

4.5 Strukturbestimmung in Proteinen

Strukturelle und dynamische Eigenschaften von Proteinen gehören zu den wichtigsten Anwendungen der magnetischen Resonanz. Da Proteine relativ komplexe Moleküle sind ist es hier in den meisten Fällen nicht möglich, eindimensionale Spektren überhaupt zuzuordnen. Man verwendet für diese Untersuchungen unterschiedliche mehrdimensionale Experimente (meist 2D, 3D). Hier sollen die beiden wichtigsten (und ältesten) kurz diskutiert werden.

4.5.1 Evolution schwach gekoppelter Spins

In Kapitel 3.5.2 hatten wir anhand eines speziellen Falles besprochen, wie man die Evolution schwach gekoppelter Spins mit

$$\mathcal{H} = \sum_i \omega_i I_{iz} + \sum_{ij} J_{ij} I_{iz} I_{jz} .$$

und $|\omega_i - \omega_j| \gg J_{ij}$ (bzw. $\omega_{D,ij}$) auch ohne explizite Matrixdarstellung berechnen kann. Wir haben dort direkt die Bewegungsgleichung

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(t) = -i [\mathcal{H}, \rho(t)]$$

ausgewertet. Das ist immer dann besonders einfach, wenn Anfangszustand $\rho(0) = A$ und Hamiltonoperator $\mathcal{H} = b B$ zyklisch vertauschen, d.h. wenn gilt

$$[A, B] = i C, \quad [B, C] = i A, \quad \text{etc.}$$

Unter diesen Bedingungen ist die Dichtematrix nach einer Zeit t gegeben durch

$$\rho(t) = A \cos (b t) - C \sin (b t)$$

Dies zeigt man, indem man diese Lösung in beide Seiten der Bewegungsgleichung einsetzt. Der Kommutator liefert

$$\begin{aligned} -i [\mathcal{H}, \rho(t)] &= -i [b B, A \cos (b t) - C \sin (b t)] \\ &= -i b [B, A] \cos (b t) + i b [B, C] \sin (b t) \\ &= -i b (-i C) \cos (b t) + i b (i A) \sin (b t) \\ &= -b C \cos (b t) - b A \sin (b t) \end{aligned}$$

und ist offenbar gleich der zeitlichen Ableitung der Lösung

$$\frac{\partial}{\partial t} \rho(t) = \frac{\partial}{\partial t} (A \cos (b t) - C \sin (b t)) = -b A \sin (b t) - b C \cos (b t)$$

Die Sandwichrelation

$$\exp(-ibBt) A \exp(ibBt) = A \cos bt - i [B,A] \sin bt$$

schreibt man oft symbolisch als

$$A \xrightarrow{bBt} A \cos bt - C \sin bt$$

Da praktisch jedes Experiment mit einem HF-Puls auf die Gleichgewichtsmagnetisierung beginnt, betrachten wir zunächst nochmals diesen Fall, d.h. $\rho(0) = I_z$ und $H = -\omega_1 I_x$. Mit $b = \omega_1$ und $[A,B] = [I_z, -I_x] = -iI_y = iC$, d.h. $C = -I_y$, ist auch $[B,C] = [-I_x, -I_y] = iI_z = iA$ automatisch erfüllt. Mit $\omega_1 t = 90^\circ$ wird also $I_z \rightarrow +I_y$.

Betrachten wir ein Zwei-Spin-System, dann ist $\rho(0) = I_z + S_z$ und $H = -\omega_1 (I_x + S_x)$, wenn wir die Spins I und S in gleicher Weise, d.h. nichtselektiv anregen. Da $[I_z, S_z] = 0$ können wir die beiden Drehungen nacheinander und in beliebiger Reihenfolge ausführen.

Im Folgenden behandeln wir gekoppelte Spin-1/2-Systeme. Bei der Auswertung der Kommutatoren treten die bereits bekannten Produkte wie $I_x^2 = I_y^2 = I_z^2 = \frac{1}{4}\hat{1}$ oder $I_x I_y = \frac{1}{2}iI_z$ etc. auf. Wir starten nun mit transversaler Magnetisierung, die der schwachen Kopplung unterliegt

$$\mathcal{H} = J I_z S_z$$

und benutzen die obige Formel. Allerdings ist nicht von vornherein klar, wie der Operator B und die Konstante b gewählt werden müssen, damit die Kommutator-Relationen $[A,B] = iC$ und $[B,C] = iA$ erfüllt sind. Wir machen deshalb den Ansatz $b = J/c$ und $B = c I_z S_z$. Mit $\rho(0) = I_y$ wird $[A,B] = [I_y, c I_z S_z] = c[I_y, I_z]S_z = i c I_x S_z = i C$.

Eine Bedingung für c erhalten wir erst, wenn wir mit $C = c I_x S_z$ den Kommutator

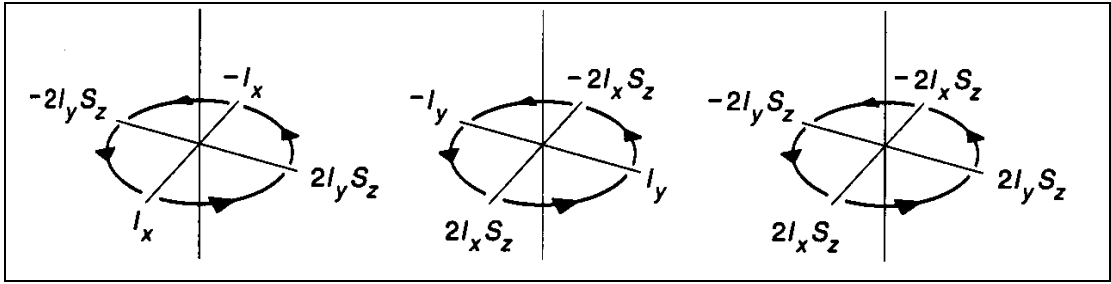
$$[B,C] = [c I_z S_z, c I_x S_z] = (cS_z)^2 [I_z, I_x] = (cS_z)^2 iI_y = iA$$

auswerten. Es muss also $(cS_z)^2 = 1$ gelten, was für Spin-1/2-Systeme wegen $S_z^2 = \frac{1}{4}\hat{1}$ automatisch erfüllt ist.

Mit $B = 2 I_z S_z$ und $[I_y, 2I_z S_z] = i 2I_x S_z$, d.h. $C = 2I_x S_z$ können wir also schreiben

$$I_y \xrightarrow{JI_z S_z t} I_y \cos(t J/2) - 2I_x S_z \sin(t J/2).$$

Wählt man für die Dauer der Evolution beispielsweise $t J/2 = \pi/2$, dann wird aus I_y gerade $-2I_x S_z$; wählt man $t J/2 = \pi$, dann wird aus $I_y \rightarrow -I_y$. Analog zur Wirkung der Pulse kann man dies auch für I_x als Anfangszustand graphisch zusammenfassen als



In dieser Figur wird unterstellt, dass $J > 0$ ist. Die J-Kopplung kann aber auch ein negatives Vorzeichen aufweisen. Dann ändert sich der Drehsinn in den beiden linken Abbildungen. In der rechten wird lediglich die Evolution unter einer auf den Spin I wirkenden Verschiebungswchselwirkung illustriert. Die Antiphasenkohärenzen $I_x S_y$ und $I_y S_x$ brauchen wir hier nicht genauer zu betrachten, denn mit $[I_x S_y, I_z S_z] = [I_y S_x, I_z S_z] = 0$, zeigen diese unter der schwachen Kopplung keine systematische Zeitentwicklung.

