

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

Das Programm

Beim letztes Mal

Peptide

DQF-COSY, TOCSY, Spinsysteme

NOE und NOESY, ROESY

sequenzspezifische Zuordnung von Peptiden

Strukturbestimmung von Peptiden

Das Programm

Heute

Heteronukleare NMR an Peptiden

HMQC, HMQC-TOCSY, HMQC-COSY

DEPT-HMQC

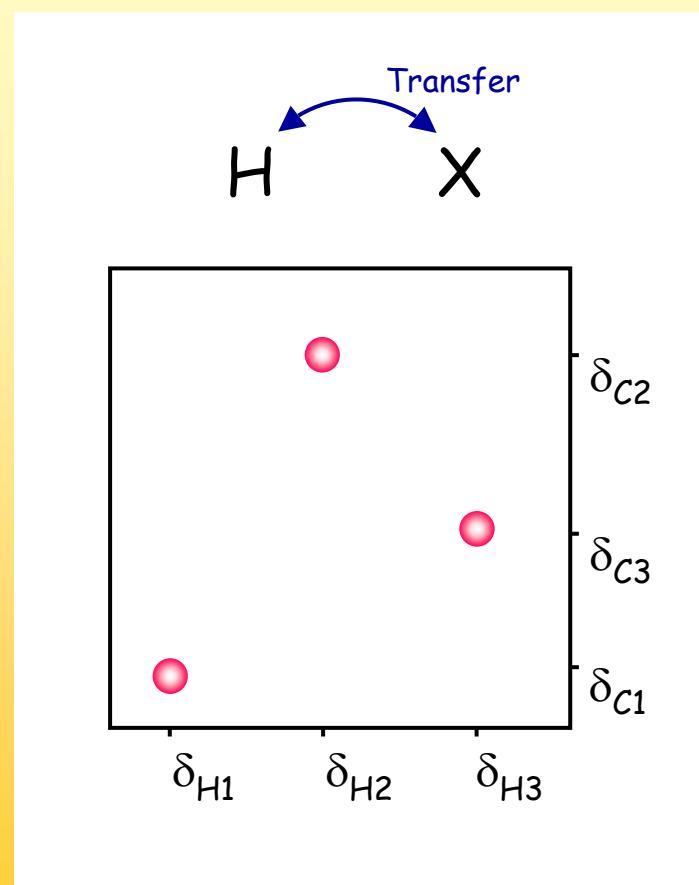
Sequentielle Zuordnung mit dem HMBC

Heteronukleare NMR an Peptiden

Peptide: Heteronukleare NMR

heteronukleare Spektren

Transfer von Magnetisierung findet zwischen unterschiedlichen Kernsorten statt. Beide Frequenzachsen zeigen die chemischen Verschiebungen unterschiedlicher Kerne. Findet Transfer statt, ergibt sich ein Signal am Schnittpunkt der chemischen Verschiebungen der involvierten Kerne. Findet kein Transfer statt, dann ergibt sich kein Signal.



Peptide: Heteronukleare NMR

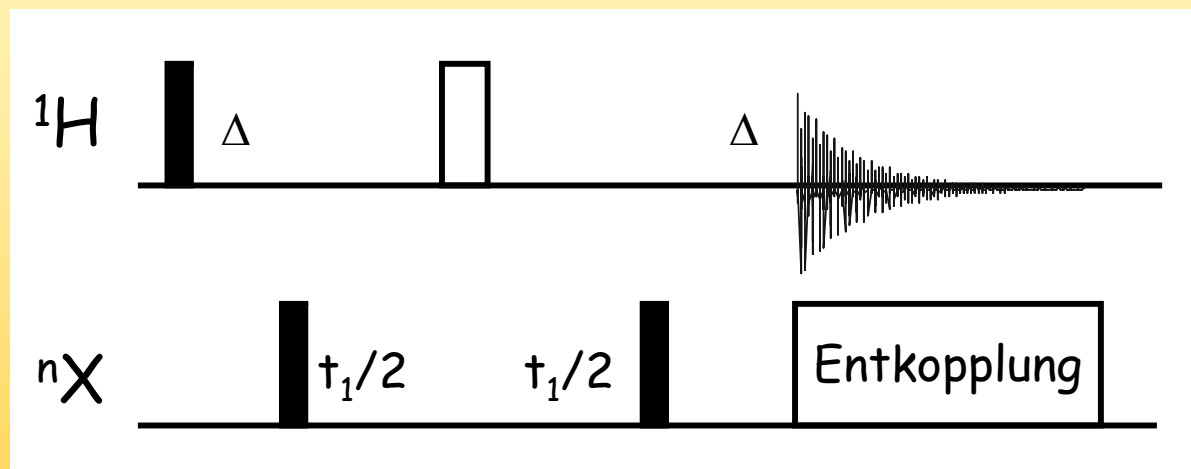
Durch die Ähnlichkeit der Aminosäuren untereinander ist Überlagerung bei Peptiden trotz der Verwendung von 2D-NMR noch ein Problem.

Wie bei kleinen Molekülen kann daher die Aufnahme von heteronuklearen Spektren ein Ausweg sein.

Wegen der besseren Empfindlichkeit werden das immer „inverse“ Spektren, also solche mit Protonendetektion sein.

Peptide: Heteronukleare NMR

Das zentrale Experiment ist dabei das HMQC, das auf direkter Kopplung zwischen H und X beruht

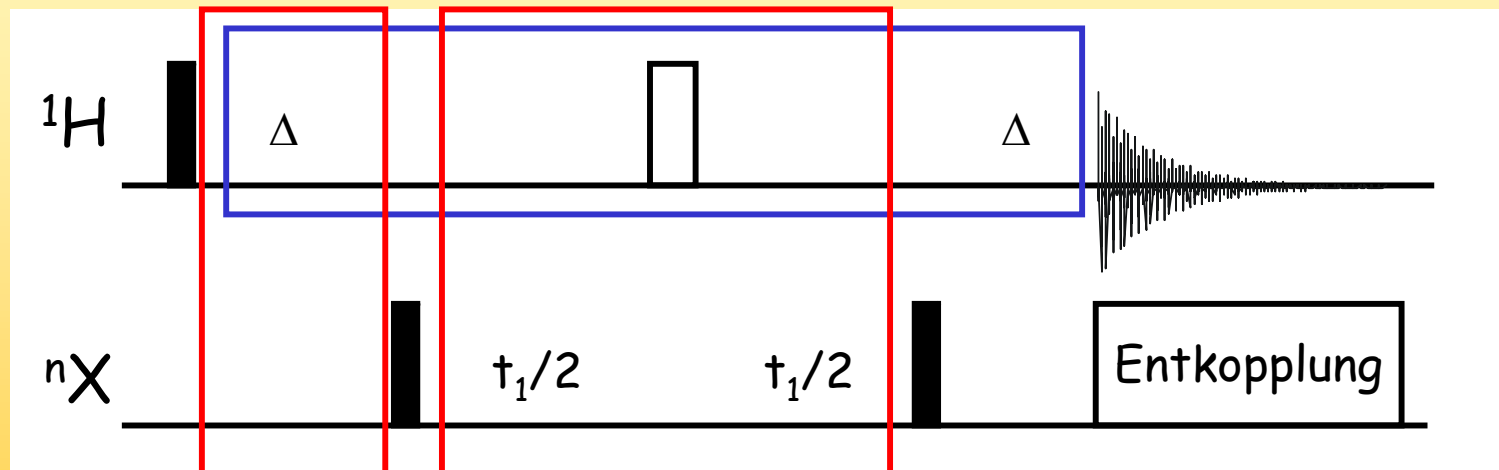


Peptide: Heteronukleare NMR

HMQC

keine chemische Verschiebung δ_H

Kopplung J_{HH} entwickelt sich nur wenig



Kopplung $^1J_{HC}$

$$\Delta = 1/(2^1J_{HC})$$

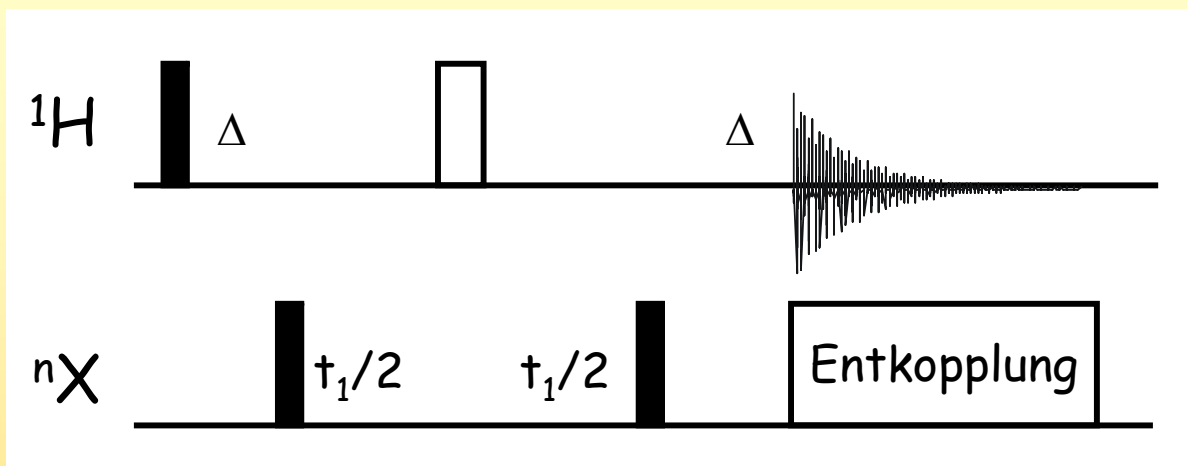
typisch 3.5 msec

chemische Verschiebung δ_C

keine chemische Verschiebung δ_H

keine Kopplung J_{HC}

Peptide: Heteronukleare NMR



$$H_z \xrightarrow{90^\circ H_x} -H_y \xrightarrow{\pi J_{HC}\Delta} -H_y \cos \pi J_{HC}\Delta + 2H_x C_z \sin \pi J_{HC}\Delta$$

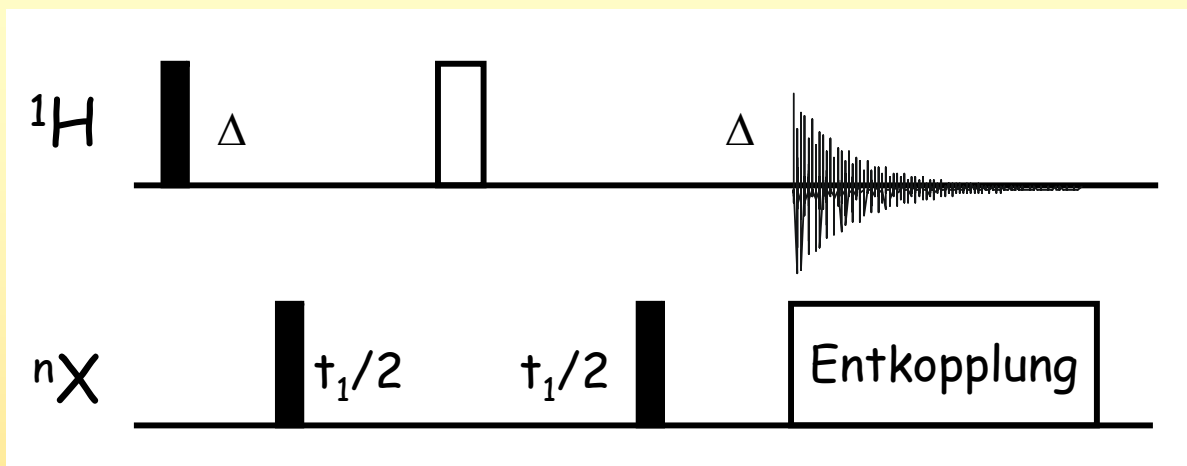
$$\Delta = 3.5 \text{ msec}, J_{HC} = 140 \text{ Hz} \longrightarrow J_{HC} * \Delta = 0.5$$

$$\cos \pi J_{HC}\Delta = \cos 0.5 \pi = 0, \sin \pi J_{HC}\Delta = \sin 0.5 \pi = 1$$

aber keine Weitbereichskopplung

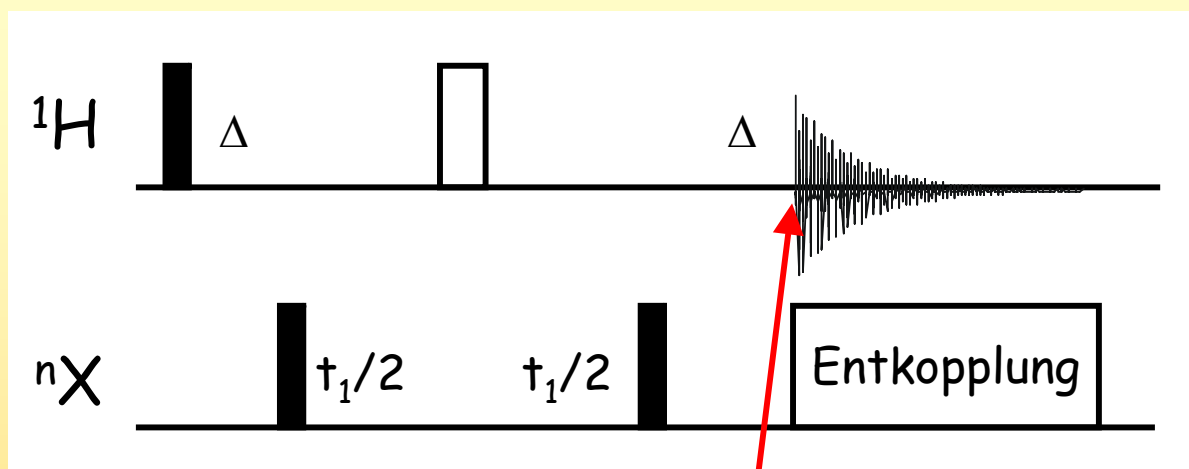
$$\Delta = 3.5 \text{ msec}, J_{HC} = 5 \text{ Hz} \longrightarrow \sin \pi J_{HC}\Delta = \sin 0.0175 \pi = 0.05$$

Peptide: Heteronukleare NMR



$$\begin{aligned}
 2H_x C_z &\xrightarrow{90^\circ C_x} \textcircled{- 2H_x C_y} \xrightarrow{\delta_C t_1} \\
 &\text{Multiquanten} \quad - 2H_x C_y \cos \delta_C t_1 + 2H_x C_x \sin \delta_C t_1 \\
 &\quad \quad \quad \text{nicht detektierbar} \\
 &\xrightarrow{90^\circ C_x} - 2H_x C_z \cos \delta_C t_1 + \cancel{2H_x C_x \sin \delta_C t_1}
 \end{aligned}$$

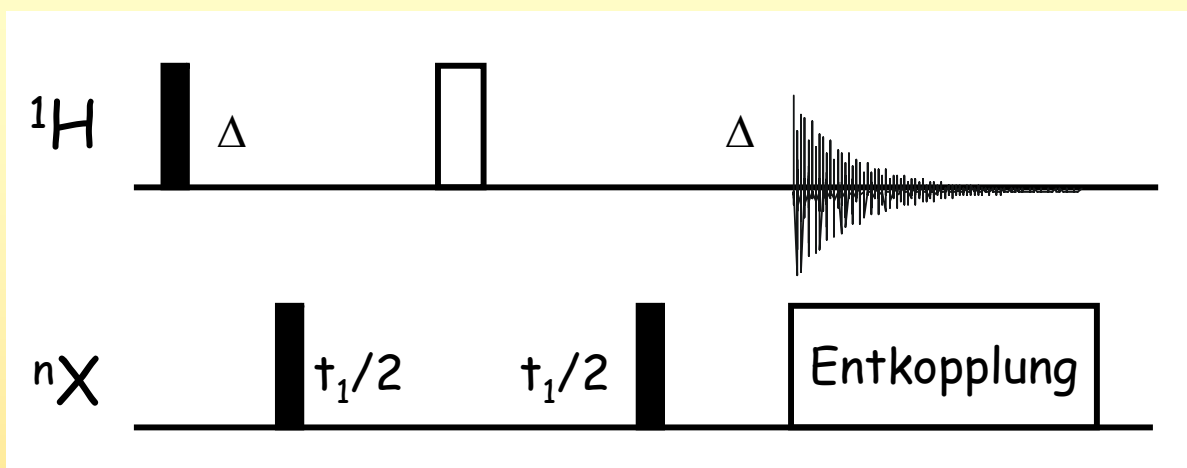
Peptide: Heteronukleare NMR



$$- 2H_x C_z \cos \delta_C t_1 \xrightarrow{\pi J_{HC} \Delta} - H_y \cos \delta_C t_1$$

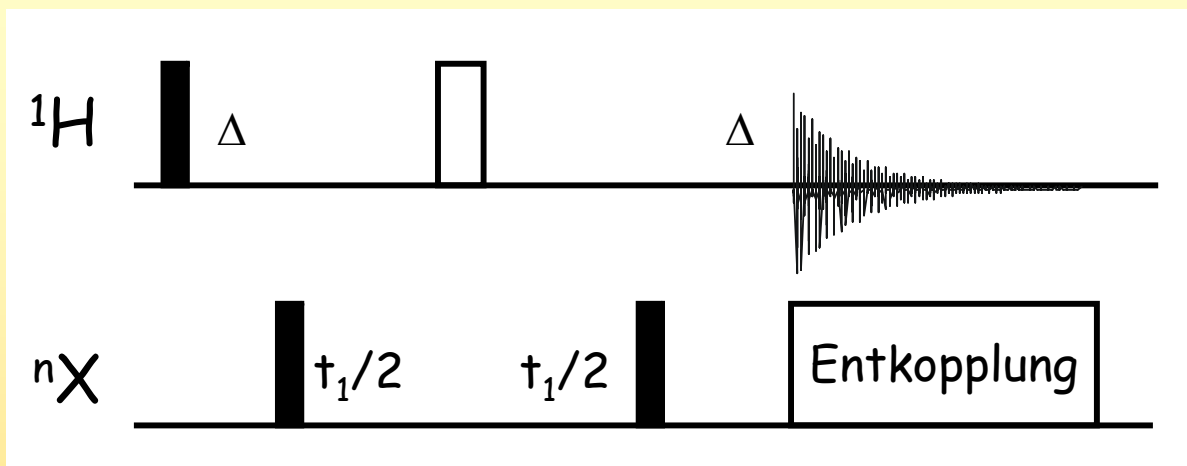
zu Beginn der Acquisition liegt Protonenmagnetisierung vor, „moduliert“ mit der chemischen Verschiebung des direkt gebundenen Kohlenstoffs

Peptide: Heteronukleare NMR



Wir schauen uns nun die homonukleare Kopplung J_{HH} nochmal etwas genauer an. Zu Beginn des Experimentes hat sie sich nicht sehr stark entwickelt, denn es war nur die Zeit 2Δ vorhanden. Mit der Zeit wird aber t_1 immer länger und die Wartezeit zur Entwicklung von J_{HH} auch

Peptide: Heteronukleare NMR



$$-H_y \xrightarrow{\pi J_{HH} 2\Delta + t_1} -H_y \cos \pi J_{HH} 2\Delta + t_1 + 2H_x C_z \sin \pi J_{HH} 2\Delta + t_1$$

am Anfang: $t_1 = 0$, $2\Delta + t_1 = 7 \text{ msec}$

nach 512 Experimenten $t_{1,\text{max}} = 512 \cdot 40 \mu\text{sec} = 20480 \mu\text{sec}$

d.h. am Ende $2\Delta + t_1 = 27.5 \text{ msec}$

d.h. am Ende kommt doch etwas zusammen und kann stören,
kann aber evt. auch genutzt werden

Peptide: Heteronukleare NMR

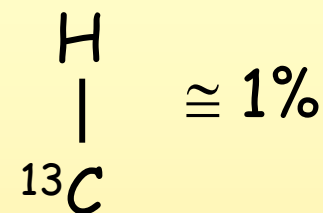
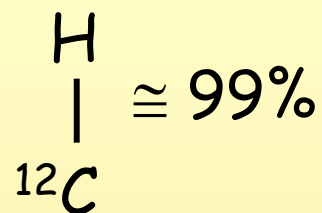
Bei Peptiden gibt es wie bei kleinen Molekülen das Problem mit den „Zentralsignalen“

Auch hier ist eine Markierung mit ^{13}C unrealistisch und man kann das Problem über einen Phasecyclus oder die Anwendung von Gradienten lösen.

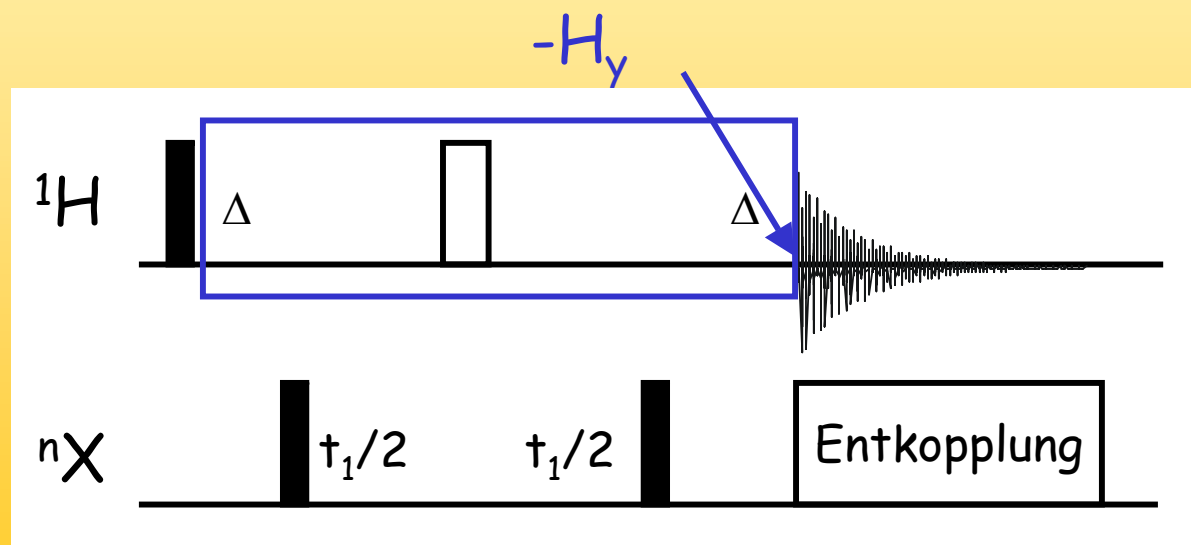
Es gibt aber noch eine weitere Möglichkeit, den „BIRD“-Puls

Peptide: Heteronukleare NMR

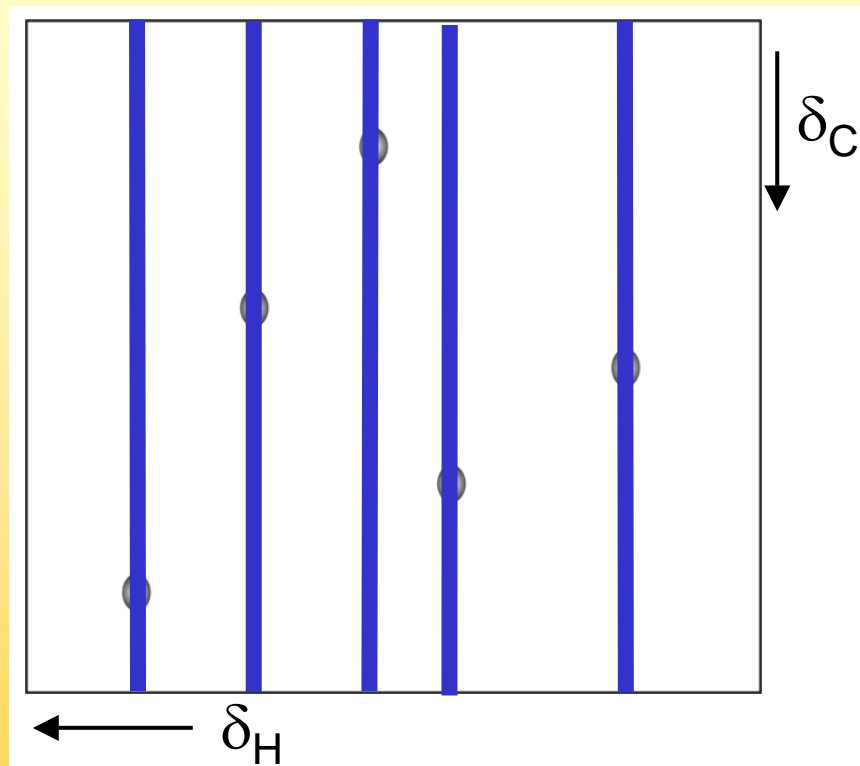
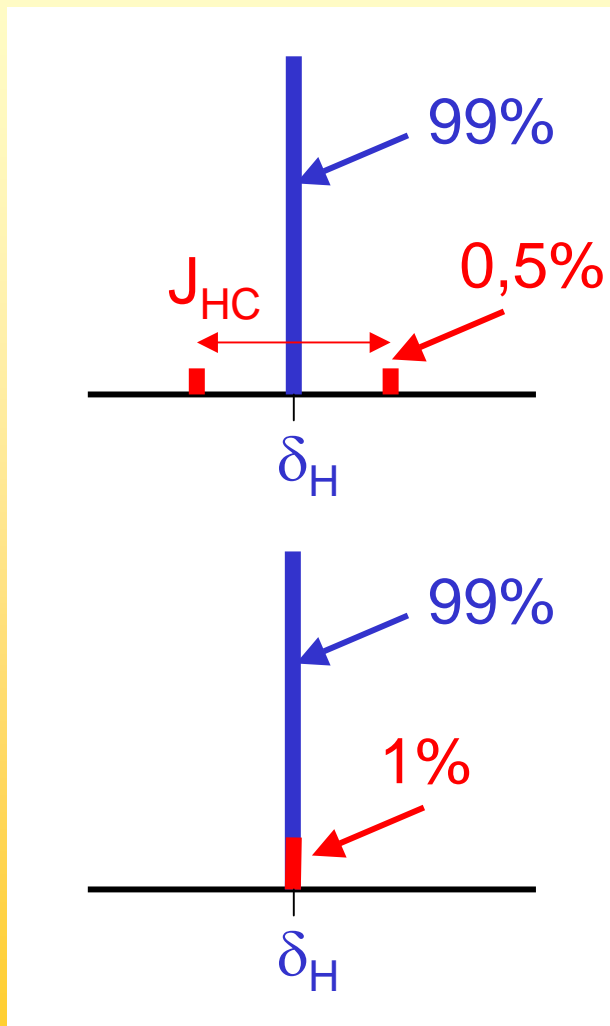
Zentralsignale resultieren
von Protonen an ^{12}C ?



keine chemische Verschiebung δ_{H} ,
Kopplung J_{HH} zu vernachlässigen



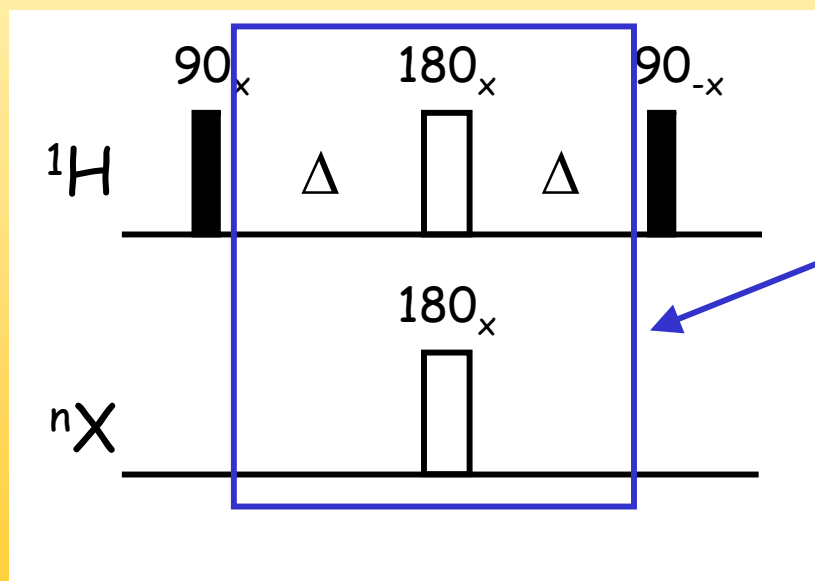
Peptide: Heteronukleare NMR



Die Signale müssen irgendwie entfernt werden

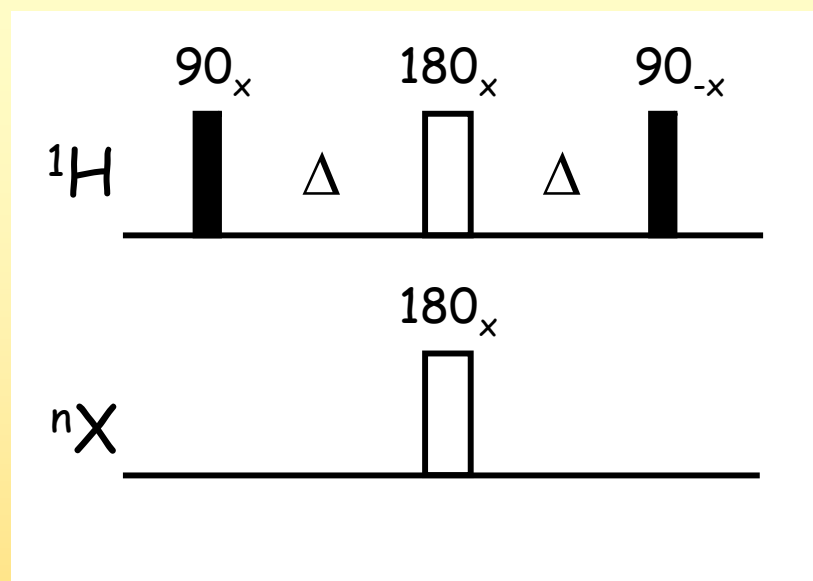
Peptide: Heteronukleare NMR

Wir wollen jetzt sehen wie das mit dem BIRD-Puls bewerkstelligt werden kann



Keine δ_{H} aktiv,
 J_{HX} ist aktiv
 $\Delta = 1/2 J_{\text{HX}}$
 (für $\text{X}=\text{C}$ $\Delta=3.5$ msec)
 J_{HH} nicht relevant

