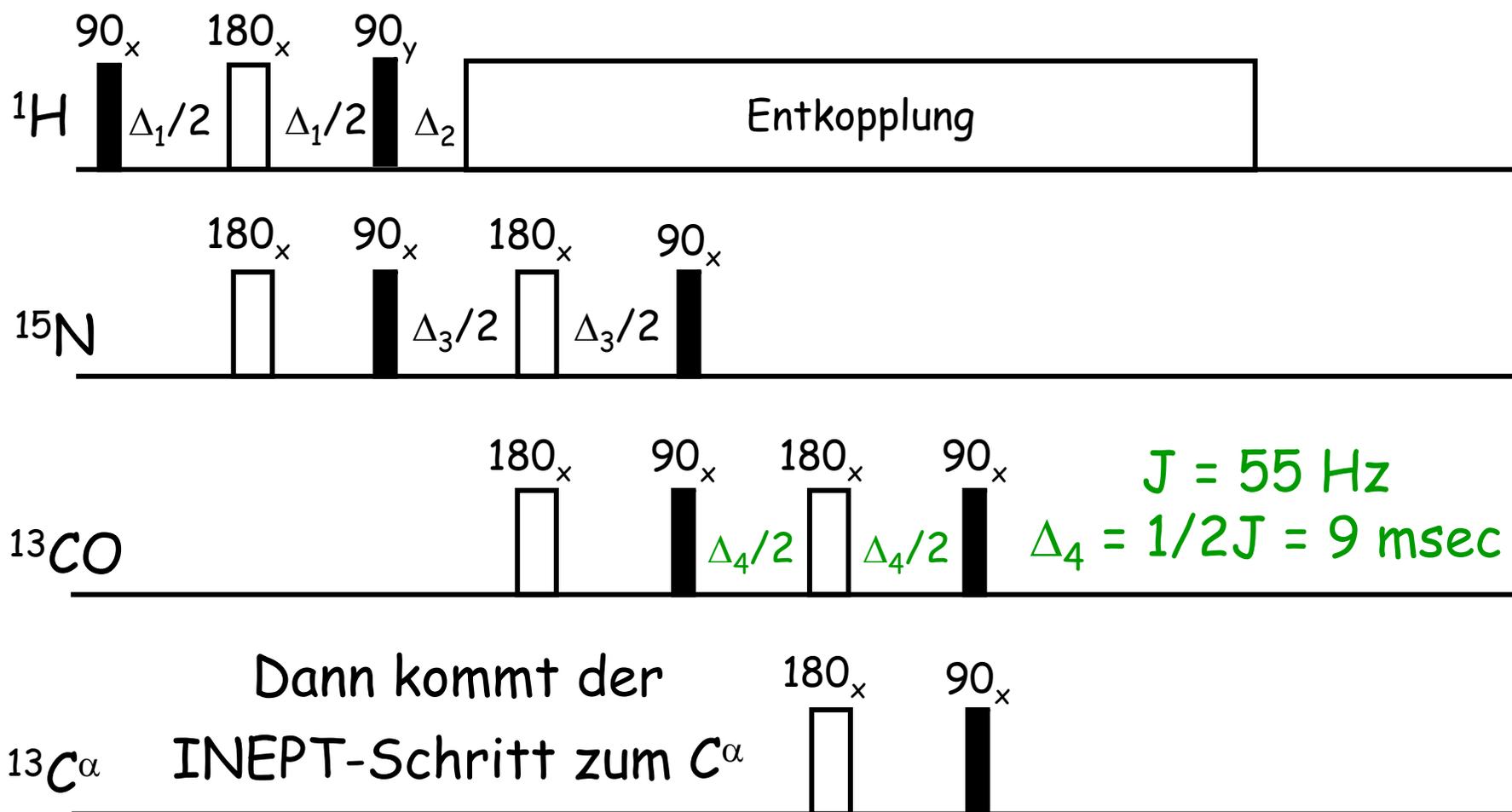
Diese Unterscheidung kann durch das HN(CO)CA bewerkstelligt werden, in dem der Transfer zum Carbonyl noch dazu kommt

# Tripelresonanztechniken

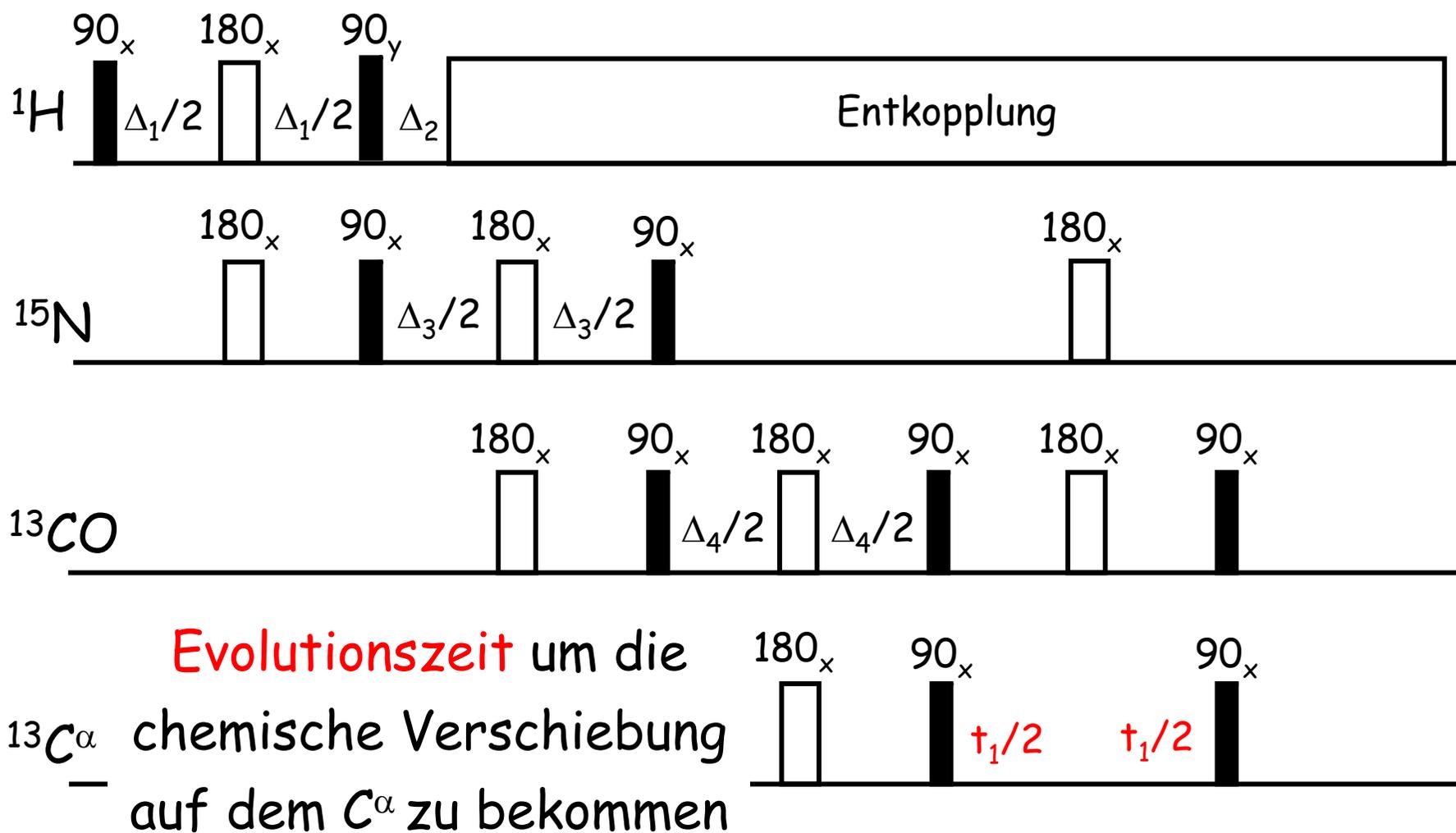


Der Anfang vom HN(CO)CA ist genau wie beim HNCA, nur gehen wir nicht zum  $C^\alpha$  sondern zum CO, hier gibt es nur eine Kopplung, also  $1/2J$  für  $\Delta_3$

# Tripelresonanztechniken



# Tripelresonanztechniken

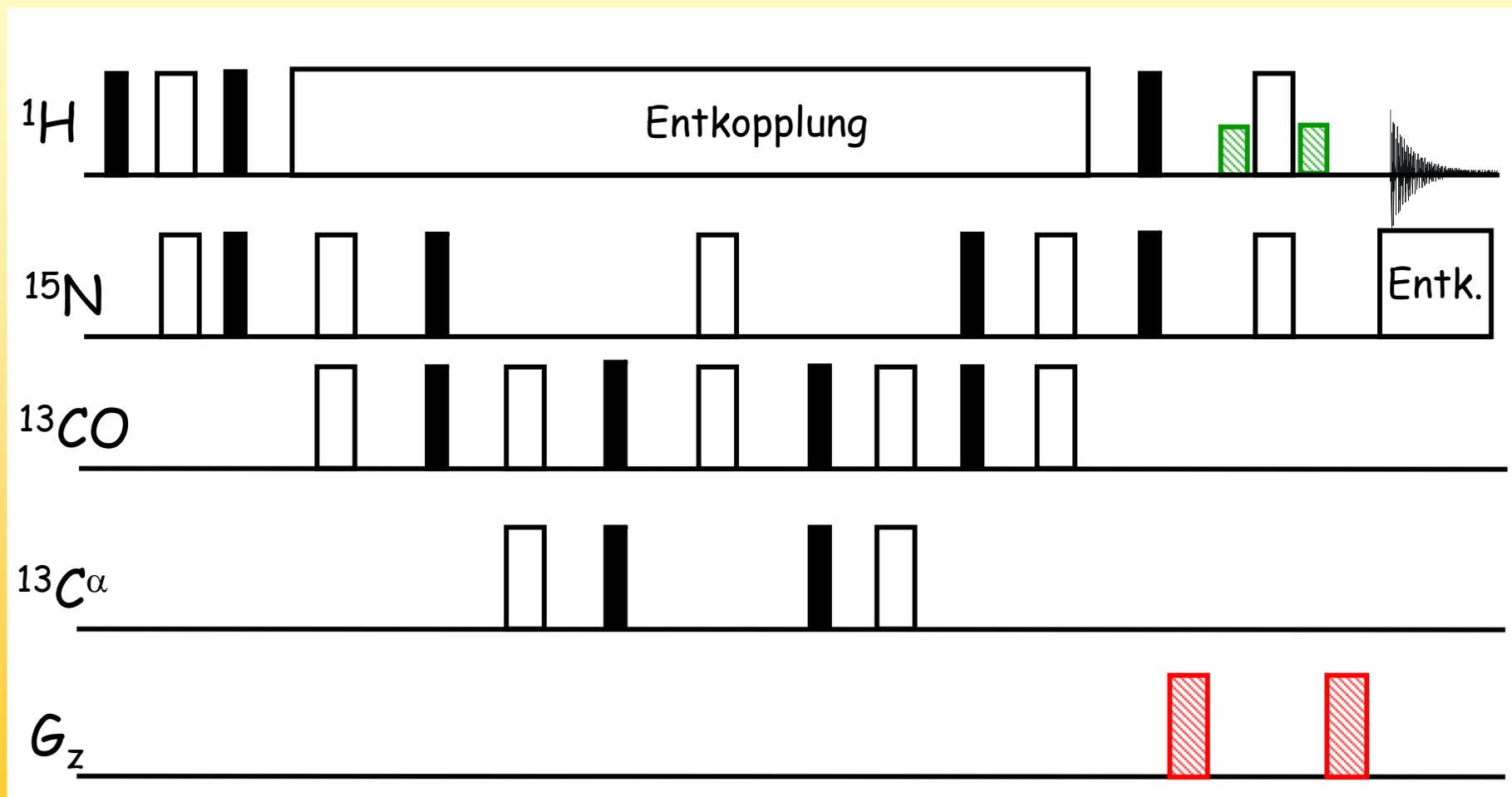


## Tripelresonanztechniken

Der Rest ist wie beim HNCA,  
Wasserunterdrückung mit WATERGATE,  
Evolutionzeit für  $^{15}\text{N}$  als „constant time“  
Experiment und das Experiment wird als  
dreidimensionales Spektrum aufgenommen mit  
 $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{13}\text{C}^\alpha$  chemischen Verschiebungen.

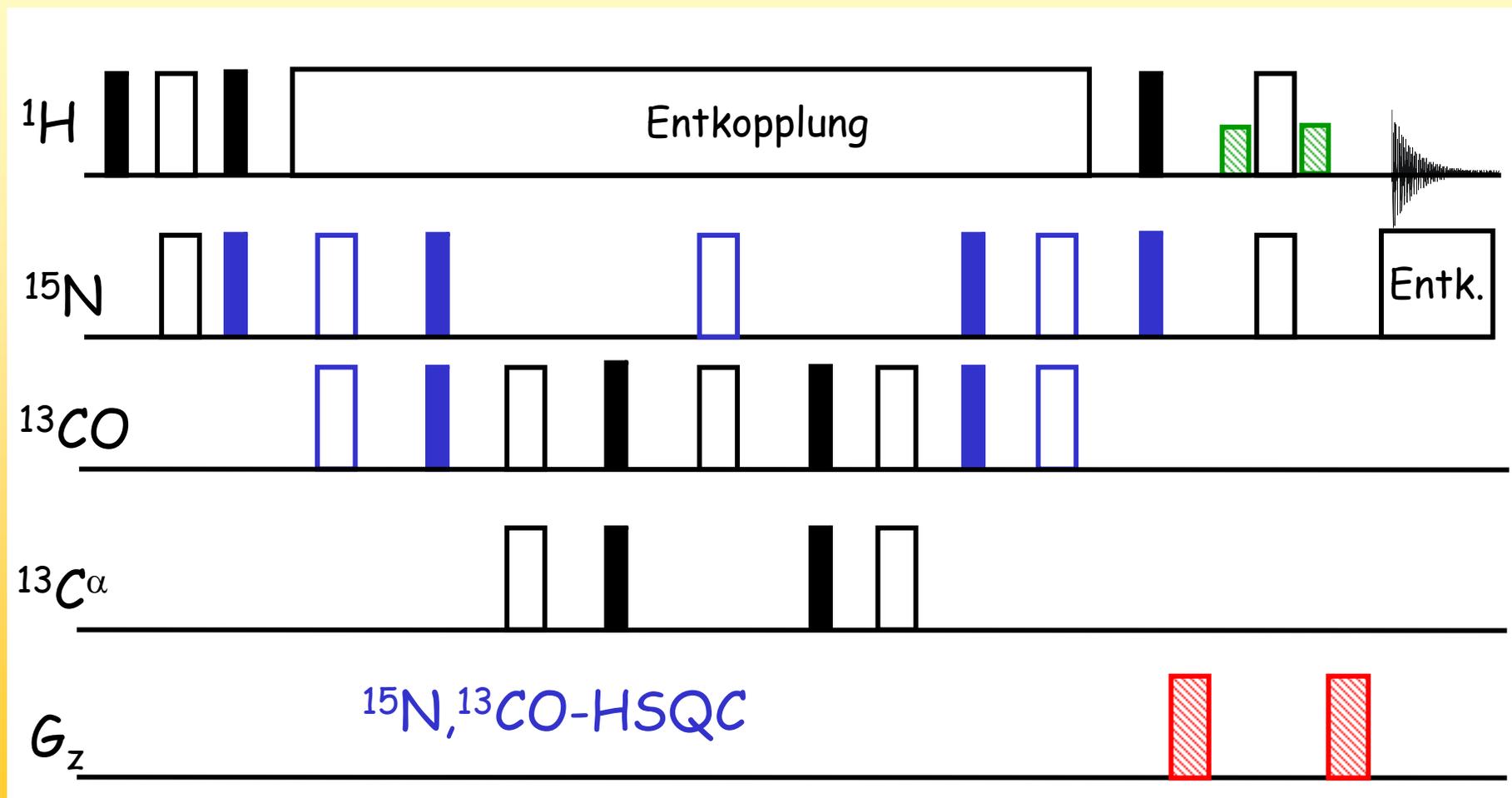
# Tripelresonanztechniken

## HN(CO)CA



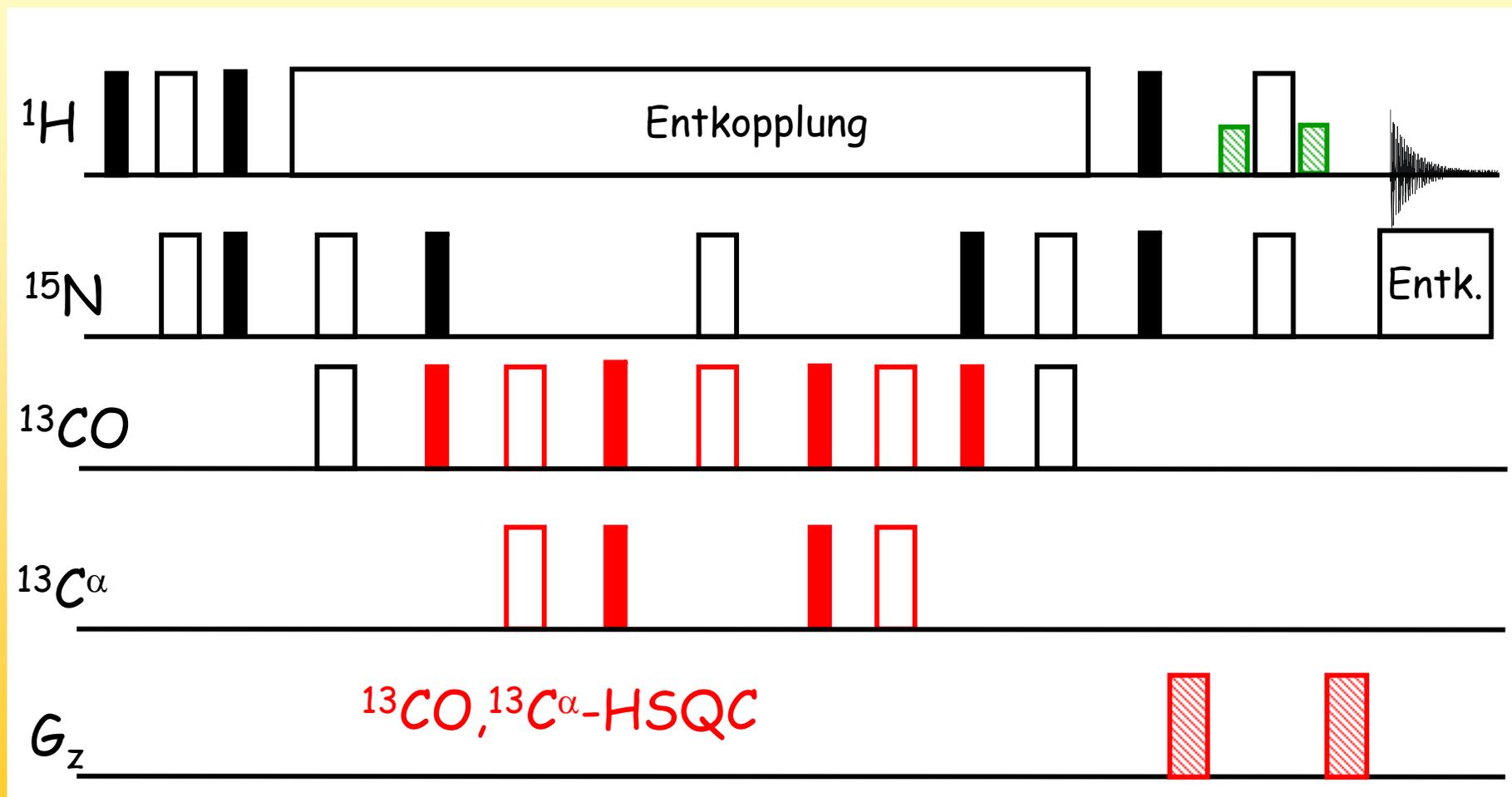
# Tripelresonanztechniken

## HN(CO)CA



# Tripelresonanztechniken

## HN(CO)CA

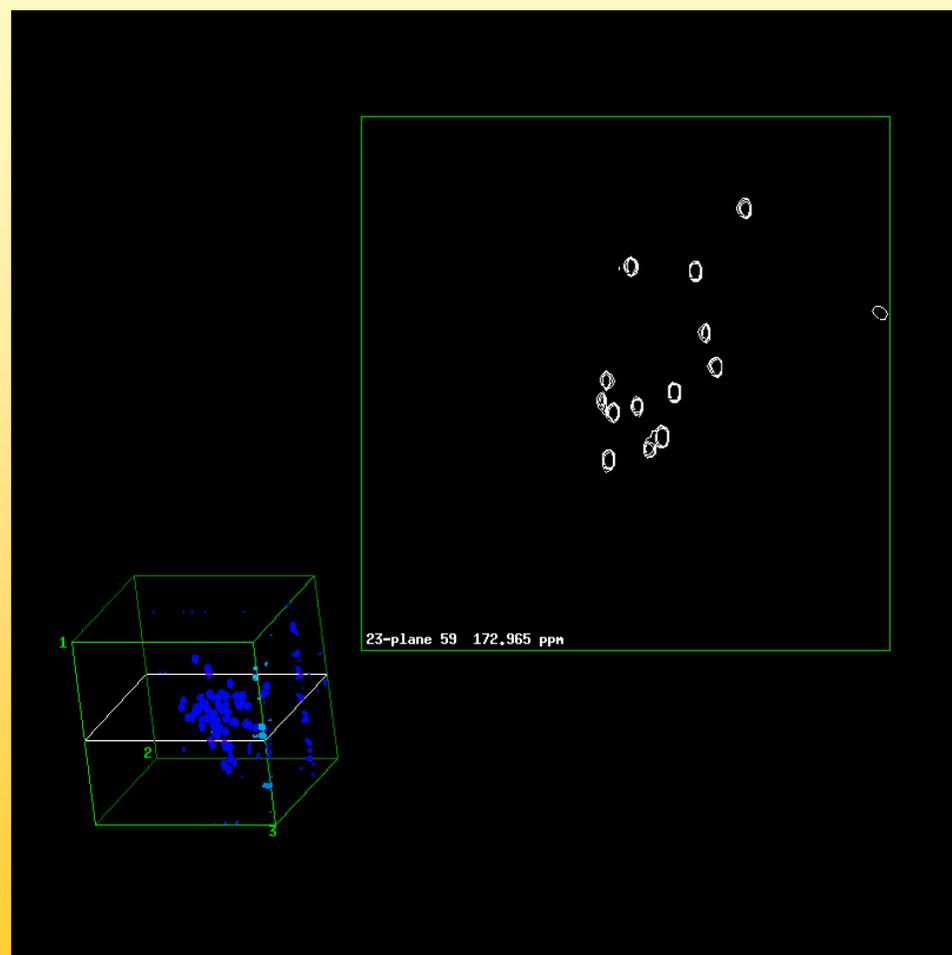


## Tripelresonanztechniken

Die  $^{15}\text{N}$ -Verschiebung dient dabei der Beseitigung von Überlagerung durch die dritte Dimension, die sequentielle Zuordnung erfolgt über die H-C-planes der 3D-Spektren