Als Beispiel für die Berechnung mit diesem so genannten Produktoperatorformalismus betrachten wir ein System in dem als Bestandteil das Spinpaar IS auftaucht, das sich unter $\mathcal{H} = \omega I_z + J I_z S_z$ entwickelt. Da die beiden Anteile des Hamiltonoperators vertauschen, können wir die Evolution unter ωI_z und $J I_z S_z$ nacheinander und in beliebiger Reihenfolge berechnen, d.h.

$$\rho(0) \xrightarrow{J I_z S_z t} \xrightarrow{\omega I_z t} \rho(t) \text{ oder } \rho(0) \xrightarrow{\omega I_z t} \xrightarrow{J I_z S_z t} \rho(t).$$

Wir starten von I_x und erhalten

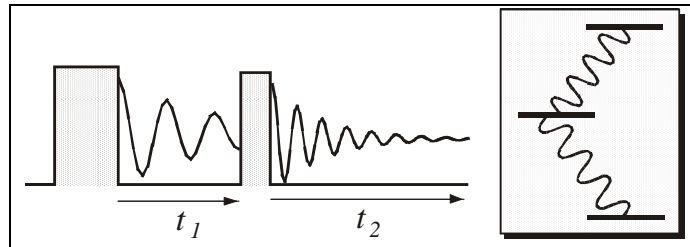
$$I_x \xrightarrow{J I_z S_z t} I_x \cos(J/2 t) + 2 I_y S_z \sin(J/2 t) \xrightarrow{\omega I_z t} [I_x \cos(\omega t) + I_y \sin(\omega t)] \cos(J/2 t) + 2 [I_y S_z \cos(\omega t) - I_x S_z \sin(\omega t)] \sin(J/2 t)$$

Mit S_x als Anfangszustand ergibt sich ein analoger Ausdruck; wir müssen lediglich S und I vertauschen.

4.5.2 COSY

Eine wichtige Anwendung der 2D Spektroskopie ist das COSY (=Correlation SpectroscopY) Experiment, welches dazu dient, Verknüpfungen zwischen Kernspins zu finden.

Im einfachsten Fall verwendet man dafür eine Folge aus zwei RF Pulsen, welche alle Spins anregen. Wir diskutieren hier den Fall eines homonuklearen, schwach gekoppelten Zweispinsystems I S mit einem Hamiltonoperator



$$\mathcal{H} = \omega_I I_z + \omega_S S_z + J I_z S_z .$$

Die Gleichgewichtsmagnetisierung

$$\rho_0 = I_z + S_z$$

wird durch den ersten $(\pi/2)_x$ Puls in transversale Magnetisierung

$$\rho(0) = I_y + S_y$$

umgewandelt. Während der Evolutionszeit t_1 wird daraus

$$\begin{aligned} \rho(t_1) = & (I_y \cos(\omega_I t_1) - I_x \sin(\omega_I t_1) + S_y \cos(\omega_S t_1) - S_x \sin(\omega_S t_1)) \cos(J t_1 / 2) \\ & + 2(-I_x S_z \cos(\omega_I t_1) - I_y S_z \sin(\omega_I t_1) - S_x I_z \cos(\omega_S t_1) - S_y I_z \sin(\omega_S t_1)) \sin(J t_1 / 2). \end{aligned}$$

Der zweite $(\pi/2)_x$ Puls erzeugt daraus

$$\begin{aligned} \rho(t_1, 0) = & (-I_z \cos(\omega_I t_1) - I_x \sin(\omega_I t_1) - S_z \cos(\omega_S t_1) - S_x \sin(\omega_S t_1)) \cos(J t_1 / 2) \\ & + 2(-I_x S_y \cos(\omega_I t_1) + I_z S_y \sin(\omega_I t_1) - S_x I_y \cos(\omega_S t_1) + S_z I_y \sin(\omega_S t_1)) \sin(J t_1 / 2). \end{aligned}$$

Von diesen Termen stellen nur die Komponenten (i) I_x , (ii) S_x , (iii) $2I_z S_y$ und (iv) $2S_z I_y$ beobachtbare Magnetisierung dar. Während der Detektionszeit t_2 entwickelt sich die erste dieser Komponenten des Dichteoperators wie

$$\begin{aligned} I_x \sin(\omega_I t_1) \cos(J t_1 / 2) \rightarrow & \sin(\omega_I t_1) \cos(J t_1 / 2) [\{I_x \cos(\omega_I t_2) + I_y \sin(\omega_I t_2)\} \cos(J t_2 / 2) \\ & + 2\{I_y S_z \cos(\omega_I t_2) - I_x S_z \sin(\omega_I t_2)\} \sin(J t_2 / 2)]. \end{aligned}$$

Beobachten wir z.B. die y-Komponente der Magnetisierung, so erhalten wir davon einen Signalbeitrag

$$s_i(t_1, t_2) = \sin(\omega_I t_1) \cos(J t_1 / 2) \sin(\omega_I t_2) \cos(J t_2 / 2).$$

Wegen $\text{Sp}\{(I_y S_z) I_y\} = \text{Sp}\{S_z\} \text{Sp}\{I_y I_y\} = 0 \cdot \text{Sp}\{I_y I_y\}$ liefert der $I_y S_z$ -Term keine y-Magnetisierung. Mit $\sin \alpha \cos \beta = \frac{1}{2} \sin(\alpha + \beta) + \frac{1}{2} \sin(\alpha - \beta)$ kann man die y-Magnetisierung schreiben als

$$s(t_1, t_2) = \frac{1}{4} [\sin((\omega_I + J/2)t_1) + \sin((\omega_I - J/2)t_1)] [\sin((\omega_I + J/2)t_2) + \sin((\omega_I - J/2)t_2)].$$

Eine zweidimensionale Fouriertransformation, also eine bezüglich t_1 und t_2 , erzeugt daraus vier Linien bei den Frequenzen $[\omega_1 = \omega_I \pm J/2, \omega_2 = \omega_I \pm J/2]$. Da J relativ klein ist, entwickelt sich die Magnetisierung in beiden Evolutionsperioden mit einer ähnlichen Frequenz. Für das Spektrum bedeutet dies, dass die entsprechenden vier Linien in der Nähe bzw. auf der Diagonalen liegen.

Einen entsprechenden Signalbeitrag bei den Frequenzen $[\omega_1 = \omega_S \pm J/2, \omega_2 = \omega_S \pm J/2]$ liefert der zweite Term $S_x \sin(\omega_S t_1) \cos(J t_1 / 2)$. Das entspricht einer Vierergruppe von Linien bei der Diagonalen, dieses Mal allerdings bei ω_S .

Weitere Signalbeiträge erhält man von den Termen $I_z S_y \sin(\omega_I t_1) \sin(Jt_1/2)$ und $S_z I_y \sin(\omega_S t_1) \sin(Jt_1/2)$, d.h. von der dritten und vierten in $\rho(t_1, 0)$ auftauchenden Komponente. Die dritte entwickelt sich während der Detektion wie

$$I_z S_y \sin(\omega_I t_1) \sin(Jt_1/2) \rightarrow \sin(\omega_I t_1) \sin(Jt_1/2)$$

$$[2(I_z S_y \cos(\omega_S t_2) - I_z S_x \sin(\omega_S t_2)) \cos(Jt_2/2) - (S_x \cos(\omega_S t_2) + S_y \sin(\omega_S t_2)) \sin(Jt_2/2)].$$

Mit der Observablen S_y wird und $\sin\alpha \sin\beta = \frac{1}{2} \cos(\alpha - \beta) - \frac{1}{2} \cos(\alpha + \beta)$ das Signal im Zeitbereich

$$s_{iii}(t_1, t_2) = \sin(\omega_I t_1) \sin(Jt_1/2) \sin(\omega_S t_2) \sin(Jt_2/2)$$

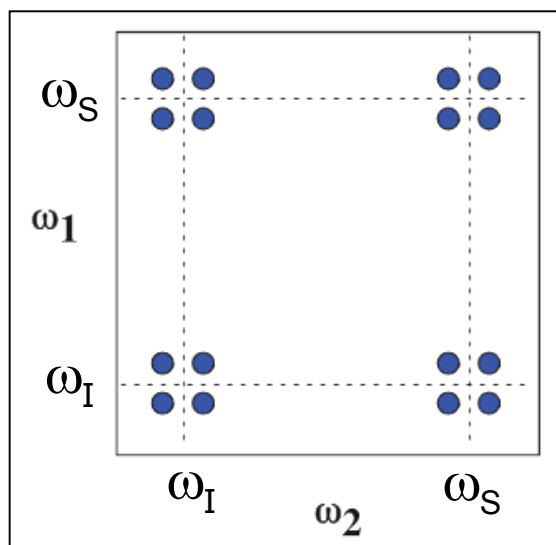
$$= \frac{1}{4} [\cos((\omega_I - J/2)t_1) - \cos((\omega_I + J/2)t_1)] [\cos((\omega_S - J/2)t_2) - \cos((\omega_S + J/2)t_2)].$$

Im Frequenzbereich erhalten wir somit vier Linien bei $[\omega_1 = \omega_I \pm J/2, \omega_2 = \omega_S \pm J/2]$. Da wir den Fall schwacher Kopplung betrachten gilt, ist $|\omega_1 - \omega_2| \gg J$ relativ groß. Damit liegt die entsprechende Viergruppe dieses Terms weit von der Diagonalen des zweidimensionalen Spektrums entfernt.