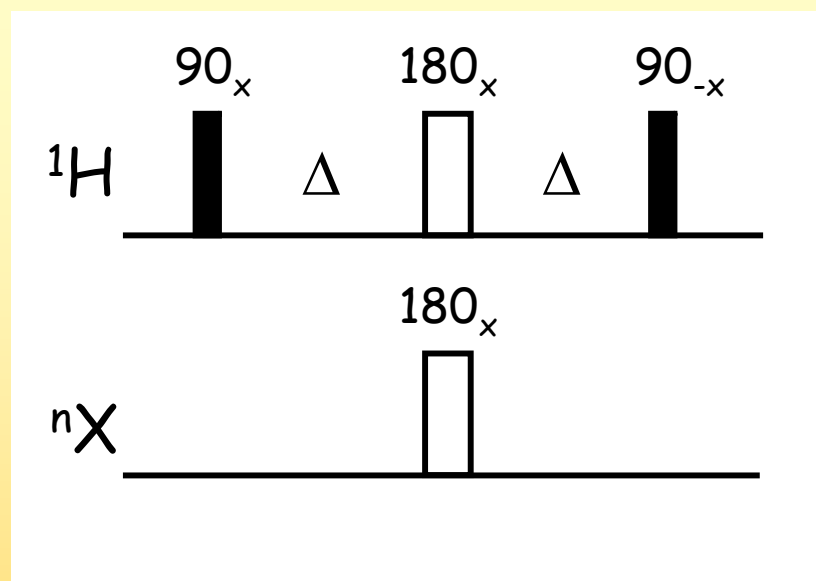
Peptide: Heteronukleare NMR



$$H_z \xrightarrow{90^\circ H_x} -H_y \xrightarrow{\pi J_{HX}\Delta} -H_y \cos \pi J_{HX}\Delta + 2H_x X_z \sin \pi J_{HX}\Delta$$

Wir wählen $\Delta = 1/2J_{HX}$ und erhalten $2H_x X_z$

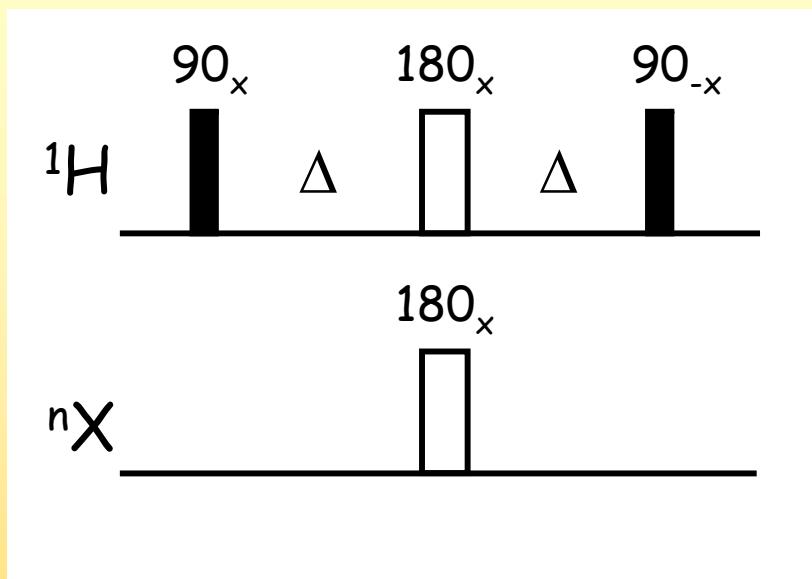
Peptide: Heteronukleare NMR



$$\xrightarrow[180^\circ X_x]{180^\circ H_x} -2H_x X_z \xrightarrow{\pi J_{HX}\Delta} -H_y \xrightarrow{90^\circ H_{-x}} H_z$$

Unterm Strich hatte der BIRD-Puls für ein Proton, das an den Heterokern gebunden war keinen Effekt !!

Peptide: Heteronukleare NMR



Was passiert mit
Protonen ohne
Heterokernkopplung ?

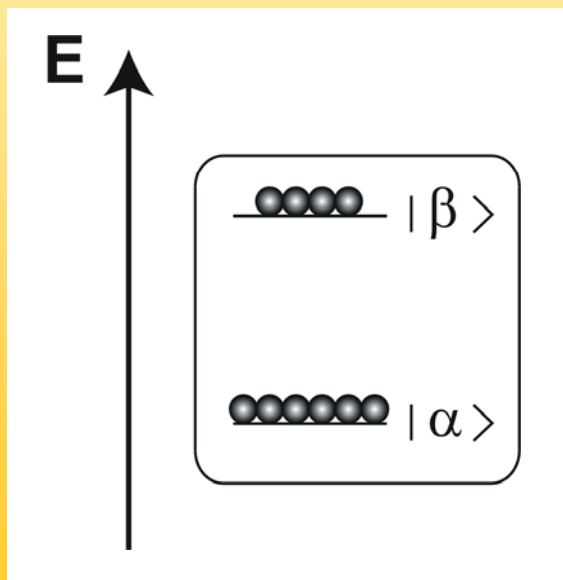
$$\begin{aligned}
 H_z &\xrightarrow{90^\circ H_x} -H_y \xrightarrow{\pi J_{HX}\Delta} -H_y \xrightarrow[180^\circ X_x]{180^\circ H_x} H_y \\
 &\xrightarrow{\pi J_{HX}\Delta} H_y \xrightarrow{90^\circ H_{-x}} -H_z
 \end{aligned}$$

Hier ist der BIRD-Puls ein 180° Puls !!

Peptide: Heteronukleare NMR

Man kann die unterschiedlichen Effekte des BIRD-Pulses ausnutzen, um die Signale der nicht an den Heterokern gebundenen Protonen zu unterdrücken

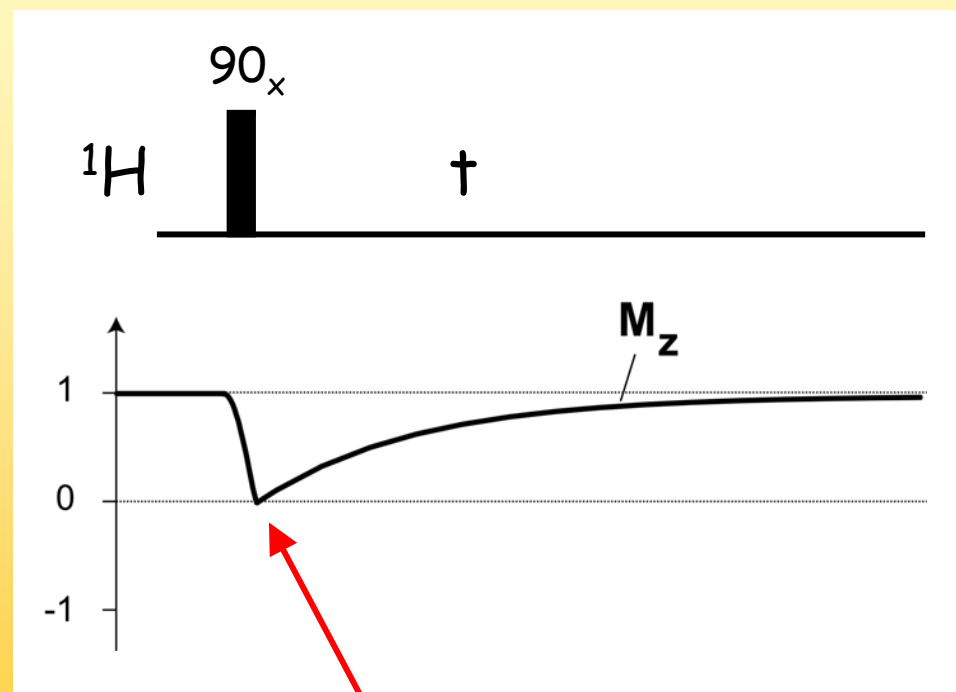
Dazu nutzt man außerdem noch die Relaxation der Kerne



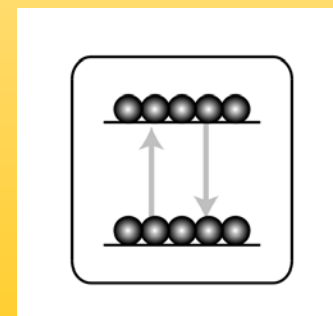
Relaxation ist die Rückkehr der Magnetisierung in den von der Boltzmann-Verteilung vorgegebenen Ausgangszustand

Peptide: Heteronukleare NMR

Nach einem 90° Puls sieht das so aus

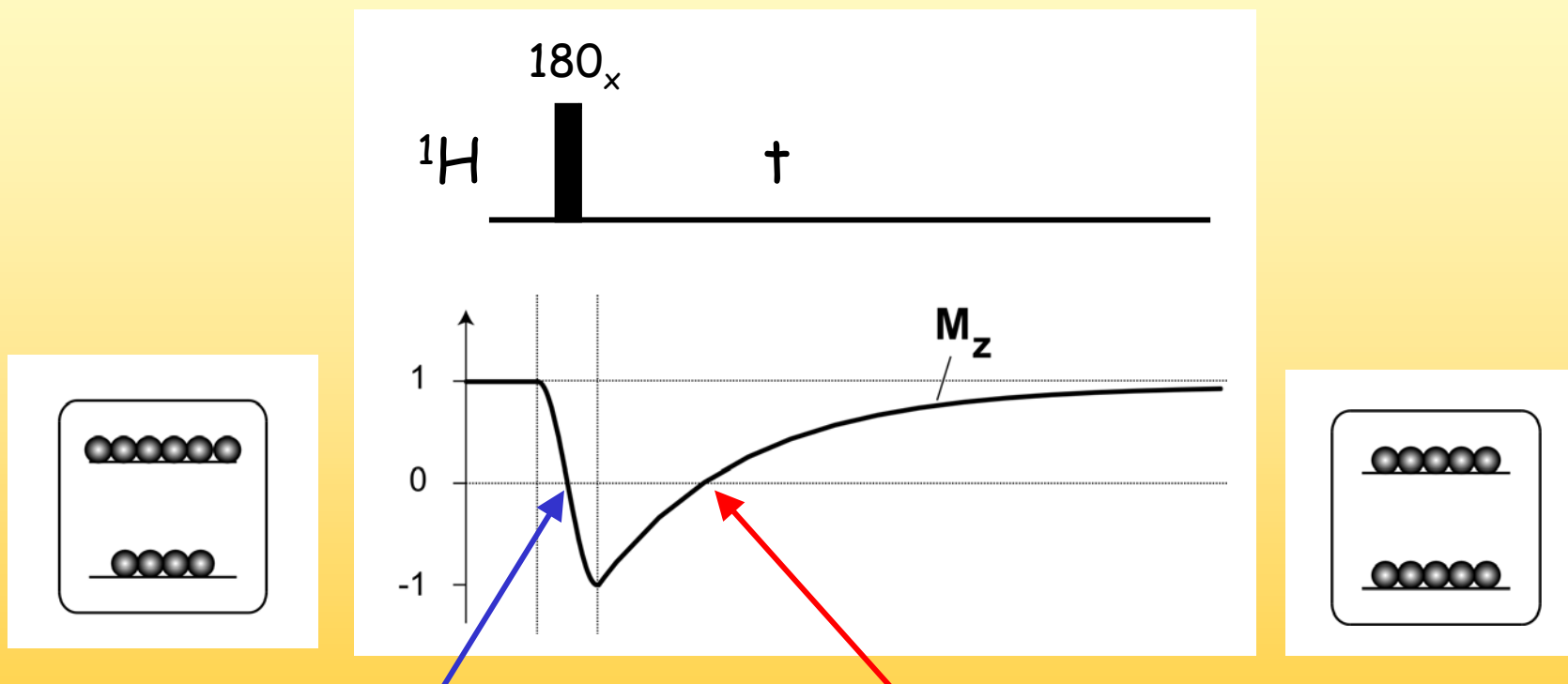


Hier liegt keine z-Magnetisierung vor !!



Peptide: Heteronukleare NMR

Nach einem 180° Puls sieht das so aus

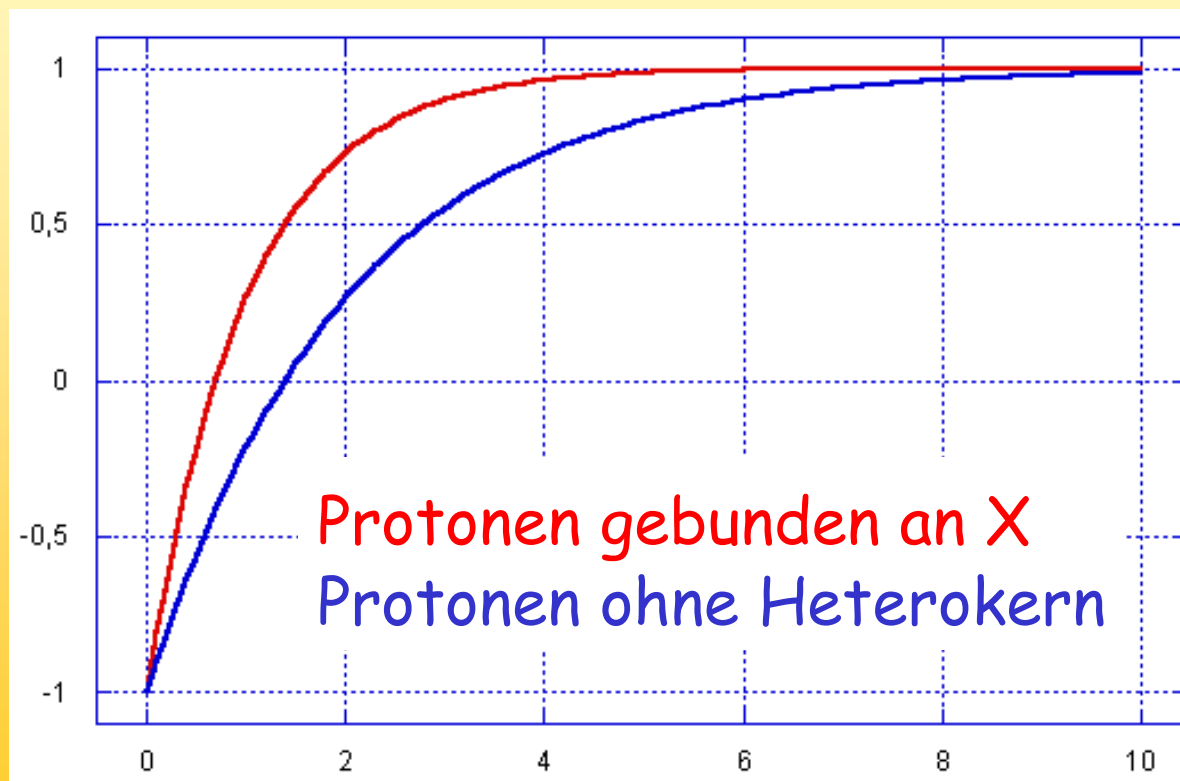


z-Magnetisierung wird
von + nach - gedreht

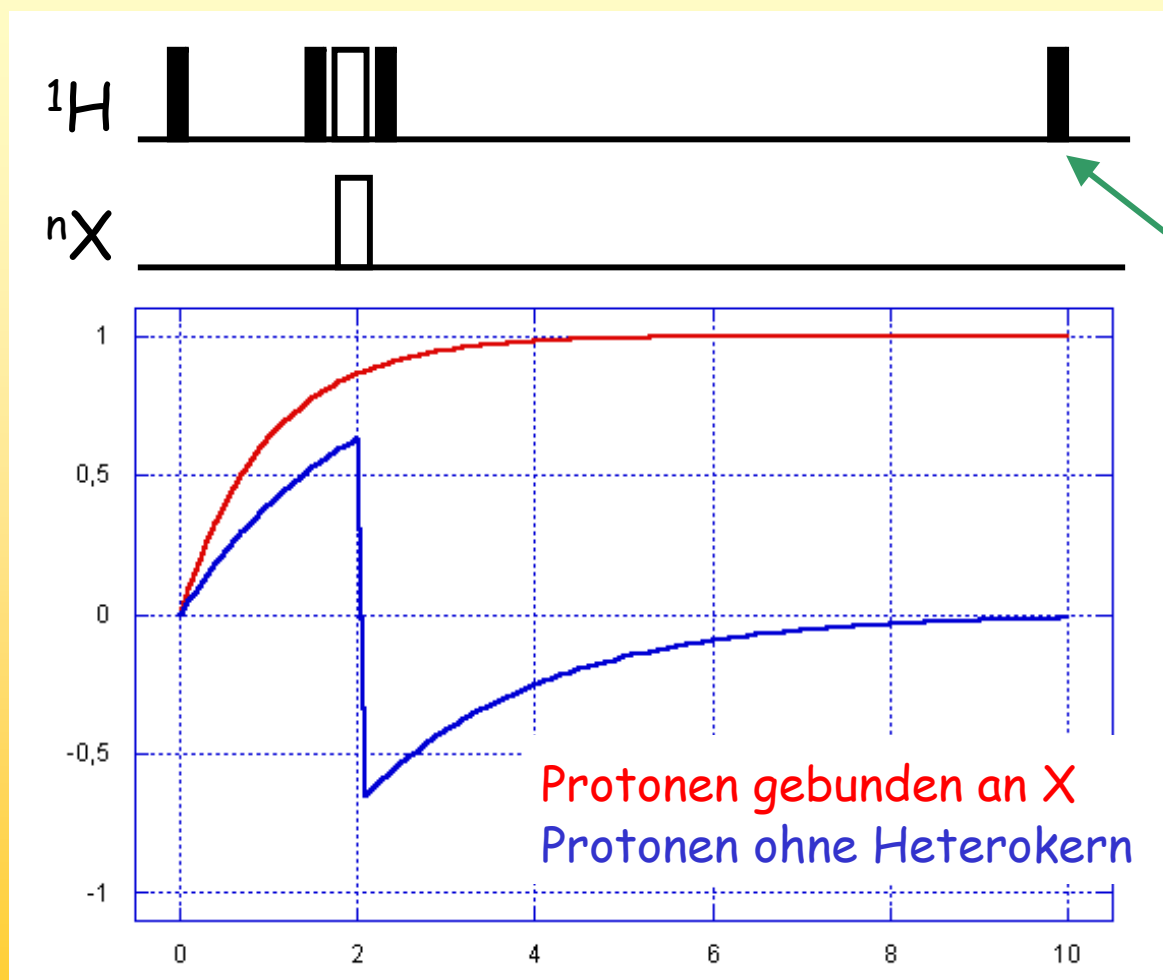
Hier liegt keine z-
Magnetisierung vor !!

Peptide: Heteronukleare NMR

Protonen gebunden an X und solche, die nicht an X gebunden sind relaxieren unterschiedlich schnell



Peptide: Heteronukleare NMR



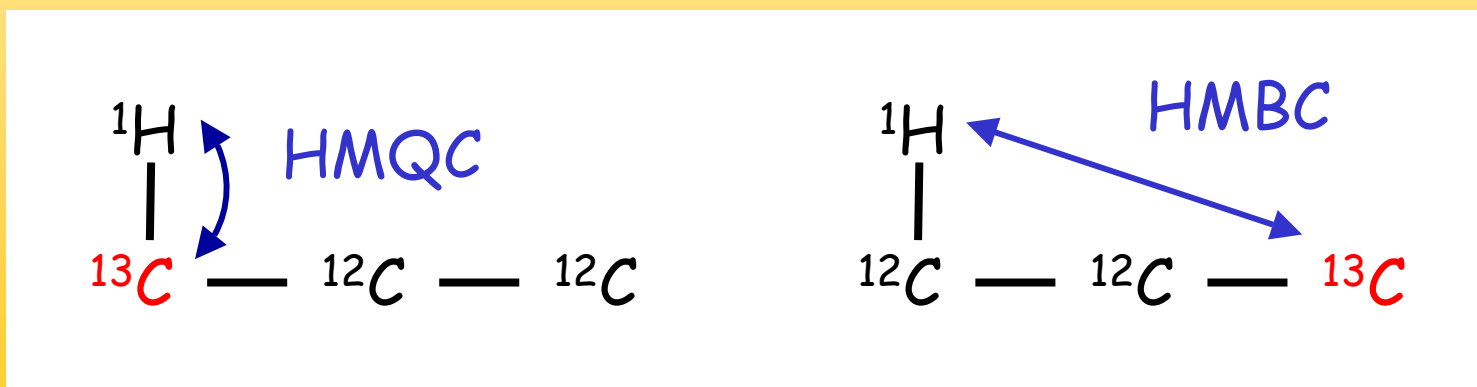
Jetzt bauen wir
den BIRD-Puls
ein

Protonen ohne
Heterokern
bekommen
diesen 90° Puls
(oder das ganze
Experiment)
nicht mit !!

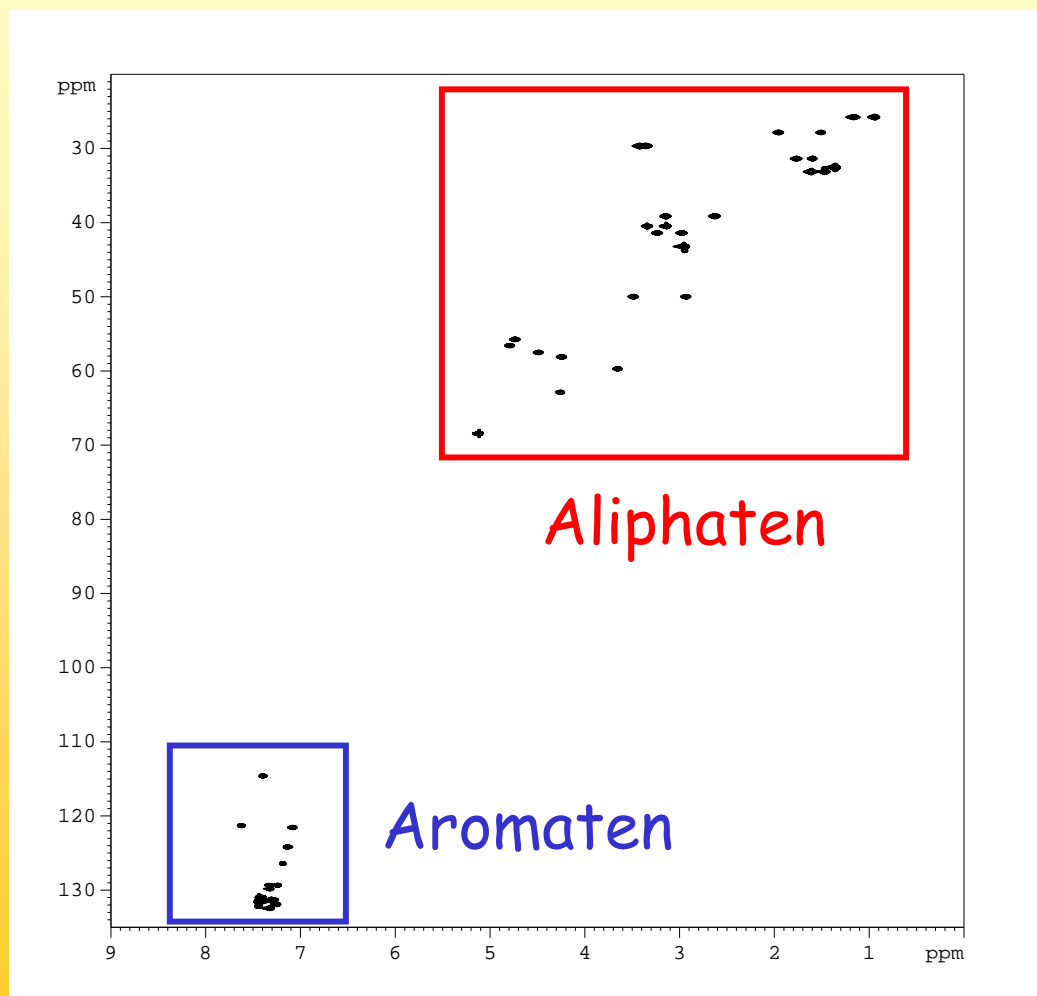
Peptide: Heteronukleare NMR

Der Trick mit dem BIRD-Puls kann generell für alle „inversen“ heteronuklearen Experimente eingesetzt werden und erlaubt auch ohne Gradienten eine saubere Datenaufnahme.

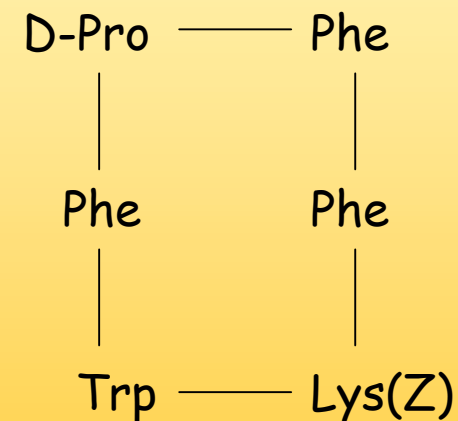
Er funktioniert allerdings nicht beim HMBC, da dort die gewünschten Protonen nicht an ^{13}C gebunden sind.



