

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

Das Programm

Beim letztes Mal

Methoden zur Bestimmung
von skalaren Kopplungskonstanten

Das Programm

Heute

Das „dynamic range“ Problem

Proteine

HSQC

3D- und 4D-NMR

^{15}N -editierte Spektren

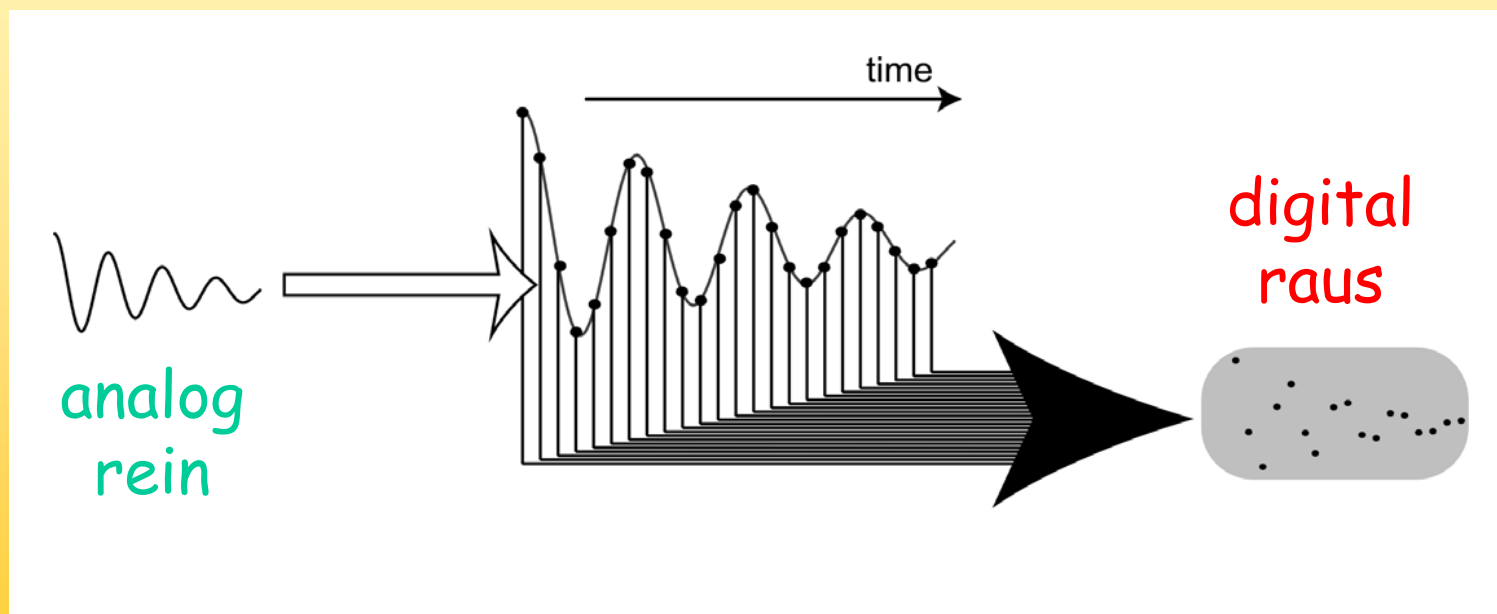
Kopplungskonstanten mit dem HSQC

Liganden-Screening mit dem HSQC

Das „dynamic range“ Problem

Das „dynamic range“ Problem

Wir haben ja schon gesehen, dass das Signal für die Auswertung digitalisiert wird, also in binäre Zahlen verwandelt wird.



Das „dynamic range“ Problem

2^{16}
2^{15}
2^{14}
2^{13}
2^{12}
2^{11}
2^{10}
2^9
2^8
2^7
2^6
2^5
2^4
2^3
2^2
2^1
2^0

Der ADC (Analog-Digital-Converter) hat bei einem modernen Spektrometer 16 bis 18 Bit. Der Empfänger, der das Signal aufnimmt, das später digitalisiert wird, muss so eingestellt werden, dass das größte Signal durch diese bits angemessen dargestellt wird.

Das „dynamic range“ Problem

2^{16}
2^{15}
2^{14}
2^{13}
2^{12}
2^{11}
2^{10}
2^9
2^8
2^7
2^6
2^5
2^4
2^3
2^2
2^1
2^0

Das größte Signal wird das vom Lösungsmittel sein, das es ja in sehr hoher „Konzentration“ vorliegt.

H₂O (18 g/mol), Dicht 1.0, 55 mol/ltr

CHCl₃ (119 g/mol), Dicht 1.5, 12 mol/ltr

DMSO (78 g/mol), Dicht 1.1, 14 mol/ltr

Das „dynamic range“ Problem

2^{16}
2^{15}
2^{14}
2^{13}
2^{12}
2^{11}
2^{10}
2^9
2^8
2^7
2^6
2^5
2^4
2^3
2^2
2^1
2^0

Die Substanzen liegen aber u.U. nur mit eine Konzentration von 1 mM vor, d.h. in wässriger Lösung ist 55 000 mal soviel Lösungsmittel wie Substanz.

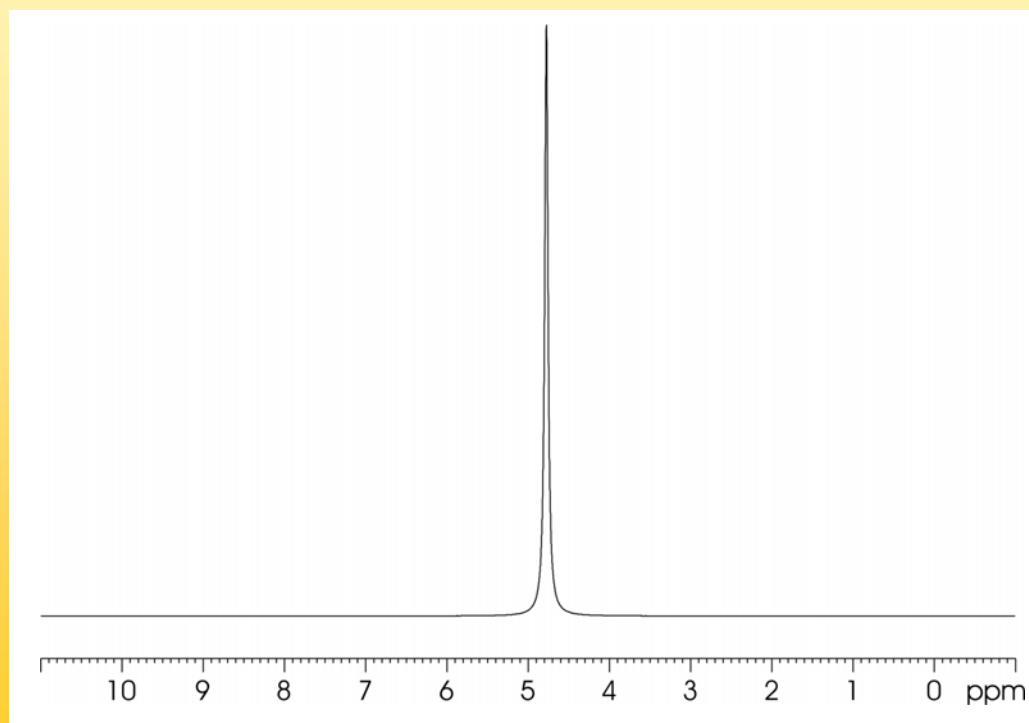
$$2^{16} = 65536$$

Wird also das Signal des Lösungsmittels gut digitalisiert, dann findet man das Substanzsignal zusammen mit dem Rauschen im untersten Bit

Das „dynamic range“ Problem

In einem Spektrum eines Proteins in wässriger Lösung sieht man nur schwer das Protein

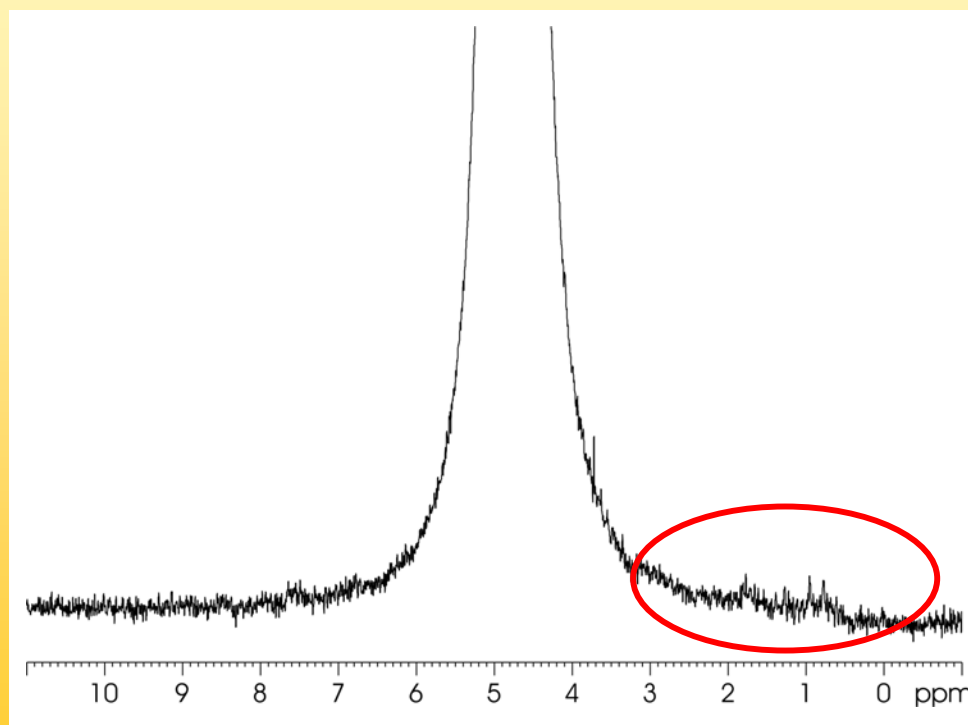
2^{16}
2^{15}
2^{14}
2^{13}
2^{12}
2^{11}
2^{10}
2^9
2^8
2^7
2^6
2^5
2^4
2^3
2^2
2^1
2^0



Das „dynamic range“ Problem

2^{16}
2^{15}
2^{14}
2^{13}
2^{12}
2^{11}
2^{10}
2^9
2^8
2^7
2^6
2^5
2^4
2^3
2^2
2^1
2^0

Man muss es sehr vergrößern, doch Proteinsignale sind nah am Rauschen



Das „dynamic range“ Problem

2^{16}
2^{15}
2^{14}
2^{13}
2^{12}
2^{11}
2^{10}
2^9
2^8
2^7
2^6
2^5
2^4
2^3
2^2
2^1
2^0

Das Lösungsmittelsignal muss also entfernt werden.

Eine Vorgehensweise ist die Deuterierung des Lösungsmittels. Ist DMSO zu 99.97 % deuteriert entspricht das einer Protonenkonzentration 4 mM, das sind nur noch 2^2

Das „dynamic range“ Problem

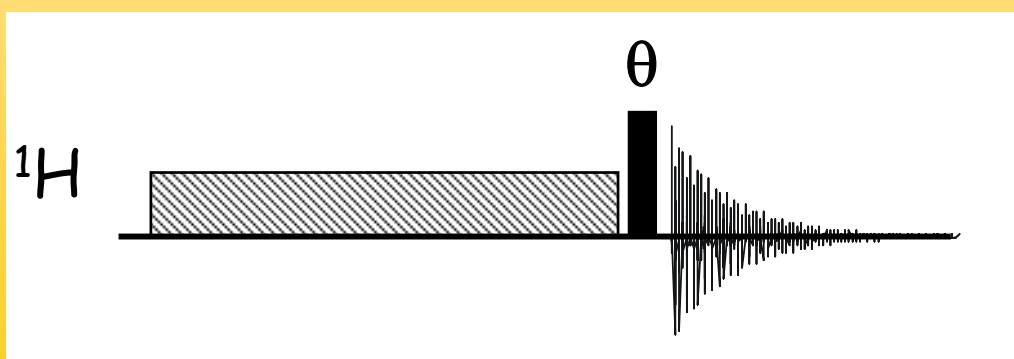
2^{16}
2^{15}
2^{14}
2^{13}
2^{12}
2^{11}
2^{10}
2^9
2^8
2^7
2^6
2^5
2^4
2^3
2^2
2^1
2^0

Allerdings funktioniert das nicht wenn Lösungsmittel und Substanz austauschbare Protonen haben. CHCl_3 kann problemlos durch CDCl_3 ersetzt werden, H_2O aber nicht durch D_2O und CH_3OH nur durch CD_3OH , sonst verschwinden austauschbare Protonen. In diesen Fällen muss man das starke Lösungsmittelsignal experimentell unterdrücken

Lösungsmittelunterdrückung

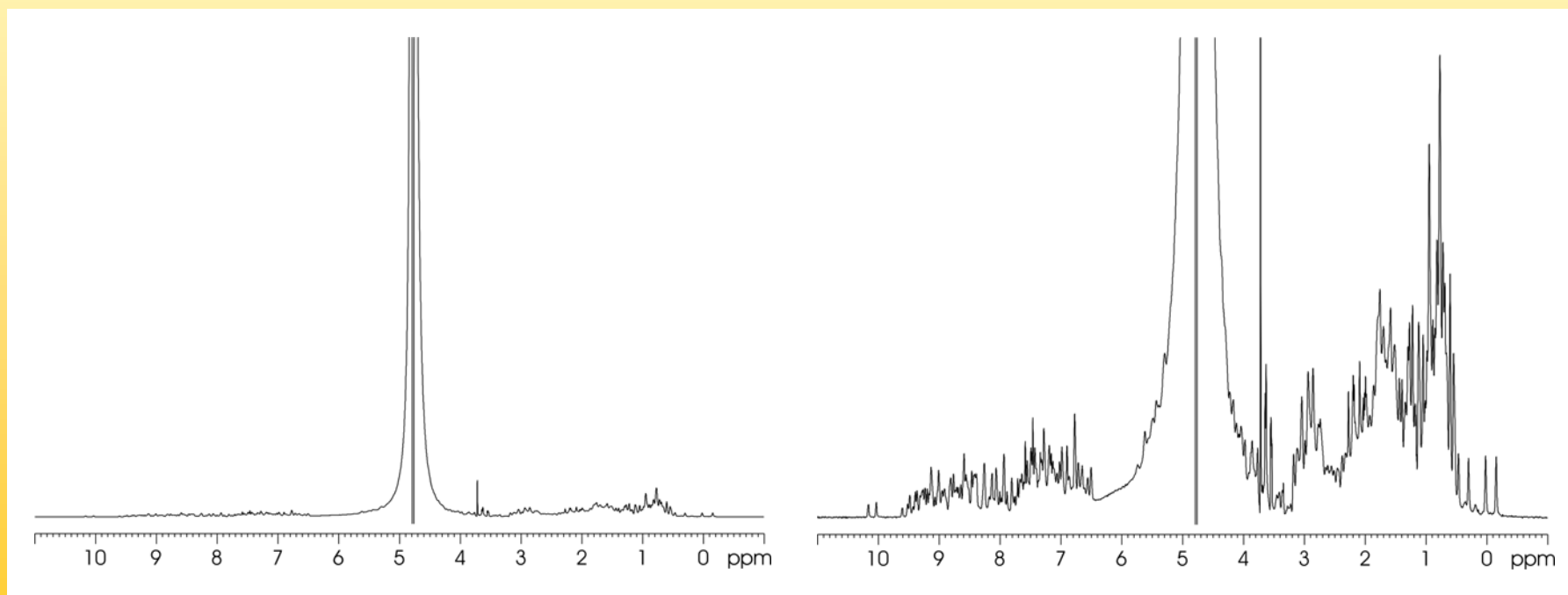
Lösungsmittelunterdrückung

Die einfachste und robusteste Lösungsmittelunterdrückung ist die „**Vorsättigung**“, bei der vor Beginn des eigentlichen Experiments mit einem langen, schwachen und daher sehr selektiven Puls auf das Lösungsmittel eingestrahlt wird. Das erfordert aber, dass die Spektrenmitte auf der Lösungsmittelfrequenz sitzt.



Lösungsmittelunterdrückung

Das Wasser verschwindet zwar nicht vollständig, aber das „dynamic range“ Problem wird überwunden



Lösungsmittelunterdrückung

Vorteile

Die Methode ist mit jedem NMR-Experiment kombinierbar

Man braucht keinen 90° -Puls zu kennen

Nachteile

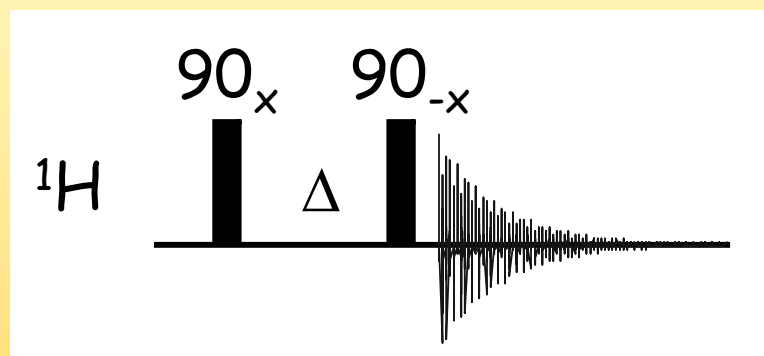
Das Restsignal kann bei ungünstigen Verhältnissen breit und groß sein

Die Sättigung kann sich auf austauschbare Protonen übertragen

Der Bereich der Einstrahlung ist vollständig gelöscht

Lösungsmittelunterdrückung

Ein Experiment, das auf die Sättigung verzichten kann, ist die **1-1-Sequenz**, die sehr simpel ist.



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

$$\xrightarrow{90^\circ H_{-x}} \boxed{H_z \cos 2\pi\delta_H\Delta} + H_x \sin 2\pi\delta_H\Delta$$

nicht detektierbar

Lösungsmittelunterdrückung

Der Wert δ_H ist relativ zur Spektren-Mitte („on-resonanz“) zu sehen. Die wird bei wässrigen Lösungen immer auf der Wasserfrequenz positioniert (was schon beim Vorsättigen unumgänglich ist). Für das Wasser ist also der Wert $\delta_H(\text{H}_2\text{O}) = 0$ und damit ist auch der Sinus 0.

Im Vektormodell ausgedrückt hat sich die Magnetisierung des Wassers zwischen den beiden Pulsen nicht bewegt und wird einfach wieder in die z-Richtung gedreht. Das ist unabhängig von Δ !

Lösungsmittelunterdrückung

Welche Signale erscheinen hängt von der Wahl von Δ ab und von den chemischen Verschiebungen

$$H_x \sin 2\pi\delta_H\Delta$$

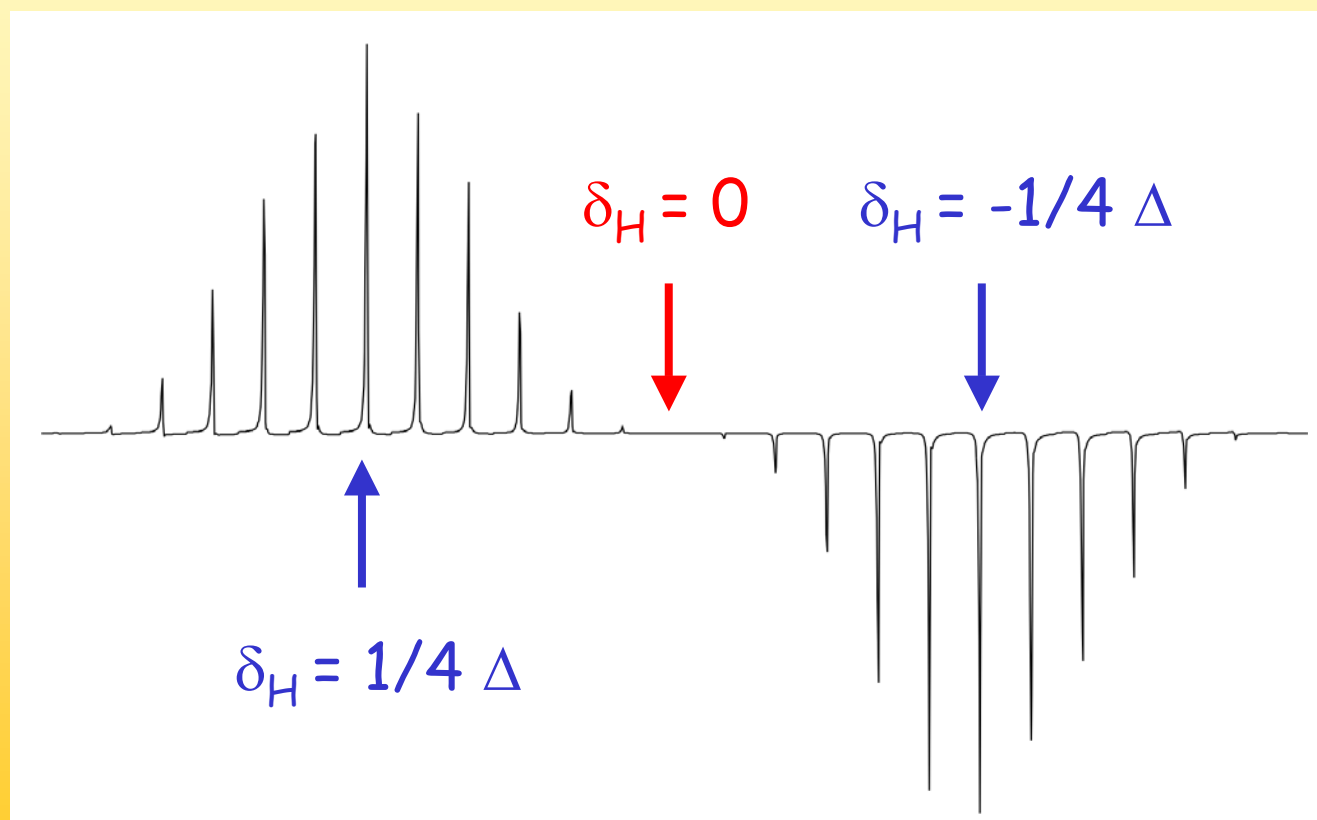
Bei einer Wartezeit Δ von 100 μs liegt das Maximum an einem 600 MHz-Spektrometer bei

$$\delta_H\Delta = \frac{1}{4}, \text{ d.h. } \delta_H = 2500 \text{ Hz} = 4.1 \text{ ppm}$$

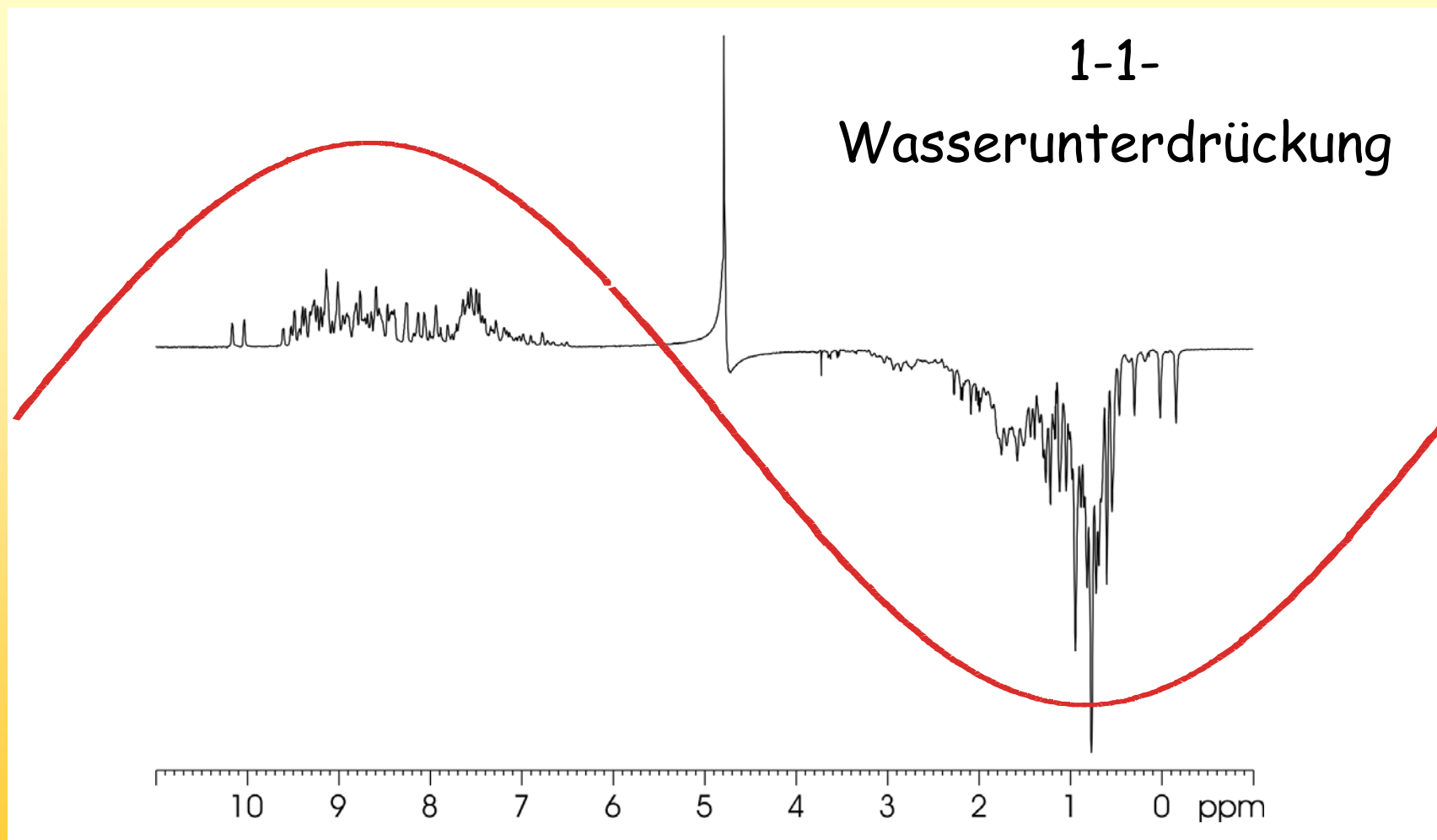
Wobei das relativ zur Spektrenmitte zu sehen ist.

Lösungsmittelunterdrückung

Das Anregungsprofil kann man mit einer einfachen Probe experimentell bestimmen



Lösungsmittelunterdrückung



Lösungsmittelunterdrückung

Vorteile

Die Methode vermeidet Sättigung der austauschbaren Protonen

Sie lässt sich mit vielen Experimenten kombinieren und braucht keine besondere Spektrometerausstattung

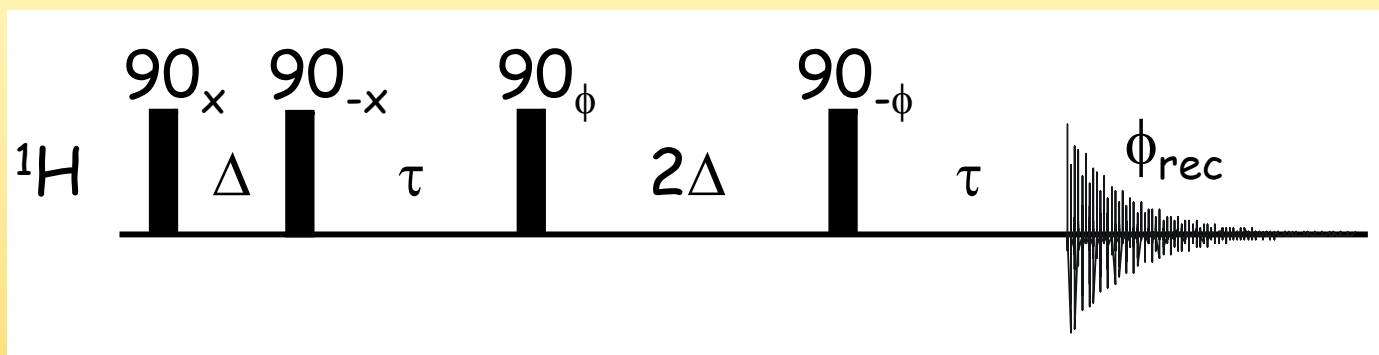
Nachteile

Das Restsignal kann bei ungünstigen Verhältnissen breit und groß sein, der Sinus hat einen schmalen Nulldurchgang

Man braucht den 90° -Puls

Lösungsmittelunterdrückung

Um das Problem mit der schmalen Nullstelle des Sinus zu lösen, wurde die **1-1-echo** Sequenz erdacht.