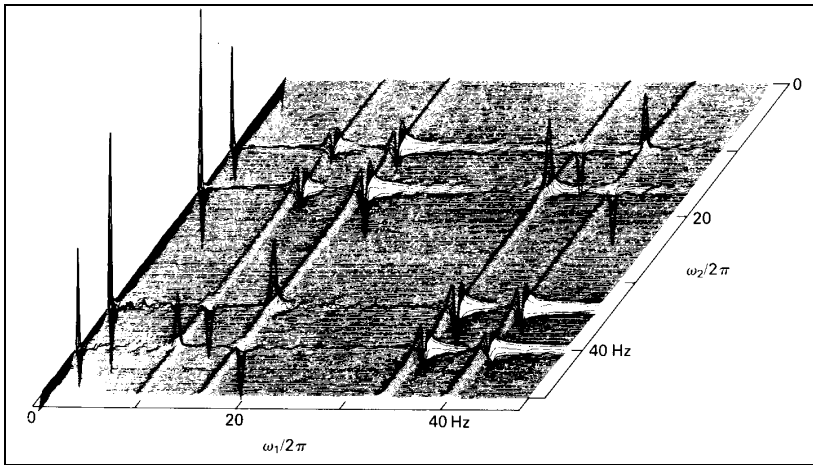
Der vierte Term $S_z I_y \sin(\omega_S t_1) \sin(Jt_1/2)$ erzeugt dementsprechend Linien bei $[\omega_1 = \omega_S \pm J/2, \omega_2 = \omega_I \pm J/2]$. Auch dieses Quartett liegt dann weit von der Diagonalen entfernt, aber auf der anderen Seite, da die Rollen von ω_1 und ω_2 nun gewissermaßen vertauscht sind.

4.5.3 Form und Interpretation des Spektrums

Das gesamte Spektrum besteht somit aus vier Gruppen zu je vier Linien. Die Quartette in der Nähe der Diagonalen enthalten die gleiche Information wie das eindimensionale Spektrum; die Kreuzpeaks hingegen zeigen, dass die beiden aneinander gekoppelt sind. Da solche Kopplungen immer über chemische Bindungen (eine oder mehrere) laufen, erlauben sie Rückschlüsse auf die Struktur des Moleküls, welches die Kerne enthält.



In der Figur ist eines der ältesten COSY Spektren dargestellt, welches die beiden Protonen in Dibromthiophen dargestellt. Die zusätzlichen Resonanzlinien bei $\omega_1 = 0$ stammen von Magnetisierungsbeiträgen, welche während der Evolutionszeit durch Relaxation entstanden sind. Sie werden in den meisten Experimenten durch Phasenzyklen oder Gradientenpulse eliminiert.

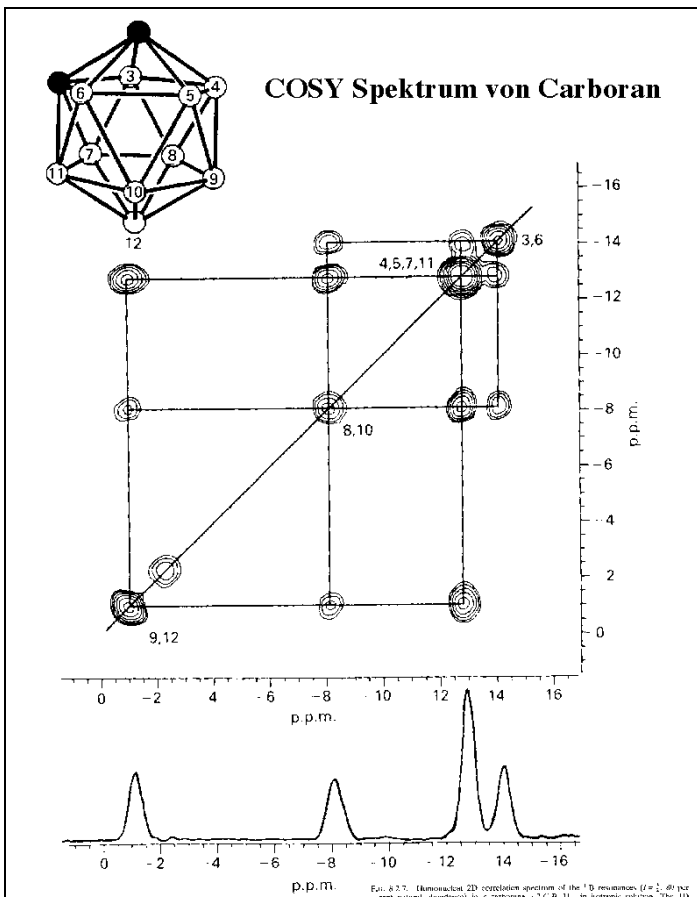


In diesem Beispiel wurde das COSY Spektrum von ^{11}B in o-Carboran gemessen. Das Molekül enthält 10 B Atome, welche aufgrund der Symmetrie des Moleküls in drei zweier- und einer Vierergruppen äquivalent sind.

Die verschiedenen Atome sind über skalare Kopplungen mit ihren nächsten Nachbarn gekoppelt. Dies kann dazu verwendet werden, die Resonanzlinien zuzuordnen. So sind die Atome 3 und 6 nicht an die Atome 9 und 12 gekoppelt, während die Atome an den Positionen 8, 10, 4, 5, 7, 11 an alle anderen Positionen gekoppelt sind.

Die einzelnen Liniengruppen sind hier nicht aufgelöst, weil die Relaxation durch das Quadrupolmoment ($I = 3/2$) relativ schnell und dadurch die Linienbreite größer ist als die Kopplungen.

Das besprochene COSY Experiment kann somit Einblick in benachbarte, chemisch



verbundene Spins geben. Bei Systemen mit sehr vielen Resonanzlinien kann das Spektrum dann sehr voll werden und es beispielsweise wünschenswert erscheinen lassen, alle ungekoppelten Spins aus dem Signal zu eliminieren. Dies kann man durch einen Phasenzklus erreichen, der als Doppelquantenfilter (DQF) fungiert. Dazu nutzt man aus, dass die unter der schwachen J-Kopplung invarianten Terme, wie z.B. $I_x S_y + I_y S_x$, sich unter einer Verschiebungswechselwirkung wie

$$I_x S_y + I_y S_x \rightarrow (I_x \cos \omega_1 t + I_y \sin \omega_1 t) (S_y \cos \omega_2 t - S_x \sin \omega_2 t) + (I_y \cos \omega_1 t - I_x \sin \omega_1 t) (S_x \cos \omega_2 t + S_y \sin \omega_2 t)$$

$$\begin{aligned}
 &= (I_x S_y + I_y S_x) \cos \omega_I t \cos \omega_S t - (I_y S_x + I_x S_y) \sin \omega_I t \sin \omega_S t \\
 &\quad + (-I_x S_x + I_y S_y) \cos \omega_I t \sin \omega_S t + (I_y S_y - I_x S_x) \sin \omega_I t \cos \omega_S t \\
 &= (I_x S_y + I_y S_x) (\cos \omega_I t \cos \omega_S t - \sin \omega_I t \sin \omega_S t) \\
 &\quad - (I_x S_x - I_y S_y) (\cos \omega_I t \sin \omega_S t + \sin \omega_I t \cos \omega_S t) \\
 &= (I_x S_y + I_y S_x) \cos [(\omega_I + \omega_S) t] \\
 &\quad - (I_x S_x - I_y S_y) \sin [(\omega_I + \omega_S) t]
 \end{aligned}$$

Mit $\omega_I \approx \omega_S$ präzedieren diese Kohärenzen also etwa doppelt so schnell wie die Einquantenkohärenzen I_x , I_y , S_y und S_x . Wenn $I_x S_y + I_y S_x$ invariant unter der schwachen Kopplung ist, dann muss das auch für $I_x S_y - I_y S_x$ gelten. Eine analoge Rechnung zeigt, dass die hier relevante Präzessionsfrequenz $\omega_I - \omega_S$ sehr klein wird. Man spricht deshalb auch von Nullquantenkohärenzen.