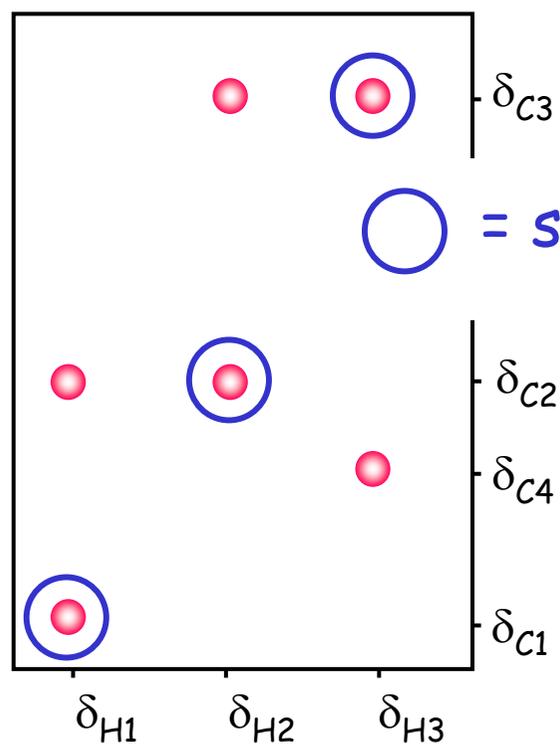
# Tripelresonanztechniken

## 3D-NMR

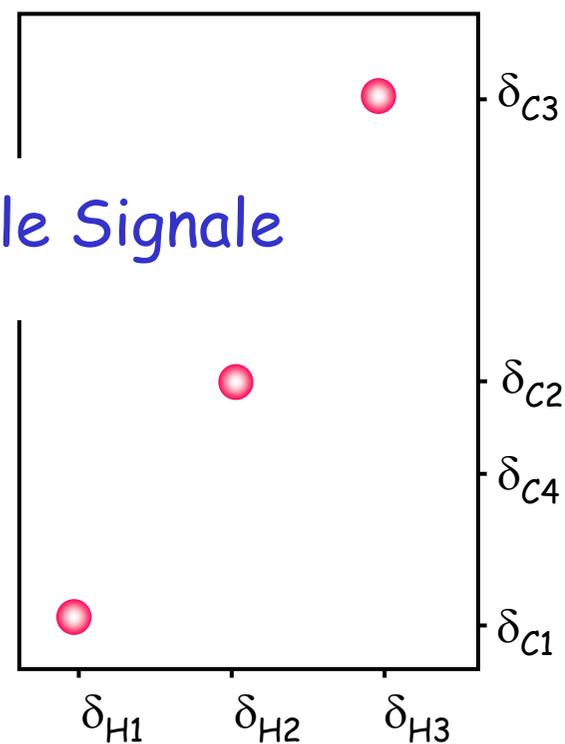


# Tripelresonanztechniken

HNCA

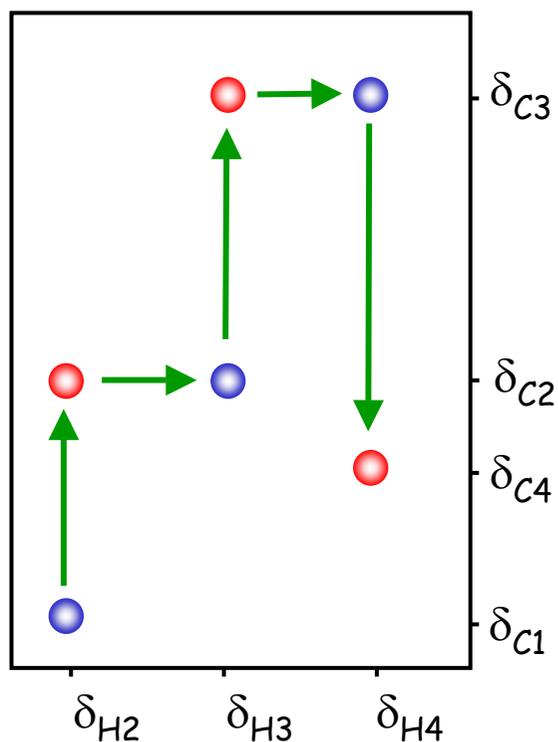
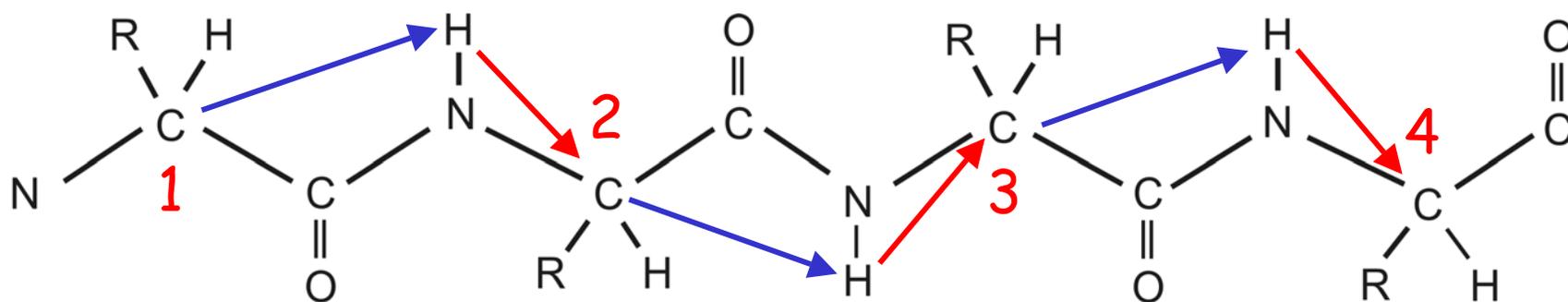


HN(CO)CA



○ = sequentielle Signale

# Tripelresonanztechniken



Damit sind wir bereit für den  
„sequential walk“ im HNCA

## Tripelresonanztechniken

Man kann analog zu HNCA/HN(CO)CA auch Experimente machen die die chemische Verschiebung des CO detektieren, auch da ist ein Paar von Experimente möglich: das HNCO und das HN(CA)CO.

Zusammen ergeben sich wieder eine bzw. zwei Korrelationen so dass eine sequentielle Zuordnung möglich ist. Noch besser ist es aber, wenn das  $C^\beta$  als weitere chemische Verschiebung hinzukommt.

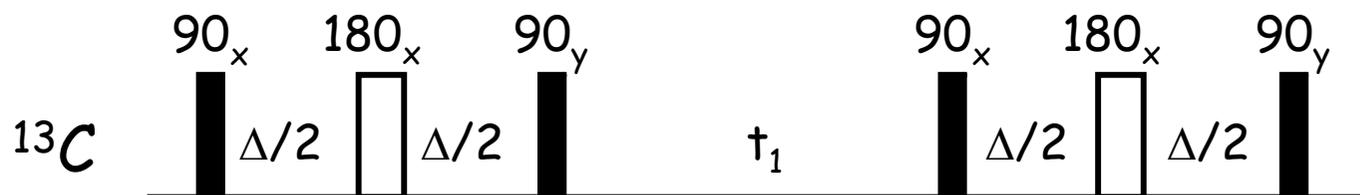
## Tripelresonanztechniken

Um nach dem Transfer vom HN zum  $C^\alpha$  auch noch den Schritt zum  $C^\beta$  zu machen, benötigt man einen COSY-artigen Transfer. Die Kopplungen zwischen  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  sind in Proteinen recht uniform, der Transfer wird sich also gut steuern lassen.

Allerdings wollen wir ja  $C^\alpha$  und  $C^\beta$  detektieren, der Transfer sollte also so angelegt sein, daß beide Signale ungefähr gleich groß sind

# Tripelresonanztechniken

Die folgende Sequenz wird verwendet:

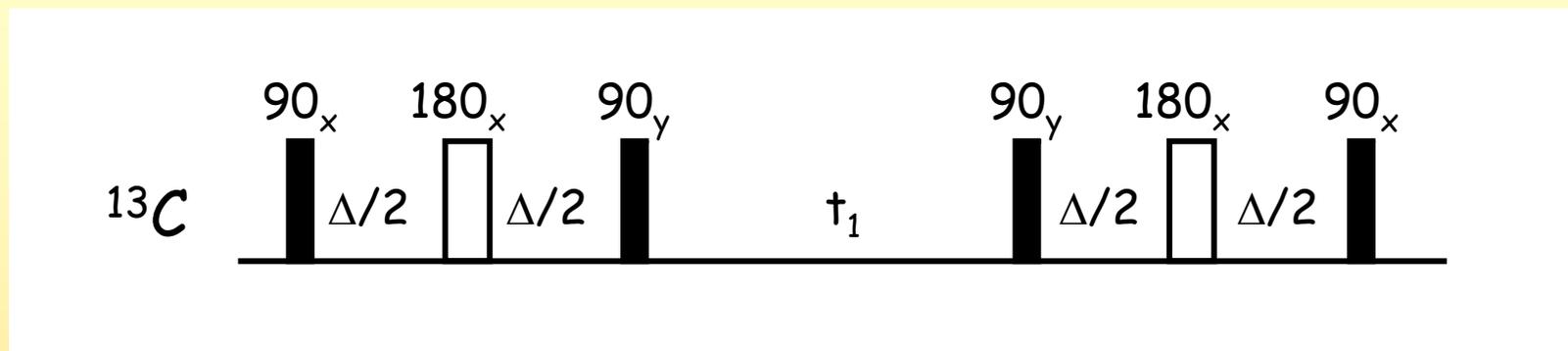


$$C_{\alpha z} \xrightarrow{90^\circ C_x} -C_{\alpha y} \xrightarrow{\pi J_{CC}\Delta}$$

$$-C_{\alpha y} \cos \pi J_{CC}\Delta + 2C_{\alpha x} C_{\beta z} \sin \pi J_{CC}\Delta$$

$$\xrightarrow{90^\circ C_y} -C_{\alpha y} \cos \pi J_{CC}\Delta - 2C_{\alpha z} C_{\beta x} \sin \pi J_{CC}\Delta$$

# Tripelresonanztechniken



$$-C_{\alpha\gamma} \cos \pi J_{CC} \Delta - 2C_{\alpha z} C_{\beta x} \sin \pi J_{CC} \Delta$$

$$\xrightarrow{\pi\Omega t_1} -C_{\alpha\gamma} \cos \pi J_{CC} \Delta \cos \pi\Omega^\alpha t_1 - 2C_{\alpha z} C_{\beta x} \sin \pi J_{CC} \Delta \cos \pi\Omega^\beta t_1$$

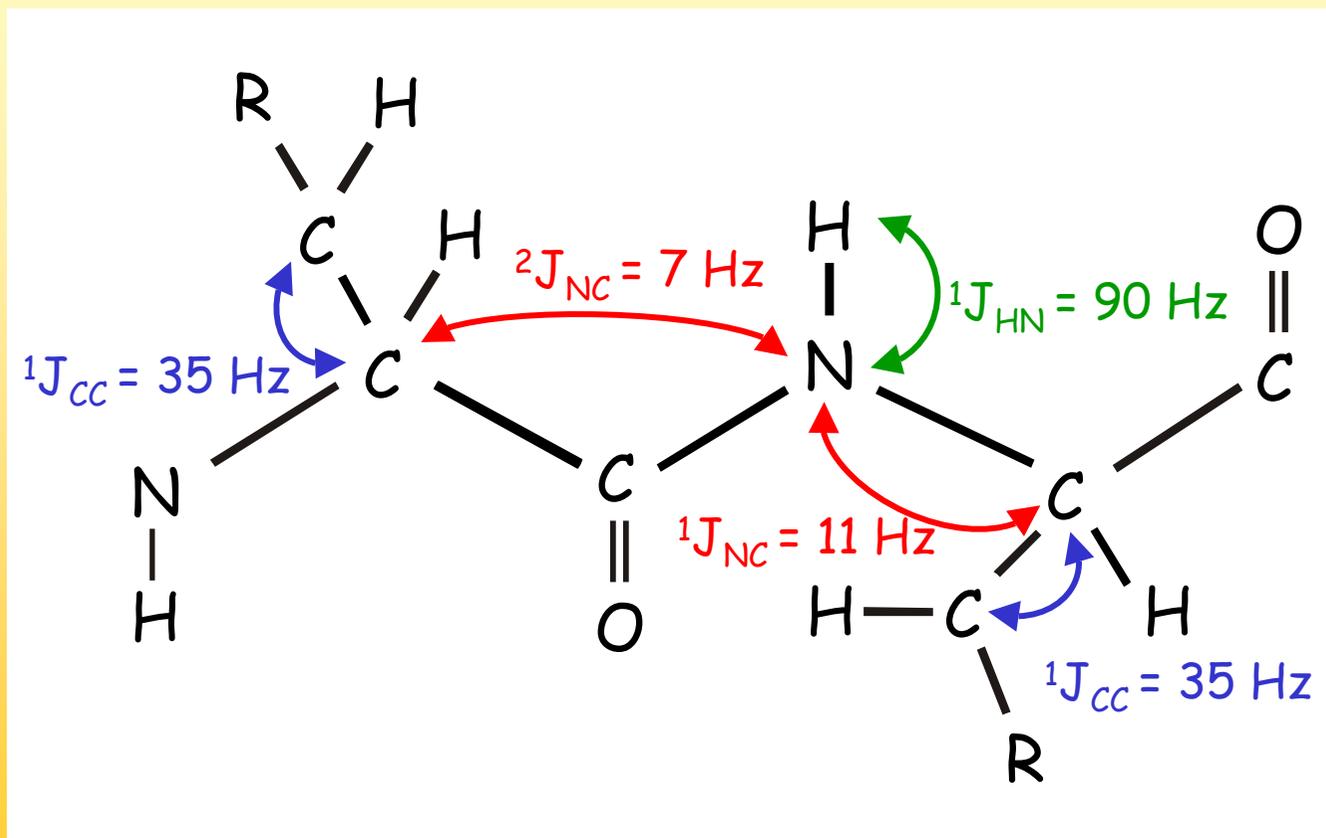
$$\xrightarrow{90^\circ C_y} -C_{\alpha\gamma} \cos \pi J_{CC} \Delta \cos \pi\Omega^\alpha t_1 + 2C_{\alpha x} C_{\beta z} \sin \pi J_{CC} \Delta \cos \pi\Omega^\beta t_1$$

$$\xrightarrow{\pi J_{CC} \Delta} -C_{\alpha\gamma} \cos^2 \pi J_{CC} \Delta \cos \pi\Omega^\alpha t_1 + C_{\alpha\gamma} \sin^2 \pi J_{CC} \Delta \cos \pi\Omega^\beta t_1$$



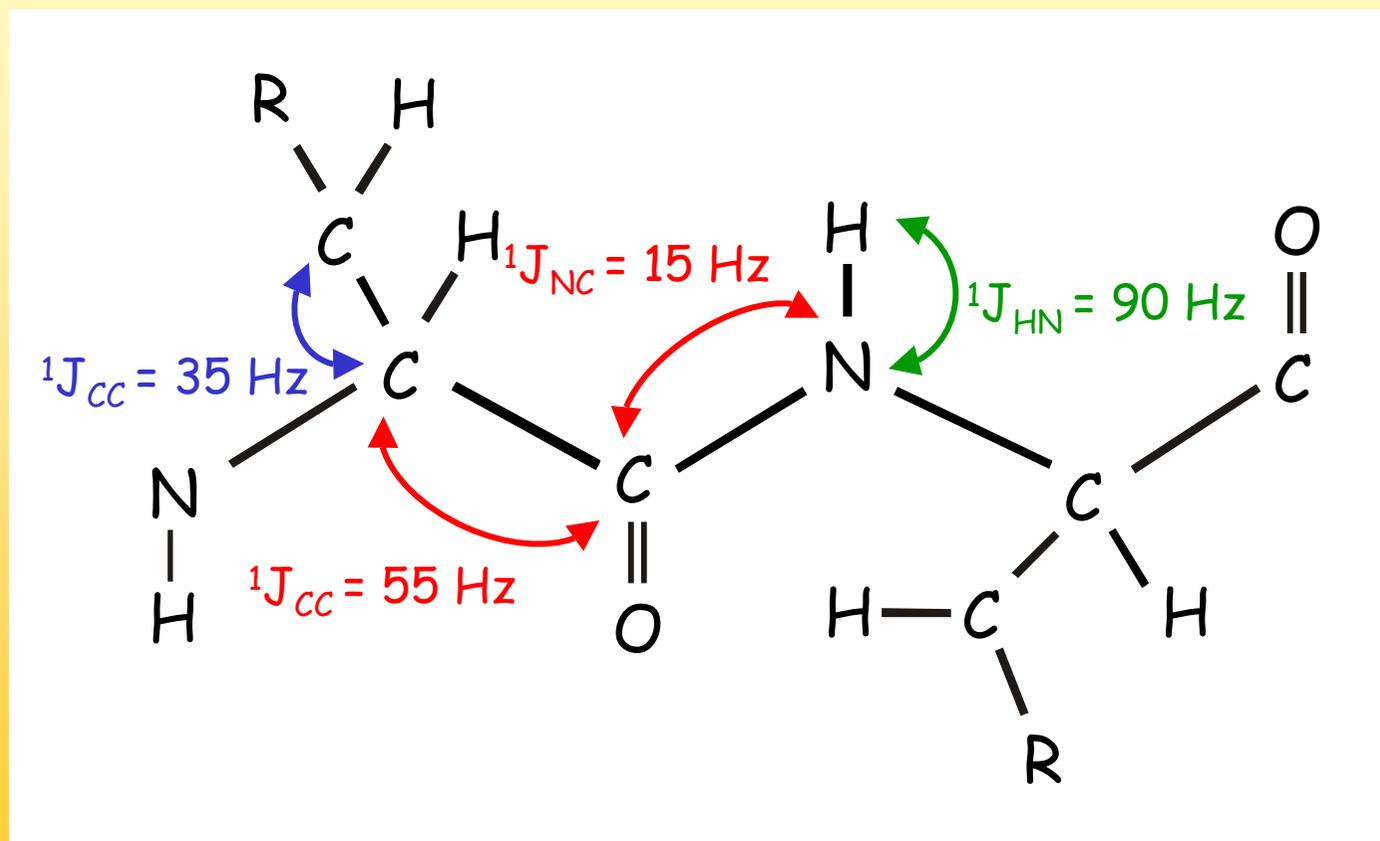
# Tripelresonanztechniken

## HNCACB



# Tripelresonanztechniken

## HN(CO)CACB



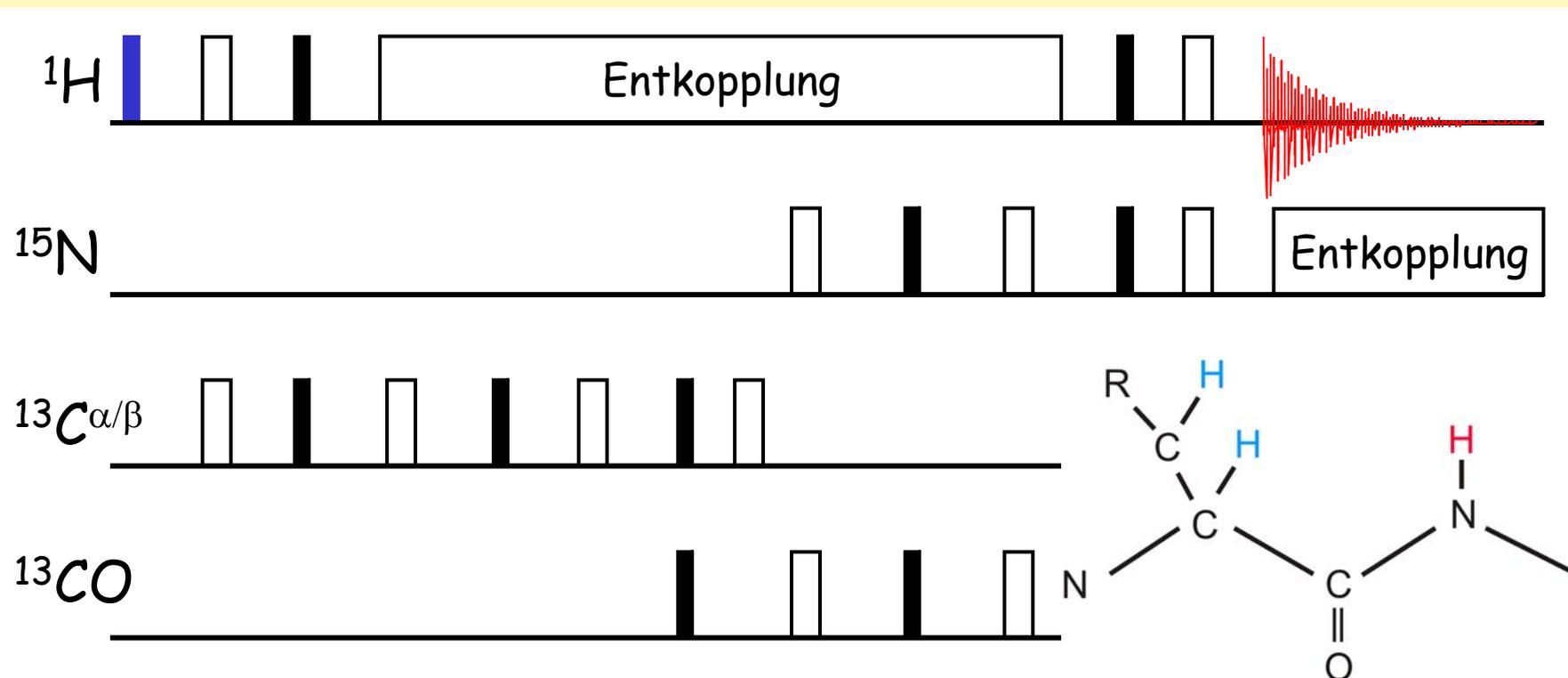
## Tripelresonanztechniken

Die Namen der Experimente ergeben sich aus der bisherigen Logik der Namensgebung. Allerdings kann man die gleichen Spektren mit einem kompakteren Paar an Pulssequenzen erhalten, die mit den C-gebundenen Protonen starten.

