

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}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.

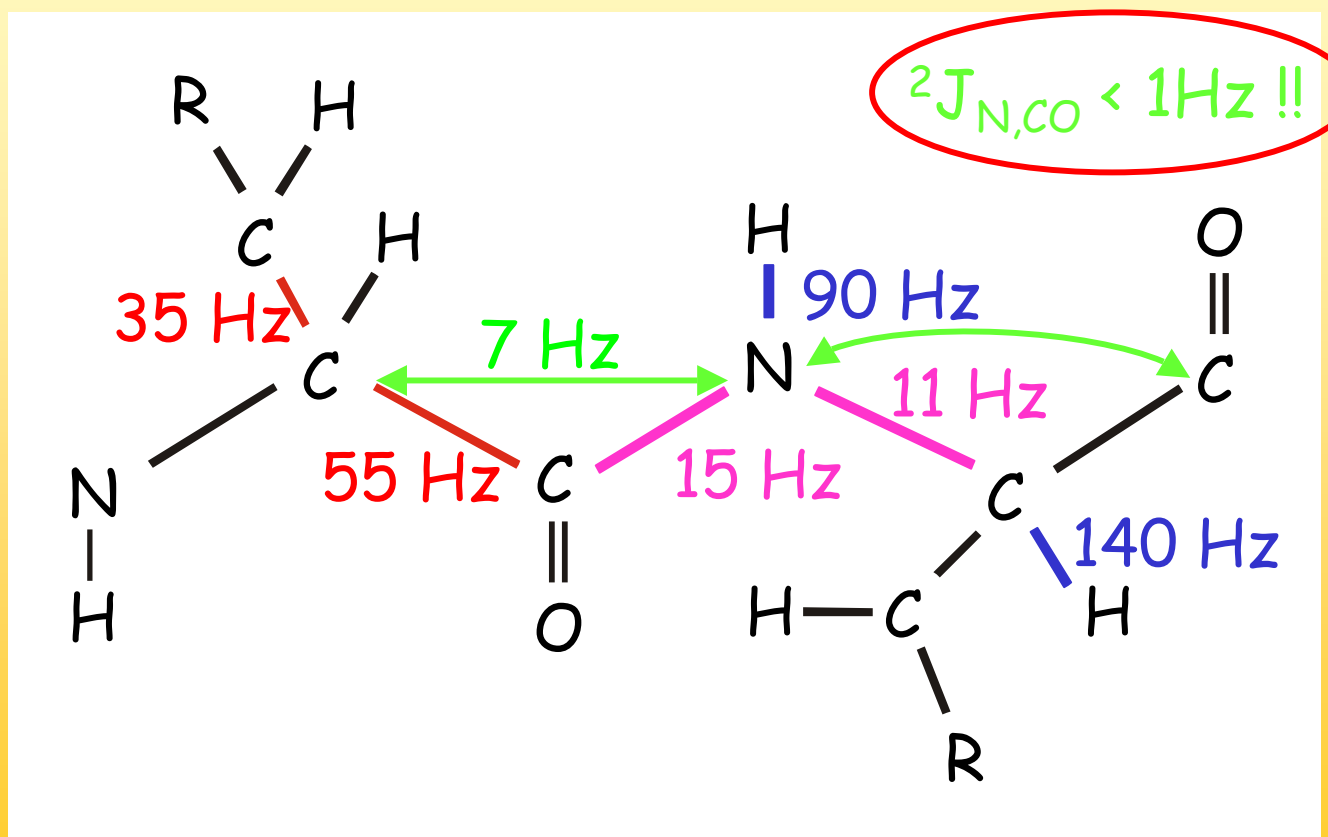
Der Transfer von Magnetisierung über heteronukleare Kopplungen ist auch bei größeren Proteinen noch effektiv.

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

Da nun ^1H , ^{13}C und ^{15}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

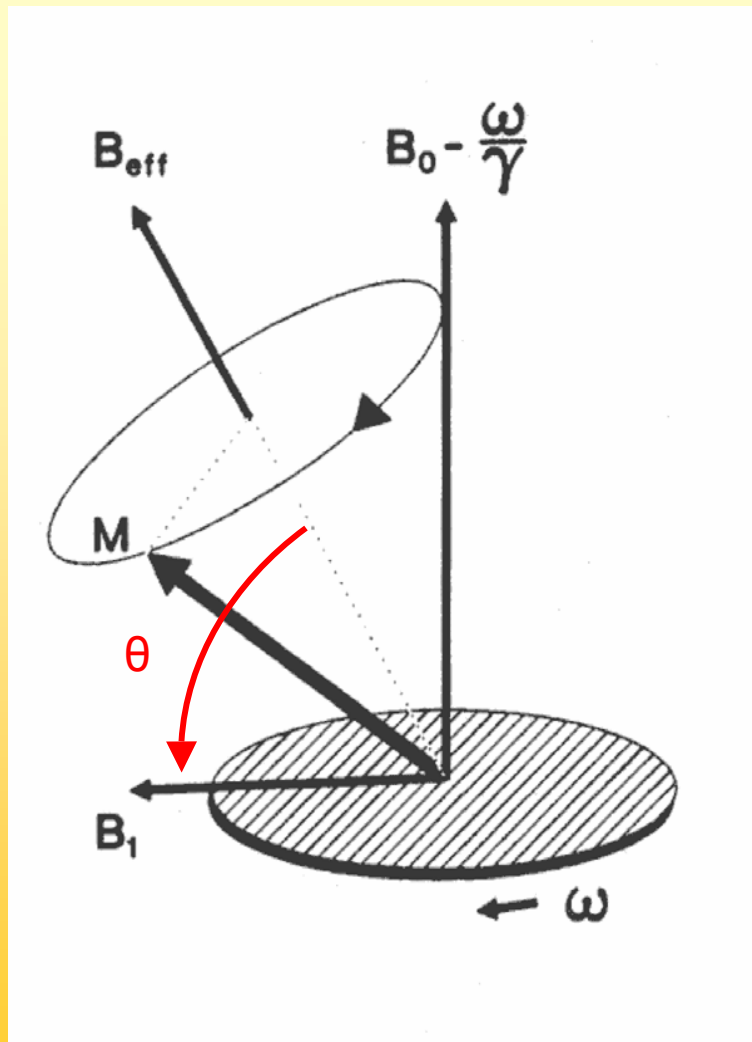
Die Carbonyle sind die „vierte“ Kernsorte

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



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

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

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

$$B_{eff} \geq B_1$$

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° an der Stelle des Senders bewirkt, eine Drehung von 360° 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

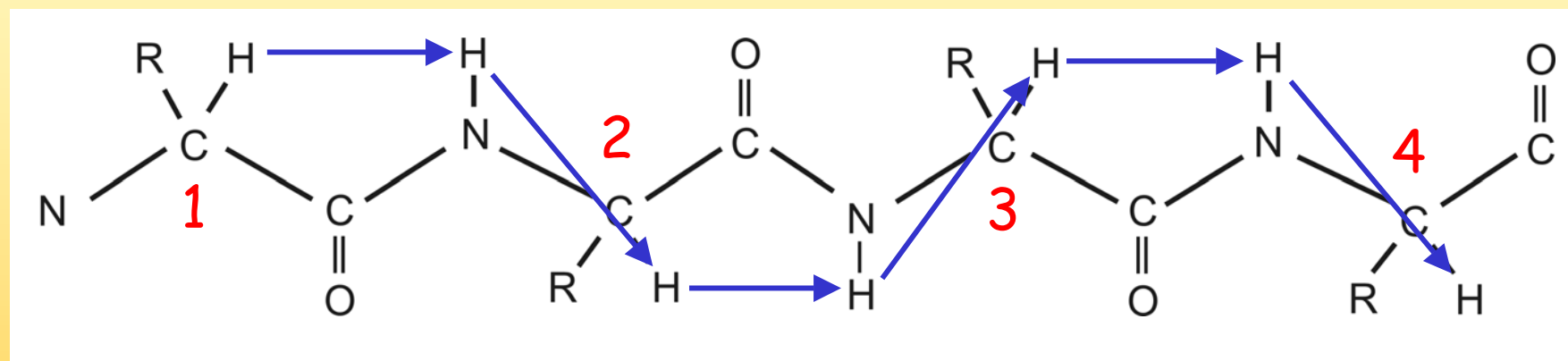
Sequentielle Zuordnung

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^α , beim NOESY gab es zwei, einmal die gleiche wie im TOCSY, dazu den über das Carbonyl hinweg

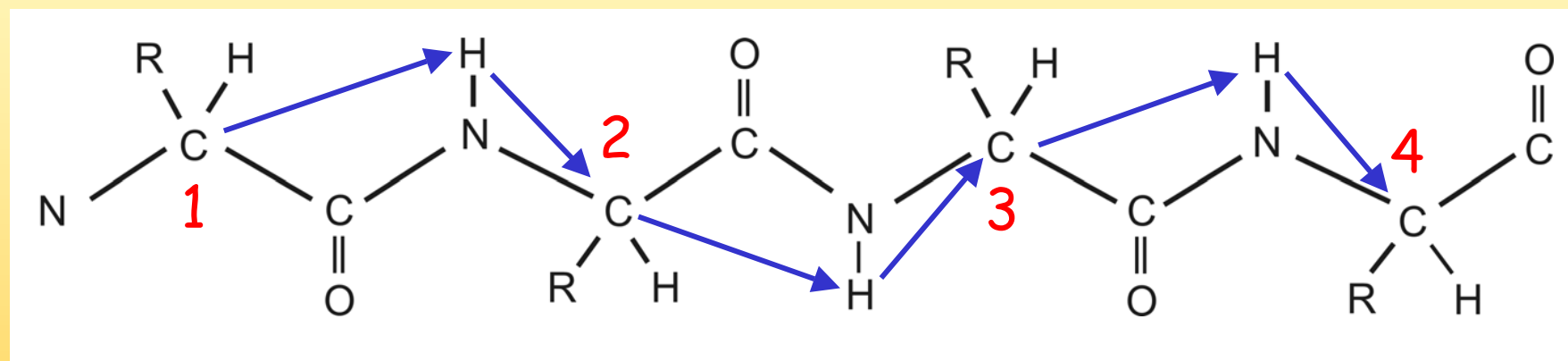
Sequenzspezifische Zuordnung

So sieht der „sequential walk“ mit homonuklearen Spektren aus



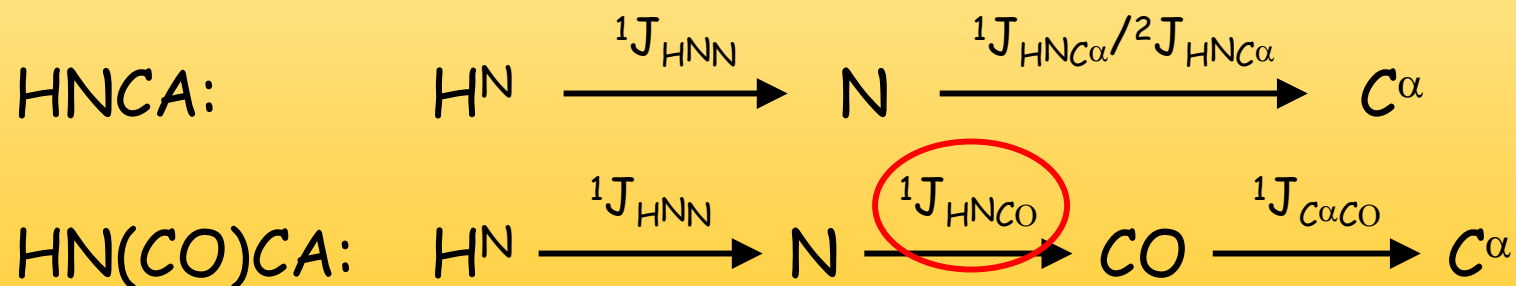
Sequenzspezifische Zuordnung

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



Tripelresonanztechniken

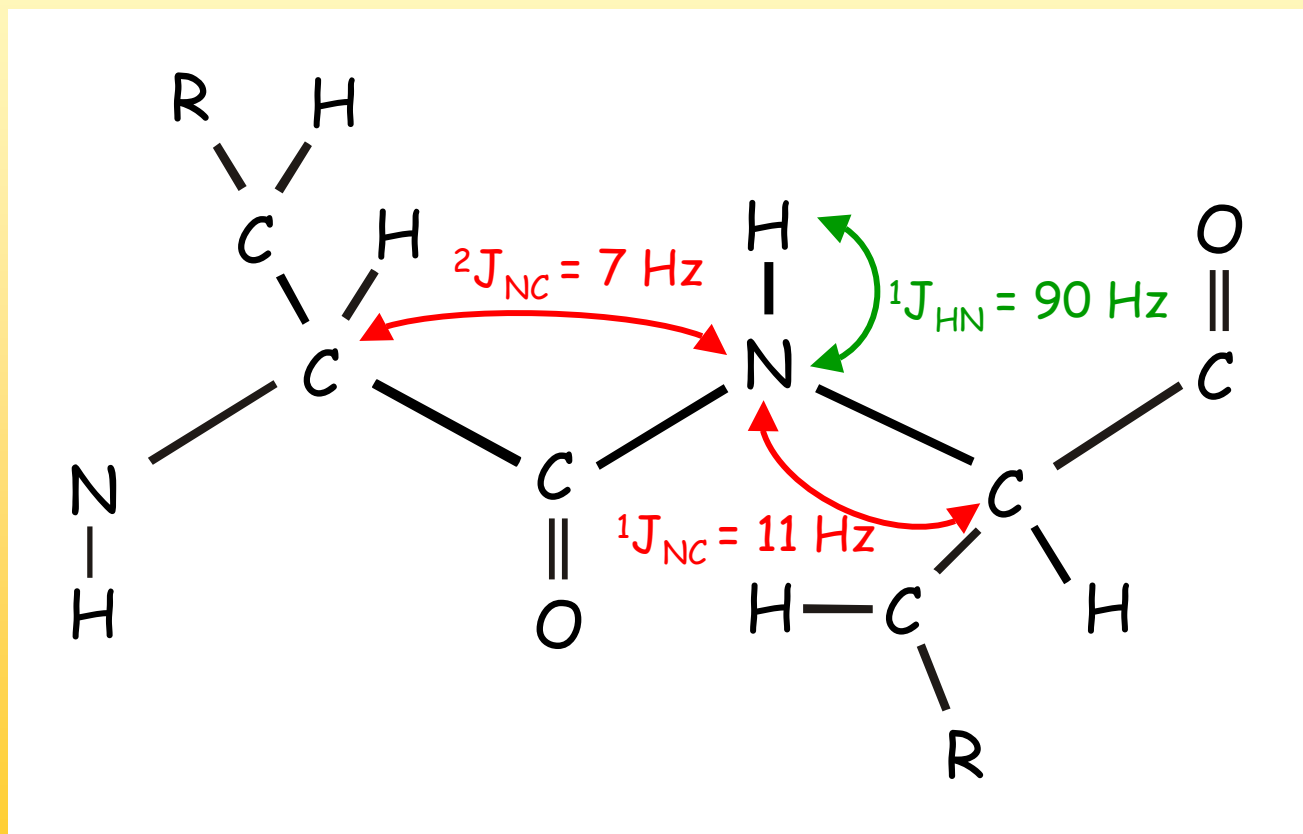
Die Unterscheidung der beiden Signale vom H^N zum C^α gelingt uns durch ein Spektrum das eine ähnliche Korrelation ergibt, aber unter Nutzung des Carbonyl. Die beiden Experimente heißen HNCA und HN(CO)CA, wobei der Name schon den Weg der Magnetisierung verrät.



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

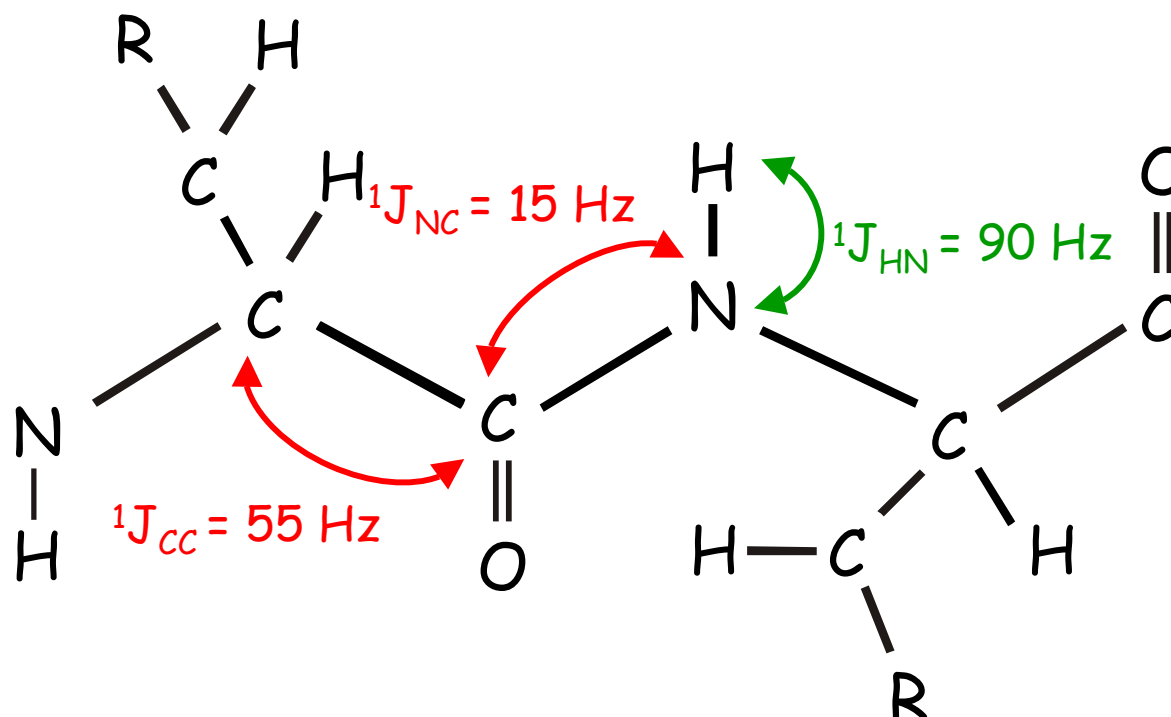
Tripelresonanztechniken

HNCA



Tripelresonanztechniken

HN(CO)CA



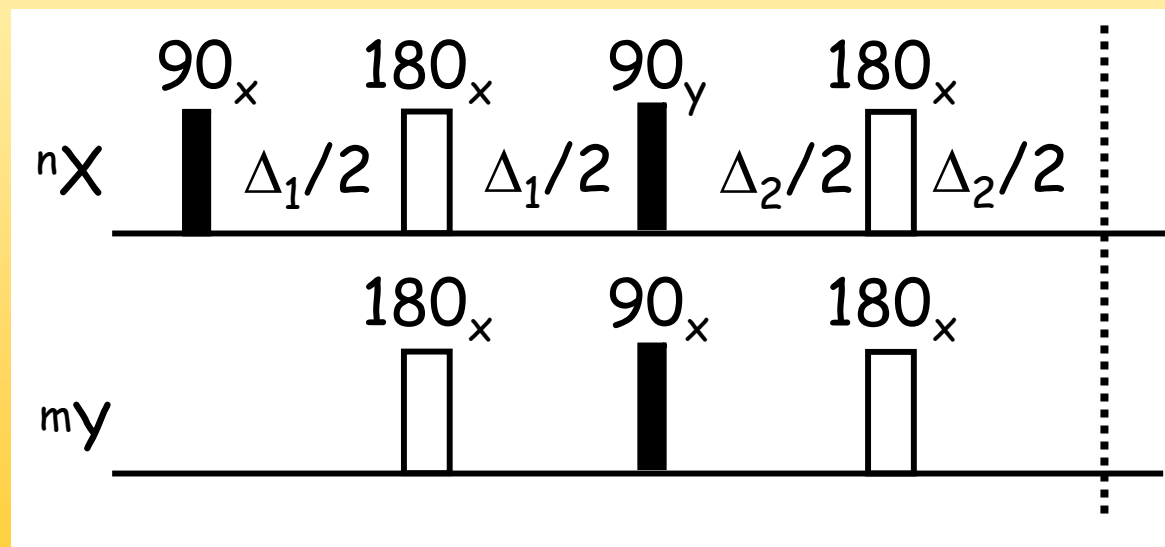
Tripelresonanztechniken

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

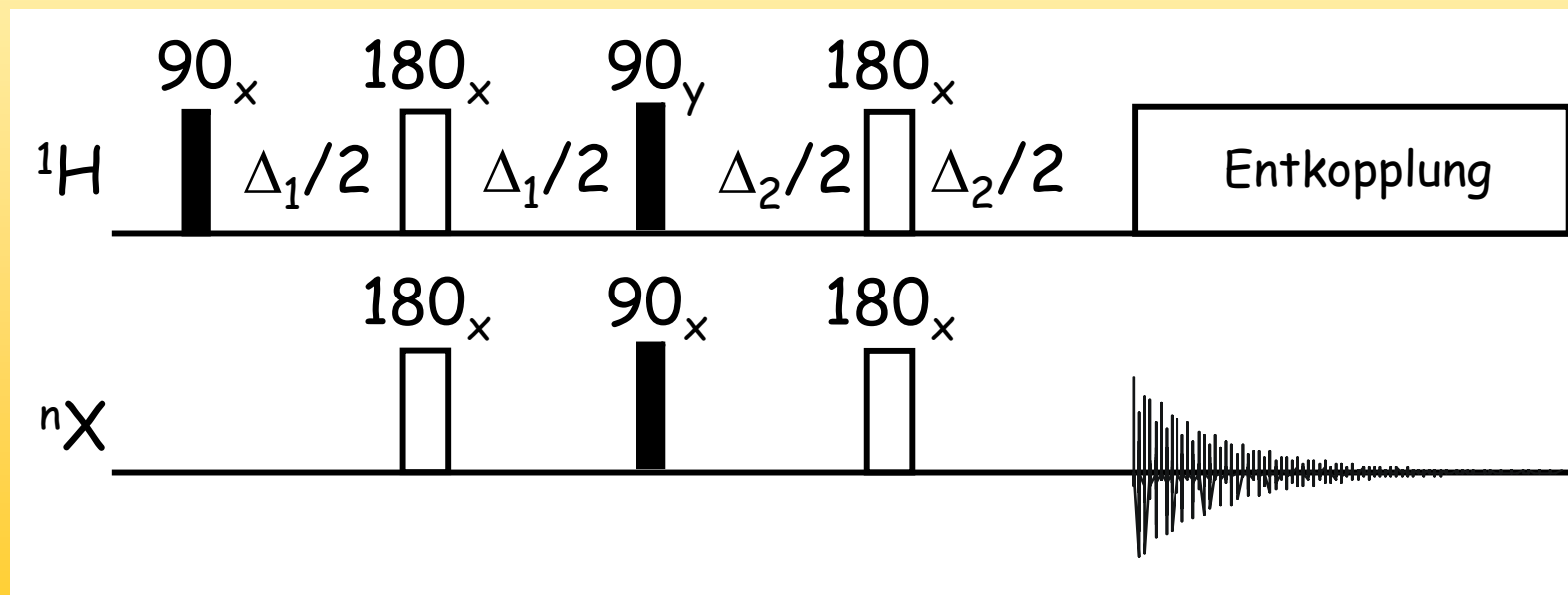
Tripelresonanztechniken

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

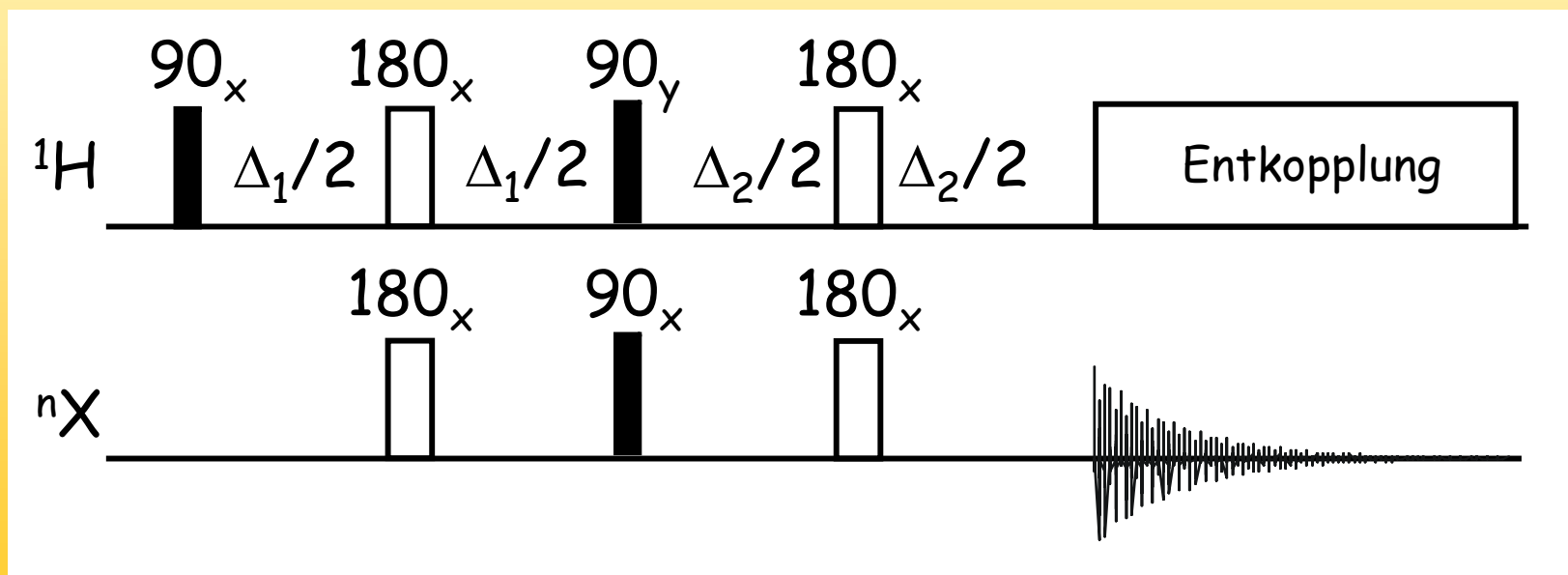


Tripelresonanztechniken

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

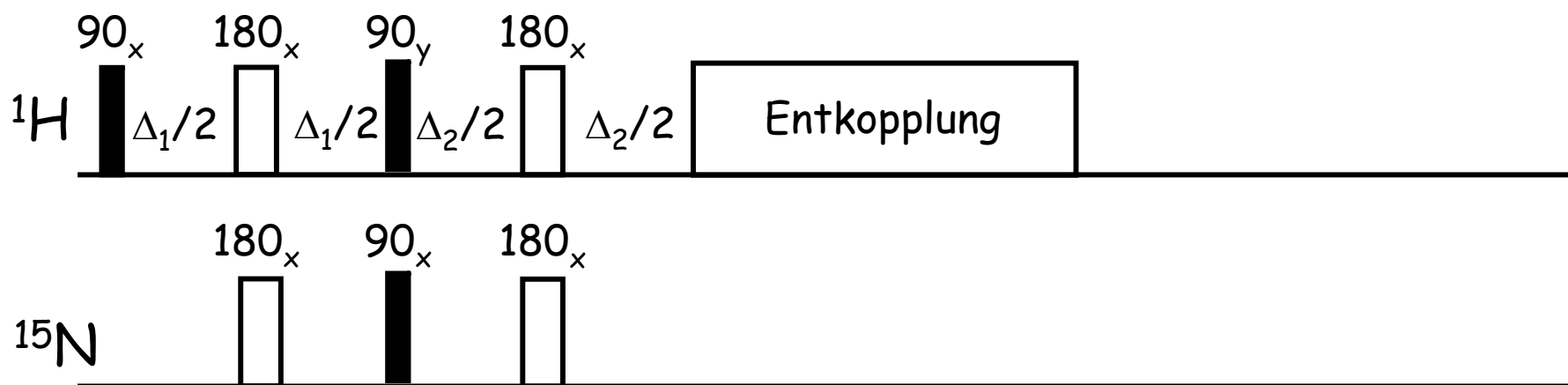
$$XH_2: X_x \sin \pi J_{H1X} \Delta_2 \cos \pi J_{H2X} \Delta_2$$