Durch einen Phasenzzyklus kann man nach Termen filtern, die nur Doppelquanten- oder auch höhere Multiquantenkohärenzen beinhalten und damit beispielsweise das Signal der (ungekoppelten) Lösemittelprotonen unterdrücken. Auch ist beim DQF-COSY die hier nicht besprochene Phasenlage der Peaks günstiger.

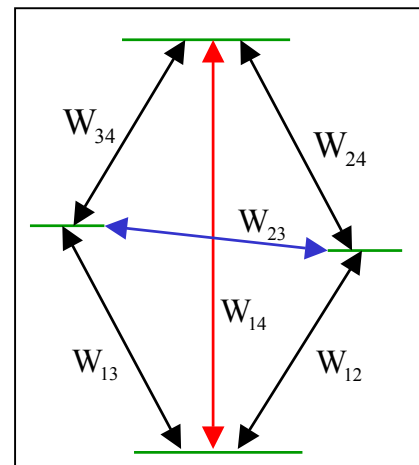
Total Correlation Spectroscopy (TOCSY) ist eine weitere Variante eines Korrelationsexperimentes. Hier treibt ein Locking Puls den Kohärenztransfer über beliebig viele Kopplungen eines chemisch verbundenen Systems. Das ist besonders wichtig, um in einer Mischung von verschiedenen Molekülen einen Überblick zu bekommen welche Resonanz zu welchem Molekül gehört.

4.5.4 Longitudinale und Kreuz-Relaxation

Stört man die Gleichgewichtsmagnetisierung eines Spinsystems, z.B. durch einen Hochfrequenzpuls, dann strebt es wieder zurück zum Gleichgewicht, es relaxiert. Hier konzentrieren wir uns auf die longitudinale Relaxation. Diese ist verknüpft mit der Änderung der Besetzungszahlen, d.h. der longitudinalen Magnetisierung eines Systems und den Spinsorten I und S. Dazu betrachten wir das Energieschema von 2 Spin-1/2 Kernen. Die Zeitabhängigkeit der Abweichungen der Populationen, d.h. der Besetzungszahldifferenzen, vom Gleichgewicht wird durch folgendes lineare Gleichungssystem beschrieben:

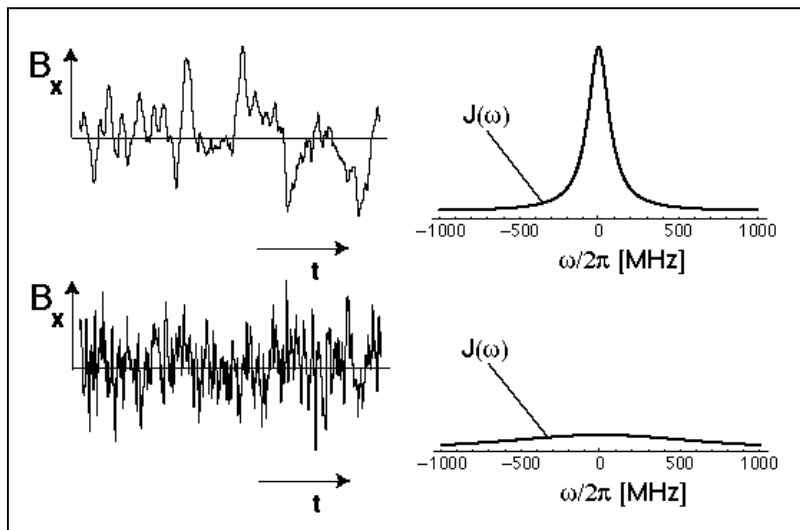
$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} n_1 \\ n_2 \\ n_3 \\ n_4 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} W_{11} & W_{12} & W_{13} & W_{14} \\ W_{21} & W_{22} & W_{23} & W_{24} \\ W_{31} & W_{32} & W_{33} & W_{34} \\ W_{41} & W_{42} & W_{43} & W_{44} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} n_1 \\ n_2 \\ n_3 \\ n_4 \end{pmatrix}$$

Für $i \neq j$ bezeichnen die $W_{ij} = W_{ji}$ die Übergangsraten zwischen den Niveaus. Betrachtet man dieses System zeilenweise,



dann erkennt man, dass $|W_{ii}|$ gleich der Gesamtwahrscheinlichkeit dafür ist, dass der Zustand i verlassen wird. Setzt man $\sum_{i=1,N} W_{ij} = 0$, dann bedeutet dies, dass die Gesamtpopulation erhalten ist.

Übergänge zwischen den Niveaus können durch zeitabhängige Störungen verursacht werden, z.B. durch HF-Pulse passender Frequenz. Auch in Abwesenheit von äußeren Störungen kann die stochastische molekulare Bewegung sehr effektiv Übergänge stimulieren, falls sie auf der "richtigen" Zeitskala stattfindet. Das bedeutet, dass das Leistungsspektrum $J(\omega)$ der molekularen Bewegung bei der Übergangsfrequenz $\omega = \omega_{ij}$ ungleich Null sein muss. Die Spektraldichte eines stochastischen Prozesses ergibt sich als das Fouierspektrum der Korrelationsfunktion der fluktuierenden Felder. Setzt man dafür $B(\tau) \propto e^{-t/\tau}$ an, dann ist



$$J(\omega) \propto \frac{\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2}$$

wobei τ_c die molekulare Relaxationszeit bezeichnet. Erfolgt der Übergang zwischen den Niveaus aufgrund der Wirkung der zeitabhängigen Dipol-Dipolwechselwirkung, dann schreibt sich die Rate als $W_{ij} = |\langle i | \mathcal{H}_{dd} | j \rangle|^2 J(\omega_{ij})$. Wir wollen annehmen dass $\omega_{13} = \omega_{24} = \omega_I$ und $\omega_{12} = \omega_{34} = \omega_S$. Mit $\omega_d \propto r^{-3}$ hängen die sich ergebenden Übergangswahrscheinlichkeiten sehr stark, und zwar proportional zu r^{-6} , vom internuklearen Abstand r ab:

$$W_{13} = W_{24} = W_{11} \propto r^{-6} J(\omega_I) \quad \text{und} \quad W_{12} = W_{34} = W_{1S} \propto r^{-6} J(\omega_S),$$

$$W_{23} = W_0 \propto r^{-6} J(\omega_I - \omega_S) \quad \text{und} \quad W_{14} = W_2 \propto r^{-6} J(\omega_I + \omega_S).$$

In einem homonuklearen System ist auf der Skala der mittleren Frequenz in sehr guter Näherung $\omega_I = \omega_S = \omega$ erfüllt. Damit sind die Spektraldichten $J(0)$, $J(\omega)$ und $J(2\omega)$ relevant. Eine Berechnung der Dipolmatrixelemente ergibt, dass der Vorfaktor vor $J(2\omega)$ viermal so groß ist wie der von $J(\omega)$ und sogar sechsmal so groß wie der vor $J(0)$.