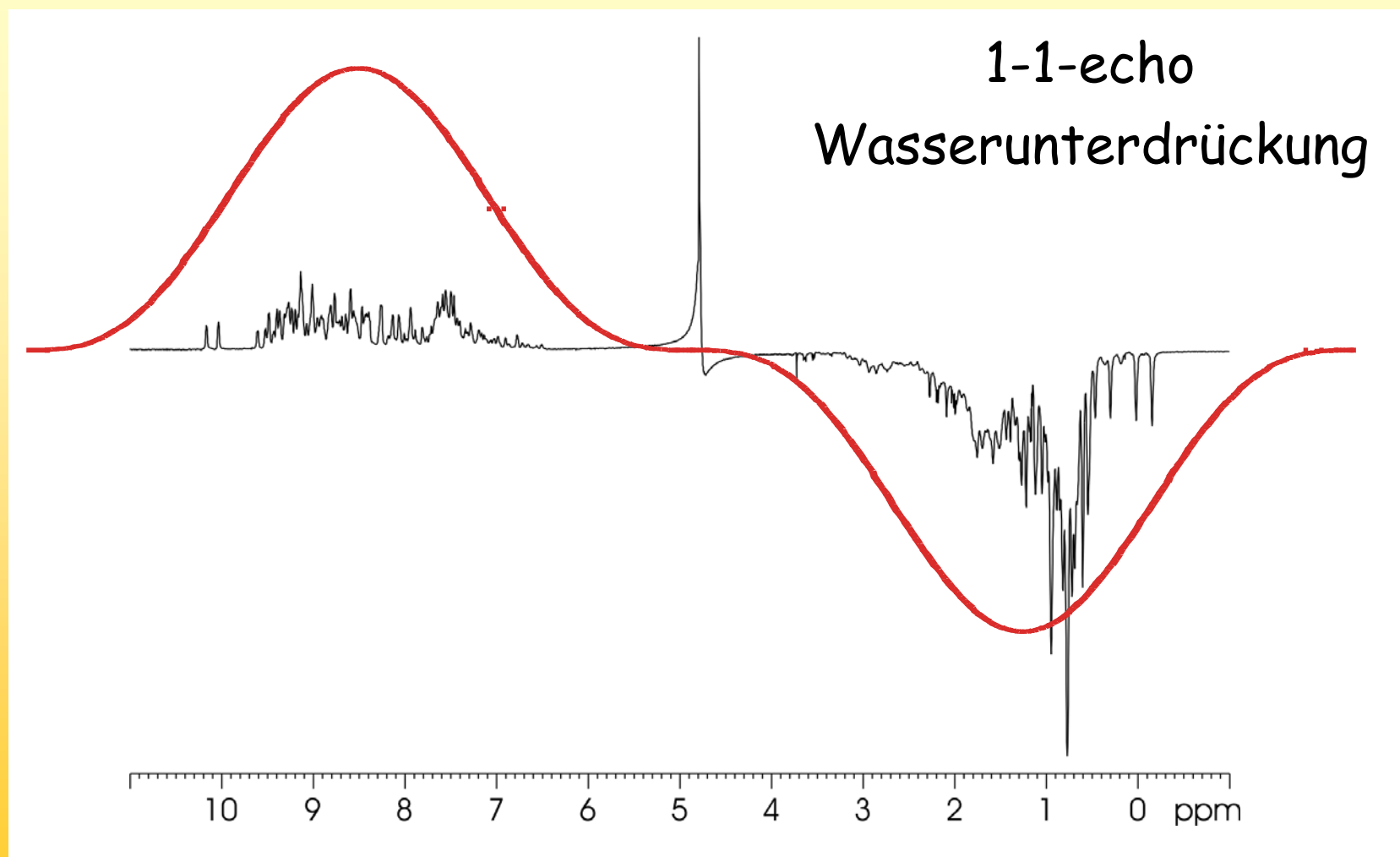


$$\phi = x, y, -x, -y$$

$$\phi_{\text{rec}} = +, -, +, -$$

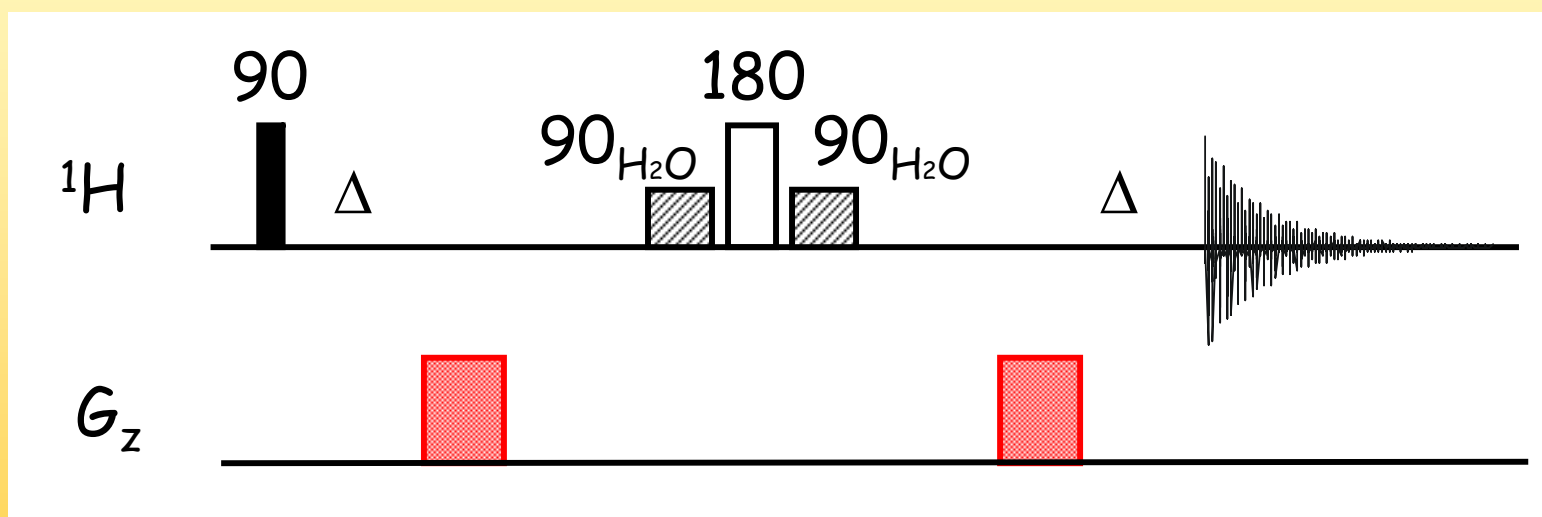
Durch die zweite Periode wird der Sinus in einen $(\text{Sinus})^3$ verwandelt mit einer flacheren Nullstelle

Lösungsmittelunterdrückung



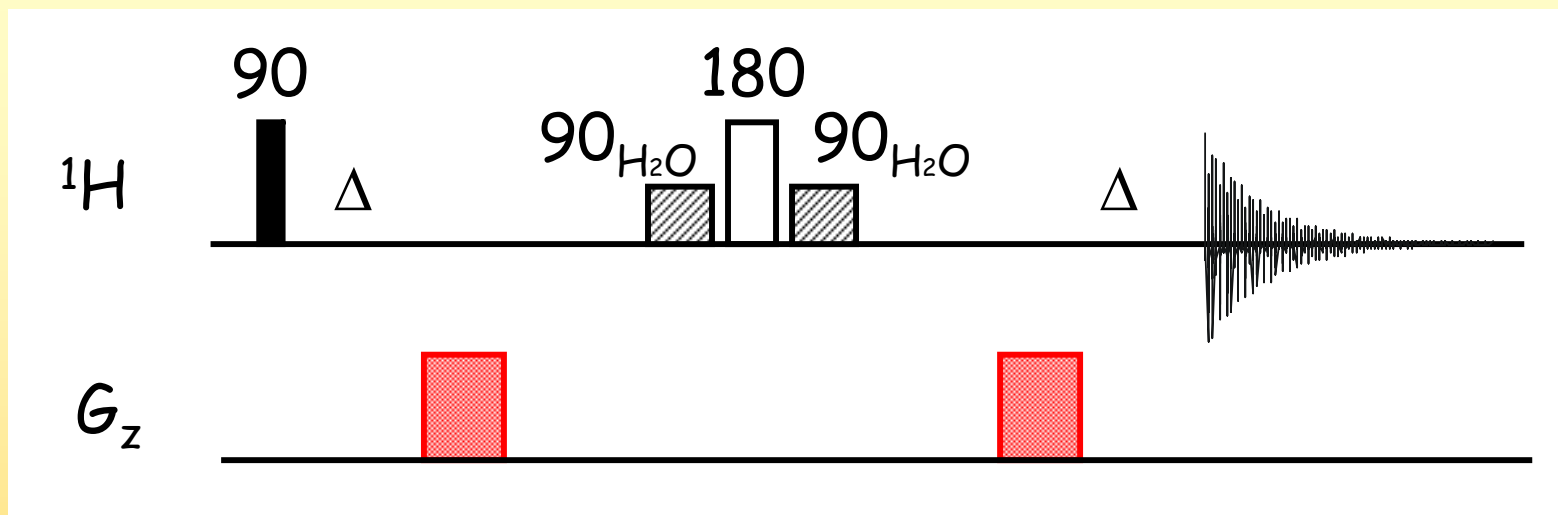
Lösungsmittelunterdrückung

Das Experiment, das eine optimale Lösungsmittelunterdrückung bietet ist die **WATERGATE-Sequenz**



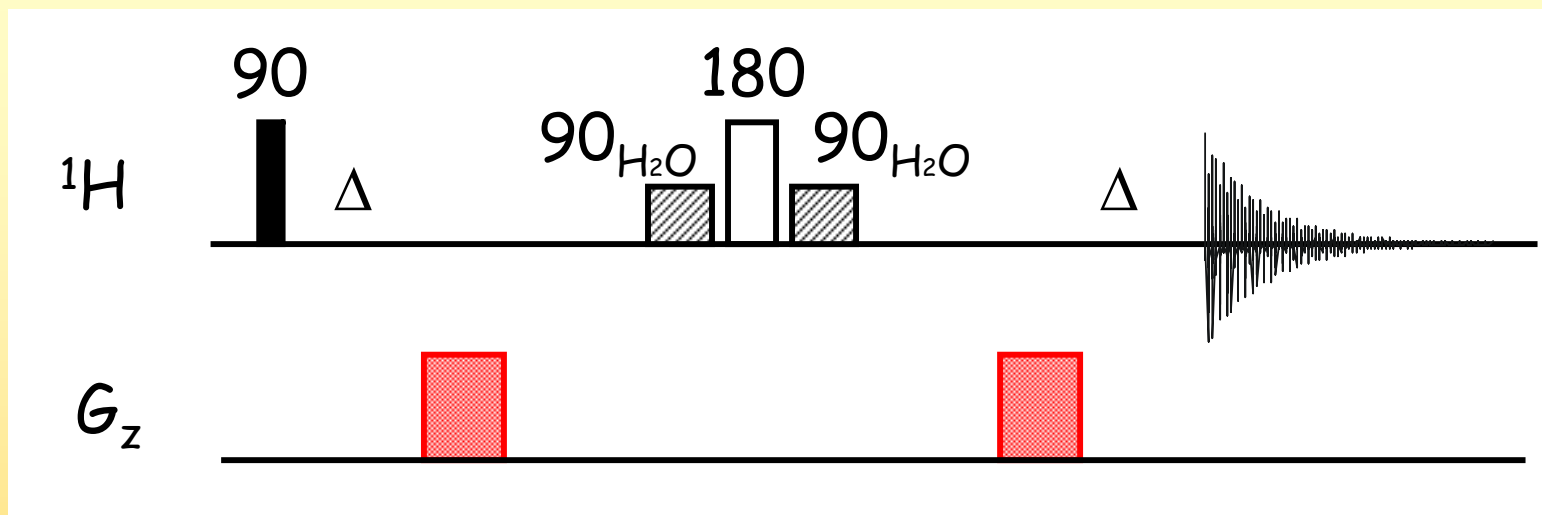
Auch hier erkennt man wieder eine Spin-Echo-Sequenz

Lösungsmittelunterdrückung



Die beiden selektiven Pulse auf die Wasserfrequenz ergeben für das Wasser in der Summe einen 360° -Puls, für alle Signale die von diesen Pulsen nicht getroffen werden ergibt sich ein 180° Puls

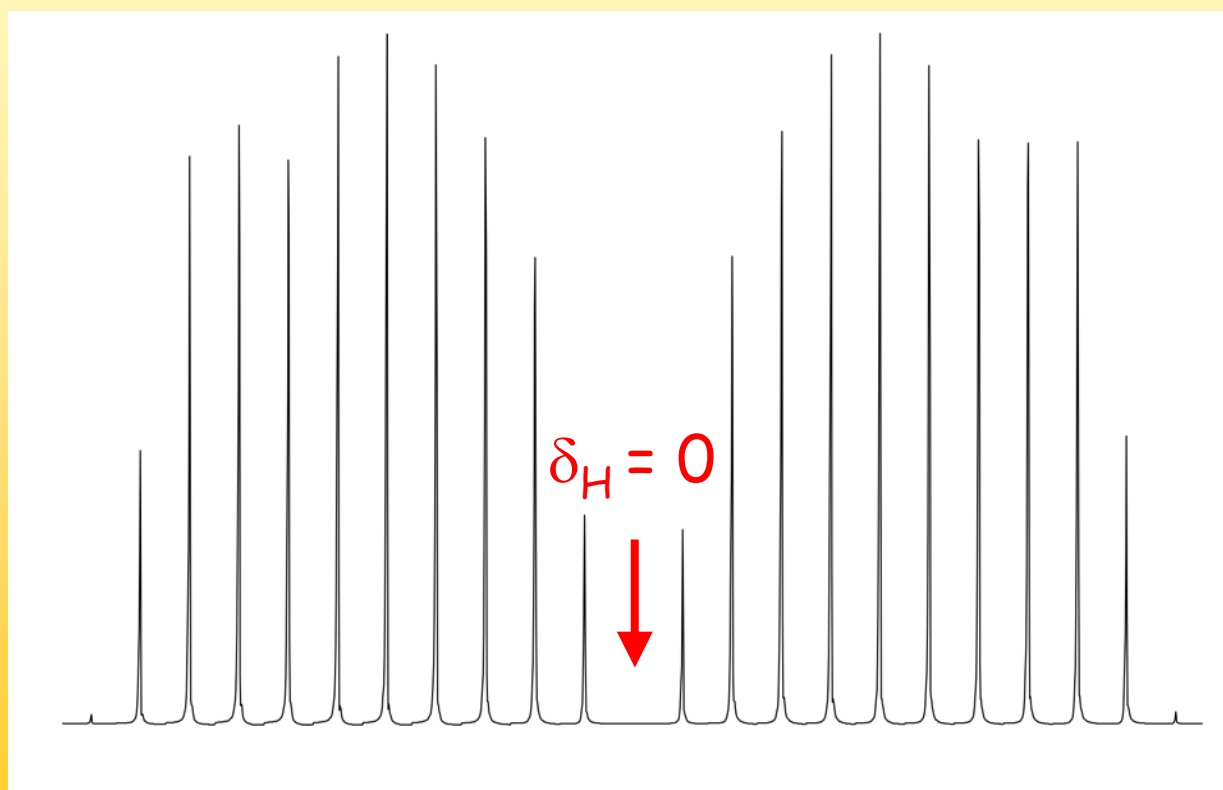
Lösungsmittelunterdrückung



Der 180° Puls wird die Gradienten refocussieren, d.h. ihr Effekt verschwindet, ein 360° Puls bleibt dagegen ohne Wirkung, das Wasser wird von den Gradienten gelöscht

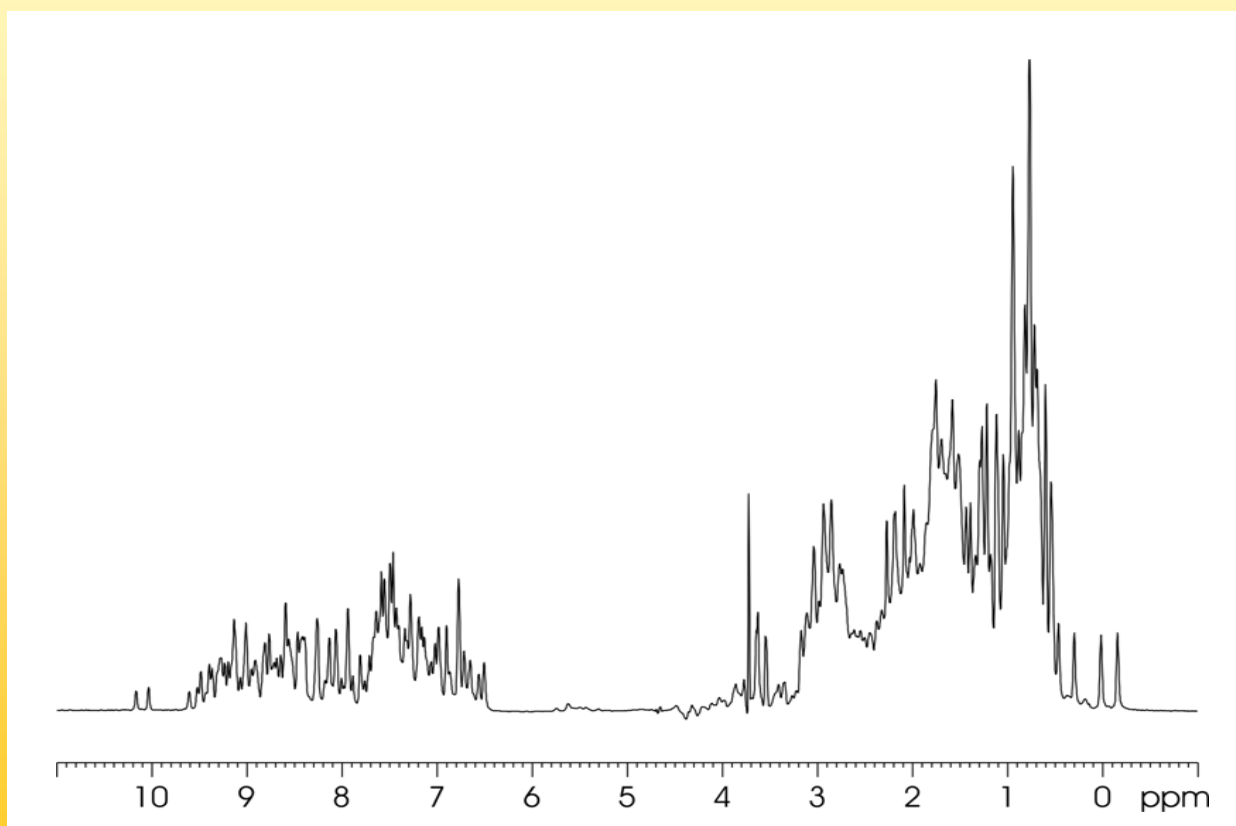
Lösungsmittelunterdrückung

Das Anregungsprofil hängt von der Wahl der selektiven Pulse ab



Lösungsmittelunterdrückung

Man wählt das Profil so, das die gewünschten Signale gute Intensität haben



Lösungsmittelunterdrückung

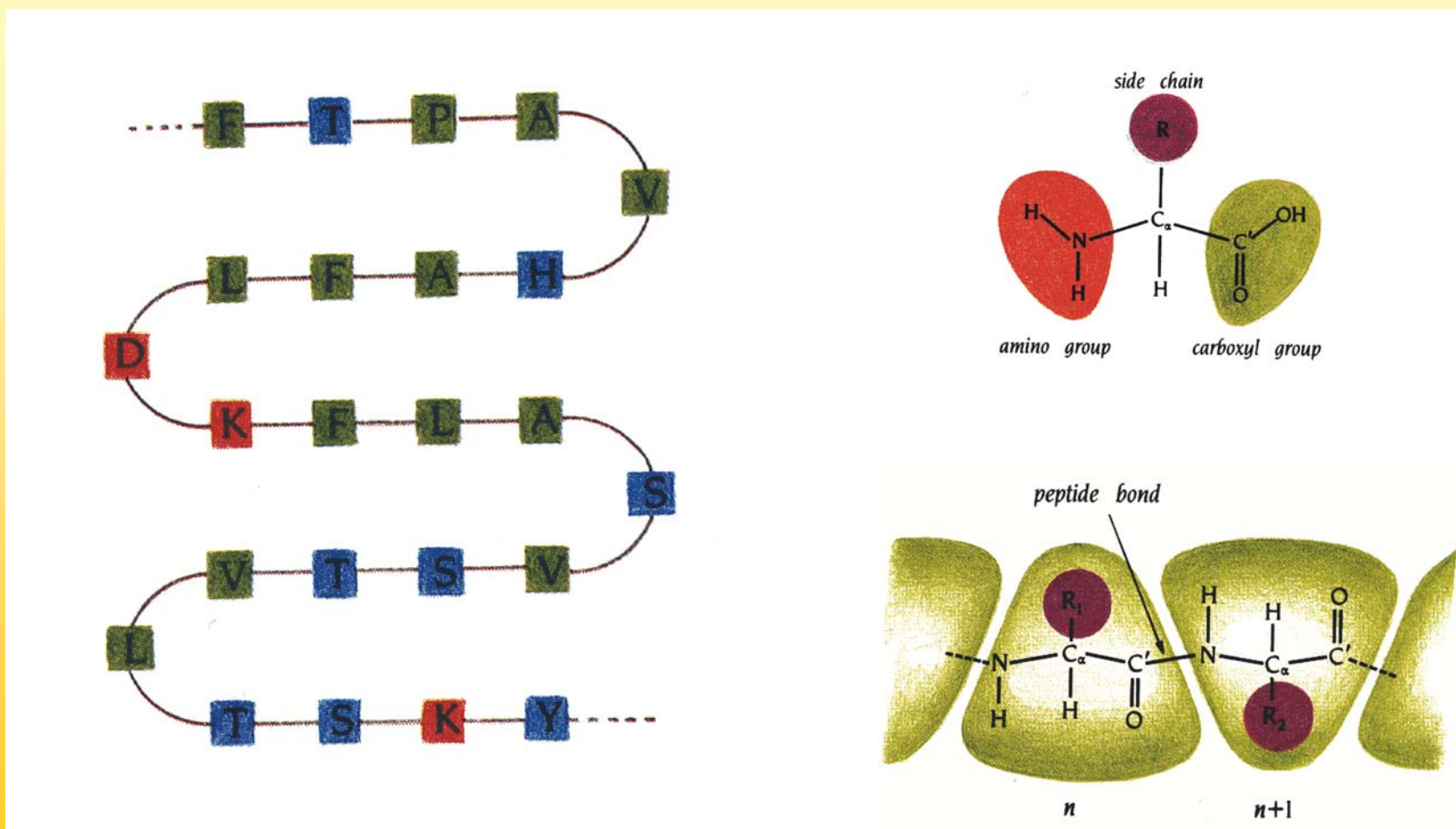
Bei all diesen Techniken geht man allerdings davon aus, dass nur ein großes Signal zu unterdrücken ist.

Sollten mehrere Signale zu entfernen sein, wird es deutlich komplizierter, bei manchen kombinierten Techniken (LC-NMR) kann das aber durchaus relevant sein.

Proteine

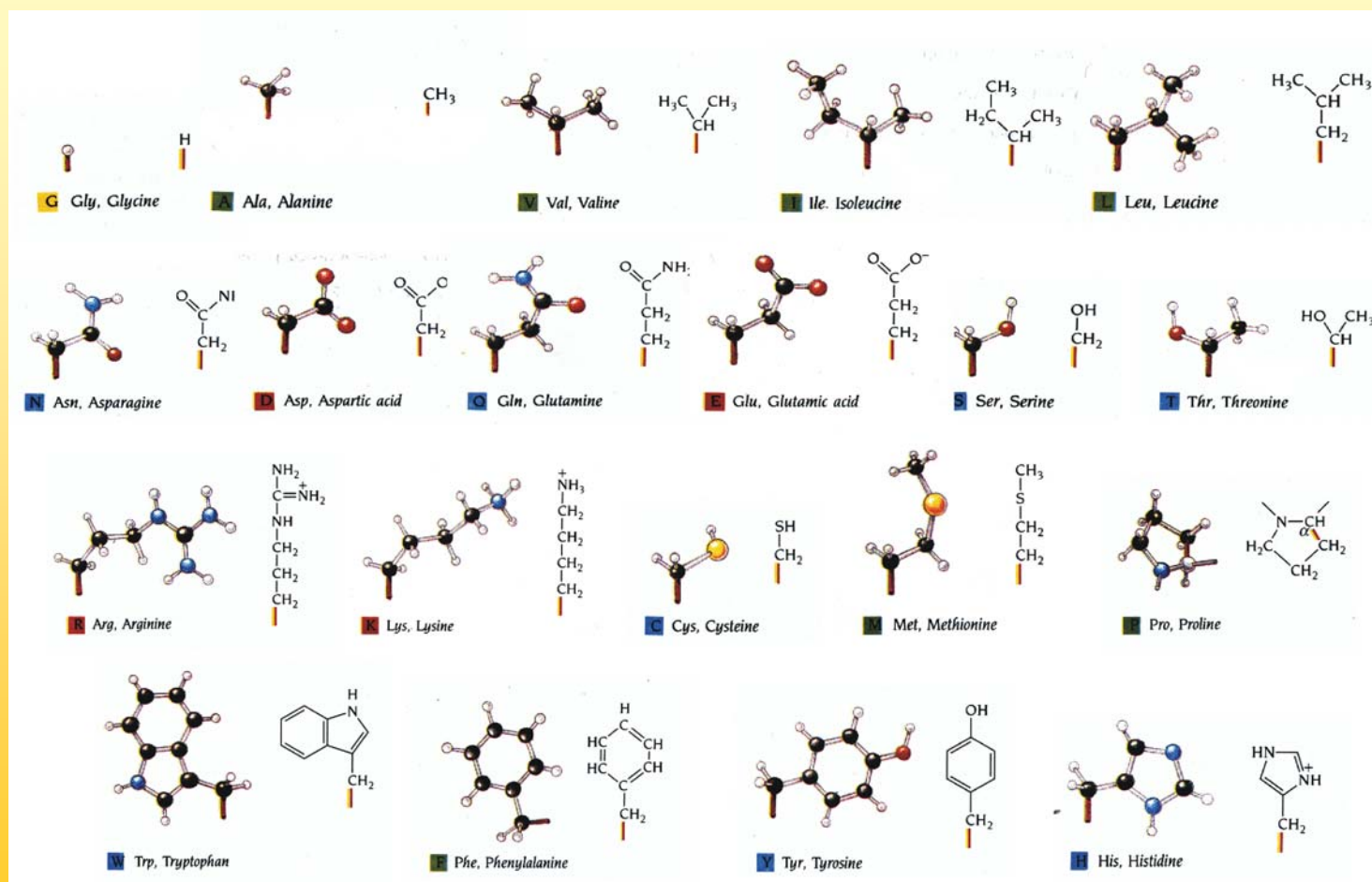
Proteine

Die Primärstruktur



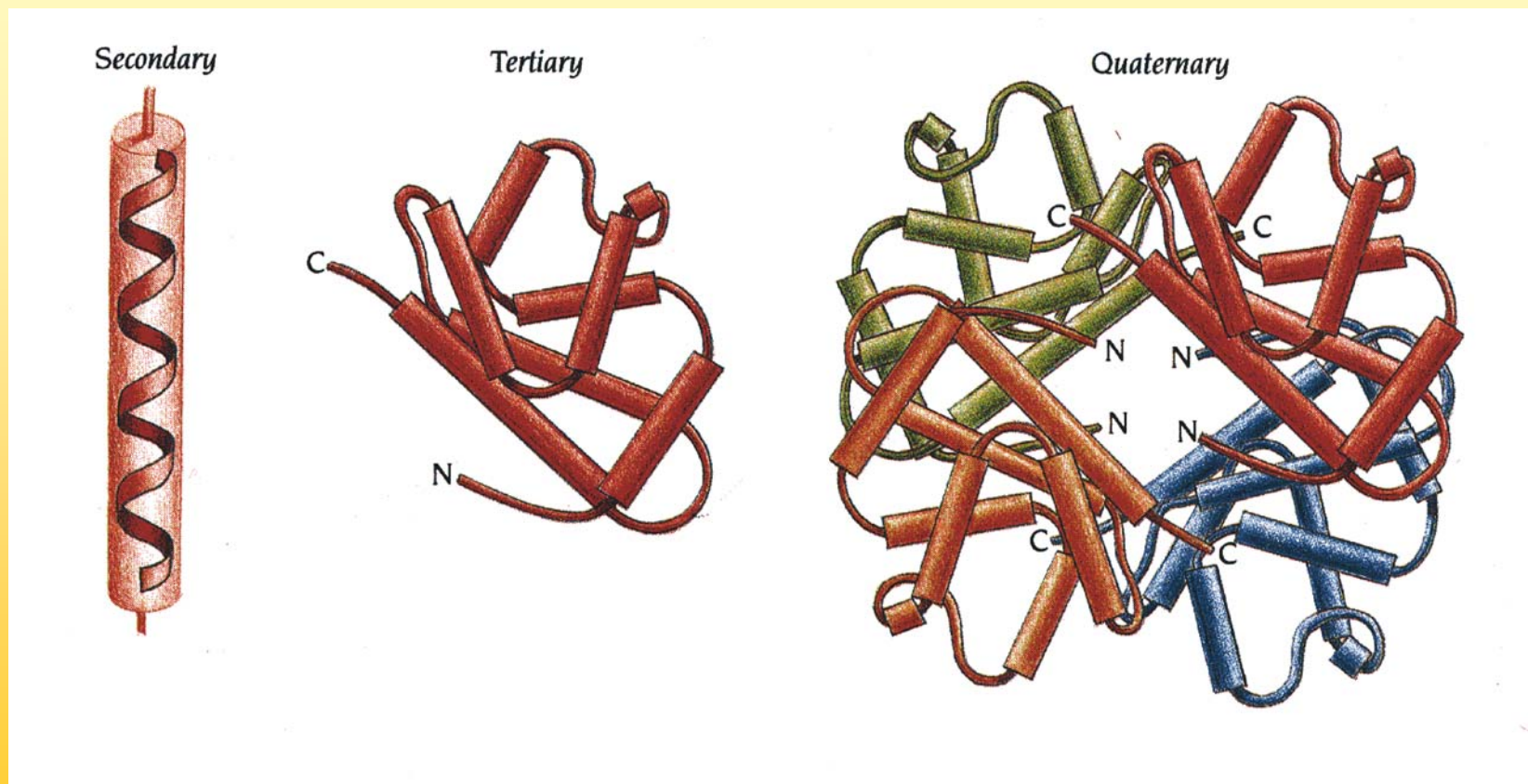
Proteine

Aminosäure-Seitenketten



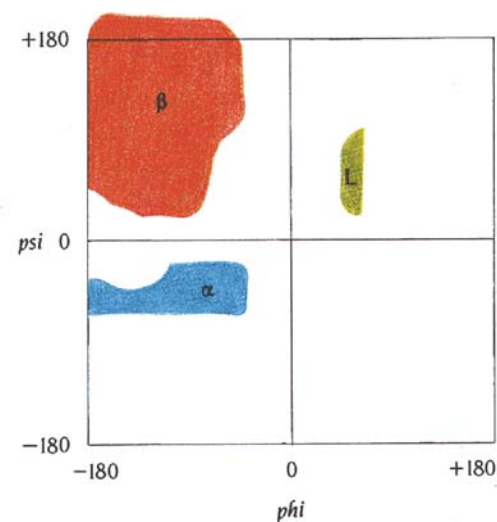
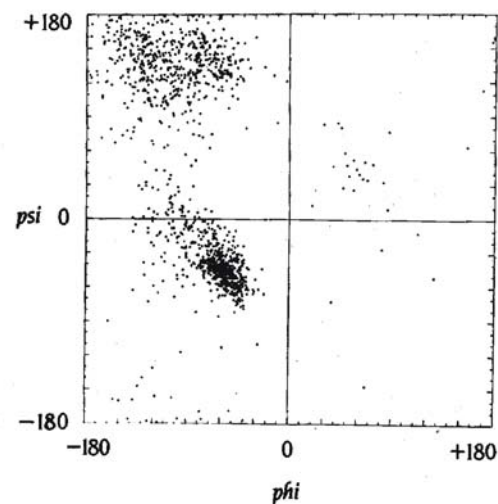
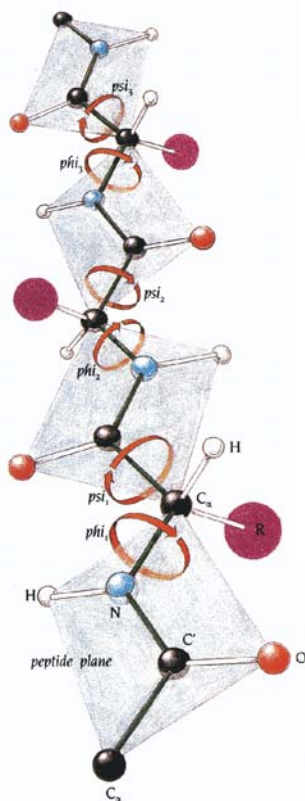
Proteine

Ebenen struktureller Organisation



Proteine

Der Ramachandran-Plot



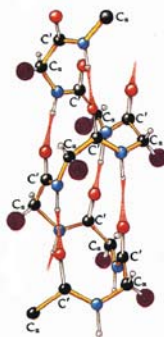
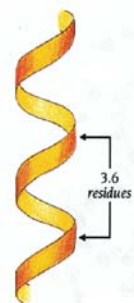
Die Struktur einer Polypeptidkette kann durch die Winkel ϕ (ϕ) und ψ (ψ) beschrieben werden.