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



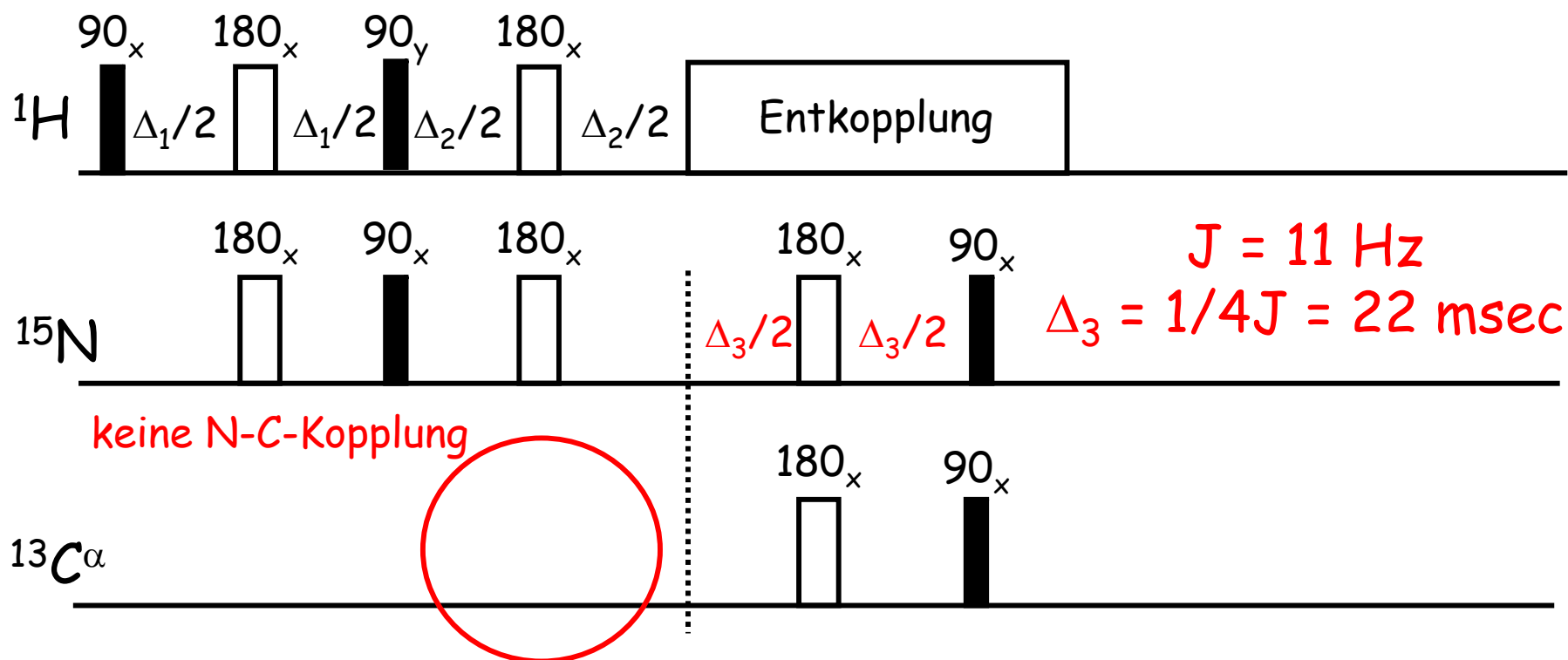
Tripelresonanztechniken

Dann bauen wir uns unsere Pulssequenz



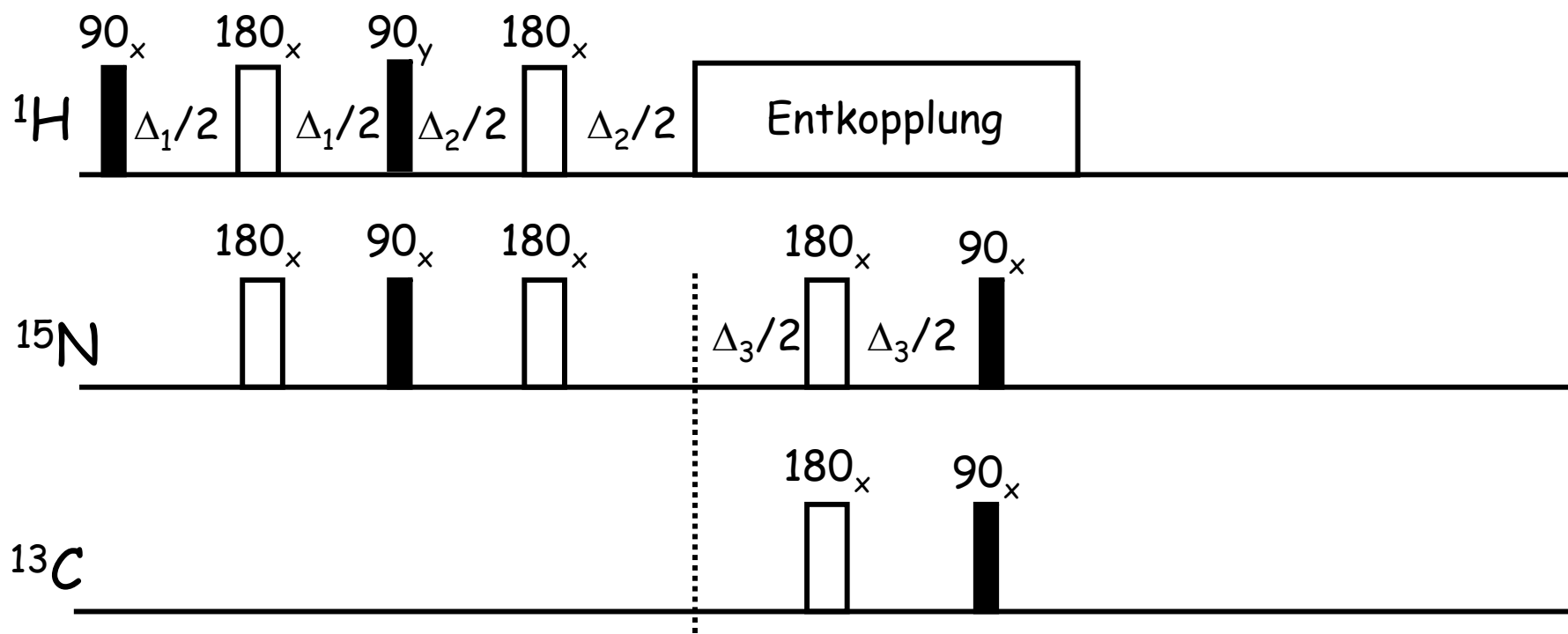
Δ_2 kann hier für den Fall HN eingestellt werden, also genau $1/2J$ (5.5 msec). H_2N wird dann unterdrückt (Seitenketten von Asn und Gln). **Damit sind wir vom Proton zum Stickstoff gekommen, nun weiter zum Kohlenstoff**

Tripelresonanztechniken



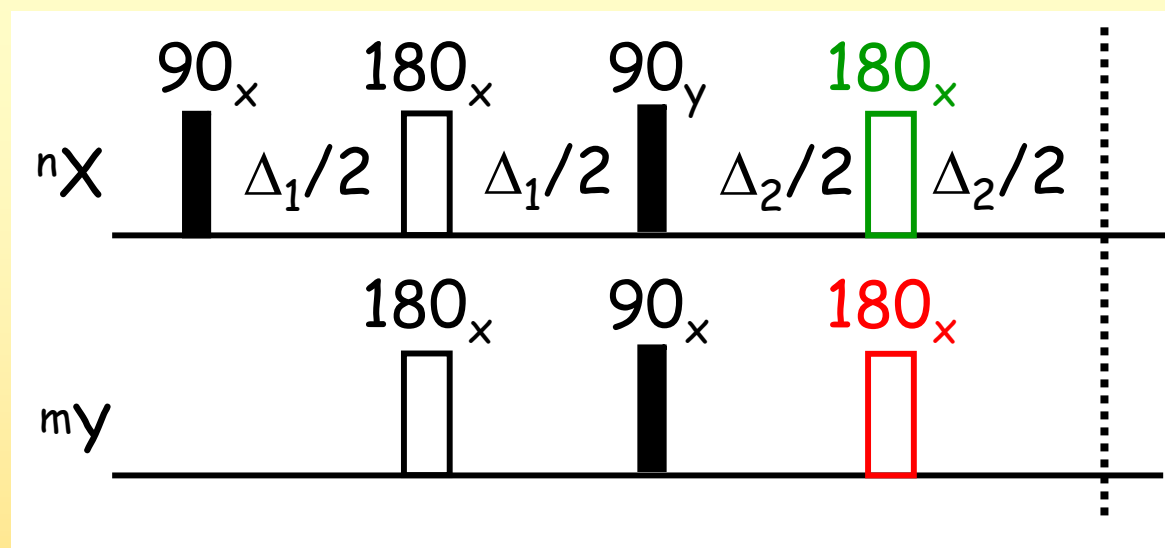
Wir hängen ein weiteres INEPT an, dabei ist zu bedenken, dass der Stickstoff 2 Kopplungen zu C_α hat, Δ_3 ist also nicht $1/2J$ sondern $1/4J$

Tripelresonanztechniken



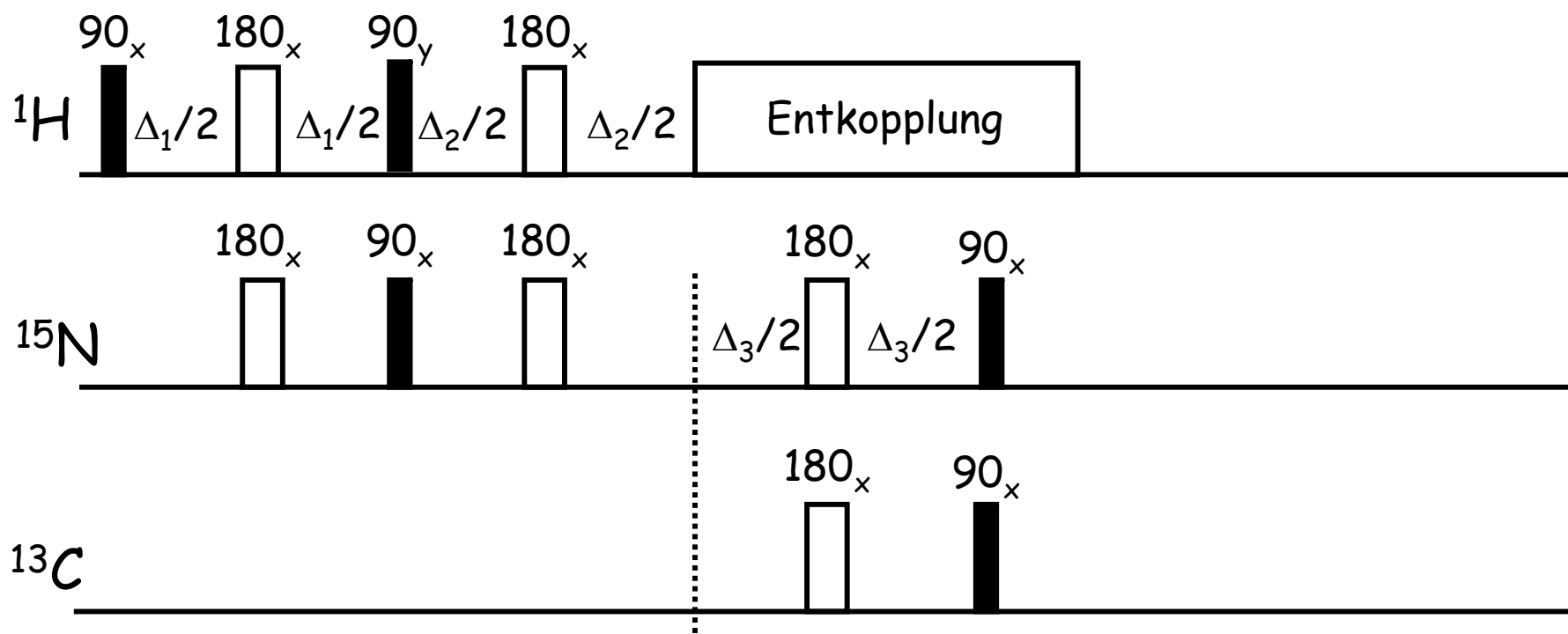
Man stellt aber fest, dass die 180° Pulse überhand nehmen, man muss bedenken wofür man die braucht....

Tripelresonanztechniken



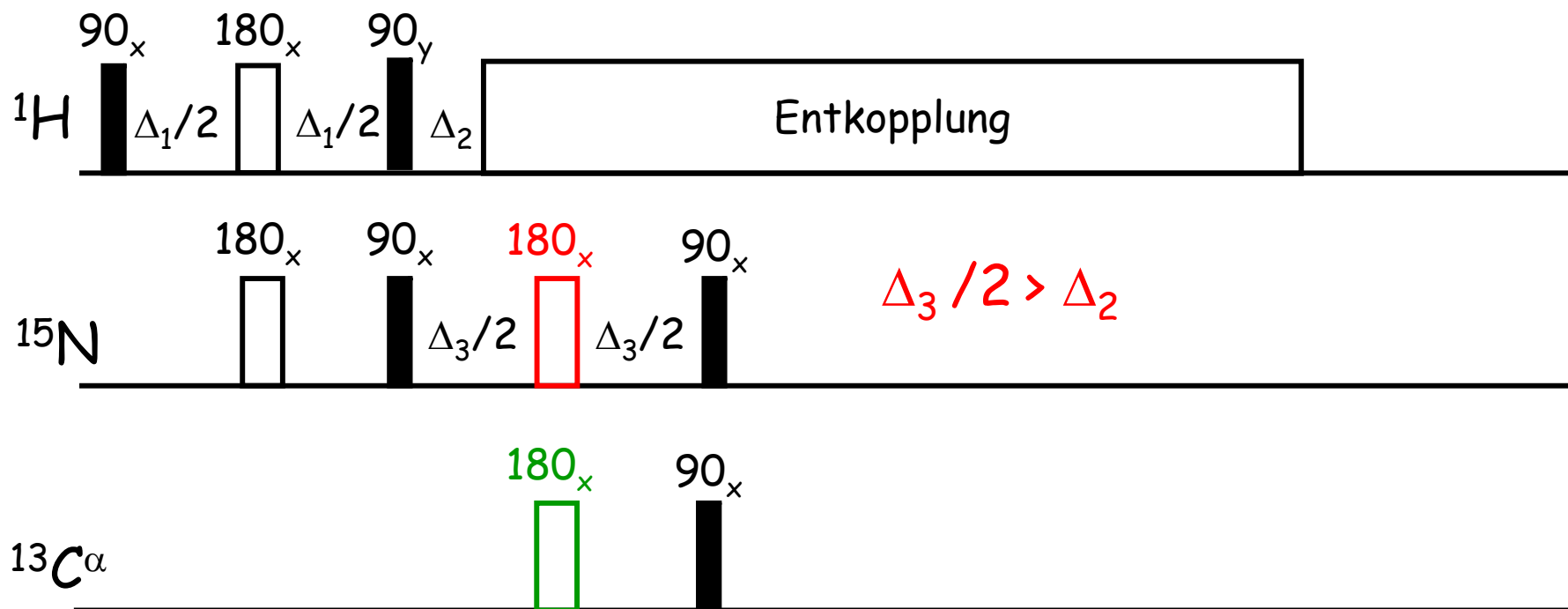
Während Δ_2 soll die J_{xy} aktiv sein. Es soll aber keine chemische Verschiebung auf Y entstehen, deshalb der **180° Puls**. Der alleine würde die Kopplung aber refocussieren, also brauchen wir noch den zweiten **180° Puls**. Wäre uns die chemische Verschiebung egal, bräuchten wir keinen Puls.

Tripelresonanztechniken



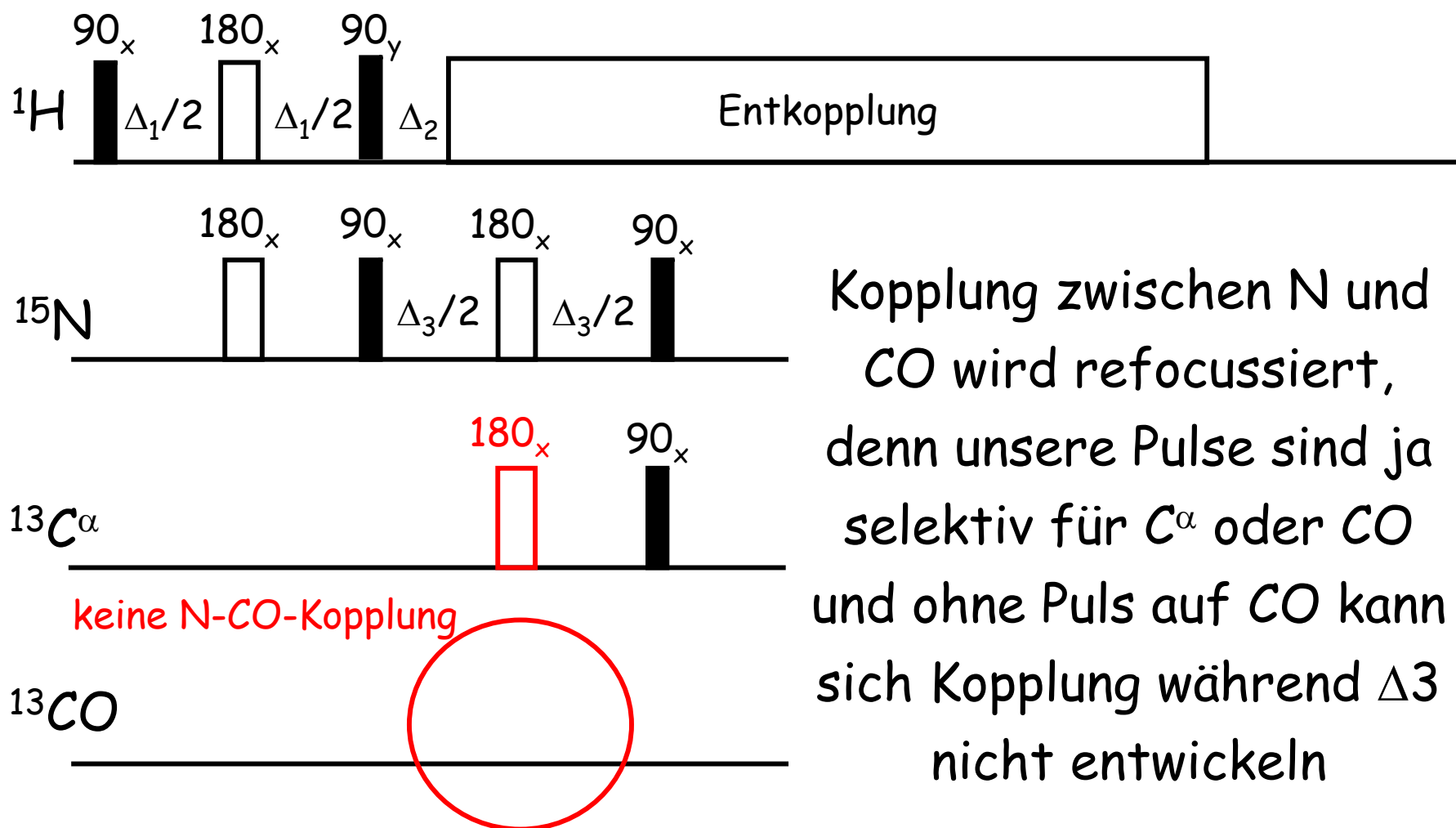
Die Situation haben hier zweimal. Was wir eigentlich aber wollen ist Kopplung während Δ_2 und Δ_3 und keine chemische Verschiebung auf ^{15}N

Tripelresonanztechniken



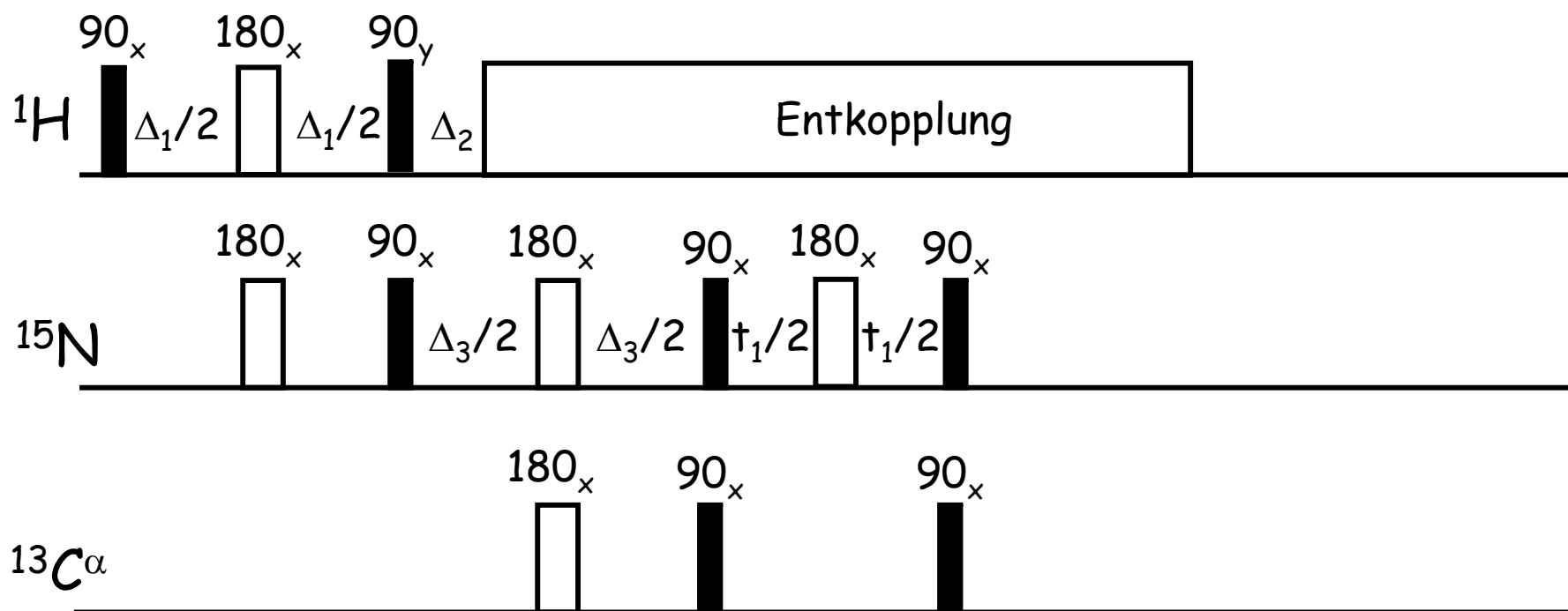
Dann kann man sehr viele streichen. Δ_2 und Δ_3 kann man zusammenfassen, ein **180° Puls** muss in der Mitte der ^{15}N -Evolution sitzen, ein zweiter **180° Puls** ist nötig

Tripelresonanztechniken



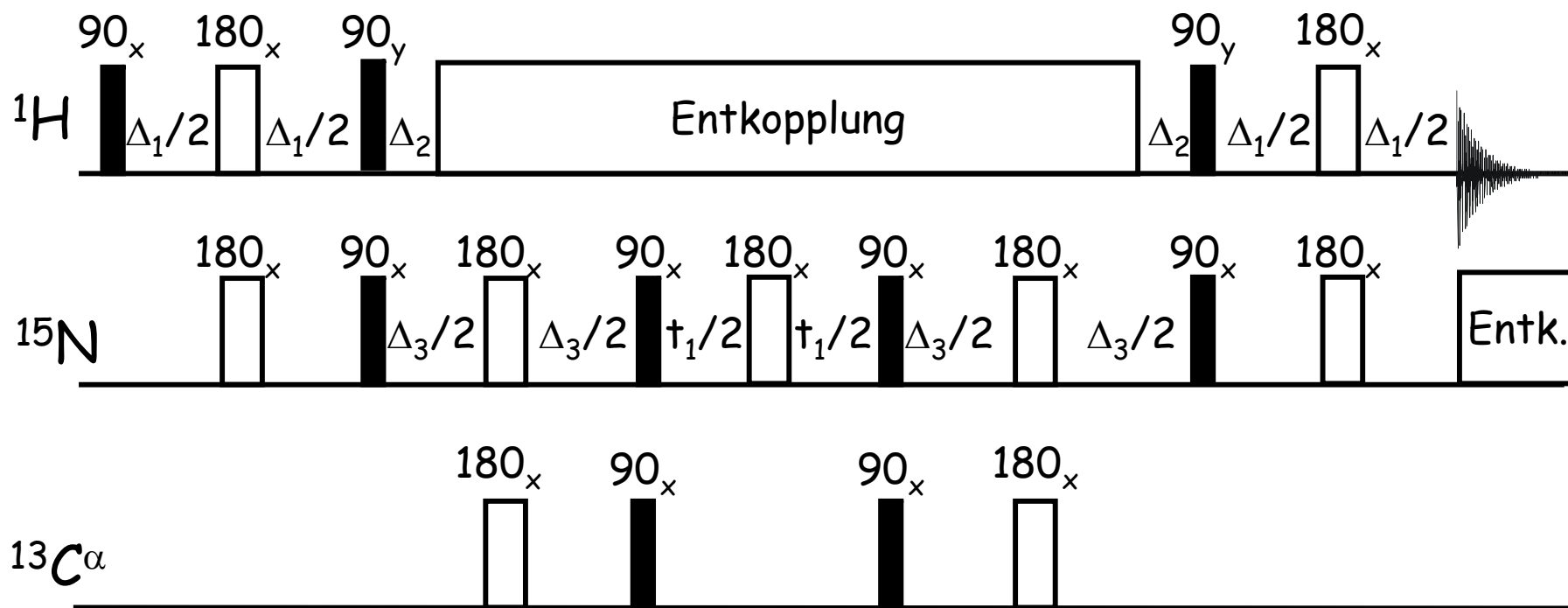
Kopplung zwischen N und CO wird refocussiert, denn unsere Pulse sind ja selektiv für C_α oder CO und ohne Puls auf CO kann sich Kopplung während $\Delta 3$ nicht entwickeln