Die Spin-Gitter-Relaxation ergibt sich aus der Änderung der z-Magnetisierung, d.h. des Erwartungswertes $\langle I_z + S_z \rangle = \text{Sp} \{ (I_z + S_z) \rho \}$. Mit der Matrixdarstellung von

$$I_z + S_z = \begin{pmatrix} 1 & & & \\ & 0 & & \\ & & 0 & \\ & & & -1 \end{pmatrix}$$

(Kapitel 3.4.1) sieht man, dass die Spurbildung gerade die Populationsterme $+\rho_{11}$ und $-\rho_{44}$ aus der Dichtematrix "herausholt". Damit ist $\langle I_z + S_z \rangle$ durch $\rho_{11} - \rho_{44} = n_1 - n_4$ gegeben. Die Änderung von $n_1 - n_2$, die durch die longitudinale Relaxationszeit T_1 beschrieben wird, erhält man nun, indem bei dem obigen Ratengleichungssystem die vierte Zeile von der ersten subtrahiert. Das ergibt

$$\frac{d}{dt} n_1 = W_{11}n_1 + W_{12}n_2 + W_{13}n_3 + W_{14}n_4 = -\overbrace{(W_{12} + W_{13} + W_{14})}^{2W_1 + W_2} n_1 + W_{12}n_2 + W_{13}n_3 + W_{14}n_4,$$

$$\frac{d}{dt} n_4 = W_{41}n_1 + W_{42}n_2 + W_{43}n_3 + W_{44}n_4 = W_{21}n_1 + W_{12}n_2 + W_{13}n_3 - (2W_1 + W_2) n_4.$$

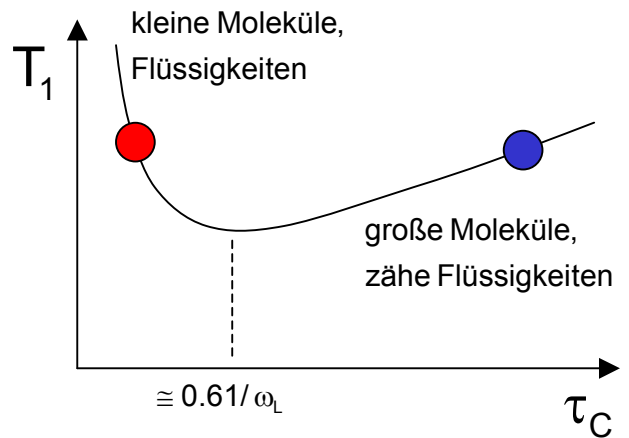
Die Rate $W_{23} \propto J(0)$ tritt hier nicht auf. Die Differenzbildung liefert

$$\frac{d}{dt} (n_1 - n_4) = -(2W_1 + W_2)(n_1 - n_4) + W_2 (n_4 - n_1) = -(2W_1 + 2W_2)(n_1 - n_4) = -(n_1 - n_4) / T_1$$

wobei letzte Gleichung auch als Definition von T_1 angesehen werden kann. Also ist

$$1 / T_1 = 2(W_1 + W_2) \propto r^{-6} [J(\omega) + 4J(2\omega)].$$

Es ist instruktiv sich die Grenzfälle dieser Gleichung vor Augen zu führen. Für schnelle Bewegungen, wie sie etwa kleine Moleküle in Lösung oder Flüssigkeiten bei hohen Temperaturen zeigen, ist $\omega \tau_C \ll 1$ und die Relaxationsrate $1/T_1 \propto \tau_C$. Große Moleküle oder viskose Flüssigkeiten findet man oft auf der anderen Seite des Minimums: hier gilt $T_1 \propto \omega^2 \tau_C$. Das Minimum selbst tritt auf, wenn sich das Molekül etwa auf der Skala der Larmorfrequenz bewegt, was typischerweise Zeiten von ca. 1 ns entspricht.



Besonders wichtig im Zusammenhang mit der Bestimmung von Proteinstrukturen ist die Tatsache, dass sich nicht nur die Populationen jeder Spinsorte im Laufe der Zeit ihrem Gleichgewicht nähern, sondern auch dass es zu einem Transfer von z-Magnetisierung zwischen den beiden Spinsorten kommen kann. Mit

$$I_z = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & & & \\ & 1 & & \\ & & -1 & \\ & & & -1 \end{pmatrix} \quad \text{und} \quad S_z = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & & & \\ & -1 & & \\ & & 1 & \\ & & & -1 \end{pmatrix}$$

bedeutet dies, dass es genau dann eine so genannte Kreuzrelaxation gibt, wenn die Erwartungswerte von I_z und S_z unterschiedlich sind und damit auch $M_I = n_1 + n_2 - n_3 - n_4$ und $M_S = n_1 - n_2 + n_3 - n_4$.

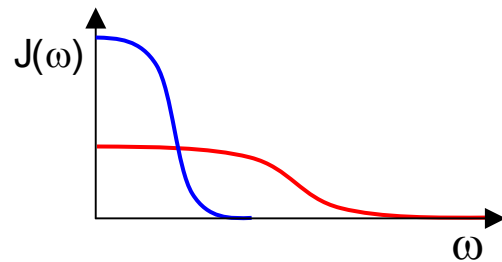
Analog zur obigen Herleitung führt dies zu einem reduzierten Satz von Ratengleichungen für die Abweichung der Magnetisierung vom Boltzmann-Gleichgewicht

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} M_I \\ M_S \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1/T_1 - C & C \\ C & -1/T_1 - C \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_I \\ M_S \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -C & C \\ C & -C \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_I \\ M_S \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} 1/T_1 & 0 \\ 0 & 1/T_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_I \\ M_S \end{pmatrix}.$$

Hierbei enthält die Kreuzrelaxationsrate $C = W_0 - W_2$ eine andere Linearkombination von Spektraldichten als $1/T_1$. Interessanterweise treten die Raten C auch auf der Diagonalen auf, allerdings mit umgekehrtem Vorzeichen als auf den Plätzen die I und S verbinden. Das bedeutet, dass die C-Matrix die Form einer Austauschmatrix hat, was wiederum impliziert, dass die Gesamtmagnetisierung beim Polarisationstransfer erhalten bleibt. Symbolisch kann man den Transfer beispielsweise so schreiben

$$I_z \rightarrow (1 - x) I_z + x S_z$$

Das Vorzeichen der Kreuzrelaxationsrate $C \propto r^{-6} [J(0) - 6J(2\omega)]$ hängt von der Korrelationszeit ab. Für $\omega \tau_c \ll 1$ (schnelle Bewegung) ist $C < 0$; für $\omega \tau_c \gg 1$ (langsame Bewegung) ist $C > 0$; für $\omega \tau_c = 1.12$ ist $C = 0$. Entscheidend für die Anwendung ist die starke Abhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate vom internuklearen Abstand.



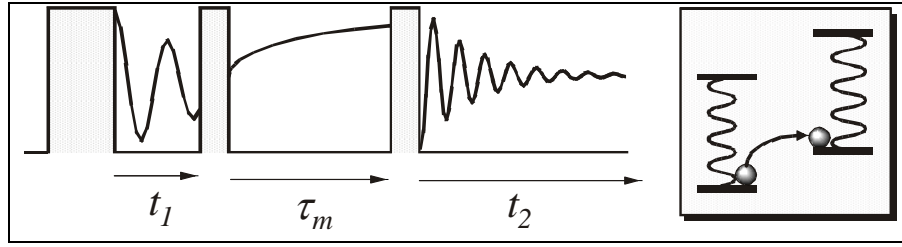
Diese Art von Magnetisierungsübertrag gibt es nicht nur in homonuklearen, sondern auch in heteronuklearen Systemen und sogar zwischen Elektronen und Kernen, die über die Fermi'sche Kontaktwechselwirkung miteinander gekoppelt sind. Da Elektronenspins eine viel größere Zeeman-Aufspaltung und damit Magnetisierung in einem externen Feld besitzen, kann ein Polarisationstransfer auf den Kern dessen Signal etwa um das Verhältnis der gyromagnetischen Verhältnisse verstärken. Dieser Effekt wurde von Overhauser entdeckt. In heteronuklearen Spinsystem liefert entsprechend der Kern-Overhauser-Effekt, z.B. der Übertrag der Protonenmagnetisierung auf die Kohlenstoffe, eine Signalverstärkung, welche die Beobachtung des ^{13}C -Kerns in natürlicher Häufigkeit oft erst ermöglicht.

4.5.5 NOESY

Das zweite grundlegend wichtige Experiment für die Untersuchung von Biomolekülen wird als NOESY (für Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) bezeichnet. In diesem Ex-

periment misst man den Austausch von Polarisation über Dipol-Dipol Wechselwirkung und damit den geometrischen Abstand zwischen den entsprechenden Spins. Dieser Austausch wird durch die (zeitabhängige) Dipolkopplung getrieben, welche u.a. Spinoperatoren I_+S_- enthält, welche (longitudinale) Polarisation zwischen I und S tauschen.