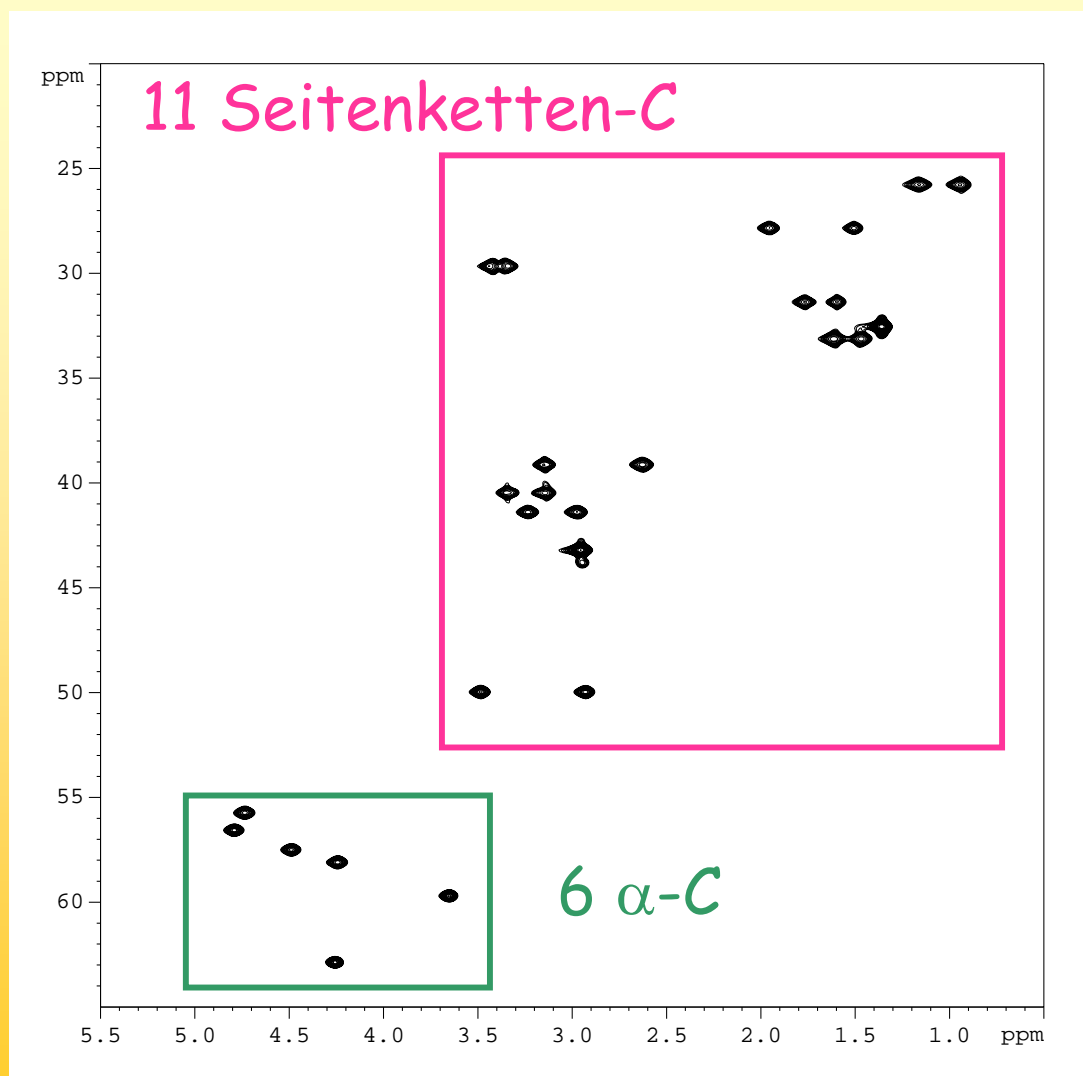
Peptide: Heteronukleare NMR



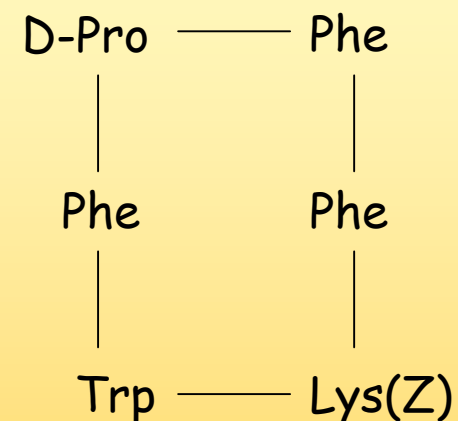
^{13}C -HMQC von F3-008



Peptide: Heteronukleare NMR

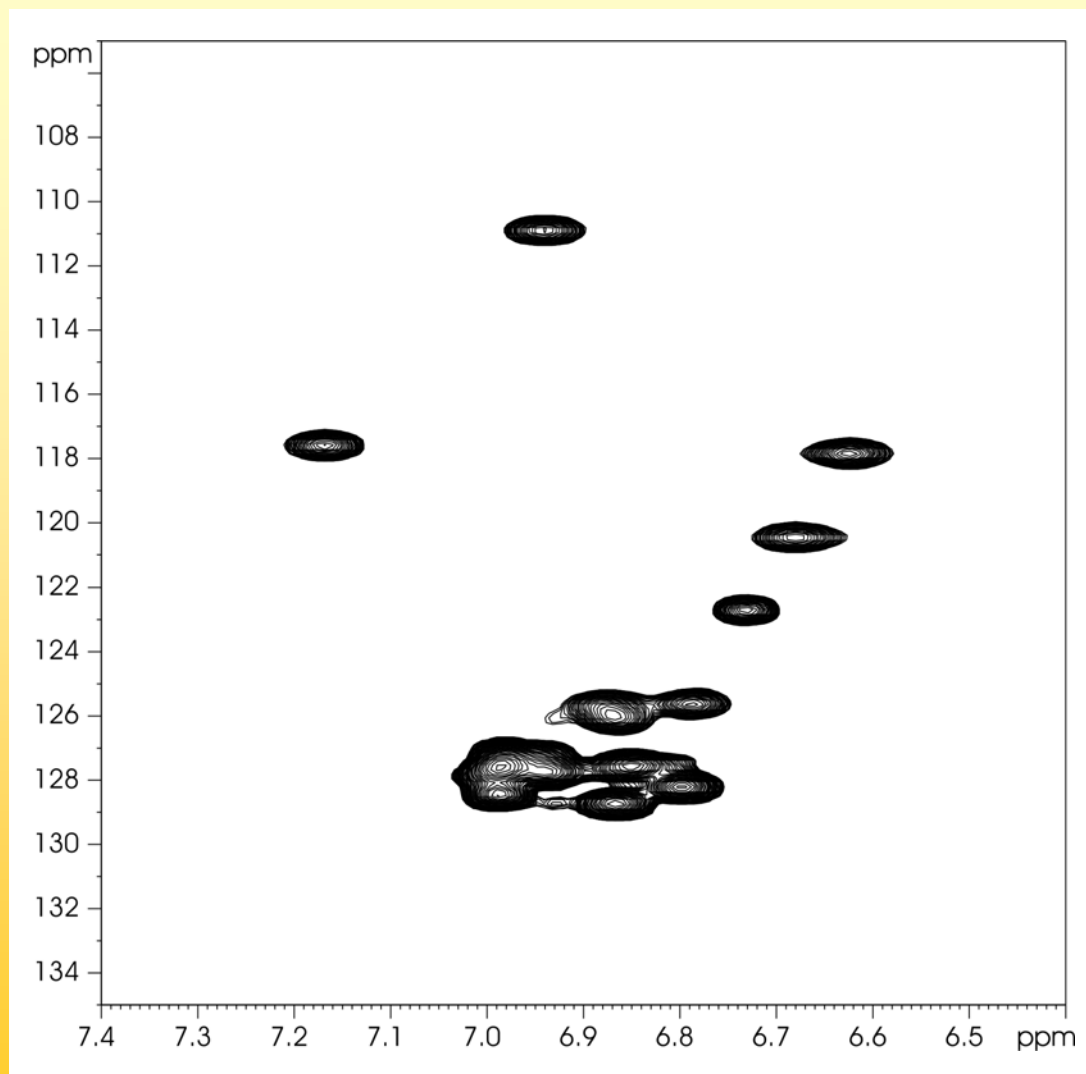


F3-008

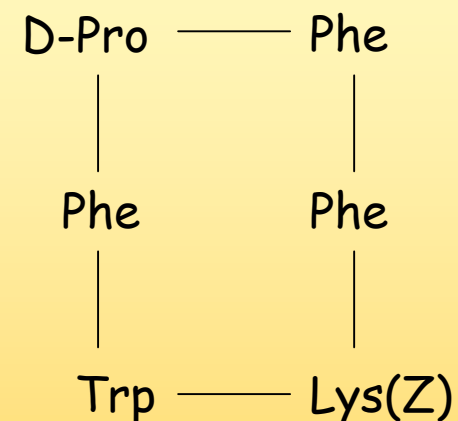


Überlagerung
wird weitgehend
aufgelöst

Peptide: Heteronukleare NMR



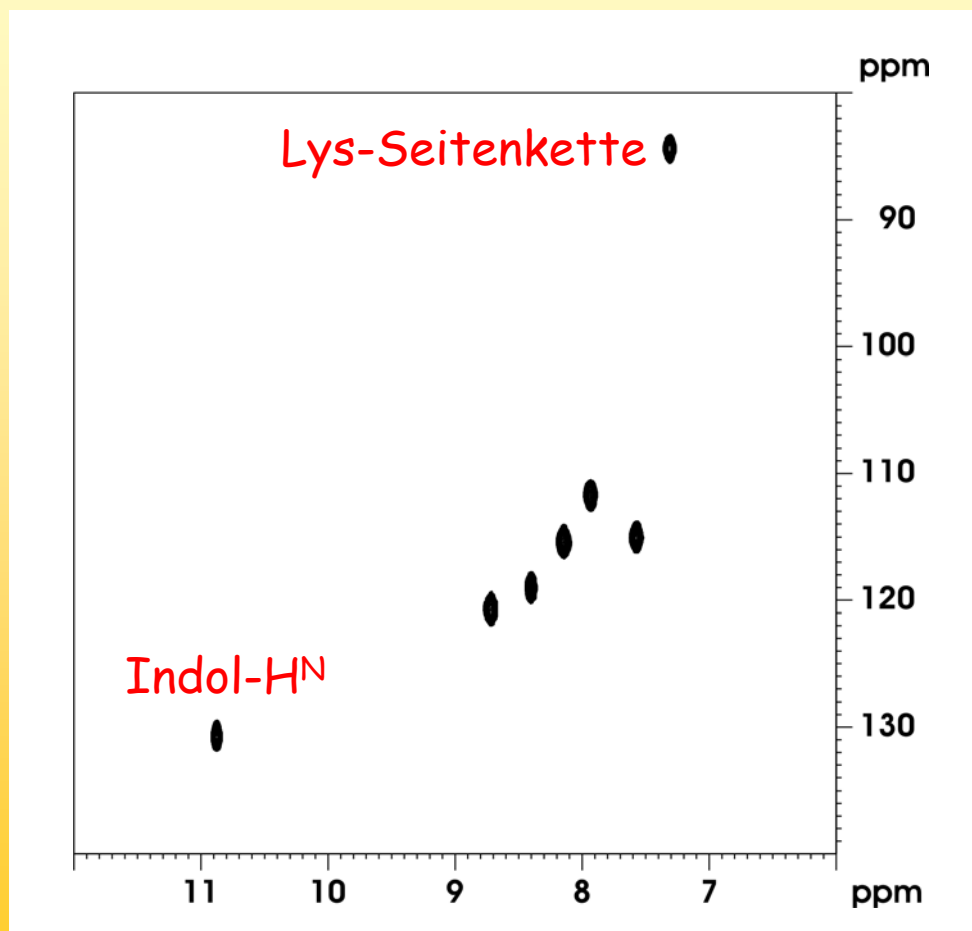
F3-008



Bei den Aromaten
kann es aber noch
immer eng sein

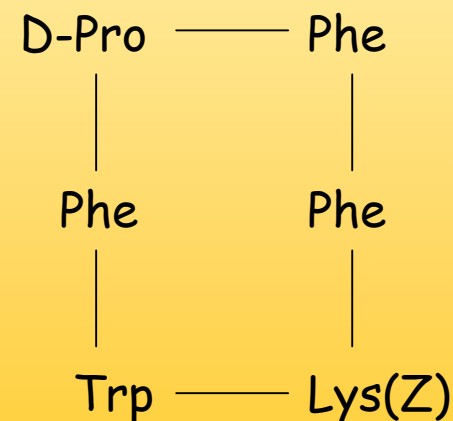
Peptide: Heteronukleare NMR

^{15}N -HMQC von F3-008



Das klappt auch mit

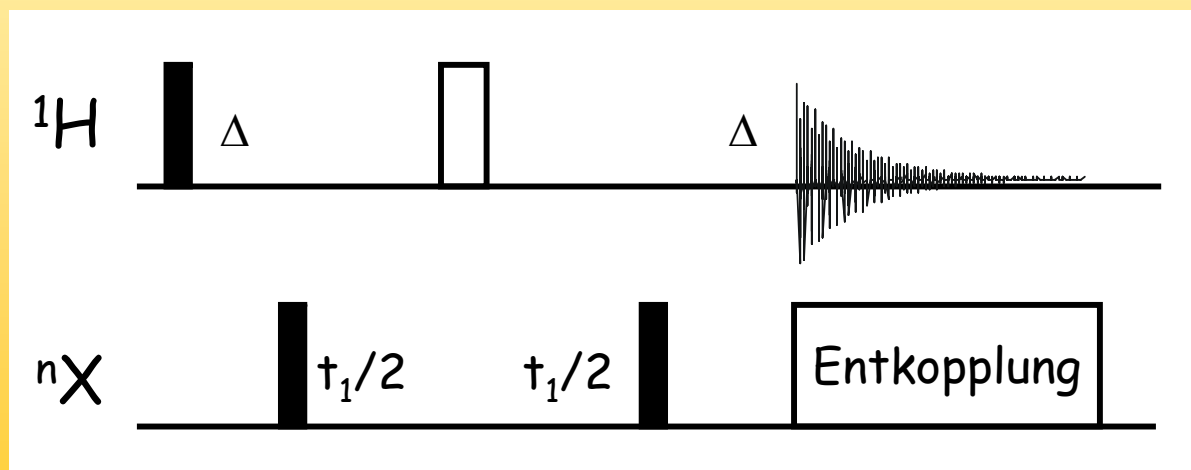
$$X = ^{15}\text{N}$$



Erweiterte HMQC-Experimente

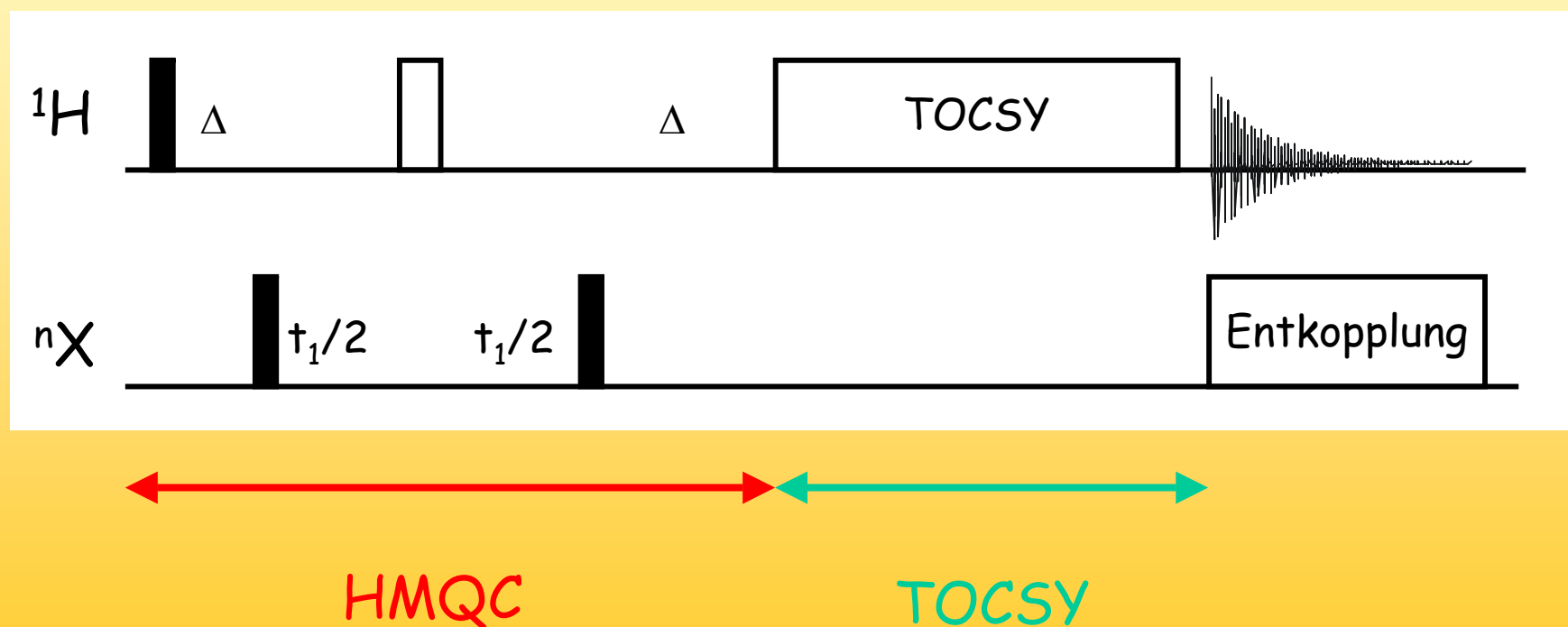
Peptide: Heteronukleare NMR

Um die gute Auflösung der heteronuklearen Spektren für eine Zuordnung der Spinsystem verwenden zu können erweitert man das HMQC....

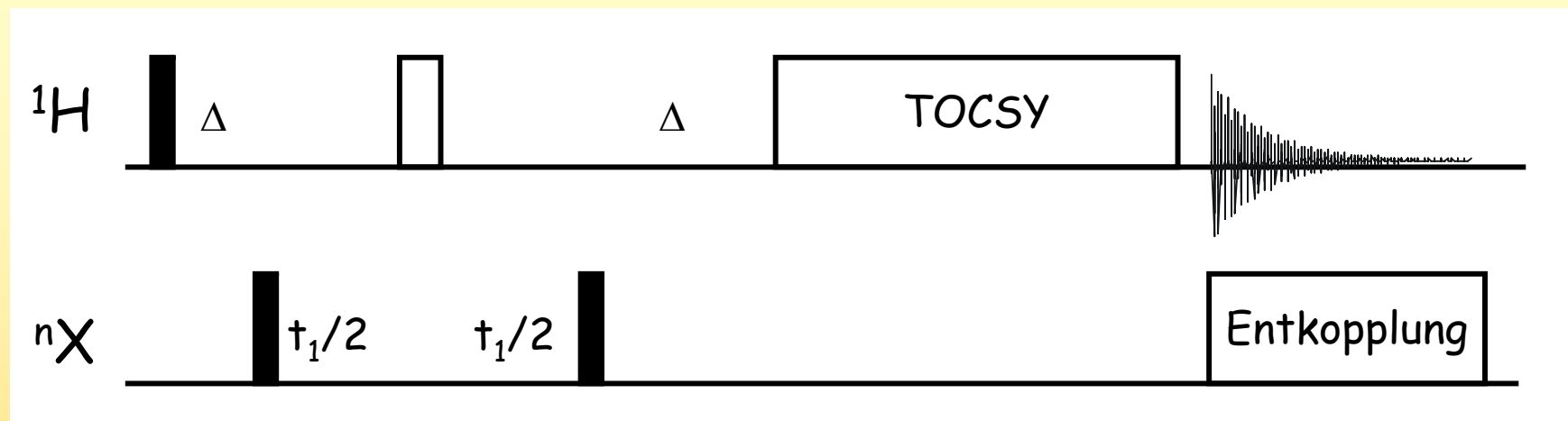


Peptide: Heteronukleare NMR

..... auf das HMQC-TOCSY. Eine Kombination von HMQC und TOCSY

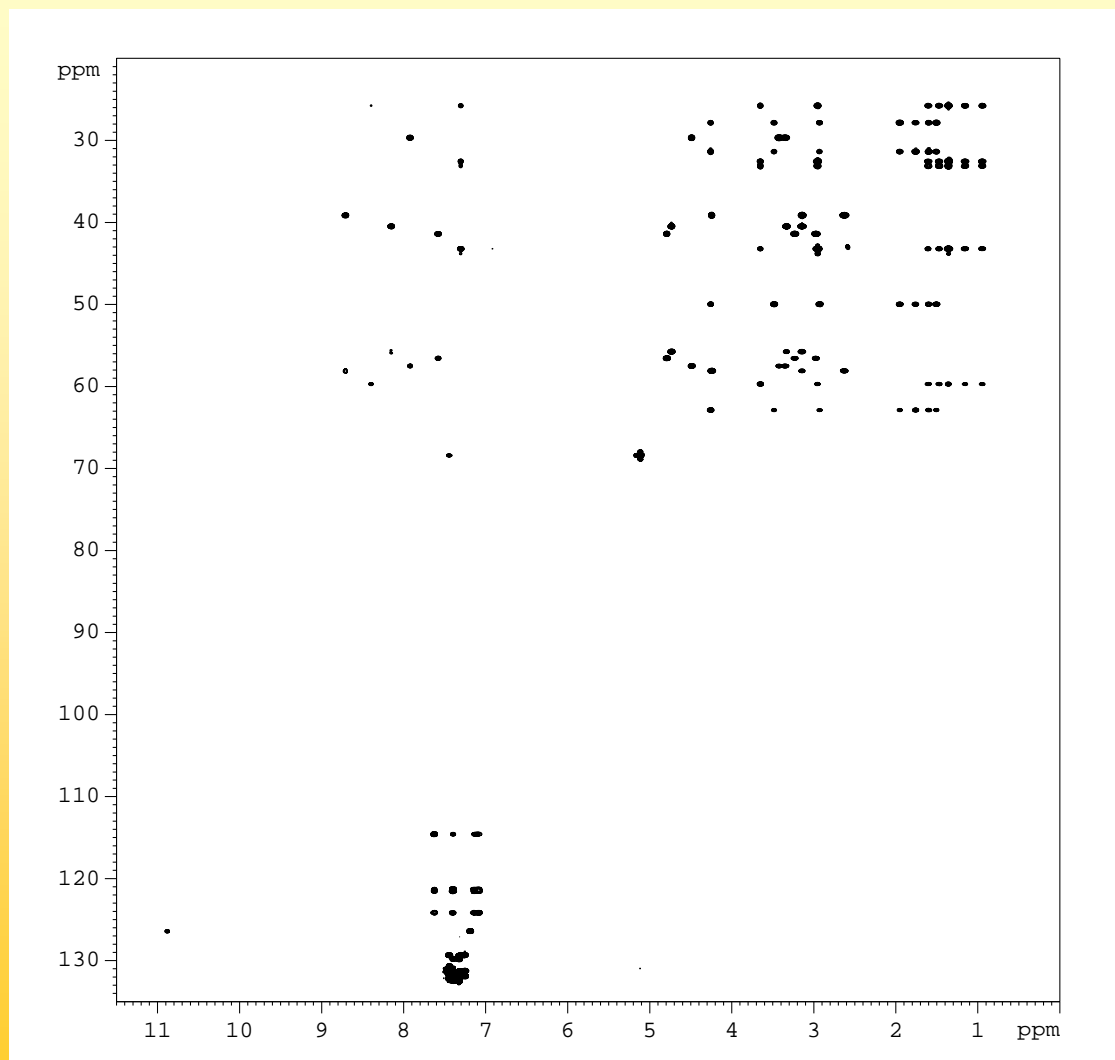


Peptide: Heteronukleare NMR

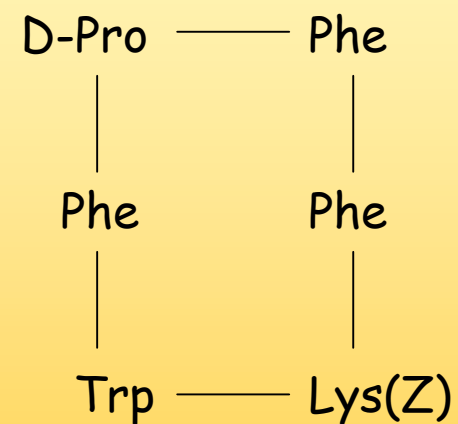


Am Ende des HMQC liegt ja hauptsächlich in-phase Magnetisierung vor. Die wird nun nicht detektiert sondern mit einer TOCSY-Mischsequenz über das ganze Spinsystem verteilt und erst anschließend detektiert. Magnetisierung die von J_{HH} resultiert wird unterdrückt.