Aus sterischen Gründen sind nur bestimmte Winkelkombinationen erlaubt, die im Ramachandran-Plot zu erkennen sind.

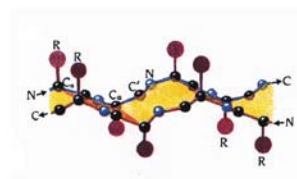
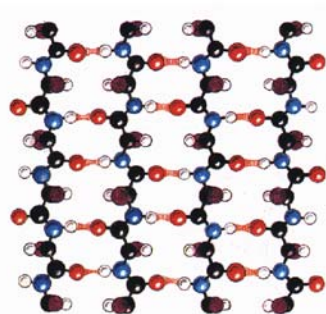
Proteine

Sekundärstrukturelemente

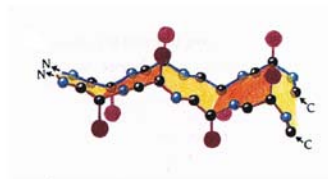
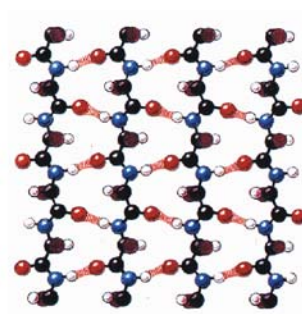
α -Helix



β -Faltblatt

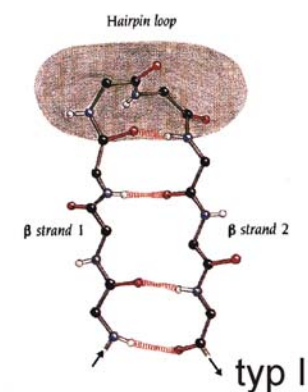
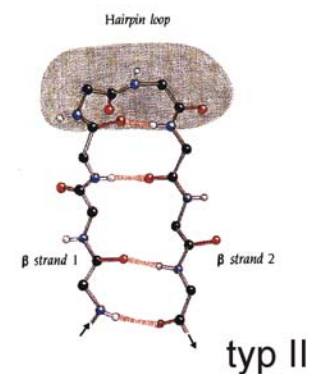


antiparallel



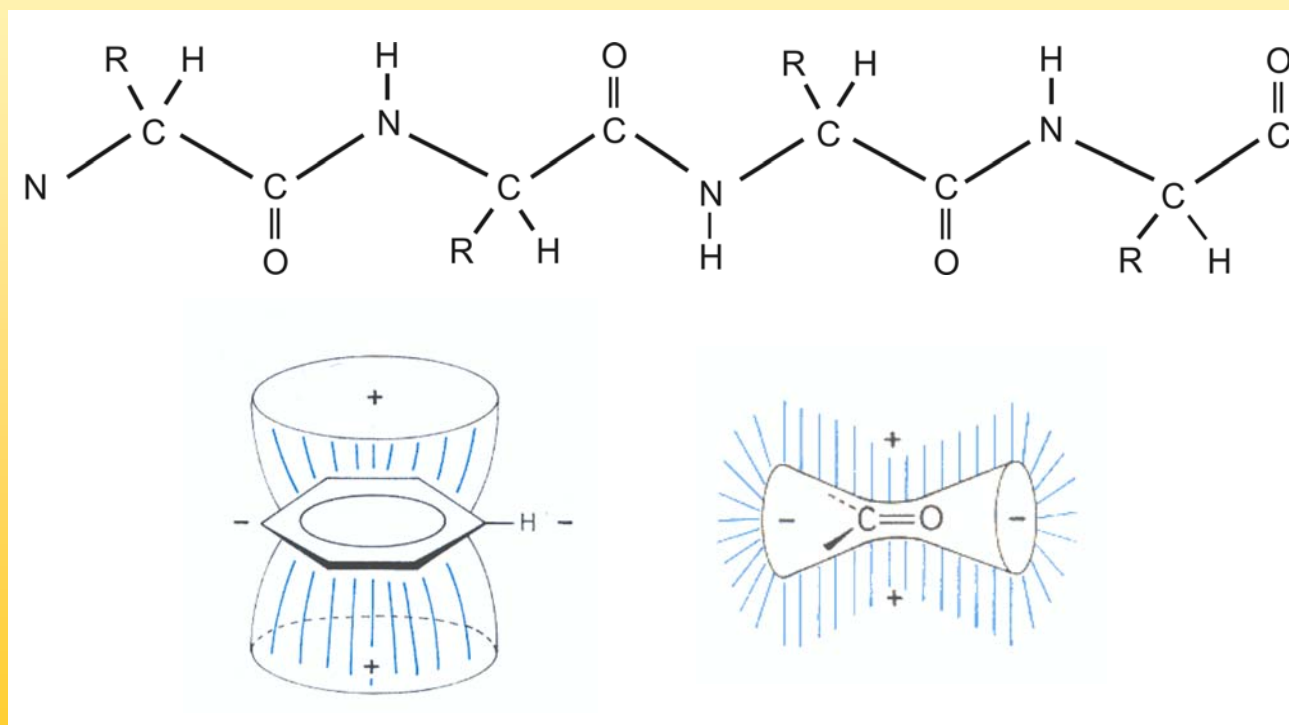
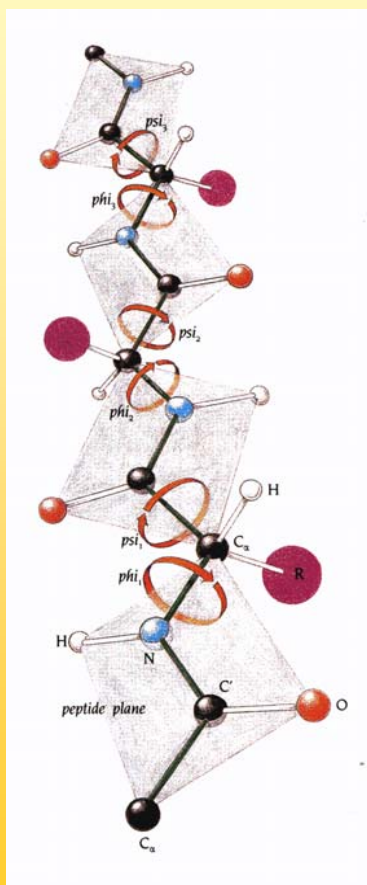
parallel

β -turn



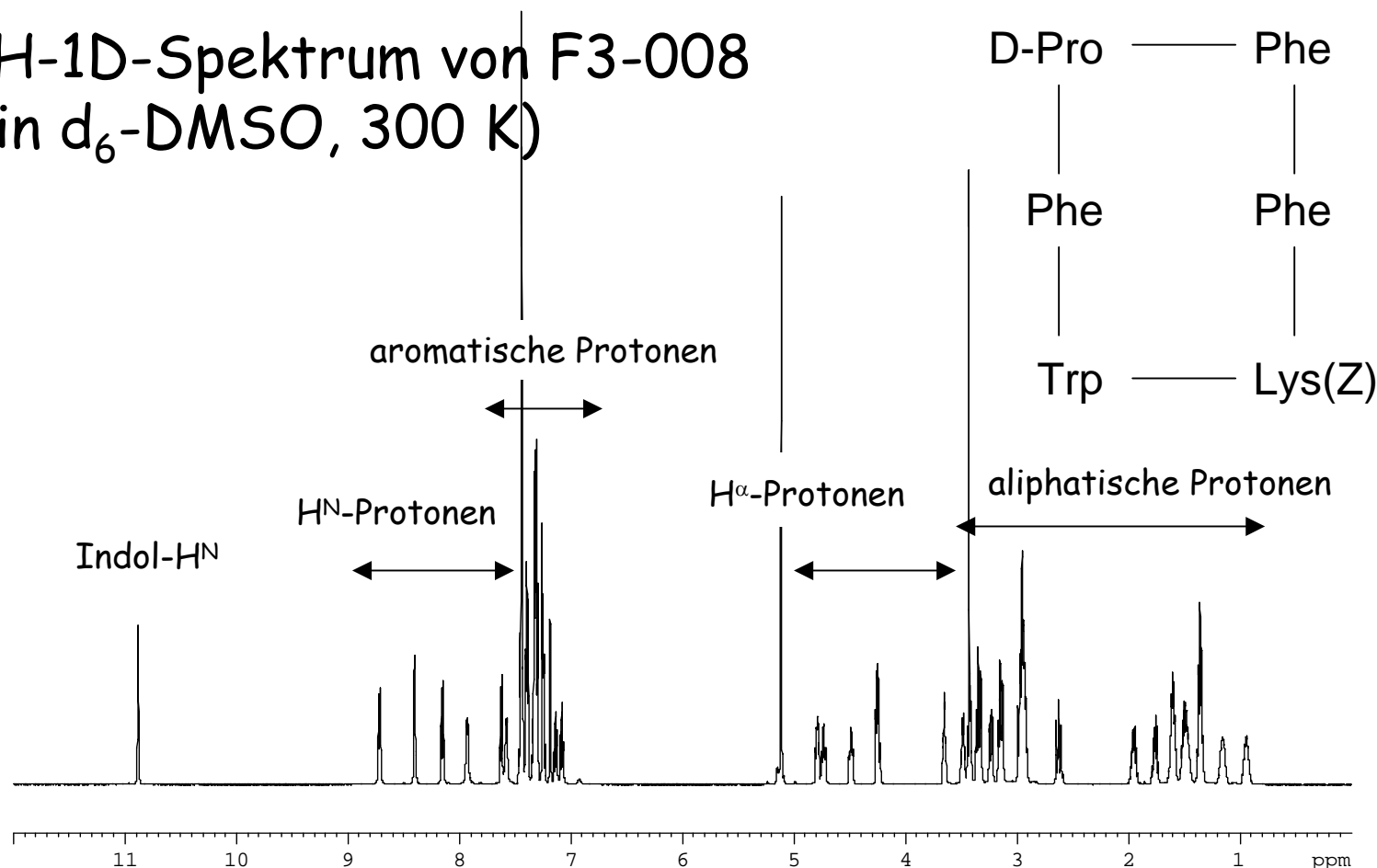
Proteine

Unterschiede in der chemischen Verschiebung treten durch Strukturierung auf



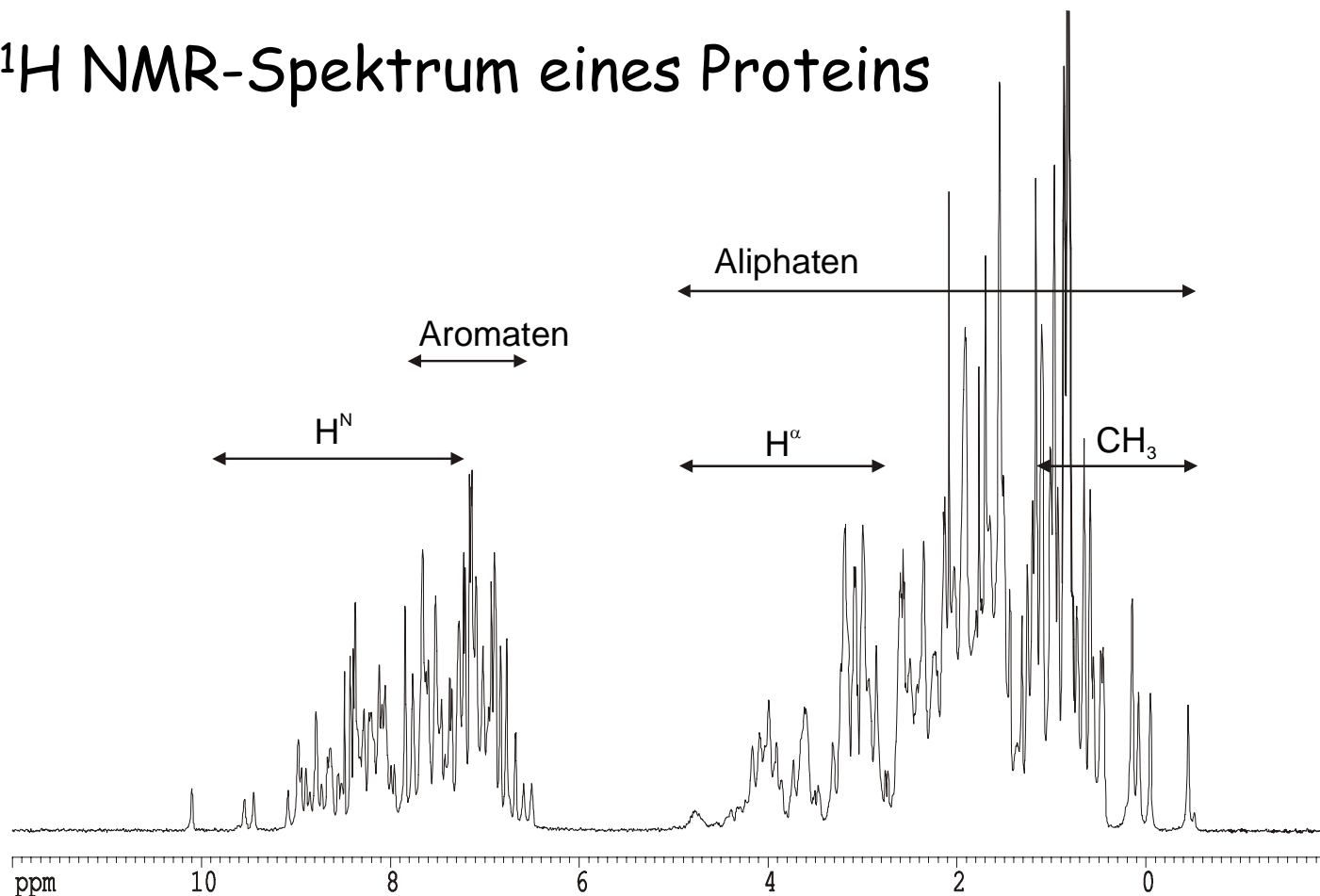
NMR-Spektroskopie an Proteinen

^1H -1D-Spektrum von F3-008
(in d_6 -DMSO, 300 K)



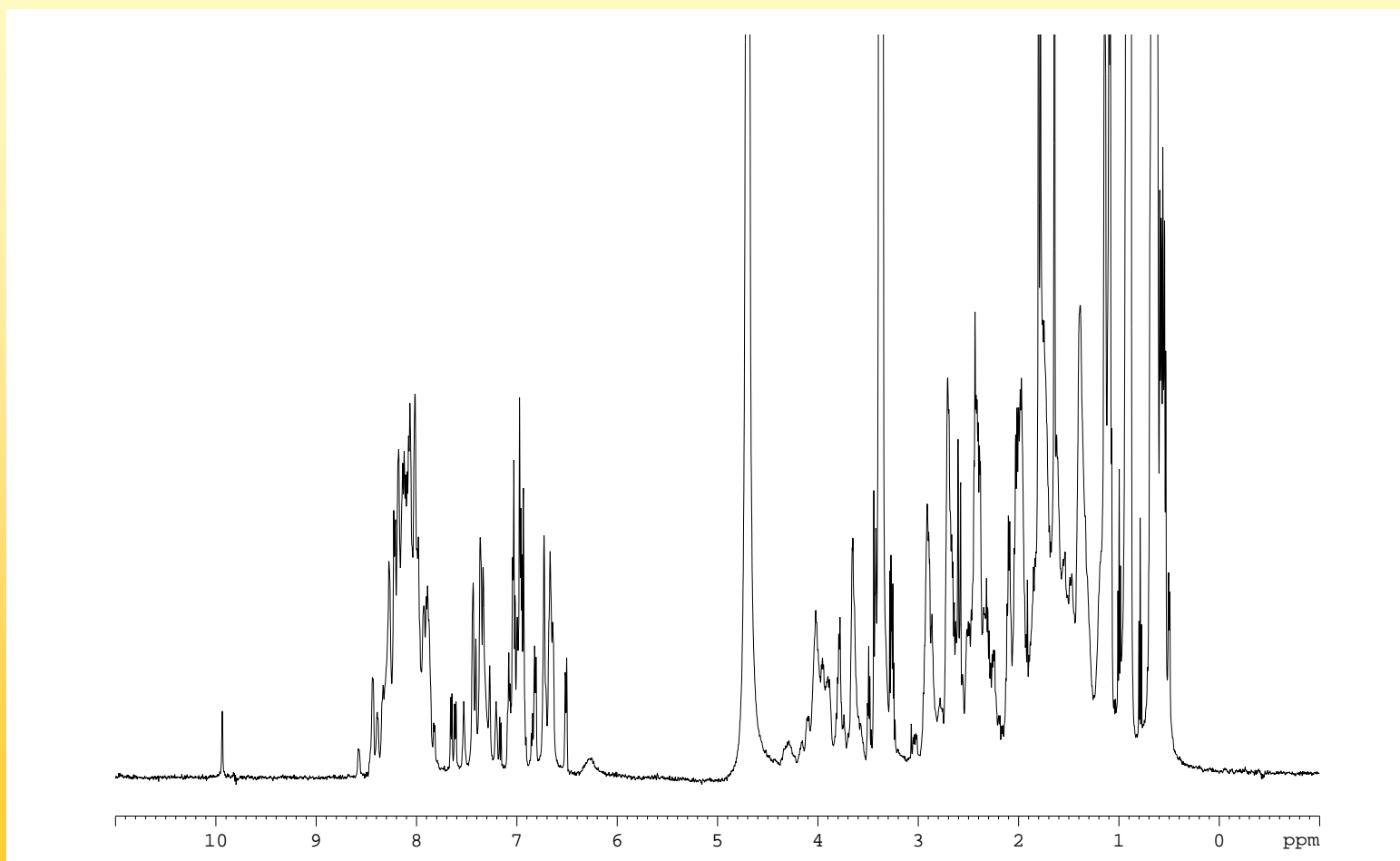
NMR-Spektroskopie an Proteinen

^1H NMR-Spektrum eines Proteins



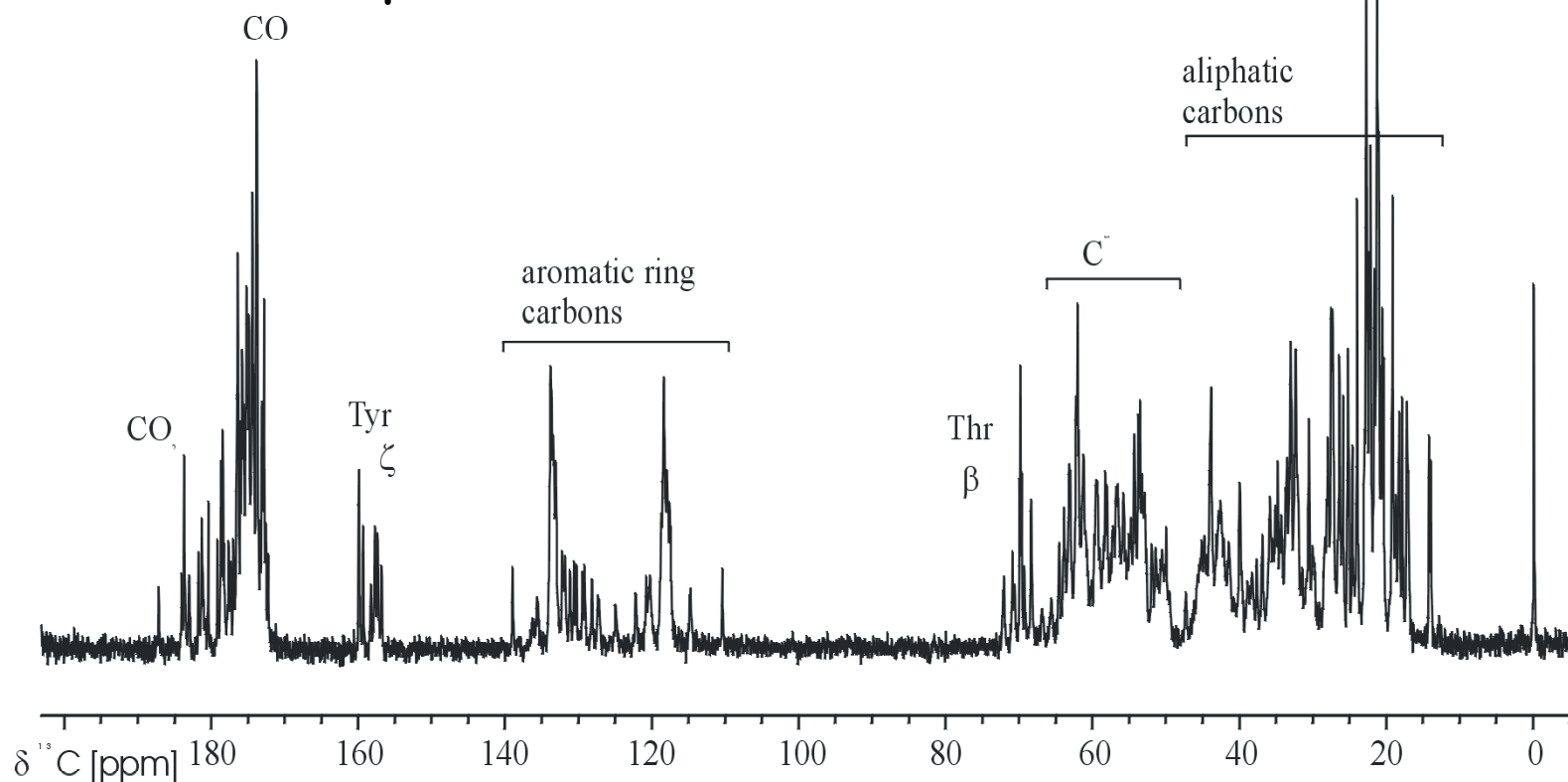
NMR-Spektroskopie an Proteinen

Ist das Protein ungefaltet gibt es keine Anisotropieeffekte



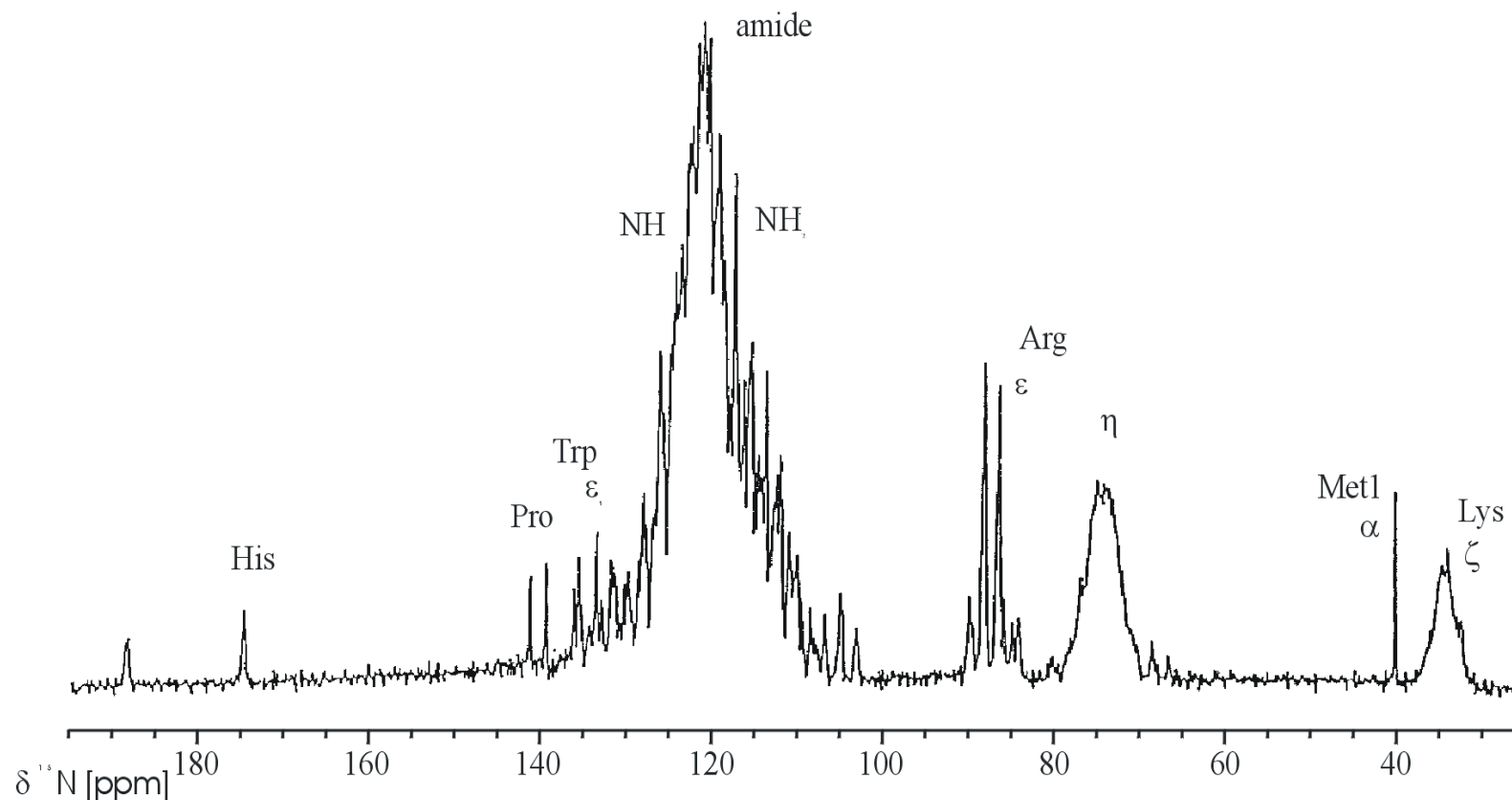
NMR-Spektroskopie an Proteinen

^{13}C NMR-Spektrum eines Proteins



NMR-Spektroskopie an Proteinen

^{15}N NMR-Spektrum eines Proteins



Sequenzspezifische Zuordnung

Bei Proteinen ist das Problem der Resonanzzuordnung in einem Polymer noch verschärft.

Das einzige was vorher bekannt ist, ist die Primärsequenz, die MUSS aber bekannt sein.