Das sind das  $CBCA(CO)NNH$  und das  $CBCANNH$ . Wie die beiden arbeiten wollen wir uns jetzt schematisch anschauen

# Tripelresonanztechniken

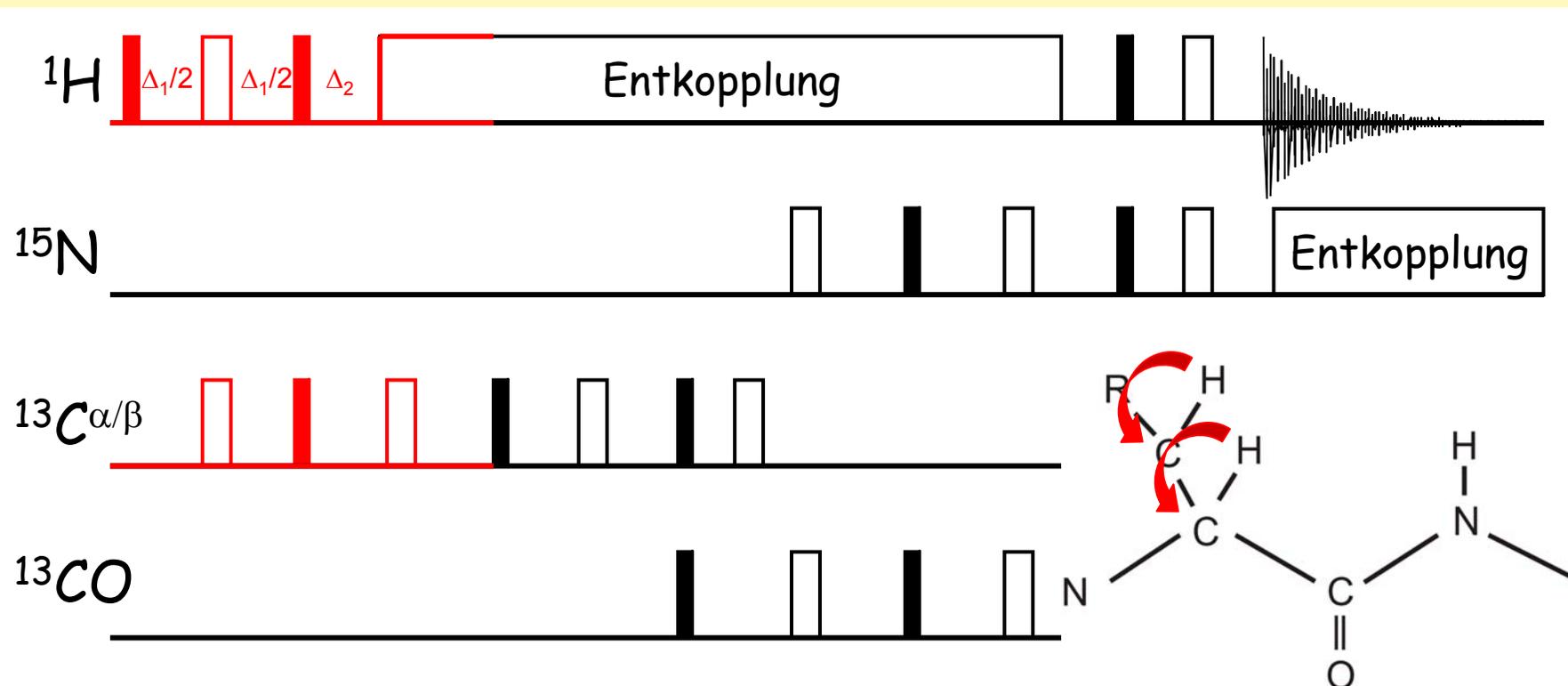
## CBCA(CO)NNH



Beginn und Detektion auf dem Proton: Empfindlichkeit !