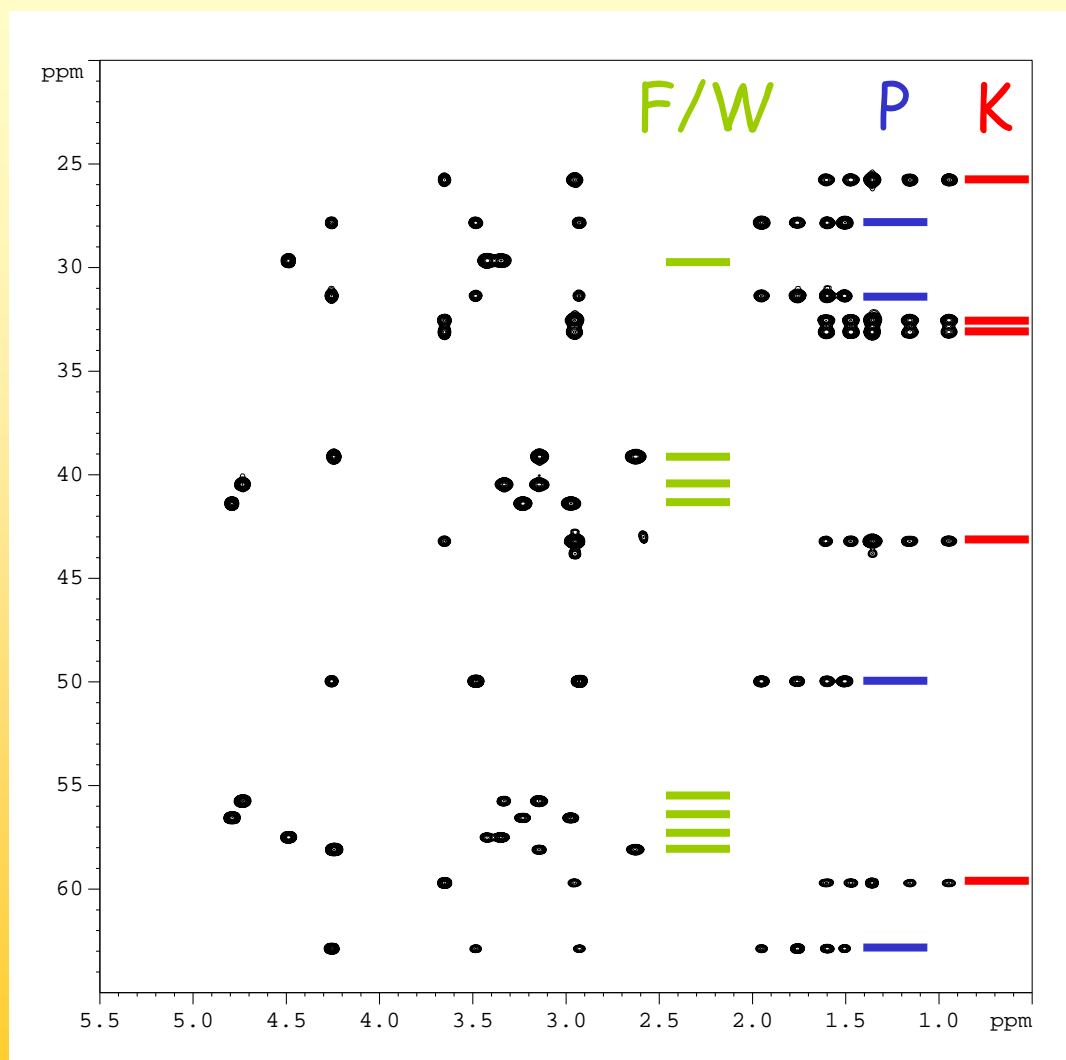
Peptide: Heteronukleare NMR



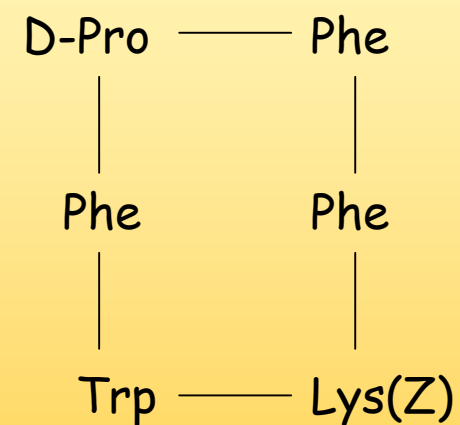
HMQC-TOCSY von F3-008



Peptide: Heteronukleare NMR

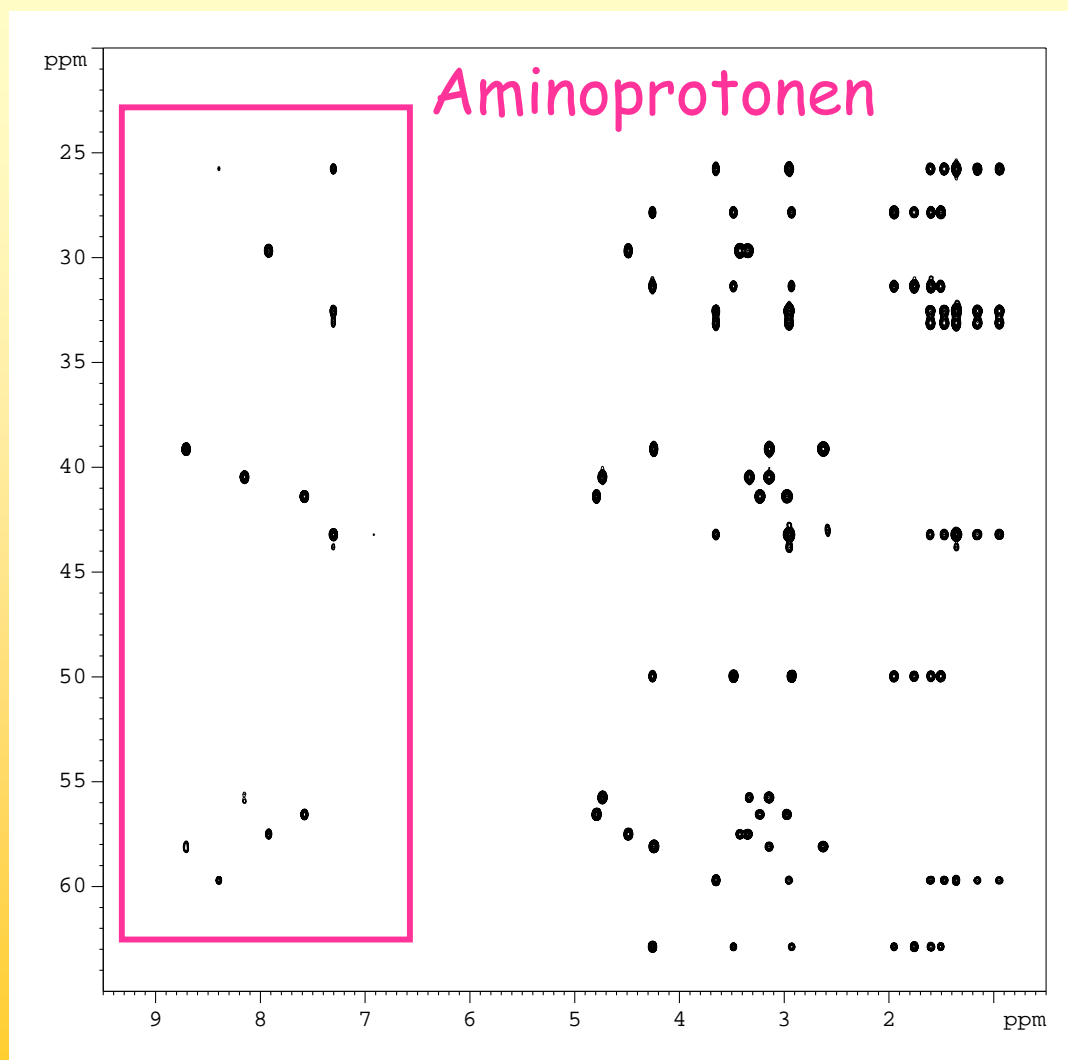


HMQC-TOCSY
von F3-008

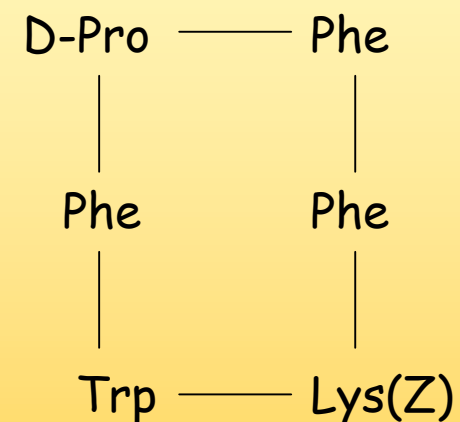


Bereich der
Aliphaten

Peptide: Heteronukleare NMR



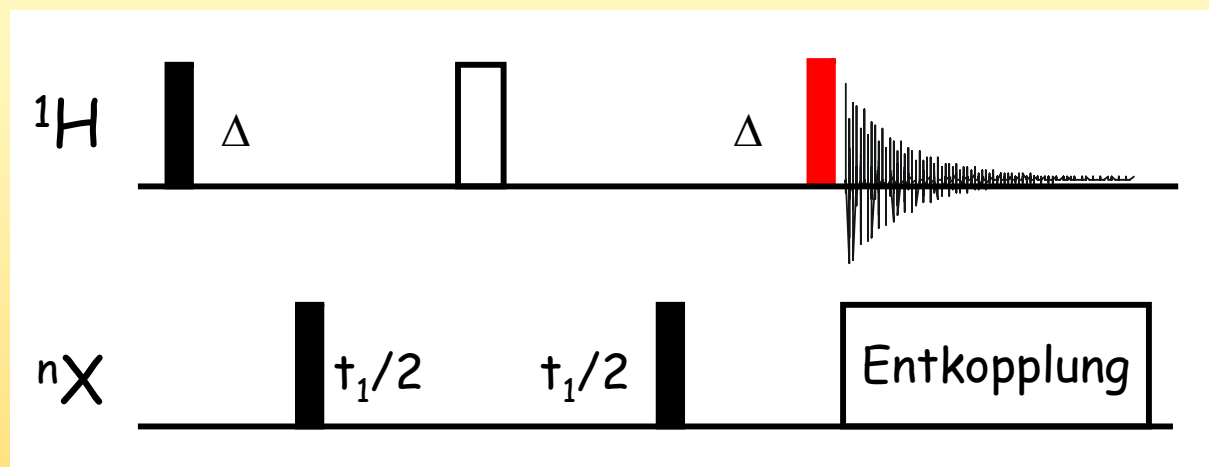
HMQC-TOCSY
von F3-008



Auch die H^N
lassen sich so
ablesen

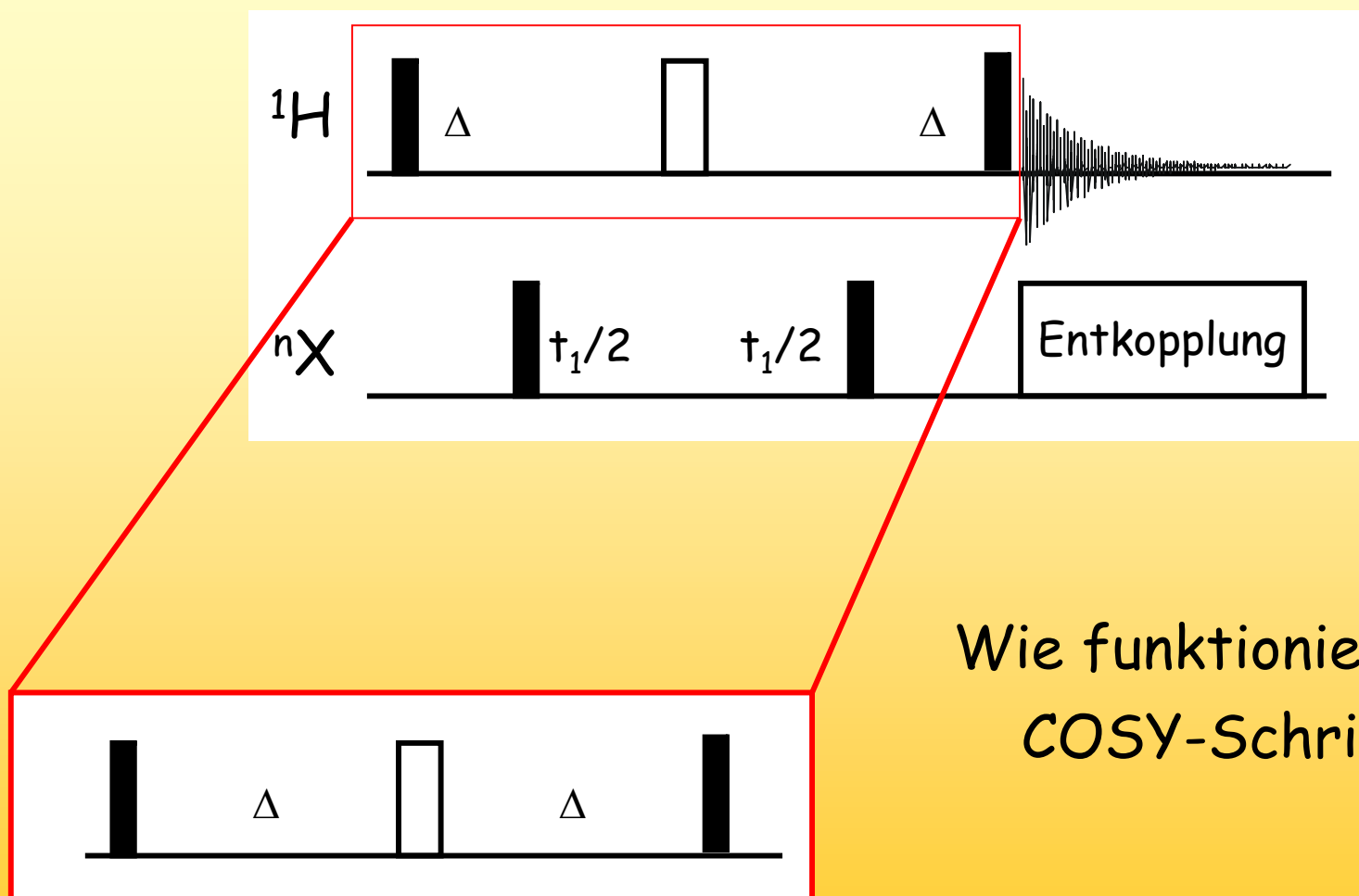
Peptide: Heteronukleare NMR

HMQC-COSY



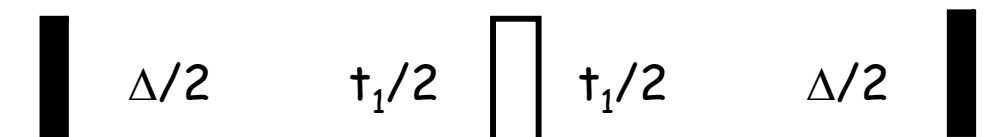
Es kann aber auch von Bedeutung sein nur einen „Schritt“ im Spinsystem weiterzugehen, d.h. nur über 3 Bindungen von einem Proton zum nächsten. Das gelingt mit dem HMQC-COSY

Peptide: Heteronukleare NMR



Wie funktioniert der
COSY-Schritt ?

Peptide: Heteronukleare NMR



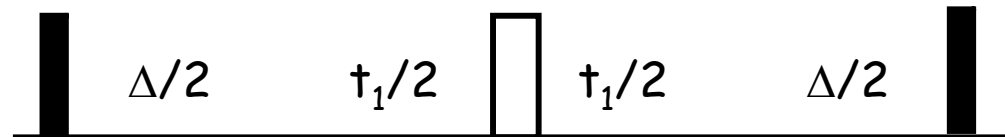
$$H_{1z} \xrightarrow{90^\circ H_x} -H_{1y} \xrightarrow{\pi J_{HH}(\Delta+t_1)}$$

$$-H_{1y} \cos \pi J_{HH}(\Delta+t_1) + 2H_{1x}H_{2z} \sin \pi J_{HH}(\Delta+t_1)$$

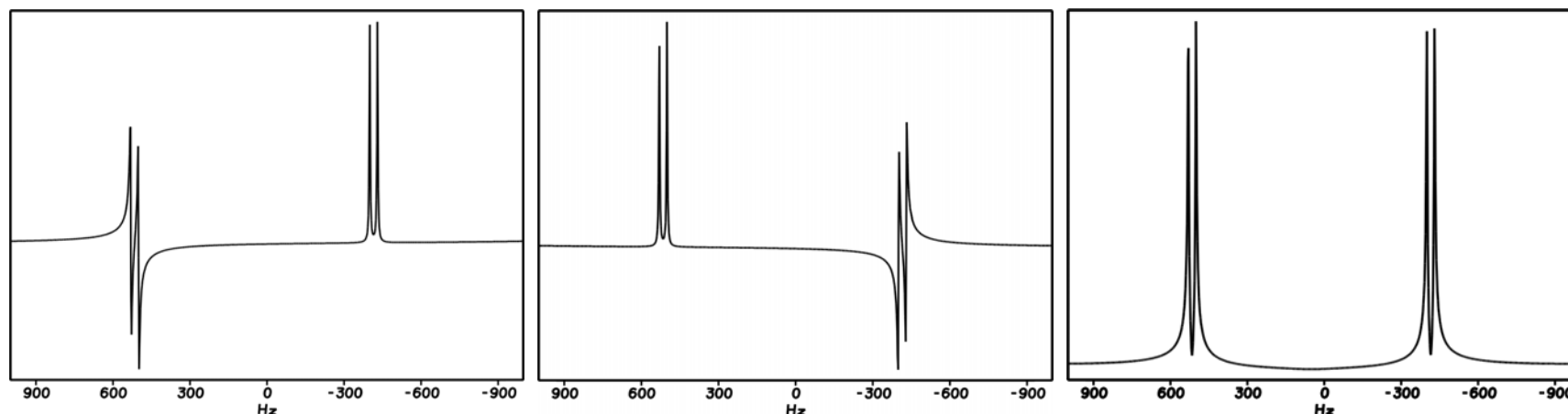
$$\xrightarrow{90^\circ H_y} -H_{1y} \cos \pi J_{HH}(\Delta+t_1) + 2H_{1z}H_{2x} \sin \pi J_{HH}(\Delta+t_1)$$

Wir haben oben schon gesehen das $\Delta+t_1$ recht groß werden kann. Zudem kennen wir die Situation schon vom „normalen“ COSY

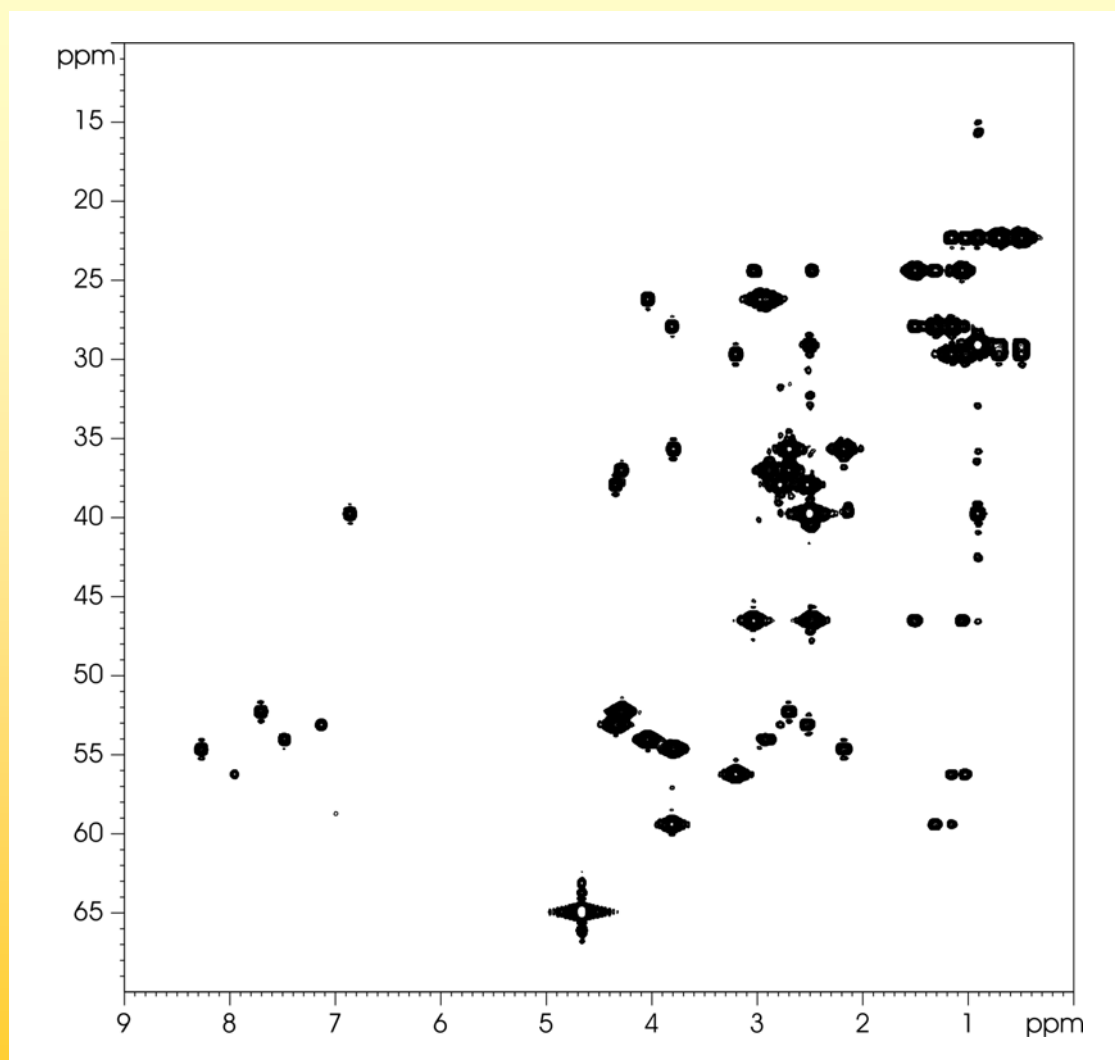
Peptide: Heteronukleare NMR



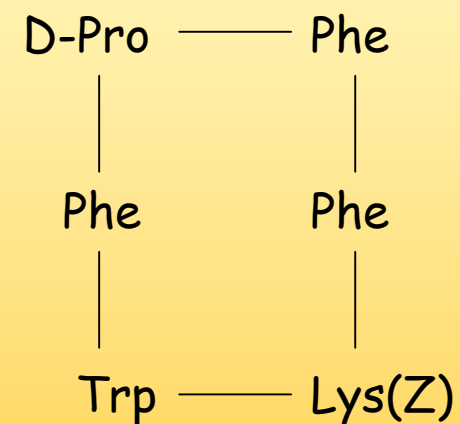
Wir bekommen zwei Signale für die beiden Protonen, haben aber einen Phasenunterschied von 90° und müssen eine Magnitude-Rechnung durchführen



Peptide: Heteronukleare NMR



HMQC-COSY
von F3-008

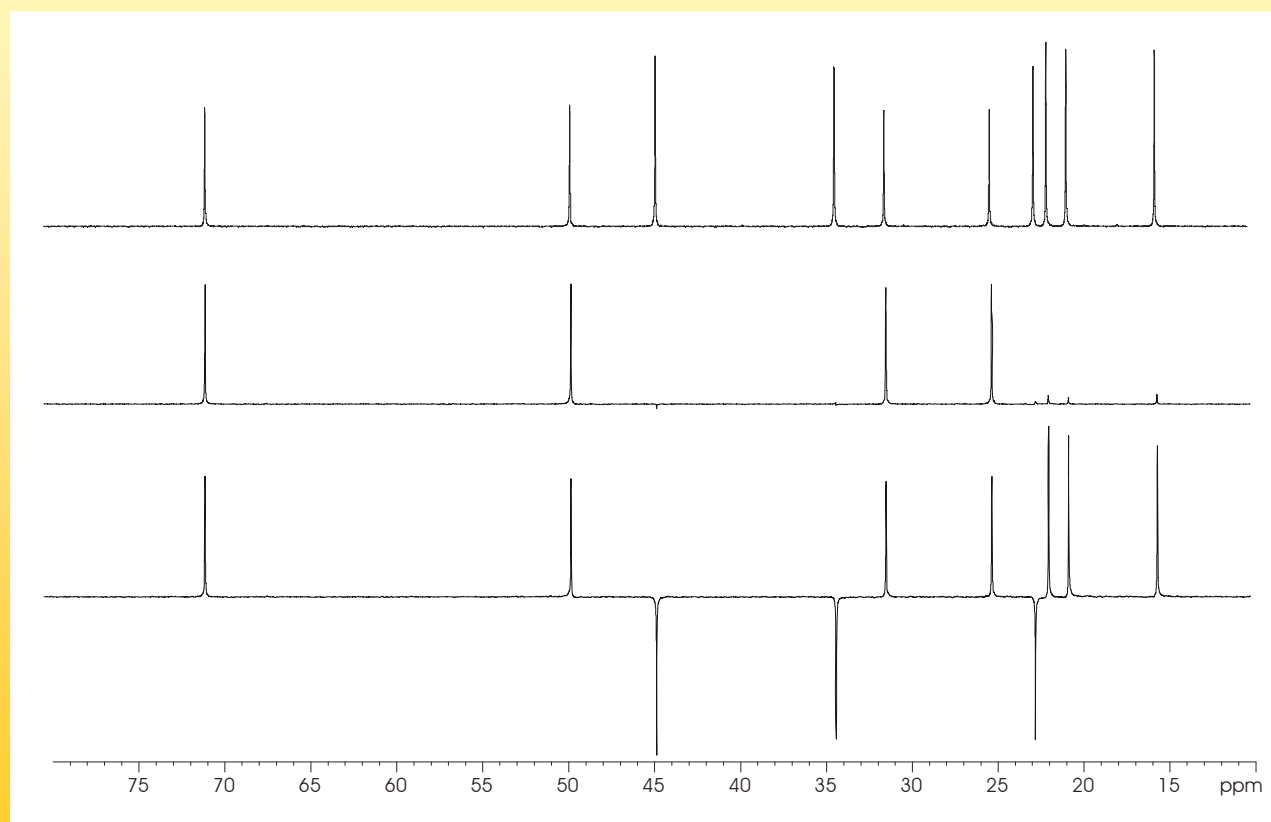


Das DEPT-HMQC

Peptide: Heteronukleare NMR

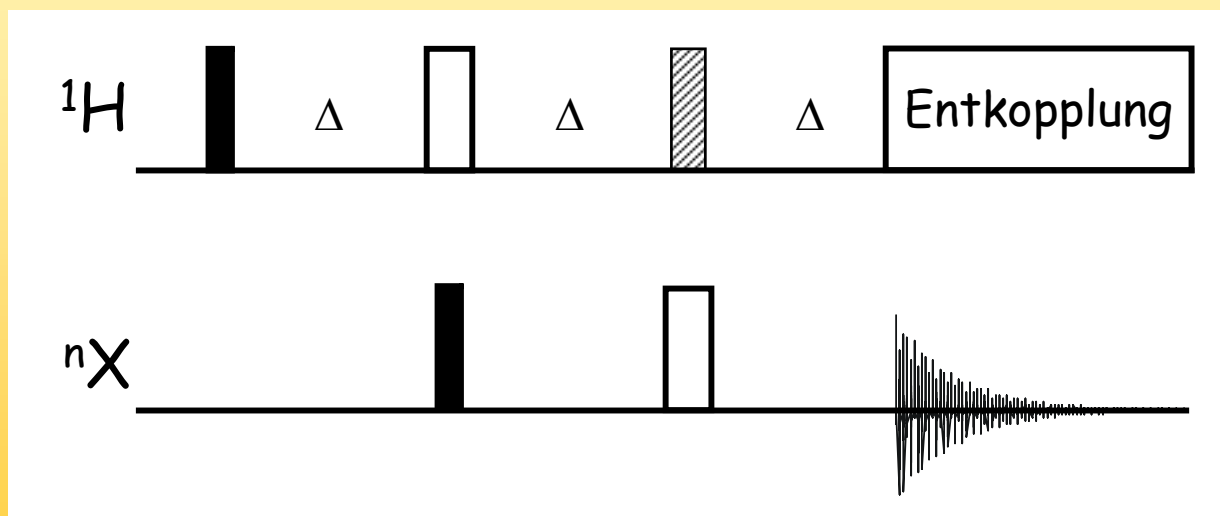
Was beim Zuordnen auch hilfreich sein kann, ist Information über die Multiplizität der Kohlenstoffkerne

DEPT !



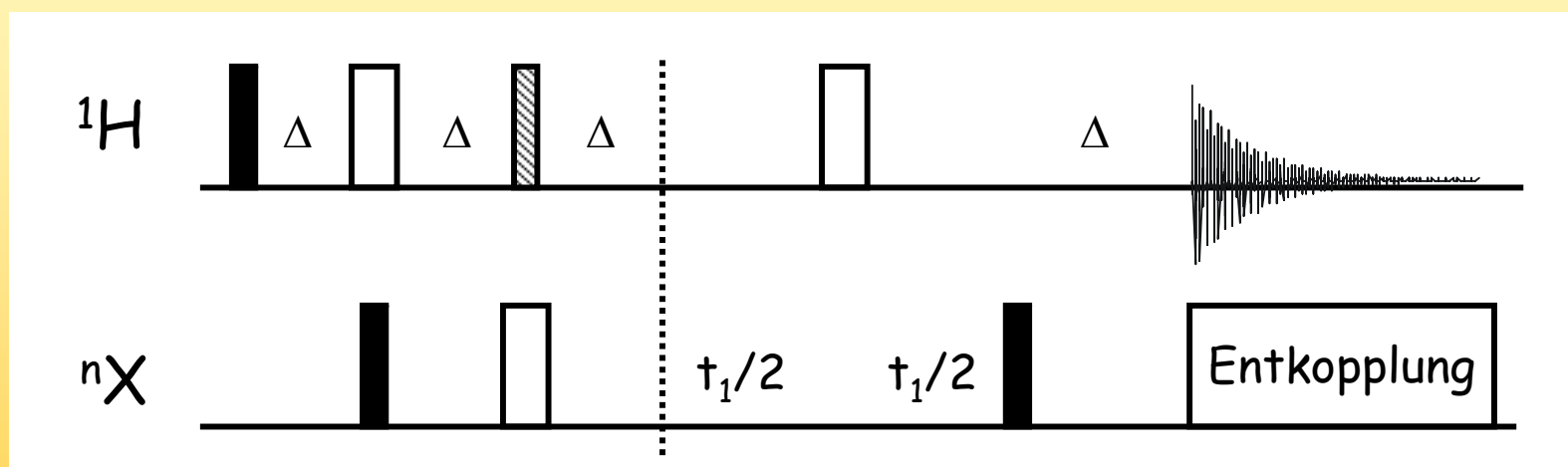
Peptide: Heteronukleare NMR

Kann man die DEPT-Sequenz und die in ihr enthaltene Information irgendwie in ein inverses Spektrum einbauen?

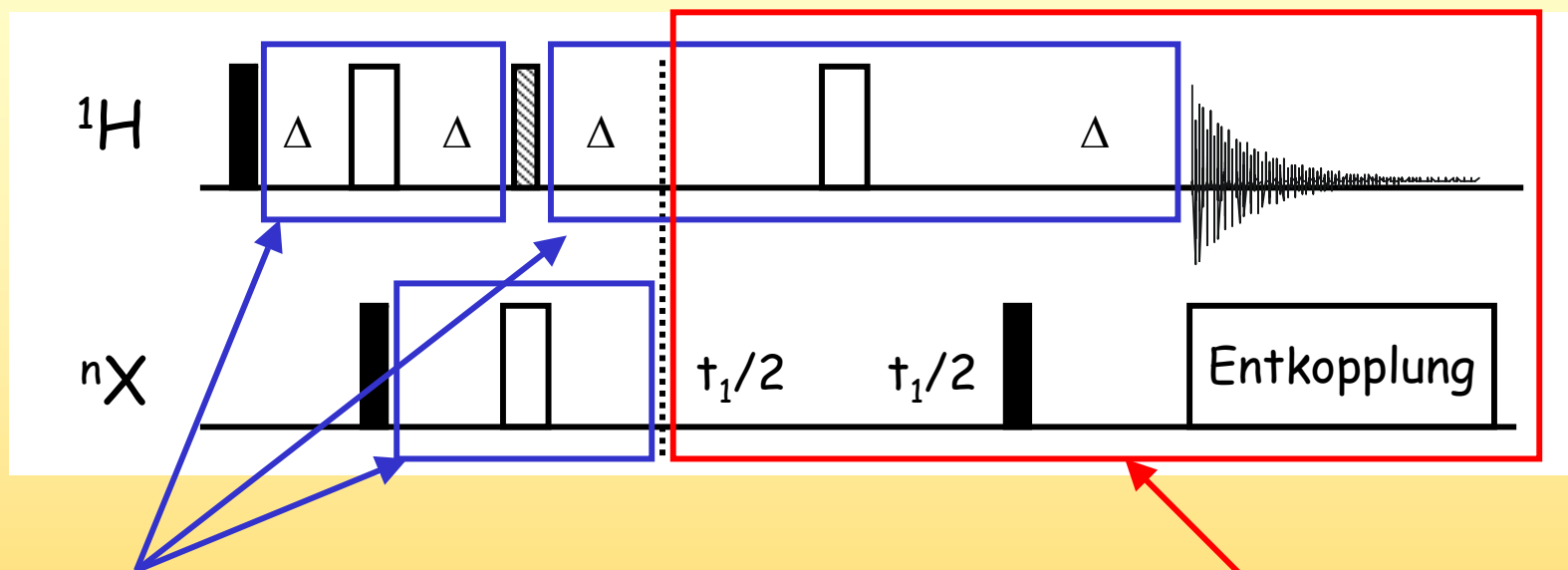


Peptide: Heteronukleare NMR

DEPT-HMQC



Peptide: Heteronukleare NMR

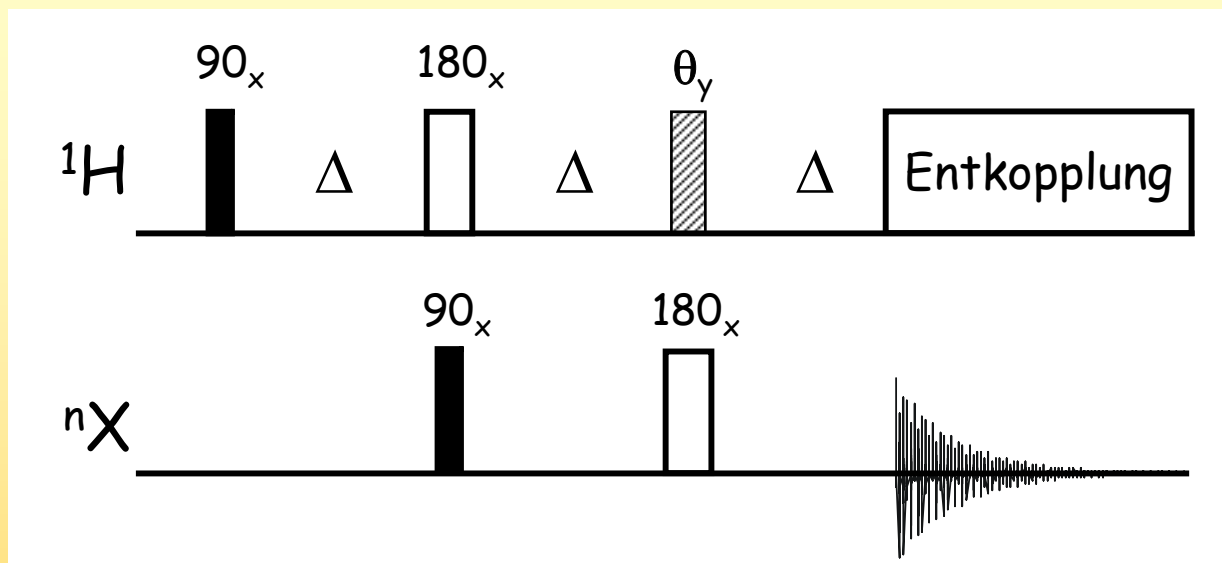


keine chemische Verschiebung

wie beim HMQC

Um das DEPT-HMQC zu verstehen müssen wir uns die DEPT-Sequenz nochmal anschauen

Peptide: Heteronukleare NMR



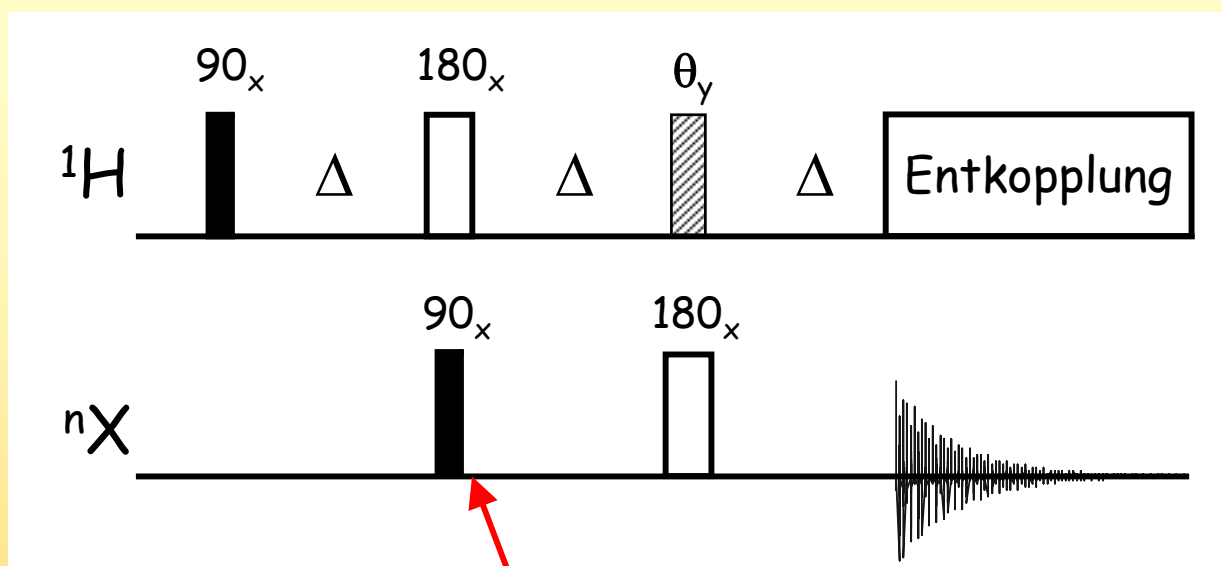
Das Vorzeichen der Signale hängt vom Editierpuls θ ab.