Basierend auf der Sequenz versucht man wieder Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den Aminosäuren zu etablieren und auf diese Weise eine

sequenz-spezifische Zuordnung

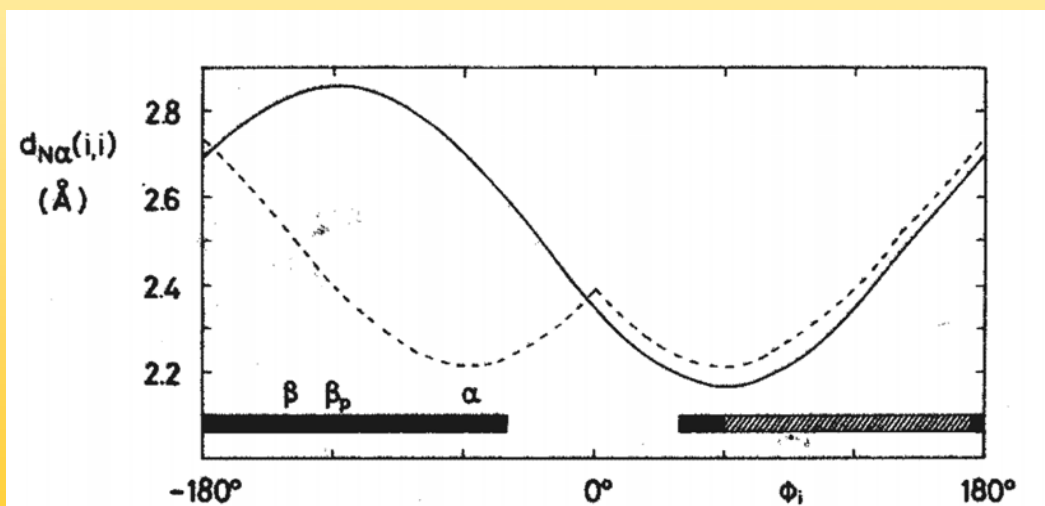
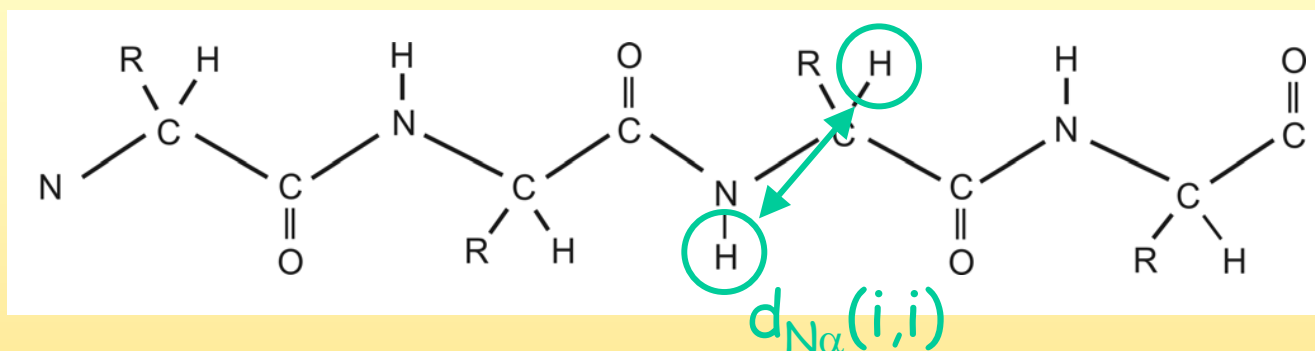
durchzuführen

Sequenzspezifische Zuordnung

Die ursprüngliche Strategie basiert auf einer

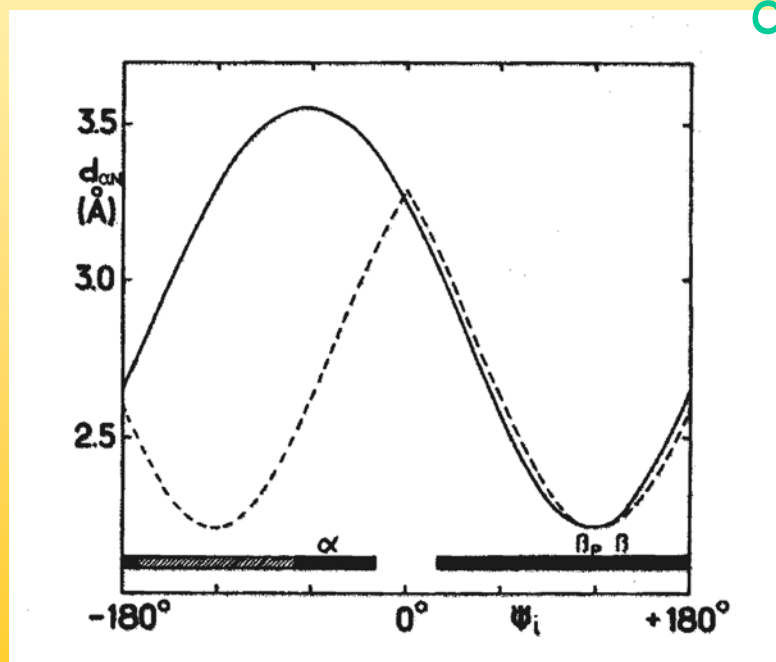
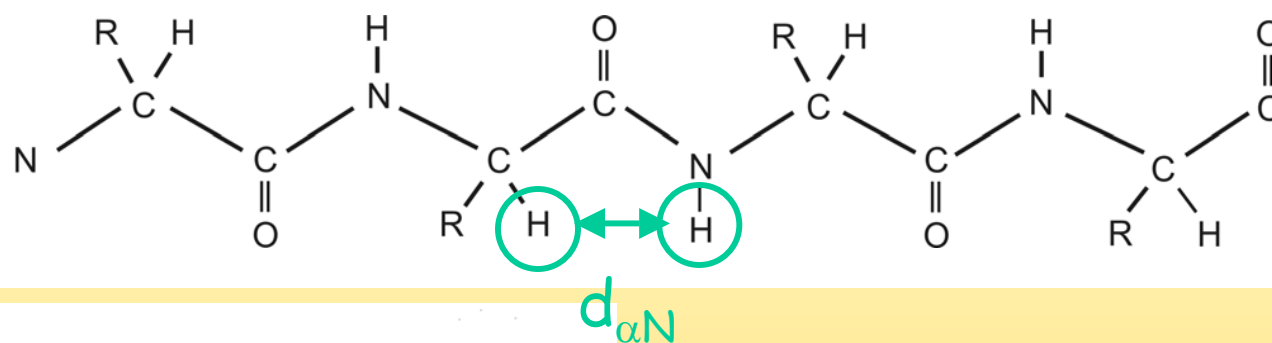
1. Identifizierung von Spinsystemen über die skalare Kopplung (J-Kopplung) im DQF-COSY oder TOCSY
2. Verknüpfung der Spinsysteme über den NOE-Effekt zwischen benachbarten Aminosäuren
3. Abgleich der verknüpften Spinsysteme mit der Primärsequenz und damit Zuordnung zu definierten Aminosäuren

Sequenzspezifische Zuordnung



Der Abstand vom H^N zum H^α , $d_{N\alpha}(i,i)$ innerhalb einer Aminosäure ist immer kurz genug für einen NOE

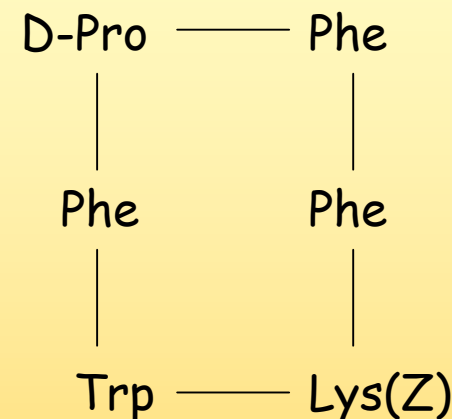
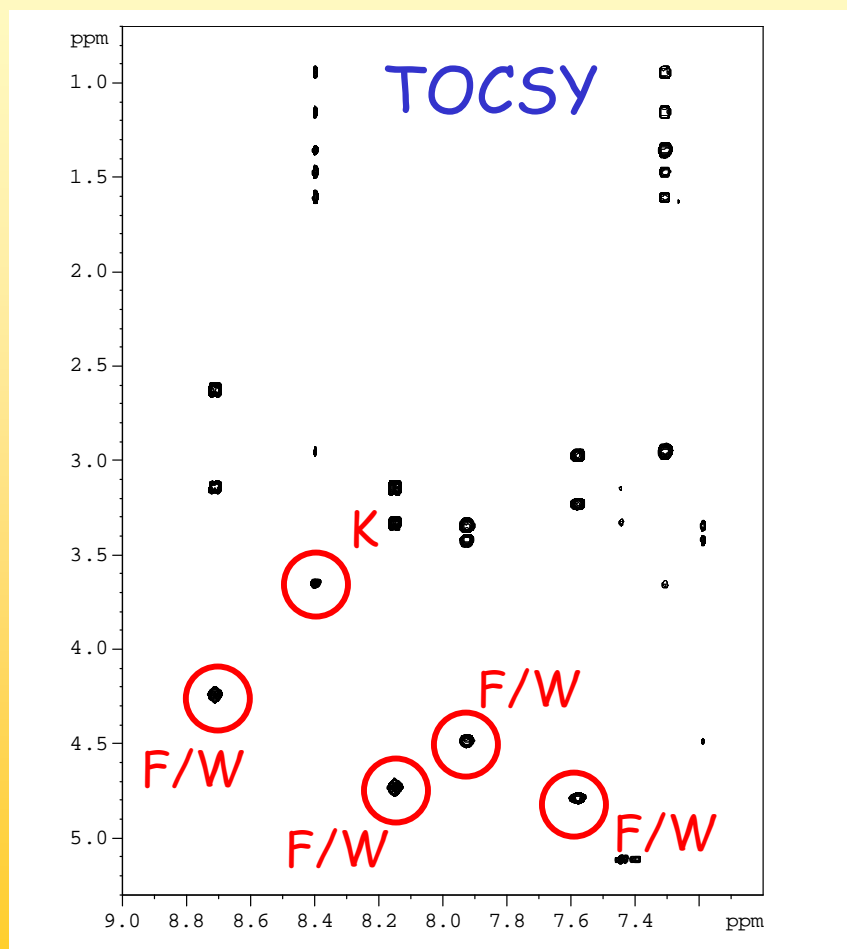
Sequenzspezifische Zuordnung



Das gleiche gilt für den Abstand vom H^N zum H^α der Aminosäure (i-1), $d_{\alpha N}$

Sequenzspezifische Zuordnung

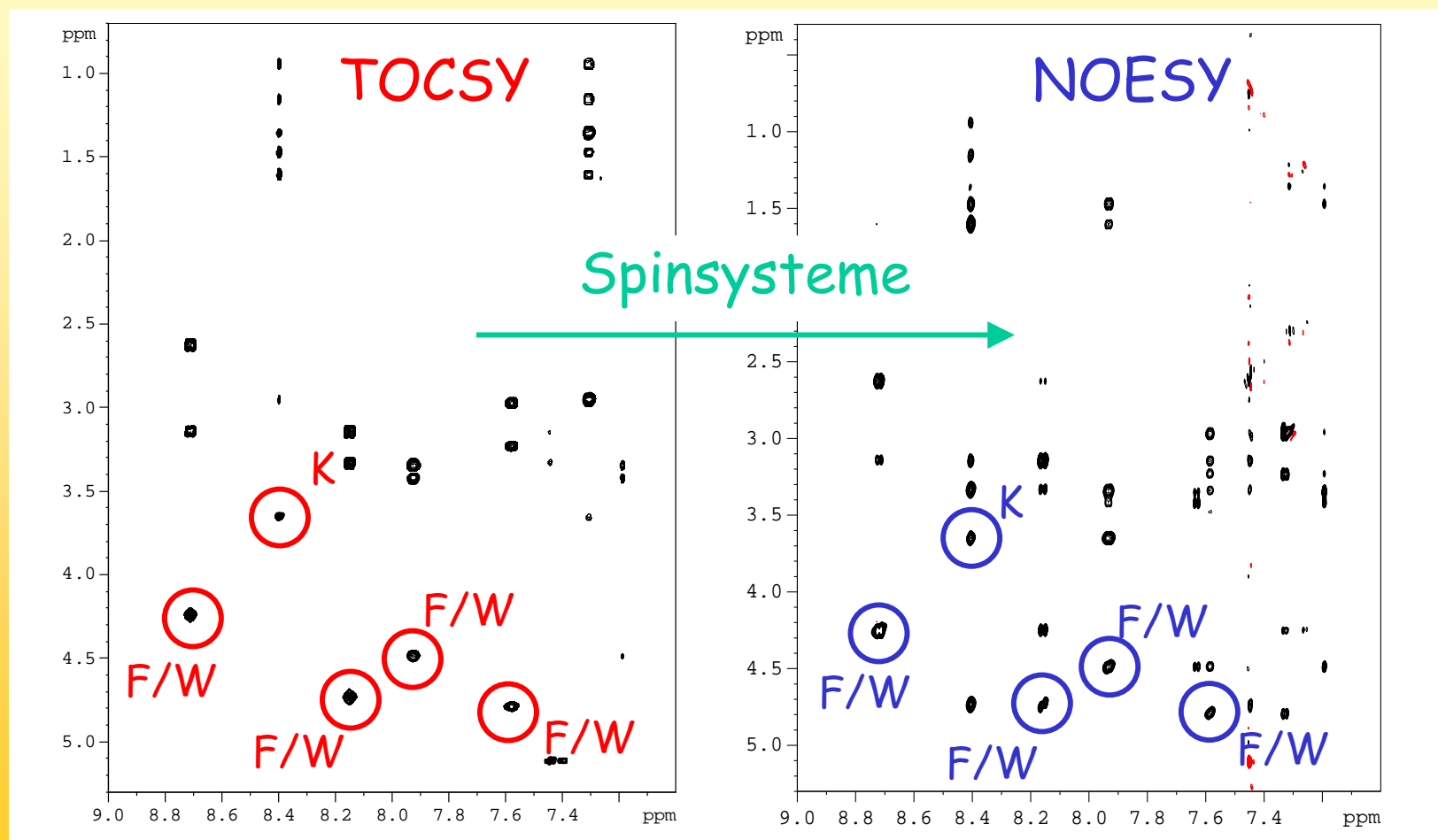
Identifizierung der Aminosäuretypen



Prolin hat kein H^N , daher sind 5 Spinsysteme zu erkennen, Lysin ist eindeutig, die anderen sind „Aromaten“

Sequenzspezifische Zuordnung

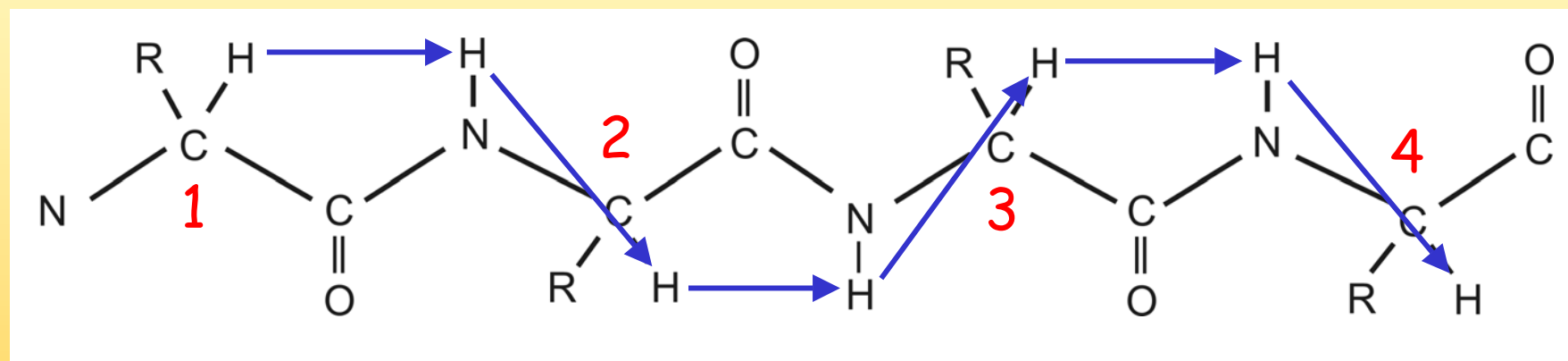
Übertragung der Spinsysteme ins NOESY



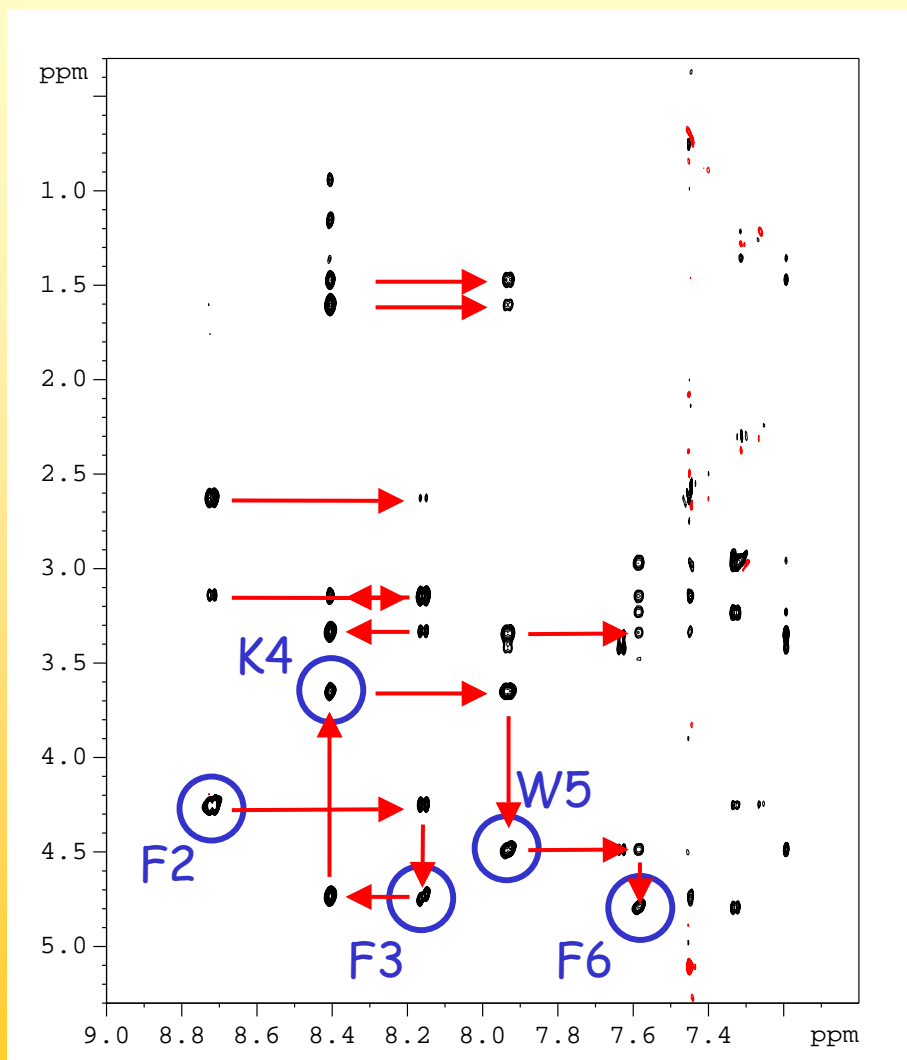
Sequenzspezifische Zuordnung

„Sequential walk“

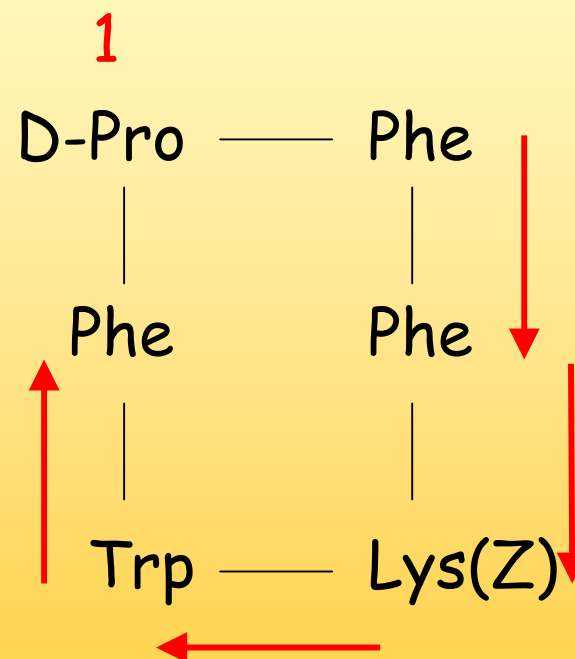
Erst in der Theorie....



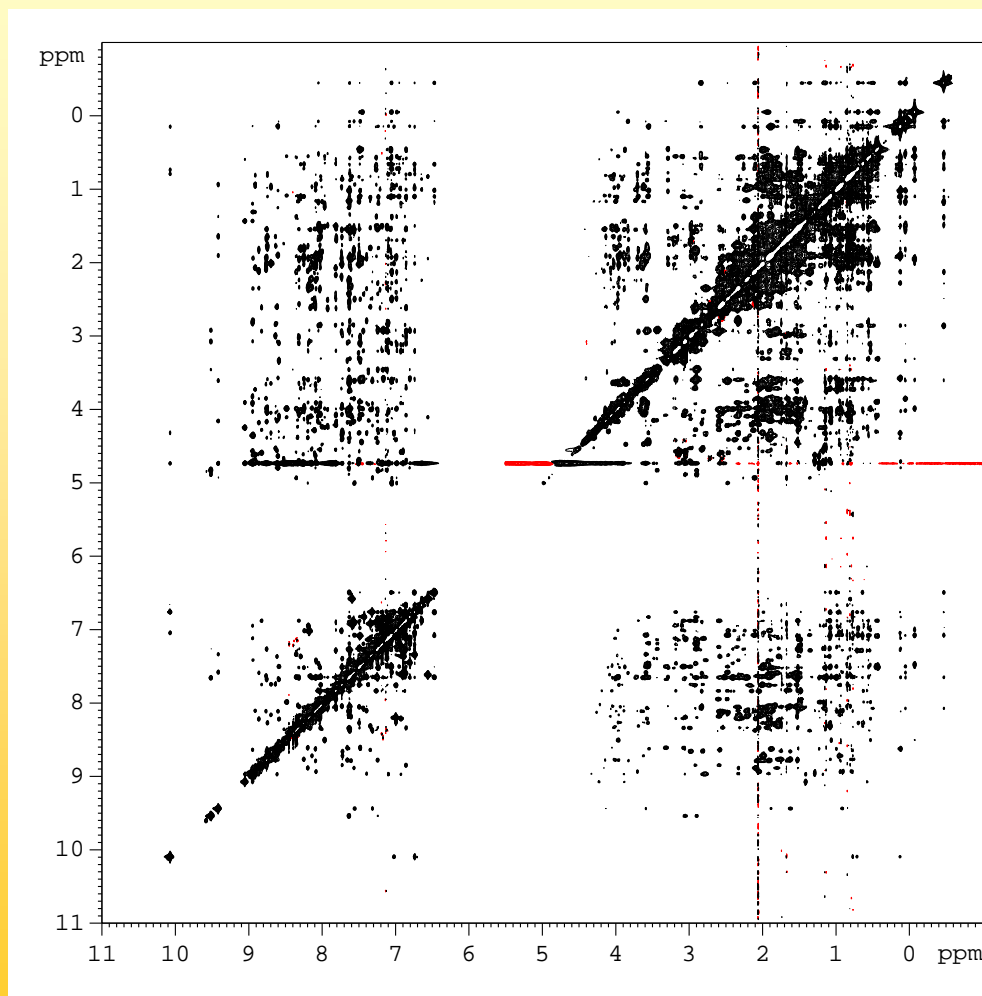
Sequenzspezifische Zuordnung



...dann im Spektrum

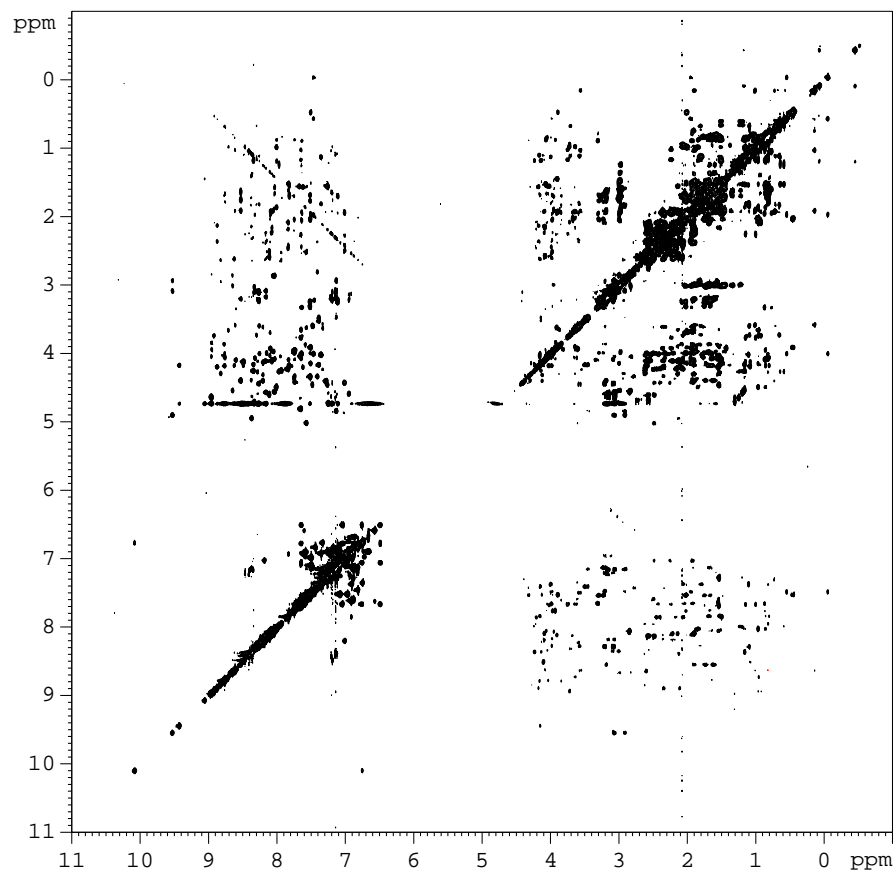


Sequenzspezifische Zuordnung



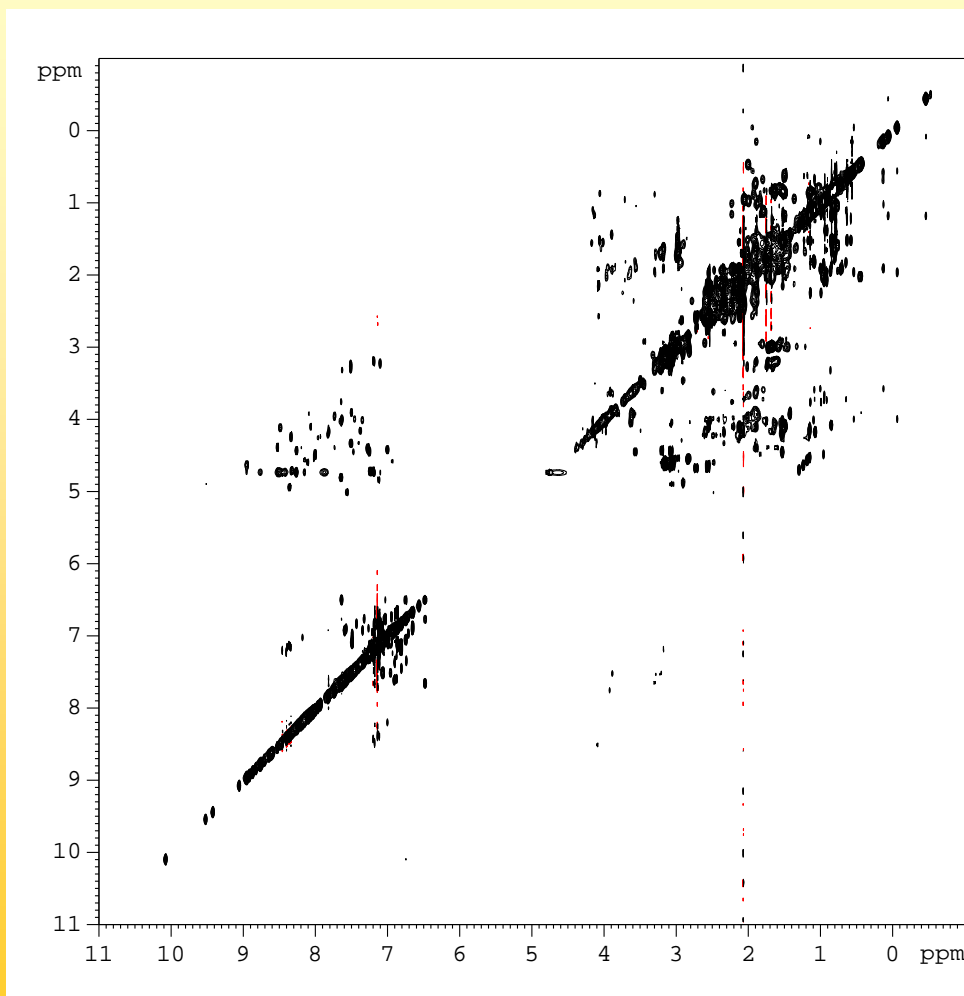
2D-NOESY (100 msec)
der SAM Domäne
(83 Aminosäuren)