# Tripelresonanztechniken

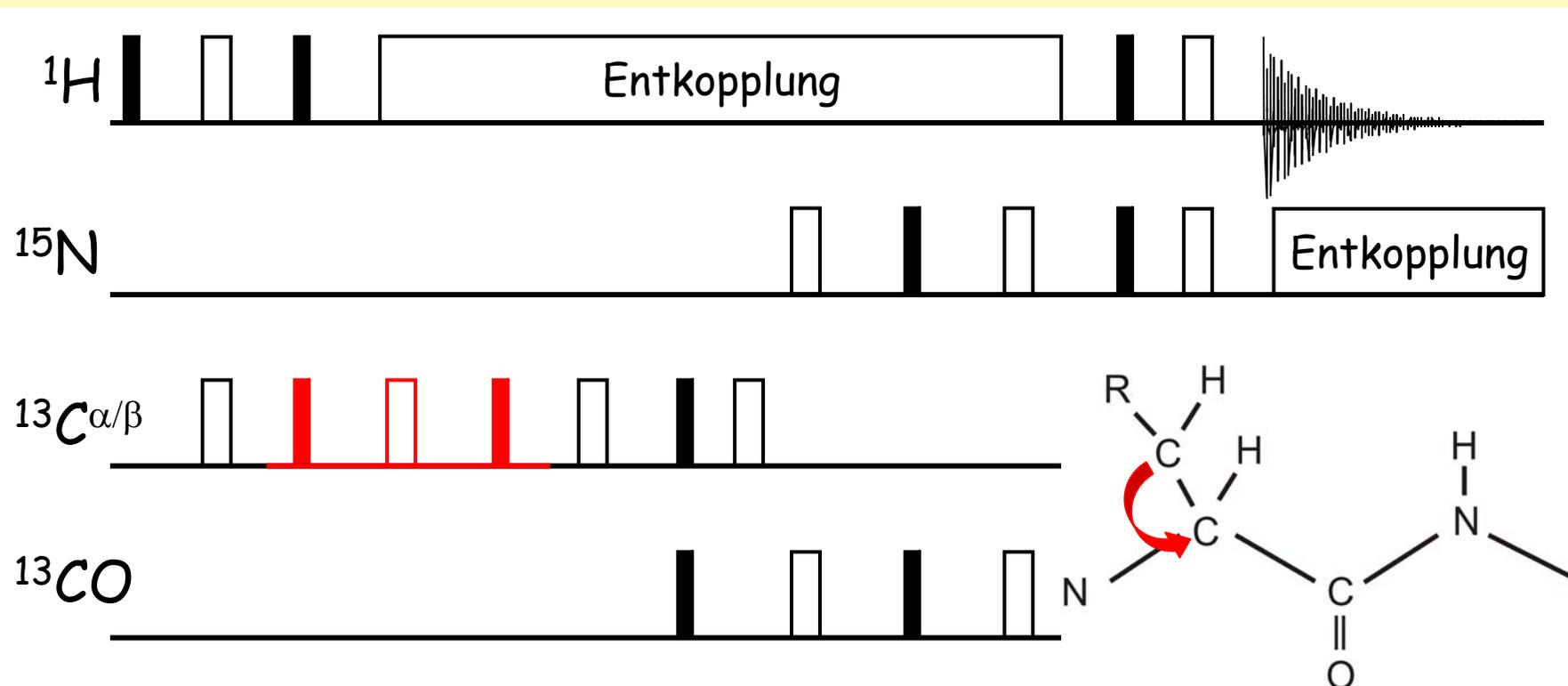
## CBCA(CO)NNH



INEPT von Protonen zu Kohlenstoffen

# Tripelresonanztechniken

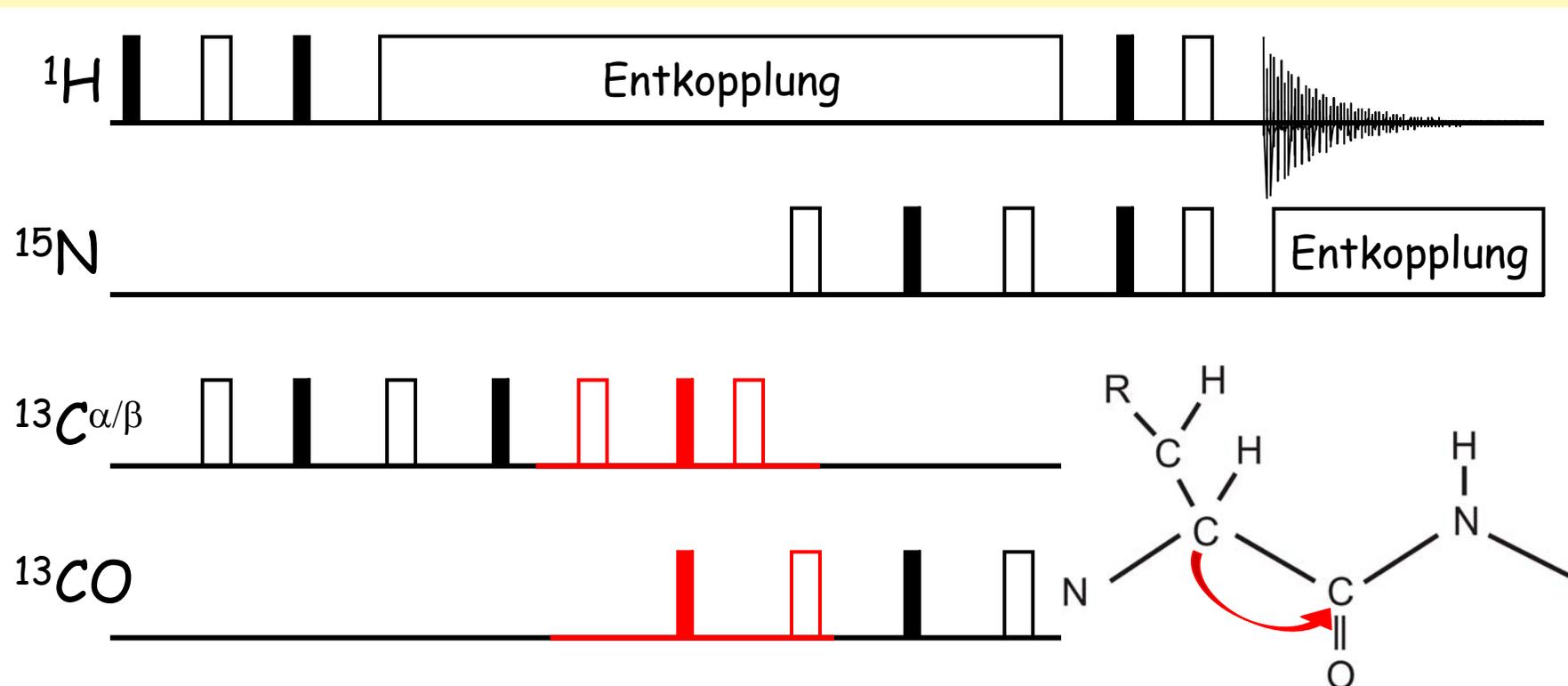
## CBCA(CO)NNH



**COSY von Kohlenstoff zu Kohlenstoff**

# Tripelresonanztechniken

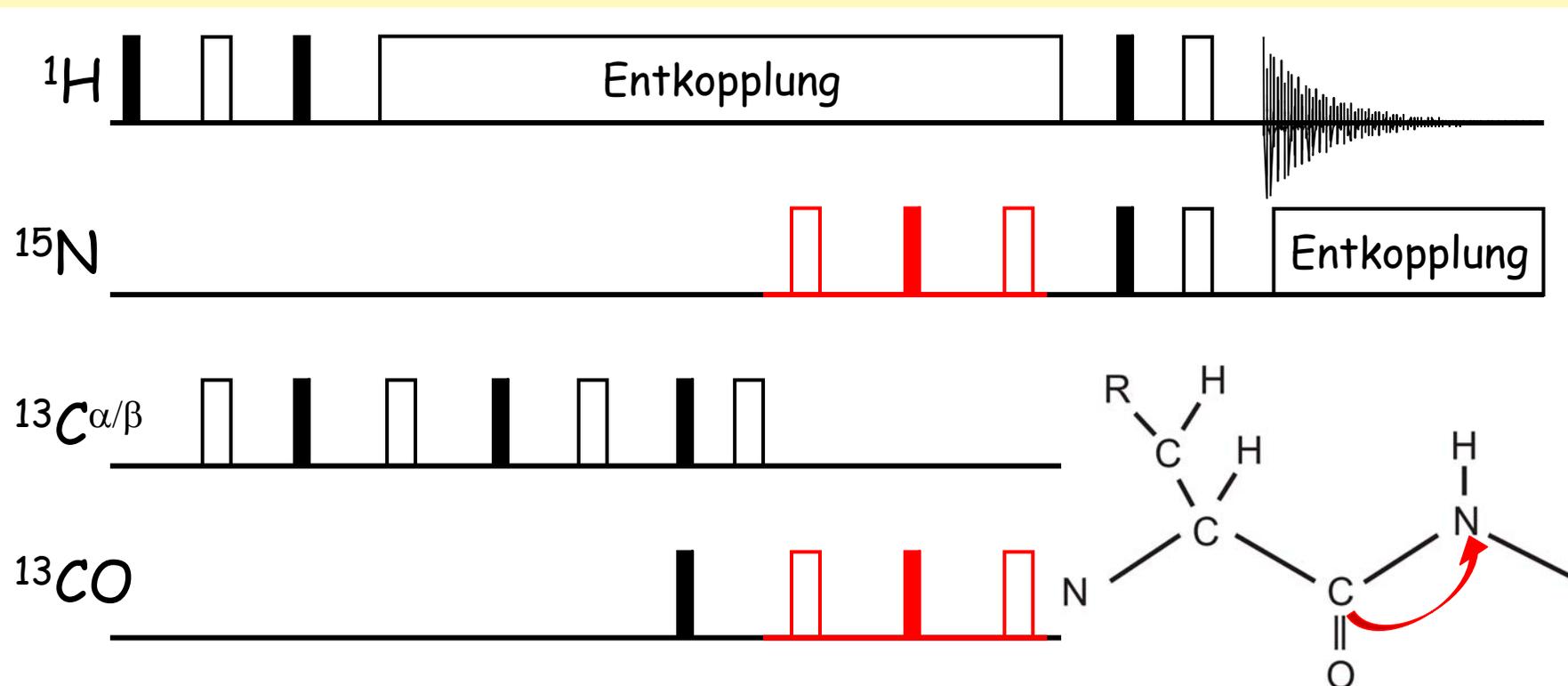
## CBCA(CO)NNH



INEPT von aliphatischem C zu Carbonyl-C

# Tripelresonanztechniken

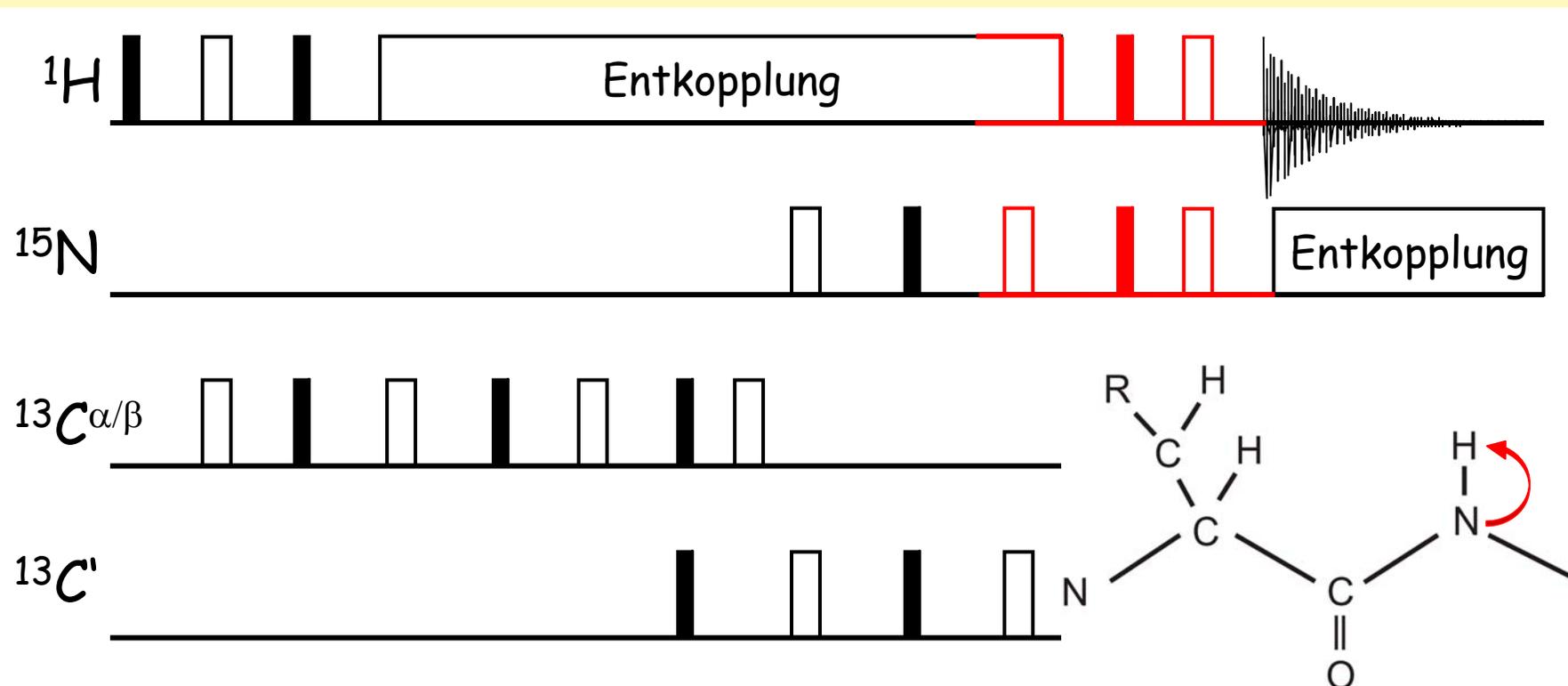
## CBCA(CO)NNH



INEPT von Carbonyl-C zu Stickstoff

# Tripelresonanztechniken

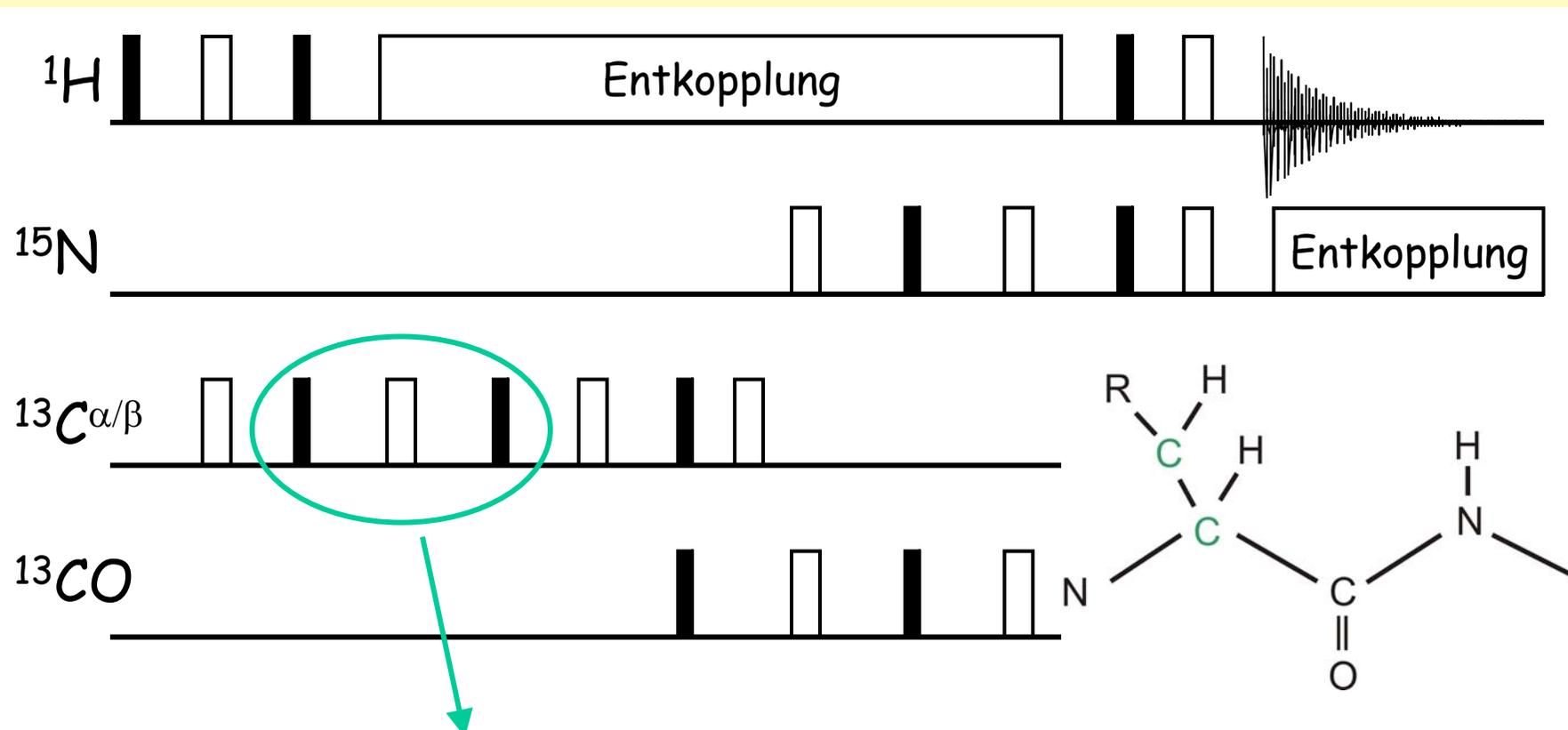
## CBCA(CO)NNH



INEPT von Stickstoff zu Aminoproton

# Tripelresonanztechniken

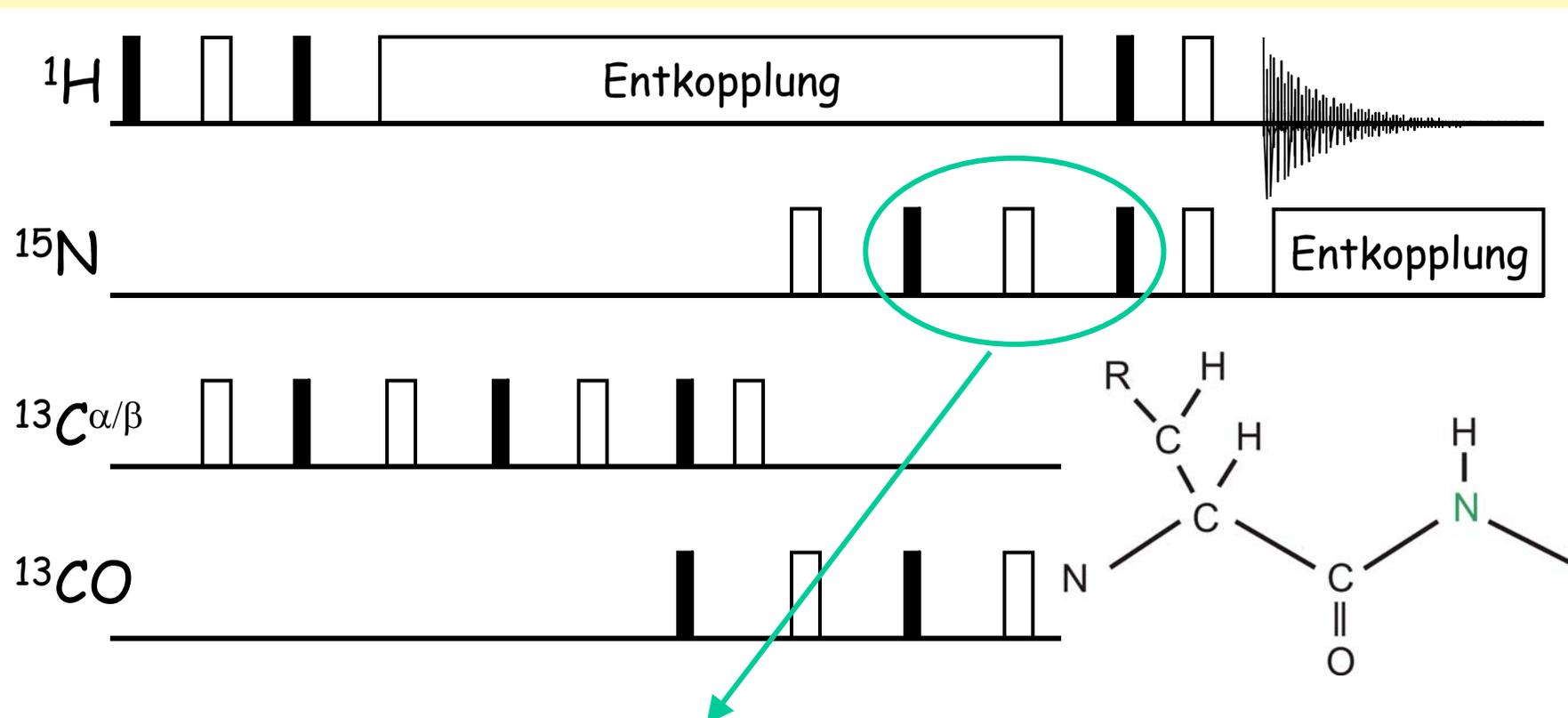
## CBCA(CO)NNH



1.Evolution: chemische Verschiebung von aliphatischen C, als „constant time“ Experiment

# Tripelresonanztechniken

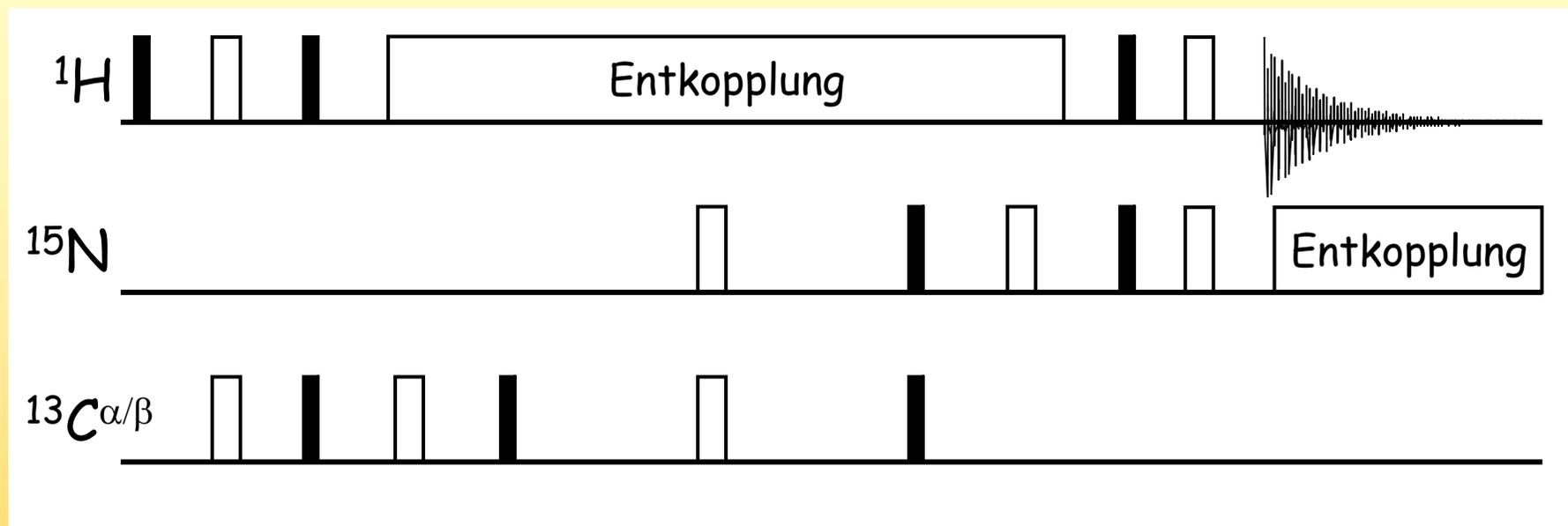
## CBCA(CO)NNH



2.Evolution: chemische Verschiebung von Stickstoff, als „constant time“ Experiment

# Tripelresonanztechniken

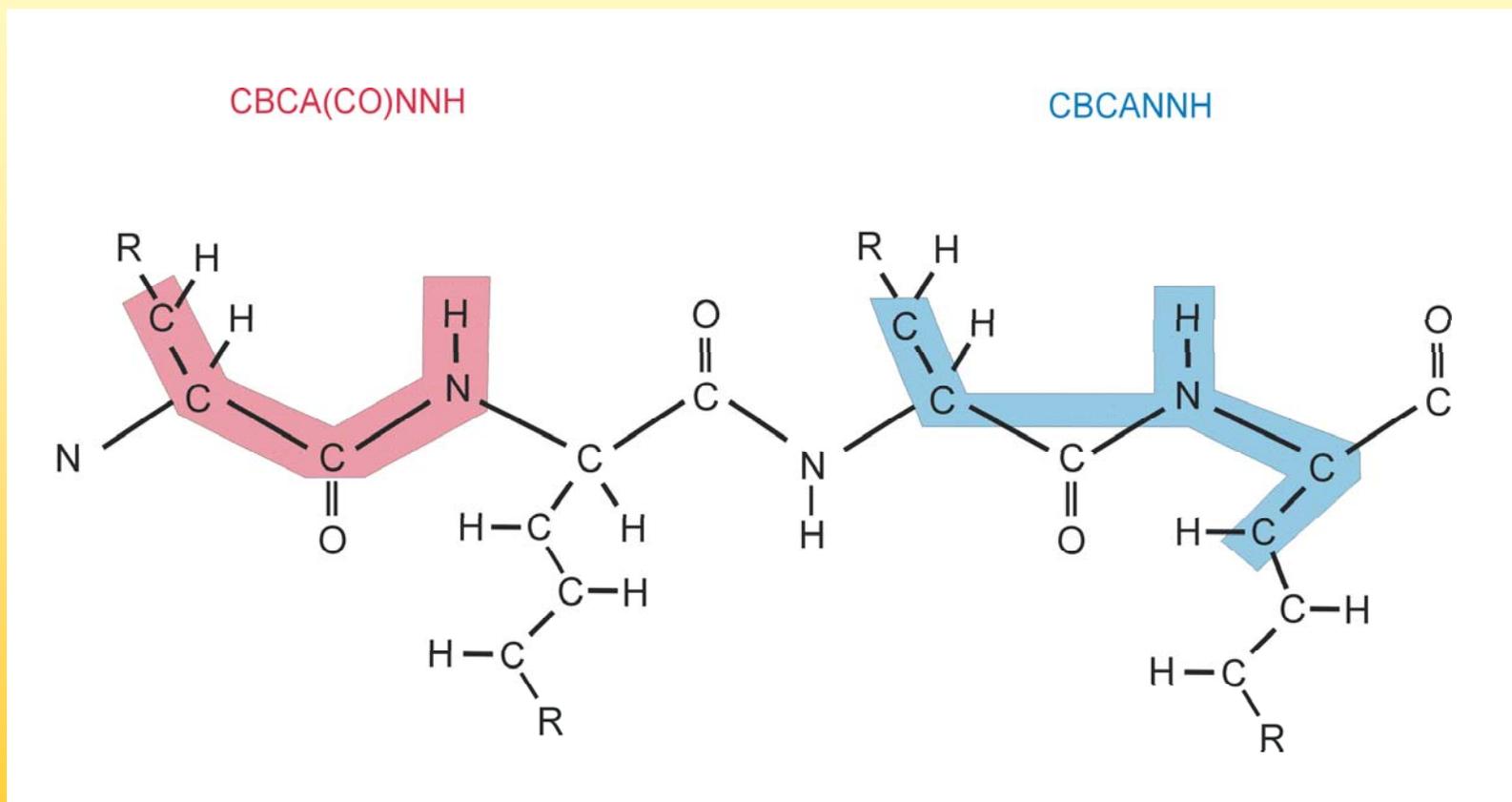
## CBCANNH



Hier wird wieder die Kopplung zwischen  $\text{C}^{\alpha}$  und N genutzt, also sind wieder zwei Wege für den Magnetisierungstransfer vorhanden und es sollten 4 Signale werden