$\theta = 45^\circ$ $\text{CH} +, \text{CH}_2 +, \text{CH}_3 +$

$\theta = 90^\circ$ $\text{CH} +, \text{CH}_2 0, \text{CH}_3 0$

$\theta = 135^\circ$ $\text{CH} +, \text{CH}_2 -, \text{CH}_3 +$

Peptide: Heteronukleare NMR



$$H_z \xrightarrow{90^\circ H_x} -H_y \xrightarrow{\pi J_{HC}\Delta} -H_y \cos \pi J_{HC}\Delta + 2H_x C_z \sin \pi J_{HC}\Delta$$

$$\Delta = 1/(2J_{HC}): \cos \pi J_{HC}\Delta = 0, \sin \pi J_{HC}\Delta = 1$$

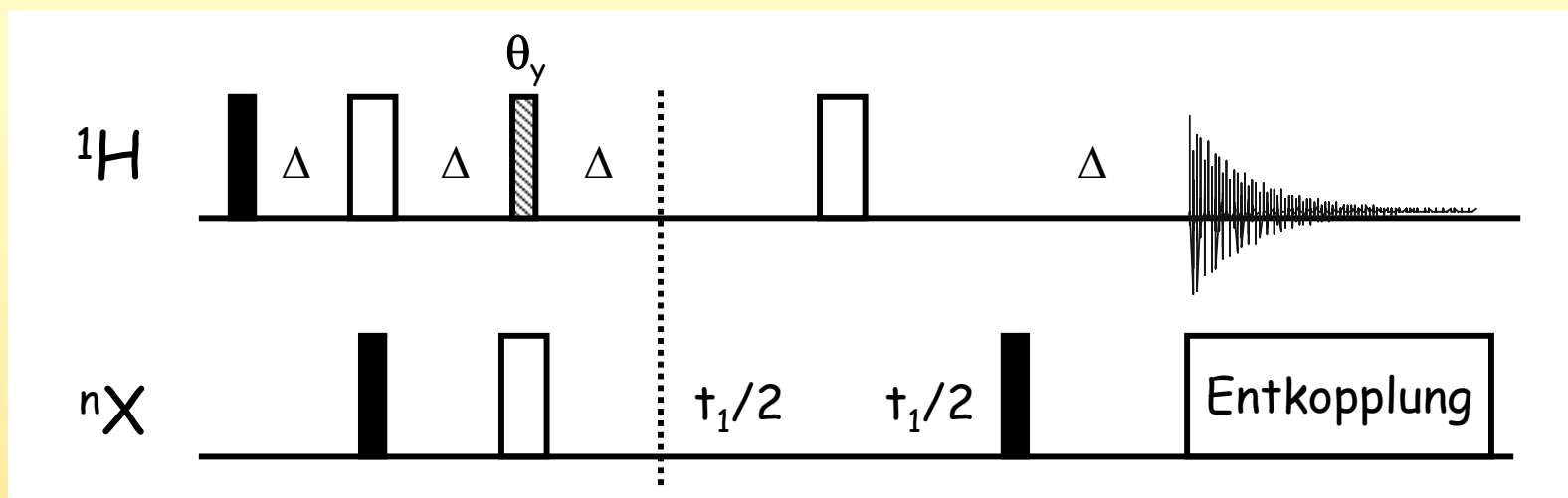
$$\longrightarrow 2H_x C_z \xrightarrow[90^\circ C_x]{180^\circ H_x} -2H_x C_y \quad \text{Multiquanten !!}$$

Peptide: Heteronukleare NMR

Von hier ab müssen wir für die unterschiedlichen Multiplizitäten getrennt rechnen, wie beim DEPT auch schon. Was aber jetzt schon auffällt ist, dass wir die Multiquanten, die wir im HMQC benutzen um in der indirekten Dimension die chemischen Verschiebung des Kohlenstoffs aufzuzeichnen, schon erzeugt haben. Im DEPT werden sie in detektierbare Kohlenstoff-Magnetisierung verwandelt.

Wir nutzen sie jetzt für ein DEPT-HMQC

Peptide: Heteronukleare NMR



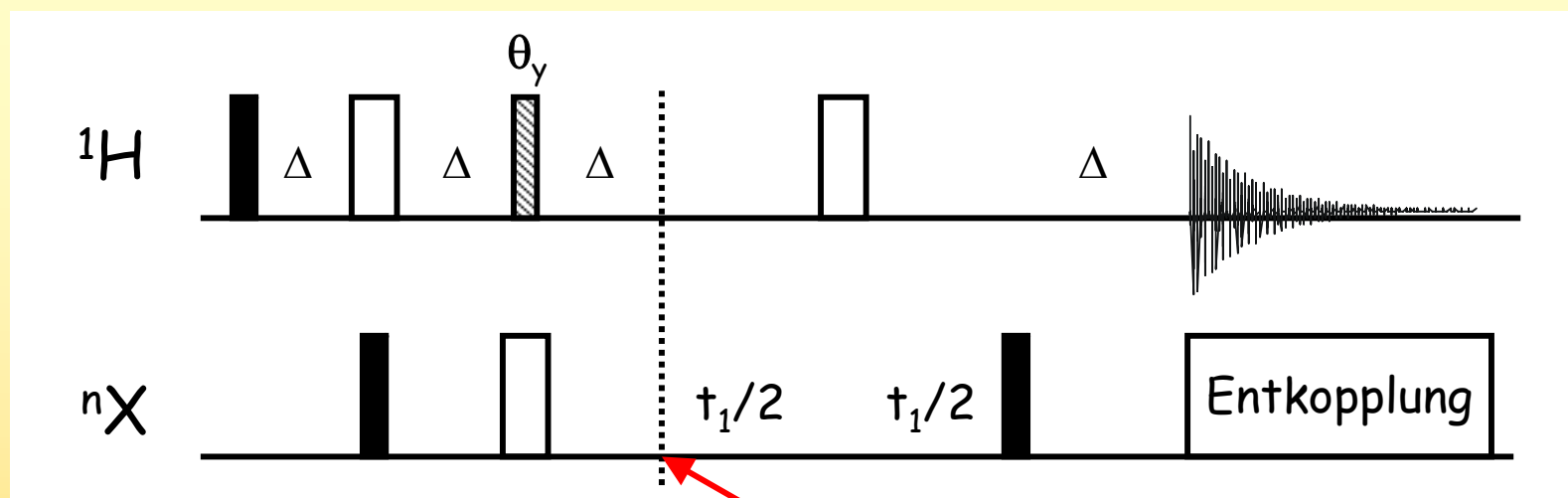
CH : Es gibt keine weitere H-C-Kopplung

$$-2 H_x C_y \xrightarrow{\pi J_{HC} \Delta} -2 H_x C_y \xrightarrow[180^\circ C_x]{\theta H_y} 2 (H_x \cos \theta - H_z \sin \theta) C_y$$

$$= 2 H_x C_y \cos \theta - 2 H_z C_y \sin \theta$$

$$\xrightarrow{\pi J_{HC} \Delta} 2 H_x C_y \cos \theta + C_x \sin \theta$$

Peptide: Heteronukleare NMR



$$2H_x C_y \cos \theta + C_y \sin \theta$$

$C_x \sin \theta$ Das kennen wir schon, das würde jetzt im DEPT detektiert

$2 H_x C_y \cos \theta$ Das sind die Multiquanten, die wir im Rest der Sequenz verwerten können

Peptide: Heteronukleare NMR

CH_2 : Es gibt eine weitere H-C-Kopplung

$$-2 H_{1x} C_y \xrightarrow{\pi J_{\text{HC}} \Delta} 4 H_{1x} H_{2z} C_x \xrightarrow{\frac{\theta H_y}{180^\circ C_x}}$$

$$4 (H_{1x} \cos \theta - H_{1z} \sin \theta) (H_{2z} \cos \theta + H_{2x} \sin \theta) C_x$$

$$= 4 H_{1x} H_{2z} C_x \cos \theta \cos \theta - 4 H_{1z} H_{2z} C_x \sin \theta \cos \theta$$

$$+ 4 H_{1x} H_{2x} C_x \cos \theta \sin \theta - 4 H_{1z} H_{2x} C_x \sin \theta \sin \theta$$

$$\xrightarrow{\pi J_{\text{HC}} \Delta} 2 H_{1x} C_y \cos \theta \cos \theta + C_x \sin \theta \cos \theta$$

$$+ 4 H_{1x} H_{2x} C_x \cos \theta \sin \theta - 2 H_{2x} C_y \sin \theta \sin \theta$$

Das gleiche bekommen wir auch nochmal von H_2 aus

Peptide: Heteronukleare NMR

Von H_1

$$2 H_{1x} C_y \cos \theta \cos \theta + C_x \sin \theta \cos \theta$$

$$+ 4 H_{1x} H_{2x} C_x \cos \theta \sin \theta - 2 H_{2x} C_y \sin \theta \sin \theta$$

Von H_2

$$2 H_{2x} C_y \cos \theta \cos \theta + C_x \sin \theta \cos \theta$$

$$+ 4 H_{2x} H_{1x} C_x \cos \theta \sin \theta - 2 H_{1x} C_y \sin \theta \sin \theta$$

$C_x \sin \theta \cos \theta$ Das würden wir im DEPT detektieren

Im DEPT-HMQC bekommen wir

$$2 H_{1x} C_y \cos \theta \cos \theta - 2 H_{1x} C_y \sin \theta \sin \theta$$

$$= 2 H_{1x} C_y (\cos \theta \cos \theta - \sin \theta \sin \theta) = 2 H_{1x} C_y \cos 2\theta$$

Peptide: Heteronukleare NMR

CH_3 : Nun sind es zwei weitere H-C-Kopplungen

$$-2 H_{1x} C_y \xrightarrow{\pi J_{\text{HC}} \Delta} 8 H_{1x} H_{2z} H_{3z} C_y \xrightarrow{\frac{\theta H_y}{180^\circ C_x}}$$

$$- 8 (H_{1x} \cos \theta - H_{1z} \sin \theta) (H_{2z} \cos \theta + H_{2x} \sin \theta) \times \\ (H_{3z} \cos \theta + H_{3x} \sin \theta) C_y$$

Damit entstehen 8 Terme durch Multiplikation

Peptide: Heteronukleare NMR

$$\begin{aligned}
 &= - 8 H_{1x} H_{2z} H_{3z} C_y \cos \theta \cos \theta \cos \theta \\
 &+ 8 H_{1z} H_{2z} H_{3z} C_y \sin \theta \cos \theta \cos \theta \\
 &- 8 H_{1x} H_{2x} H_{3z} C_y \cos \theta \sin \theta \cos \theta \\
 &+ 8 H_{1z} H_{2x} H_{3z} C_y \sin \theta \sin \theta \cos \theta \\
 &- 8 H_{1x} H_{2z} H_{3x} C_y \cos \theta \cos \theta \sin \theta \\
 &+ 8 H_{1z} H_{2z} H_{3x} C_y \sin \theta \cos \theta \sin \theta \\
 &- 8 H_{1x} H_{2x} H_{3x} C_y \cos \theta \sin \theta \sin \theta \\
 &+ 8 H_{1z} H_{2x} H_{3x} C_y \sin \theta \sin \theta \sin \theta
 \end{aligned}$$

Peptide: Heteronukleare NMR

$$\begin{aligned}
 \xrightarrow{\pi J_{HC}\Delta} & 2 H_{1x} C_y \cos \theta \cos \theta \cos \theta \\
 & + C_x \sin \theta \cos \theta \cos \theta \\
 & + 4 H_{1x} H_{2x} C_x \cos \theta \sin \theta \cos \theta \\
 & - 2 H_{2x} C_y \sin \theta \sin \theta \cos \theta \\
 & + 4 H_{1x} H_{3x} C_x \cos \theta \cos \theta \sin \theta \\
 & - 2 H_{3x} C_y \sin \theta \cos \theta \sin \theta \\
 & - 8 H_{1x} H_{2x} H_{3x} C_y \cos \theta \sin \theta \sin \theta \\
 & - 8 H_{2x} H_{3x} C_x \sin \theta \sin \theta \sin \theta
 \end{aligned}$$

Und das ganze wieder von 3 Protonen !!

Peptide: Heteronukleare NMR

$$C_x \sin \theta \cos \theta \cos \theta$$

Hier finden wir unseren DEPT-Term wieder

$$2 H_{1x} C_y \cos \theta \cos \theta \cos \theta$$

$$-2 H_{1x} C_y \sin \theta \sin \theta \cos \theta$$

$$-2 H_{1x} C_y \sin \theta \cos \theta \sin \theta$$

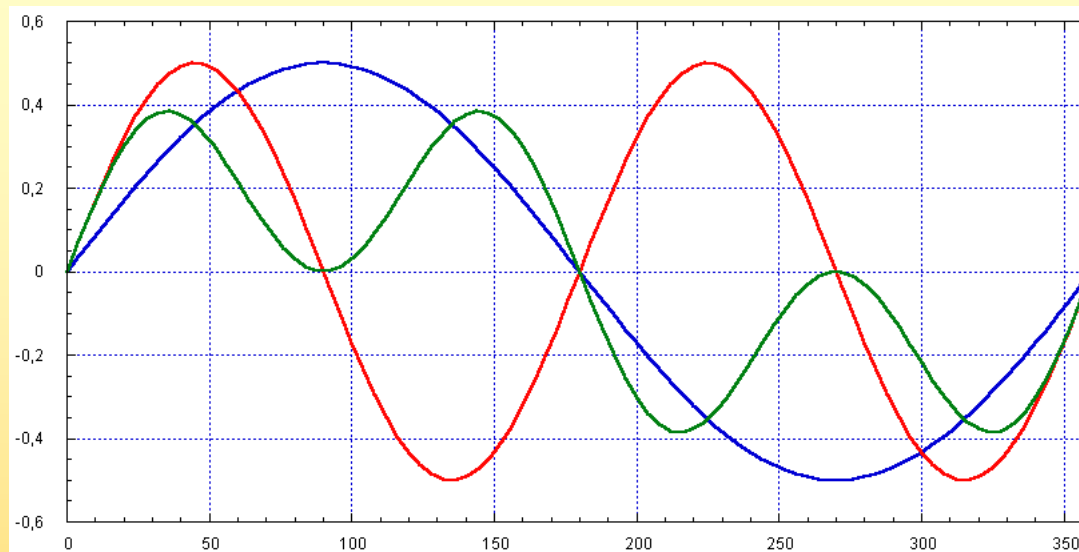
$$= 2 H_{1x} C_y (\cos^3 \theta - 2 \sin^2 \theta \cos \theta)$$

$$= 2 H_{1x} C_y (3/4 \cos 3\theta + 1/4 \cos \theta)$$

Im DEPT-HMQC ergibt das

Peptide: Heteronukleare NMR

Beim „klassischen“
DEPT sah das so
aus



$$\text{CH} : \sin \theta$$

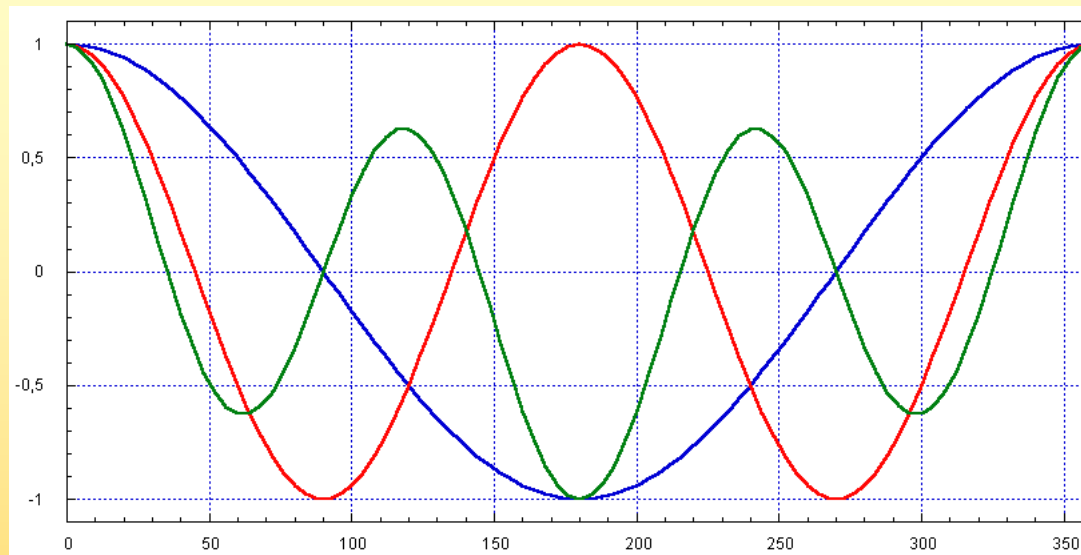
$$\text{CH}_2 : \sin \theta \cos \theta$$

$$\text{CH}_3 : \sin \theta \cos \theta \cos \theta$$

Nützliche Pulswinkel sind
hier 45° , 90° und 135°

Peptide: Heteronukleare NMR

Beim DEPT-HMQC
ergibt sich etwas
anderes



$$\text{CH} : \cos \theta$$

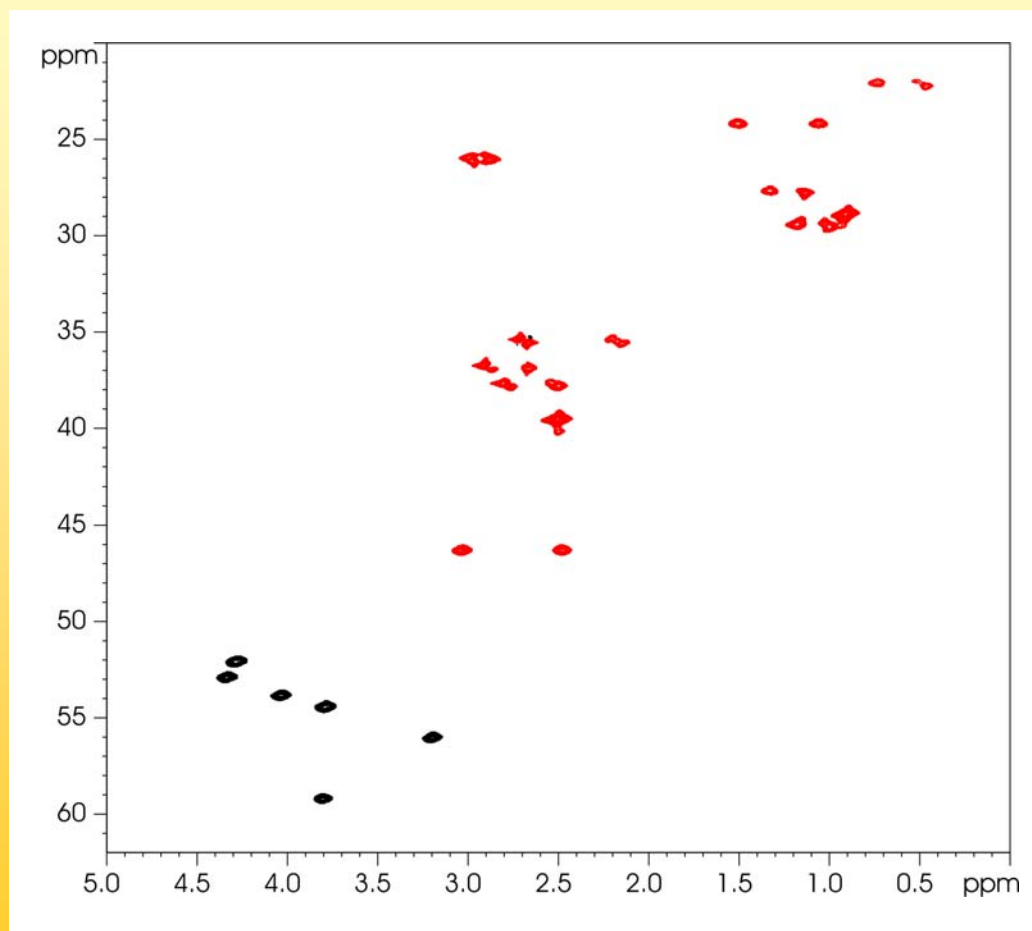
$$\text{CH}_2 : \cos 2\theta$$

$$\text{CH}_3 : \frac{3}{4} \cos 3\theta + \frac{1}{4} \cos \theta$$

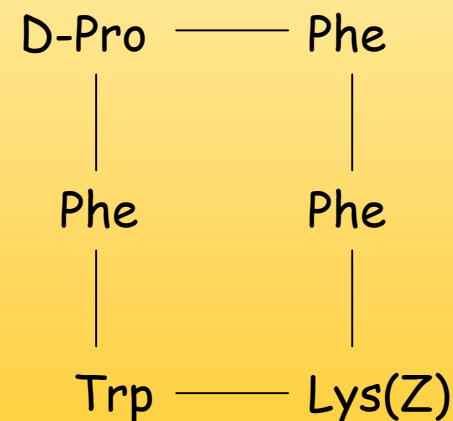
Nützliche Pulswinkel sind
hier 60°, 90°, 120 und 180°

Peptide: Heteronukleare NMR

^{13}C -DEPT-HMQC (180) von F3-008

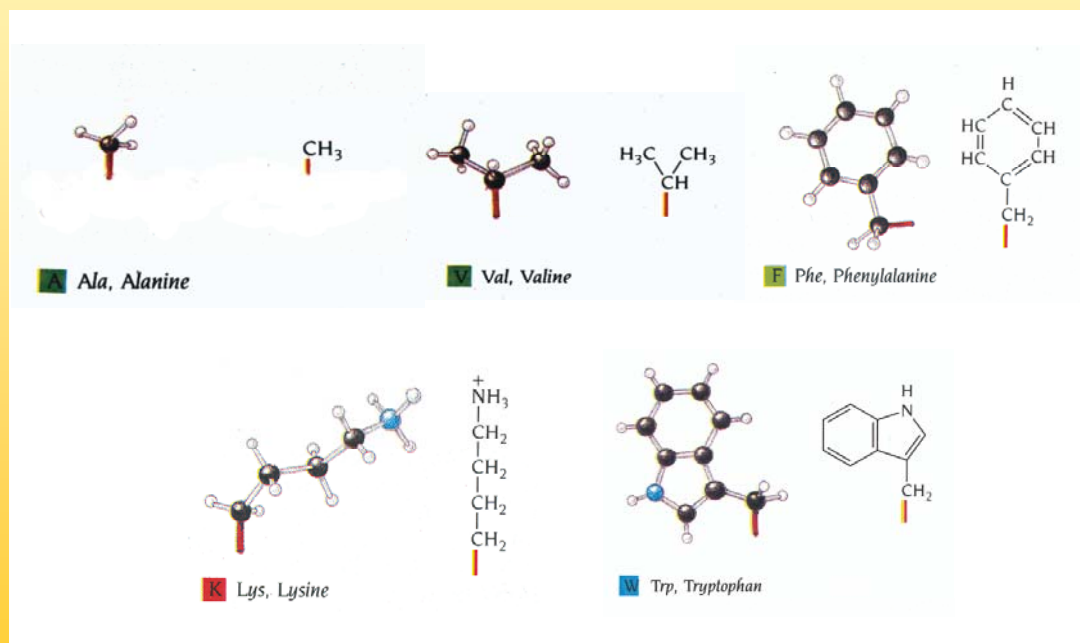
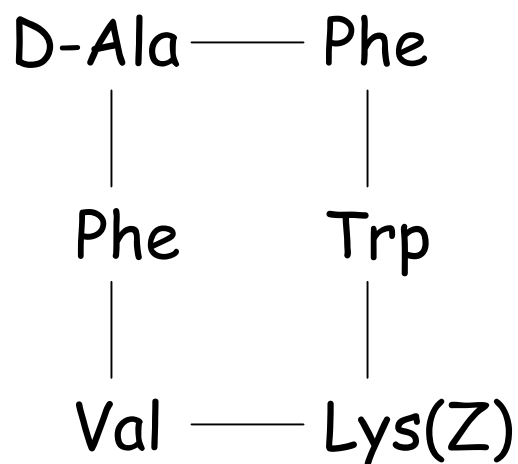