Sequenzspezifische Zuordnung



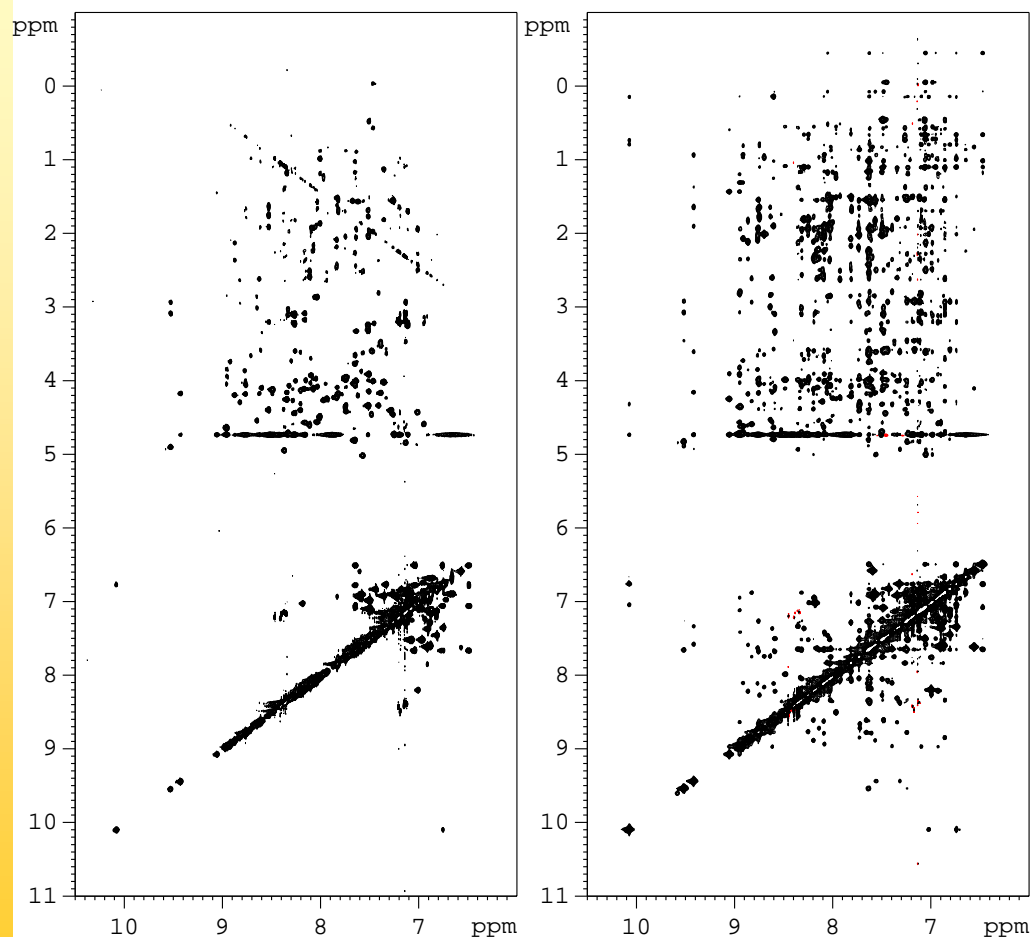
2D-TOCSY (65 msec)
der SAM Domäne
(83 Aminosäuren)

Sequenzspezifische Zuordnung



2D-TOCSY (24 msec)
der SAM Domäne
(83 Aminosäuren)

Sequenzspezifische Zuordnung



H^N -Bereich von
TOCSY und NOESY
der SAM Domäne
(83 Aminosäuren)
Dieselbe Strategie
zur Zuordnung kann
verwendet werden,
wird aber durch
Überlagerung
erschwert

Sequenzspezifische Zuordnung

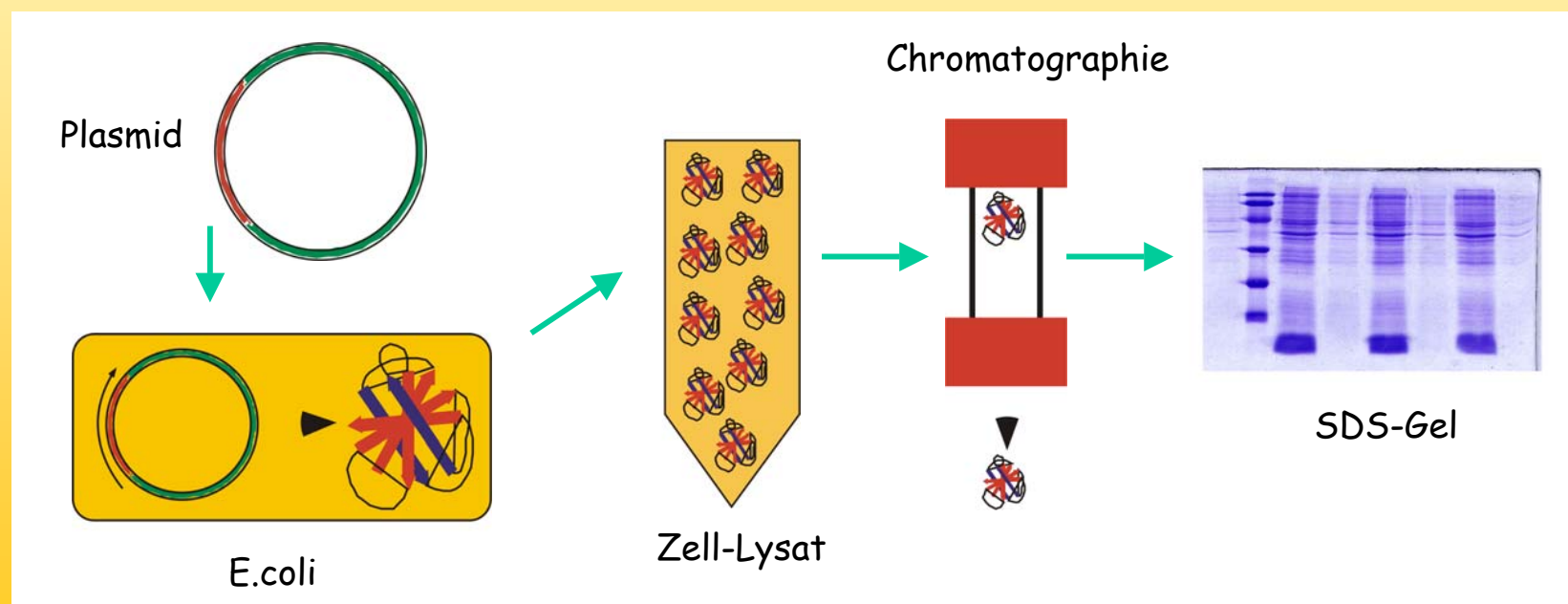
Die sequenzspezifische Zuordnung und auch die Extraktion von struktureller Information wird mit zunehmender Proteingröße immer schwieriger:

1. Es sind mehr Signale im selben spektralen Bereich, die Wahrscheinlichkeit für Überlagerung nimmt zu
2. Mit zunehmender Molekülgröße ändern sich die Relaxationseigenschaften, die Linien werden breiter, die Überlagerung wird noch wahrscheinlicher und TOCSY und COSY funktionieren immer schlechter

—————→ heteronukleare Spektren

Proteine: Isotopenmarkierung

Die Aufnahme von heteronuklearen Spektren ist bei Proteinen mit den Heterokernen in natürlicher Häufigkeit ($^{13}\text{C}=1.1\%$ und $^{15}\text{N}=0.4\%$) unrealistisch, es muß angereichert werden



Sequenzspezifische Zuordnung

Mit markierten Proteinen gibt es dann zwei
Möglichkeiten:

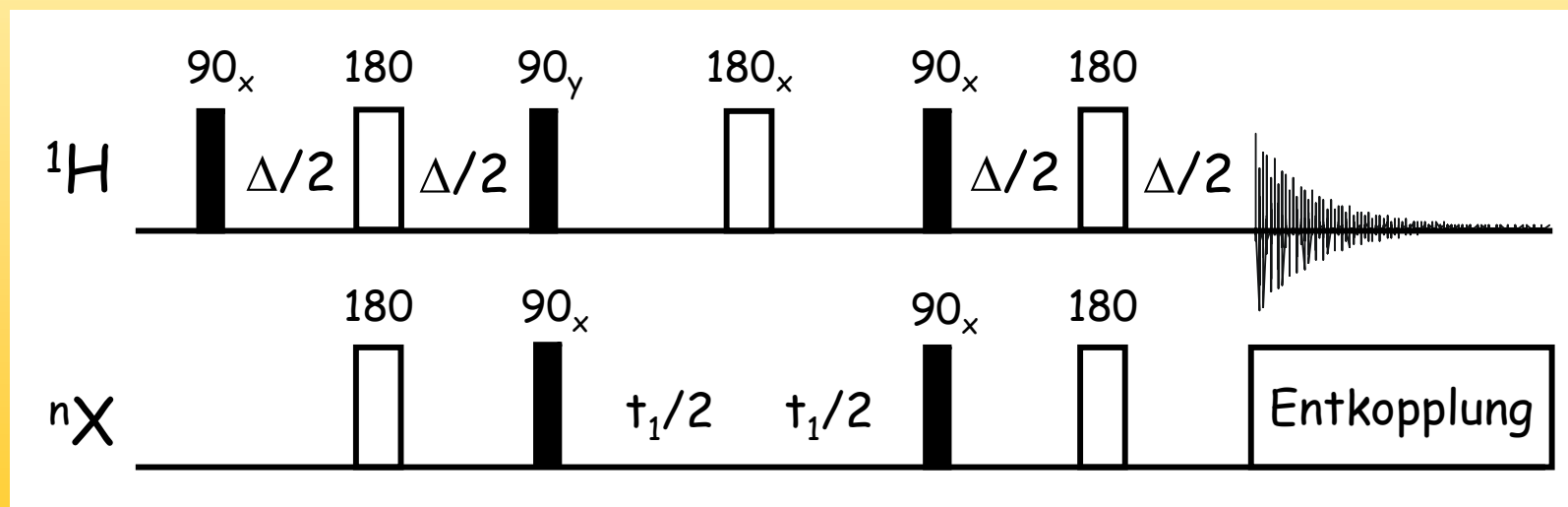
Die bislang vorgestellte Strategie zur sequenz-
spezifischen Zuordnung wird dann mit ^{15}N -editierten,
dreidimensionalen Techniken erweitert und ist dann auch
auf mittelgroße Proteine anwendbar

Es wird eine neue Strategie basierend auf sogenannten
Tripelresonanz-Techniken angewendet, die auch für
„sehr große“ Proteine noch anwendbar ist

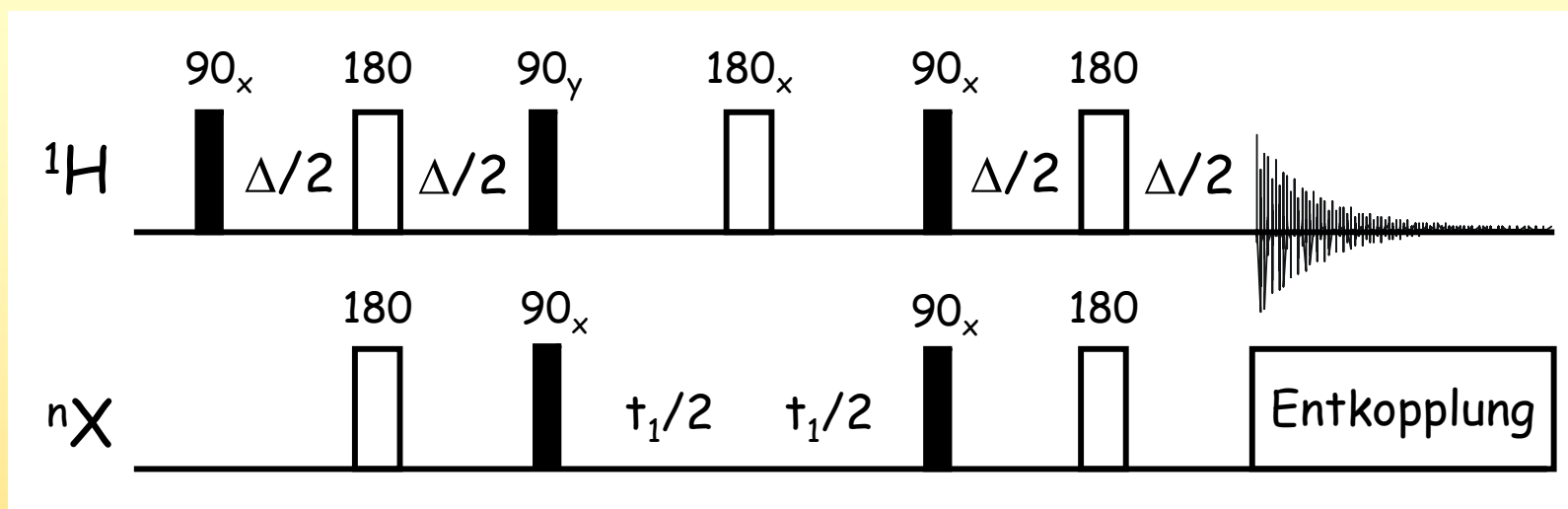
HSQC

HSQC

Bei den heteronuklearen Spektren von Proteinen ist eine Optimierung hinsichtlich der Relaxationseigenschaften und der Linienbreiten erforderlich, man nimmt daher bei ^{15}N ein HSQC statt eines HMQC auf



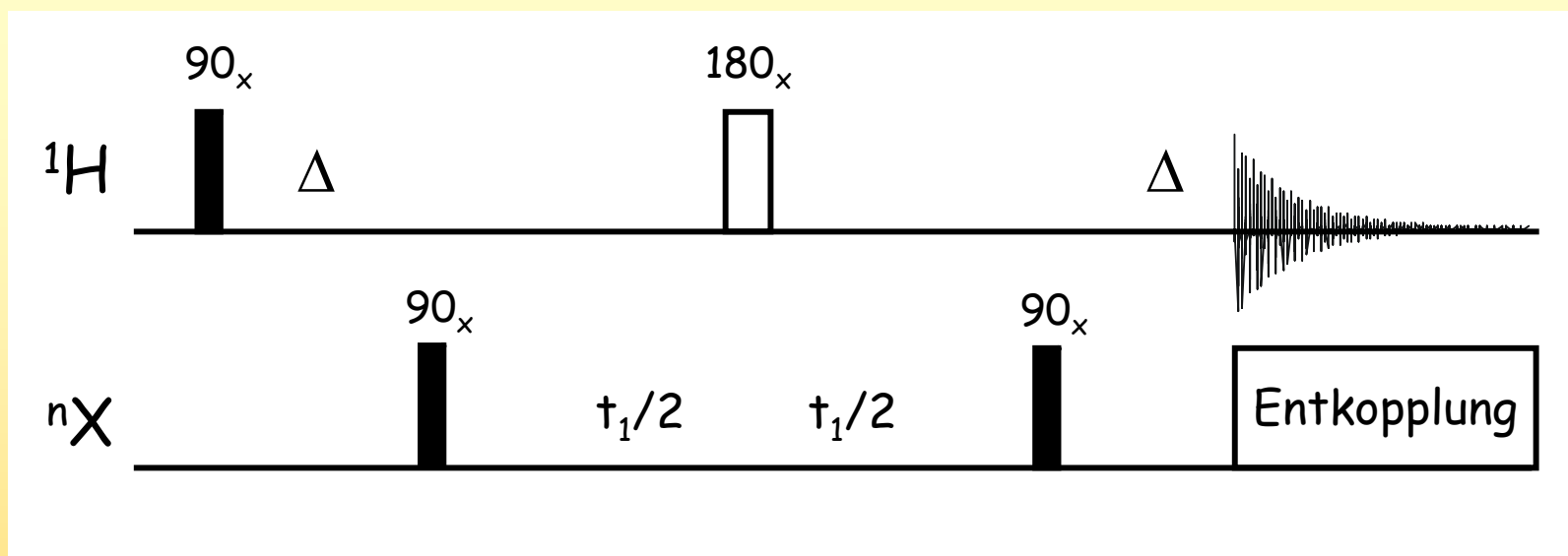
HSQC



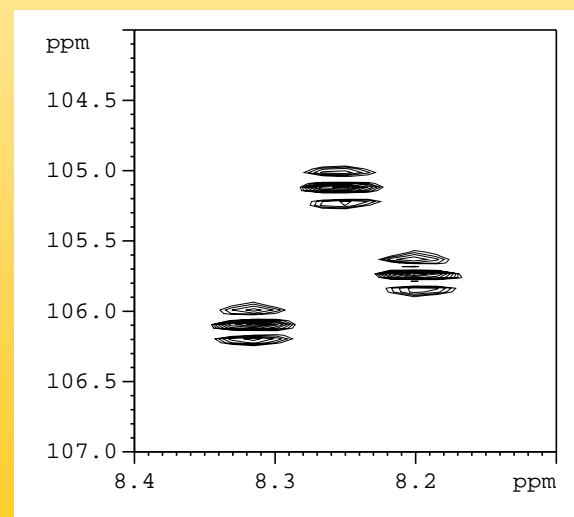
Heteronuclear Single Quantum Correlation

Die Zeit in der transversale Protonenmagnetisierung vorliegt ist von der Evolutionszeit unabhängig
 Es gibt in der Evolutionszeit keine Entwicklung von Protonen-Kopplung

HSQC



Bei sehr guter Auflösung sieht man die Aufspaltung im HMQC, die dadurch erzeugte Linienverbreiterung ist immer vorhanden



HSQC

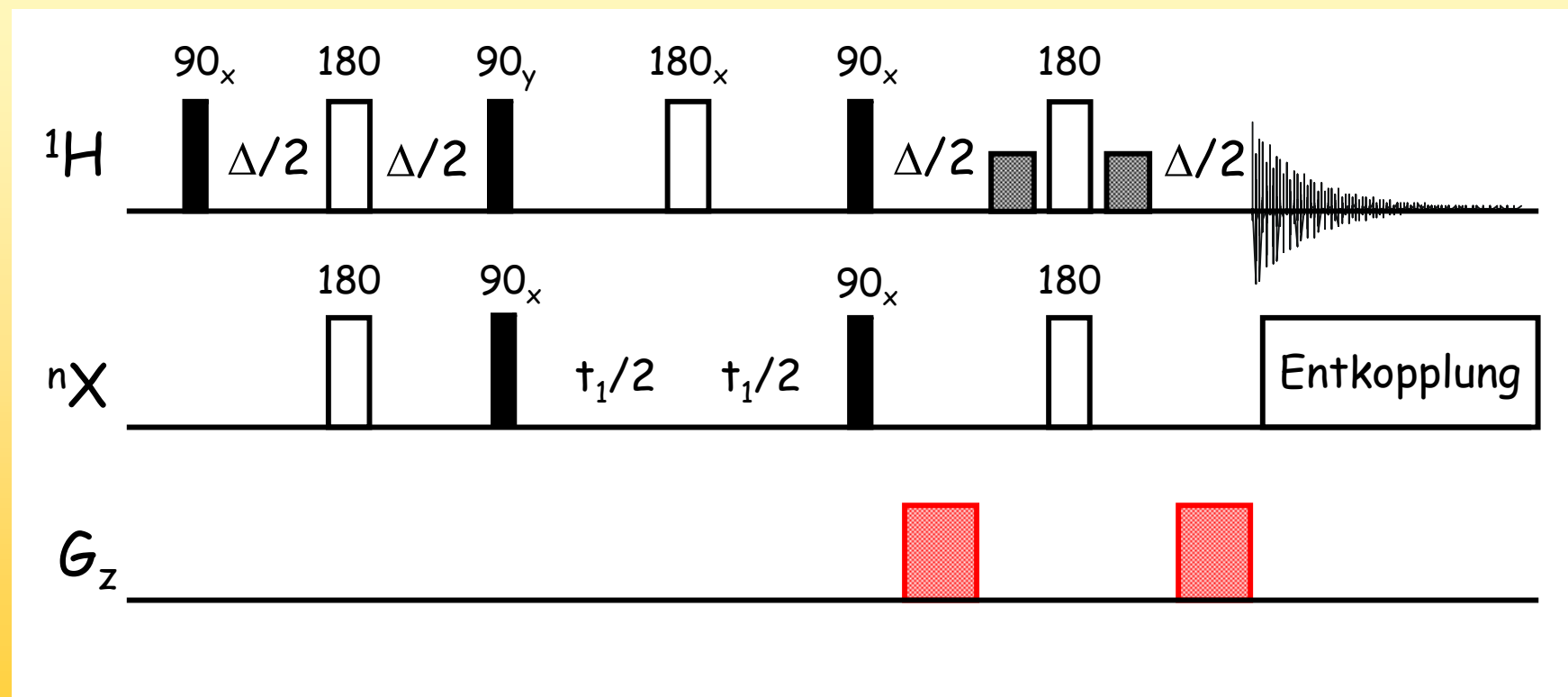
Sowohl HMQC als auch HSQC arbeiten mit Protonendetektion und damit höherer Empfindlichkeit

Das HMQC hat weniger Pulse und ist daher weniger fehleranfällig, vor allem bei ^{13}C kann das Vorteile haben

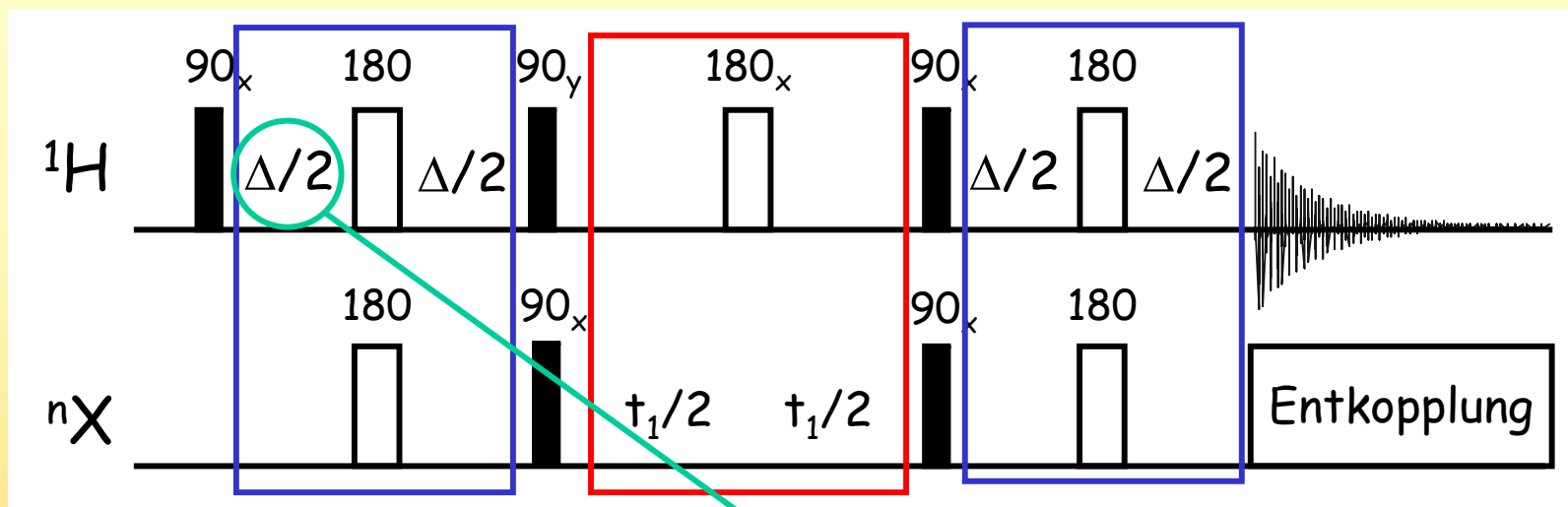
Beim HSQC ist die Implementierung einer Lösungsmittelunterdrückung günstiger, sehr gut funktioniert das mit der WATERGATE-Sequenz

HSQC

HSQC mit WATERGATE-Wasserunterdrückung



HSQC



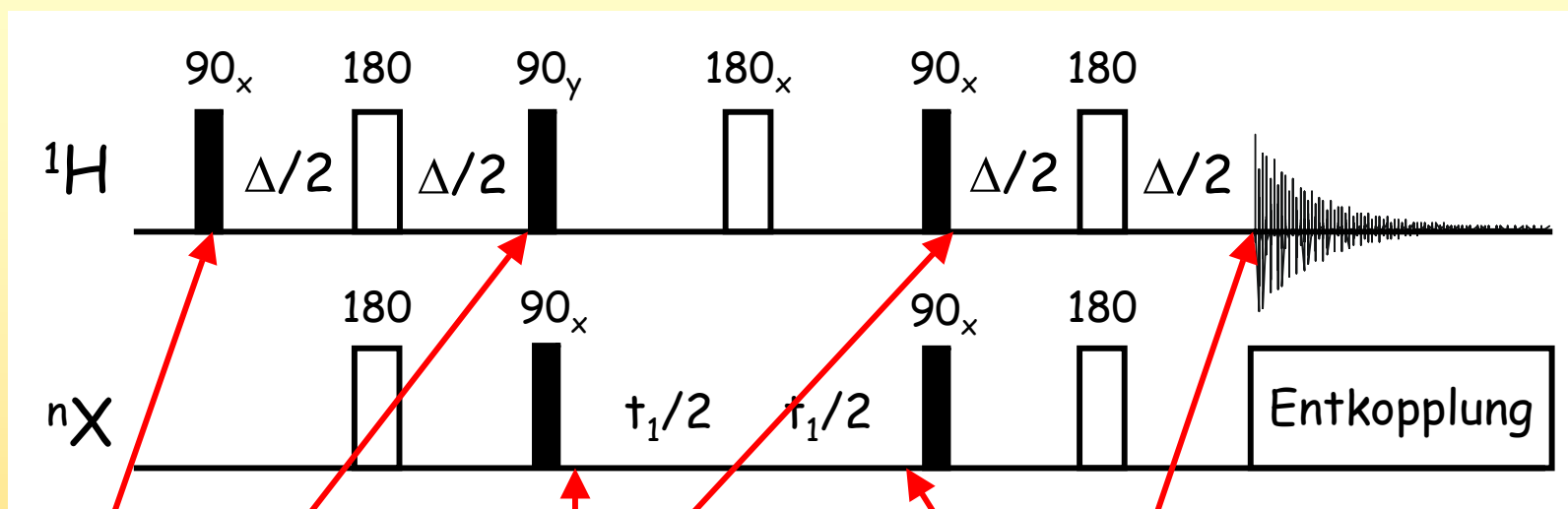
Kein δ_H , aber J_{HX}
 J_{HH} für kurze Δ
 vernachlässigbar

wie vorne

Kein δ_H , aber δ_X
 Keine J_{HH} und auch
 keine J_{HX}

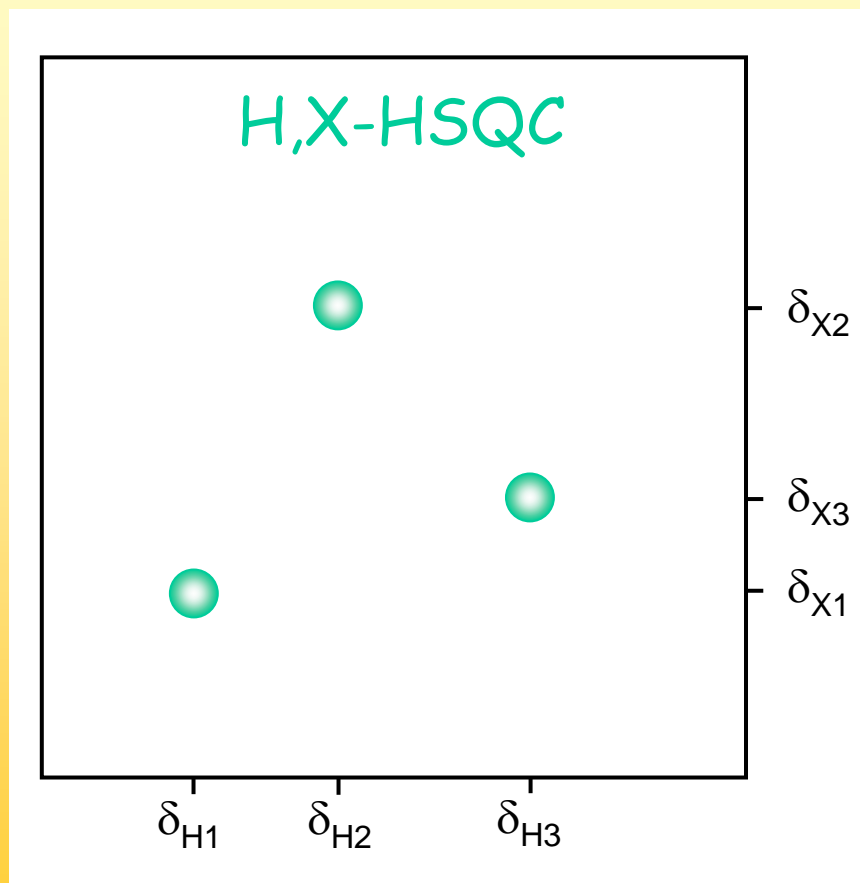
Δ wird wieder
 $1/2J_{\text{HX}}$ gesetzt