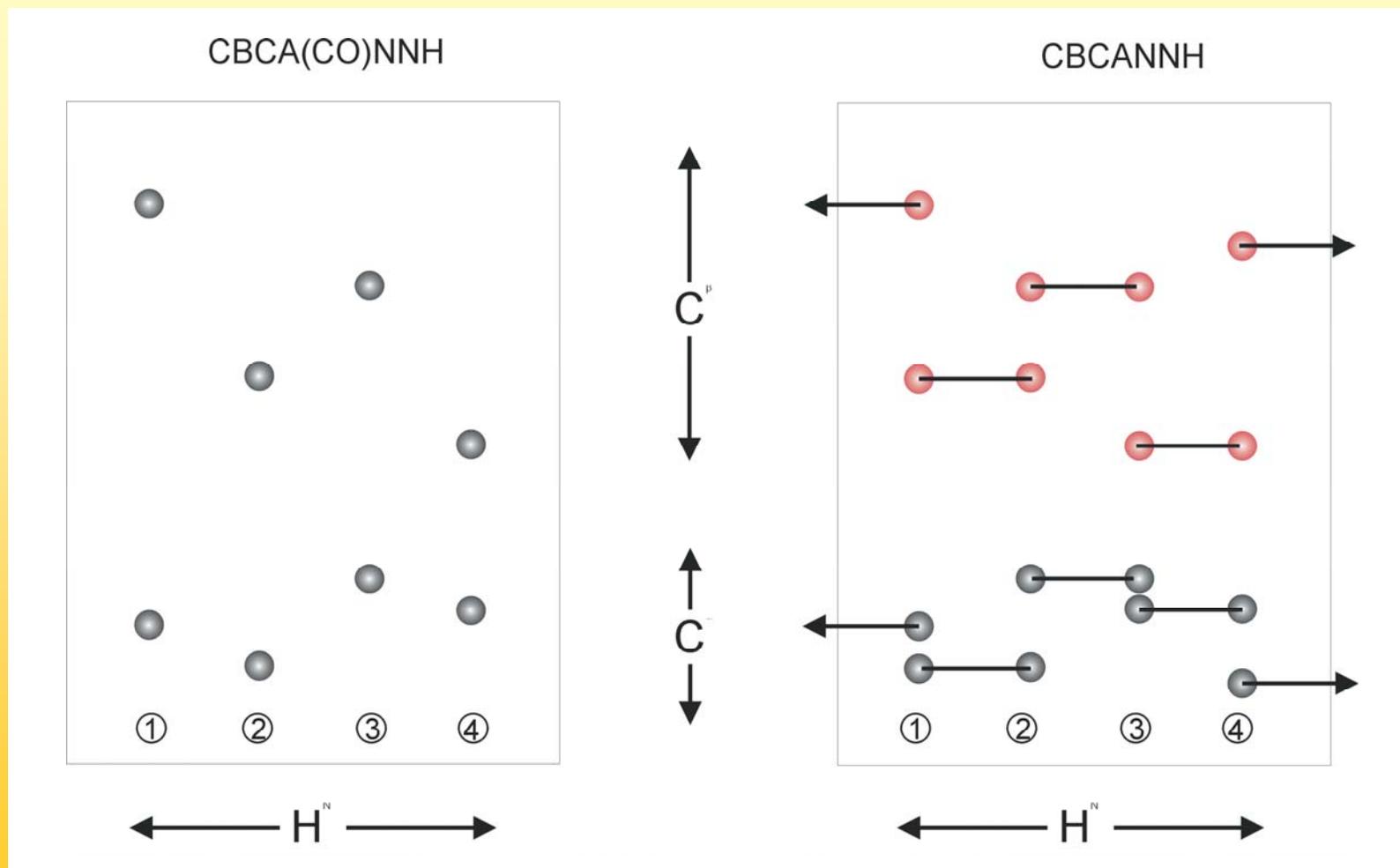
# Tripelresonanztechniken

## Sequentielle Zuordnung



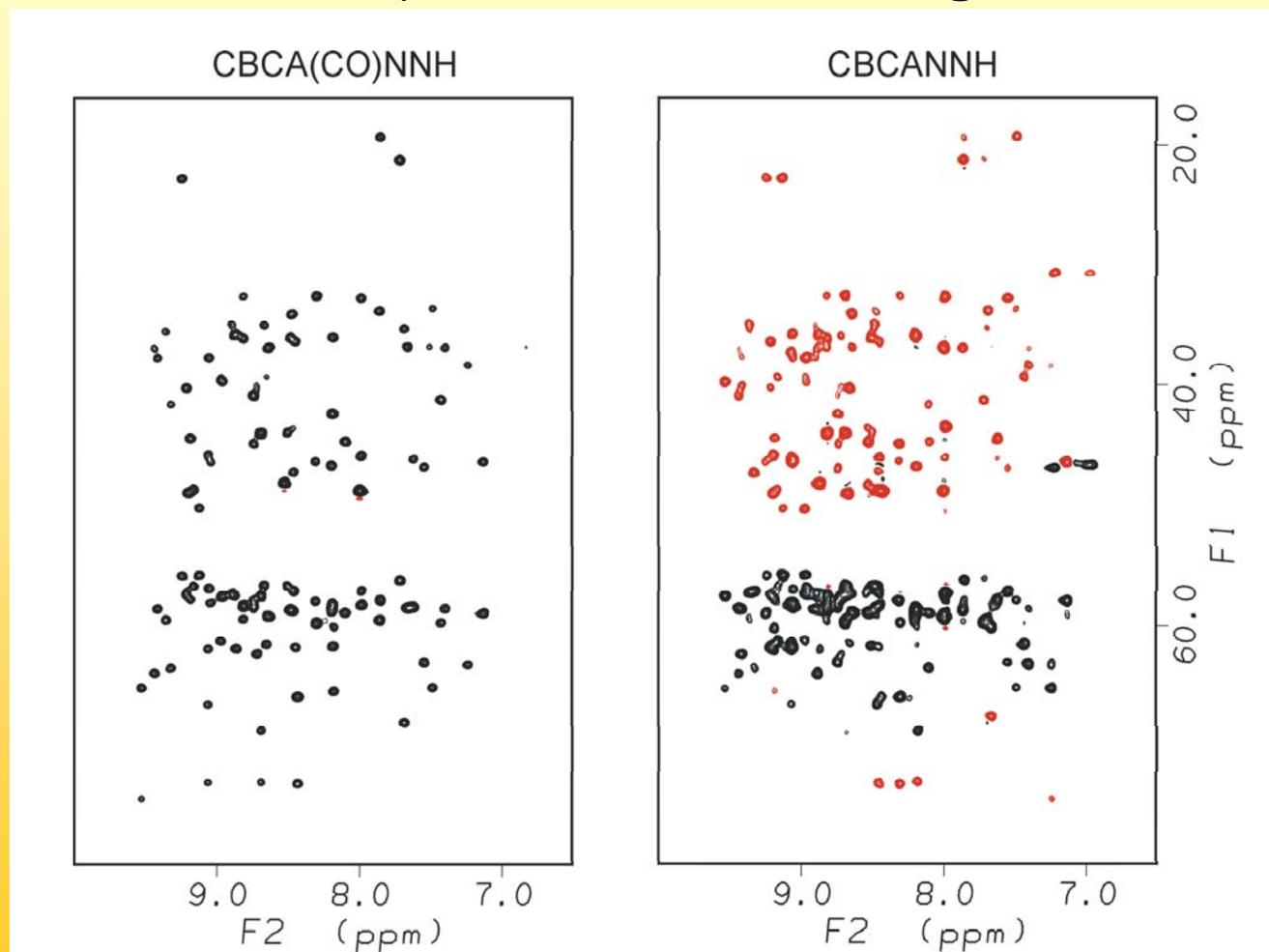
# Tripelresonanztechniken

## Sequentielle Zuordnung



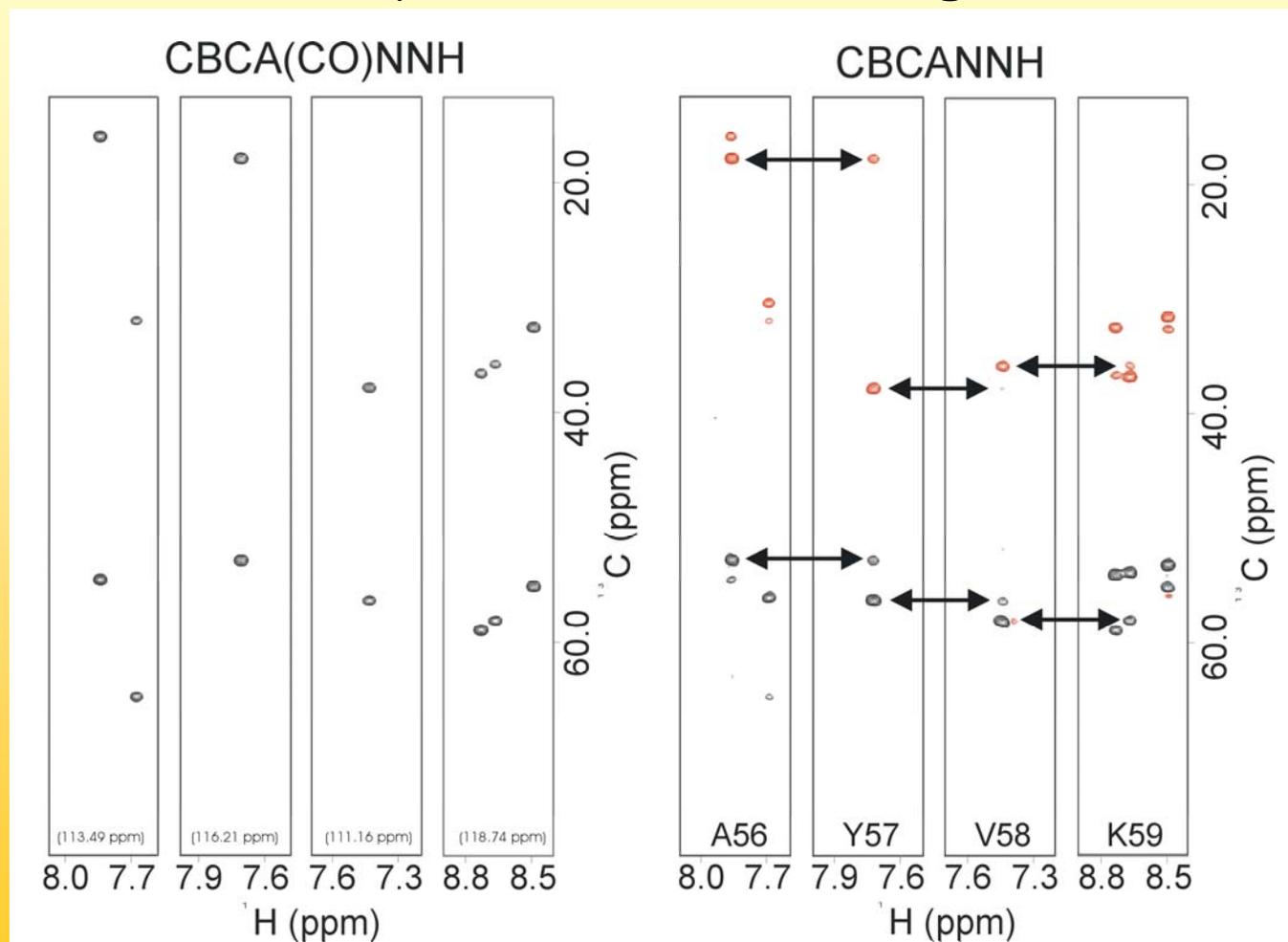
# Tripelresonanztechniken

## Sequentielle Zuordnung



# Tripelresonanztechniken

## Sequentielle Zuordnung



## Tripelresonanztechniken

Mit den beiden Experimenten sind wieder sequentielle Nachbarschaften etabliert worden.

Um eine eindeutige Zuordnung zu machen muss man die Reihe der Aminosäuren mit der Sequenz abgleichen, d.h.

man braucht Information über den Aminosäuretyp

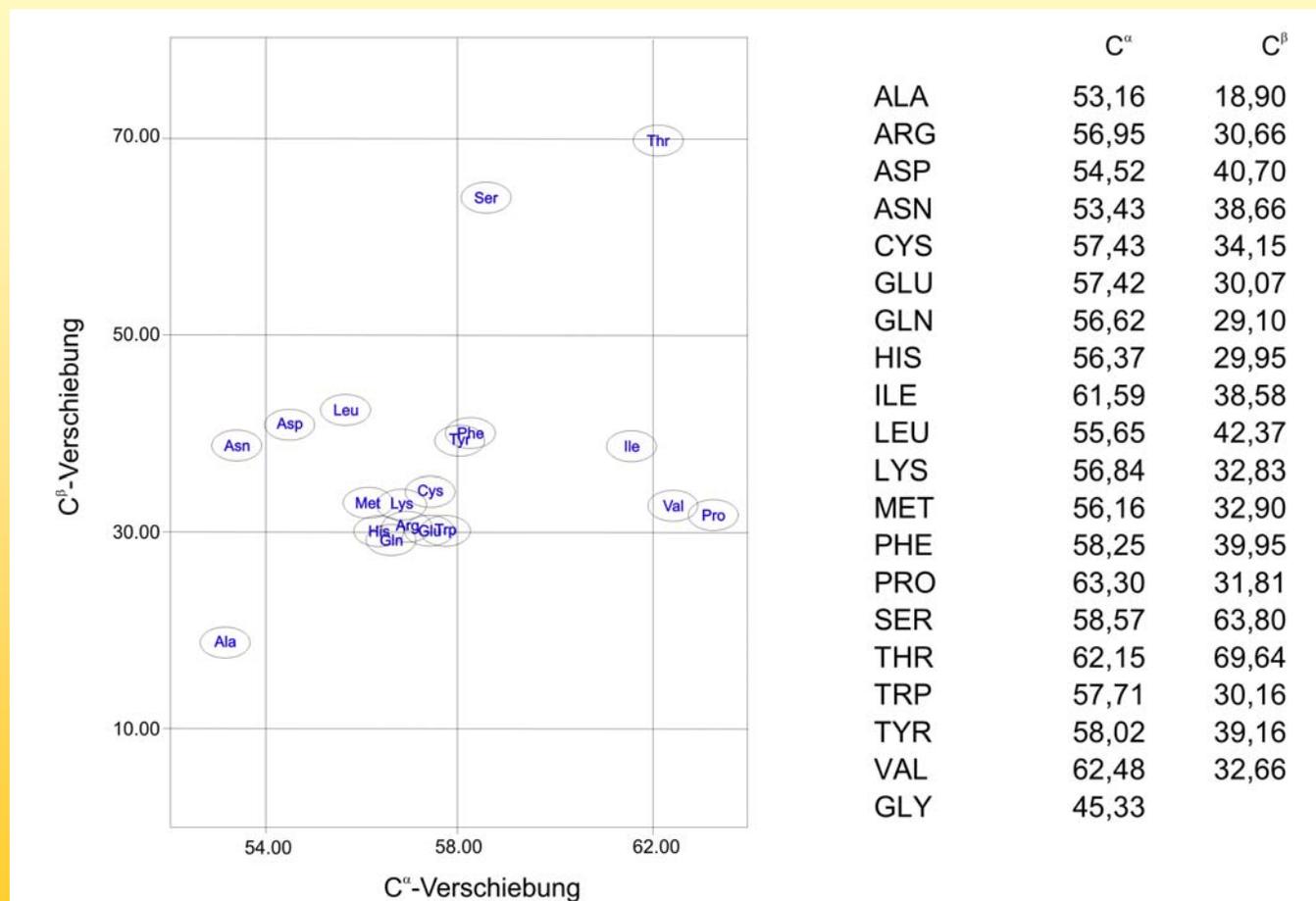
Die bekommt man entweder aus den Spinsystemen der

Seitenketten (siehe unten) oder aus den chemischen

Verschiebungen von  $C\alpha$  und  $C\beta$ .

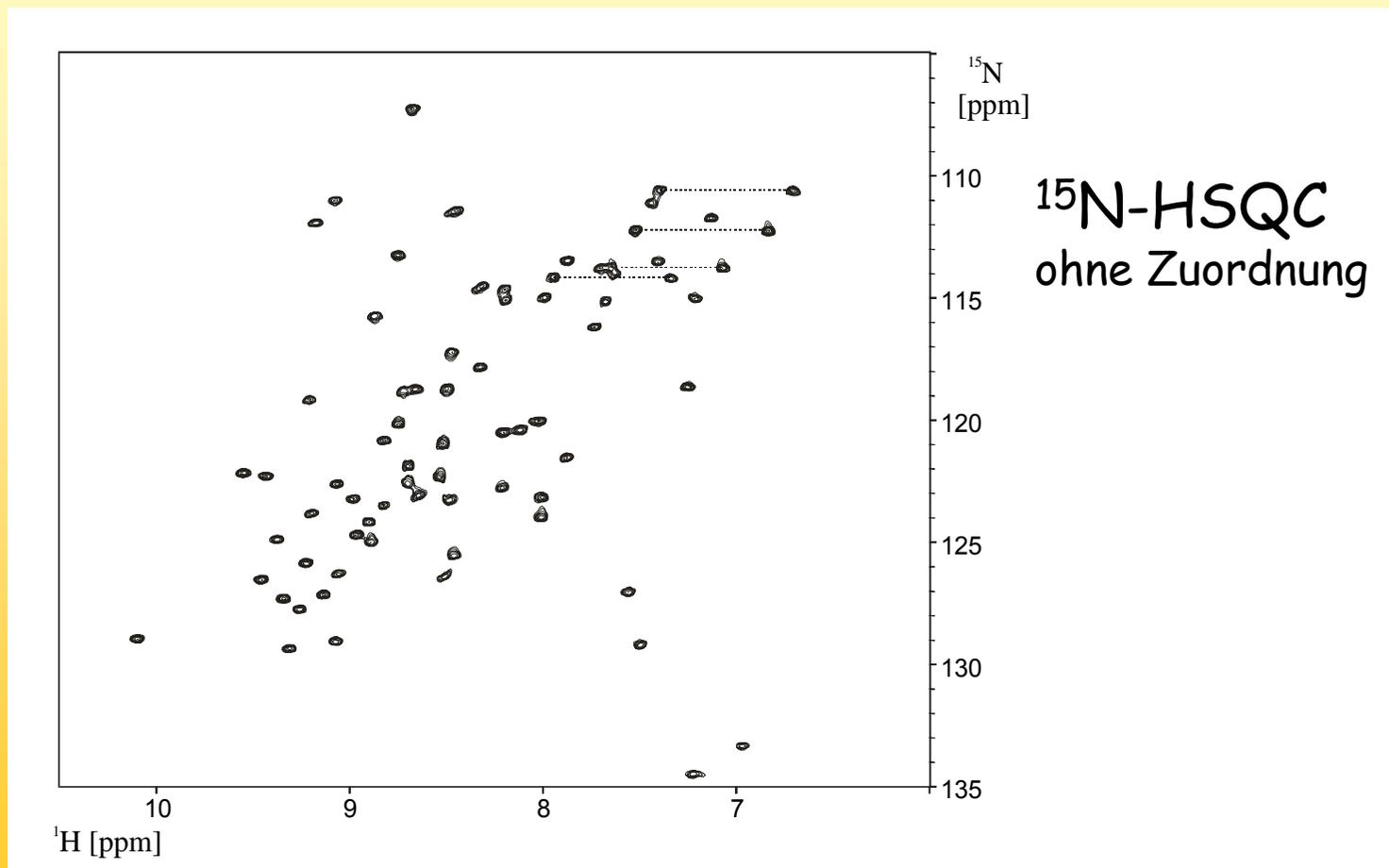
# Tripelresonanztechniken

## Aminosäuretyp-Bestimmung



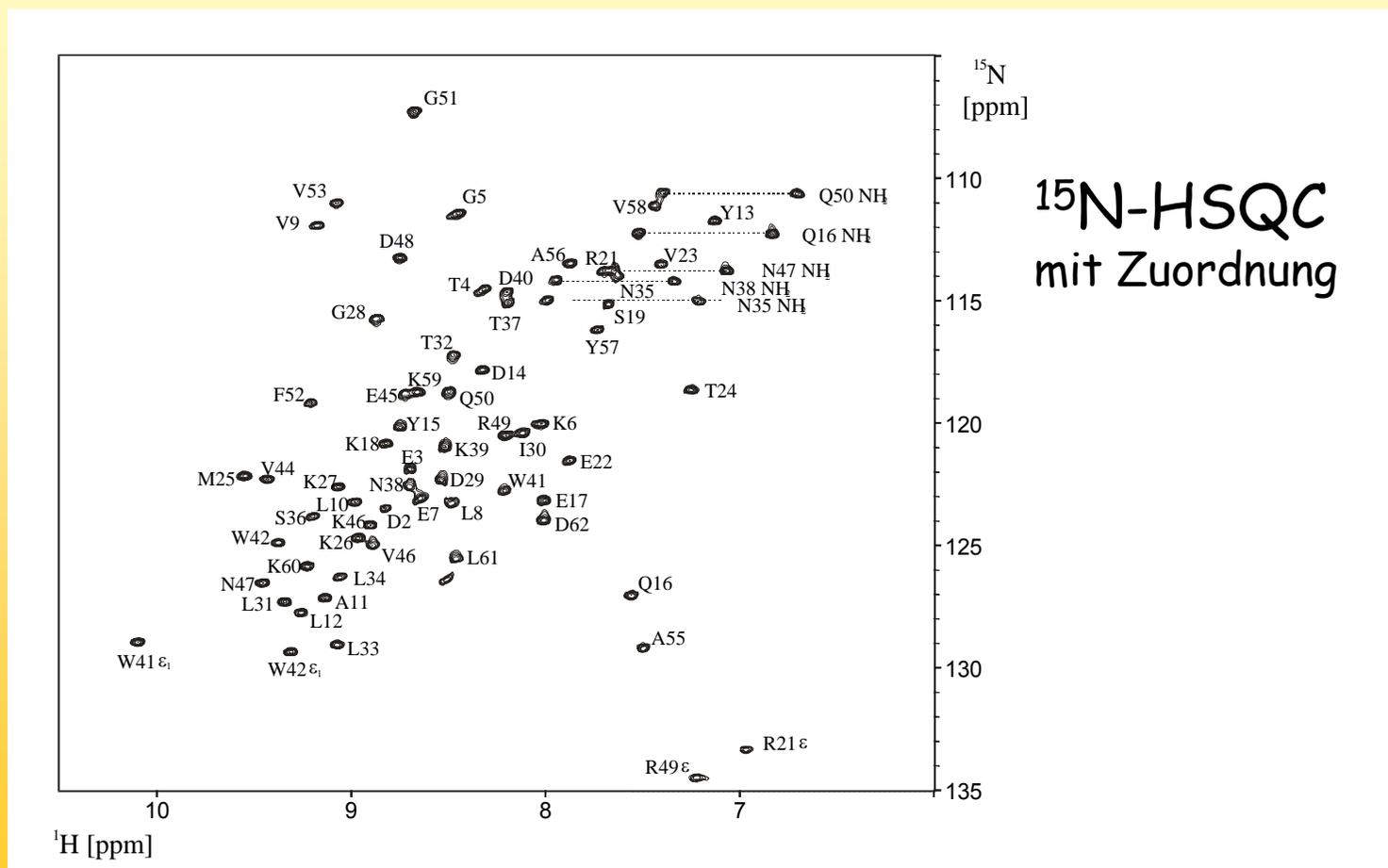
# Tripelresonanztechniken

## „backbone“-Zuordnung



# Tripelresonanztechniken

## „backbone“-Zuordnung



## Tripelresonanztechniken

Diese „backbone“-Zuordnung beinhaltet die Zuordnung der Aminoprotonen, der Stickstoffkerne und der beiden Kohlenstoffe  $C\alpha$  und  $C\beta$ .

Sie kann mit weiteren Tripelresonanzexperimenten auf die Seitenketten erweitert werden