Tripelresonanztechniken



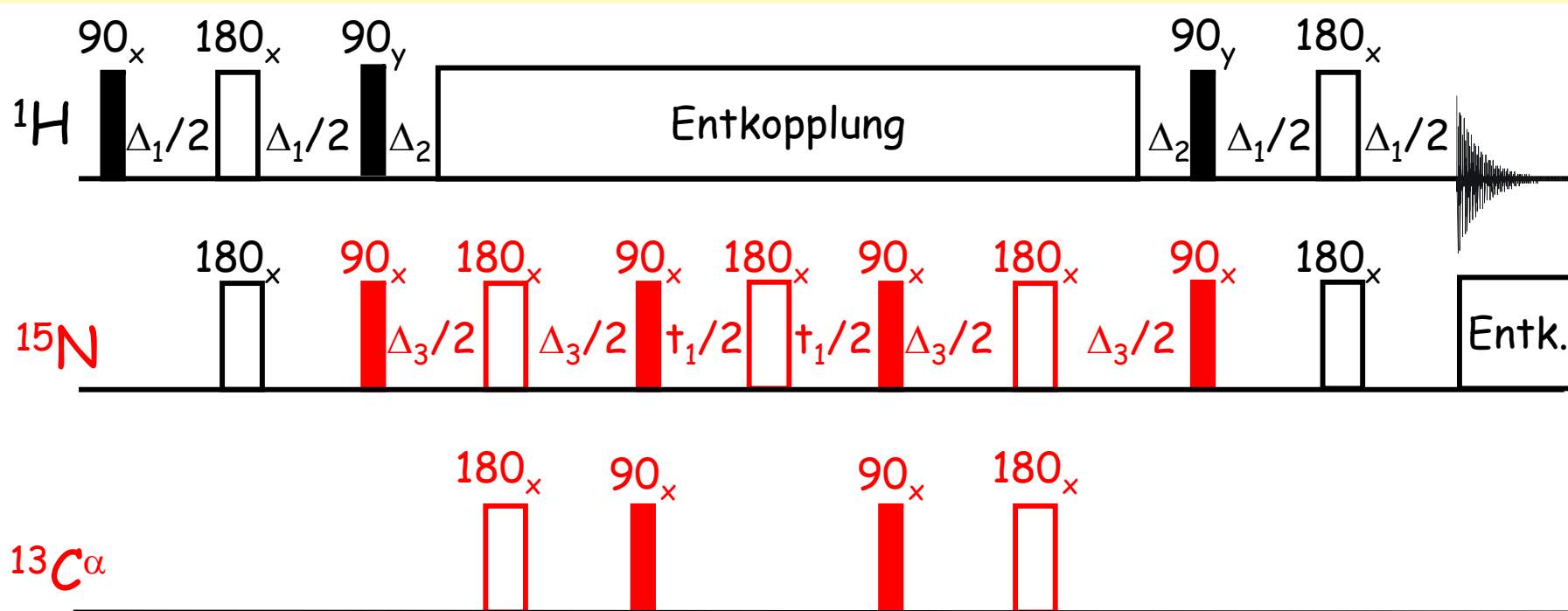
Nach dem zweiten INEPT-Transfer wird nicht refocussiert sondern wie beim HSQC nur die chemische Verschiebung des zweiten Kerns detektiert

Tripelresonanztechniken



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

Tripelresonanztechniken

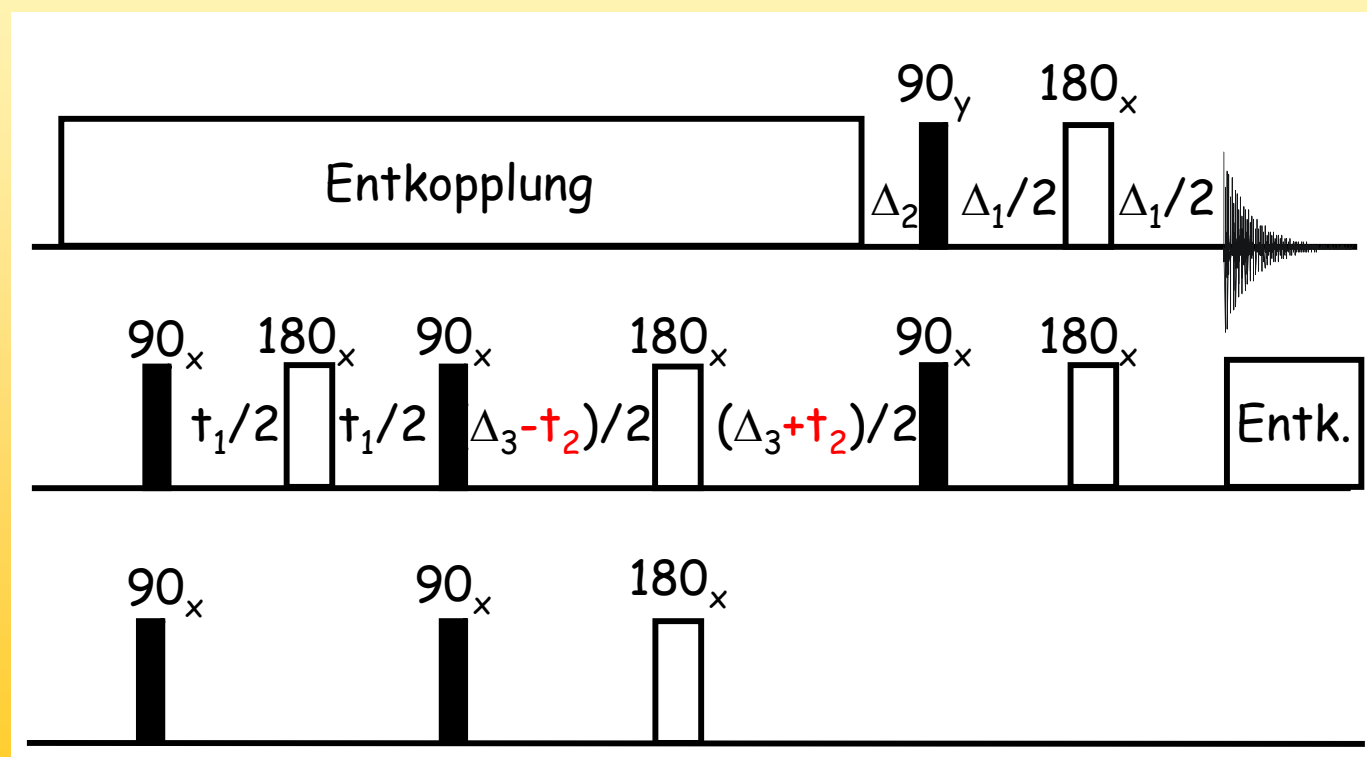


In der Mitte der Pulssequenz haben wir ein
 $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}_\alpha$ -HSQC durchgeführt

Tripelresonanztechniken

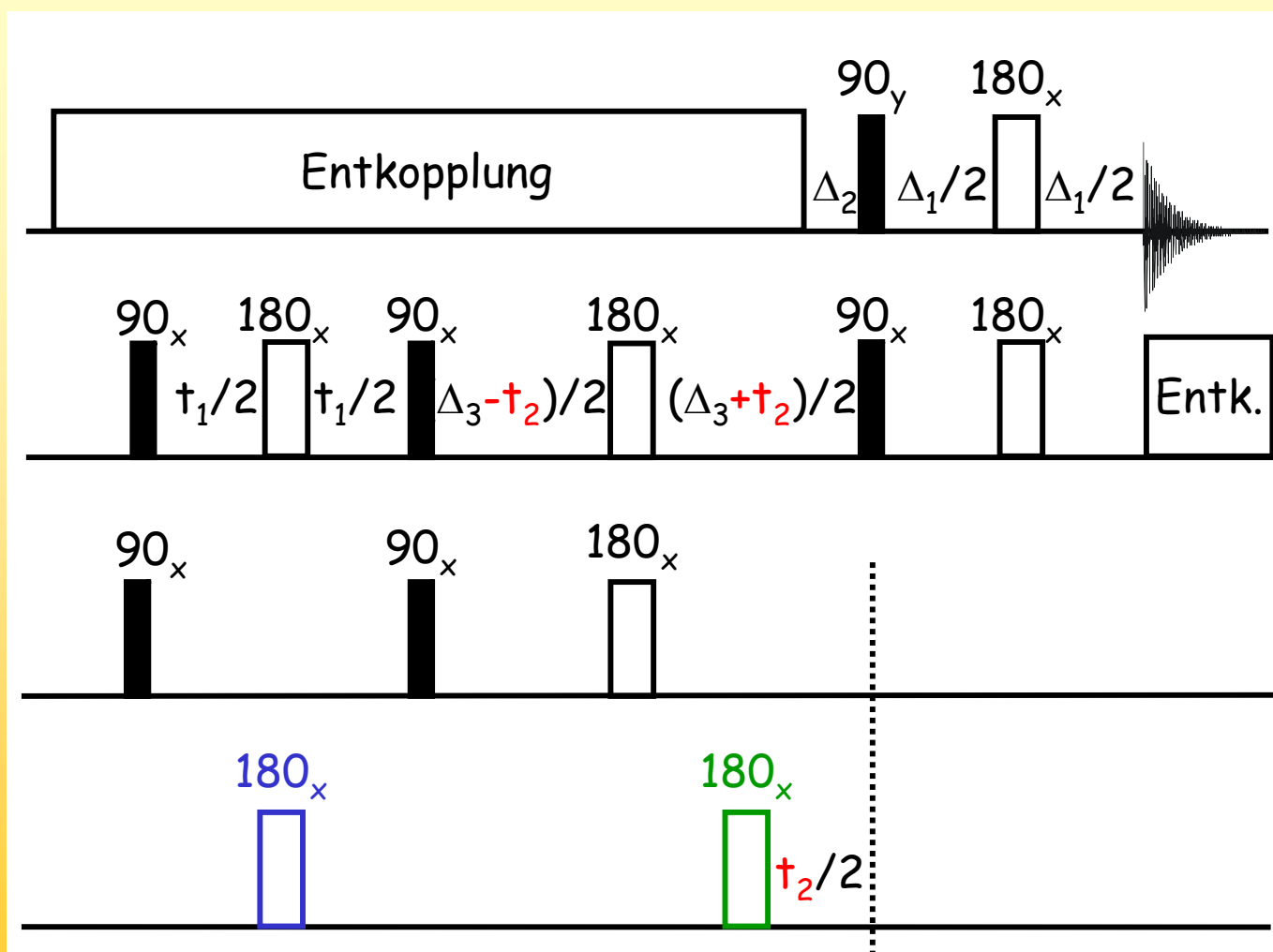
Damit haben wir das **HNCA** gebaut, es wird normalerweise als 3D-Spektrum aufgenommen, mit den chemischen Verschiebungen von C^α , N und H^N auf den 3 Achsen.

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



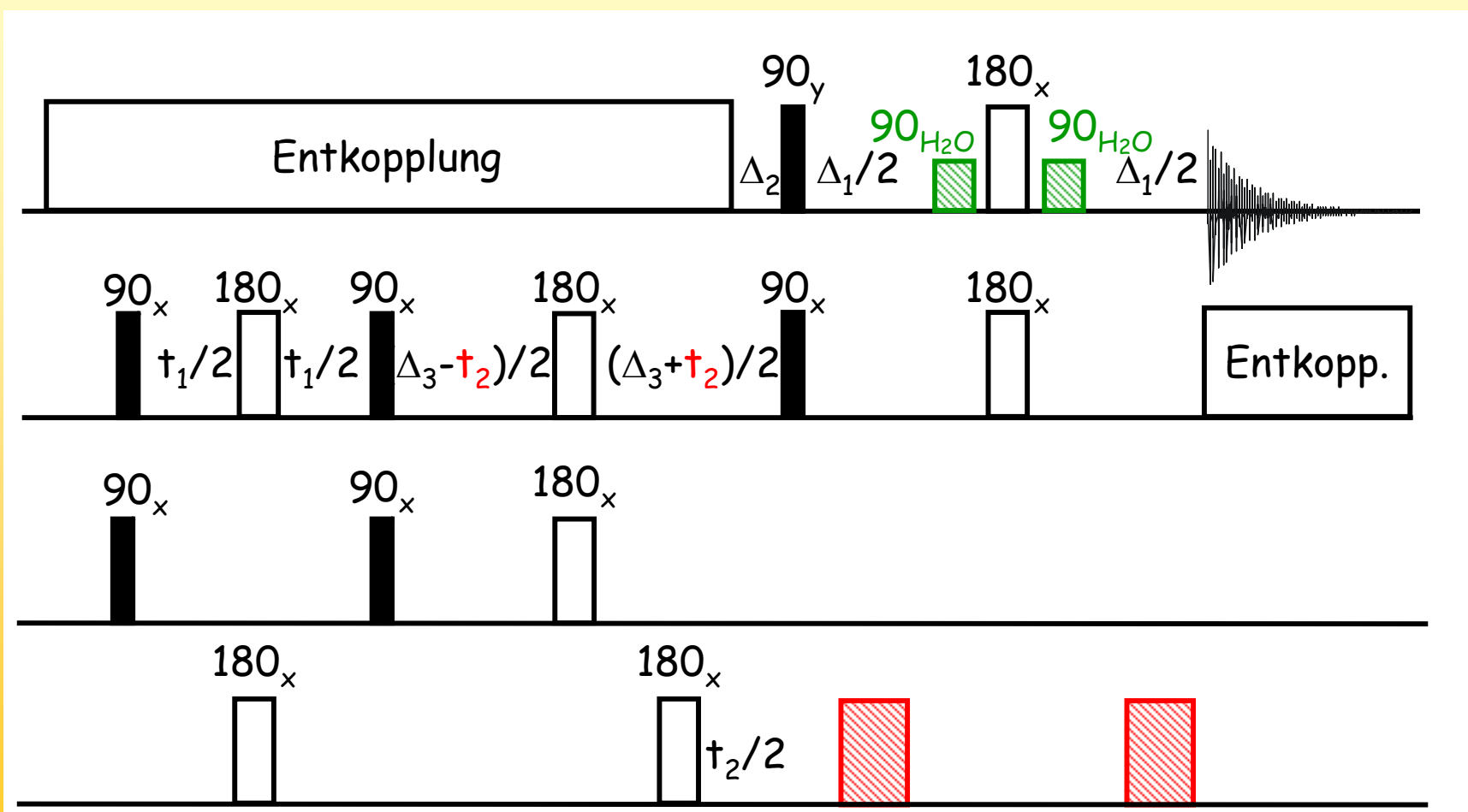
Tripelresonanztechniken

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

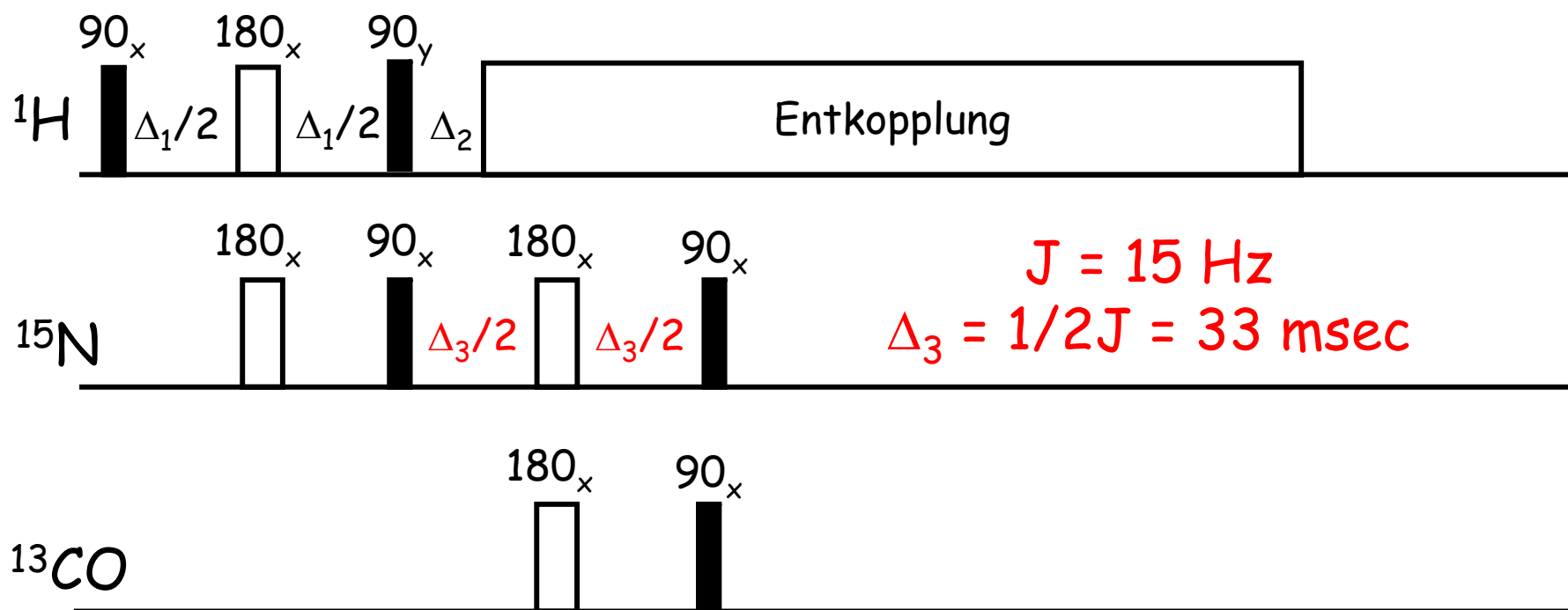


Tripelresonanztechniken

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

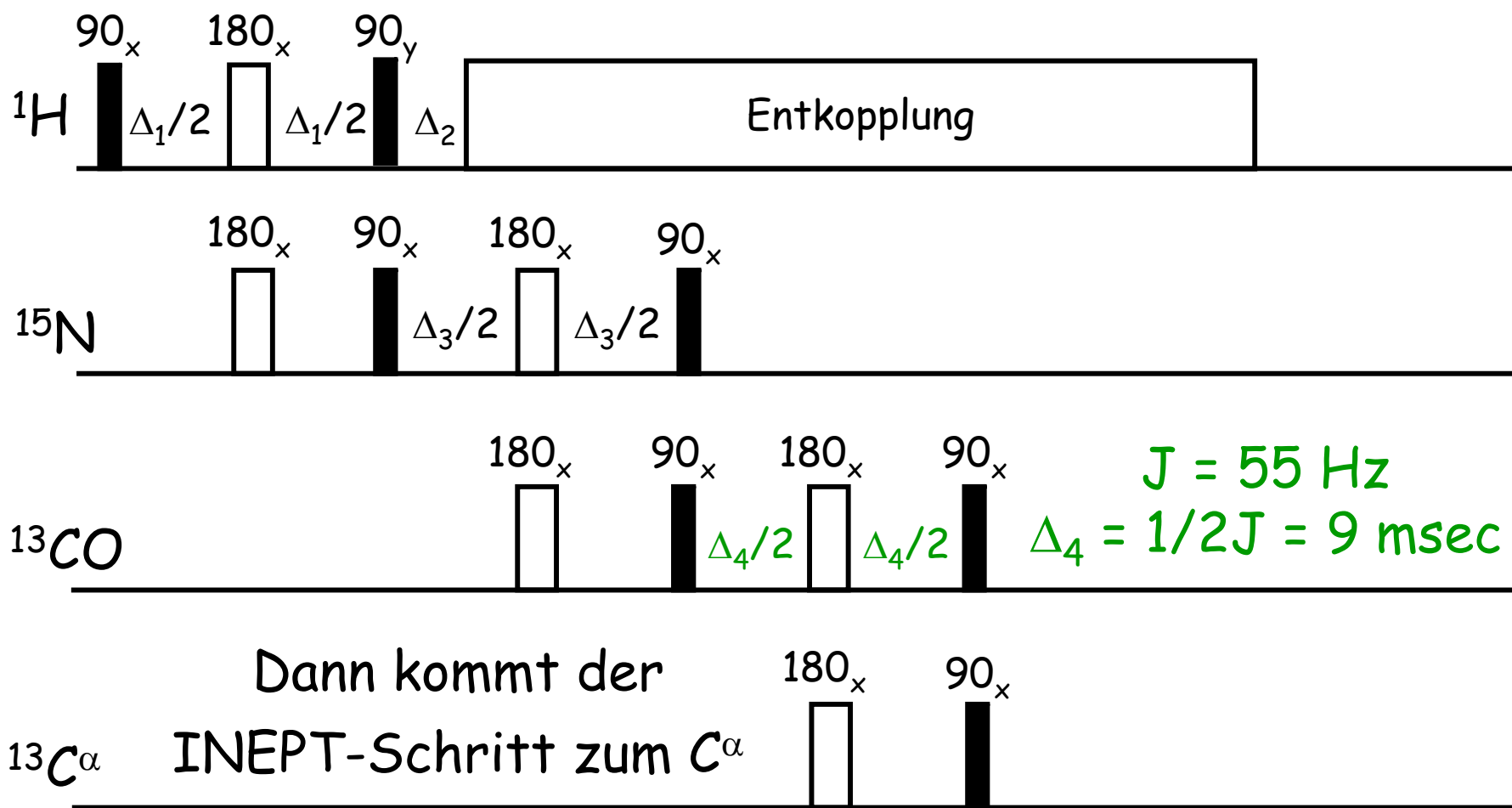
Diese Unterscheidung kann durch das HN(CO)CA bewerkstelligt werden, in dem der Transfer zum Carbonyl noch dazu kommt

Tripelresonanztechniken

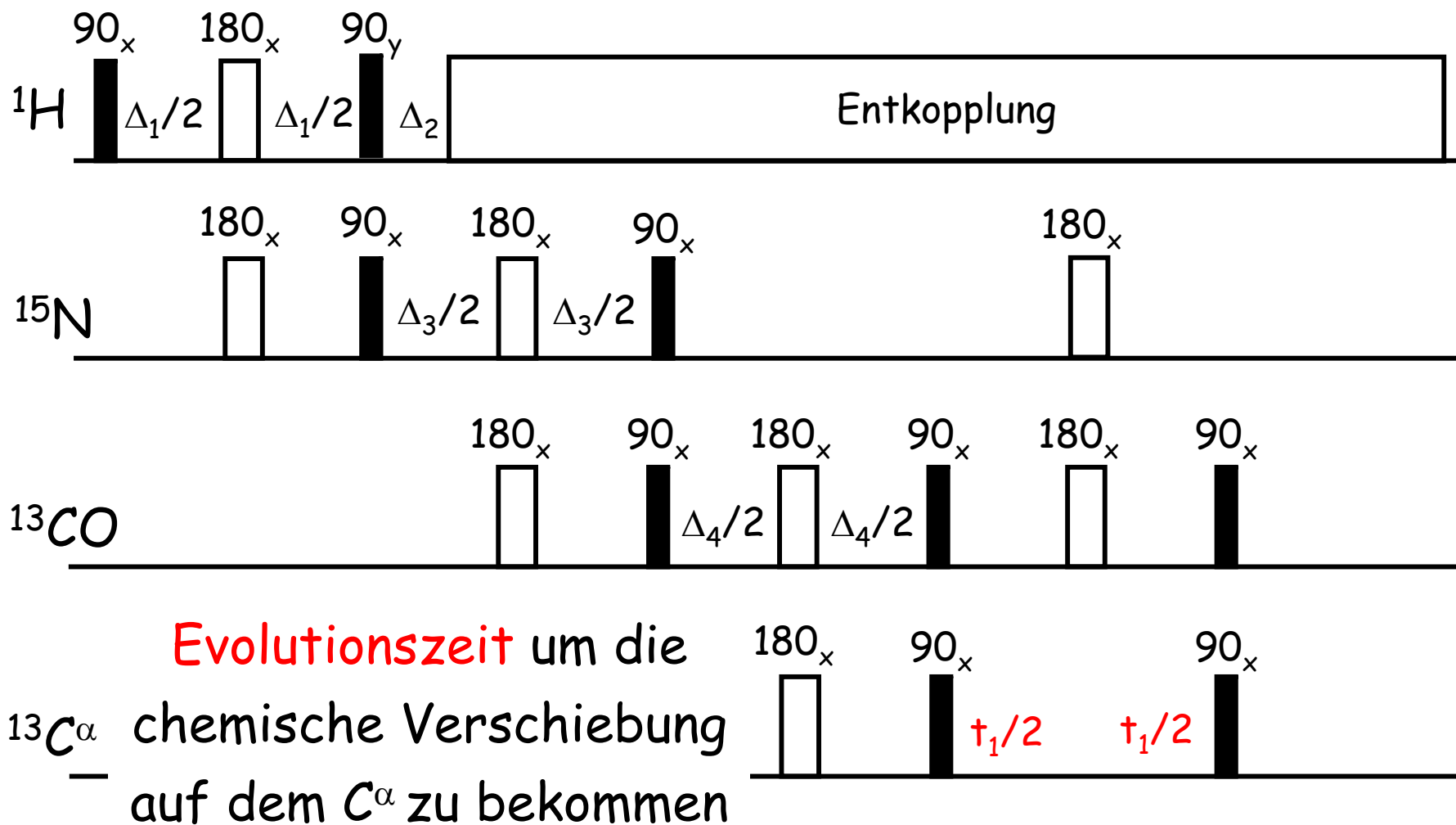


Der Anfang vom HN(CO)CA ist genau wie beim HNCA, nur gehen wir nicht zum C^α sondern zum CO, hier gibt es nur eine Kopplung, also $1/2J$ für Δ_3