Das ist wegen der
ähnlichen
Aminosäuren gut
geordnet



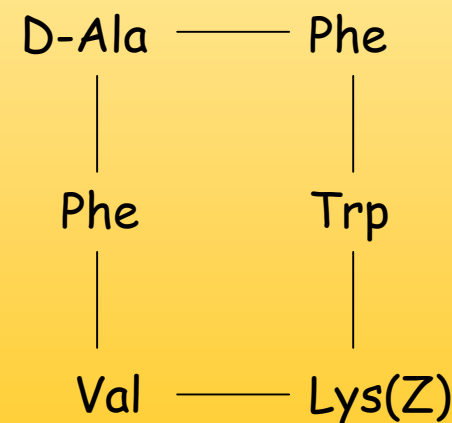
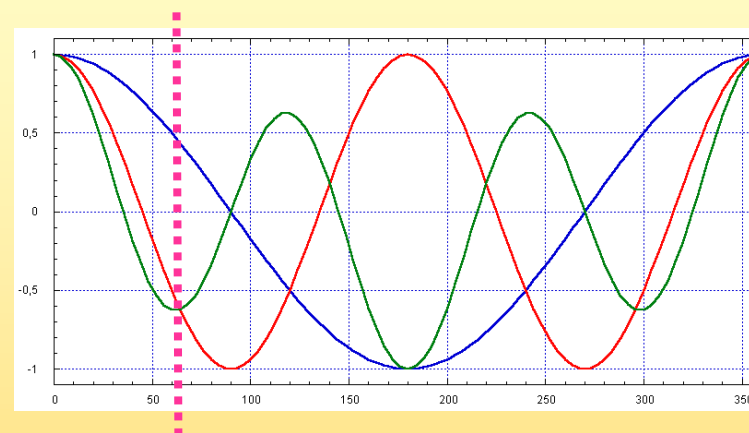
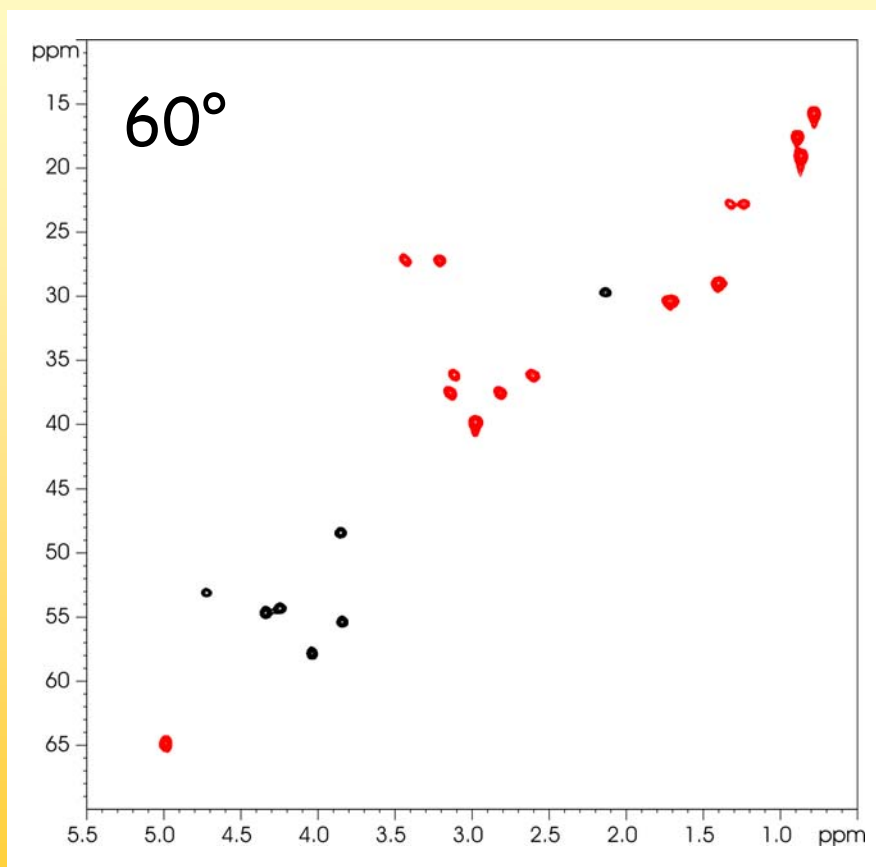
Peptide: Heteronukleare NMR

Unser normales Peptid, F3-008, eignet sich nicht gut um das DEPT-HMQC zu demonstrieren, deshalb nehmen wir hier ein anderes Peptid, retro-VDA-008



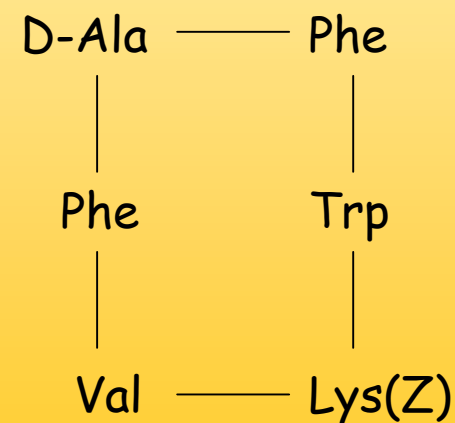
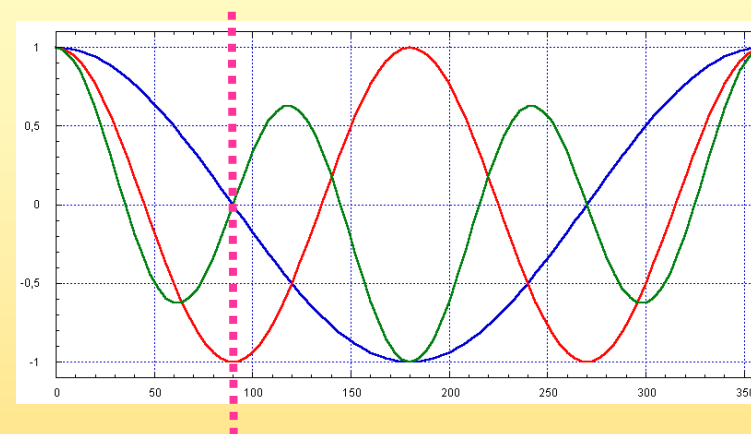
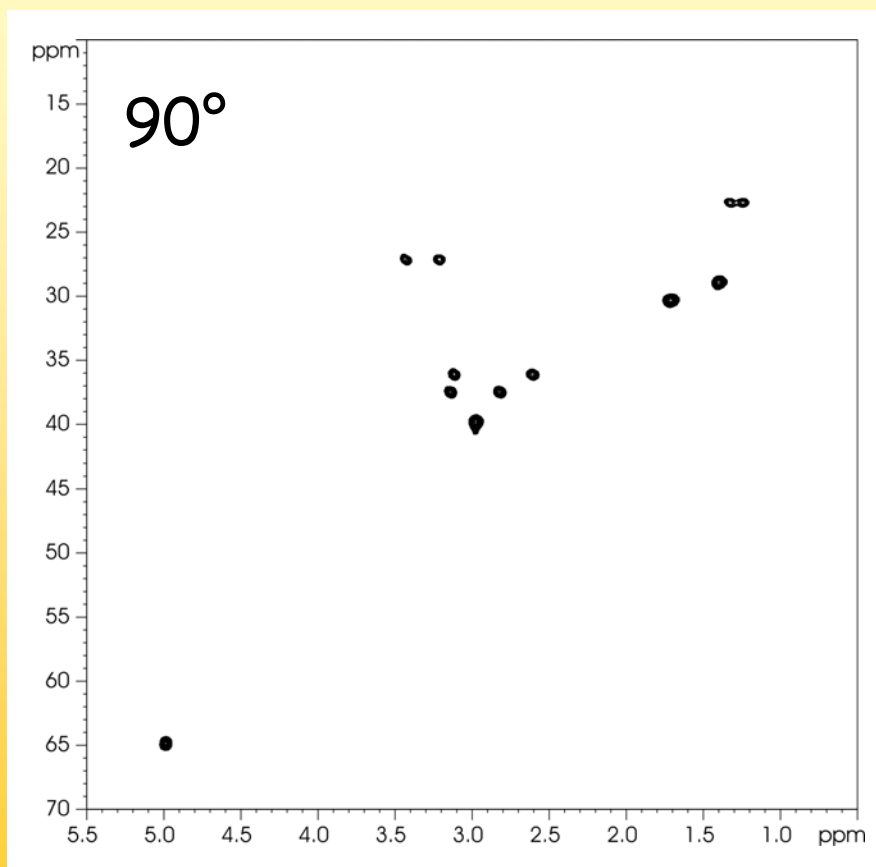
Peptide: Heteronukleare NMR

^{13}C -DEPT-HMQCs von VDA-008



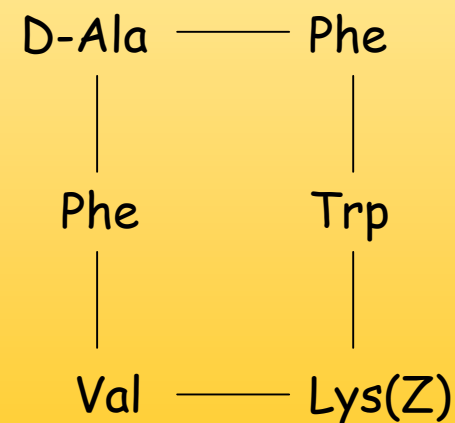
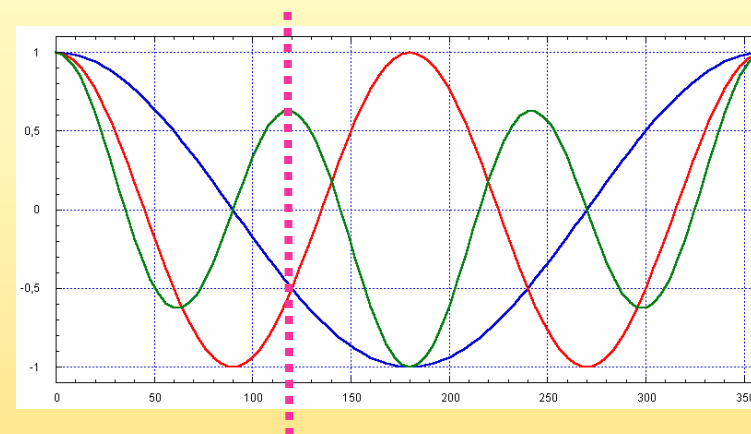
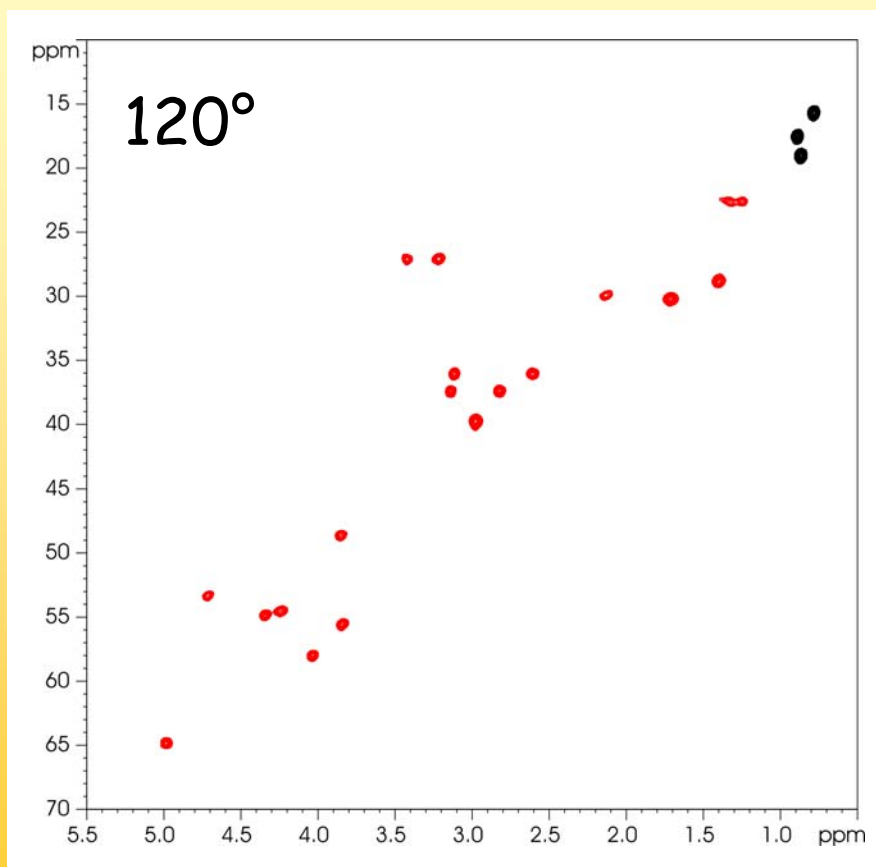
Peptide: Heteronukleare NMR

^{13}C -DEPT-HMQCs von VDA-008



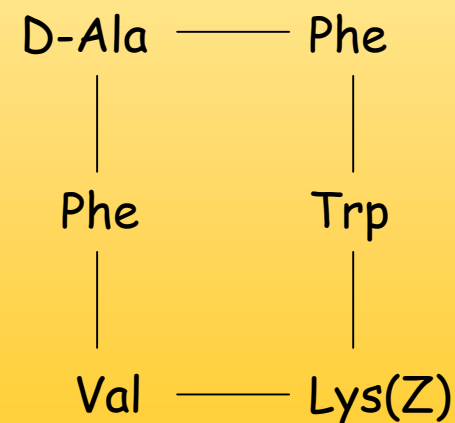
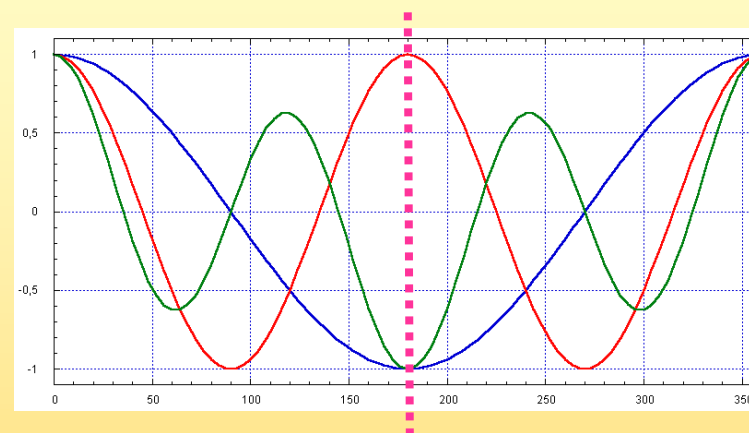
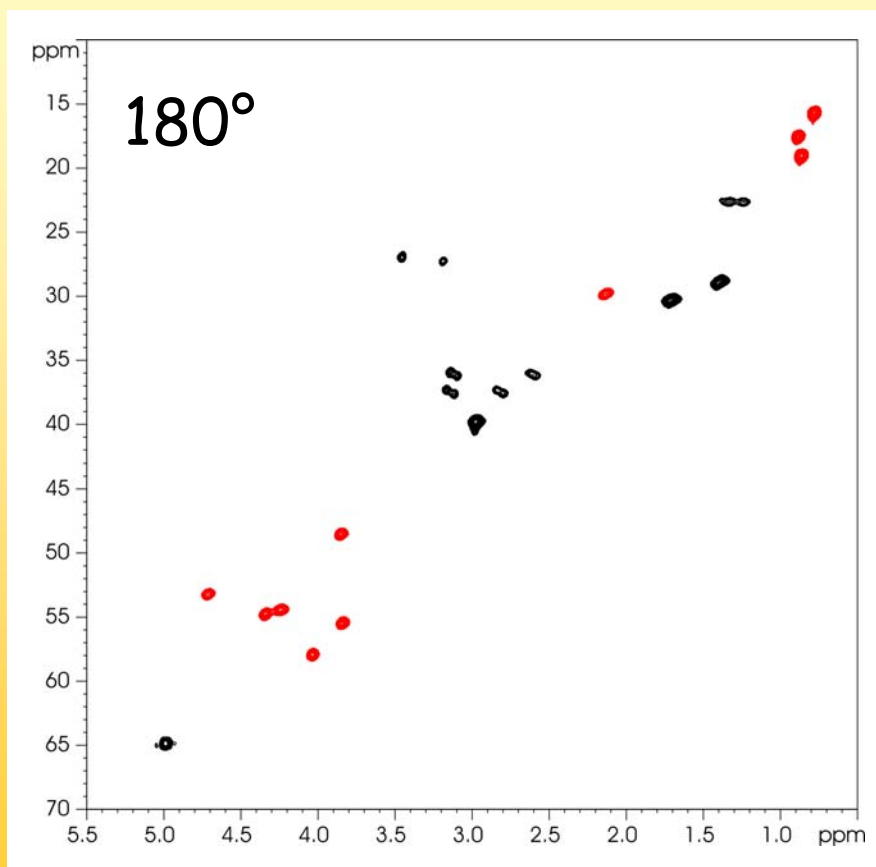
Peptide: Heteronukleare NMR

^{13}C -DEPT-HMQCs von VDA-008



Peptide: Heteronukleare NMR

^{13}C -DEPT-HMQCs von VDA-008



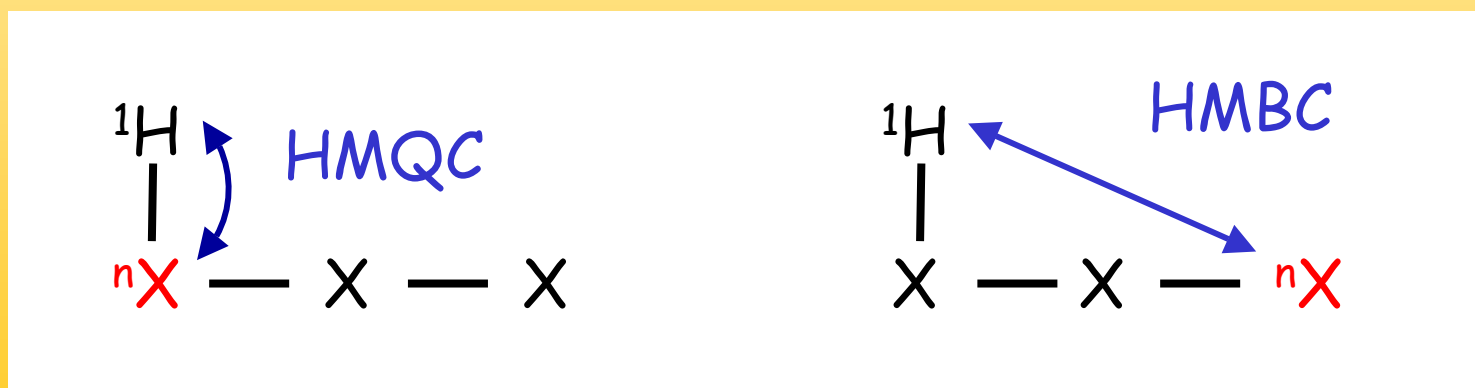
Das HMBC bei Peptiden

Sequentielle Zuordnung

Peptide: Heteronukleare NMR

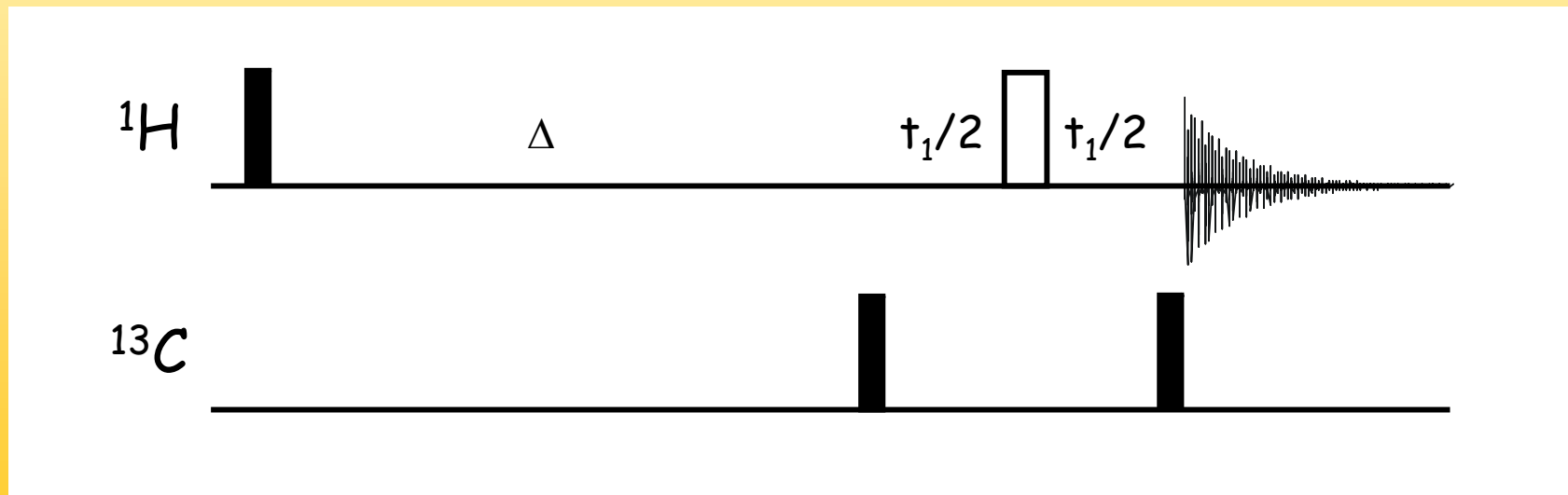
Alle bislang vorgestellten heteronuklearen Experimente basierten auf dem Vorliegen einer direkten ^1H -X-Kopplung.

X-Kerne, die kein Proton tragen, werden nicht detektierbar sein. Dazu muss man sich wieder der Weitbereichskopplungen bedienen, das Experiment der Wahl ist dann das HMBC

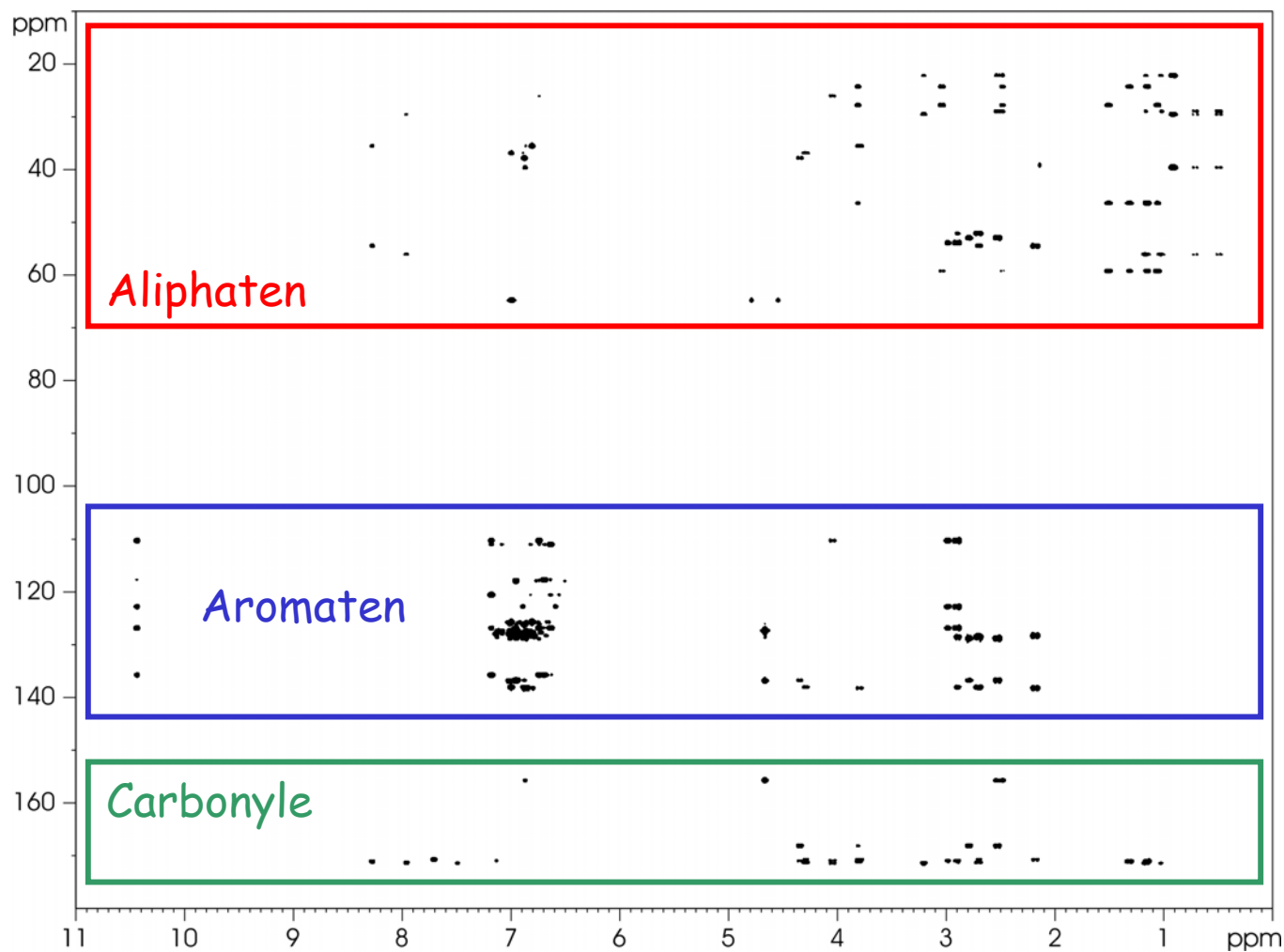


Peptide: Heteronukleare NMR

Beim HMBC wird eine lange Wartezeit zur Entwicklung der meist kleineren Weitbereichskopplung gewählt, die heteronukleare Kopplung wird nicht refocussiert und es muss eine Magnitude-Rechnung durchgeführt werden.



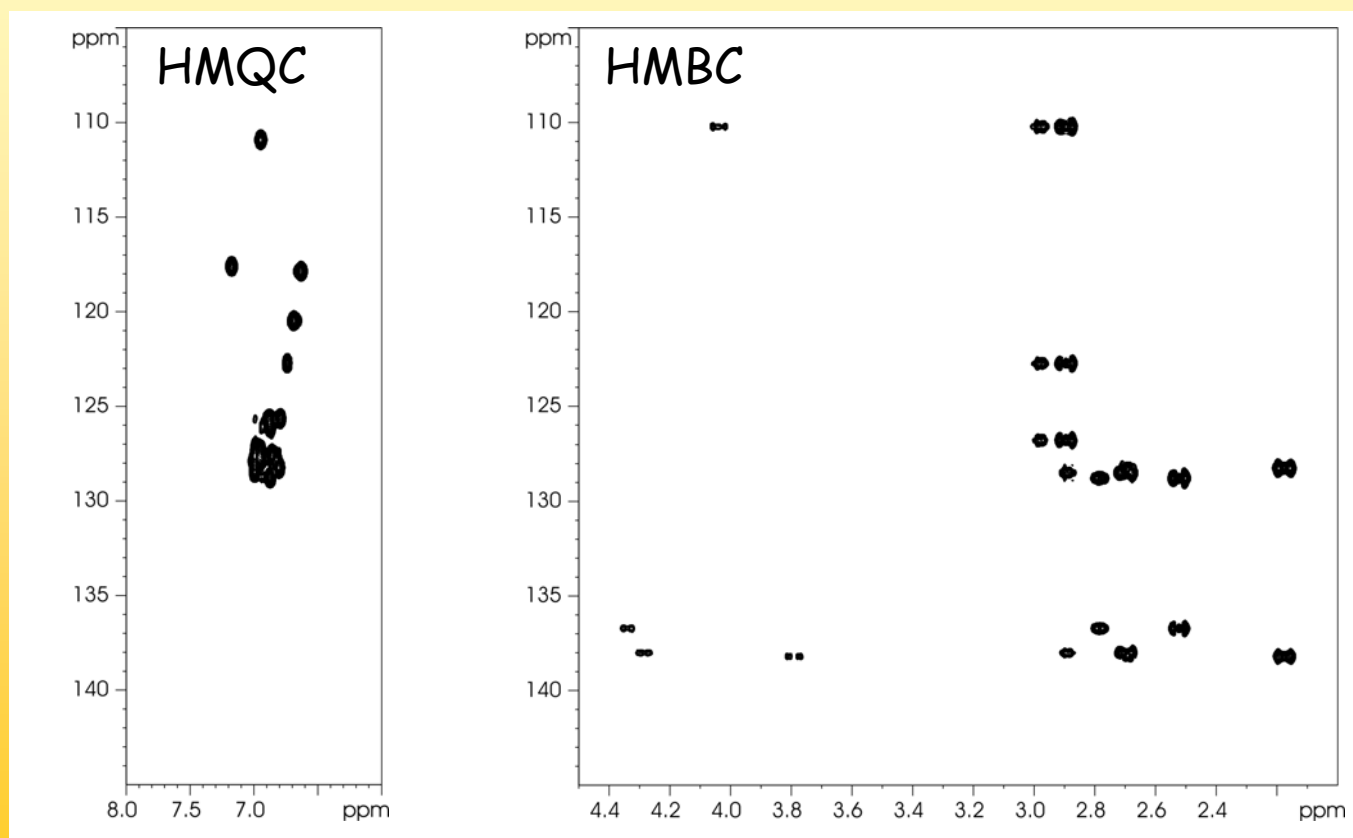
Peptide: Heteronukleare NMR



^{13}C -HMBC
von F3-008

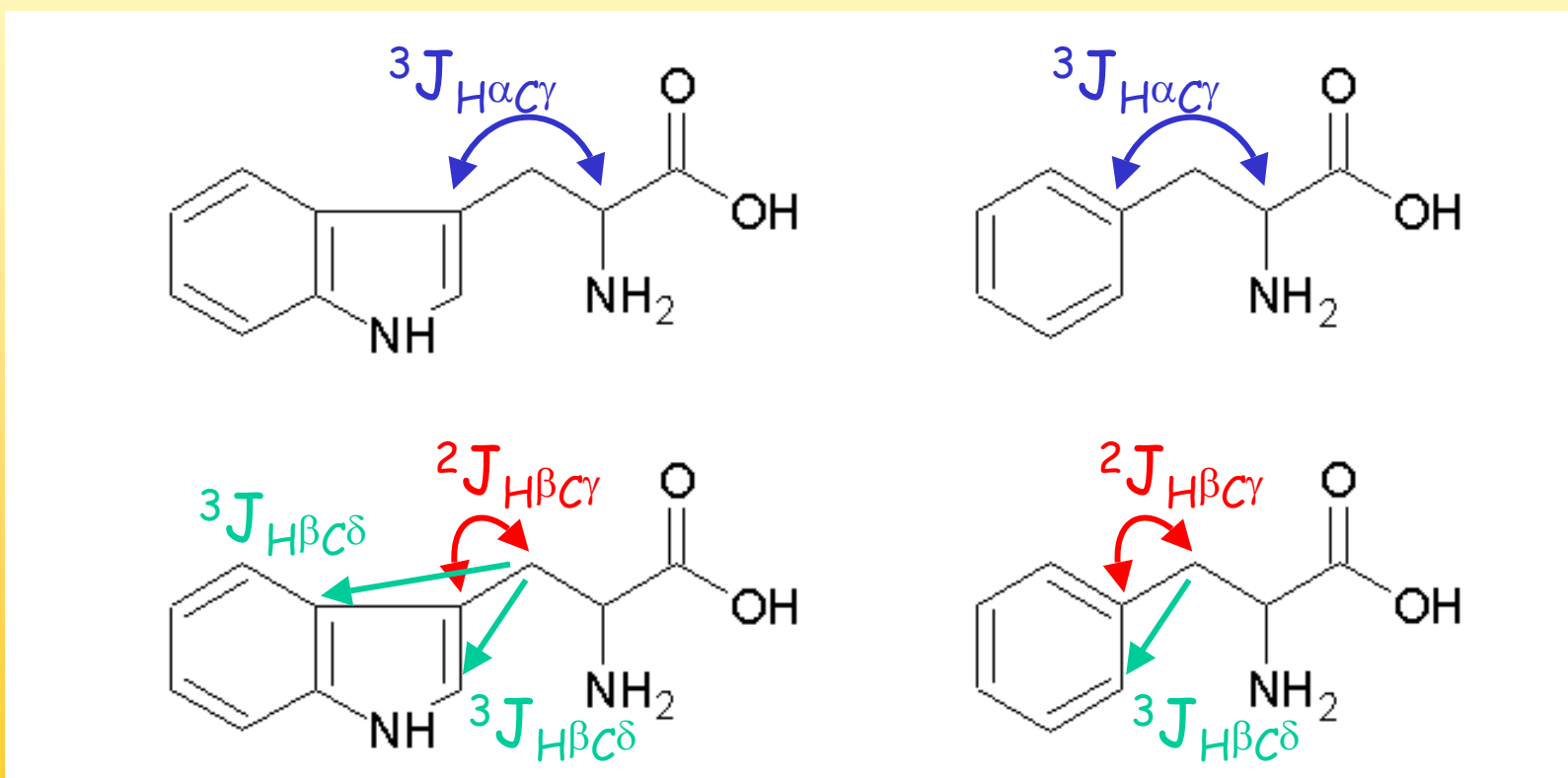
Peptide: Heteronukleare NMR

Der Aromatenbereich des ^{13}C -HMBC dient zur Zuordnung von quartären Kohlenstoff in den aromatischen Ringen