HSQC



$$\begin{aligned}
 H_z &\xrightarrow{90^\circ H_x} \xrightarrow{\pi J_{HX}\Delta} -H_y \cos \pi J_{HX}\Delta + 2H_x X_z \sin \pi J_{HX}\Delta = 2H_x X_z \\
 2H_x X_z &\xrightarrow[90^\circ X_x]{90^\circ H_y} 2H_z X_y \xrightarrow{2\pi\delta_X t_1} 2H_z X_y \cos 2\pi\delta_X t_1 \\
 &\xrightarrow[90^\circ X_x]{90^\circ H_y} 2H_x X_z \cos 2\pi\delta_X t_1 \xrightarrow{\pi J_{HX}\Delta} H_y \cos 2\pi\delta_X t_1
 \end{aligned}$$

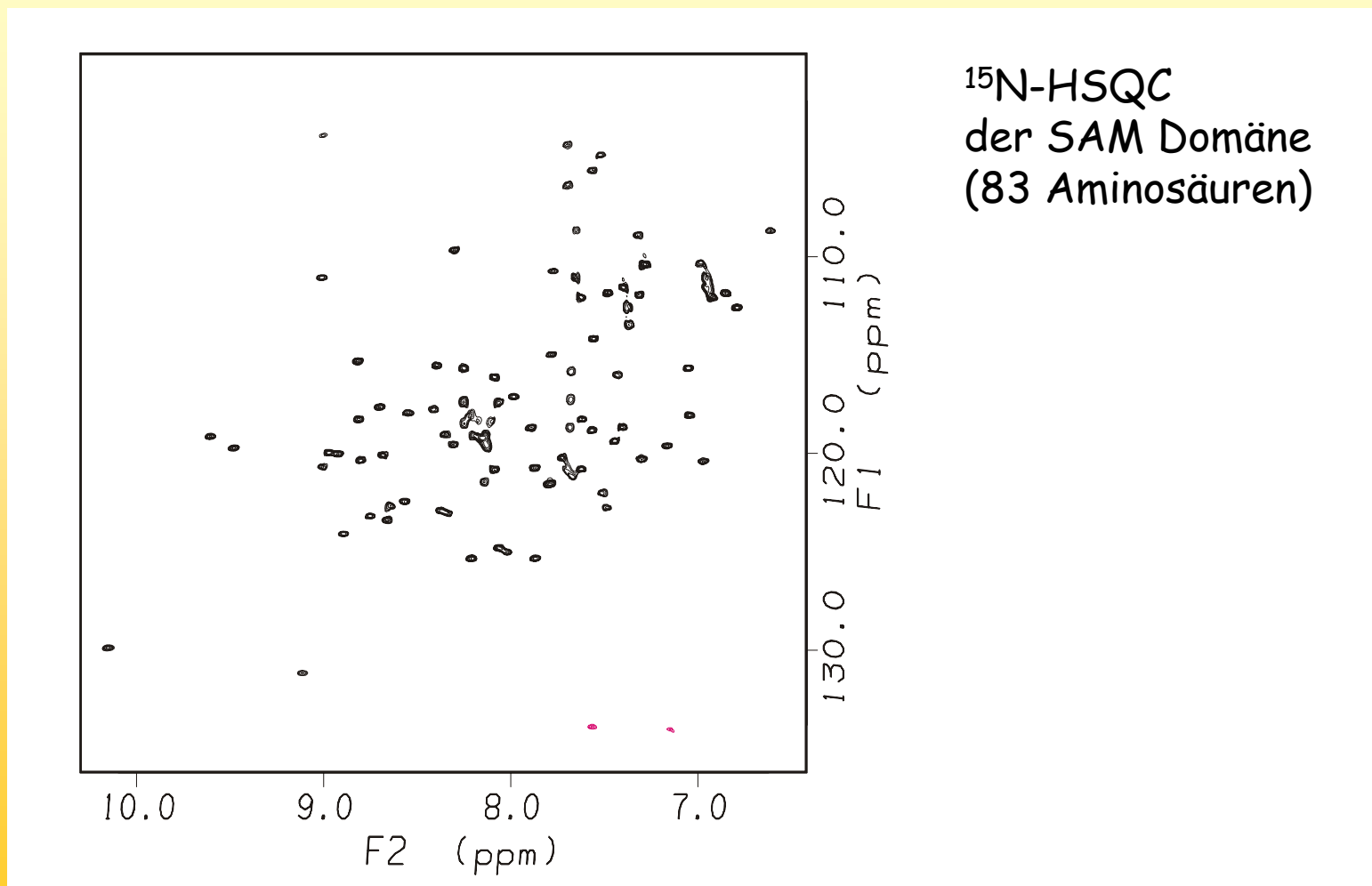
HSQC



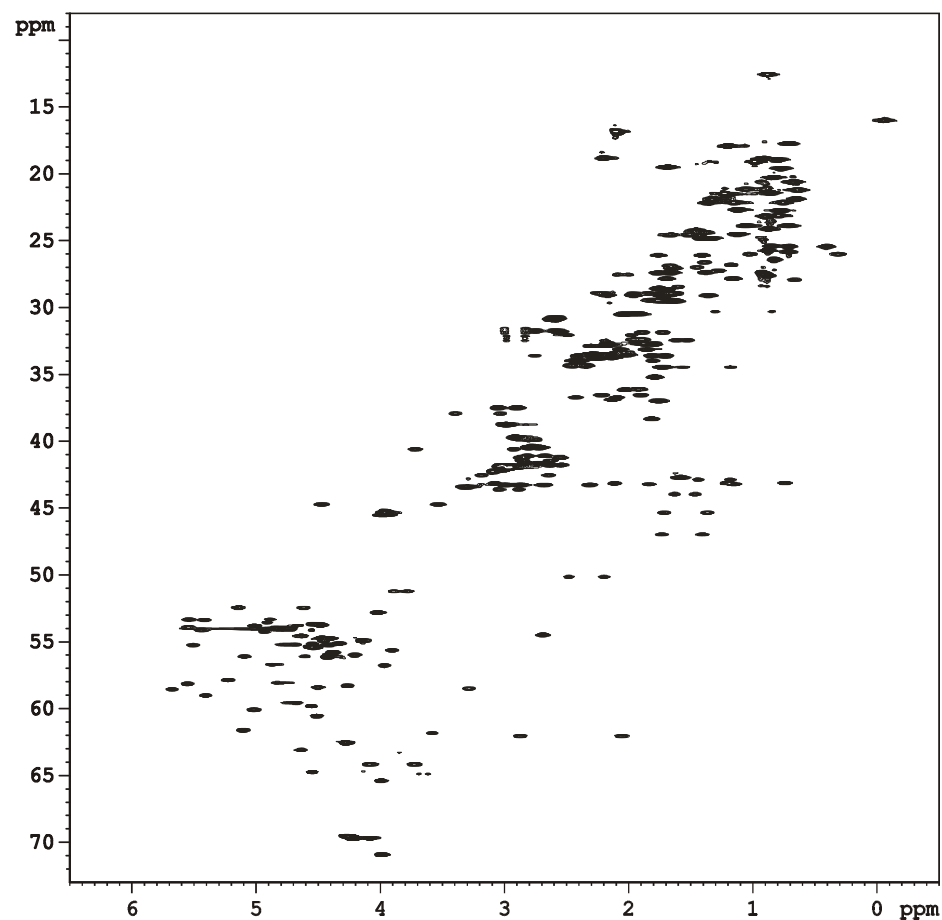
$$H_y \cos 2\pi\delta_x t_1$$

Nach Detektion und 2D-Fouriertransformation entsteht ein 2D-Spektrum mit δ_x in der indirekten Dimension und δ_H der daran gebundenen Protonen in der direkten Dimension

HSQC

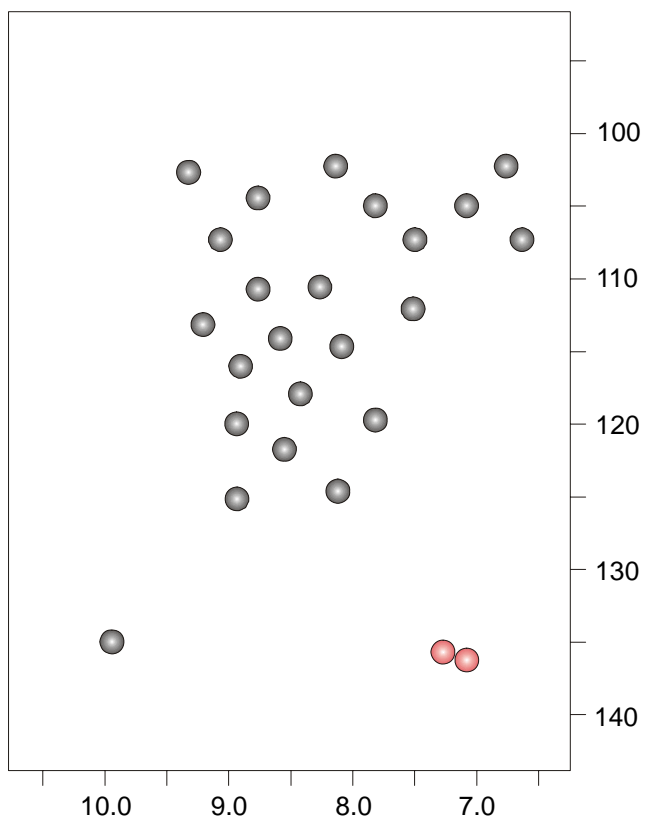
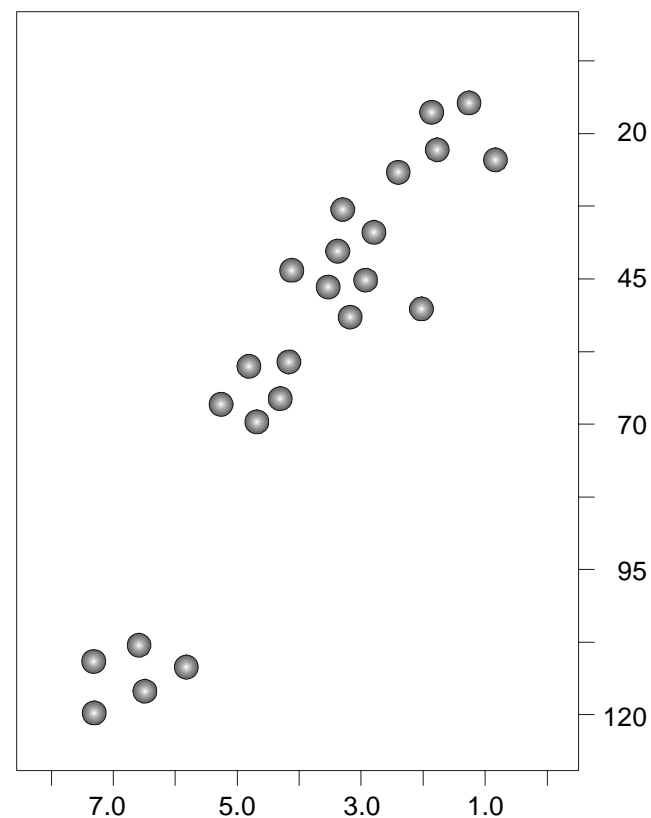


HSQC



^{13}C -HSQC
der SAM Domäne
(83 Aminosäuren)

HSQC

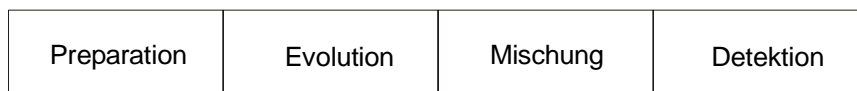
 $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC

Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie mit mehr als zwei Dimensionen

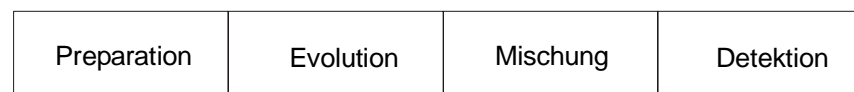
nD-NMR

Ein dreidimensionales Experiment entsteht formal durch Kombination von zwei zweidimensionalen Experimenten

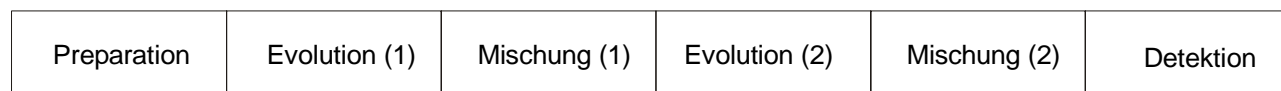
1. 2D-Sequenz



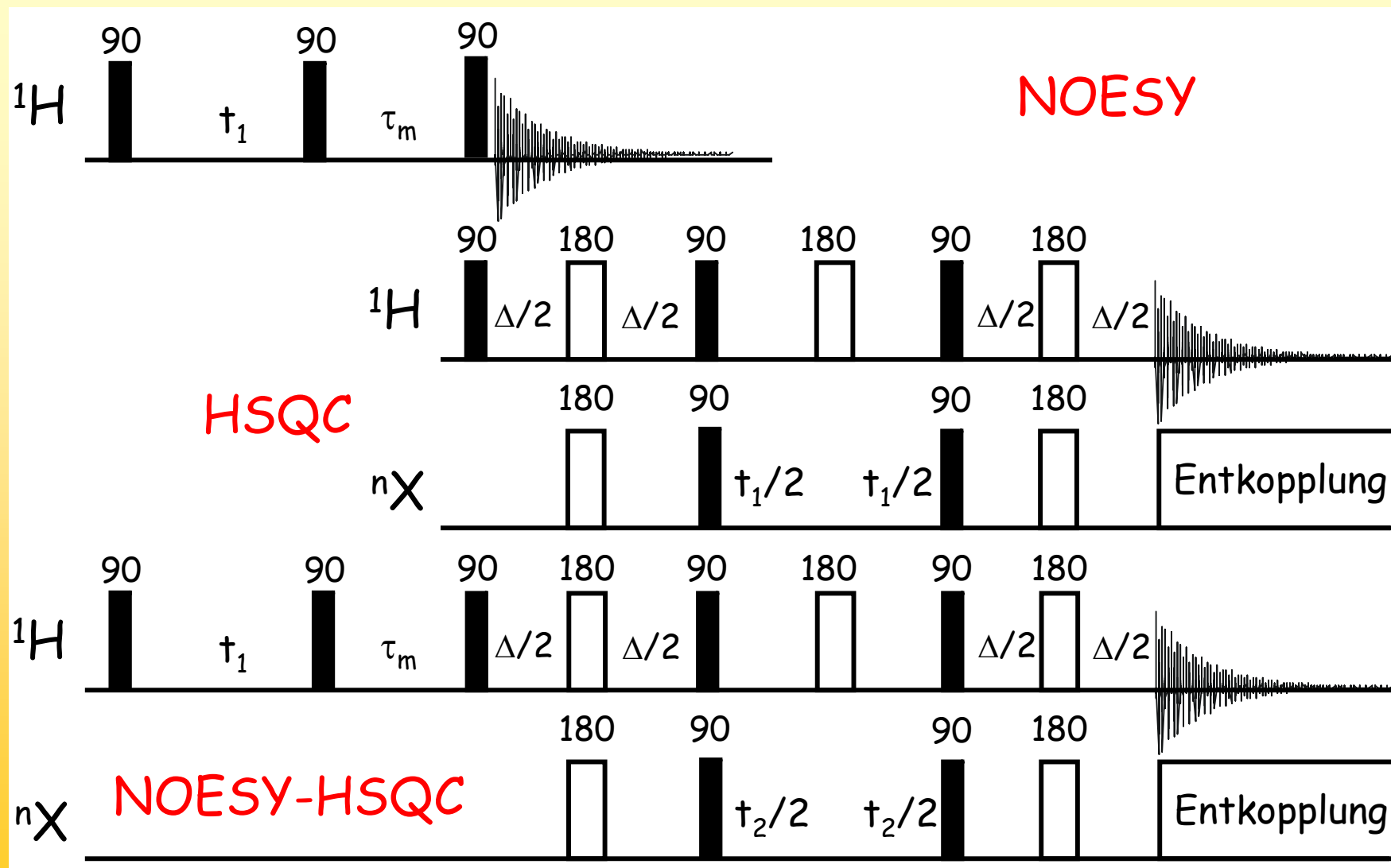
2. 2D-Sequenz



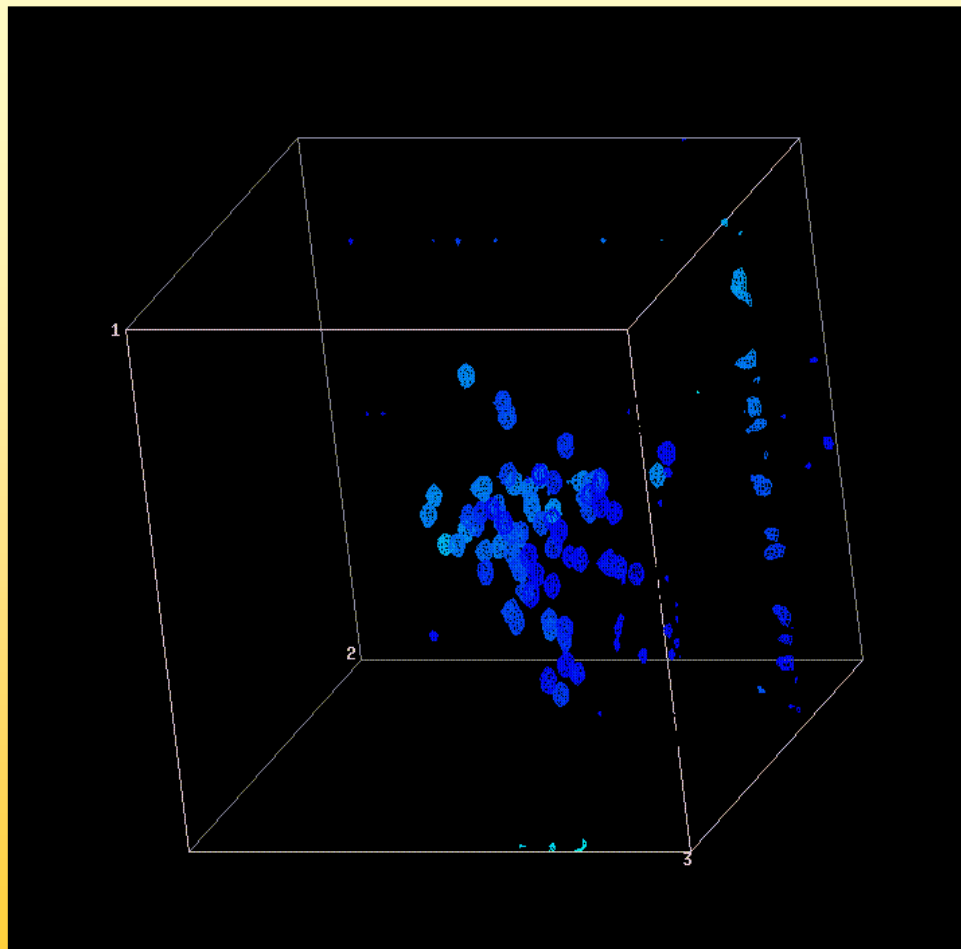
3D-Sequenz



nD-NMR

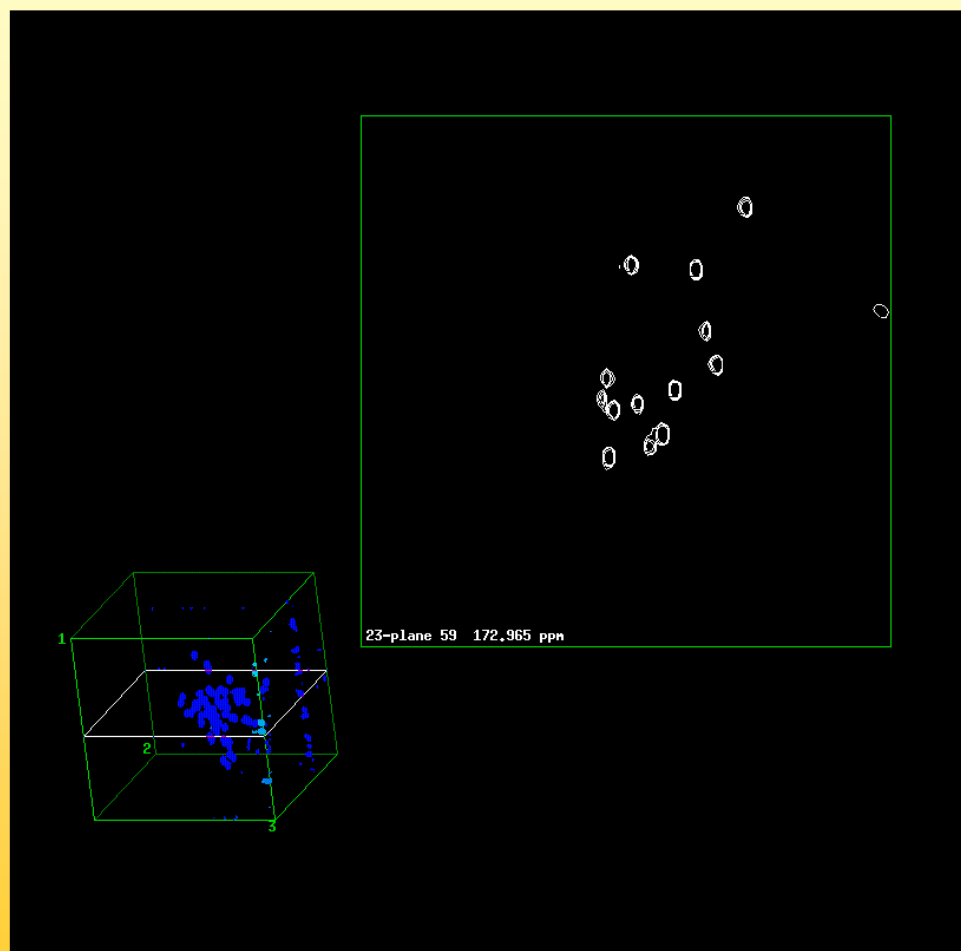


nD-NMR



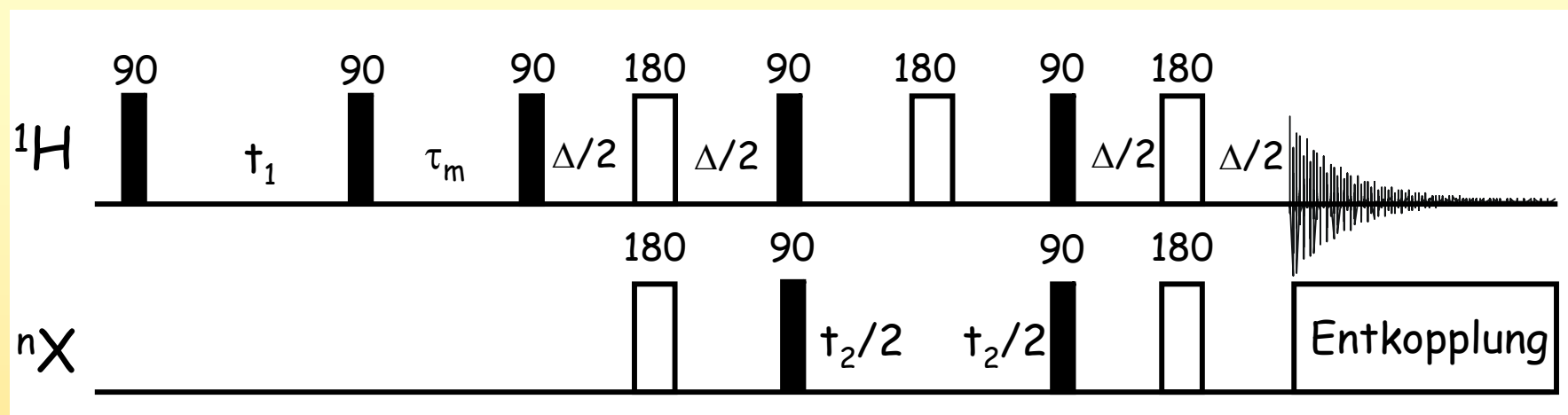
Das Spektrum ist dann
keine Fläche mit
Signalen mehr sondern
ein Würfel, mit drei
Achsen mit chemischer
Verschiebung.
Intensität zeigt sich als
„vierte Dimension“

nD-NMR



Da der Würfel nur schwer zu analysieren ist, schneidet man aus dem Würfel bei konstanter Frequenz in einer Dimension ein 2D-Spektrum heraus, das man als herkömmliches 2D analysiert

nD-NMR



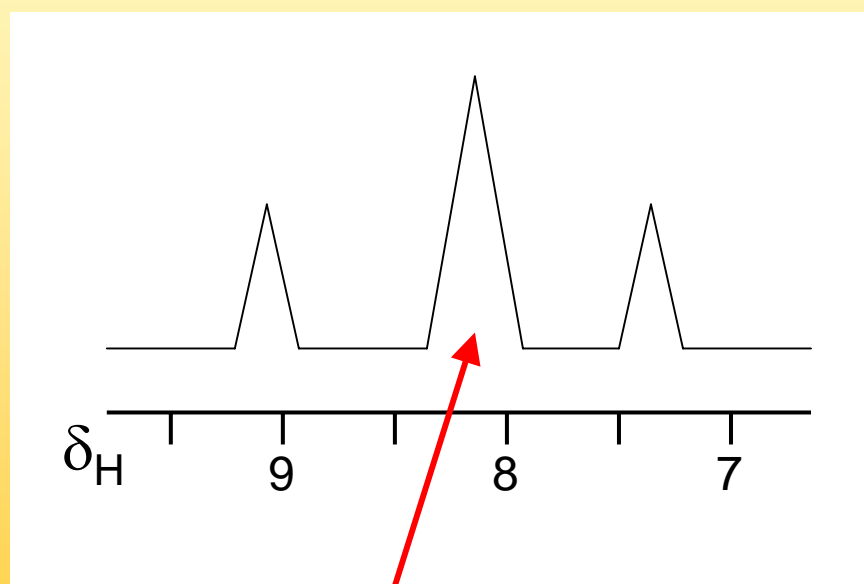
Ein Beispiel für ein 3D- Experiment ist das dreidimensionale

$n\text{X}$ -NOESY-HSQC

Es wird dazu verwendet die Überlagerung in den NOESY-Spektren, die sowohl bei der Zuordnung als auch bei der Abstandsbestimmung ein Problem ist aufzulösen

nD-NMR

Als Beispiel dient der Bereich der Aminoprotonen, in dem bei Proteinen immer Überlagerung auftritt