Das NOESY Experiment verwendet eine Dreipulsfolge. Wir betrachten wiederum ein Zweispinsystem, welches aber nicht gekoppelt ist ($J = 0$). Wie beim COSY Experiment be-



ginnt man nach dem 1. Puls, der transversale Magnetisierung also $I_y + S_y$ liefern soll, mit einer Evolutionszeit. Danach wird das Spinsystem durch den Dichteoperator

$$\rho(t_1) = I_y \cos(\omega_I t_1) - I_x \sin(\omega_I t_1) + S_y \cos(\omega_S t_1) - S_x \sin(\omega_S t_1) .$$

beschrieben. Der zweite $(\pi/2)_x$ Puls, welcher die Evolutionszeit abschließt, erzeugt daraus

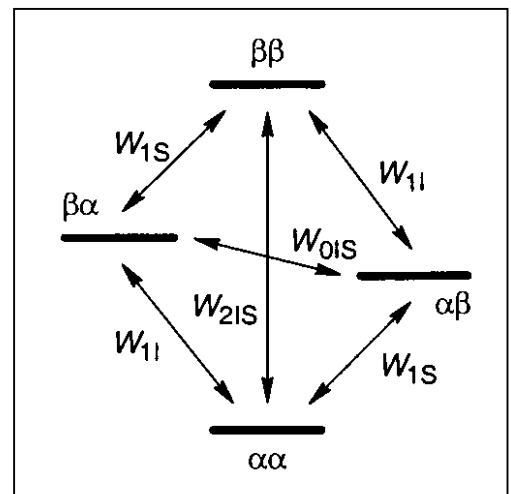
$$\rho(t_1, 0) = -I_z \cos(\omega_I t_1) - I_x \sin(\omega_I t_1) - S_z \cos(\omega_S t_1) - S_x \sin(\omega_S t_1) .$$

Die transversalen Terme I_x und S_x zerfallen während der Mischzeit τ_m und werden nicht mehr berücksichtigt.

Sind die beiden Spins geometrisch benachbart, so spüren sie eine Dipolwechselwirkung

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_{dd} = & \omega_d \left\{ (1 - 3\cos^2\theta) (I_z S_z - \frac{1}{4} (I_+ S_- + I_- S_+)) \right. \\ & - \frac{3}{2} \sin\theta \cos\theta [(I_z S_+ + I_+ S_z) e^{-i\phi} + (I_z S_- + I_- S_z) e^{i\phi}] \\ & \left. - \frac{3}{4} \sin^2\theta [I_+ S_+ e^{-2i\phi} + I_- S_- e^{2i\phi}] \right\} . \end{aligned}$$

Aufgrund der molekularen Bewegung in einer Flüssigkeit verschwindet die Kopplung im zeitlichen Mittel. Die Terme $(I_+ S_- + I_- S_+)$ und $(I_+ S_+ + I_- S_-)$ können jedoch, gerade aufgrund der Zeitabhängigkeit, Übergänge zwischen den Zuständen $|\alpha\beta\rangle \Leftrightarrow |\beta\alpha\rangle$ respektive $|\alpha\alpha\rangle \Leftrightarrow |\beta\beta\rangle$ erzeugen. In beiden Fällen wird Zeeman-Polarisation zwischen den gekoppelten Spins ausgetauscht, wobei im zweiten Fall das Vorzeichen gedreht wird.



Findet ein Austausch statt, d.h. wird ein Anteil x zwischen I_z und S_z übertragen, so ist der Zustand am Ende der Mischzeit

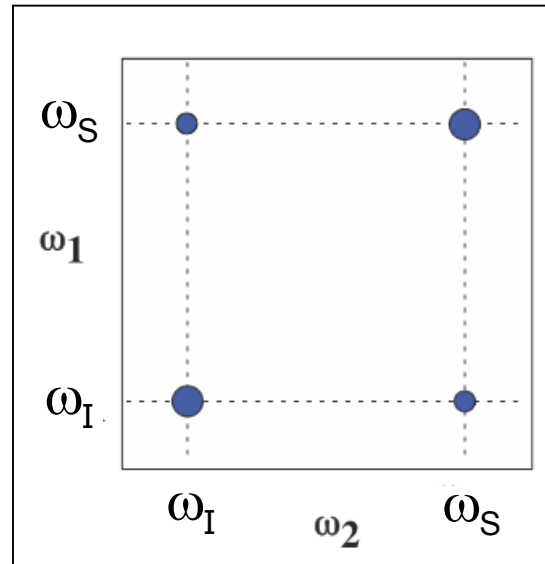
$$\rho(t_1, \tau_m) = -I_z [(1 - x) \cos(\omega_I t_1) + x \cos(\omega_S t_1)] - S_z [(1 - x) \cos(\omega_S t_1) + x \cos(\omega_I t_1)] .$$

Der dritte Puls erzeugt daraus

$$\rho(t_1, \tau_m, 0) = -I_y [(1-x) \cos(\omega_I t_1) + x \cos(\omega_S t_1)] - S_y [(1-x) \cos(\omega_S t_1) + x \cos(\omega_I t_1)].$$

Wir erhalten somit insgesamt vier Linien:

ω_1	ω_2	Amplitude
ω_I	ω_I	$1-x$
ω_I	ω_S	x
ω_S	ω_I	x
ω_S	ω_S	$1-x$

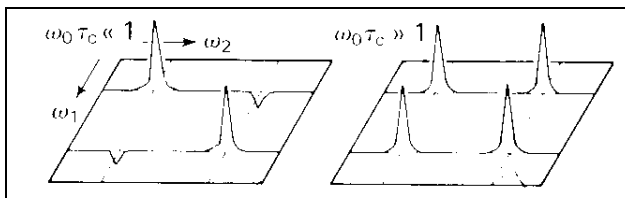
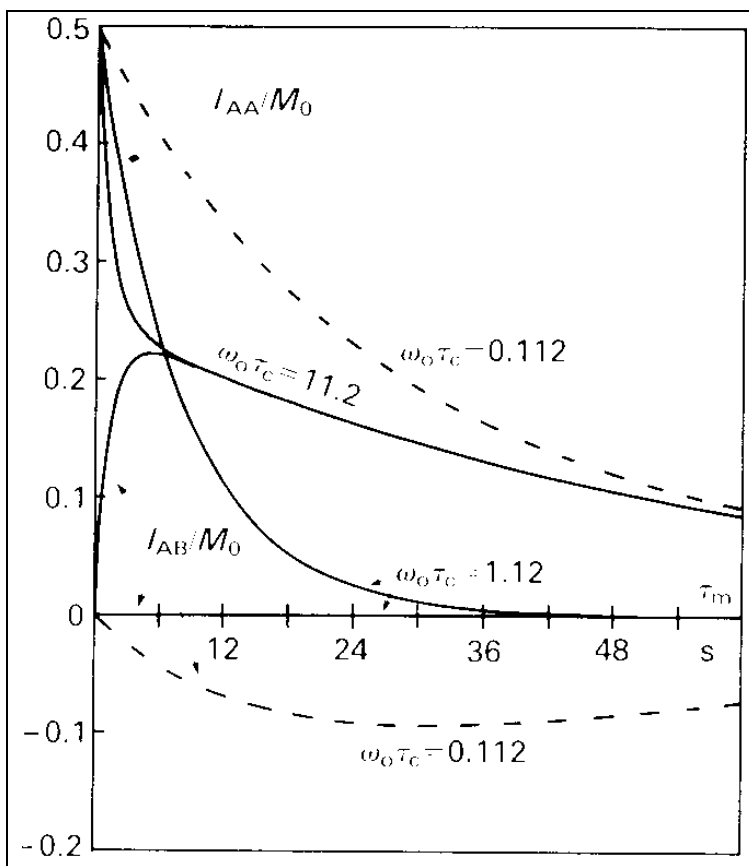


Die Diagonale enthält wie üblich die Information des 1D Spektrums, während die Außerdiagonalelemente anzeigen welche Spins geometrisch benachbart sind.