Tripelresonanztechniken



Tripelresonanztechniken

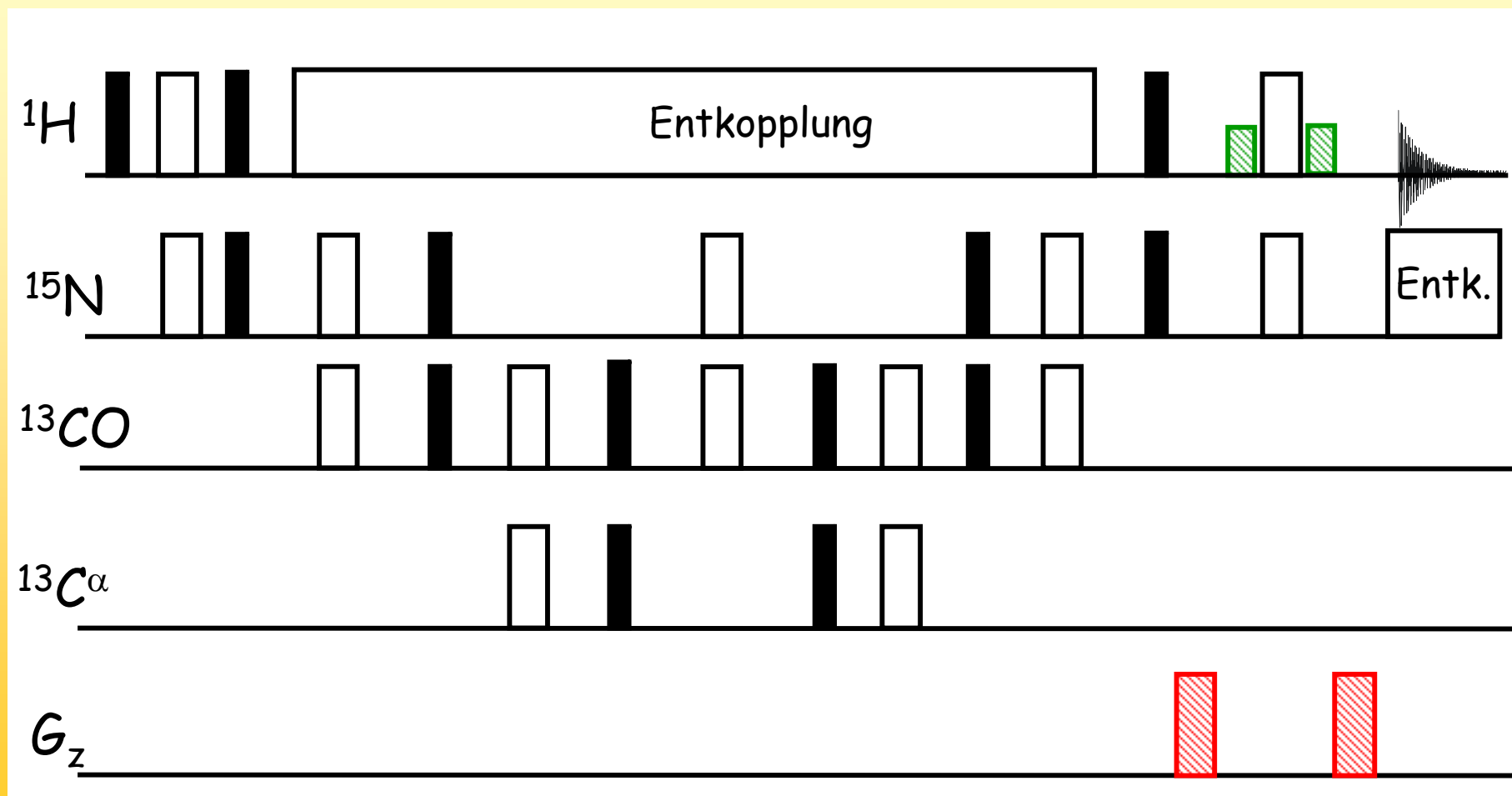


Tripelresonanztechniken

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

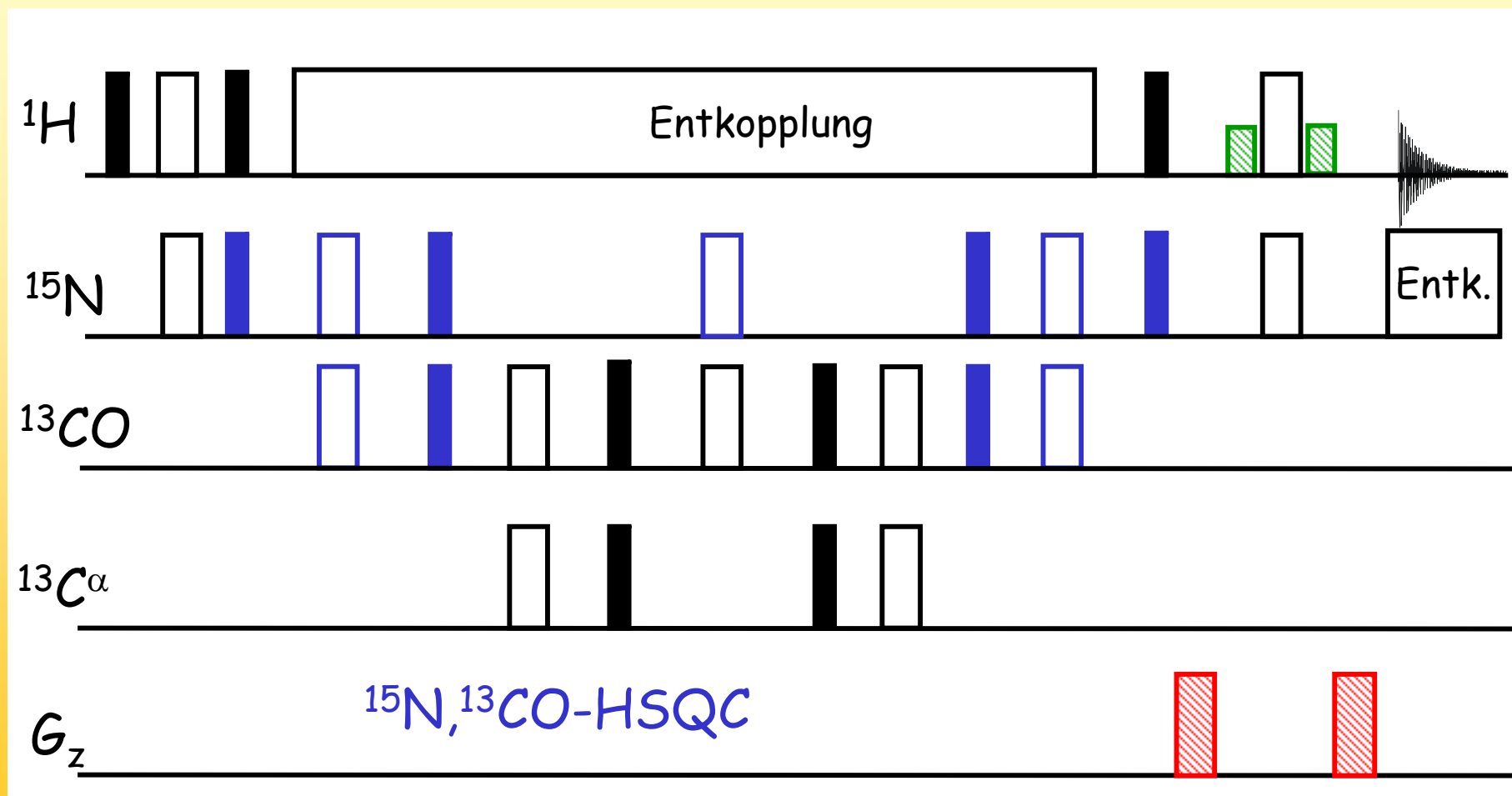
Tripelresonanztechniken

HN(CO)CA



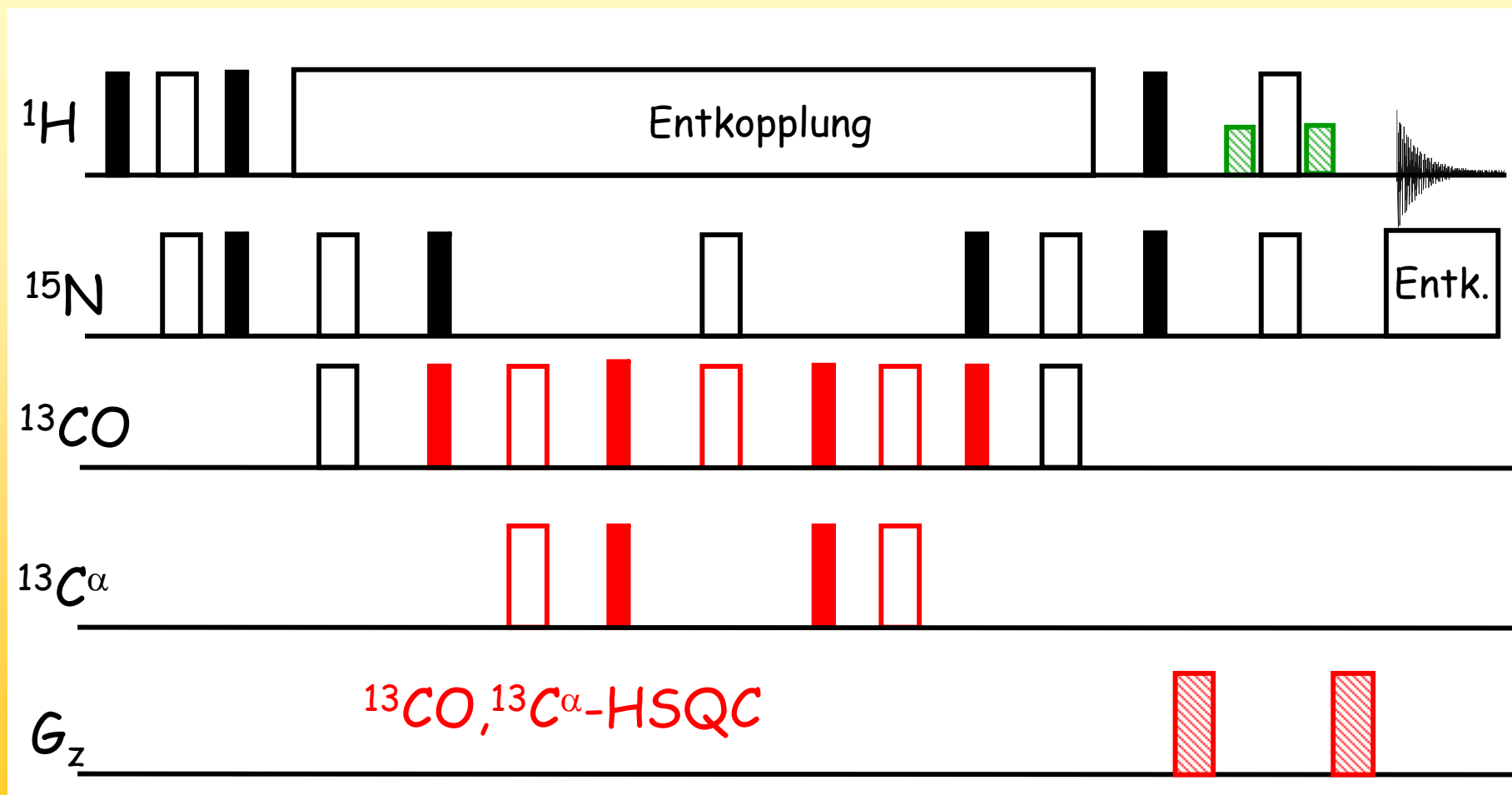
Tripelresonanztechniken

HN(CO)CA



Tripelresonanztechniken

HN(CO)CA

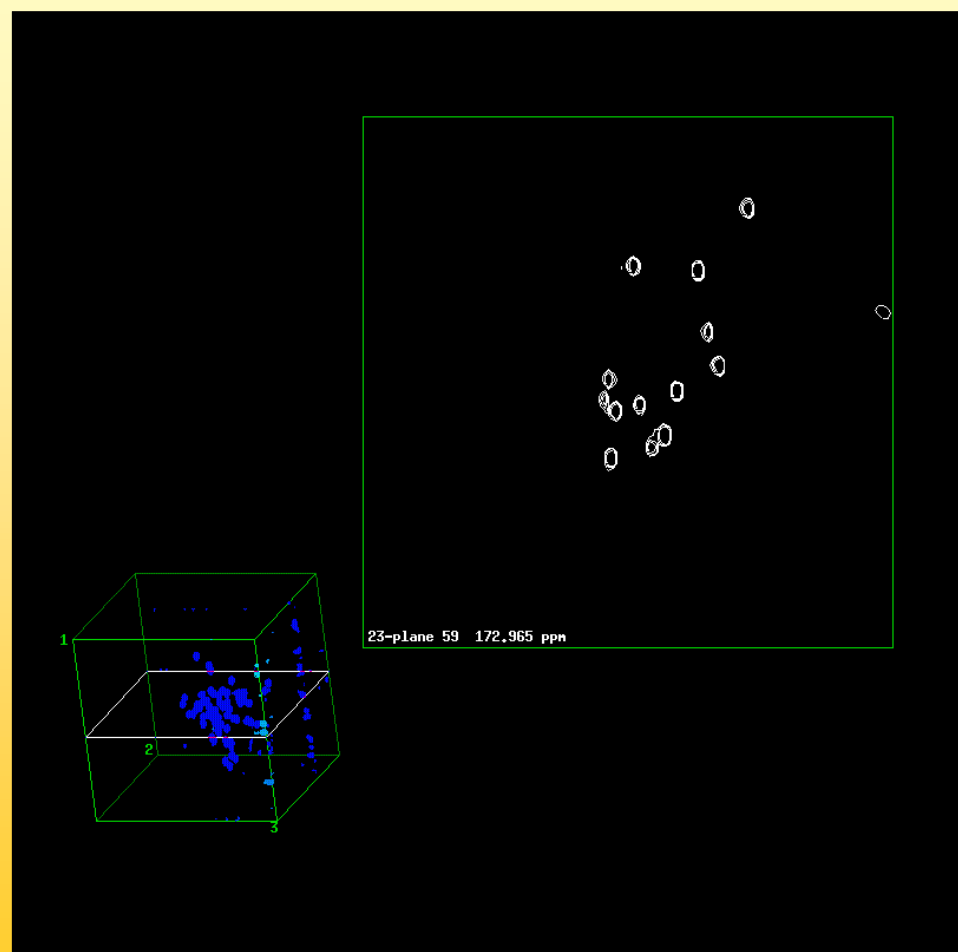


Tripelresonanztechniken

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

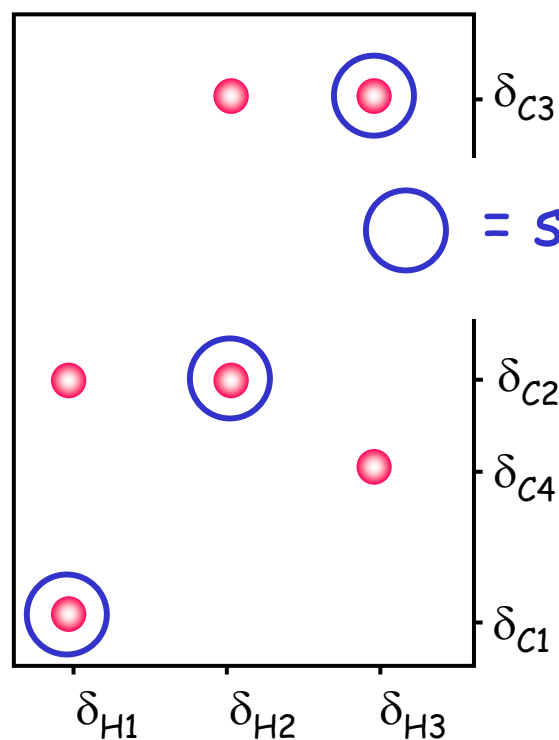
Tripelresonanztechniken

3D-NMR



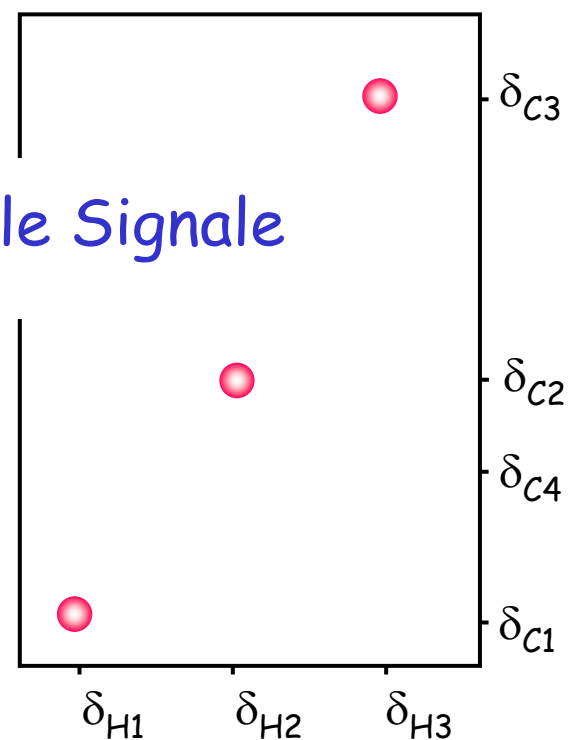
Tripelresonanztechniken

HNCA

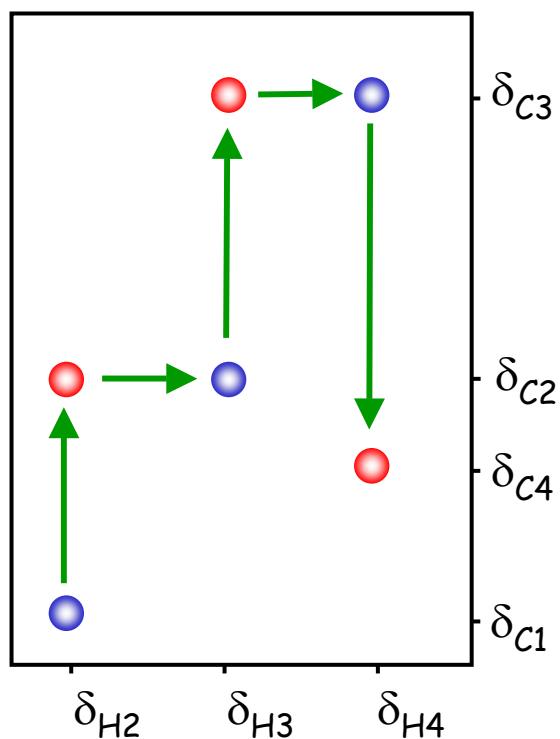
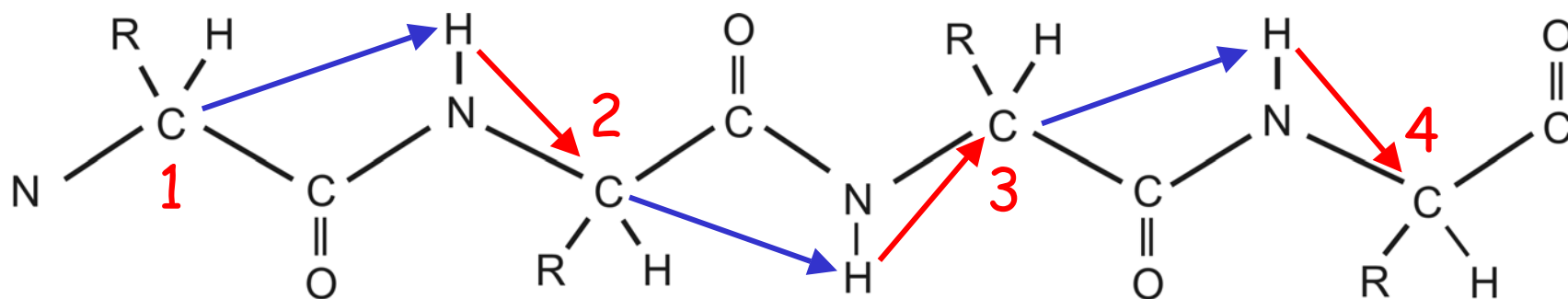


○ = sequentielle Signale

HN(CO)CA



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^β als weitere chemische Verschiebung hinzukommt.

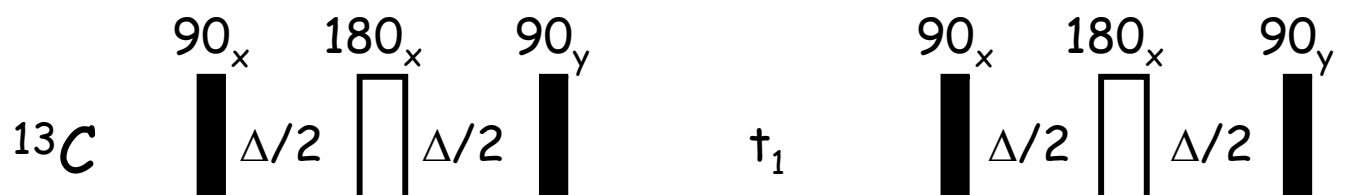
Tripelresonanztechniken

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

Allerdings wollen wir ja C^α und C^β detektieren, der Transfer sollte also so angelegt sein, daß beide Signale ungefähr gleich groß sind

Tripelresonanztechniken

Die folgende Sequenz wird verwendet:

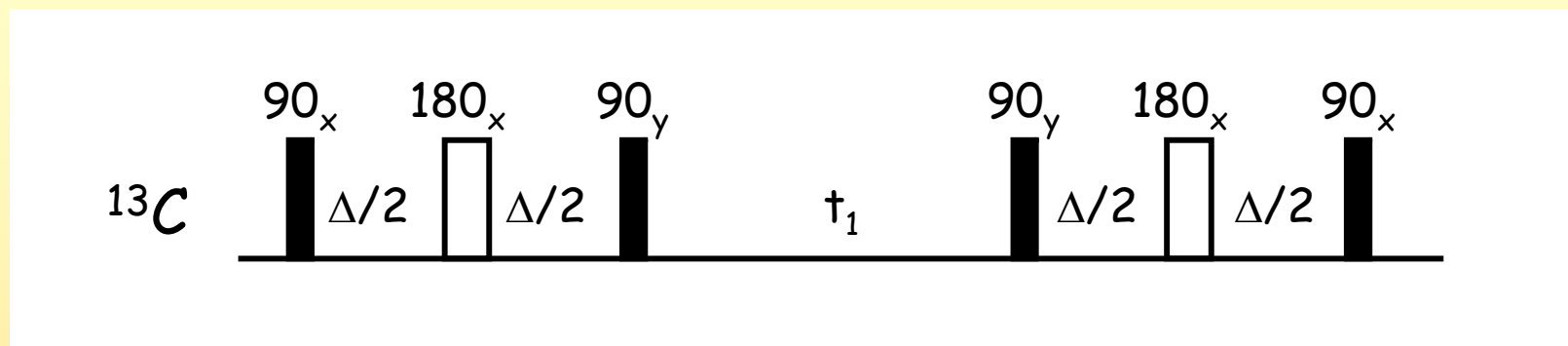


$$C_{\alpha z} \xrightarrow{90^\circ C_x} -C_{\alpha y} \xrightarrow{\pi J_{CC}\Delta}$$

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

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

Tripelresonanztechniken



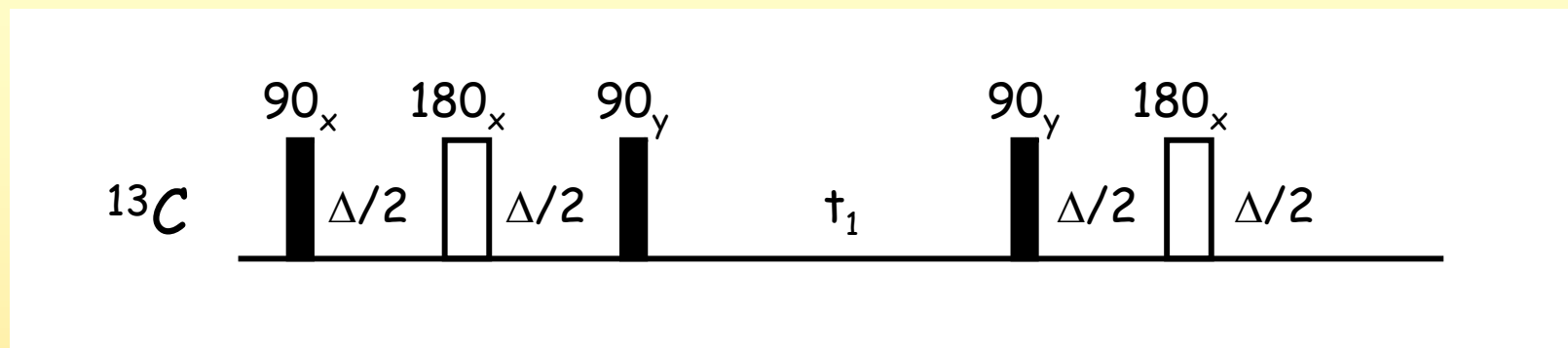
$$-C_{\alpha\gamma} \cos \pi J_{CC} \Delta - 2C_{\alpha z} C_{\beta x} \sin \pi J_{CC} \Delta$$

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

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

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

Tripelresonanztechniken



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

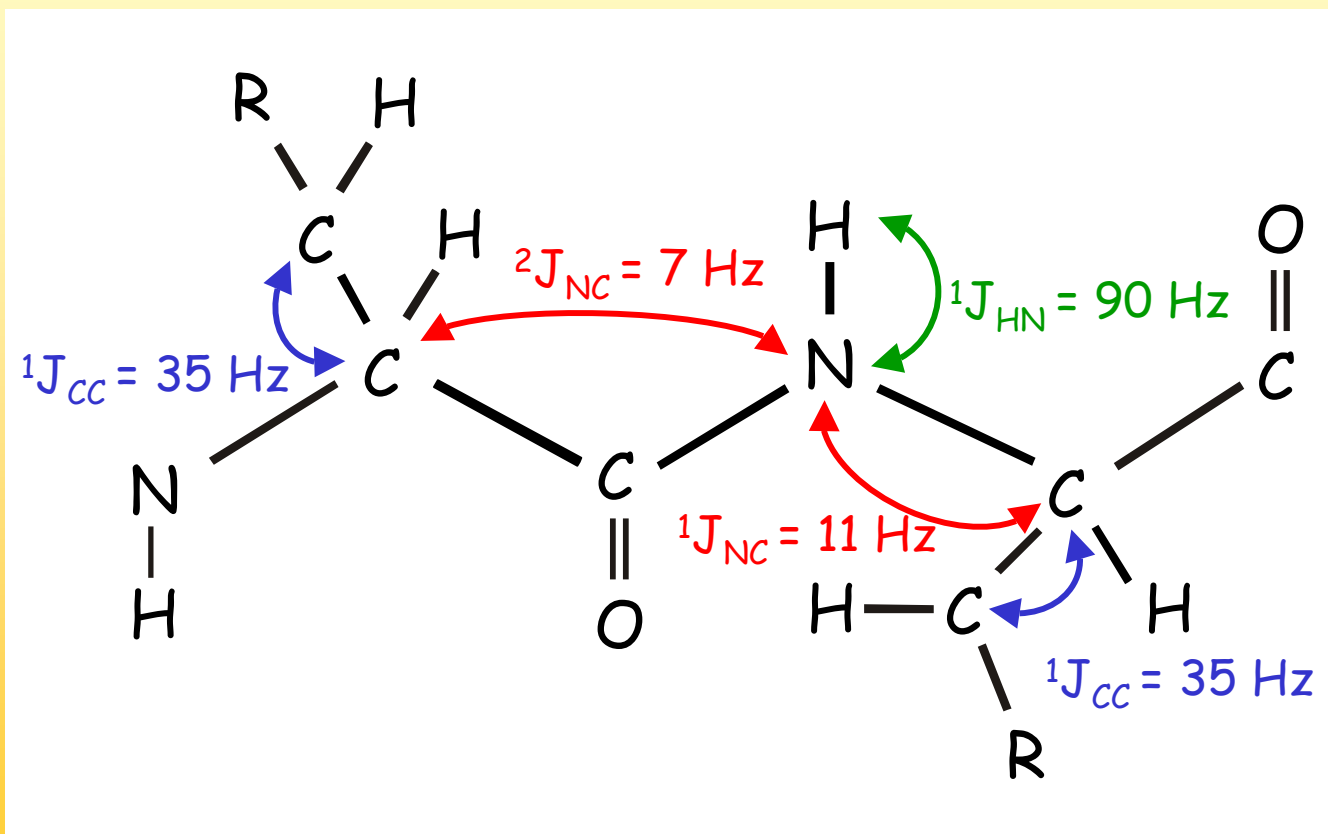
Konstante ! Konstante !

Wir haben also am Ende vom C^α zwei Signale mit gleicher Phase aber unterschiedlichem Vorzeichen, die die chemischen Verschiebungen von C^α und C^β tragen.

Und mit $\Delta = 1/4 J_{CC}$ ergibt sich für beide Terme der Faktor $\frac{1}{2}$.