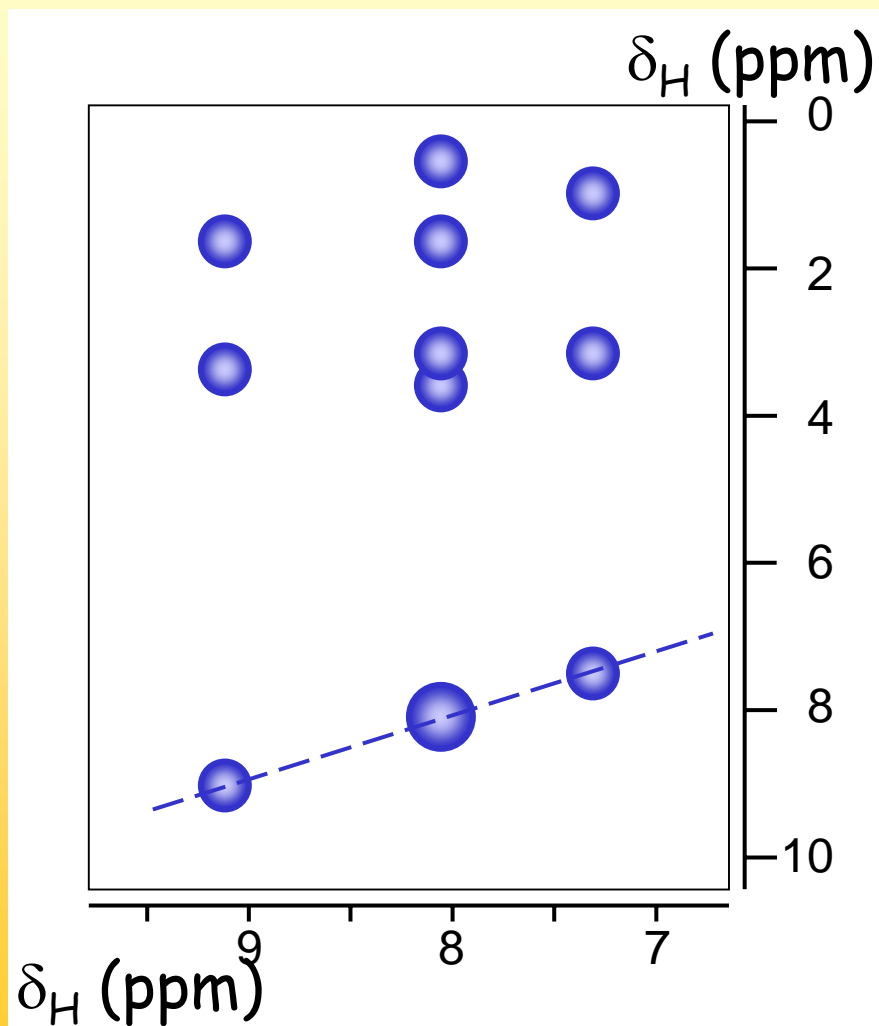


2 Signale

1D- ^1H -Spektrum

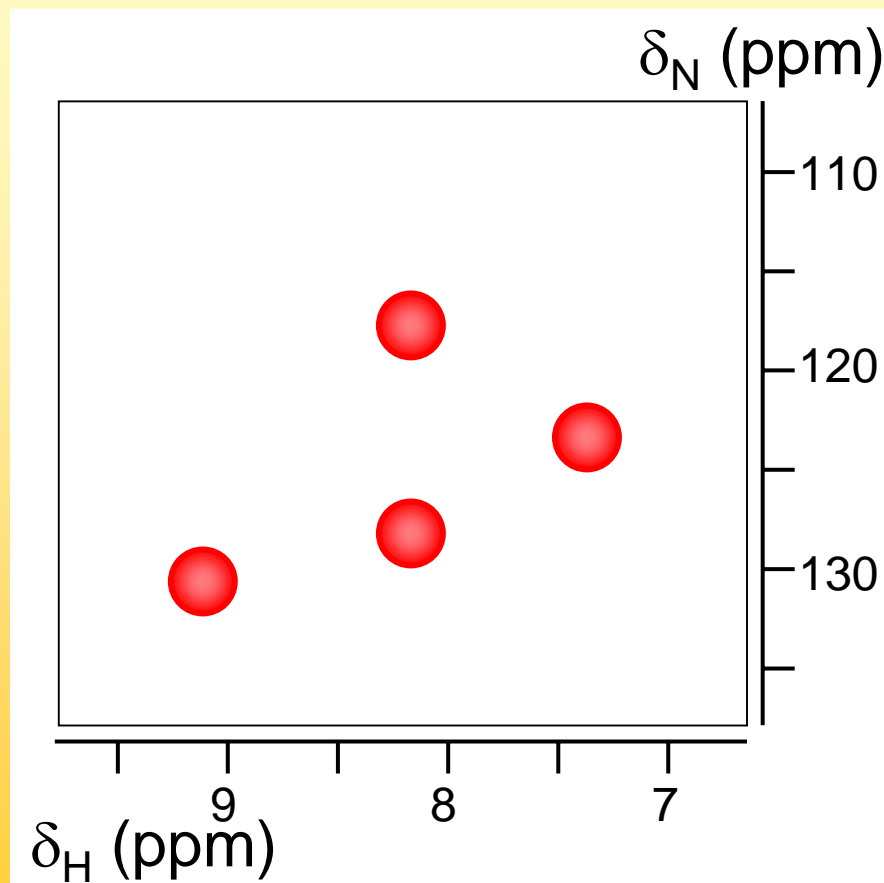
Bereich der Aminoprotonen
eines Proteins, 4 Signale
von denen 2 überlagert
sind

nD-NMR



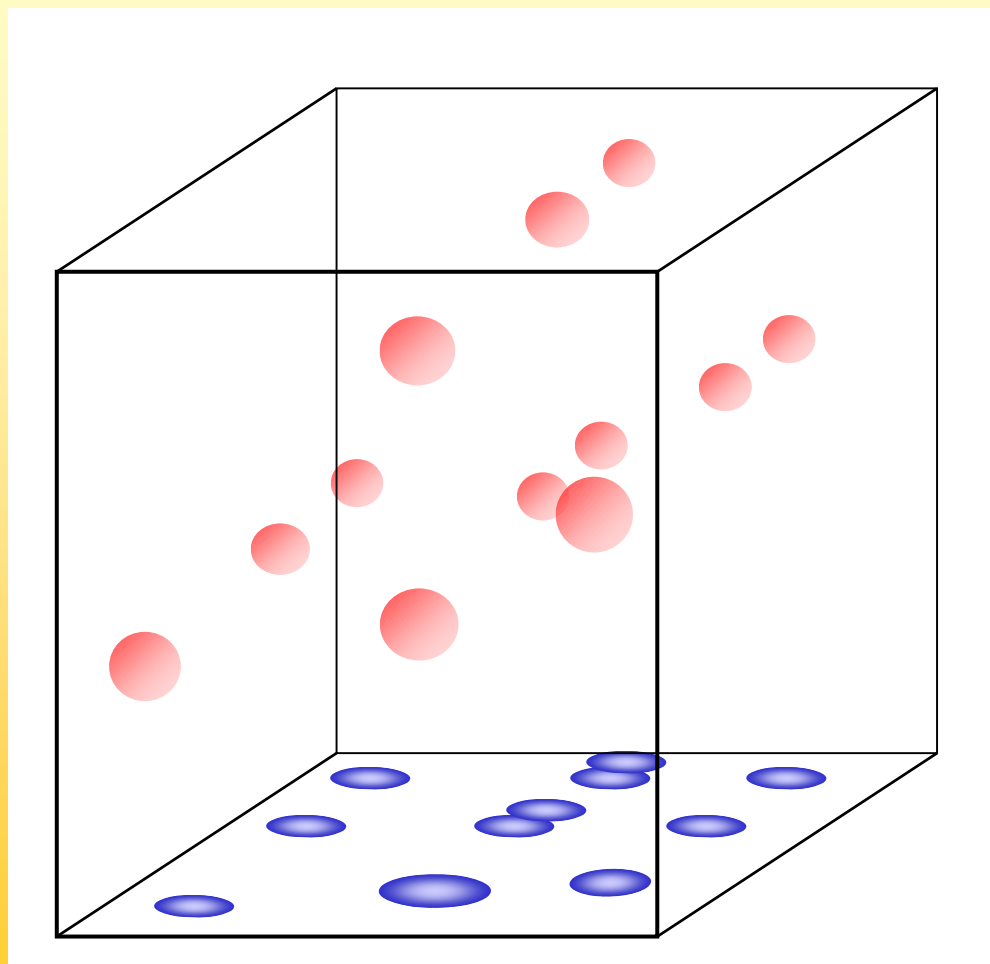
2D-NOESY-Spektrum:
Die Überlagerung im Bereich
der Seitenketten wird
aufgelöst, nicht aber im
Bereich der Aminoprotonen

nD-NMR



2D-¹⁵N-HSQC-Spektrum
Die Überlagerung im
Bereich der Aminoprotonen
wird aufgelöst

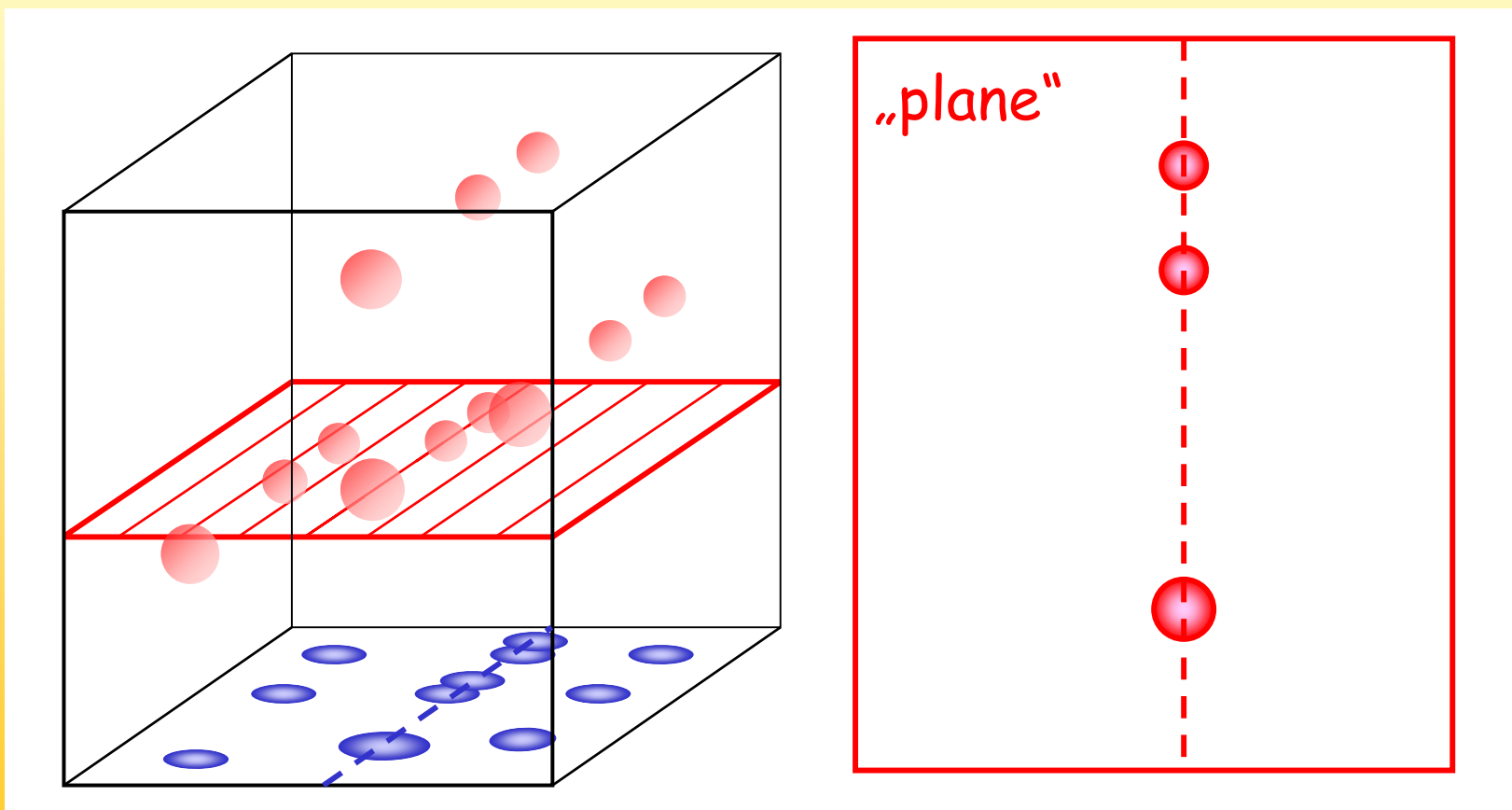
nD-NMR



Im 3D-Spektrum gibt
es dann keine
Überlagerung mehr
Zwei der drei
Seitenflächen
entsprechen genau den
zweidimensionalen
Experimenten

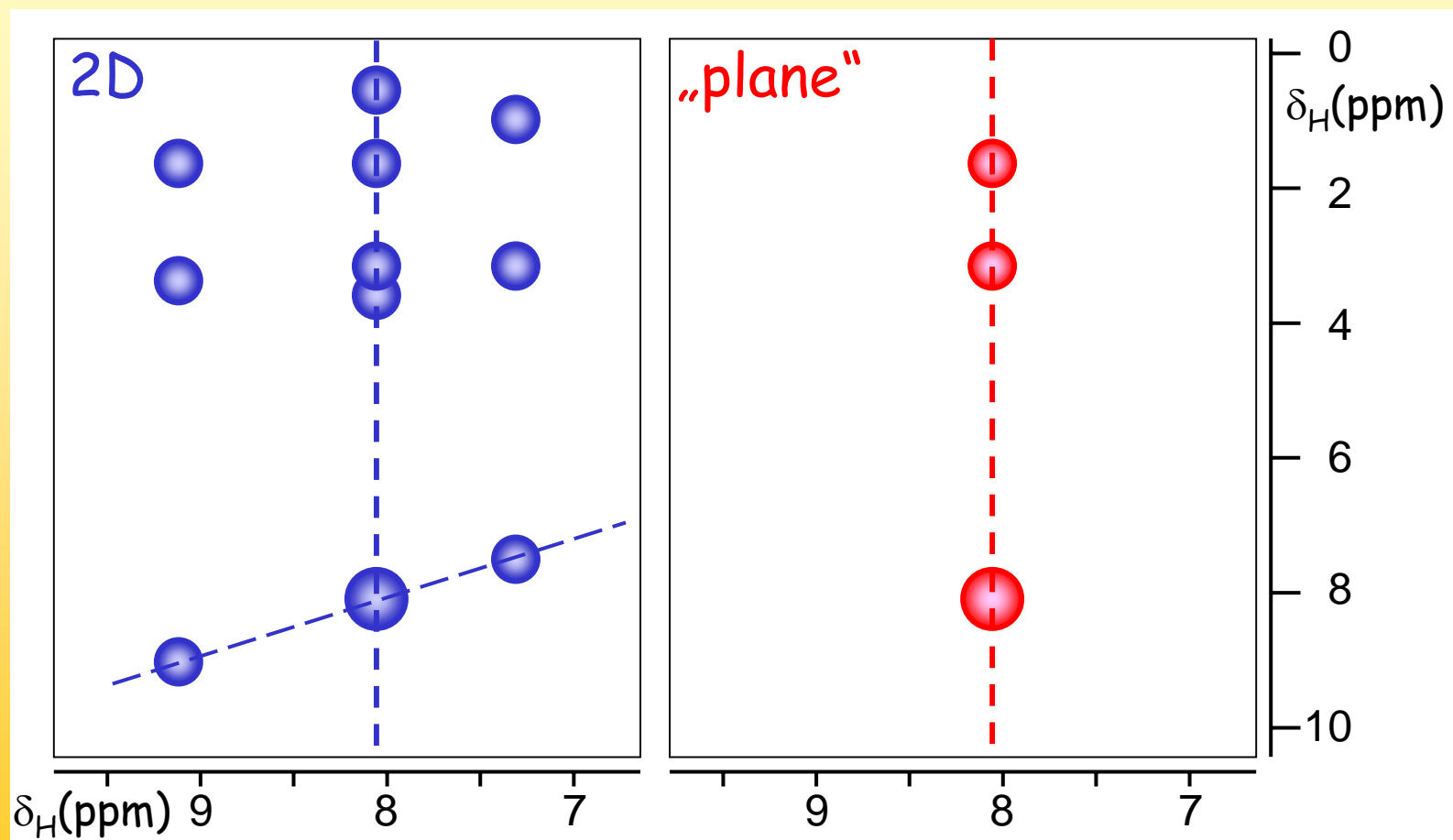
nD-NMR

Aus dem Würfel wird eine Ebene („plane“) extrahiert,
hier bei einer bestimmten ^{15}N -Verschiebung

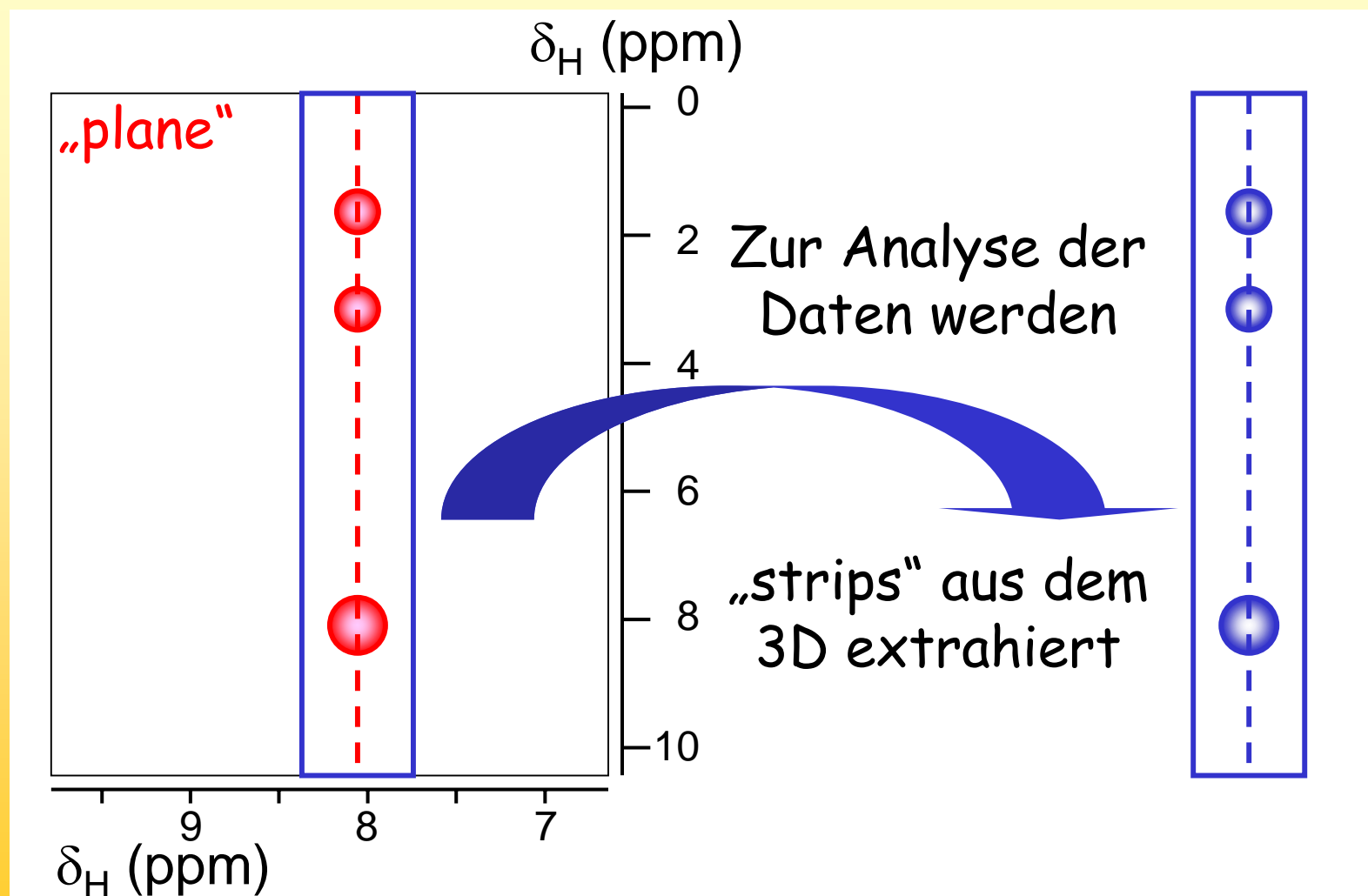


nD-NMR

Die Überlagerung ist verschwunden !

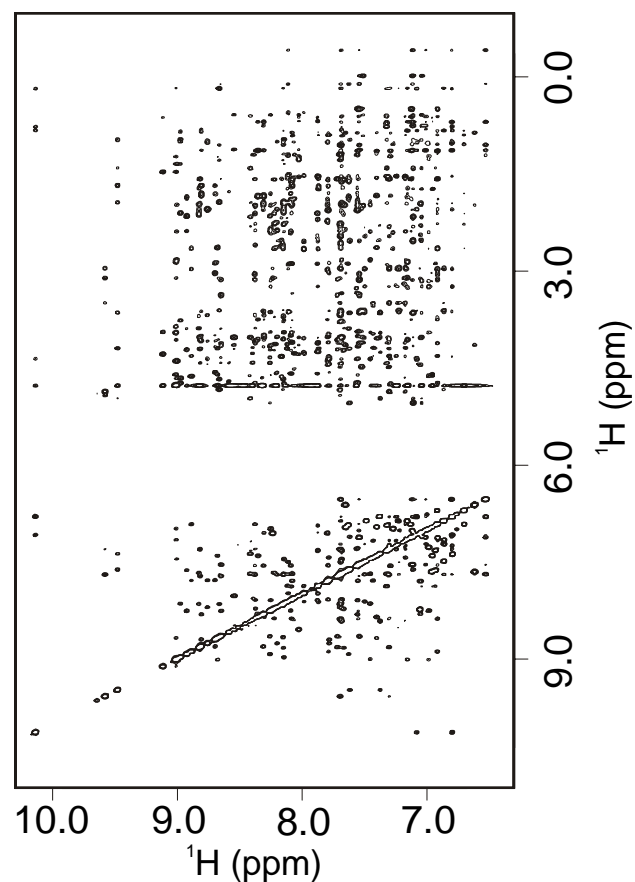


nD-NMR

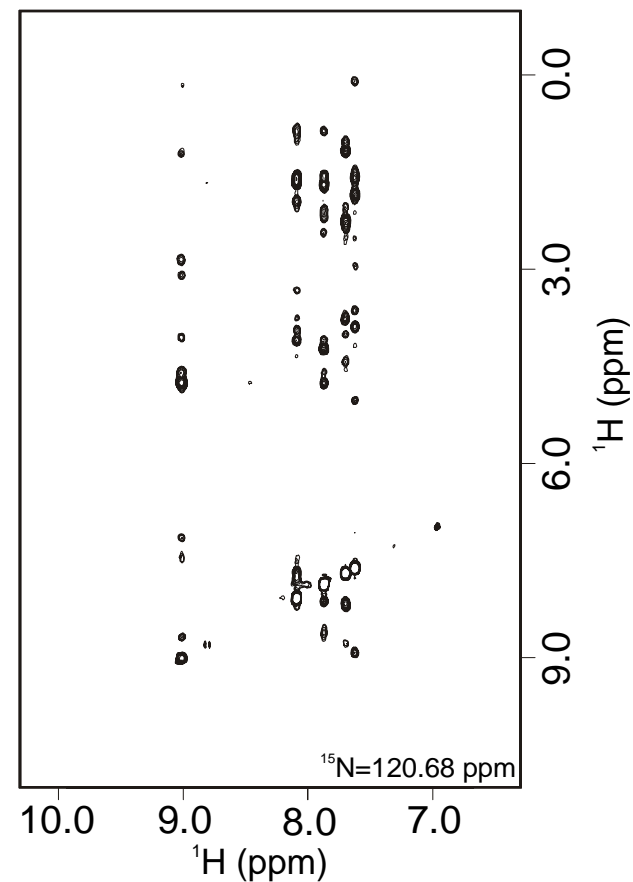


nD-NMR

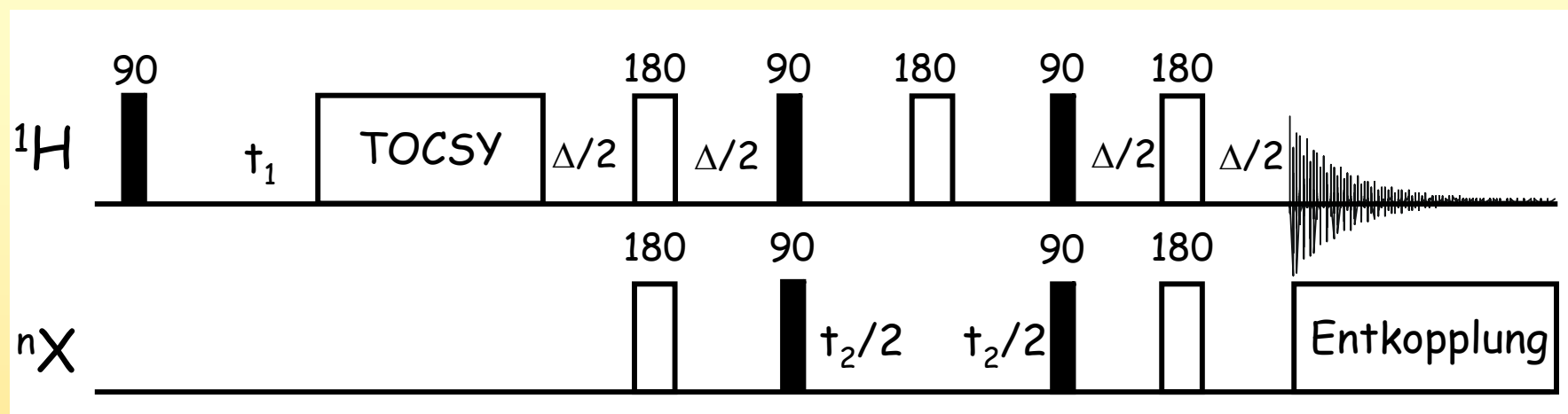
2D-NOESY



3D-NOESY



nD-NMR



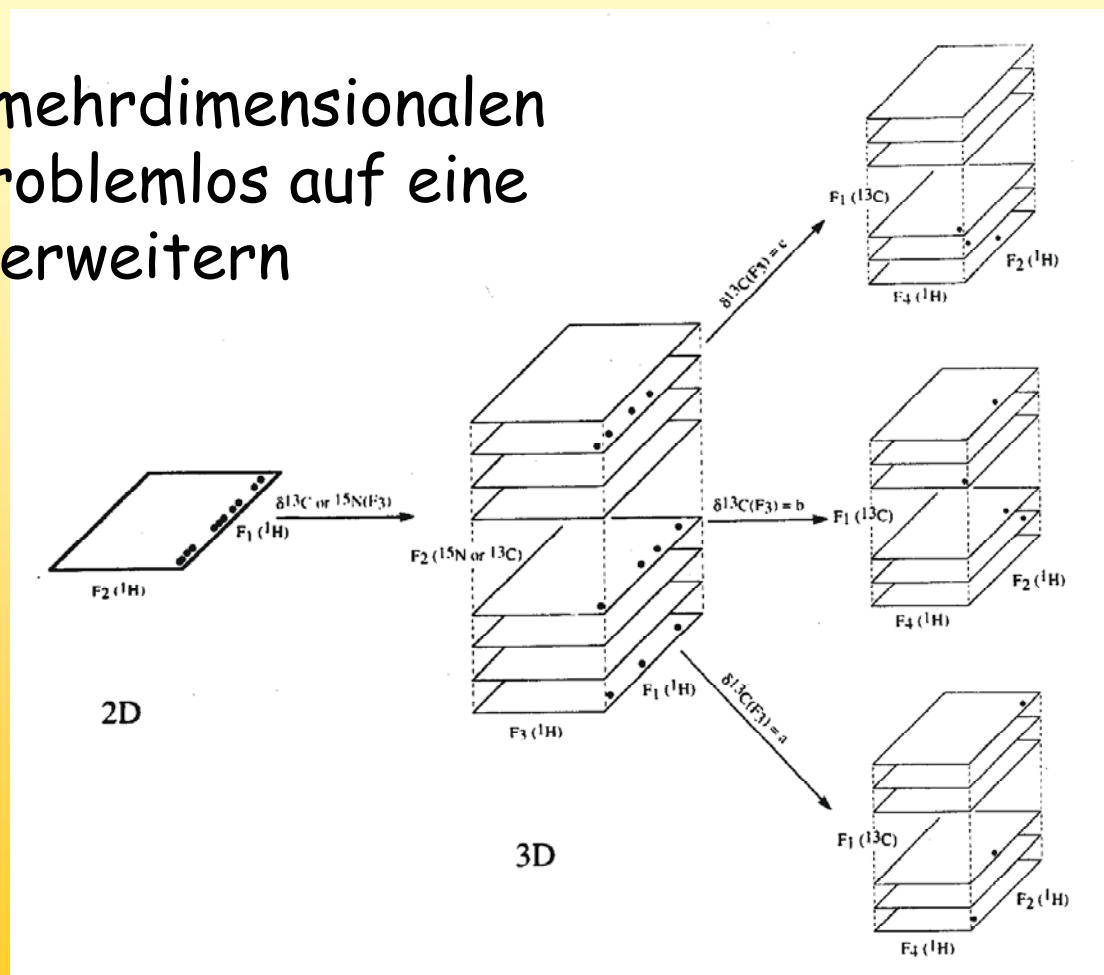
Genauso gibt es das dreidimensionale

^nX -TOCSY-HSQC

Auch hier die Überlagerung in den Spektren aufgelöst und die bekannte Strategie der sequenzspezifischen Zuordnung greift wieder

nD-NMR

Das Schema der mehrdimensionalen NMR lässt sich problemlos auf eine vierte Dimension erweitern

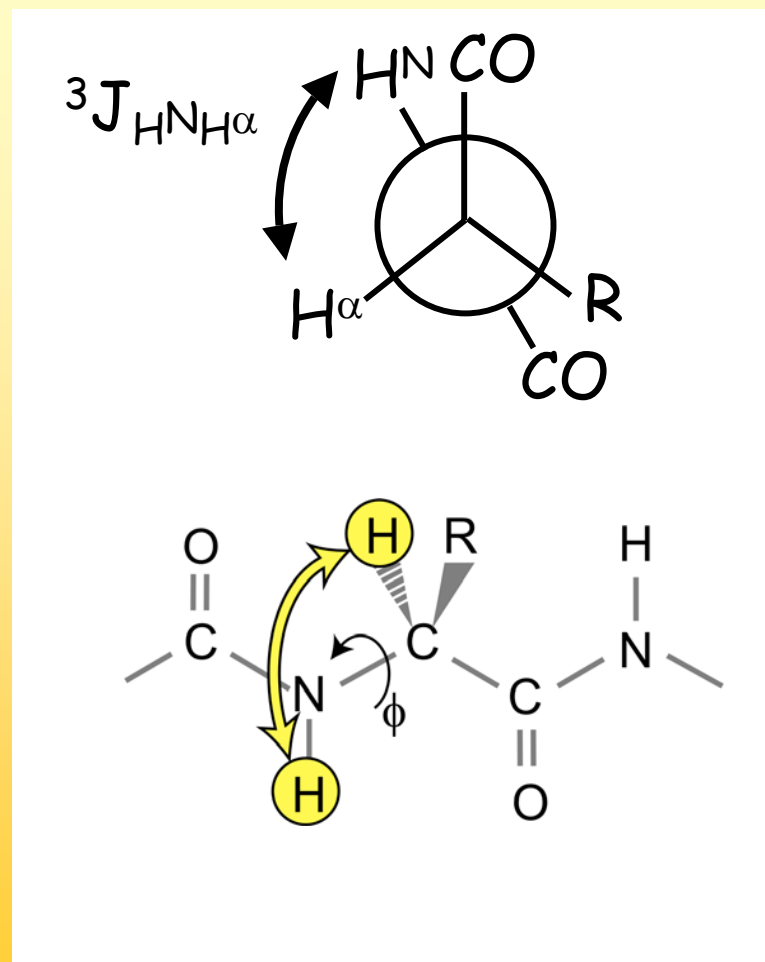


Bestimmung von $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ mit dem HSQC

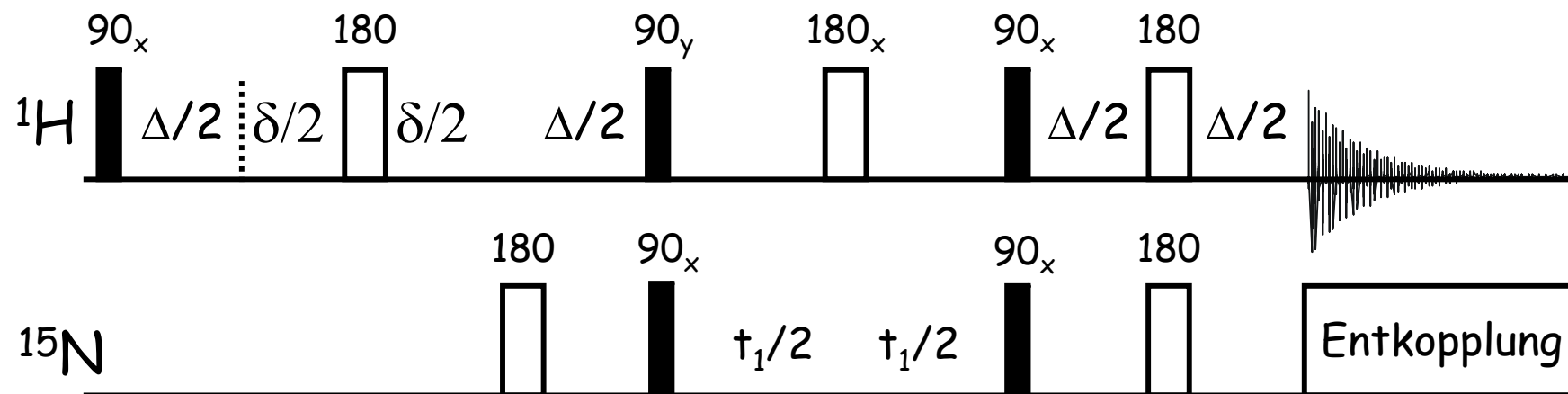
Bestimmung von $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ mit dem HSQC

Wir hatten schon gesehen, daß die $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ Kopplungskonstante wichtige Strukturinformation enthält.