HBHA(CO)NNH

$H\alpha$  und  $H\beta$

H(CCO)NNH-TOCSY

Protonen der Seitenkette

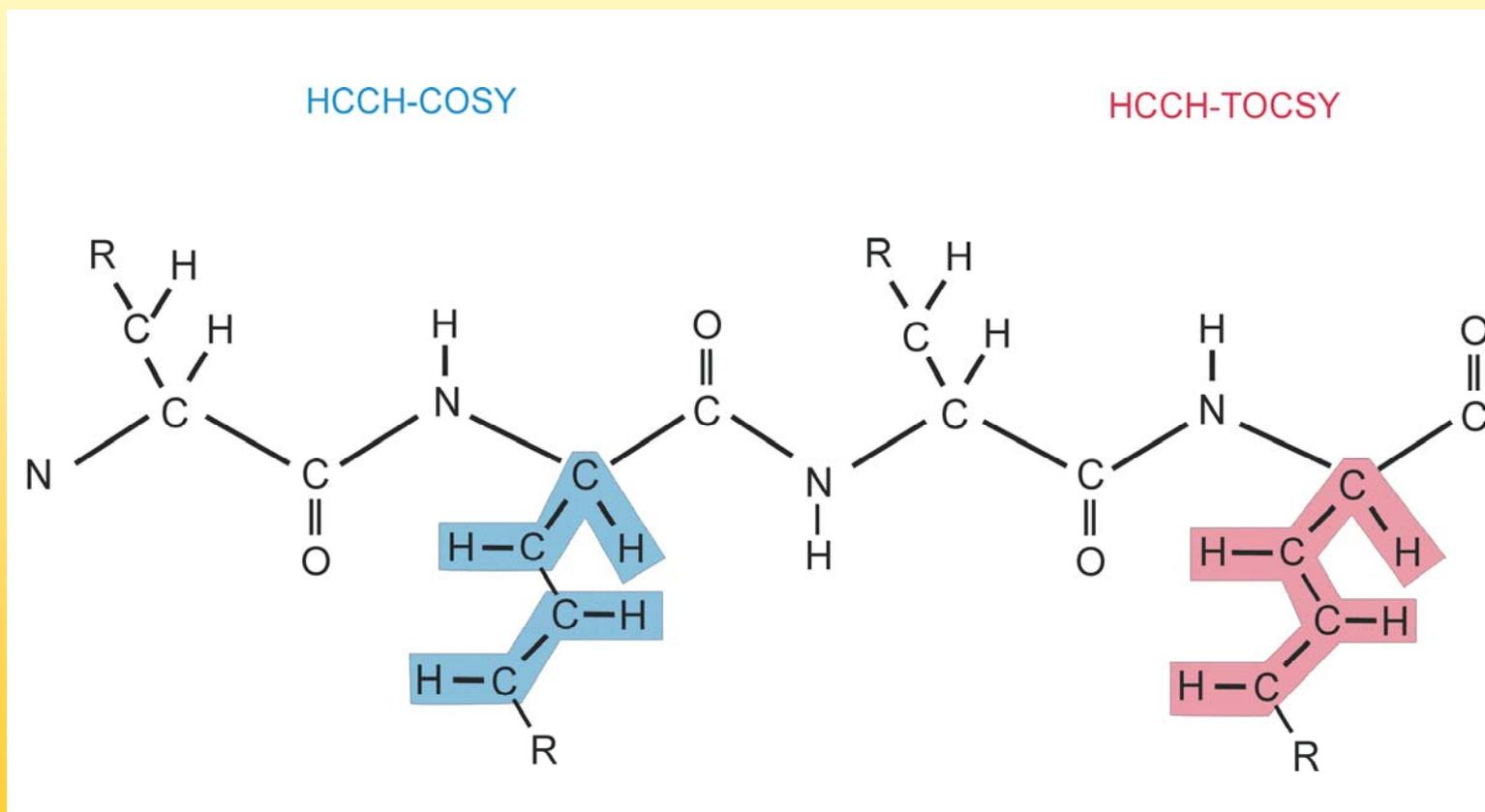
(H)C(CO)NNH-TOCSY

Kohlenstoffe der Seitenkette

Man führt aber auch noch eine andere Zuordnung durch

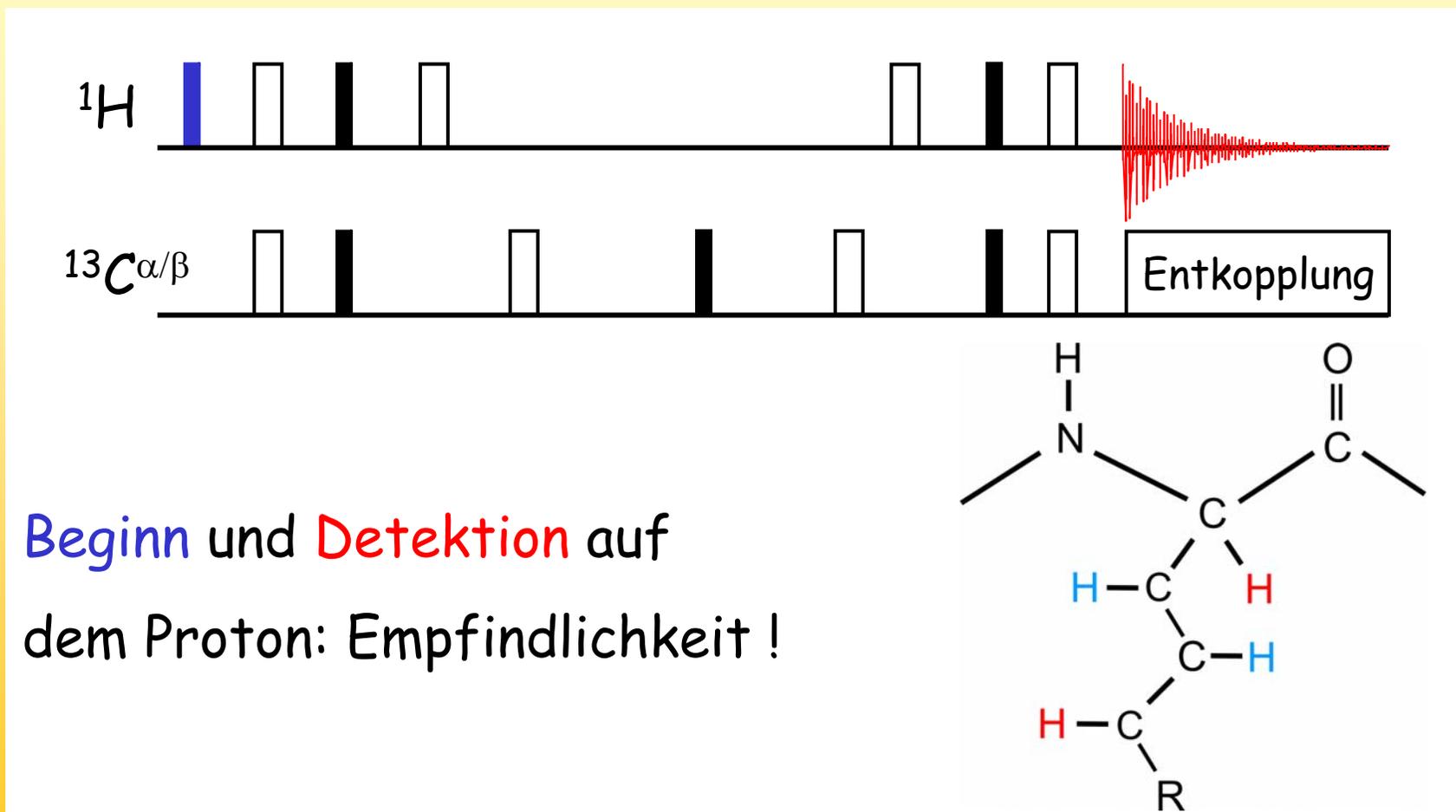
# Tripelresonanztechniken

## Seitenkettenzuordnung



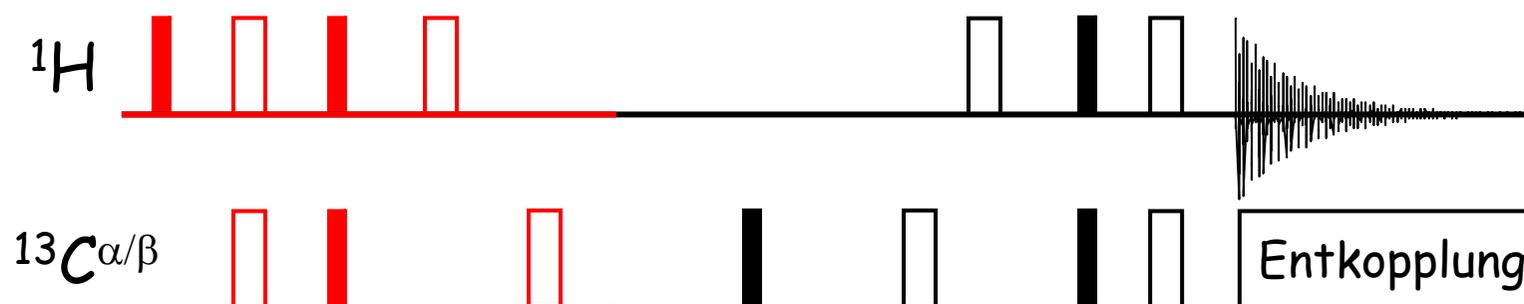
# Tripelresonanztechniken

## HCCH-COSY

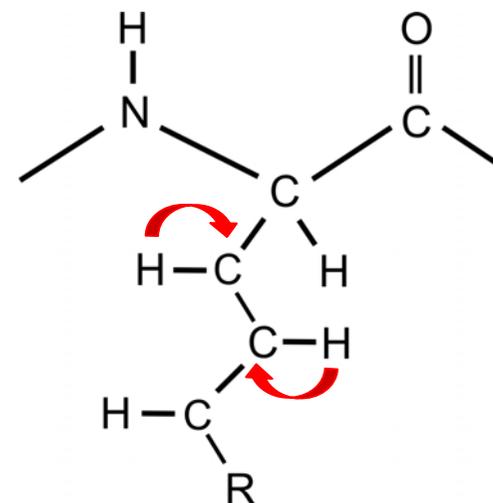


# Tripelresonanztechniken

## HCCH-COSY

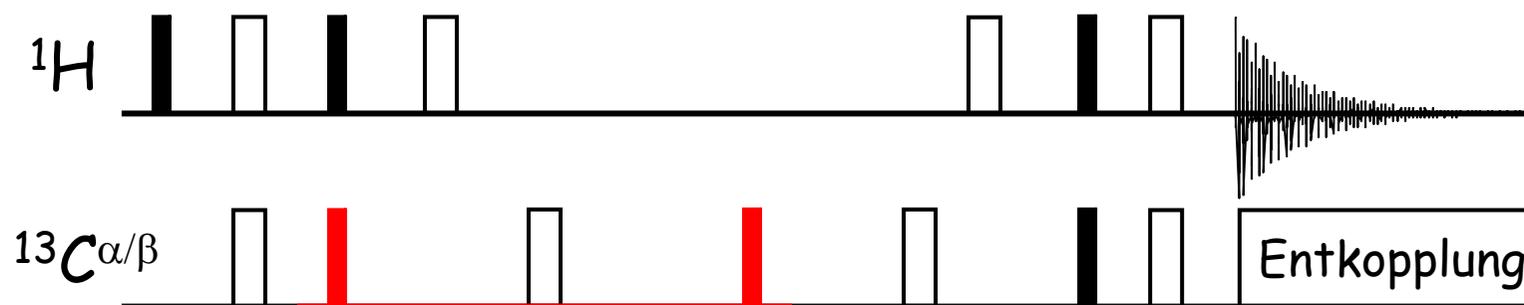


INEPT von Protonen  
zu Kohlenstoffen

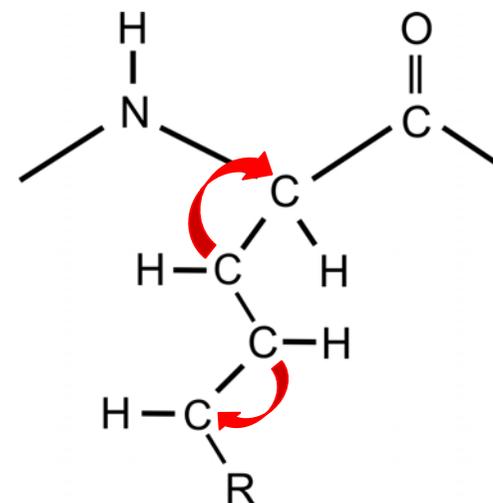


# Tripelresonanztechniken

## HCCH-COSY

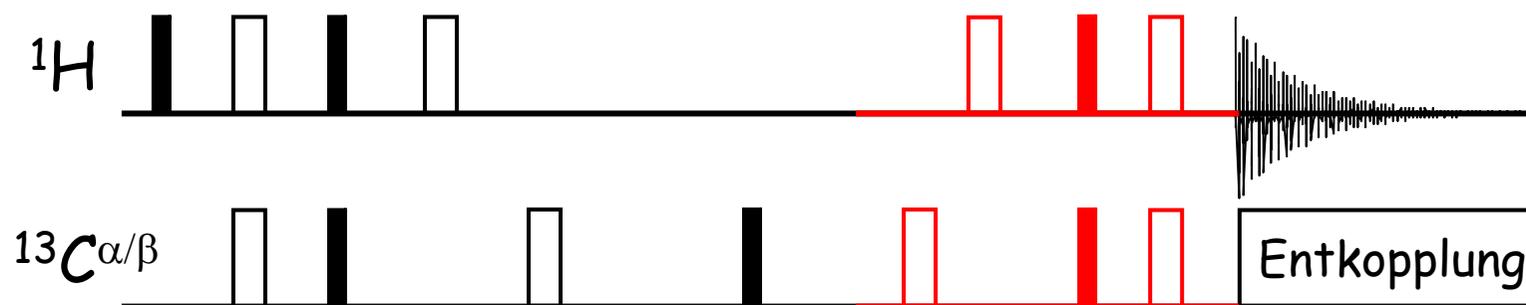


COSY von Kohlenstoff  
zu Kohlenstoff

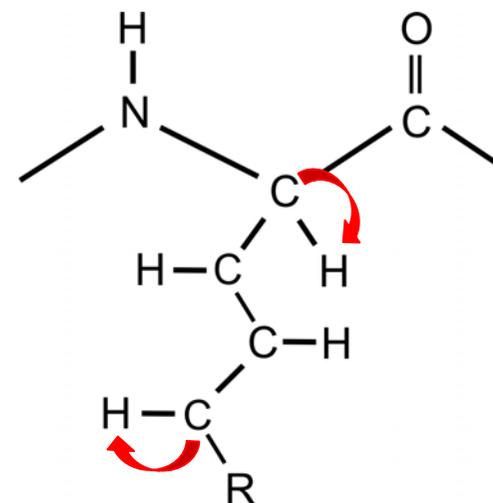


# Tripelresonanztechniken

## HCCH-COSY

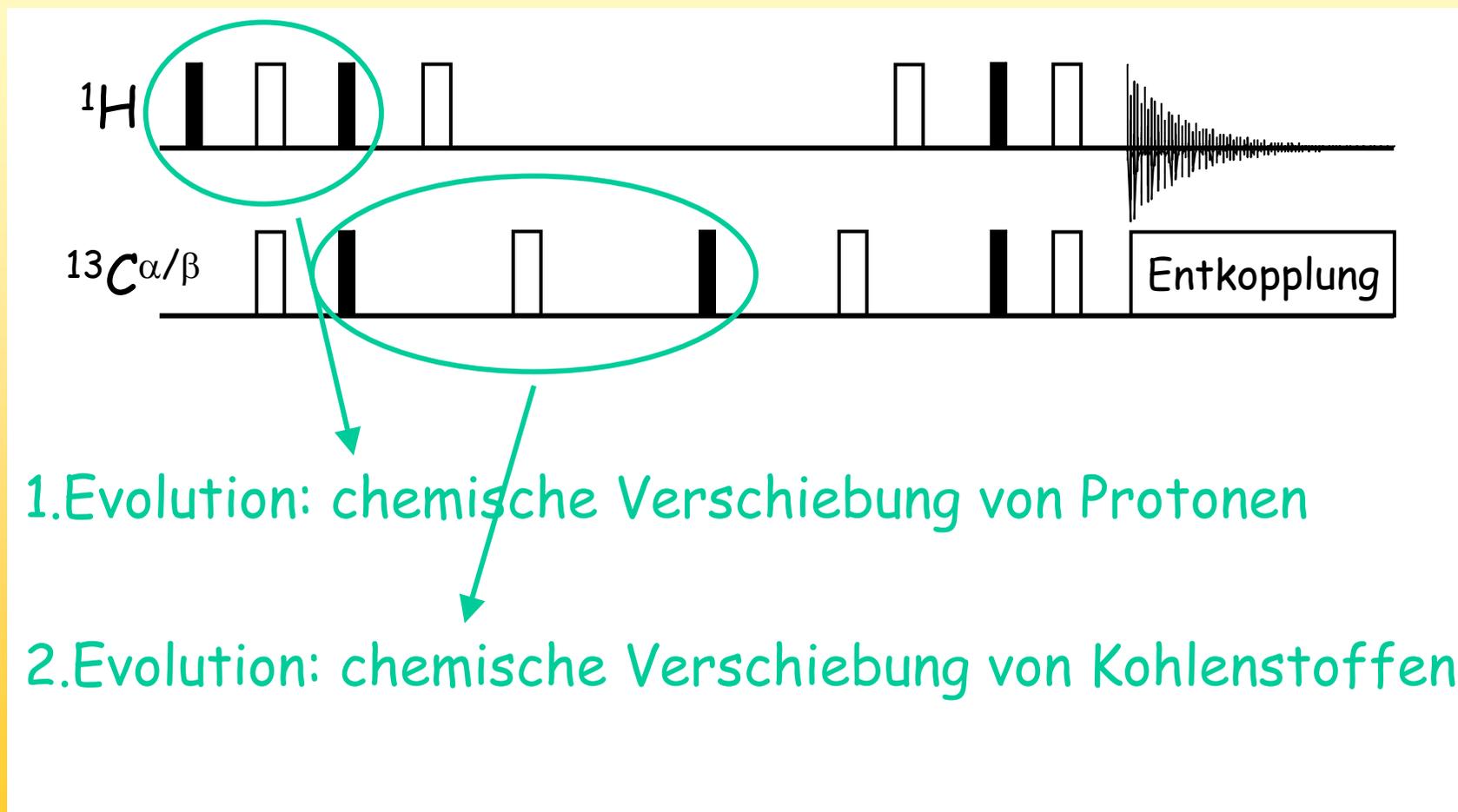


INEPT von Kohlenstoff  
zu Protonen



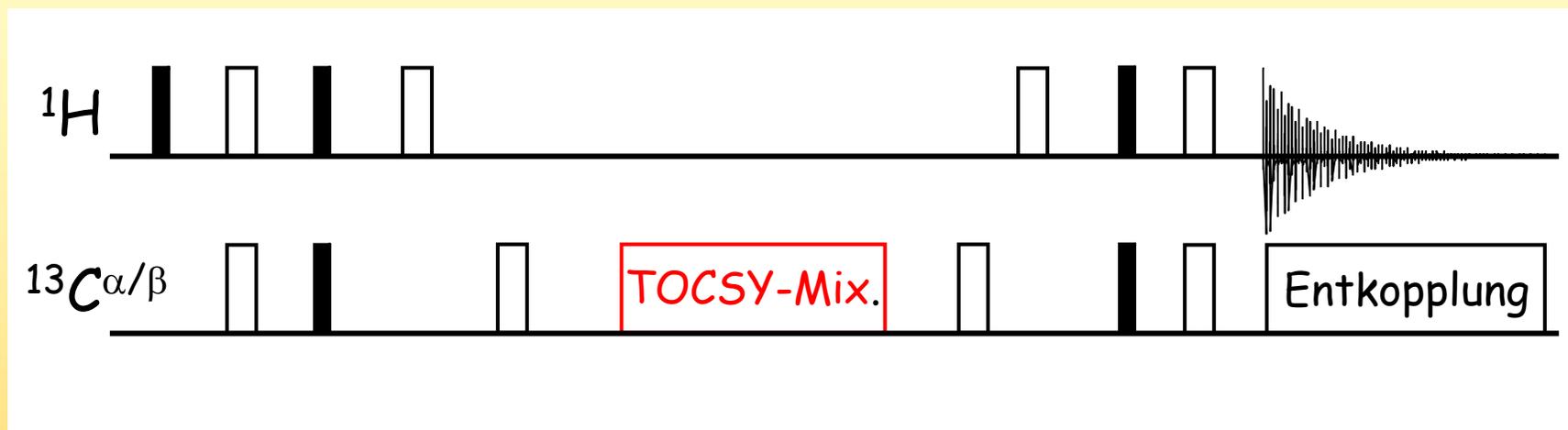
# Tripelresonanztechniken

## HCCH-COSY



# Tripelresonanztechniken

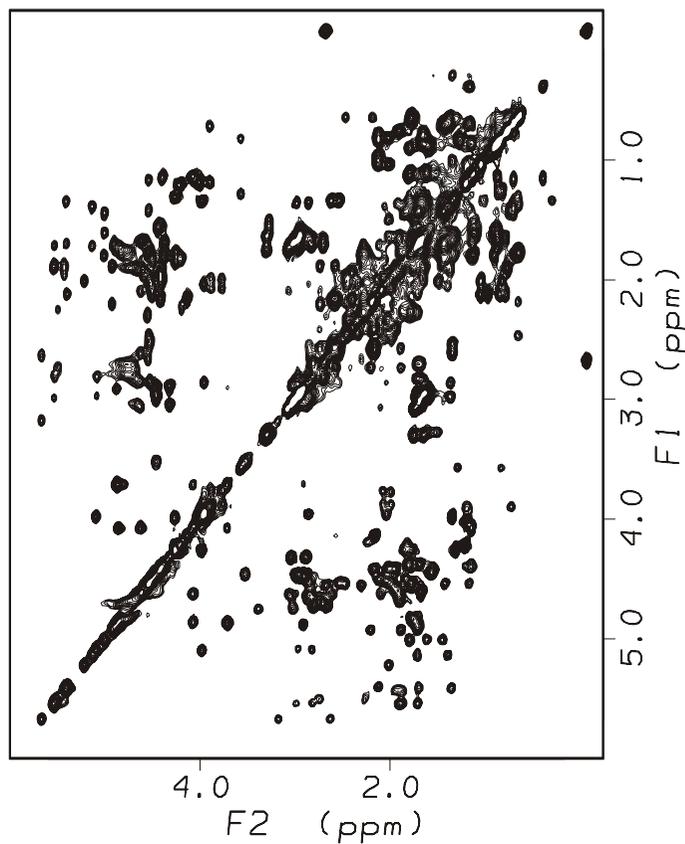
## HCCH-TOCSY



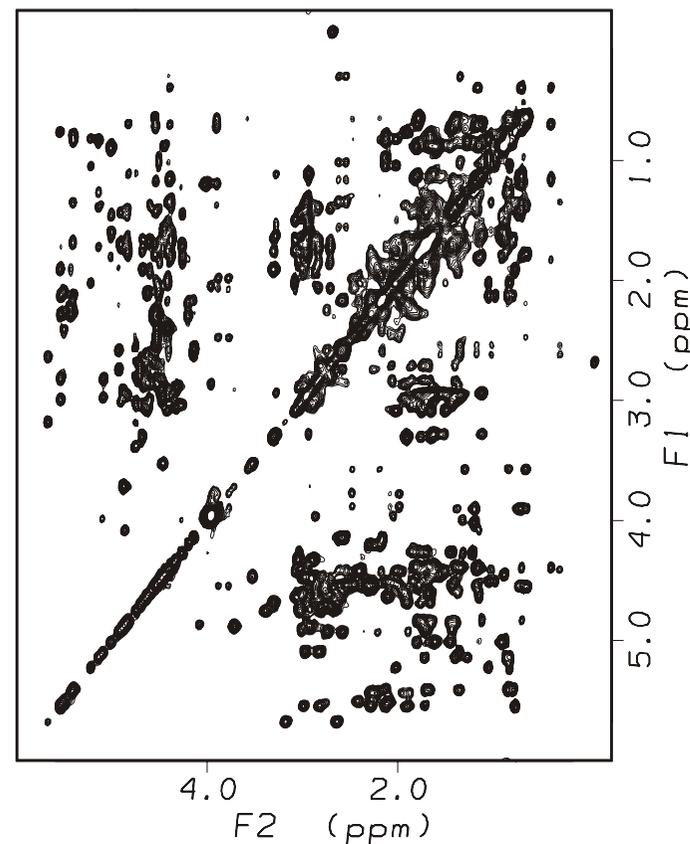
So wie im Protonen-Fall das COSY durch das TOCSY ergänzt werden kann um das ganze Spinsystem abzuklopfen geht das auch im Kohlenstoff-Fall. Ansonsten ist das Experiment wie das HCCH-COSY

# Tripelresonanztechniken

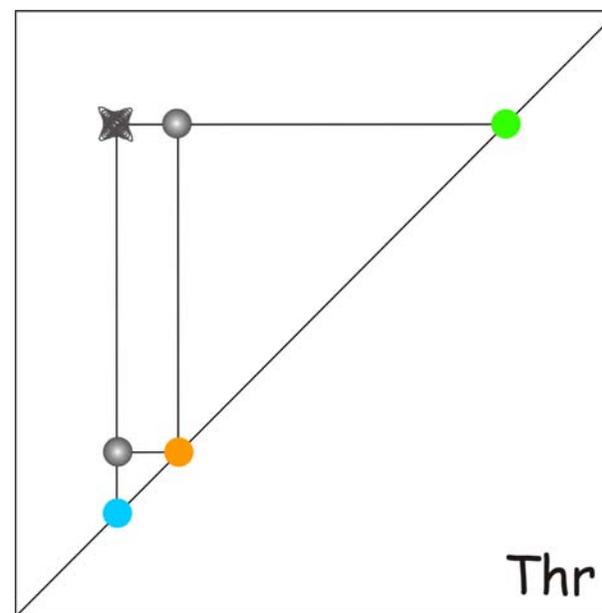
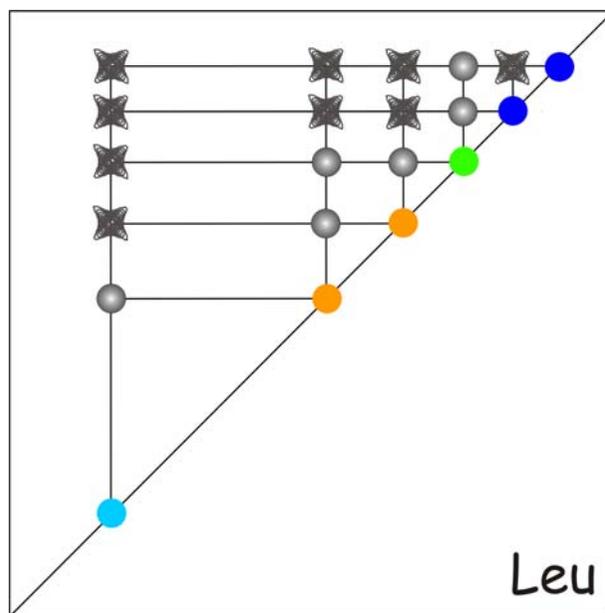
## HCCH-COSY



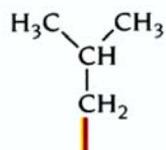
## HCCH-TOCSY



# Tripelresonanztechniken



**L** Leu, Leucine

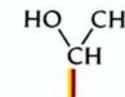


COSY

TOCSY



**T** Thr, Threonine



# NMR an großen Proteinen

## NMR an großen Proteinen

Wenn die Größe der Proteine weiter zunimmt, wird es aber auch mit den bislang gezeigten

Tripelresonanzexperimente immer schwieriger.