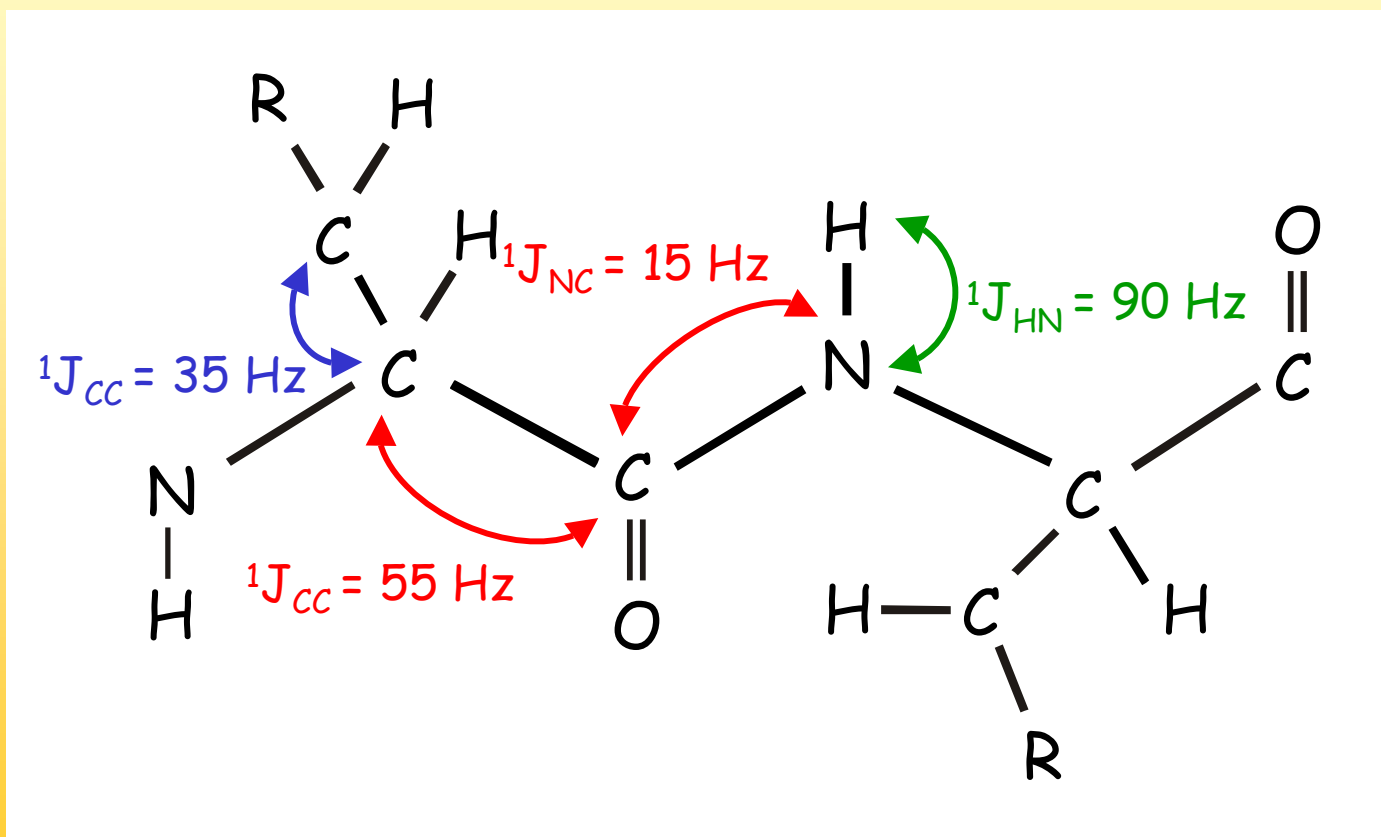
Tripelresonanztechniken

HNCACB



Tripelresonanztechniken

HN(CO)CACB



Tripelresonanztechniken

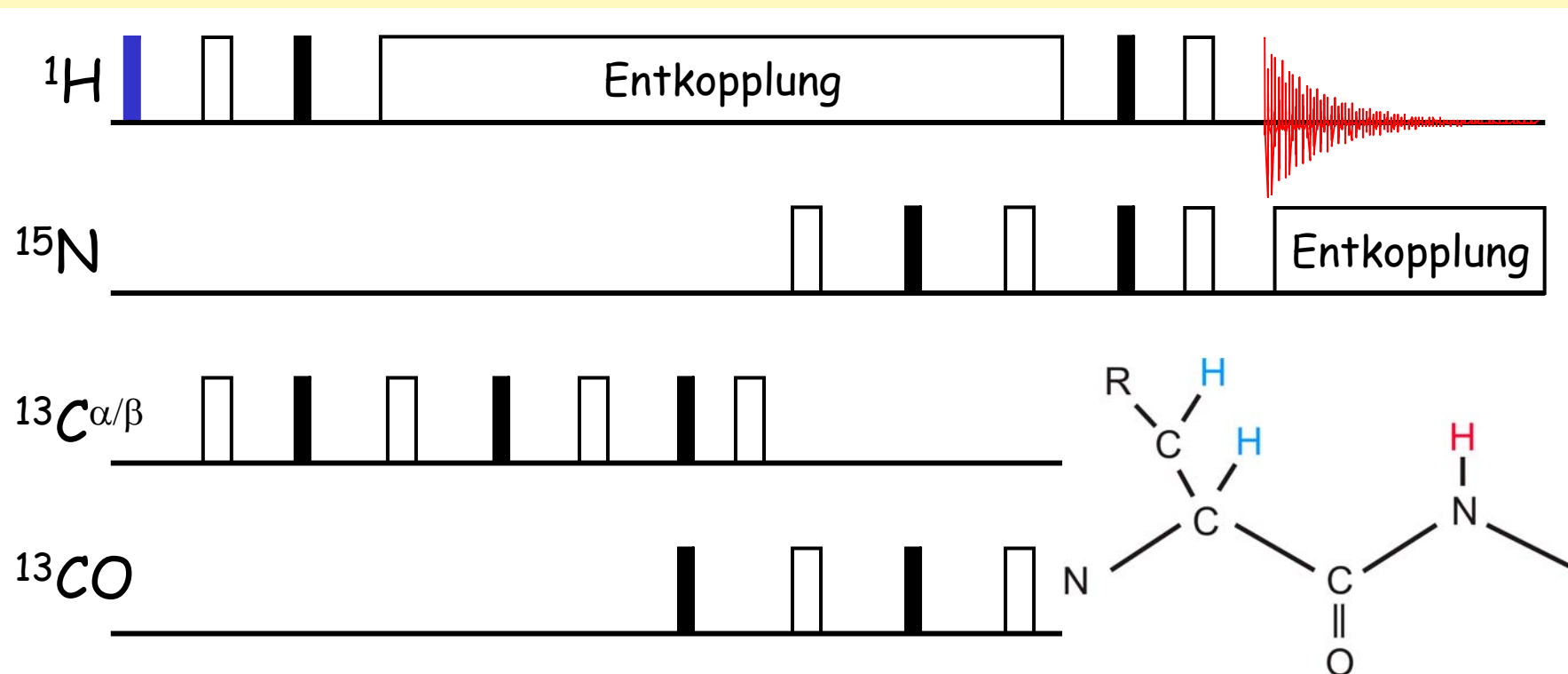
Die Namen der Experimente ergeben sich aus der bisherigen Logik der Namensgebung.

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

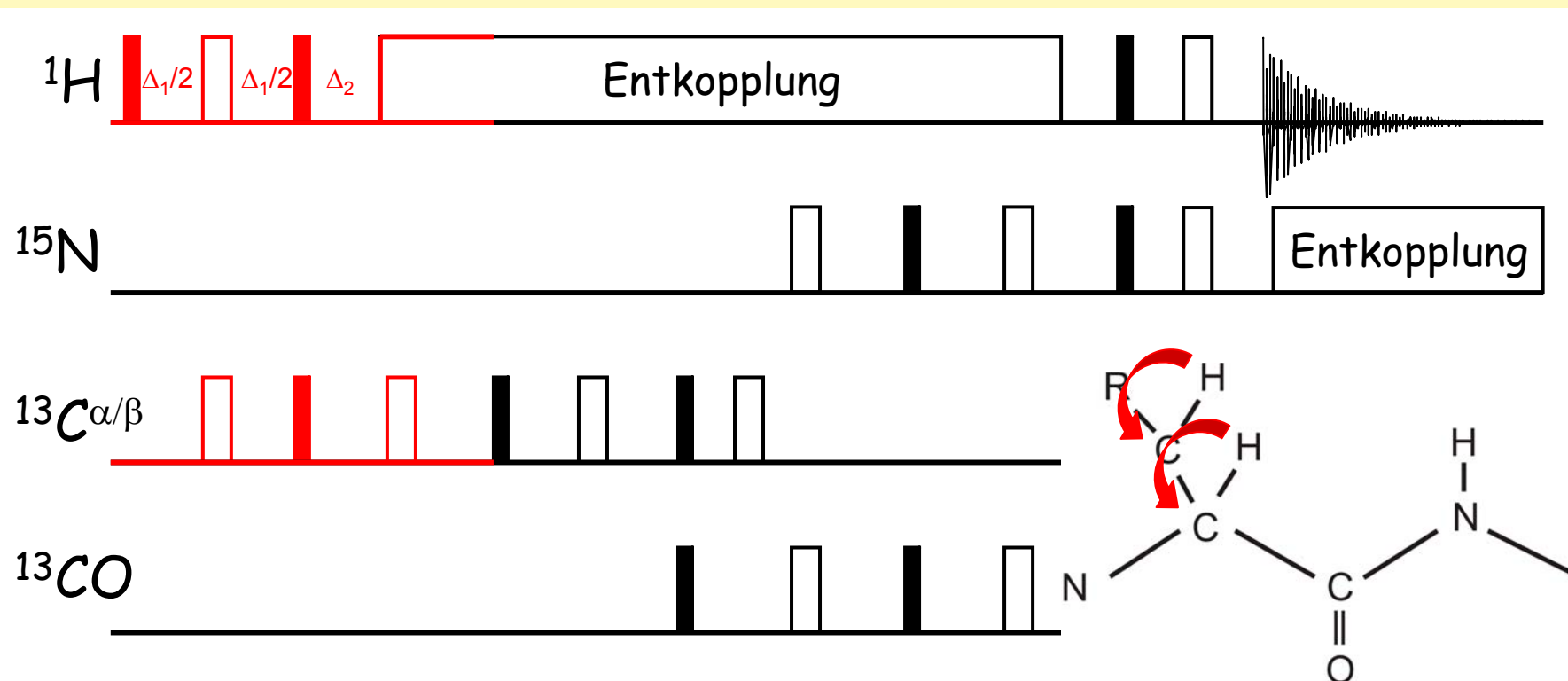
CBCA(CO)NNH



Beginn und Detektion auf dem Proton: Empfindlichkeit !