Sie ist aber mit zunehmender Größe des Proteins und damit dem Versagen des DQF-COSY mit dem Experiment nur noch schwer zu bestimmen

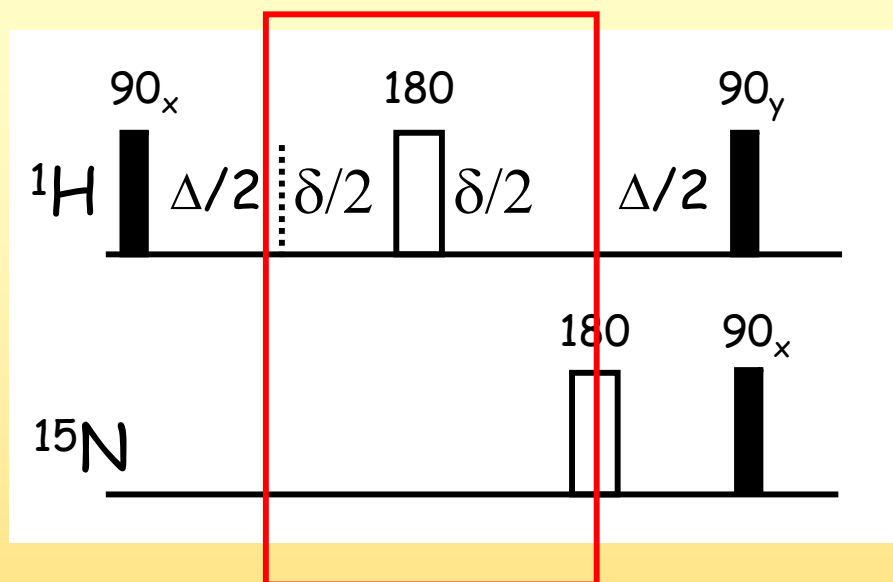


Bestimmung von $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ mit dem HSQC



Man nutzt daher das ^{15}N -HSQC zur Bestimmung der Kopplungskonstanten. Bisher hatten wir sie immer wegen der kurzen Wartezeiten vernachlässigt, macht man die Wartezeiten länger werden sie relevant.

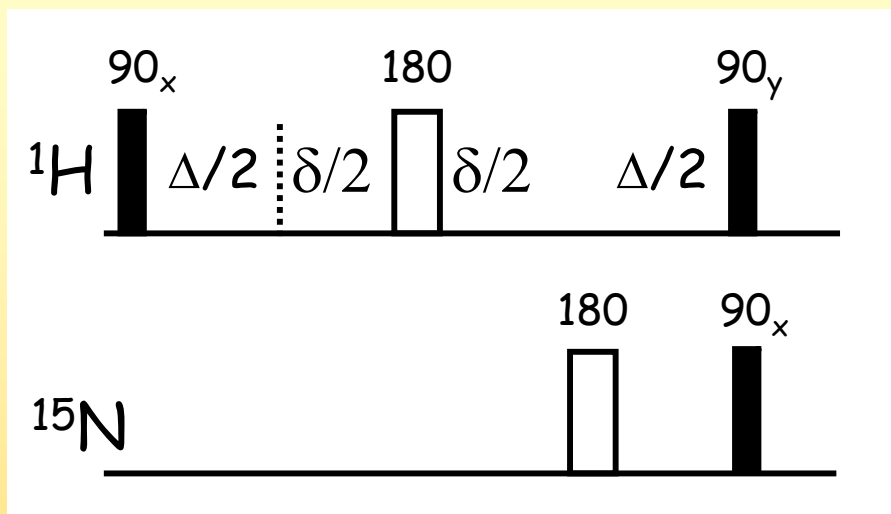
Bestimmung von $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ mit dem HSQC



Diesmal rechnen wir mit der $^3J_{\text{HH}}$, chemische Verschiebung entwickelt sich auch hier nicht

Heteronukleare Kopplung entwickelt sich nicht während der Wartezeit δ , sondern nur, wie gehabt während $\Delta/2$, am Ende haben wir mit $\Delta = 1/2J$ wieder antiphase-Magnetisierung

Bestimmung von ${}^3J_{\text{HNH}\alpha}$ mit dem HSQC



Am Ende rechnen wir also nur mit ${}^3J_{\text{HH}}$, die sich ungestört während $\Delta + \delta$ entwickelt

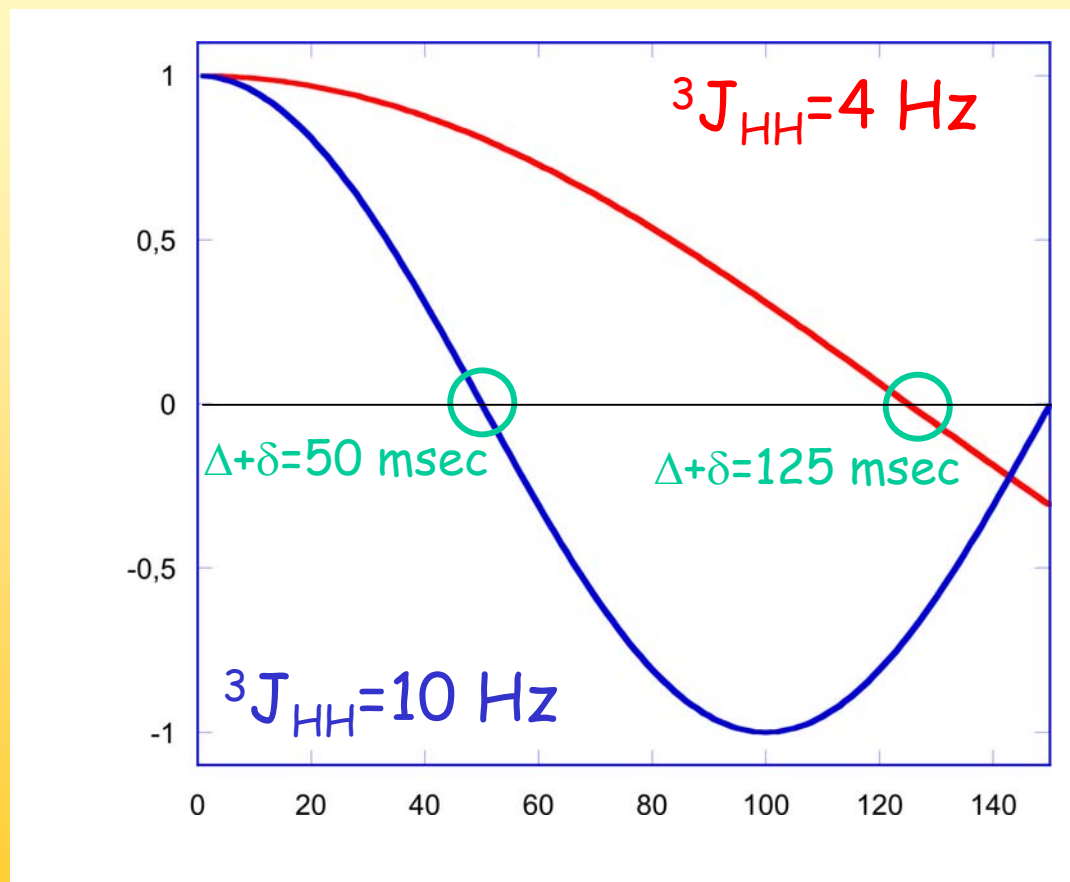
$$\begin{aligned}
 &H_{\text{Nz}} \xrightarrow{90^\circ H_x} \xrightarrow{\pi J_{\text{HH}}(\Delta + \delta)} 2H_{\text{Nx}} N_z \cos \pi J_{\text{HH}}(\Delta + \delta) - 4H_{\text{Ny}} N_z H_{\alpha z} \sin \pi J_{\text{HH}}(\Delta + \delta) \\
 &\xrightarrow[90^\circ X_x]{90^\circ H_y} 2H_{\text{Nz}} N_y \cos \pi J_{\text{HH}}(\Delta + \delta) - 4H_{\text{Ny}} N_y H_{\alpha x} \sin \pi J_{\text{HH}}(\Delta + \delta)
 \end{aligned}$$

führt am Ende zu Signal

nicht detektierbar

Bestimmung von $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ mit dem HSQC

Damit erscheint die Kopplung als Intensität im HSQC



Man nimmt nun eine Serie von HSQCs auf mit unterschiedlichen Werten für δ und erhält je nach Kopplungskonstante an verschiedenen Stellen einen Nulldurchgang

Bestimmung von $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ mit dem HSQC

Man bestimmt dann die Intensität der Signale in jedem HSQC und trägt gegen die verwendete Wartezeit auf. Daraus kann man mit einem einfachen fit die Nullstelle und damit die Kopplungskonstante bestimmen.

Die Auflösung im HSQC ist viel besser als im COSY und daher gibt es weniger Überlagerung, die Signale werden auf sehr empfindliche Art und Weise durch die $^1J_{\text{HN}}$ erzeugt, das Experiment funktioniert also auch bei größeren Proteinen

Liganden-„Screening“ mit dem HSQC

Screening

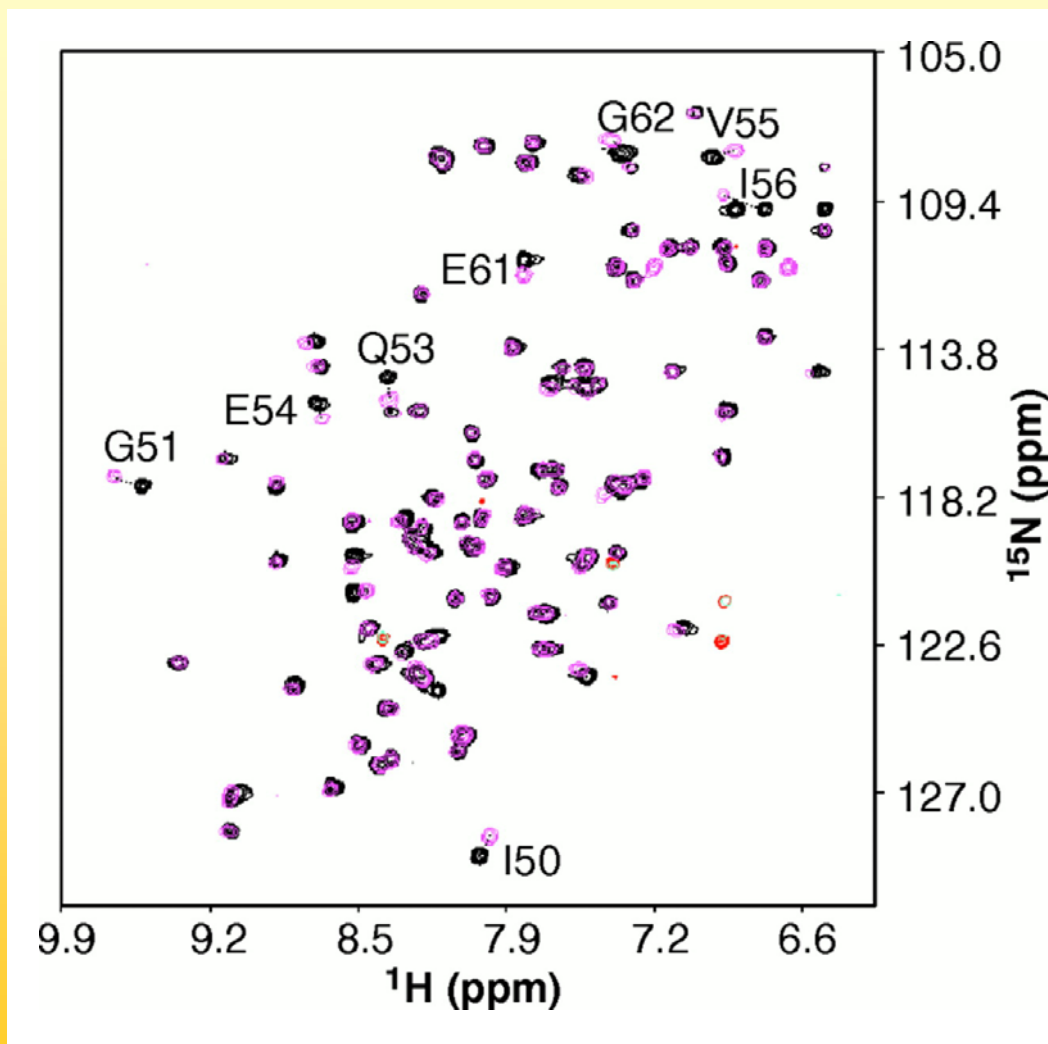
Eine weitere, zunehmend wichtigere Anwendung der NMR-Spektroskopie ist das „Screenen“ von Substanzbibliotheken zur Identifizierung von Leitstrukturen für Pharmaka

Dazu gibt es inzwischen zahlreiche Verfahren, eines davon ist das sogenannte

„SAR-by-NMR“

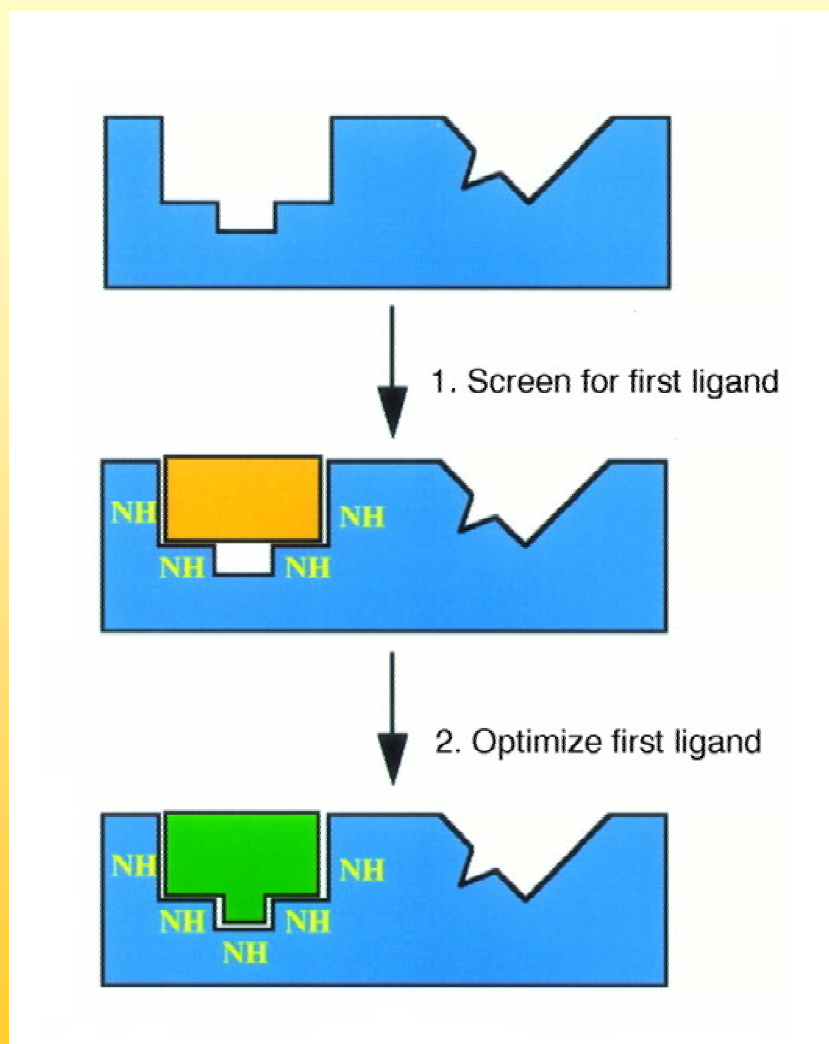
Verfahren. Ausgangspunkt ist dabei ein vollständig zugeordnetes ^{15}N -HSQC Spektrum

Screening



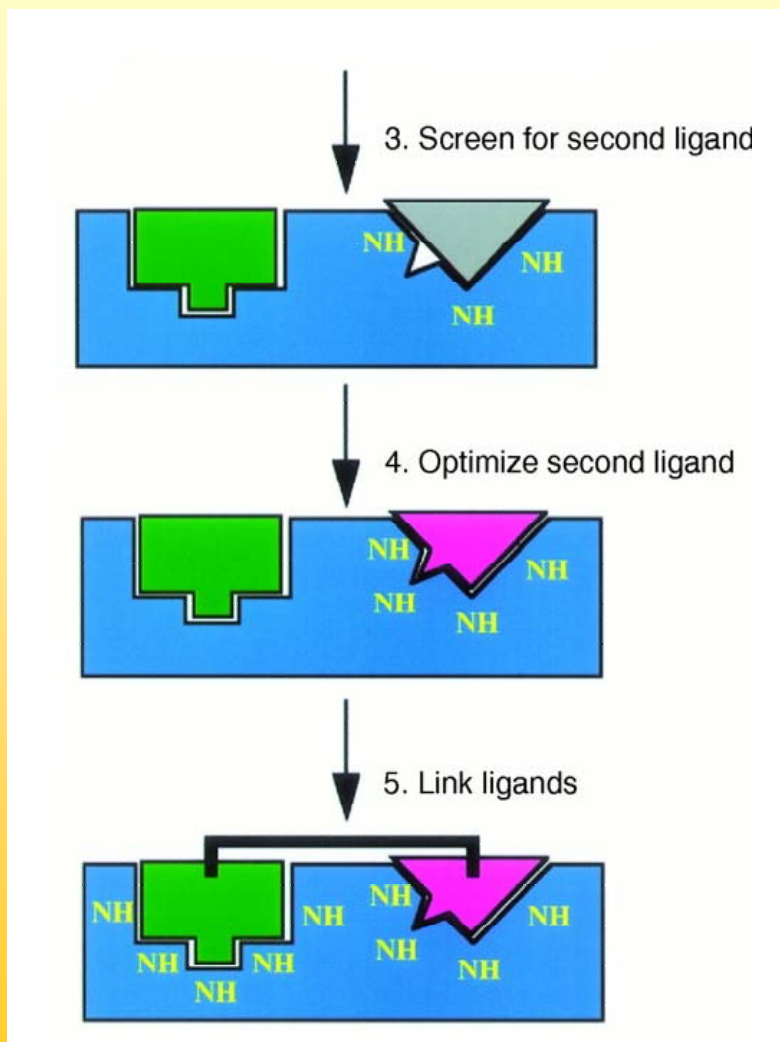
HSQC-Spektren
mit und ohne
potentiellem
Liganden werden
verglichen
Das ist auch als
„high-throughput“
Verfahren
möglich

Screening



Damit wird ein erster Ligand identifiziert, der dann mit Synthese oder gezielter Suche noch optimiert werden kann

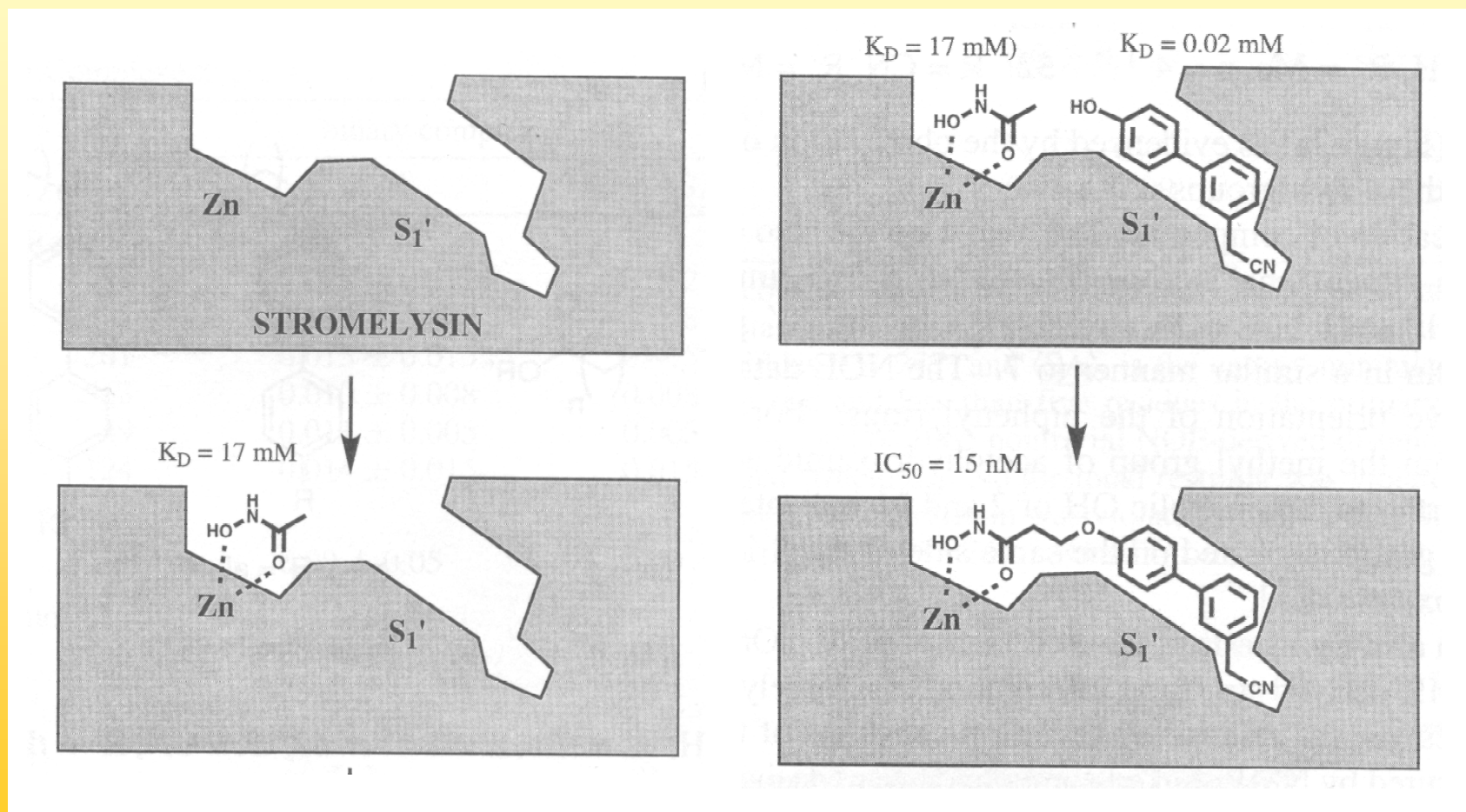
Screening



Dann wird ein zweiter Ligand identifiziert, der wiederum optimiert werden kann und dann mit dem ersten verknüpft wird

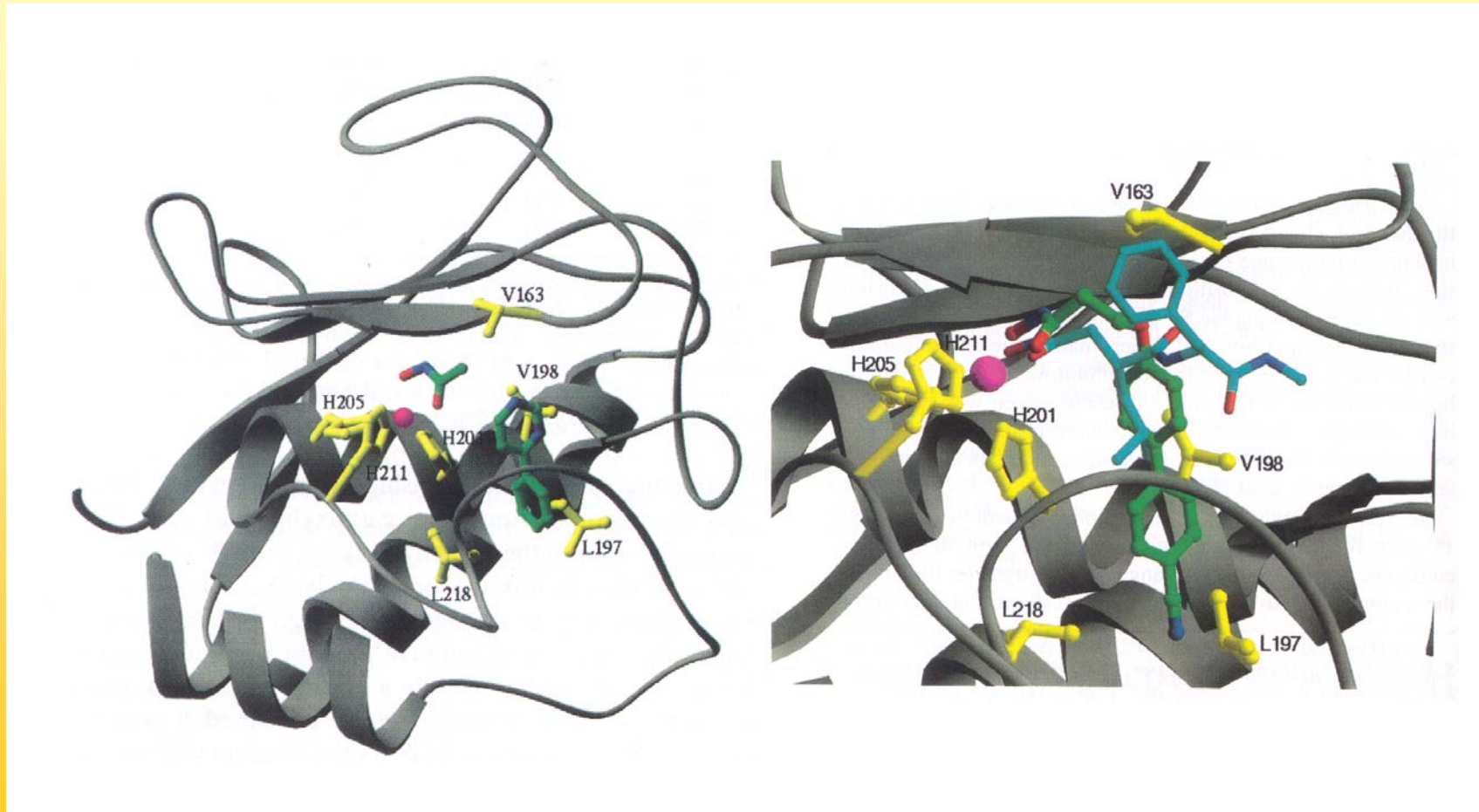
Screening

Anwendung auf einen Inhibitor von Stromelysin



Screening

Anwendung auf einen Inhibitor von Stromelysin



Screening

Neben dem „Screening“ kann das gleiche Experiment natürlich auch zum Studium von Protein-Ligand-Wechselwirkungen genutzt werden.

Dann wird nur ein, schon bekannter Ligand eingesetzt und die Bindungsstelle und gegebenenfalls auch die Bindungskonstante bestimmt.

Neben dem Screening mit dem HSQC gibt es noch zahlreiche andere NMR-Screening-Techniken, die eine Veränderung an den Liganden nutzen um die Bindung zu detektieren

Zusammenfassung

Was haben wir uns heute angeschaut:

Lösungsmittelunterdrückung

Proteine und die sequenzspezifische Zuordnung

HSQC

Dreidimensionale NMR: NOESY-HSQC

Kopplungskonstanten mit dem HSQC

Screening mit dem HSQC

That's it for today

Nächstes Mal:
Tripelresonanzexperimente
TROSY