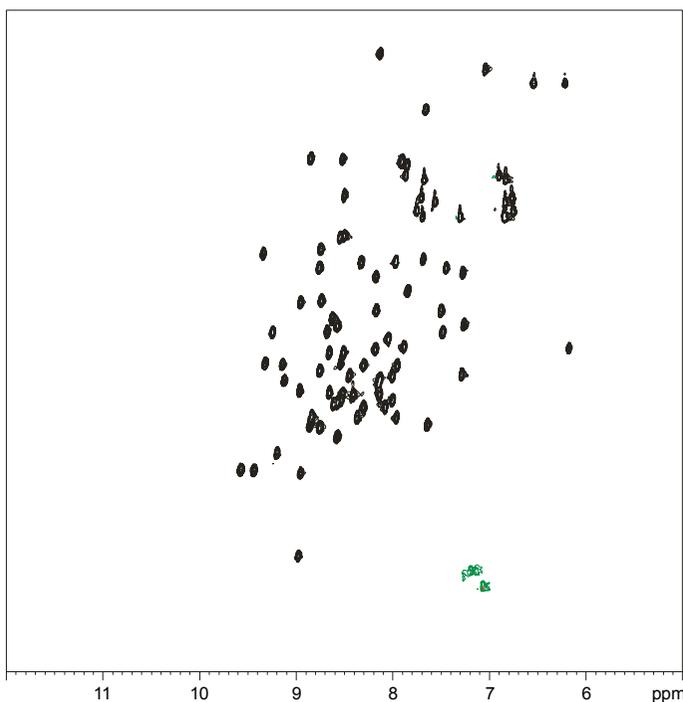
Zum einen wird die Zahl der Signale immer größer ohne das die Dispersion der Signale sich ändert.

Zum anderen wird die Relaxation der involvierten Kerne immer effizienter, dadurch wird die Linienbreite immer größer und der Transfer von Magnetisierung wird immer schwächer bei gleichbleibender Länge der Wartezeiten (da sich die Kopplungen nicht ändern)

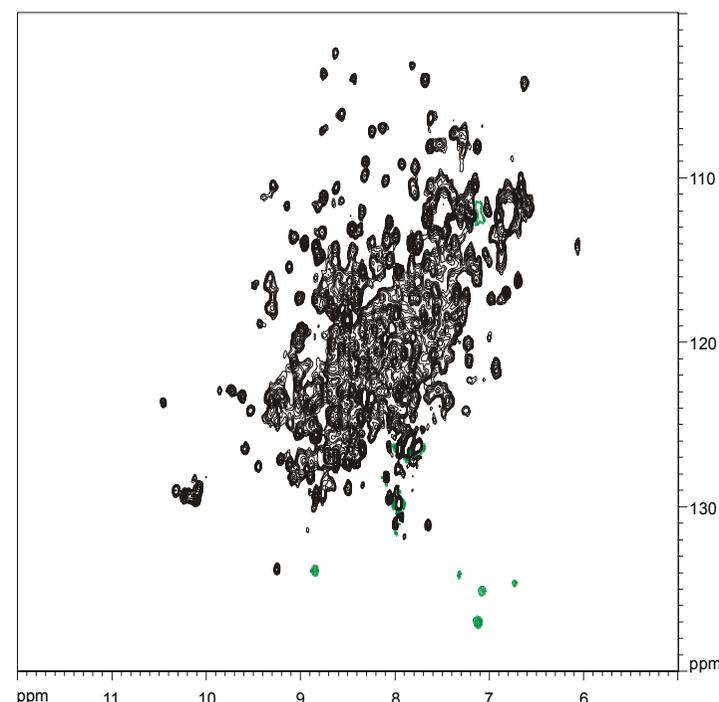
# NMR an großen Proteinen

Die Zahl der Signale nimmt zu

Ubiquitin (76 aa)

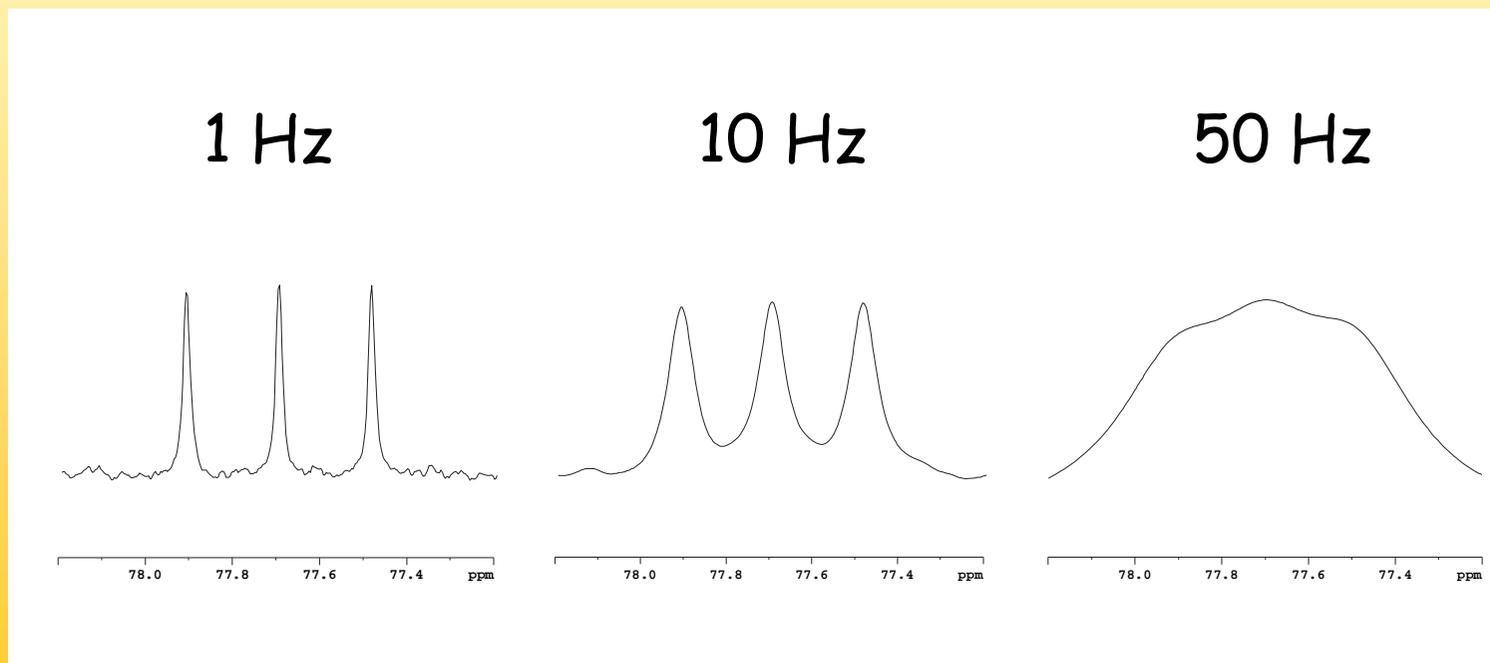


Cph1- $\Delta$ 2 (514 aa)



# NMR an großen Proteinen

Die Linien werden breiter, das sorgt für mehr Überlagerung und für ineffizienteren Magnetisierungstransfer



## NMR an großen Proteinen

Während man gegen die zunehmende Zahl der Signale nur wenig tun kann, kann man sich überlegen wie man die zunehmende Relaxation zurückdrängt. Dazu gibt es zwei Vorgehensweisen, die man sowohl unabhängig als auch gemeinsam nutzen kann:

Deuterierung

TROSY

## NMR an großen Proteinen

Die Hauptquelle der Relaxation ist für die involvierten Kerne unterschiedlich

Protonen ( $^1\text{H}$ )	andere Protonen
Kohlenstoff ( $^{13}\text{C}$ )	das direkt gebunden Proton
Stickstoff ( $^{15}\text{N}$ )	das direkt gebunden Proton

Wobei der Unterschied zwischen Stickstoff und Kohlenstoff gebundenen Protonen die Austauschbarkeit mit dem Wasser ist

## NMR an großen Proteinen

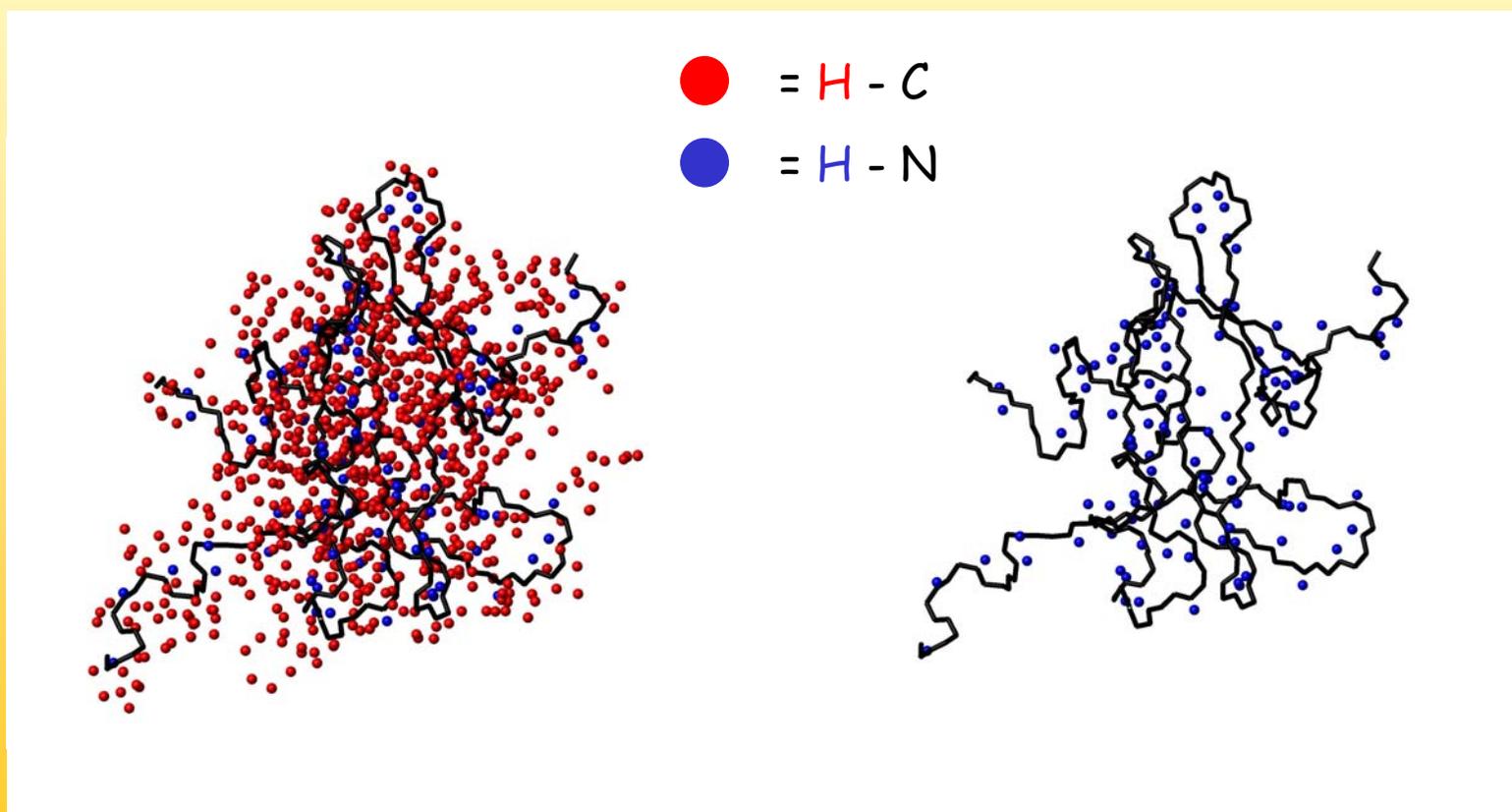
Wir haben gesehen das viele der Experimente die wir bislang gesehen haben mit dem  $H^N$  beginnen und es auch detektieren. Das macht man sich zu nutze: Die Proteine werden deuteriert (in  $D_2O$ ) hergestellt und erst am Ende in  $H_2O$  überführt wo nur die austauschbaren Protonen (hauptsächlich die  $H^N$ ) zurücktauschen. Damit sind um die  $H^N$ -Protonen nur noch wenige andere Protonen und der Hauptrelaxationspartner der Kohlenstoffe ist weg

# NMR an großen Proteinen

## Deuterierung

"normales" Protein

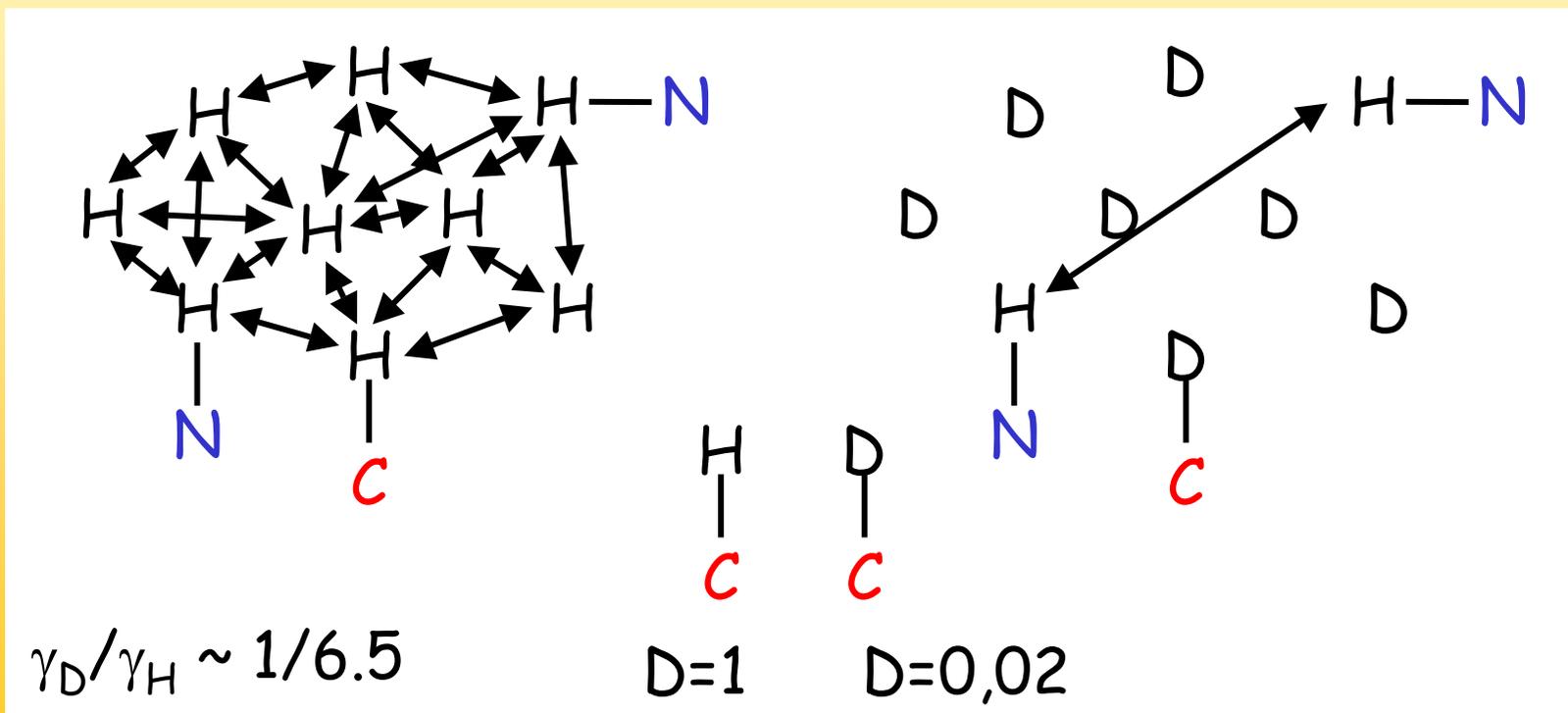
deuteriertes Protein



# NMR an großen Proteinen

## Deuterierung

Protonenspins werden verdünnt, die C-H-Wechselwirkung entfernt



## NMR an großen Proteinen

Jetzt bleiben noch die Stickstoffkerne, die ihren Hauptrelaxationspartner noch haben. Beim

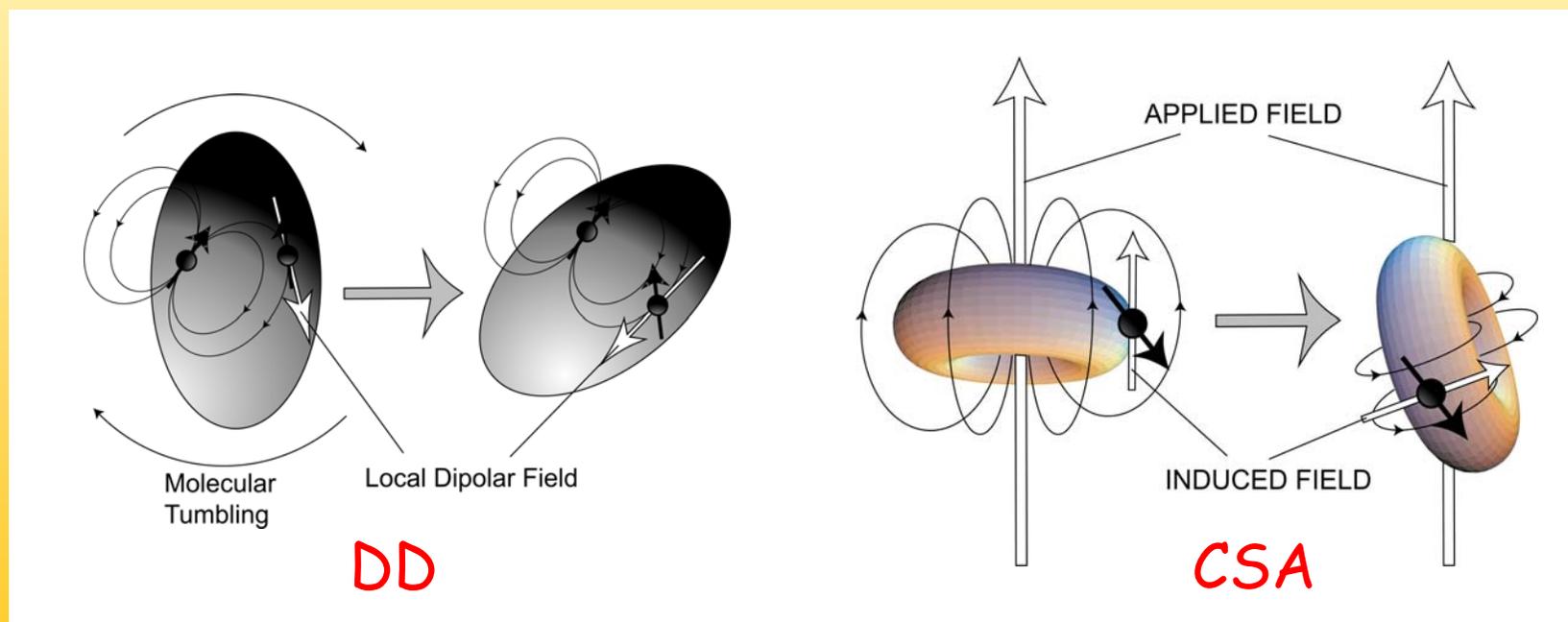
### TROSY

(Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)

werden nun unterschiedliche Relaxationseffekte genutzt um die Linien von Stickstoff und  $H^N$  zu verbessern