Der Austausch wird durch die Dipolwechselwirkung getrieben; in zweiter Ordnung Störungsrechnung kann man die Rate berechnen, welche proportional zum Quadrat der Kopplungskonstante ist und damit $\sim r^{-6}$.

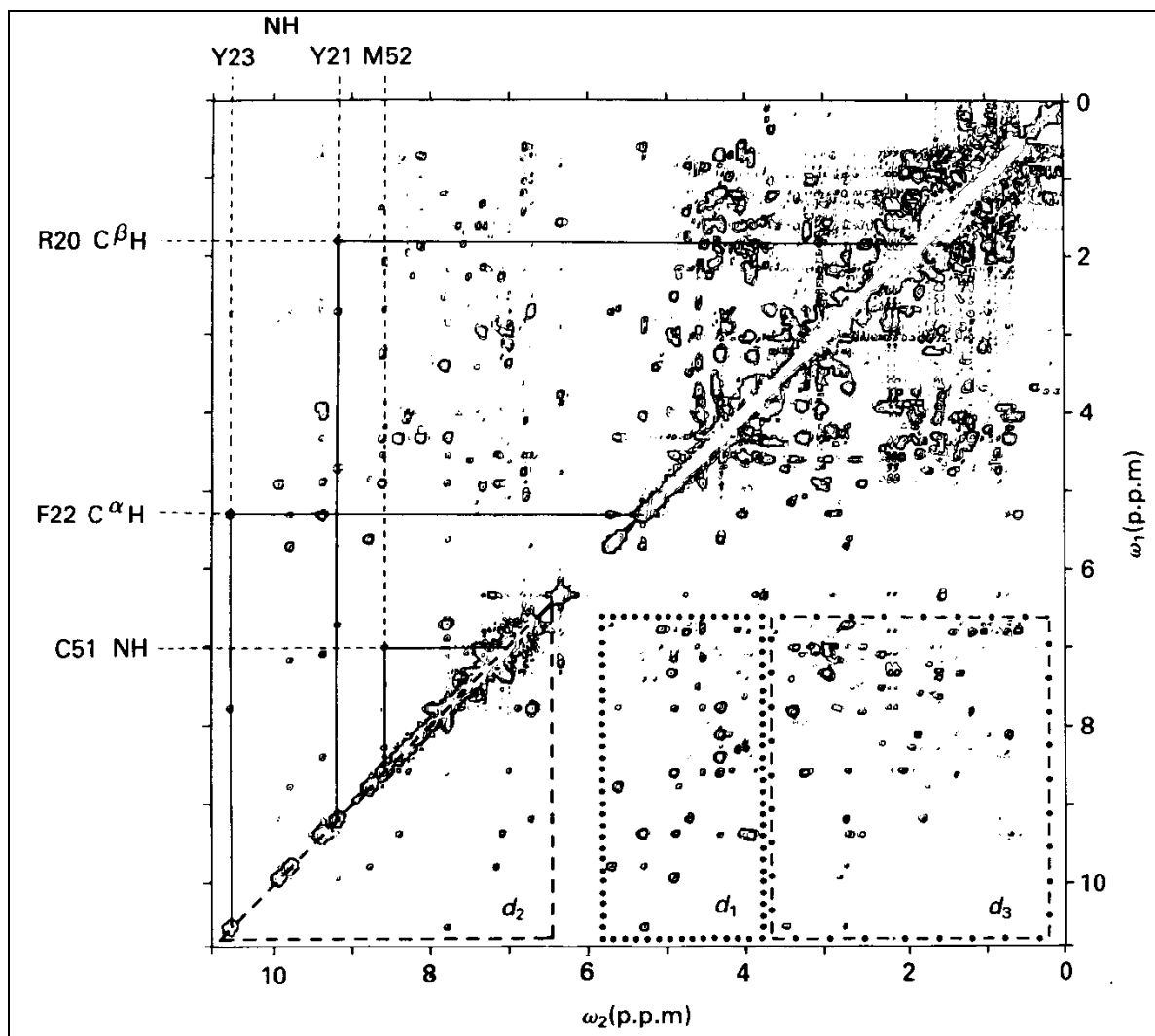
Die Austauschamplitude x ist abhängig von der Mischzeit τ_m und wird durch das oben diskutierte lineare Differentialgleichungssystem beschrieben.

Der Austauschprozess mit der Rate C führt zum Aufbau der Kreuzpeaks und gleichzeitig zu einer Reduktion der Diagonalpeaks. Die Relaxationsprozesse führen zu einer Dämpfung aller Linien. In der Figur ist das Verhalten für Kreuzpeak und Diagonalpeak für unterschiedliche Austauschraten dargestellt.



Die verschiedenen Kurven stellen die Zeitabhängigkeit der Amplituden für unterschiedliche Korrelationszeiten dar. Für langsame Bewegung ($\omega_0 \tau_c \gg 1$) wird der Austausch durch den FlipFlop

Term dominiert und die Kreuzpeaks haben positives Vorzeichen. Für kurze Korrelationszeiten ($\omega_0 \tau_c \ll 1$) dominiert der FlopFlop (2 Quanten) Term $I_+S_+ + I_-S_-$ und das Vorzeichen der Außerdiagonalpeaks wird negativ.



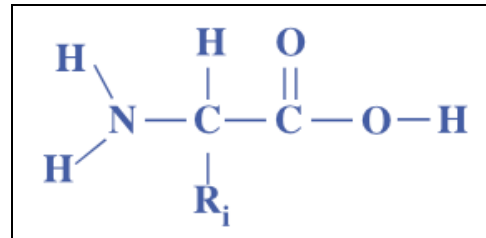
In der Figur ist das NOESY Spektrum von BPTI, einem kleinen Protein dargestellt. Auf der Diagonalen erscheint das 1D Spektrum, welches sehr wenig Auflösung zeigt. Die gestrichelten Linien geben die Bereiche an, in denen die wichtigsten Kreuzpeaks für die Zuordnung liegen: Die Amidprotonen NH liegen im Bereich > 6.5 ppm, die C α Protonen im Bereich 4-6 ppm und die C β ... Protonen unterhalb 3.5 ppm. Die Rechtecke bezeichnen somit den Austausch NH-NH, NH - C α und NH - C β .

Da die Stärke der Wechselwirkung mit $1/r^3$ skaliert verschwindet die Kreuzrelaxation mit $1/r^6$. Sie hängt damit sehr stark vom Abstand ab, ergibt also sehr genaue Messwerte für intramolekulare Distanzen. Für die Bestimmung der Raten muss eine Reihe von Spektren mit unterschiedlicher Mischzeit aufgenommen werden.

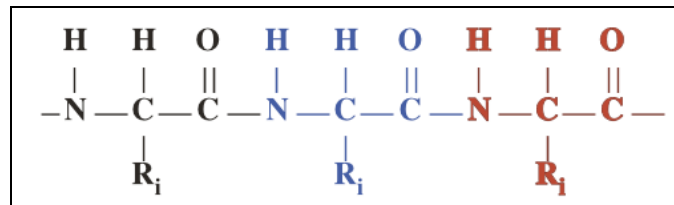
4.5.6 Proteine

Wahrscheinlich das wichtigste Beispiel für die Anwendung solcher Messungen sind Proteinmoleküle. Proteine sind natürliche Polymere aus Aminosäuren.

Aminosäuren haben grundsätzlich immer die gleiche Struktur: An einem zentralen Kohlenstoffatom sind eine Säuregruppe, eine Aminogruppe, ein Wasserstoffatom, sowie eine Seitenkette gebunden. Die verschiedenen Aminosäuren unterscheiden sich durch diese Seitenketten.