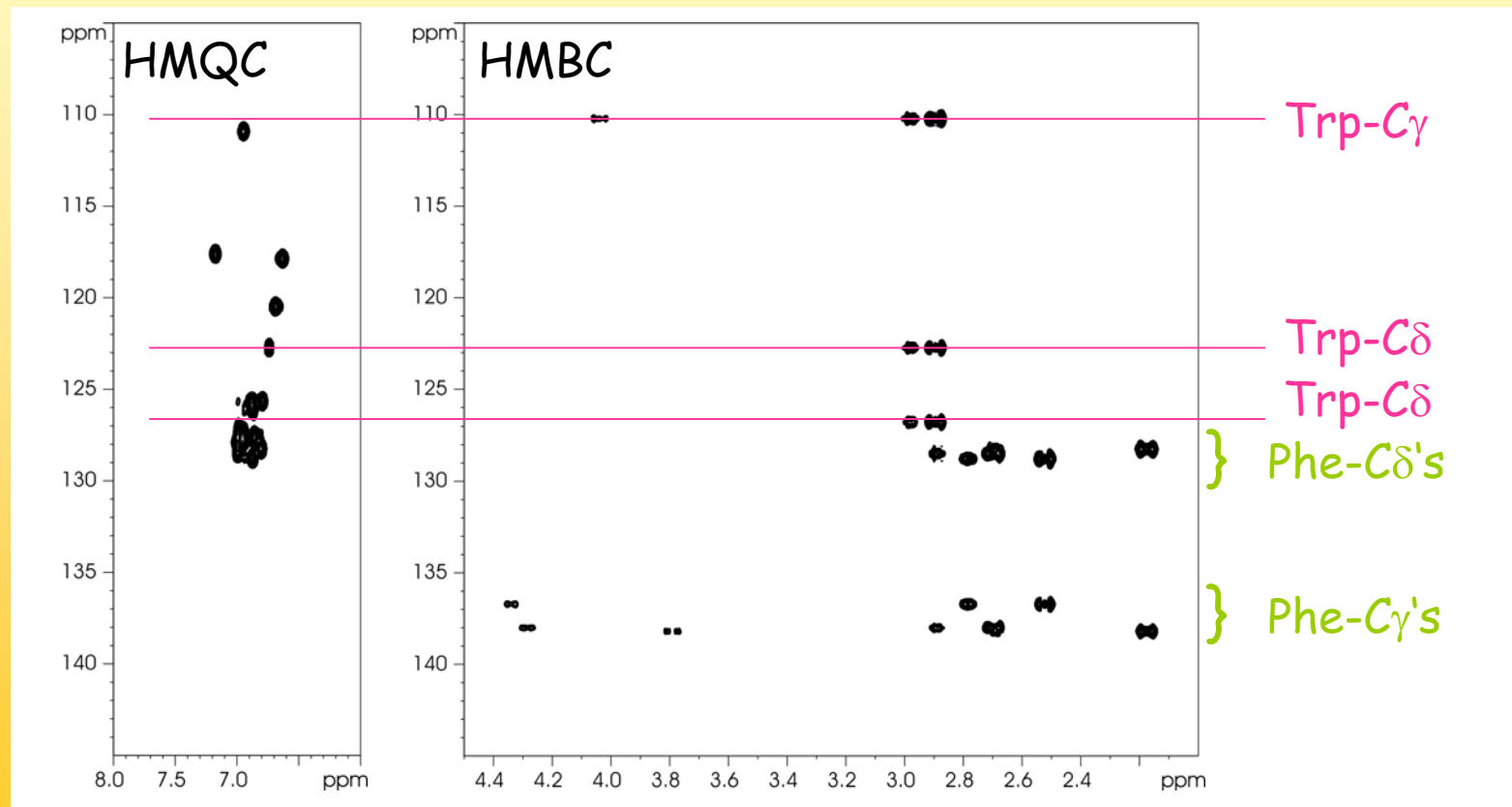
Peptide: Heteronukleare NMR

Im Falle von unserem Modellpeptid, F3-008, gibt es Tryptophan und Phenylalanin



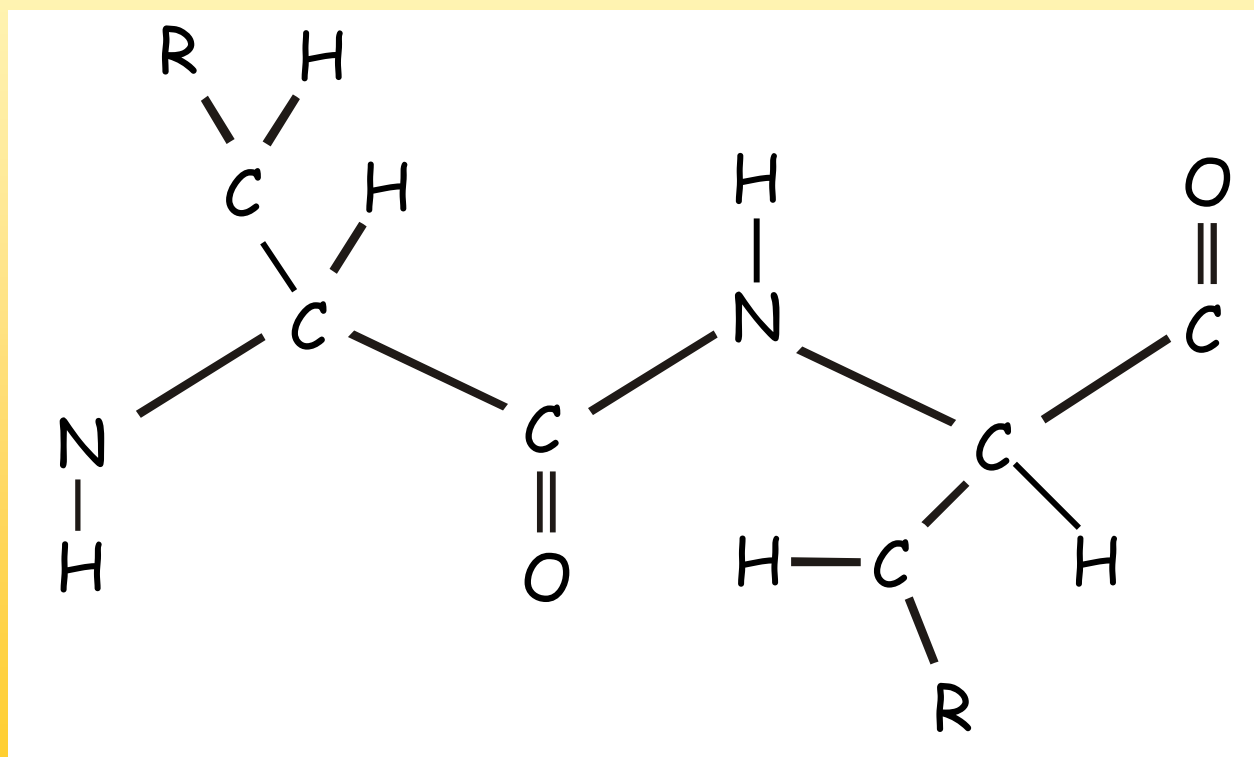
Peptide: Heteronukleare NMR

Die Zuordnungen von quartären Kohlenstoffstoffen in den aromatischen Ringen lassen sich dann leicht ableiten



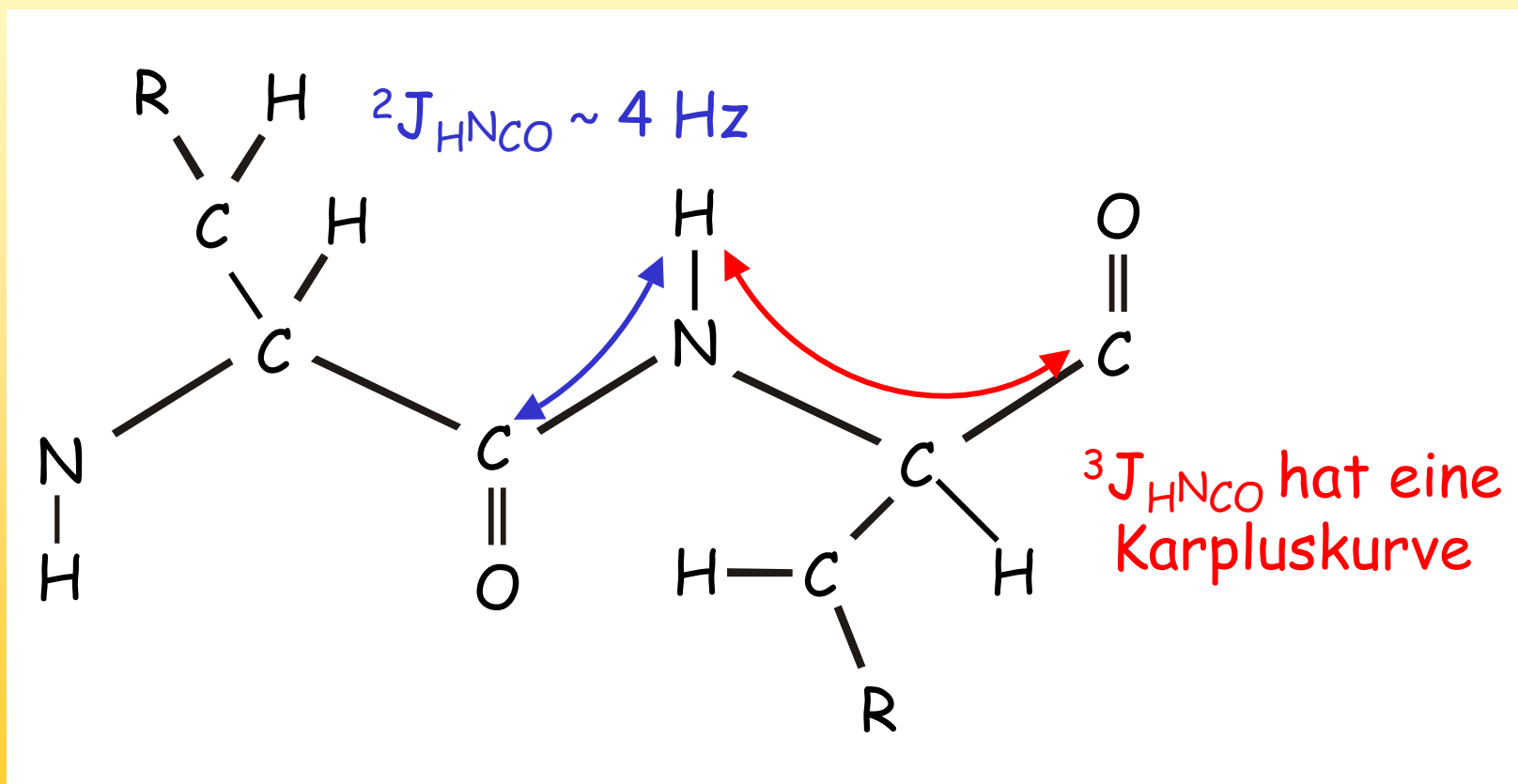
Peptide: Heteronukleare NMR

Noch wichtiger ist aber das HMBC bei Peptiden im Zusammenhang mit den Carbonyl-Kohlenstoffen
Wie groß sind denn hier die Kopplungskonstanten ?



Peptide: Heteronukleare NMR

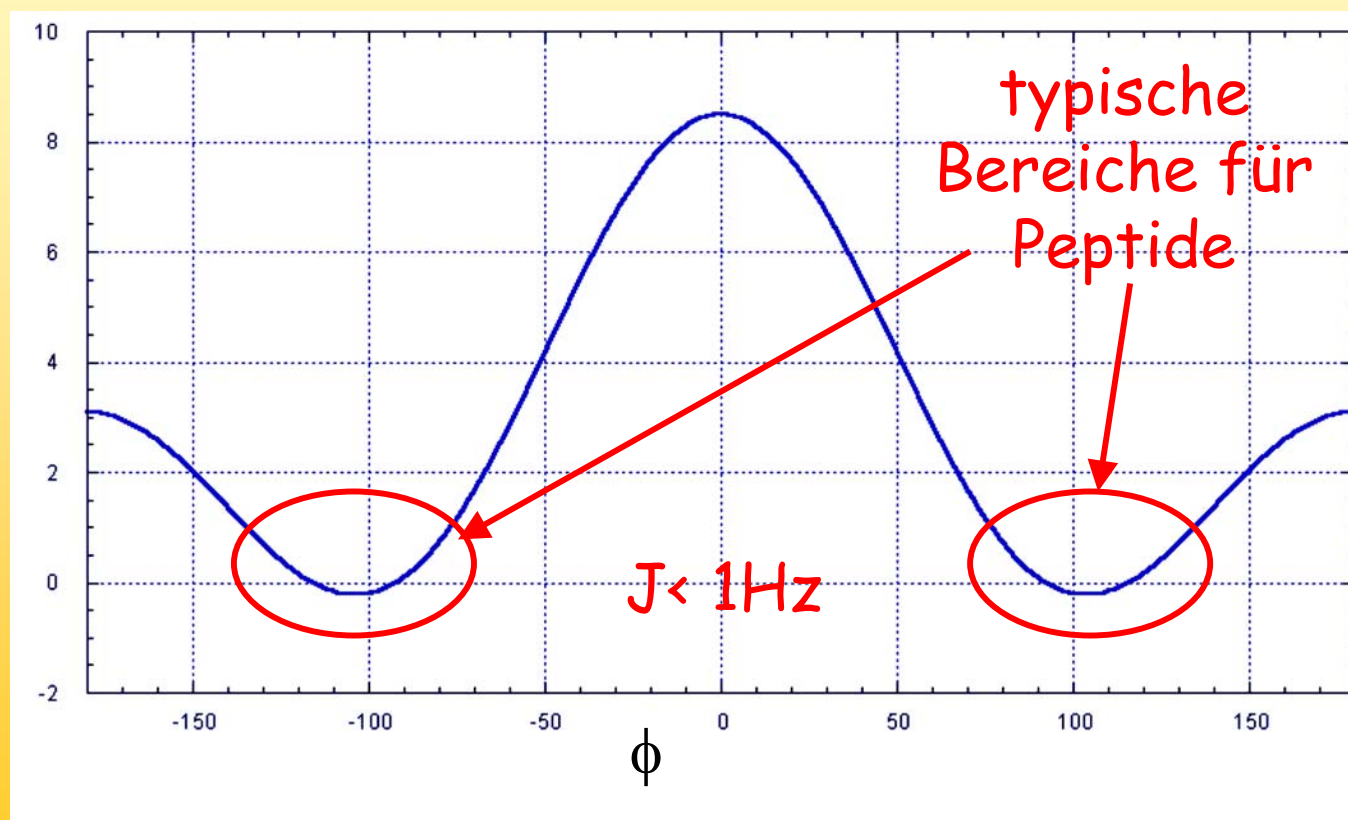
Die Kopplungskonstanten ausgehend vom Aminoproton



Peptide: Heteronukleare NMR

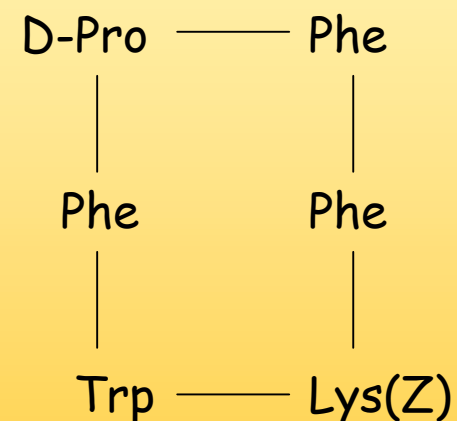
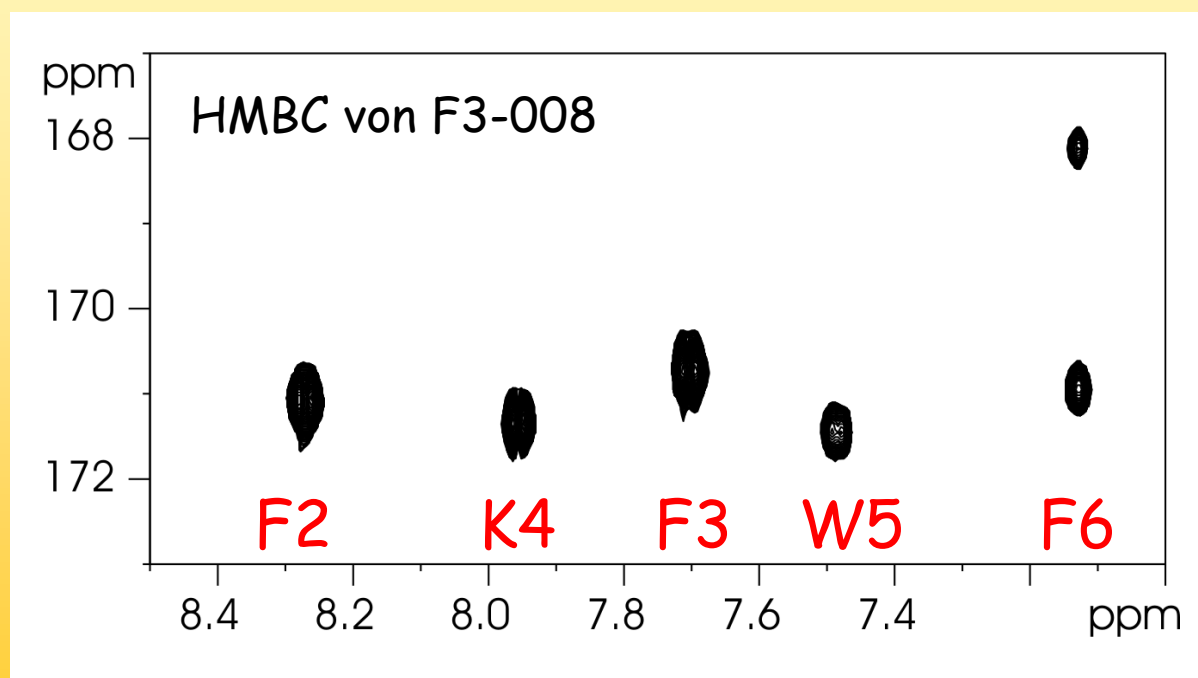
Die Karpluskurve für ${}^3J_{\text{HNCO}}$ hat die Gleichung

$${}^3J_{\text{HNCO}} = 5.7 \cos^2(\phi - 180) - 2.7 \cos(\phi - 180) + 0.1$$



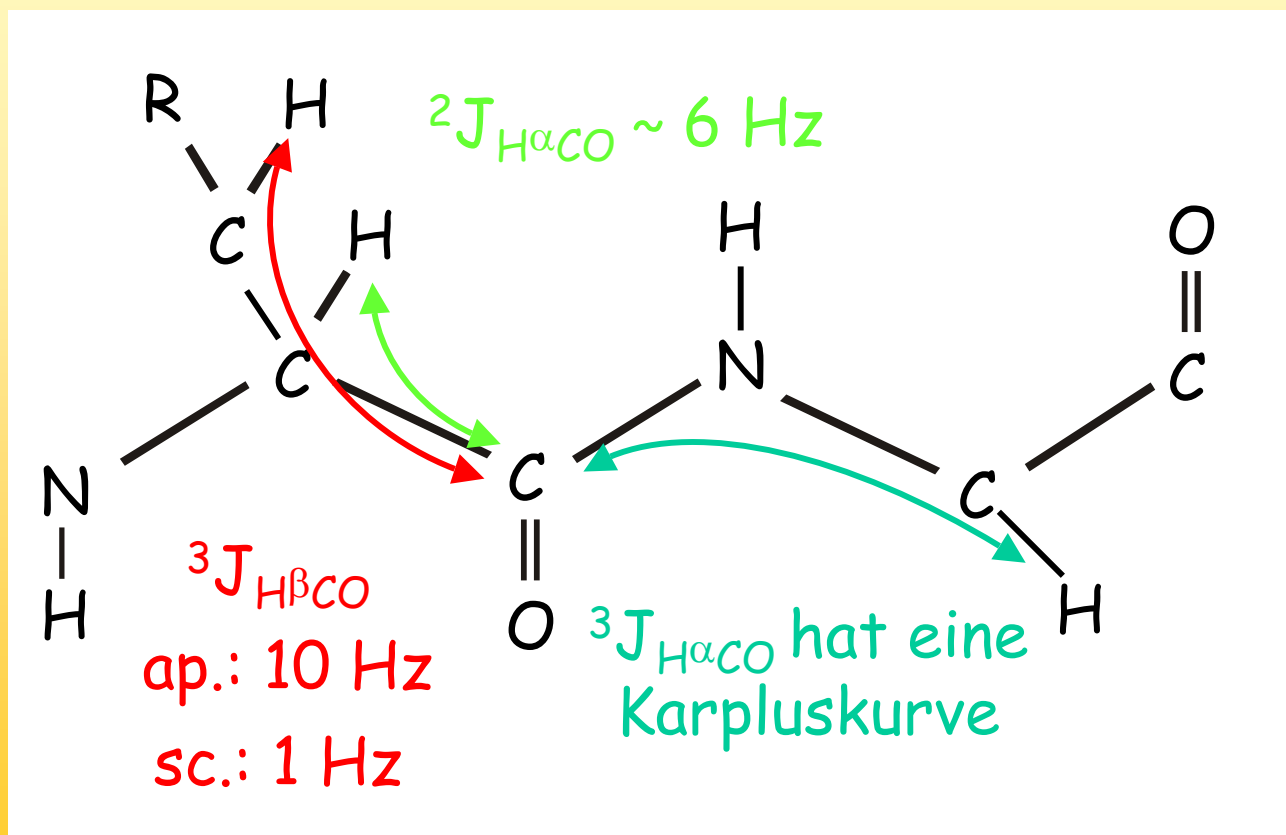
Peptide: Heteronukleare NMR

Der Bereich der Aminoprotonen sieht dann so aus, alle Korrelationen via 2J sind zu sehen, nur eine via 3J , die kommt von F6