Tripelresonanztechniken

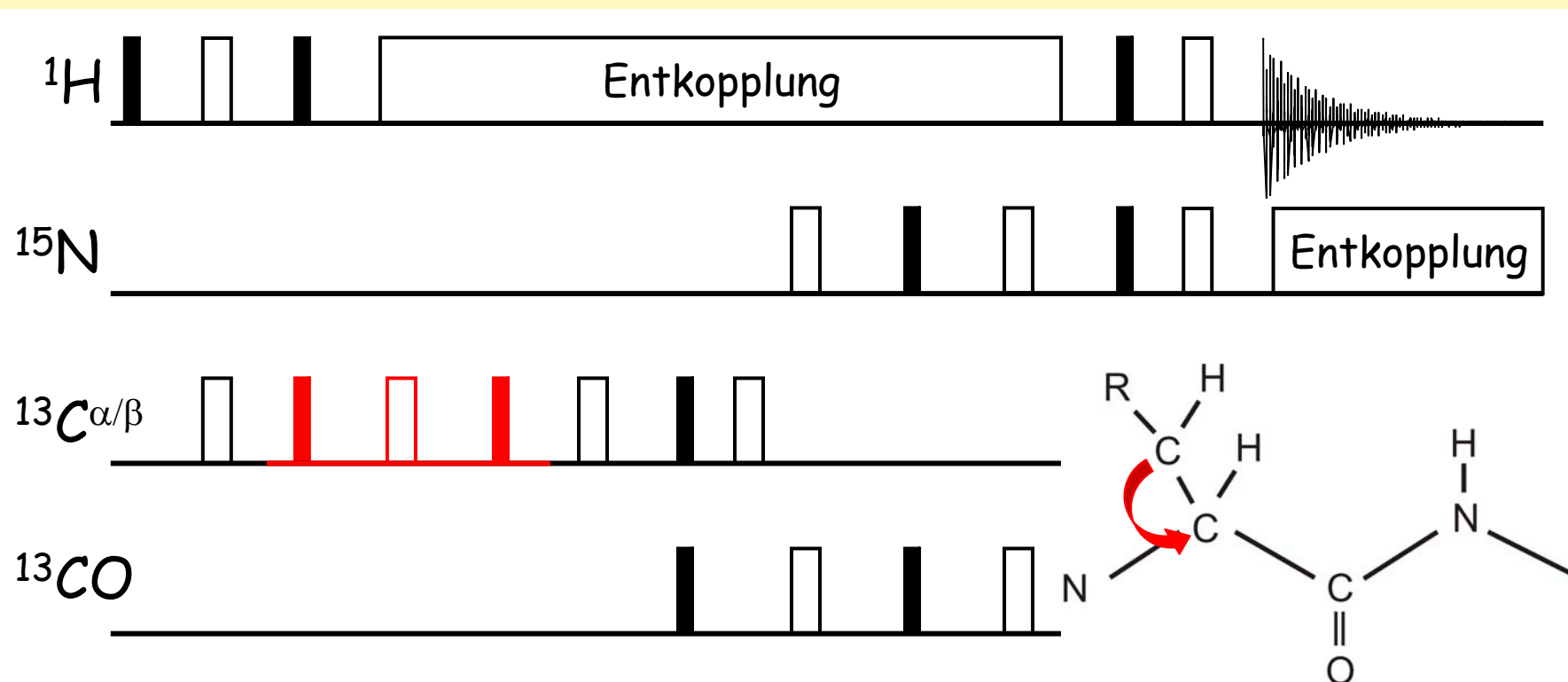
CBCA(CO)NNH



INEPT von Protonen zu Kohlenstoffen

Tripelresonanztechniken

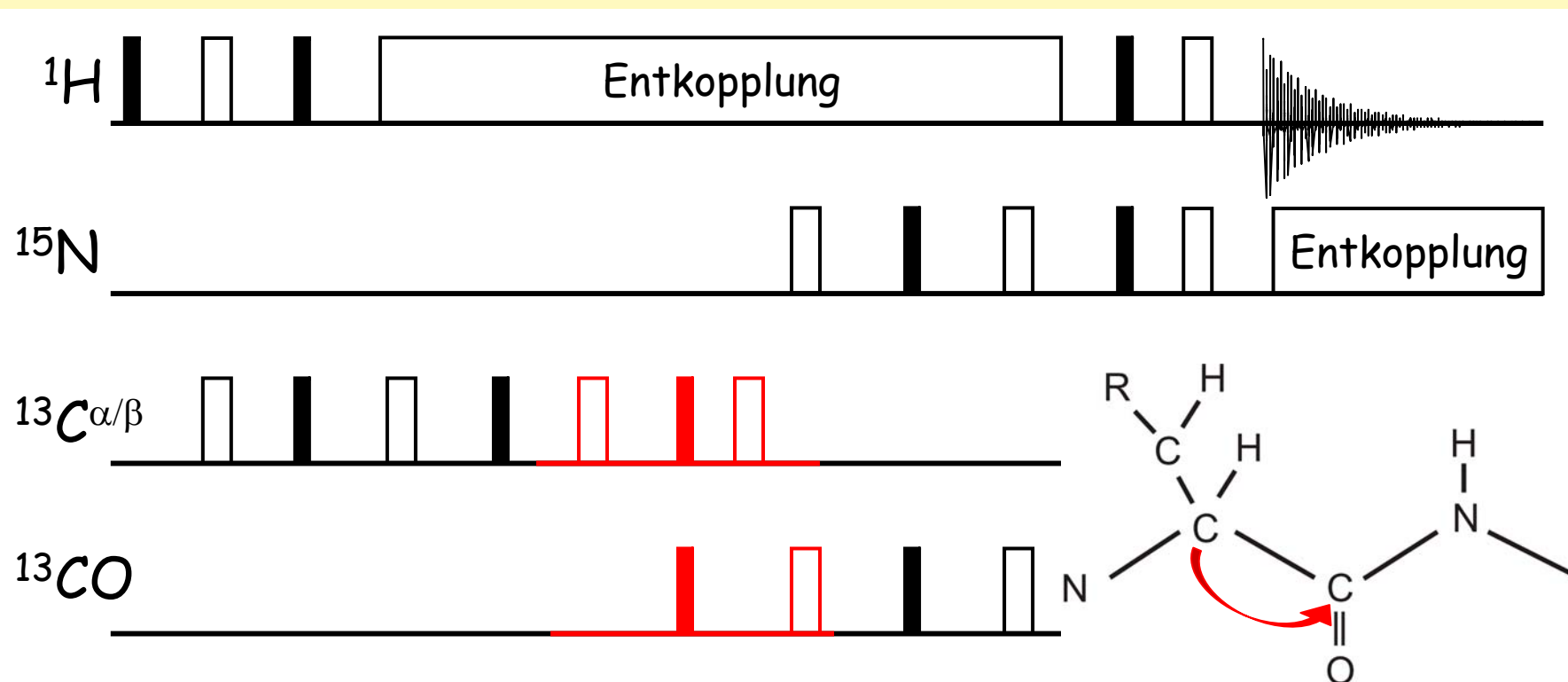
CBCA(CO)NNH



COSY von Kohlenstoff zu Kohlenstoff

Tripelresonanztechniken

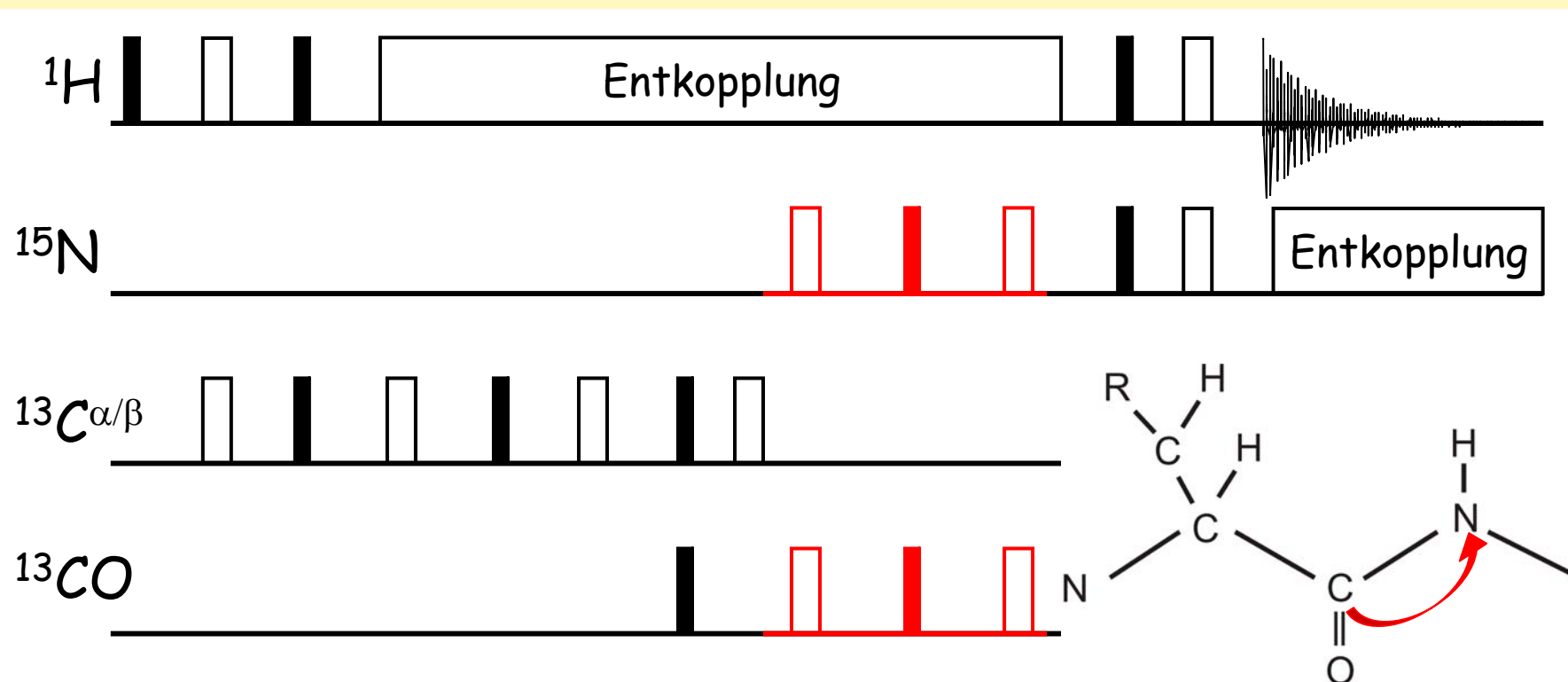
CBCA(CO)NNH



INEPT von aliphatischem C zu Carbonyl-C

Tripelresonanztechniken

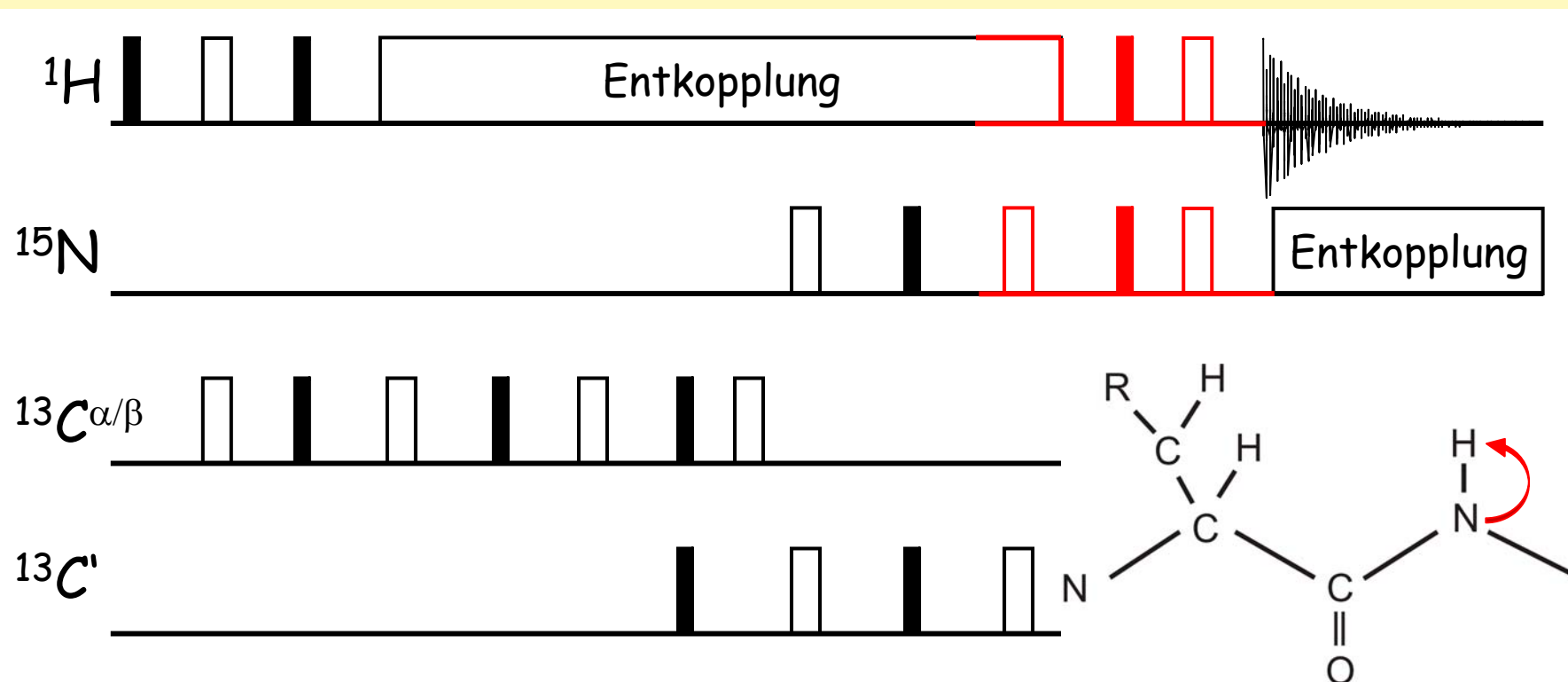
CBCA(CO)NNH



INEPT von Carbonyl-C zu Stickstoff

Tripelresonanztechniken

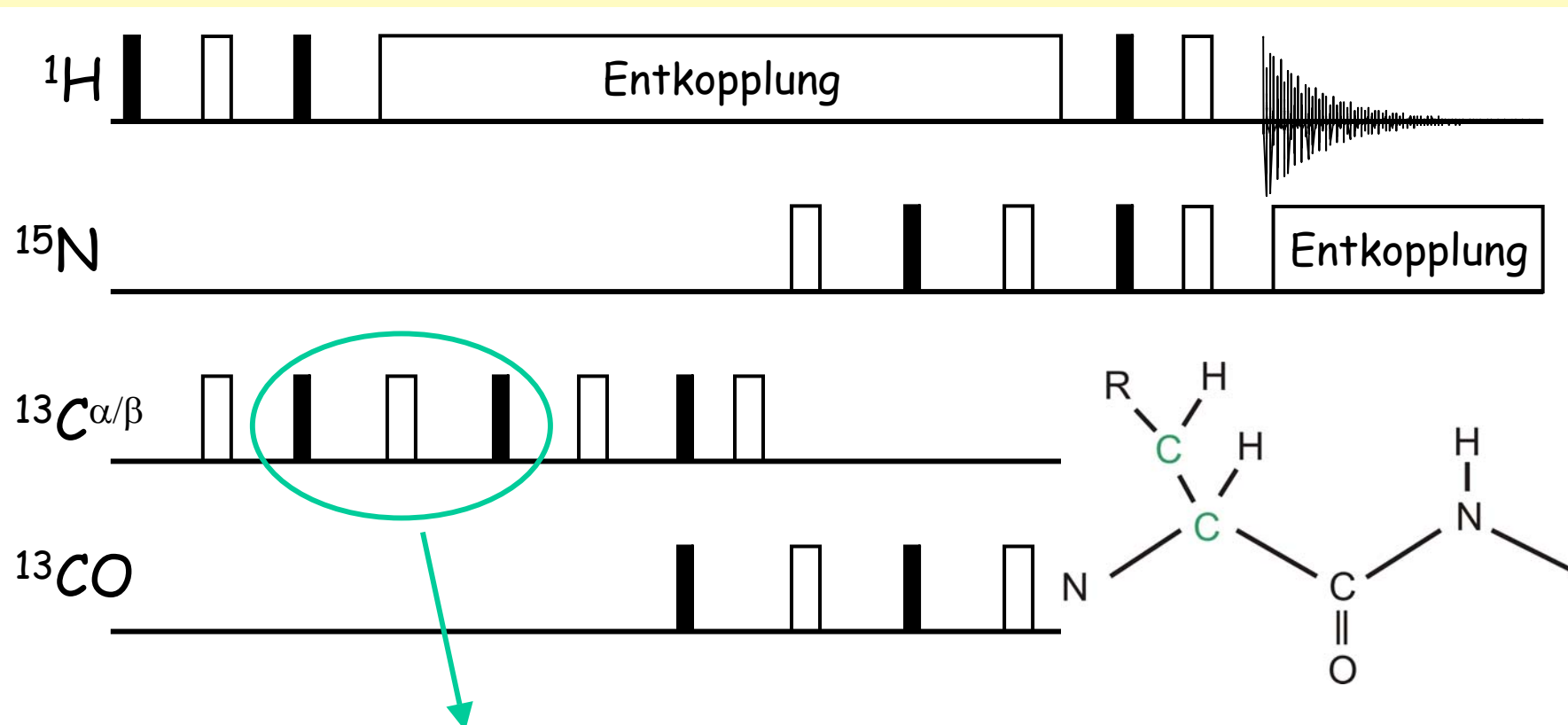
CBCA(CO)NNH



INEPT von Stickstoff zu Aminoproton

Tripelresonanztechniken

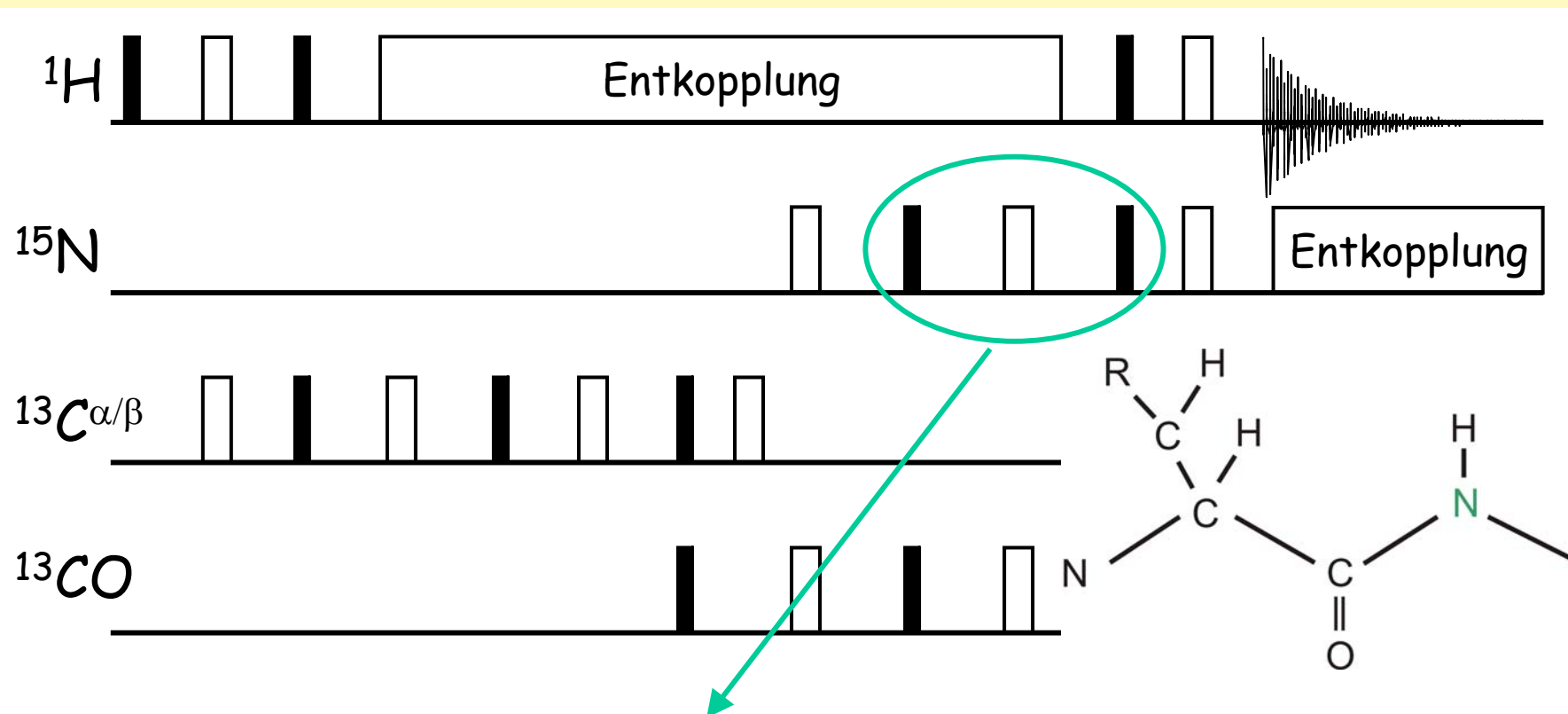
CBCA(CO)NNH



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

Tripelresonanztechniken

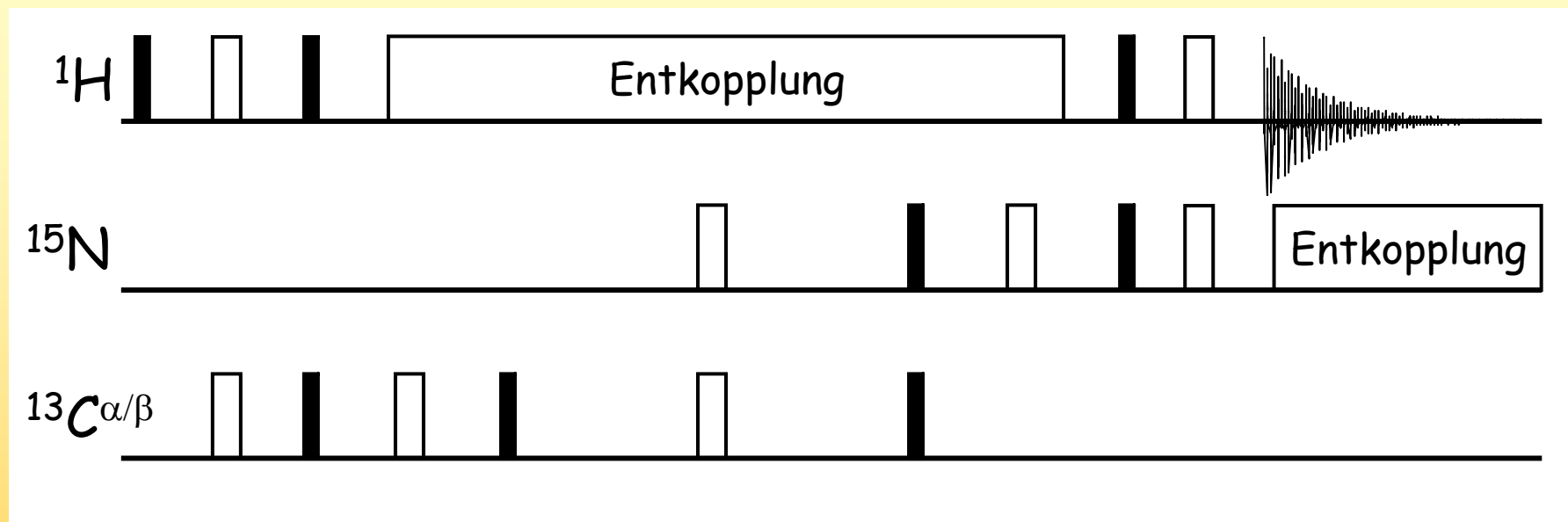
CBCA(CO)NNH



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

Tripelresonanztechniken

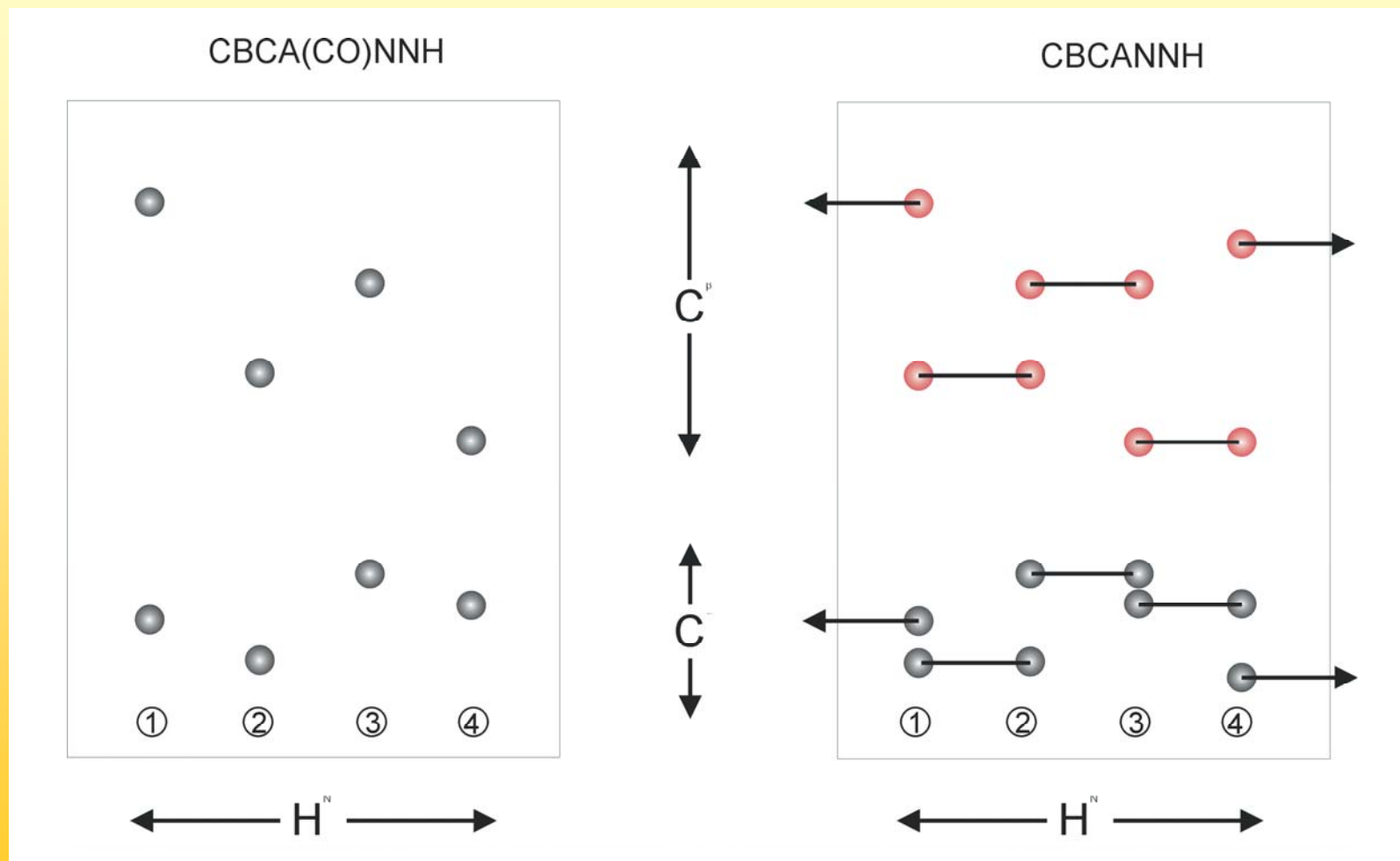
CBCANNH



Hier wird wieder die Kopplung zwischen C^α und N genutzt, also sind wieder zwei Wege für den Magnetisierungstransfer vorhanden und es sollten 4 Signale werden

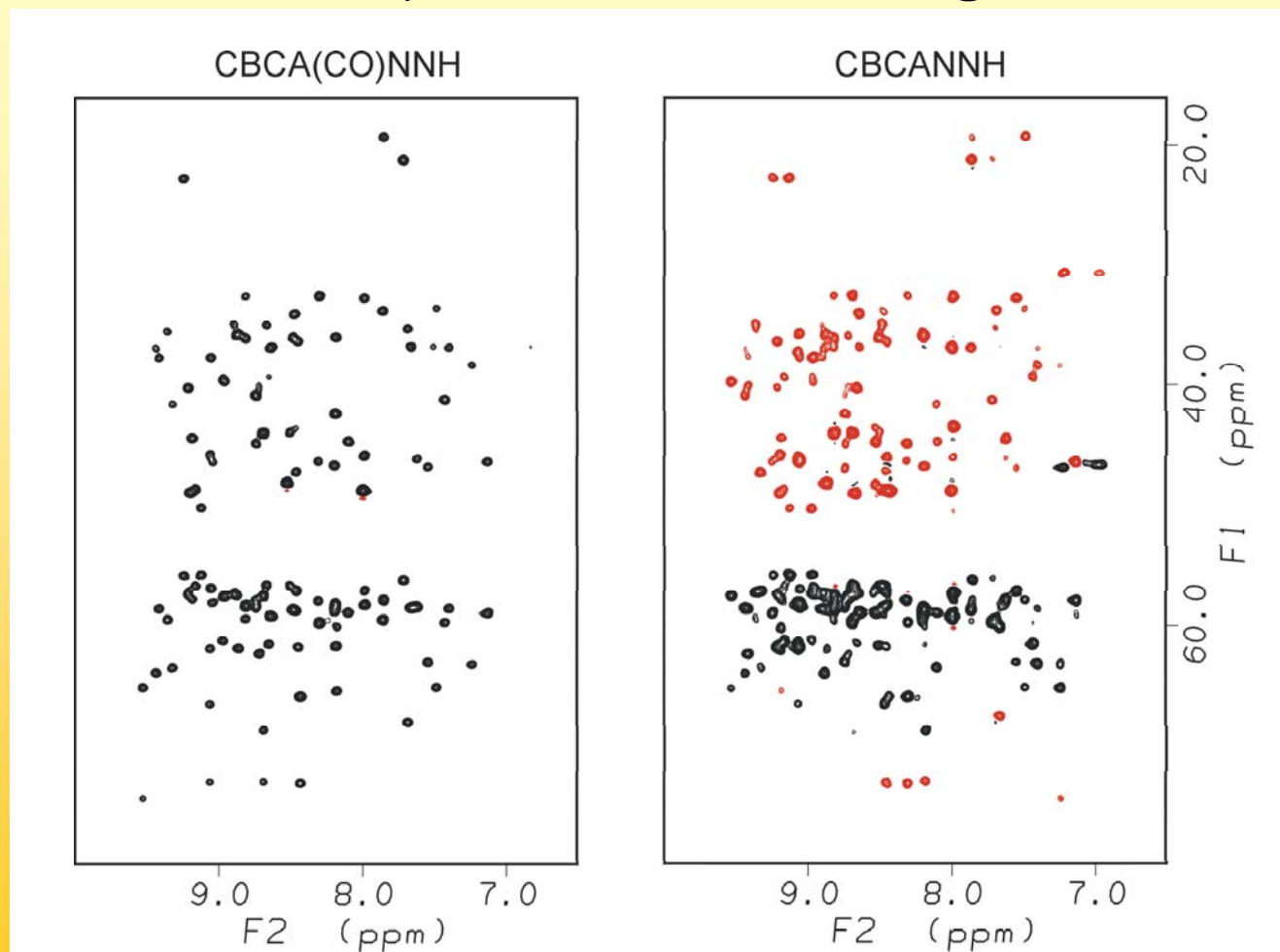
Tripelresonanztechniken

Sequentielle Zuordnung



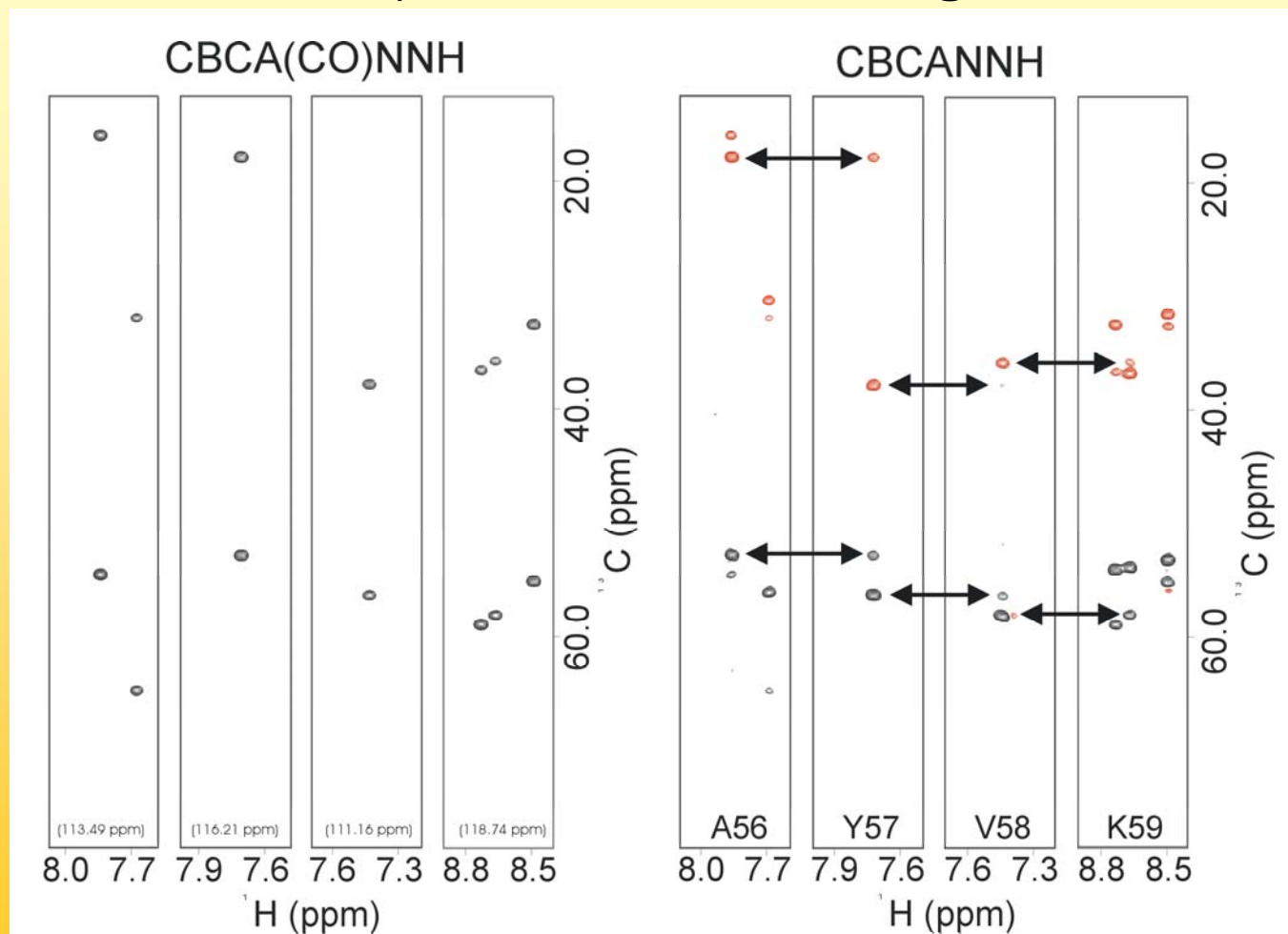
Tripelresonanztechniken

Sequentielle Zuordnung



Tripelresonanztechniken

Sequentielle Zuordnung



Tripelresonanztechniken

Mit den beiden Experimenten sind wieder sequentielle Nachbarschaften etabliert worden.

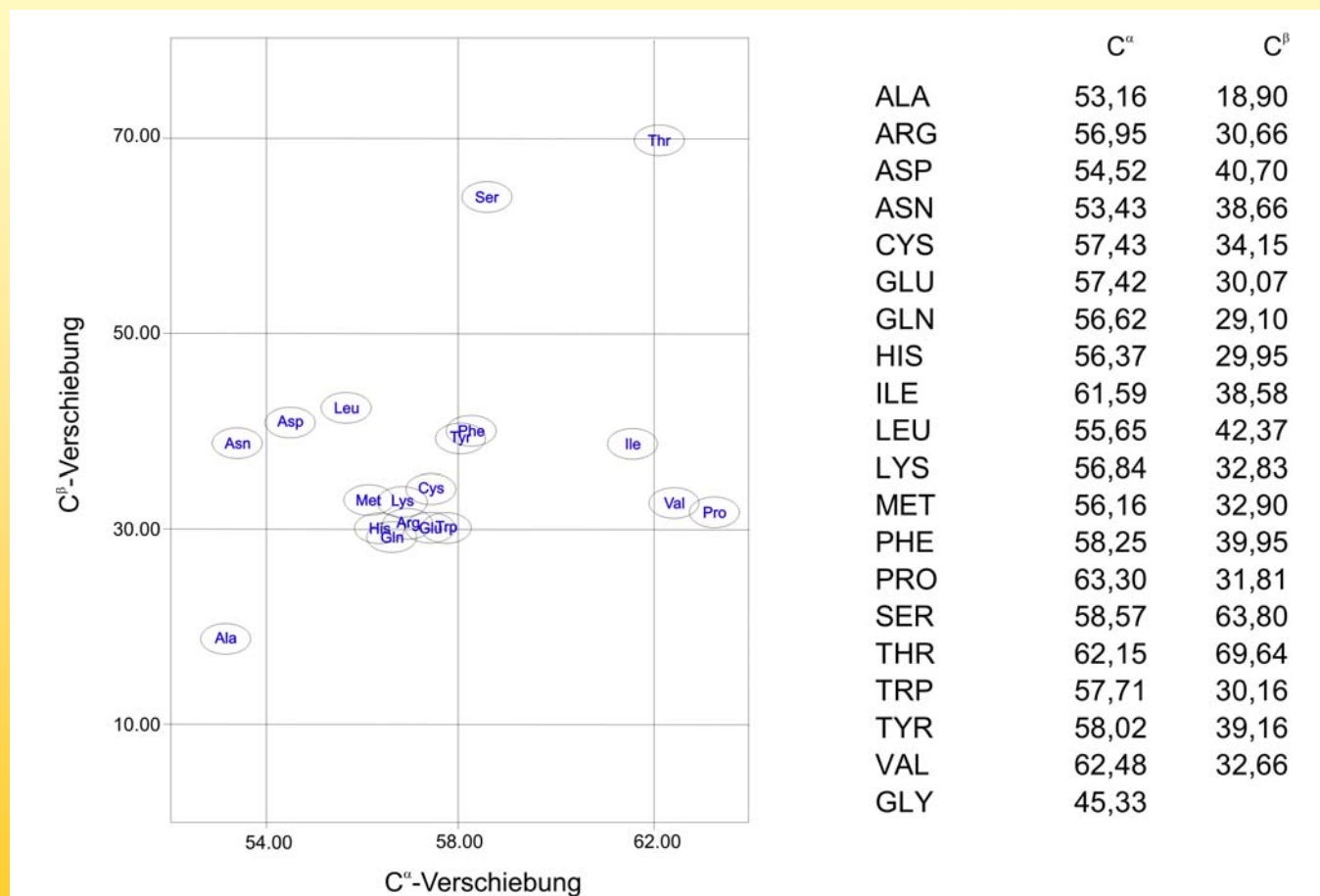
Um eine eindeutige Zuordnung zu machen muss man die Reihe der Aminosäuren mit der Sequenz abgleichen, d.h.

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 $C\beta$.