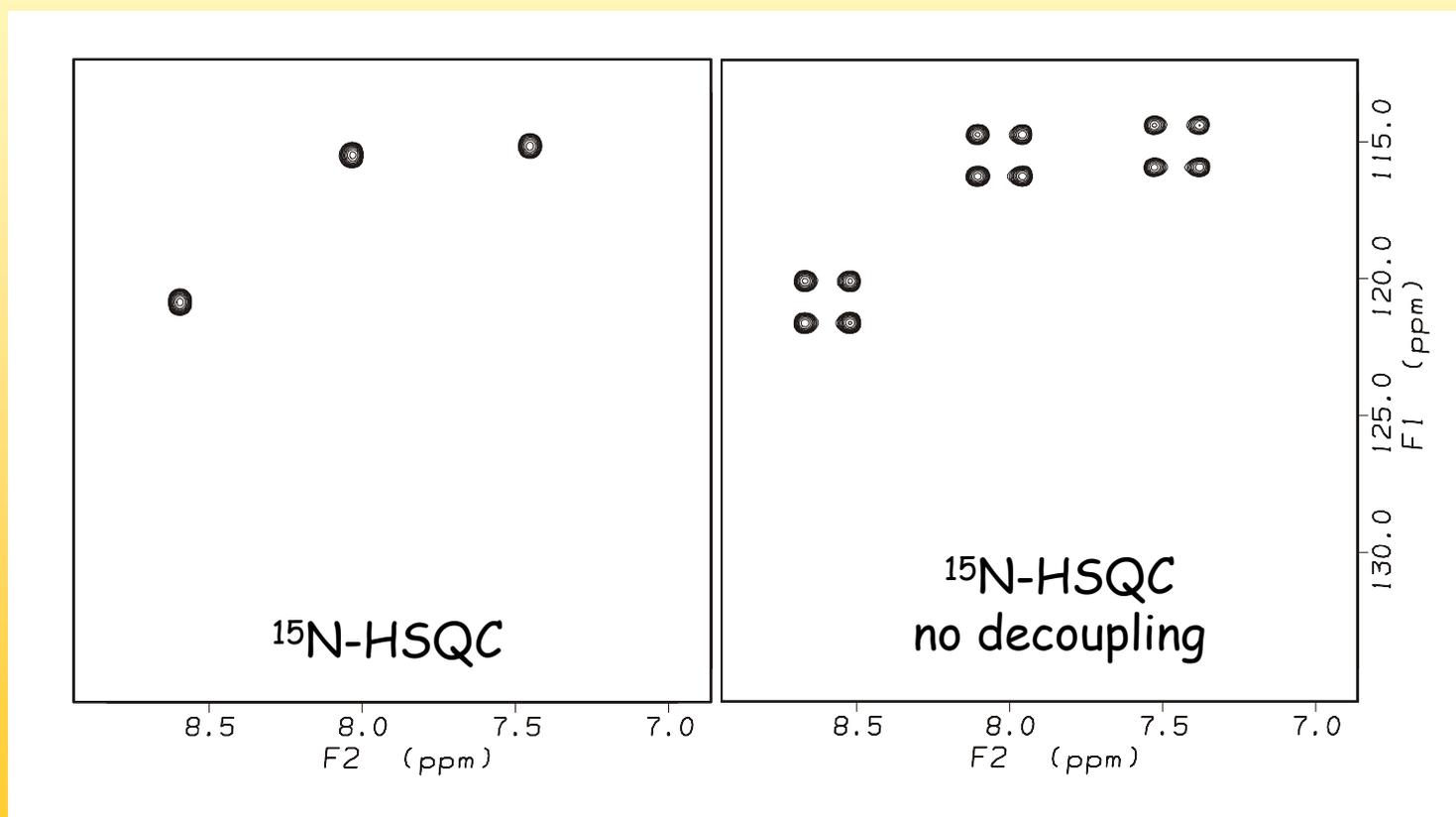
## NMR an großen Proteinen

Zwei der wichtigsten Relaxationsmechanismen haben wir zu Beginn kennen gelernt, die Dipol-Dipol-Wechselwirkung (DD) und die chemical-shift-anisotropie (CSA). Beide Mechanismen können sich gegenseitig beeinflussen.



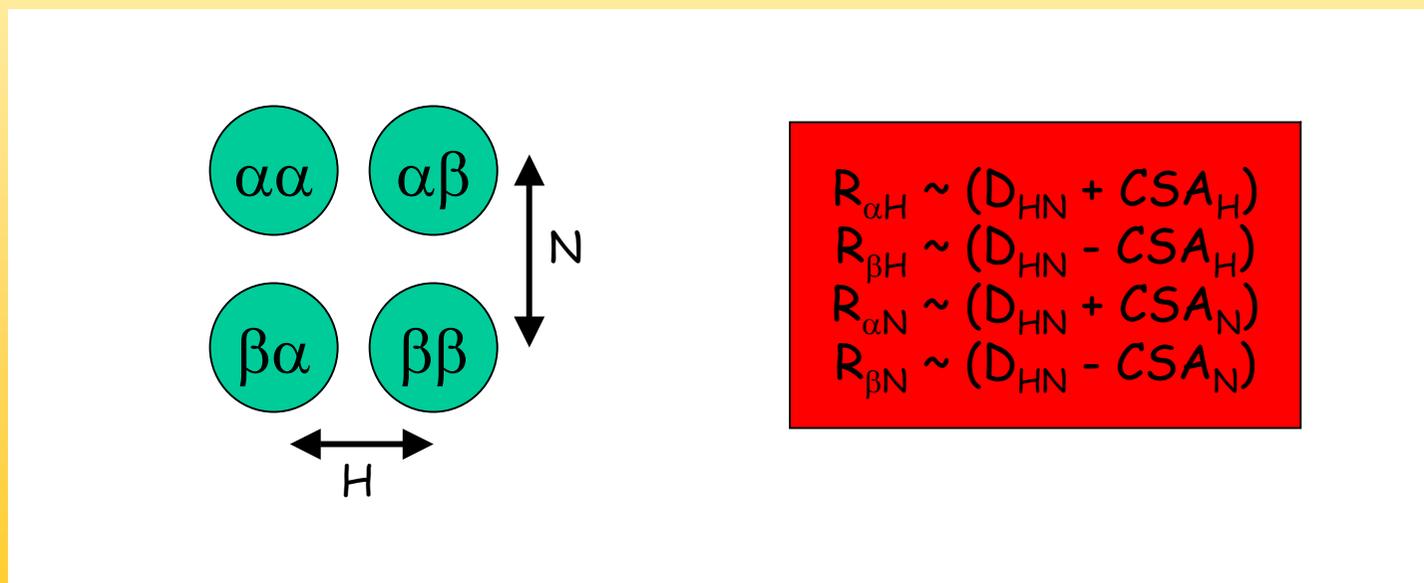
# NMR an großen Proteinen

Bei kleinen Molekülen ist diese Beeinflussung nicht leicht zu erkennen



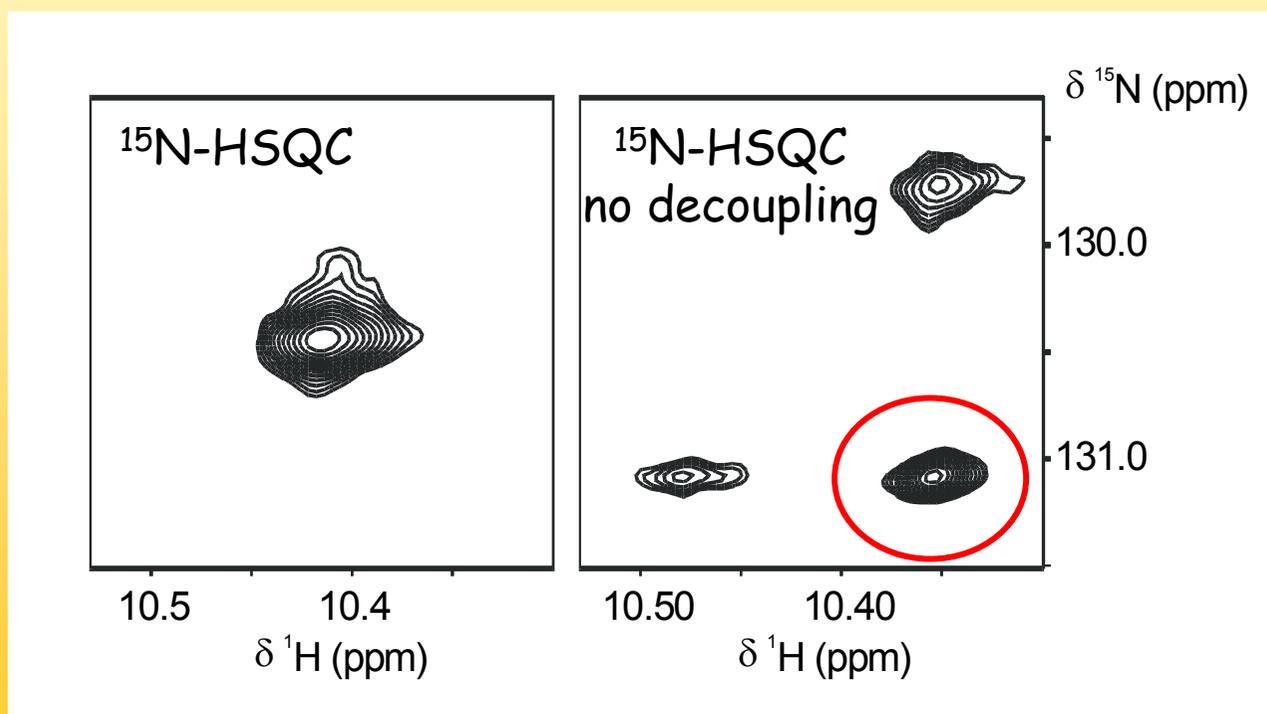
## NMR an großen Proteinen

Wir erinnern uns aber, dass den vier Komponenten des Multipletts die beiden unterschiedlichen Spinzustände ( $\alpha$  und  $\beta$ ) zuzuordnen sind. Es stellt sich heraus, dass die Beeinflussung von CSA und DD bei jeder anders ist.



## NMR an großen Proteinen

Und bei großen Molekülen ist das dann in der Tat zu sehen, jeweils eine Linie von  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$  ist schmal, eine der vier Peaks des Multipletts also besonders scharf



## NMR an großen Proteinen

Man kann nun berechnen wann der Effekt am größten ist

$$D_{\text{HN}} = (1/2\sqrt{2}) \gamma_{\text{H}}\gamma_{\text{N}}\mu(h/2\pi(r_{\text{HN}})^3)$$

$$\gamma_{\text{H}} = 2.6 * 10^8 (\text{Ts})^{-1}$$

$$CSA_{\text{H}} = (1/2\sqrt{2}) \gamma_{\text{H}} B_0 \Delta\sigma_{\text{H}}$$

$$\gamma_{\text{N}} = - 2.7 * 10^7 (\text{Ts})^{-1}$$

$$\Delta\sigma_{\text{H}} = - 16 \text{ ppm}$$

$$CSA_{\text{N}} = (1/2\sqrt{2}) \gamma_{\text{N}} B_0 \Delta\sigma_{\text{N}}$$

$$\Delta\sigma_{\text{N}} = - 160 \text{ ppm}$$

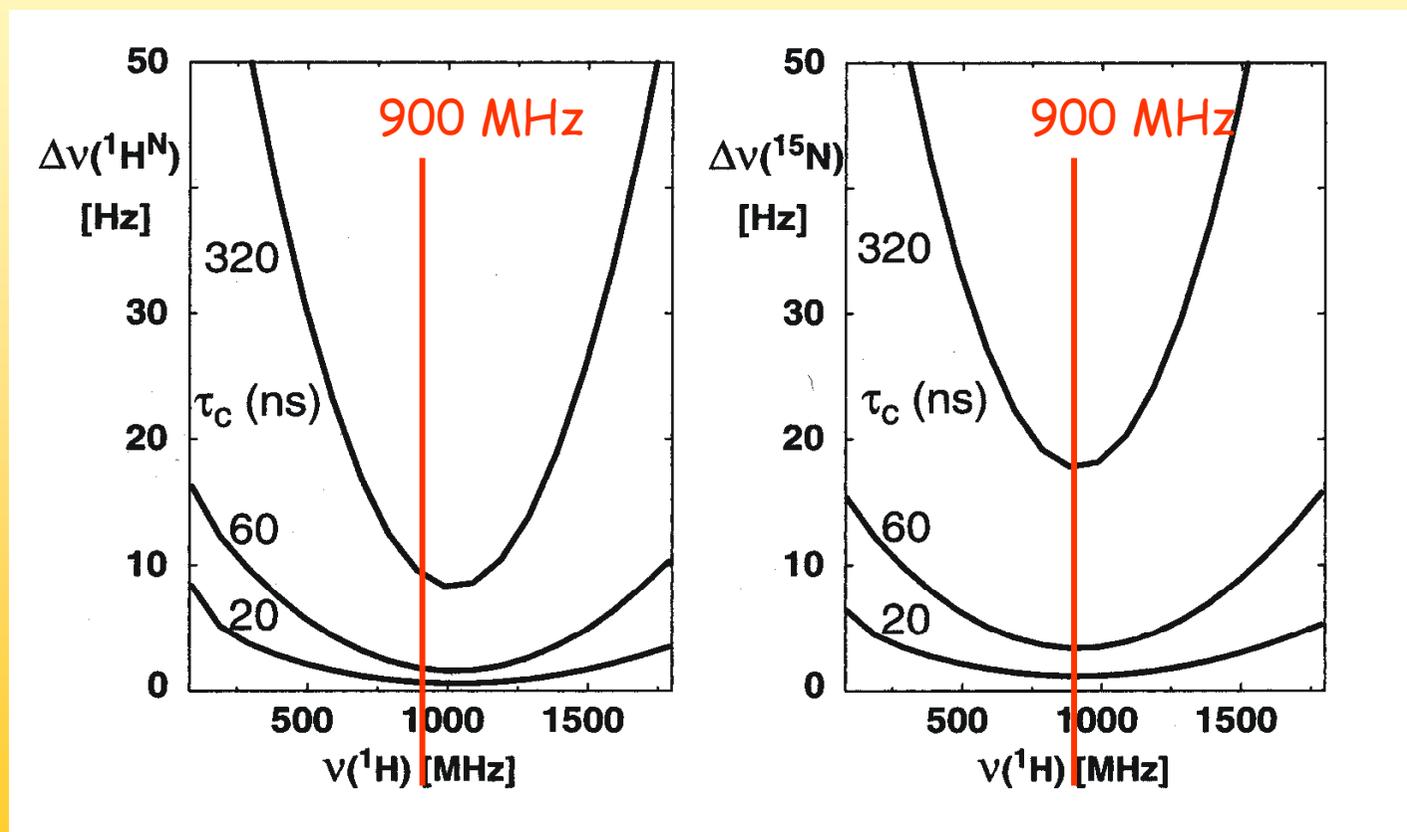
$$\Delta\sigma_{\text{H}} / \Delta\sigma_{\text{N}} = \gamma_{\text{N}} / \gamma_{\text{H}}$$

$$(D_{\text{HN}} - CSA_{\text{N}}) = (D_{\text{HN}} - CSA_{\text{H}}) = 0 \text{ for the same } B_0$$

$$B_0 = 25.6 \text{ T} \sim 1.1 \text{ GHz}$$

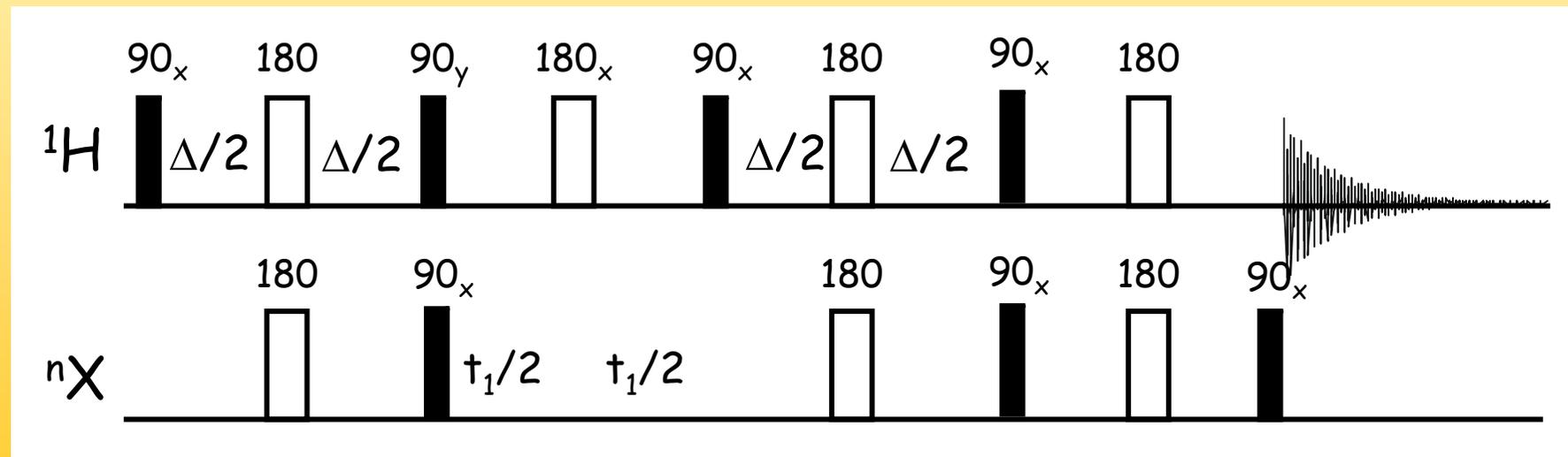
# NMR an großen Proteinen

Mit realistischen Annahmen liegt das Maximum nah bei 950 MHz



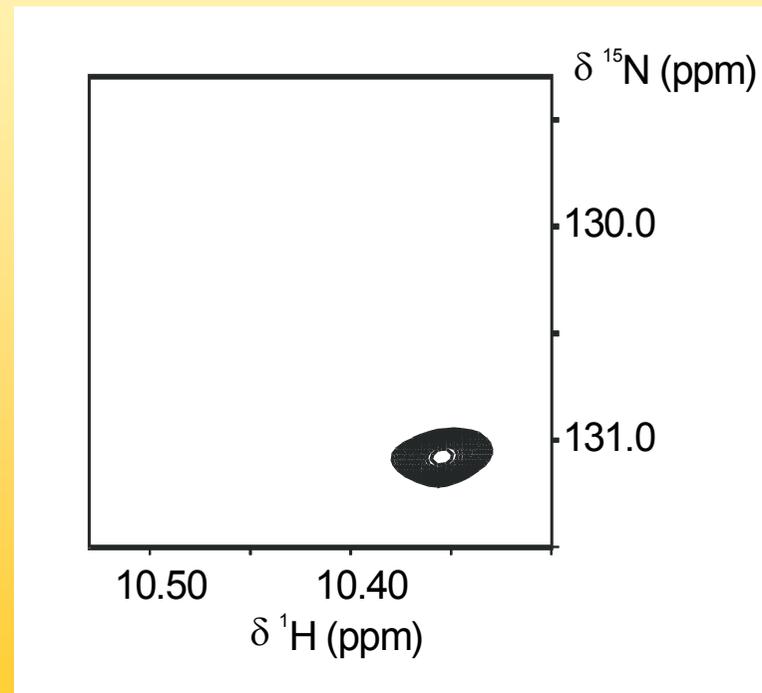
# NMR an großen Proteinen

Um nur den einen Peak zu erhalten benutzt man diese Pulssequenz, das ganze kann aber auch in jedes Tripelresonanzexperiment eingebaut werden



# NMR an großen Proteinen

Am Ende erhält man dann im TROSY scharfe Linien  
auch für größere Moleküle



Grundlagen der NMR-Spektroskopie  
Techniken für organische Moleküle  
Techniken für Peptide  
Techniken für Proteine

# That's it

Fragen: [schmieder@fmp-berlin.de](mailto:schmieder@fmp-berlin.de)

Scripte: [www.fmp-berlin.de/schmieder/teaching](http://www.fmp-berlin.de/schmieder/teaching)