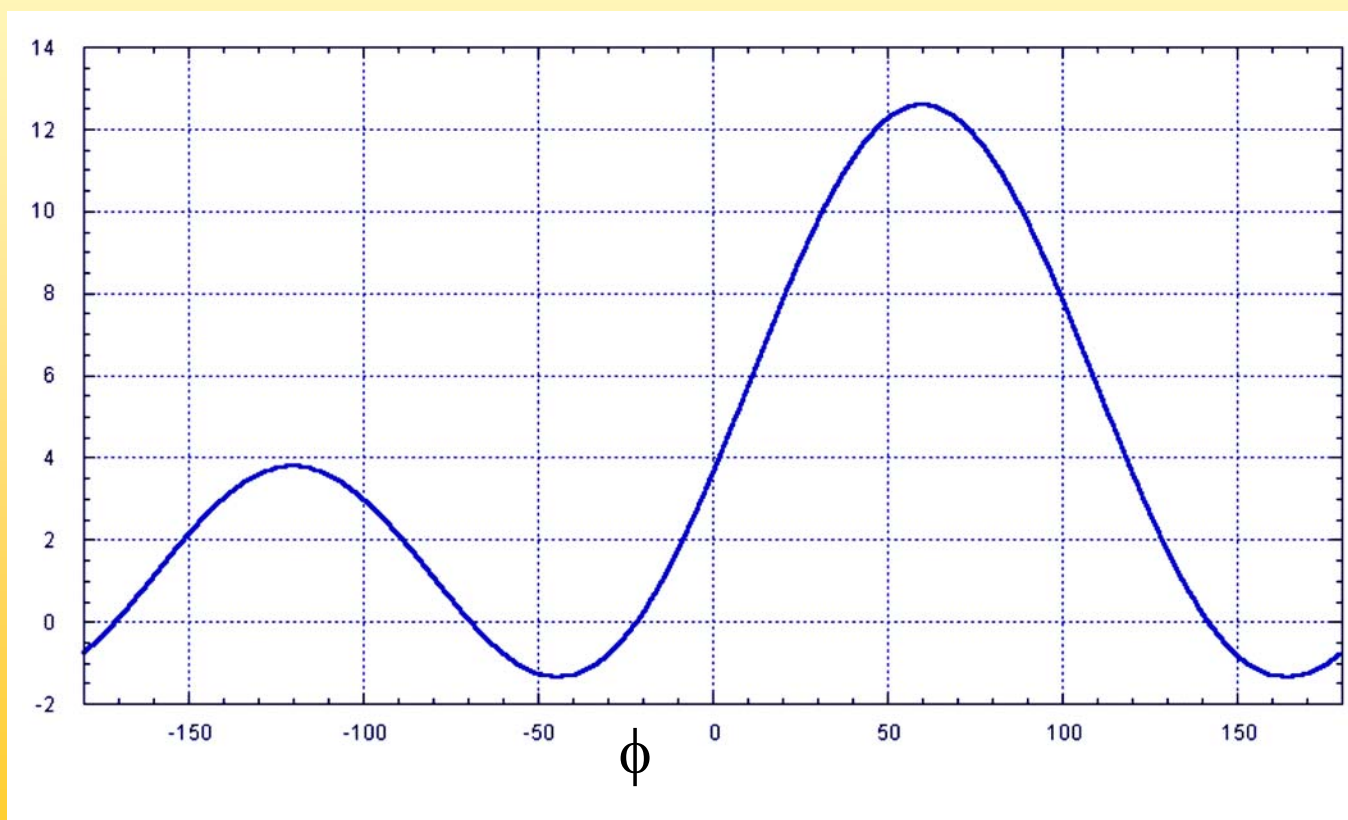
Peptide: Heteronukleare NMR

Die Kopplungskonstanten ausgehend von aliphatischen Protonen



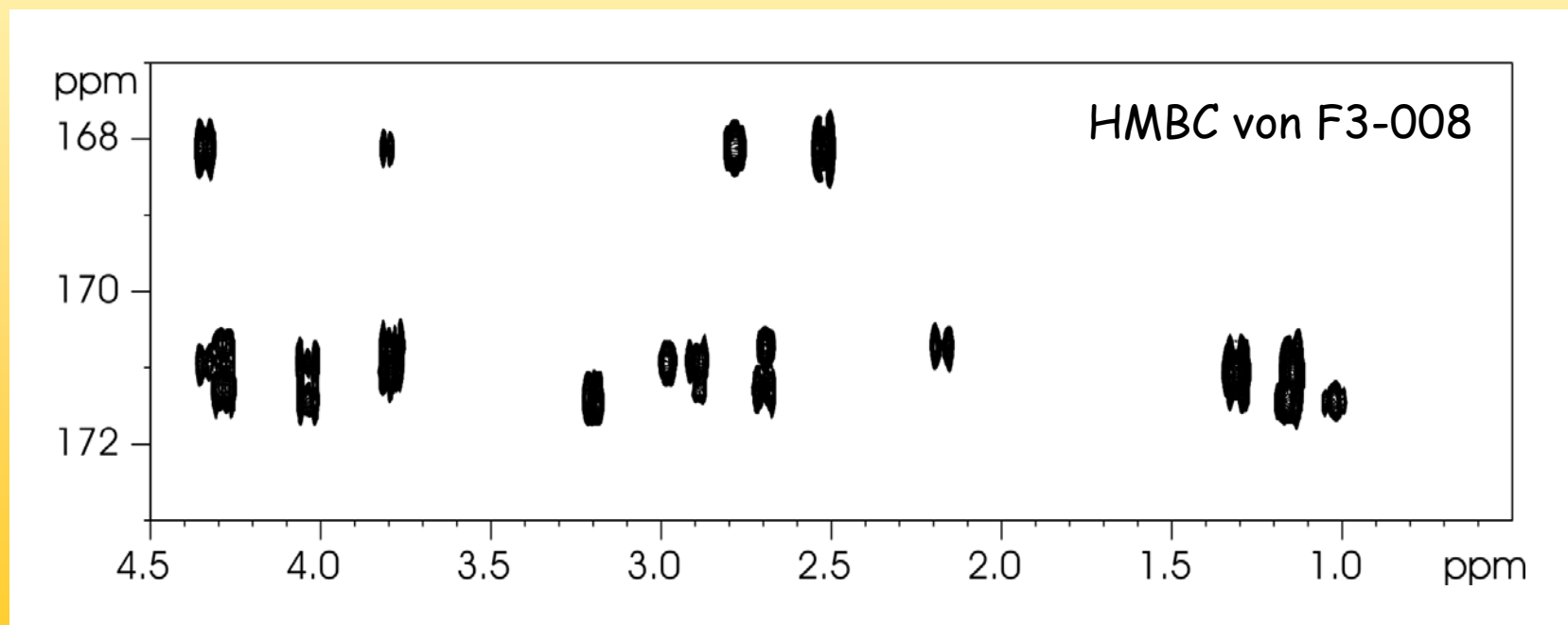
Peptide: Heteronukleare NMR

Die Karpluskurve für $^3J_{H^{\alpha}CO}$ hat die Gleichung

$$^3J_{H^{\alpha}CO} = 9.0 \cos^2(\phi + 120) - 4.4 \cos(\phi + 120) - 0.8$$


Peptide: Heteronukleare NMR

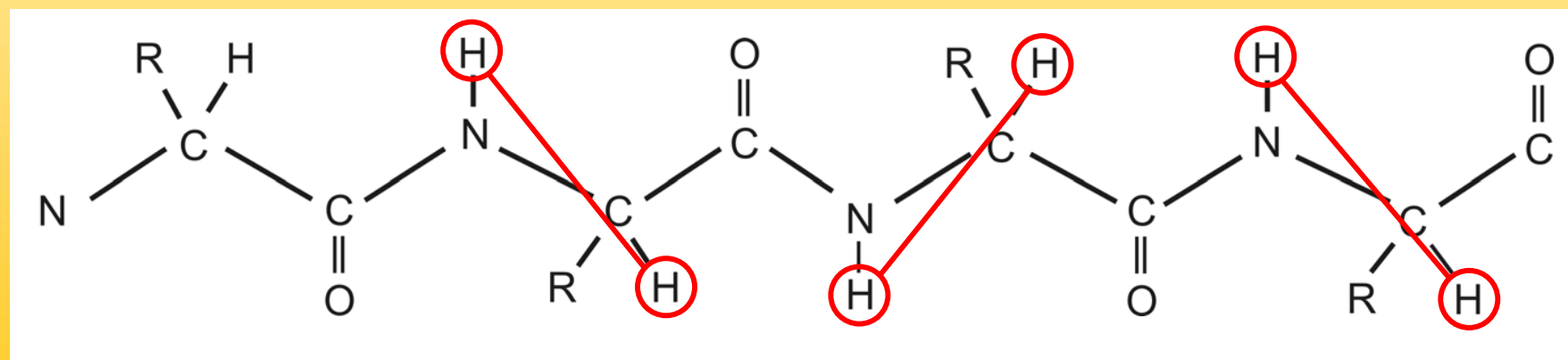
Der Bereich der aliphatischen Protonen sieht dann so aus, alle H^α außer K4 zeigen 2 Korrelationen, es ist auch für jedes H^β eine Korrelation zu sehen, damit kann man die Carbonyle eindeutig einer Aminosäure zuordnen



Peptide: Heteronukleare NMR

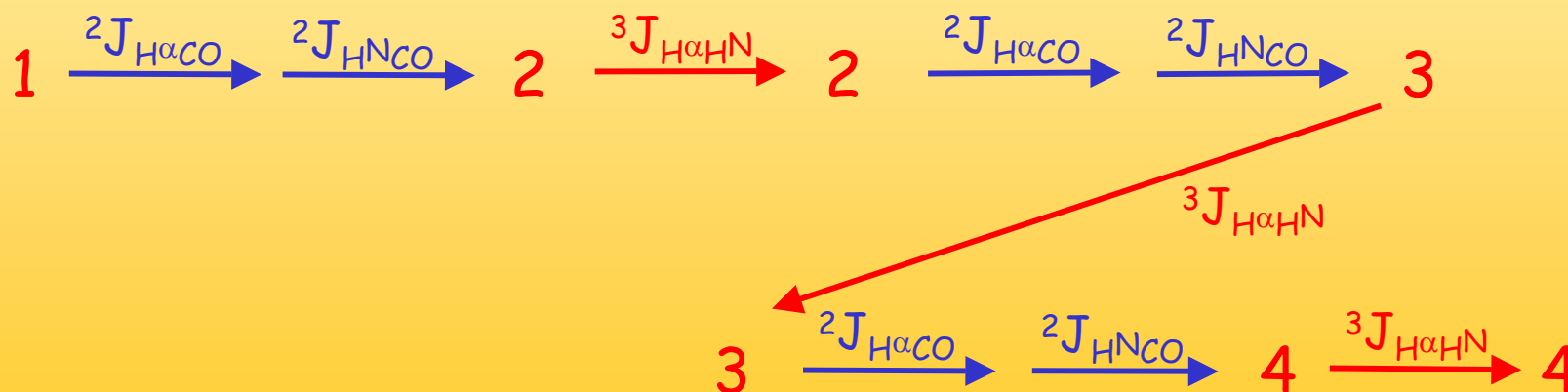
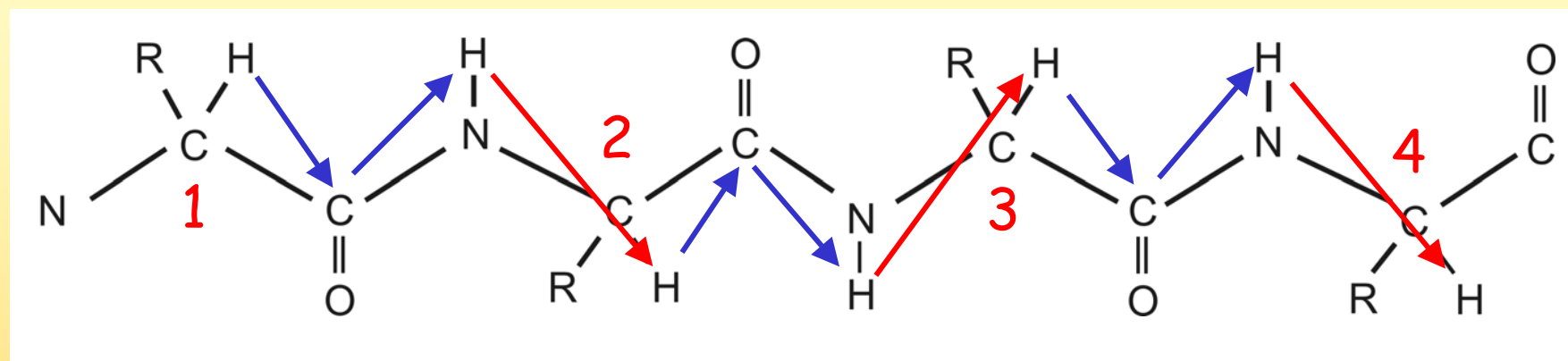
Basierend auf diesen Kopplungskonstanten kann man im HMBC nicht nur die Carbonyl-Kohlenstoffe zuordnen sondern auch eine sequentielle Zuordnung machen.

Wegen der kleinen Kopplungskonstante zwischen H^N und dem eigenen Carbonyl, nimmt man noch das DQF-COSY mit dazu, dass eine Korrelation von H^N zu H^α bietet.



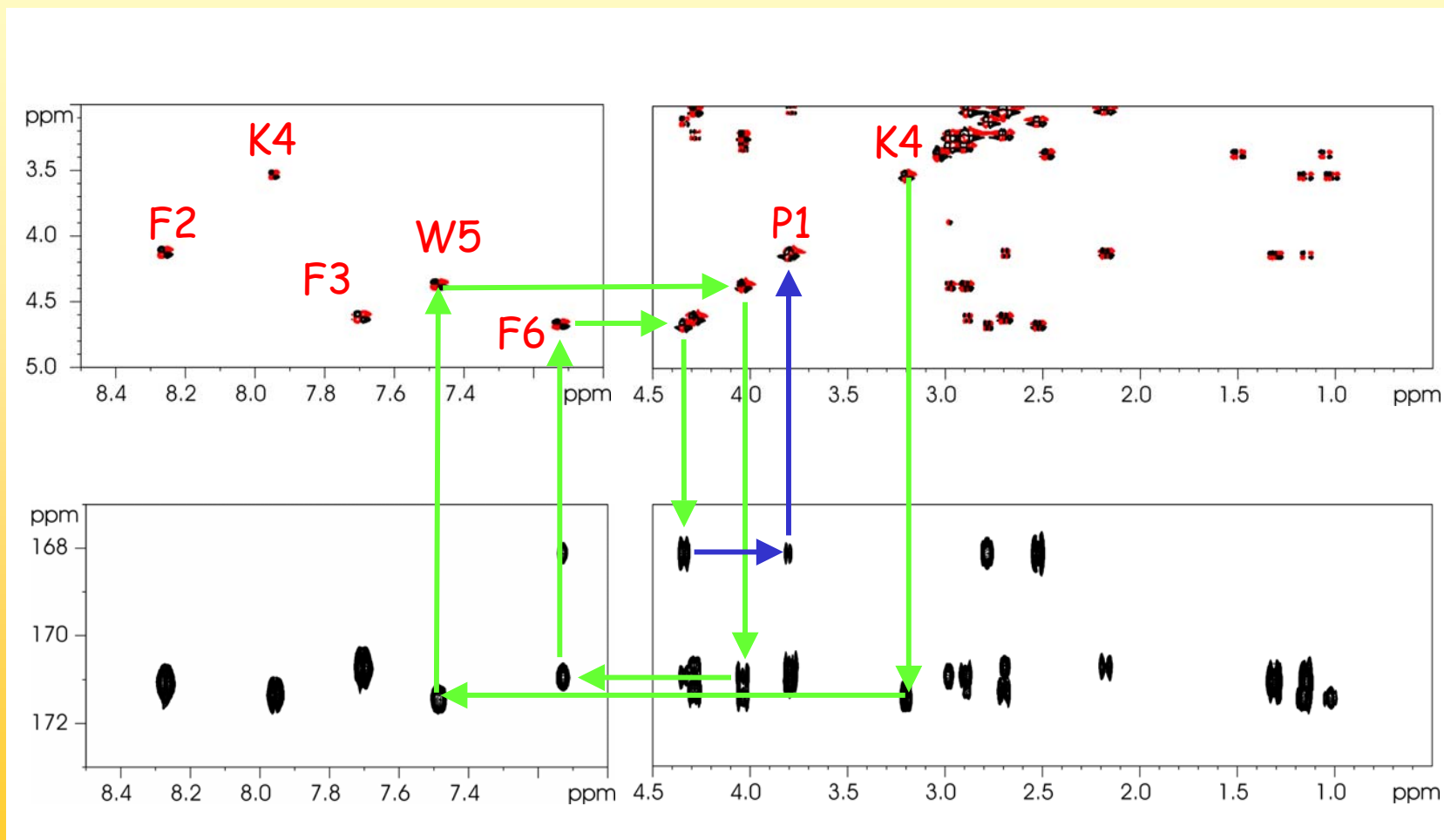
Peptide: Heteronukleare NMR

Damit ergibt sich ein neuer „sequential walk“



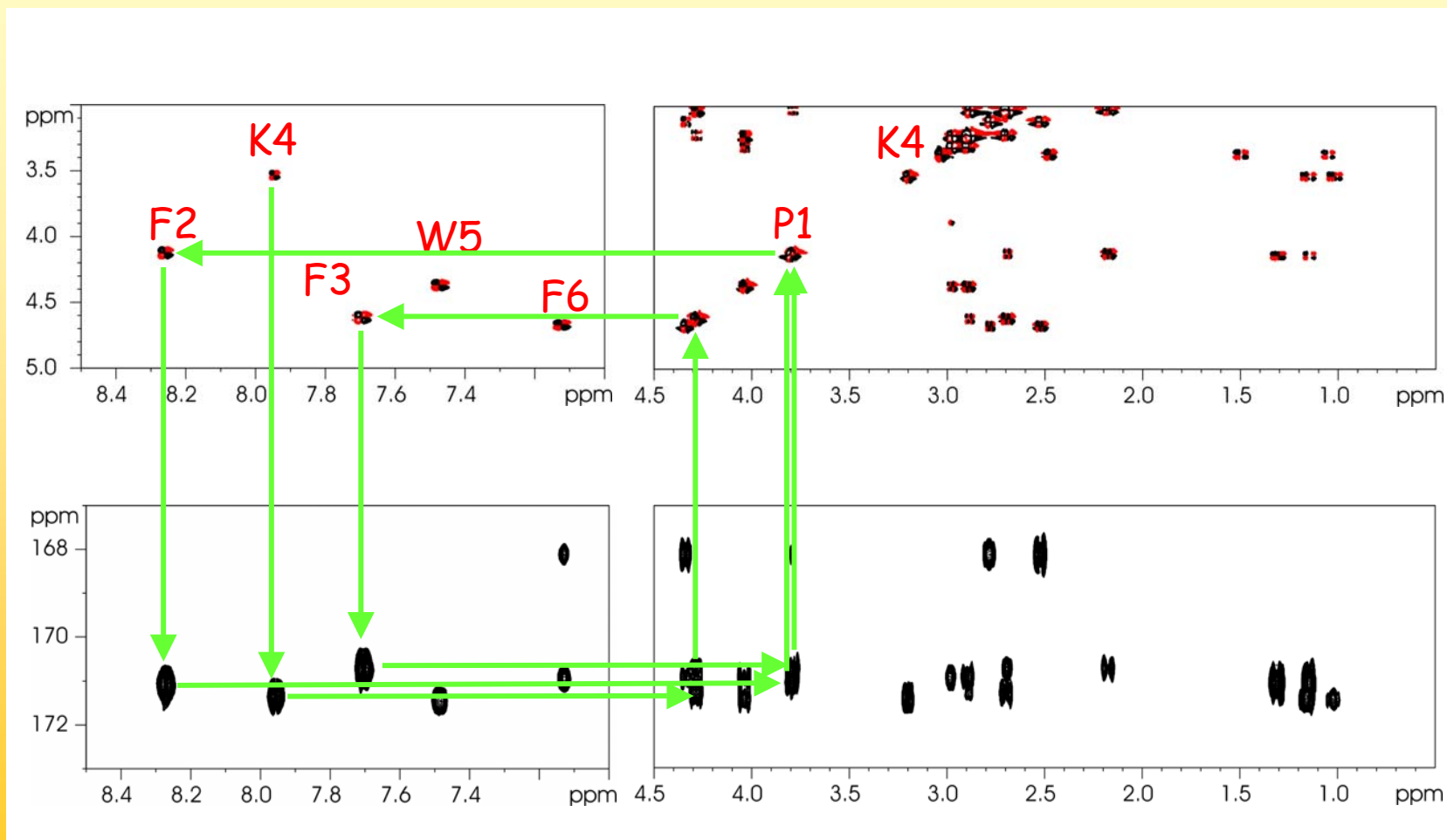
Peptide: Heteronukleare NMR

Mit richtigen Spektren sieht das so aus



Peptide: Heteronukleare NMR

Von K4 in die andere Richtung



Peptide: Heteronukleare NMR

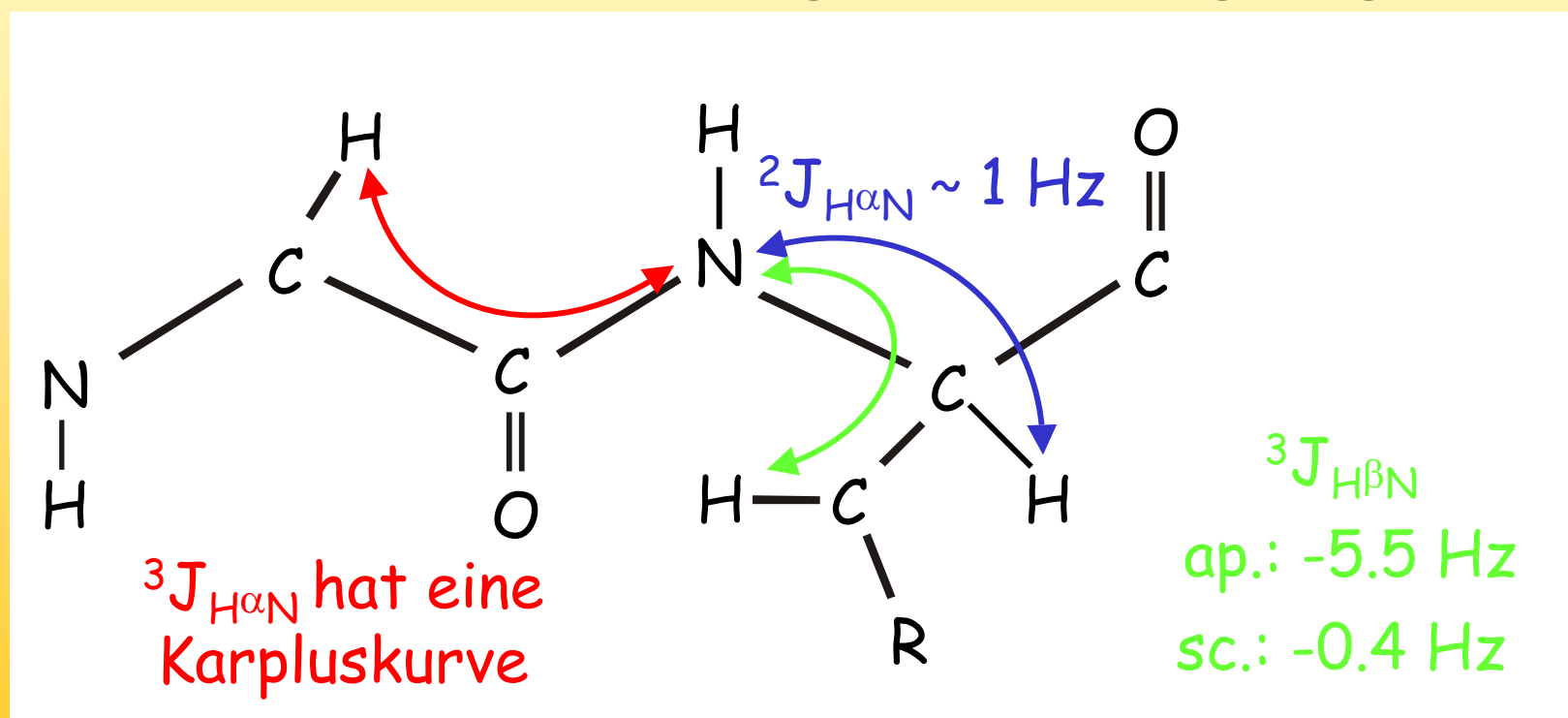
Die sequentielle Zuordnung über das HMBC hat den Vorteil von Abständen durch den Raum unabhängig zu sein.

Es können nur Signale der benachbarten Aminosäuren auftauchen während beim NOESY je nach Struktur viel Aminosäuren als Signalpartner möglich sind.

Nachteil ist die schlechtere Empfindlichkeit der HMBC und die schlechte Signaldispersion im Bereich der Carbonylsignale, die nur über wenige ppm verteilt liegen

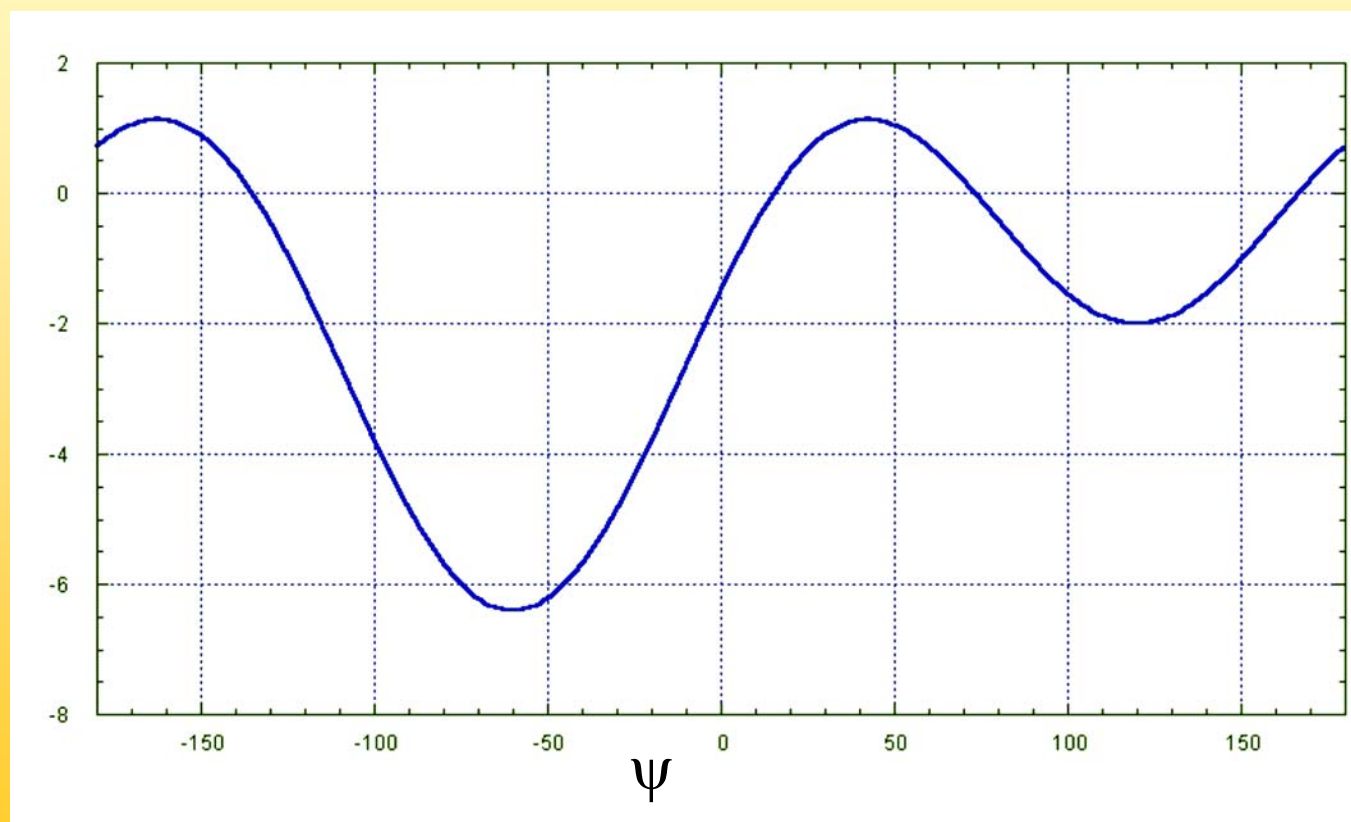
Peptide: Heteronukleare NMR

Ein HMBC kann auch mit ^{15}N als Heterokern aufgenommen werden, allerdings sind die Kopplungen meist sehr klein und die natürliche Häufigkeit ist sehr gering



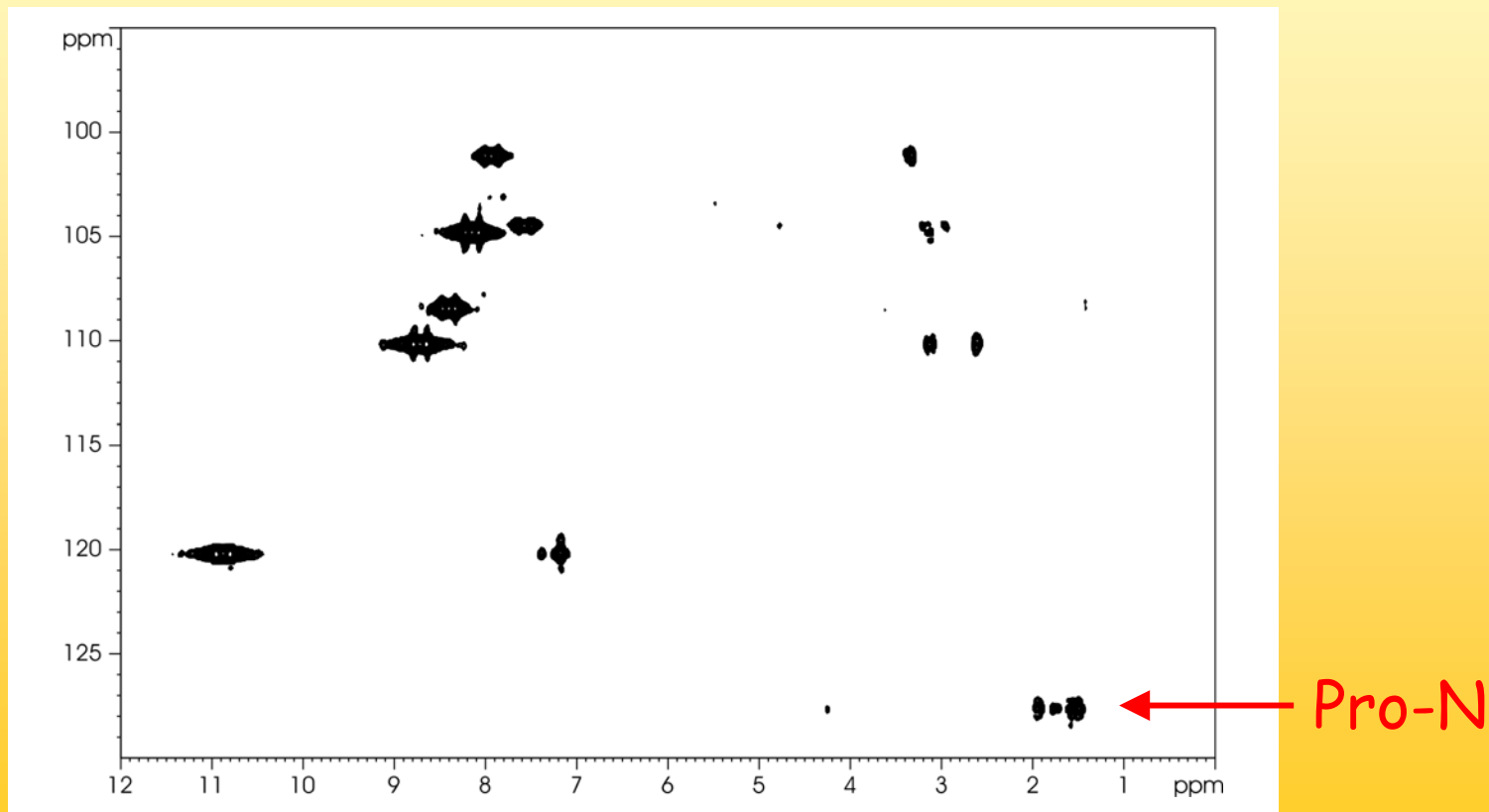
Peptide: Heteronukleare NMR

Die Karpluskurve für $^3J_{H\alpha N}$ hat die Gleichung

$$^3J_{H\alpha N} = -5.1 \cos^2(\psi - 120) + 2.2 \cos(\psi - 120) + 0.9$$


Peptide: Heteronukleare NMR

Die meisten Stickstoffatome sind ja schon zugeordnet, hier findet man nun auch das von Prolin, das S/N ist wie zu erwarten schlecht



Zusammenfassung

Was haben wir uns heute angeschaut:

Heteronukleare NMR an Peptiden

HMQC, HMQC-TOCSY, HMQC-COSY

DEPT-HMQC

HMBC

Sequentielle Zuordnung mit dem HMBC

That's it for today

Nächstes Mal:
Bestimmung von Kopplungskonstanten
am Beispiel von Peptiden