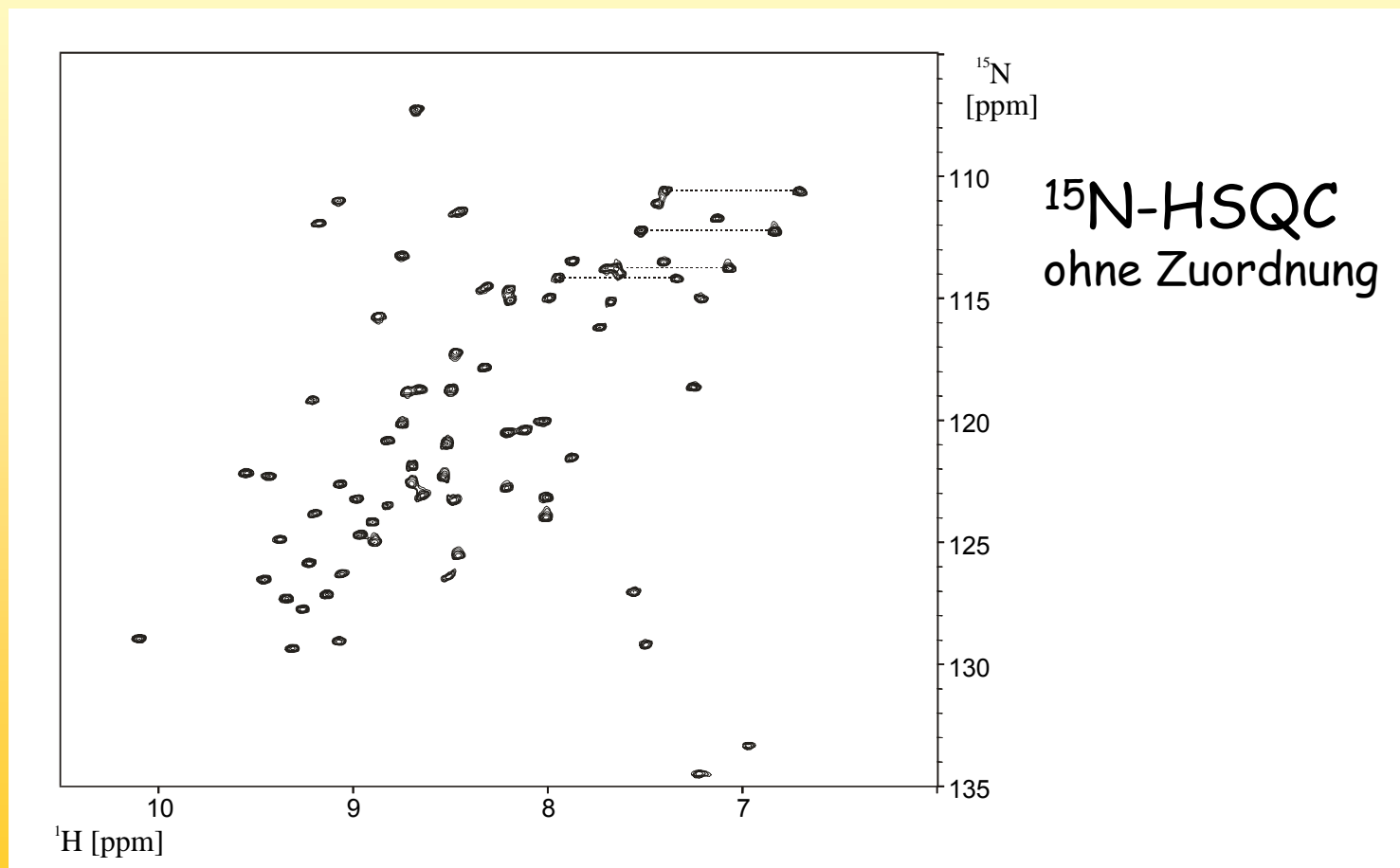
Tripelresonanztechniken

Aminosäuretyp-Bestimmung



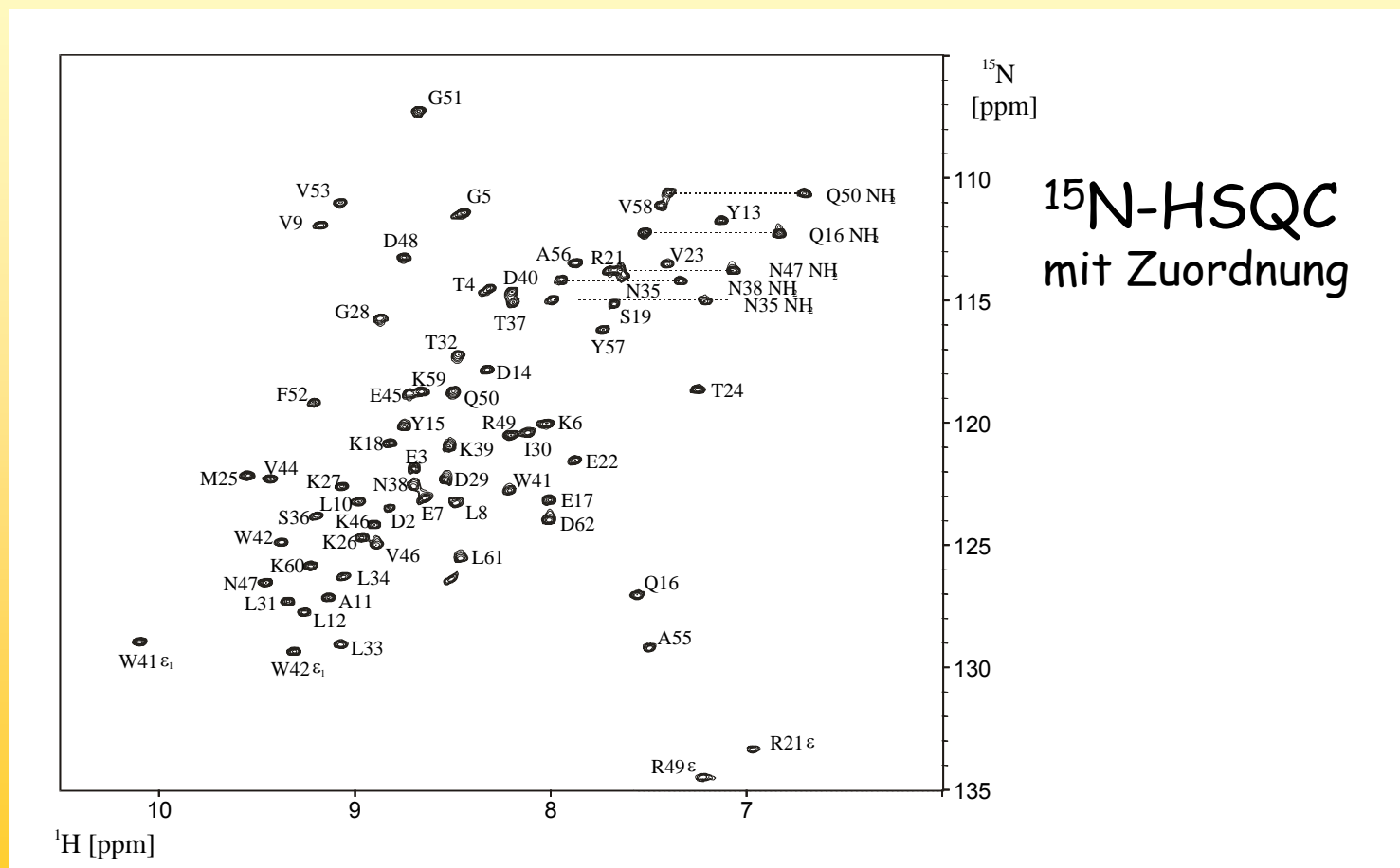
Tripelresonanztechniken

„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

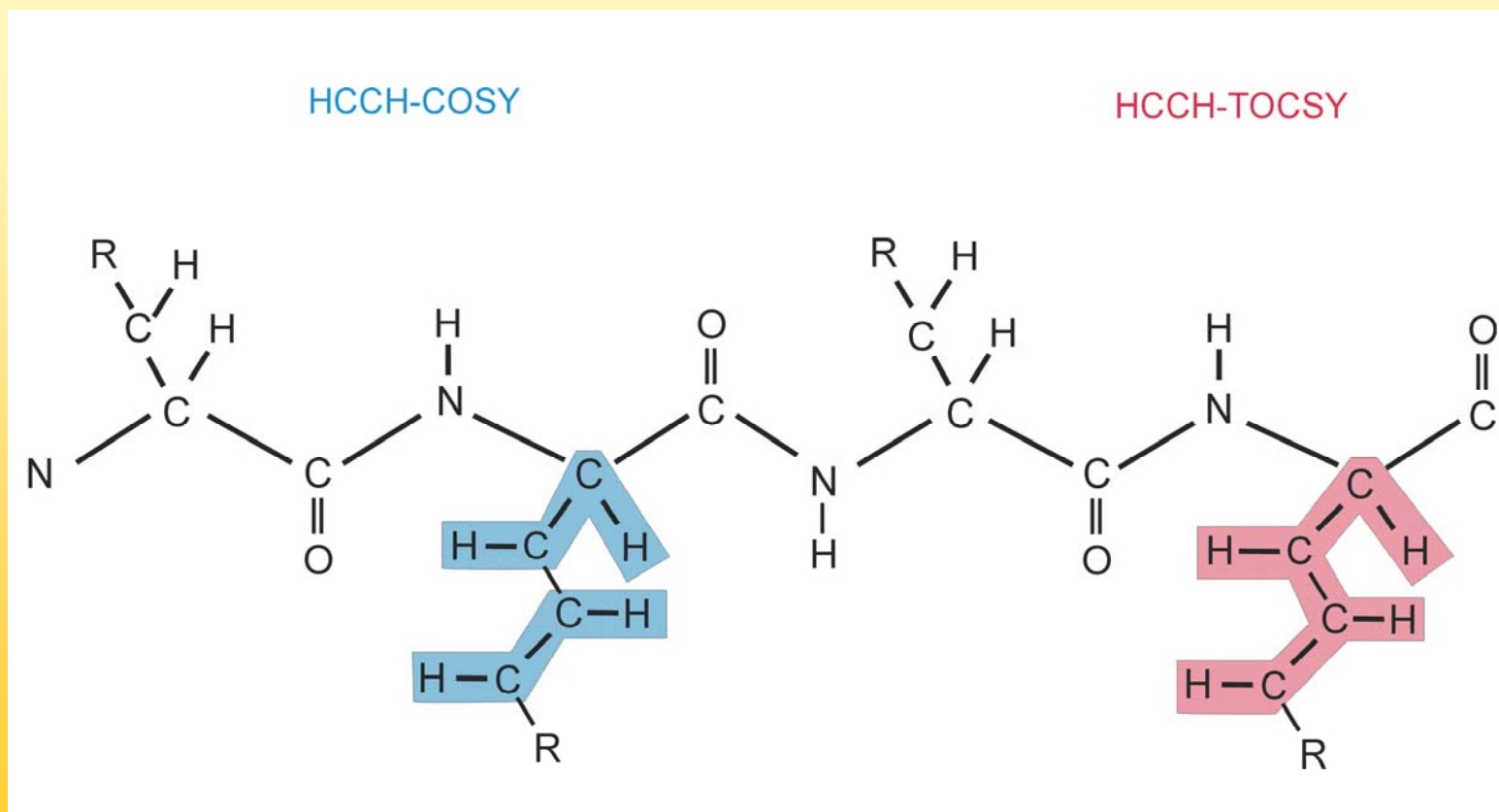
(H)C(CO)NNH-TOCSY

Kohlenstoffe der Seitenkette

Man führt aber auch noch eine andere Zuordnung durch

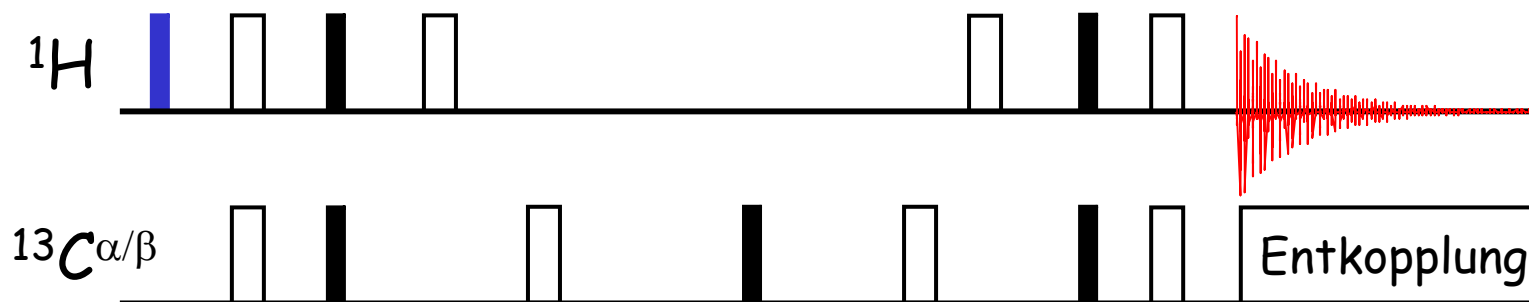
Tripelresonanztechniken

Seitenkettenzuordnung

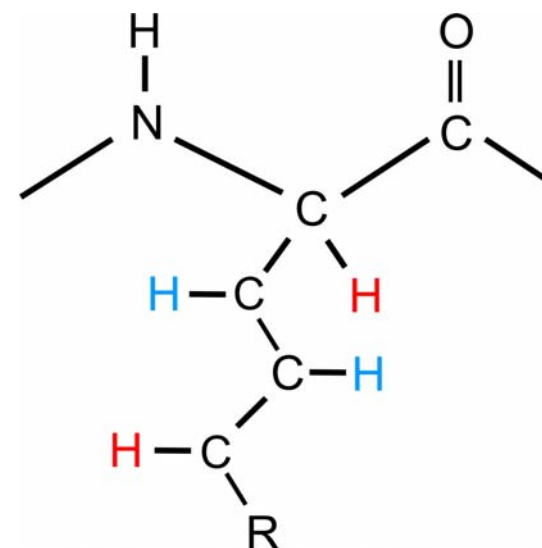


Tripelresonanztechniken

HCCH-COSY

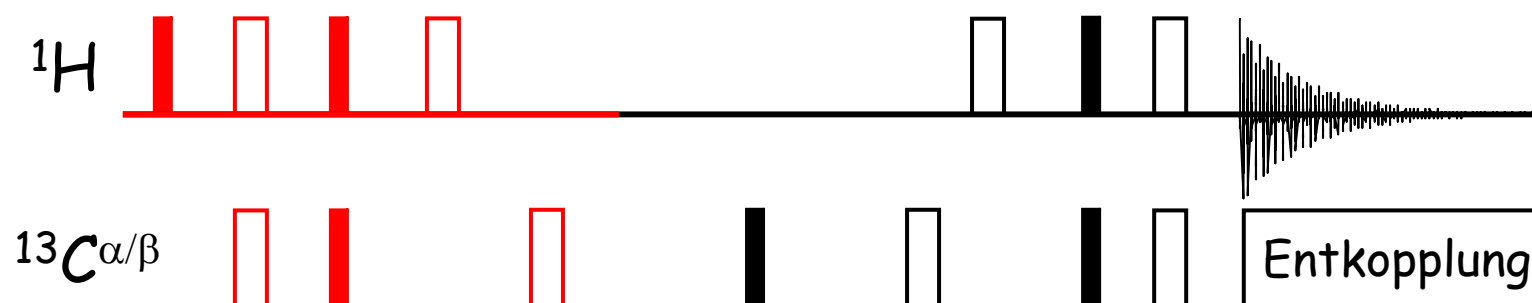


Beginn und Detektion auf
dem Proton: Empfindlichkeit !

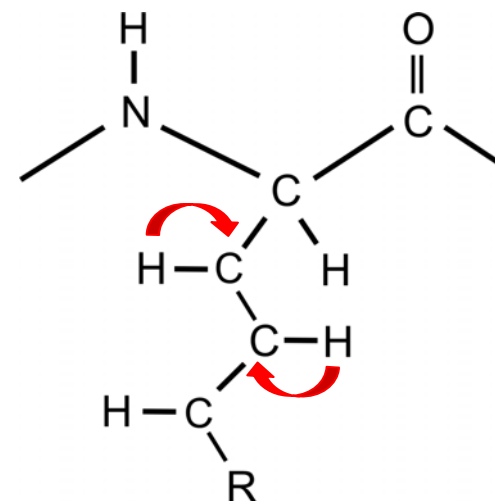


Tripelresonanztechniken

HCCH-COSY

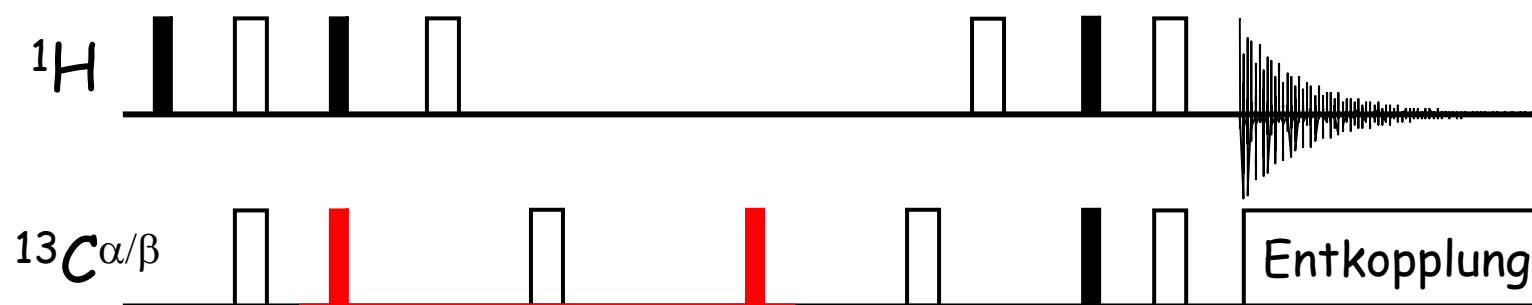


INEPT von Protonen
zu Kohlenstoffen

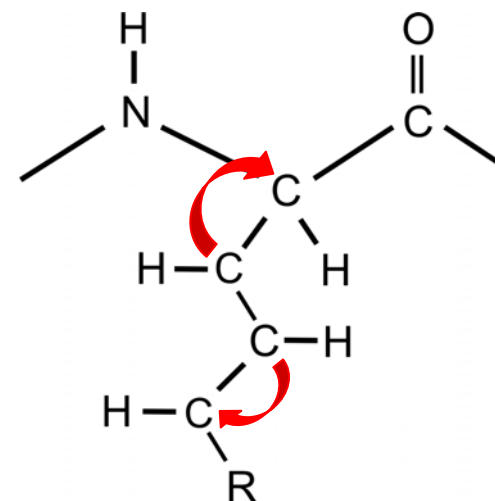


Tripelresonanztechniken

HCCH-COSY

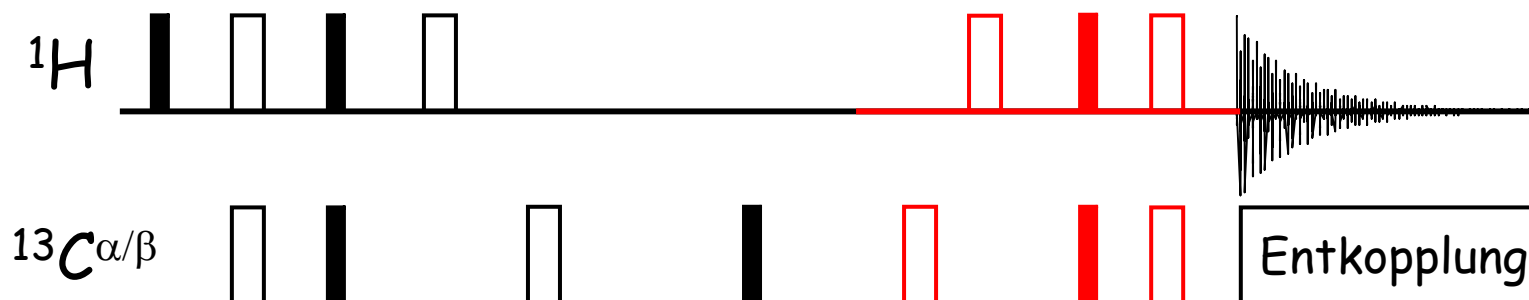


COSY von Kohlenstoff
zu Kohlenstoff

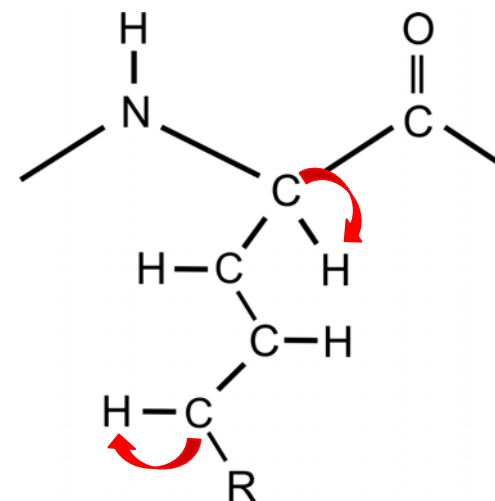


Tripelresonanztechniken

HCCH-COSY



INEPT von Kohlenstoffen
zu Protonen



Tripelresonanztechniken

HCCH-COSY

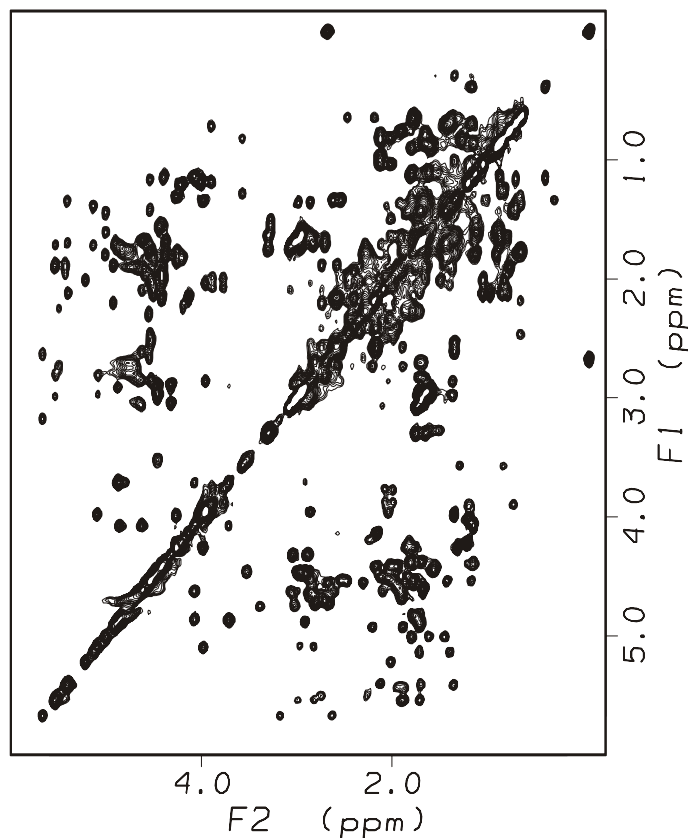


1.Evolution: chemische Verschiebung von Protonen

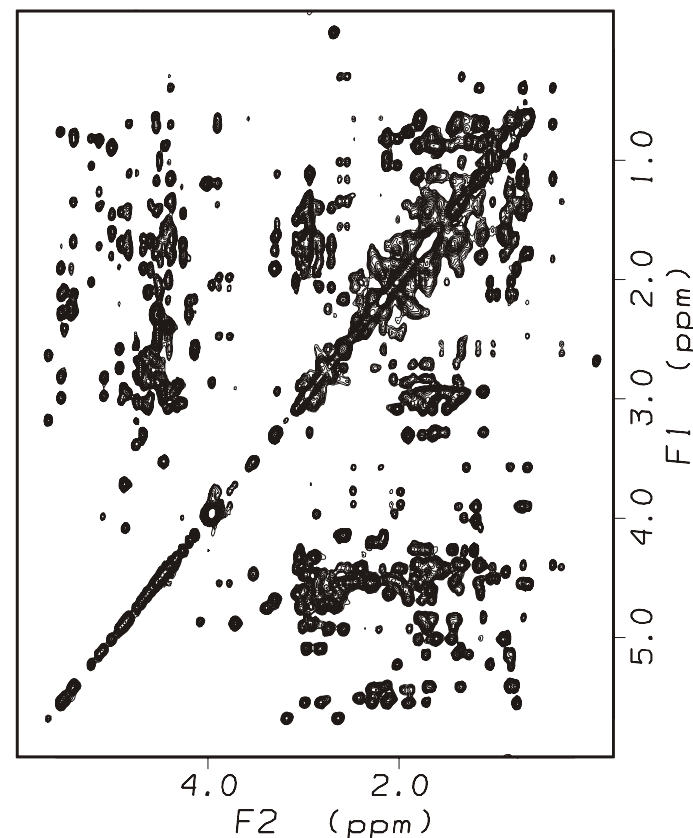
2.Evolution: chemische Verschiebung von Kohlenstoffen

Tripelresonanztechniken

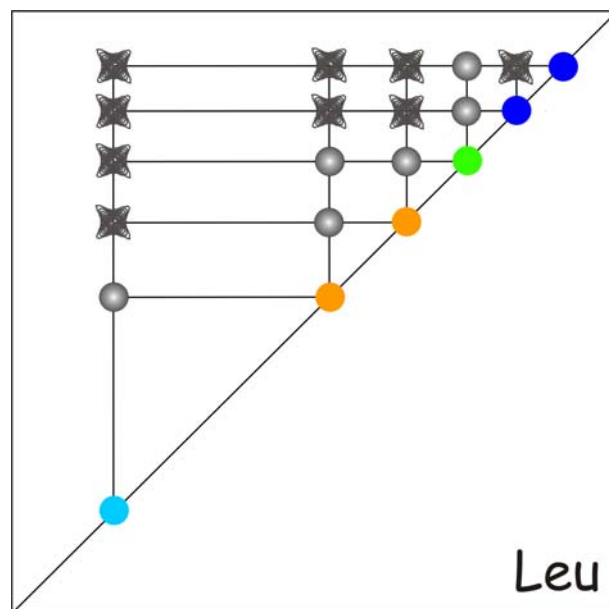
HCCH-COSY



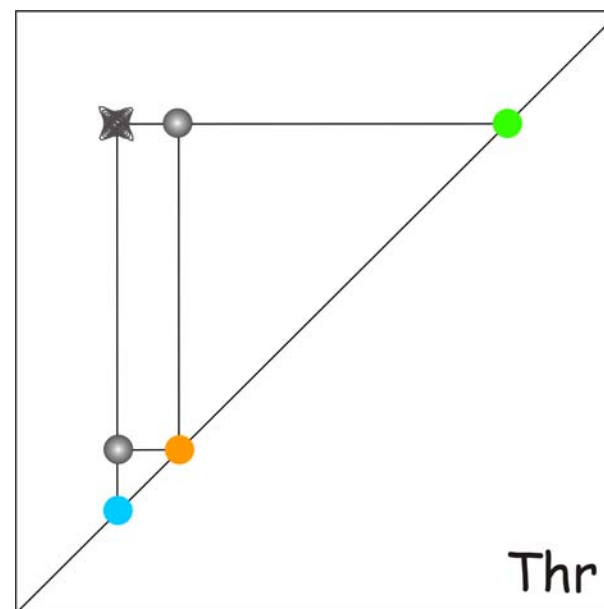
HCCH-TOCSY



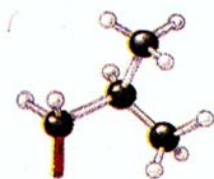
Tripelresonanztechniken



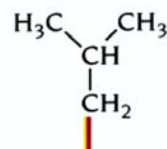
● = α ● = β ● = γ ● = δ ● = ϵ



● = α ● = β ● = γ ● = δ ● = ϵ



L Leu, Leucine

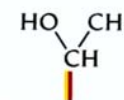


COSY

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.

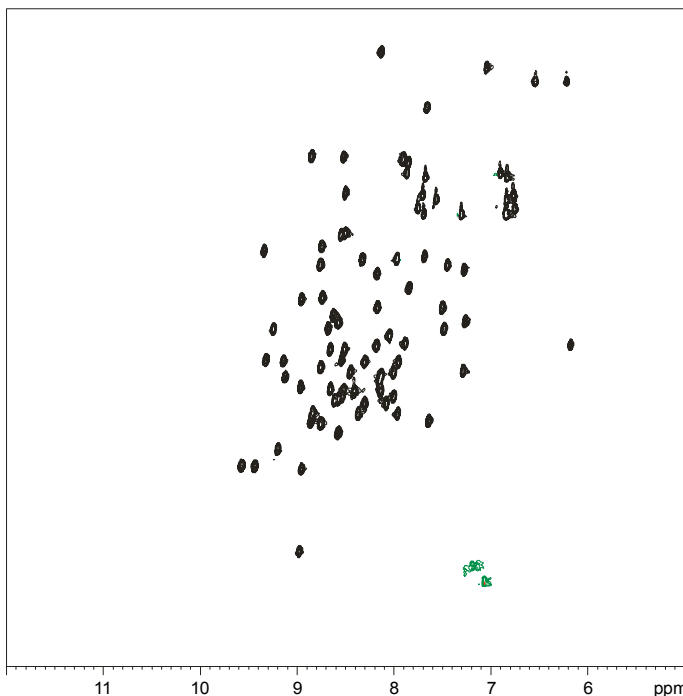
Zum einen wird die Zahl der Signale immer größer ohne das die Dispersion der Signale sich ändert.

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)

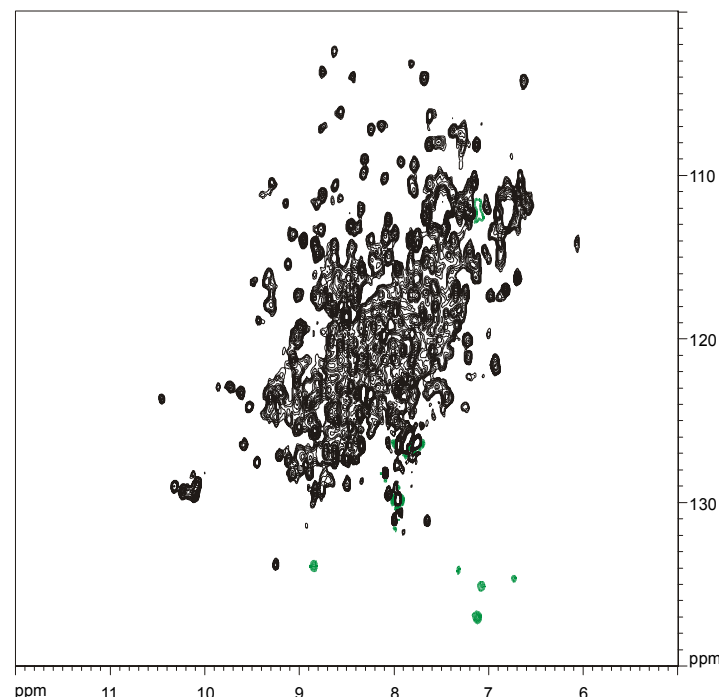
NMR an großen Proteinen

Die Zahl der Signale nimmt zu

Ubiquitin (76 aa)

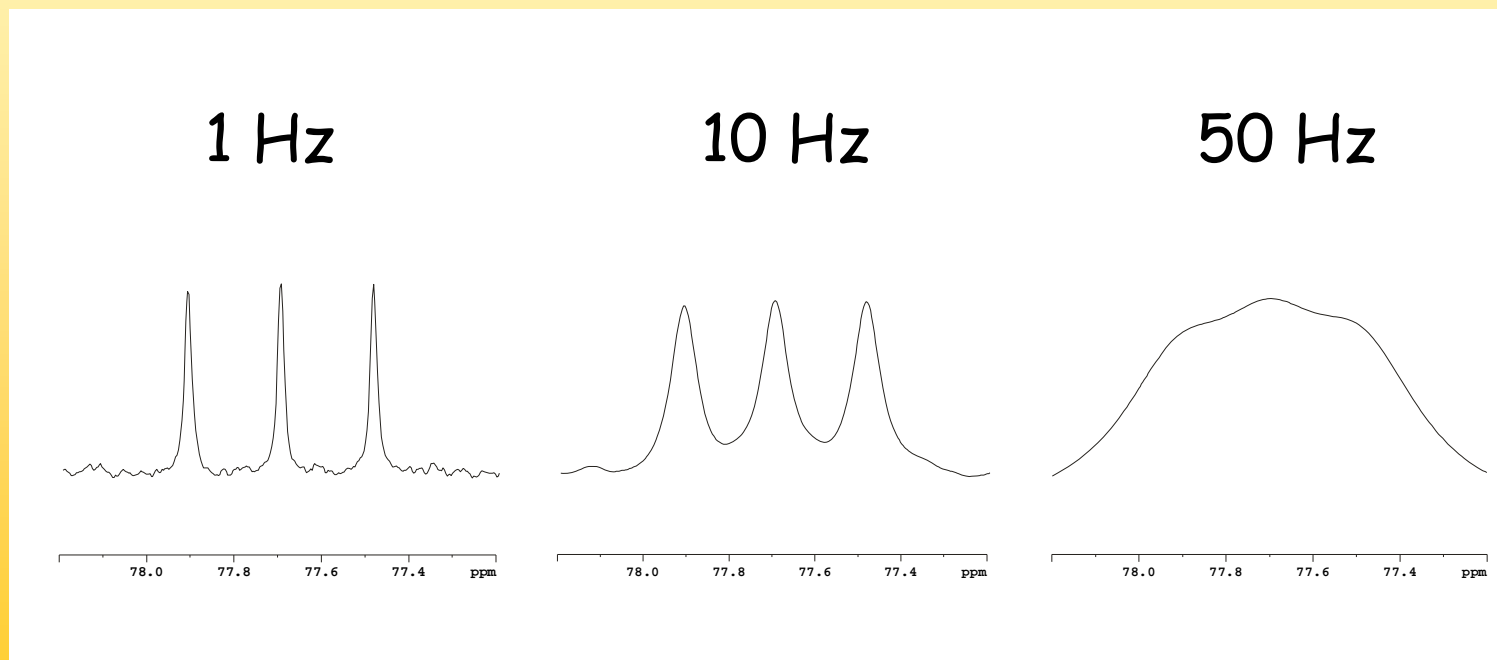


Cph1- Δ 2 (514 aa)



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

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

NMR an großen Proteinen

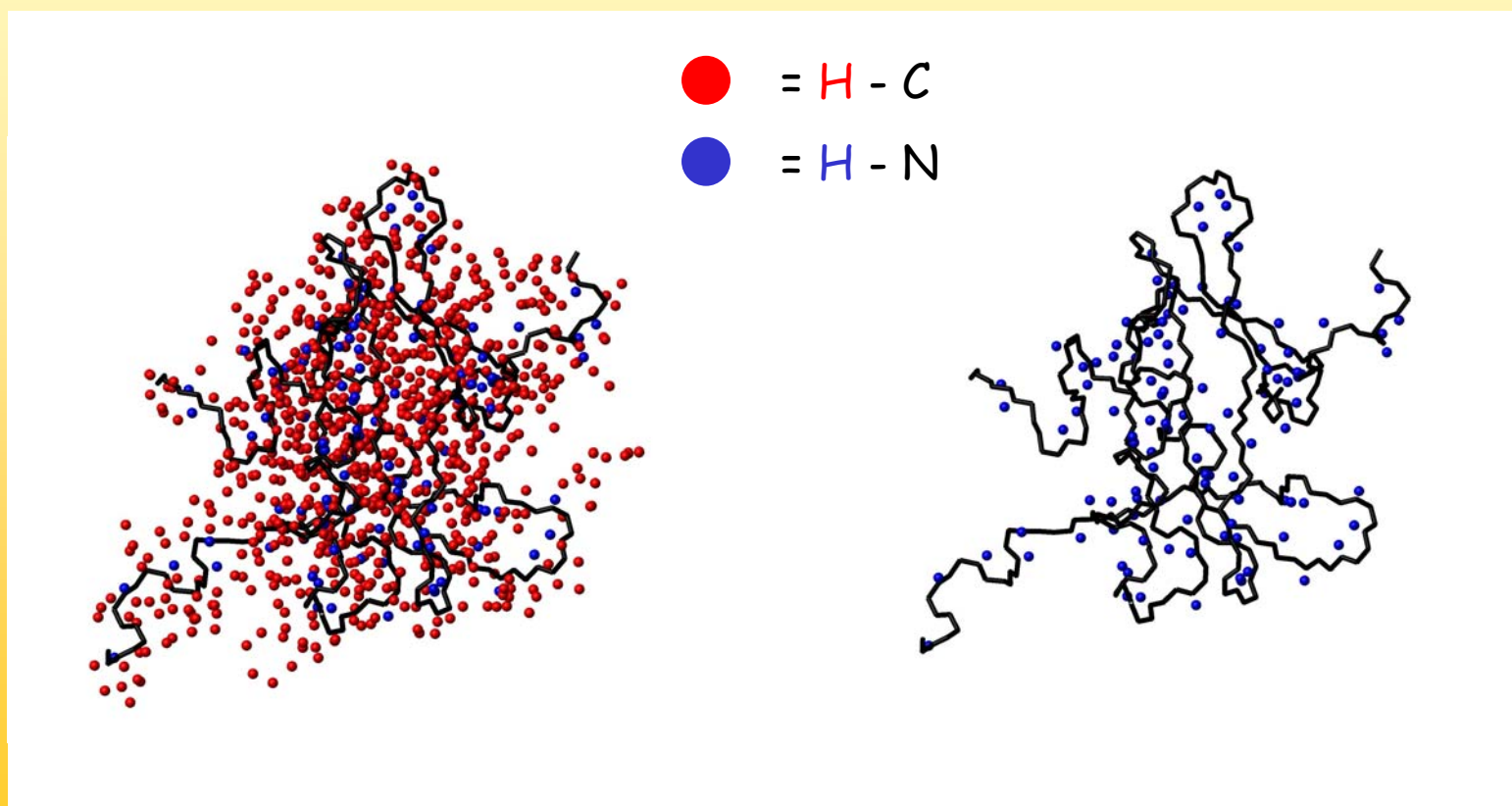
Wir haben gesehen das viele der Experimente die wir bislang gesehen haben mit dem H^N beginnen und es auch detektieren. Das macht man sich zu nutze:
Die Proteine werden deuteriert (in D_2O) hergestellt und erst am Ende in H_2O überführt wo nur die austauschbaren Protonen (hauptsächlich die H^N) zurücktauschen.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

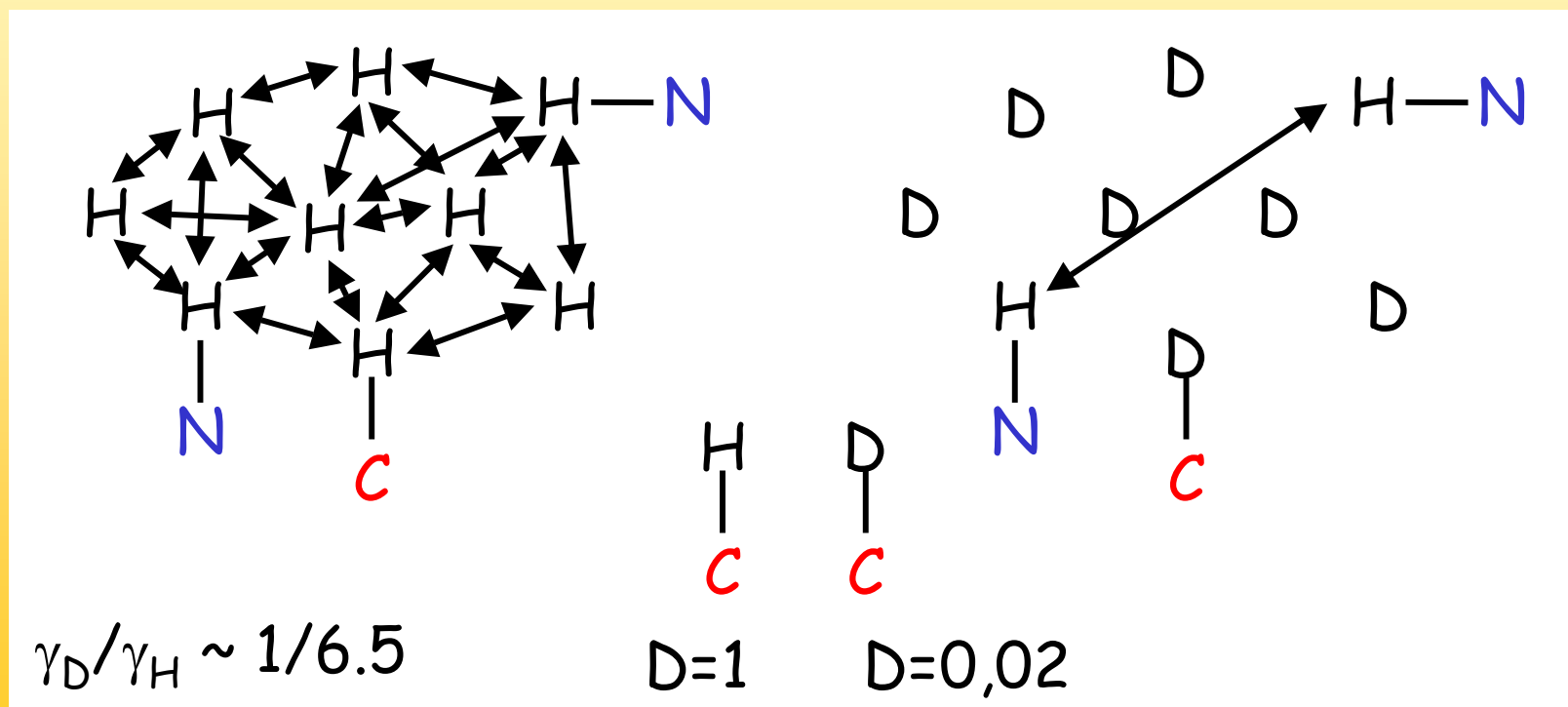
deuteriertes Protein



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

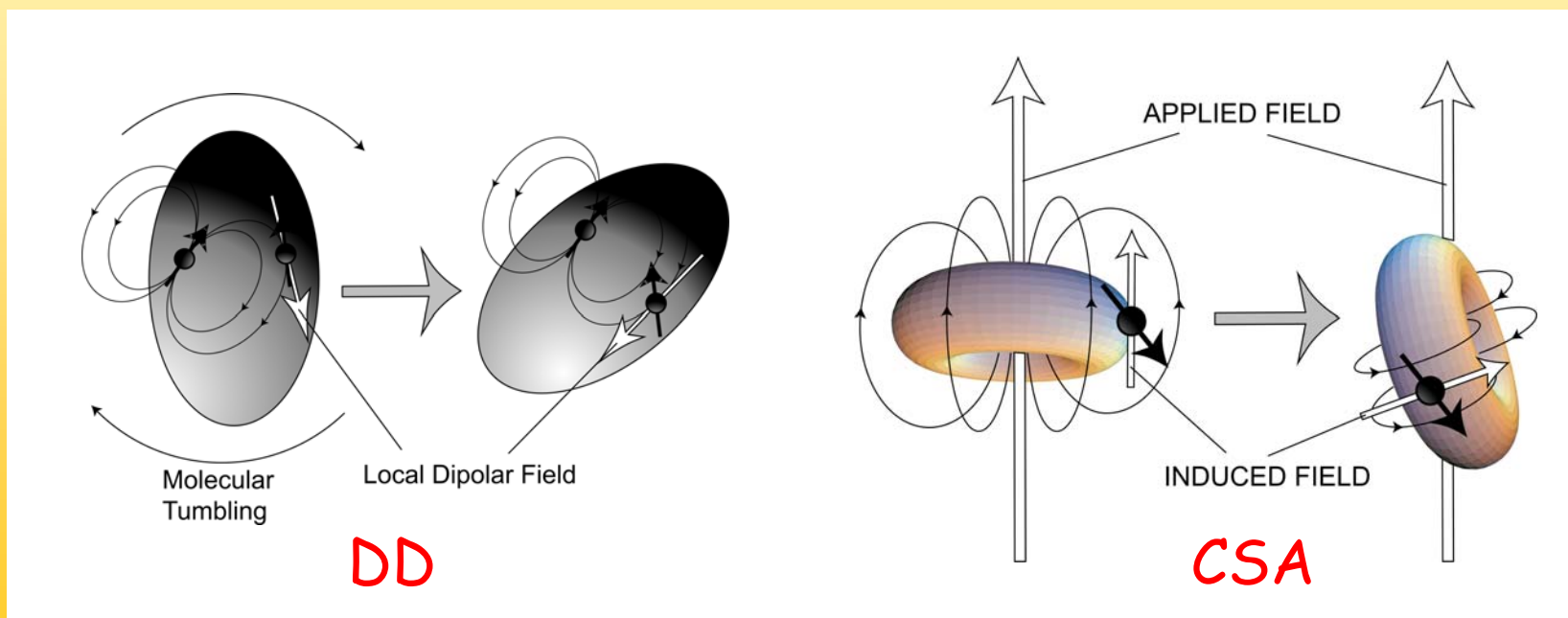
TROSY

(Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy)

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

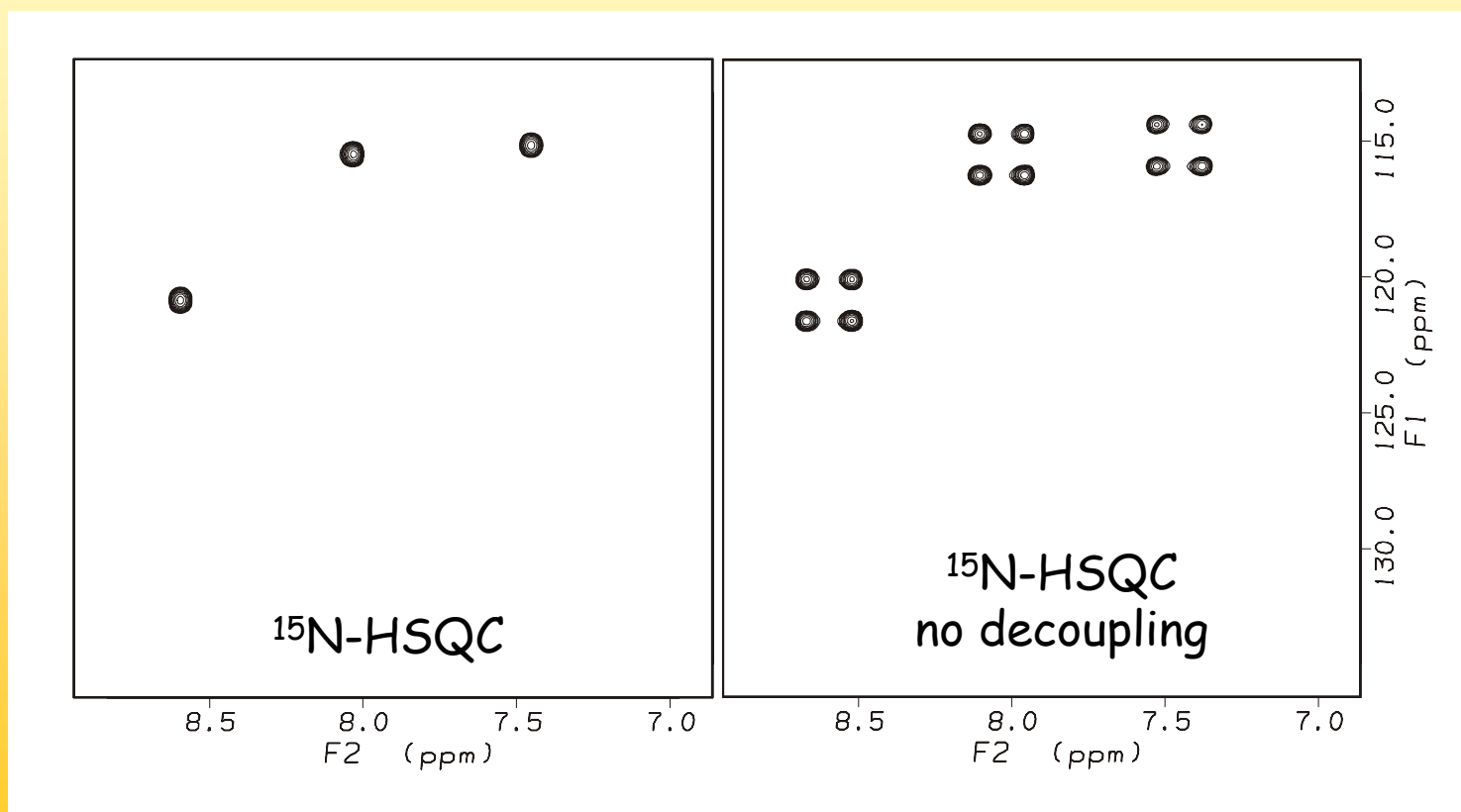
NMR an großen Proteinen

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.



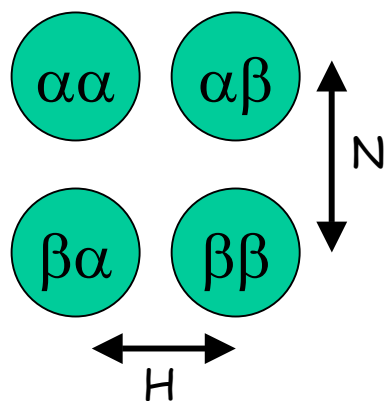
NMR an großen Proteinen

Bei kleinen Molekülen ist diese Beeinflussung
nicht leicht zu erkennen



NMR an großen Proteinen

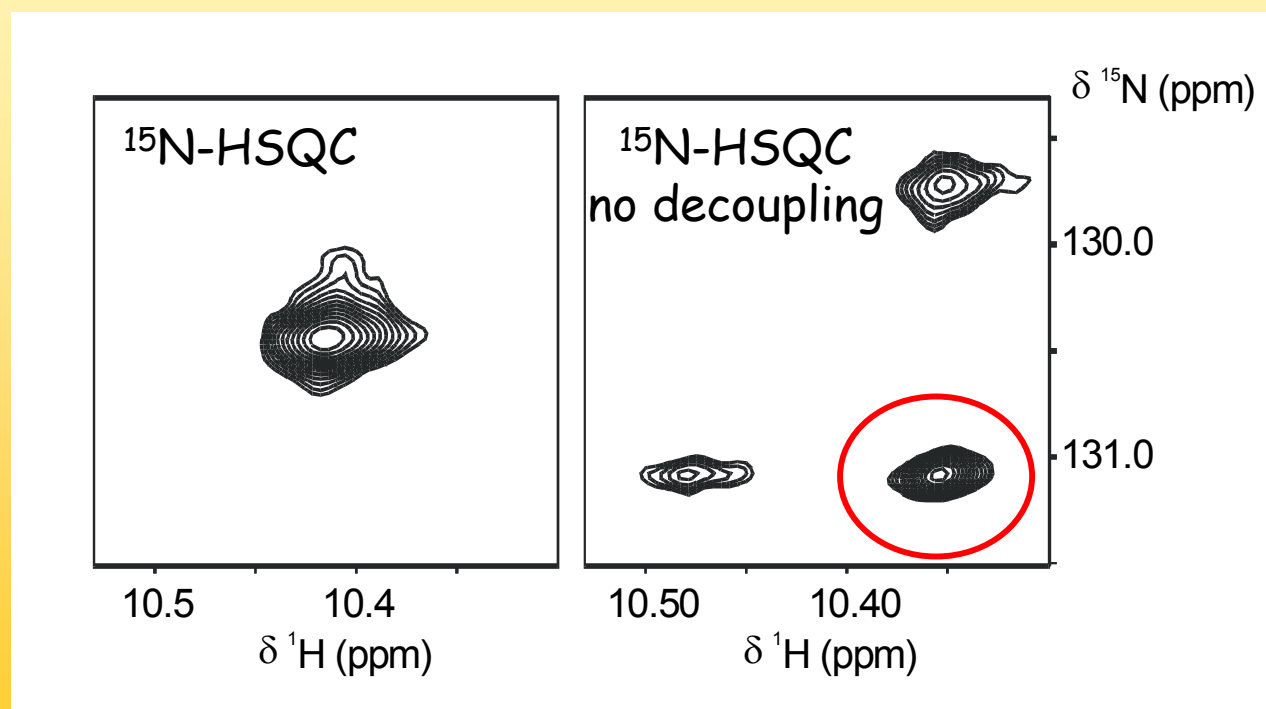
Wir erinnern uns aber, dass den vier Komponenten des Multipletts die beiden unterschiedlichen Spinzustände (α und β) zuzuordnen sind. Es stellt sich heraus, dass die Beeinflussung von CSA und DD bei jeder anders ist.



$$\begin{aligned}
 R_{\alpha H} &\sim (D_{HN} + CSA_H) \\
 R_{\beta H} &\sim (D_{HN} - CSA_H) \\
 R_{\alpha N} &\sim (D_{HN} + CSA_N) \\
 R_{\beta N} &\sim (D_{HN} - CSA_N)
 \end{aligned}$$

NMR an großen Proteinen

Und bei großen Molekülen ist das dann in der Tat zu sehen, jeweils eine Linie von ^1H und ^{15}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

$$D_{\text{HN}} = (1/2\sqrt{2}) \gamma_{\text{H}} \gamma_{\text{N}} \mu (h/2\pi(r_{\text{HN}})^3) \quad \gamma_{\text{H}} = 2.6 \cdot 10^8 (\text{Ts})^{-1}$$

$$CSA_{\text{H}} = (1/2\sqrt{2}) \gamma_{\text{H}} B_0 \Delta\sigma_{\text{H}} \quad \gamma_{\text{N}} = -2.7 \cdot 10^7 (\text{Ts})^{-1}$$

$$CSA_{\text{N}} = (1/2\sqrt{2}) \gamma_{\text{N}} B_0 \Delta\sigma_{\text{N}} \quad \Delta\sigma_{\text{H}} = -16 \text{ ppm}$$

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

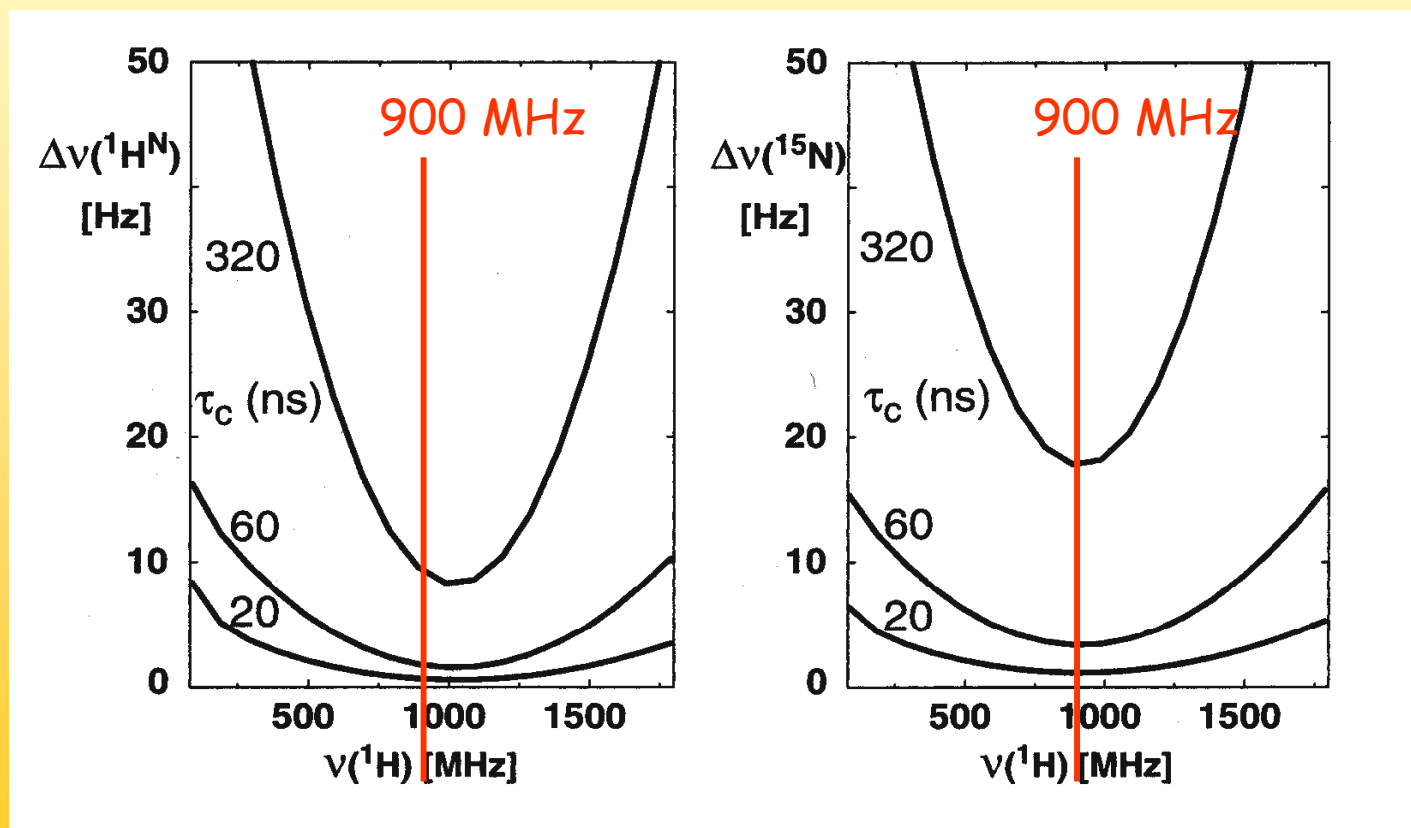
$$\Delta\sigma_{\text{H}} / \Delta\sigma_{\text{N}} = \gamma_{\text{N}} / \gamma_{\text{H}}$$

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

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

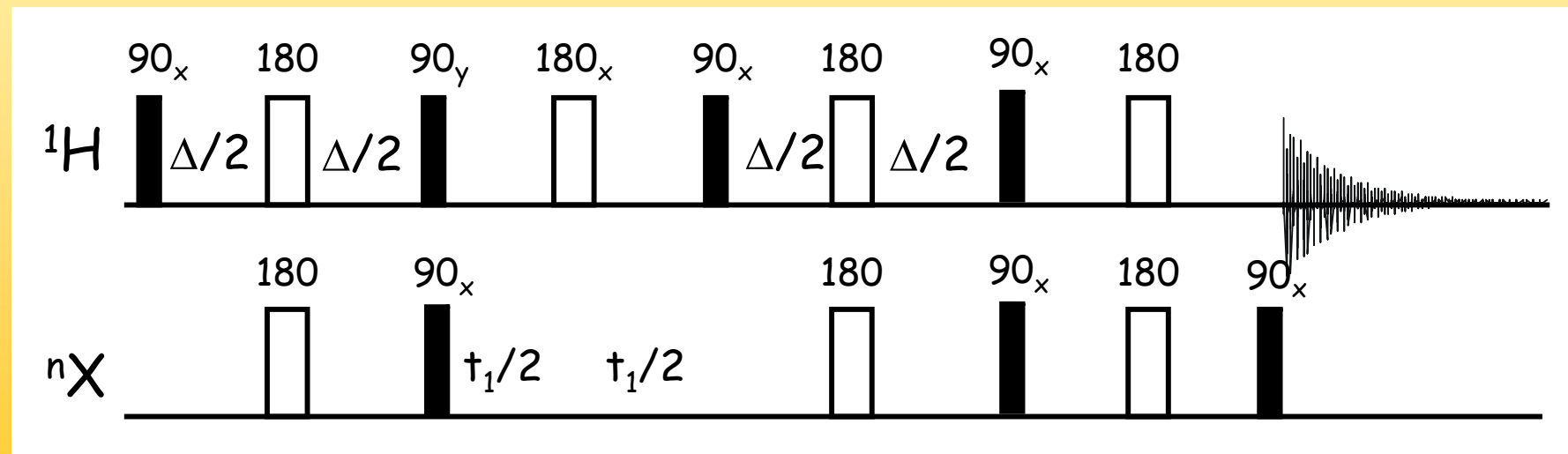
NMR an großen Proteinen

Mit realistischen Annahmen liegt das
Maximum nah bei 950 MHz



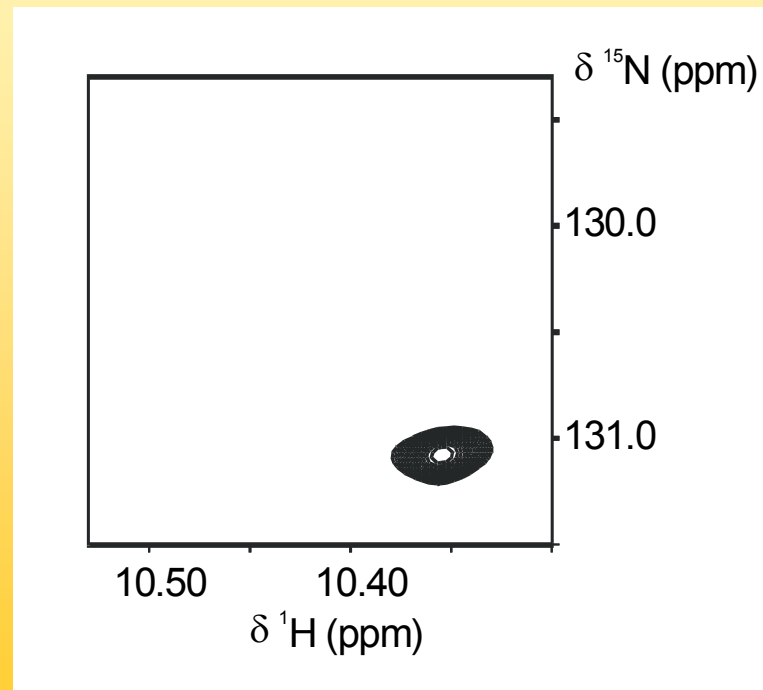
NMR an großen Proteinen

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

Scripte: www.fmp-berlin.de/schmieder/teaching