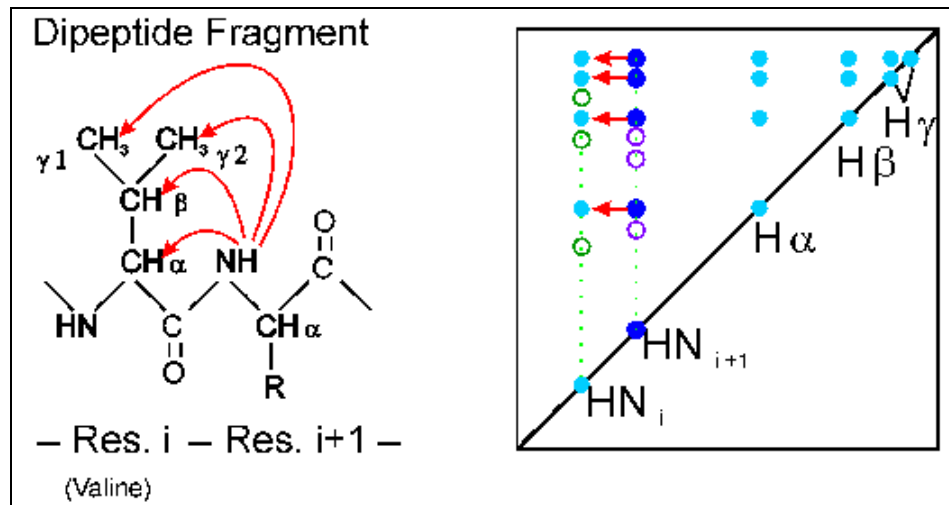


In einem Protein sind einige Dutzend bis einige Hundert Aminosäuren aneinander gebunden, wobei der Rückgrat des Moleküls immer aus der Wiederholung $\text{NH} - \text{CHR}_i - \text{CO}$ besteht. Diese Proteine bilden die Grundbausteine der meisten Lebewesen; sie sind z.B. für die Energieversorgung zuständig, oder für die Steuerung der meisten biochemischen Prozesse. Die Sequenz der Aminosäuren ist in den Genen codiert und kann u.a. durch die Sequenzierung der DNA bestimmt werden. Allerdings ist die Sequenz noch nicht direkt für die Funktion zuständig. Die Ketten der Aminosäuren falten sich und erst die daraus entstehende dreidimensionale Struktur bestimmt die biologische Funktion. Um die Struktur solcher Moleküle zu bestimmen, ist die übliche Methode der Röntgenbeugung nicht immer geeignet, da es häufig nicht möglich ist, genügend gute Einkristalle zu ziehen. Außerdem ist es natürlich interessant, sie auch in ihrer "natürlichen" Umgebung, d.h. in wässriger Lösung zu untersuchen. Dies ist möglich mit Hilfe der NMR-Spektroskopie.



Bevor Struktur und Dynamik bestimmt werden können müssen die Linien in den Spektren einzelnen Kernen zugeordnet werden. Dazu können zum einen die gerechneten chemischen Verschiebungen benutzt werden, aber auch bereits Informationen aus zweidimensionalen Spektren. So können NOESY Kreuzpeaks verwendet werden, um ein Amidproton einer bestimmten Aminosäure zuzuordnen: Im gezeigten Beispiel werden dafür die Abstände zu einem benachbarten Valin verwendet.

Bevor Struktur und Dynamik bestimmt werden können müssen die Linien in den Spektren einzelnen Kernen zugeordnet werden. Dazu können zum einen die gerechneten chemischen Verschiebungen benutzt werden, aber auch bereits Informationen aus zweidimensionalen Spektren. So können NOESY Kreuzpeaks verwendet werden, um ein Amidproton einer bestimmten Aminosäure zuzuordnen: Im gezeigten Beispiel werden dafür die Abstände zu einem benachbarten Valin verwendet.

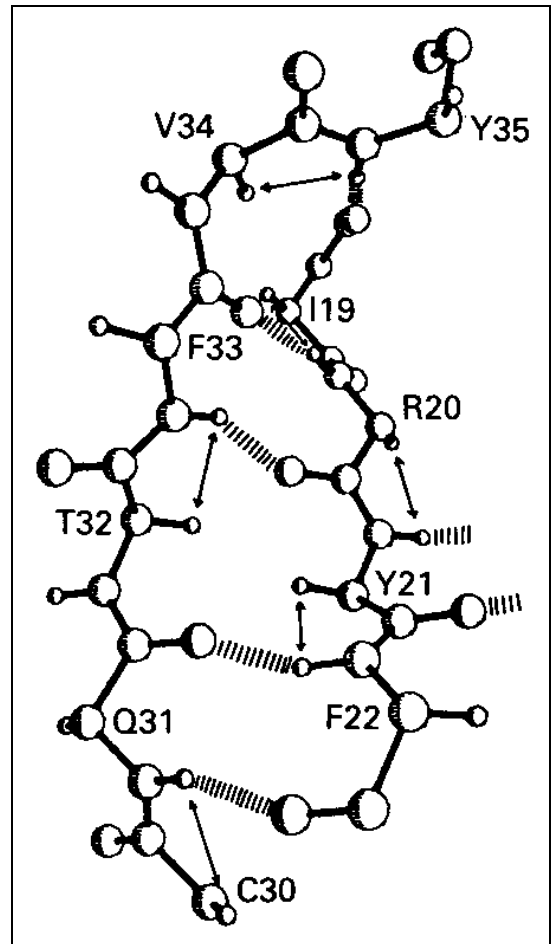
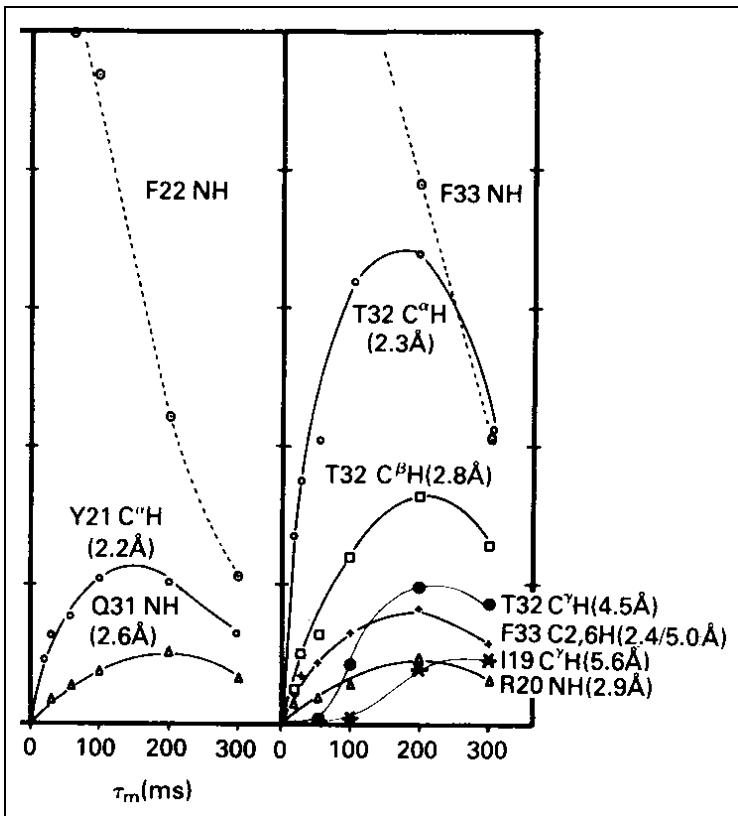
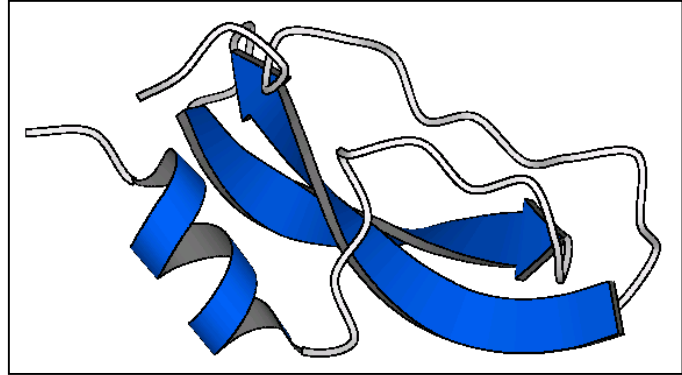


Dabei benutzt man die oben skizzierte Abstandsabhängigkeit der Dipol-Dipol Wechselwirkung, aber zusätzlich auch so genannt indirekte Kopplungen, welche durch die Elektronen in chemischen Bindungen vermittelt werden. Dadurch kann man nicht nur feststellen,

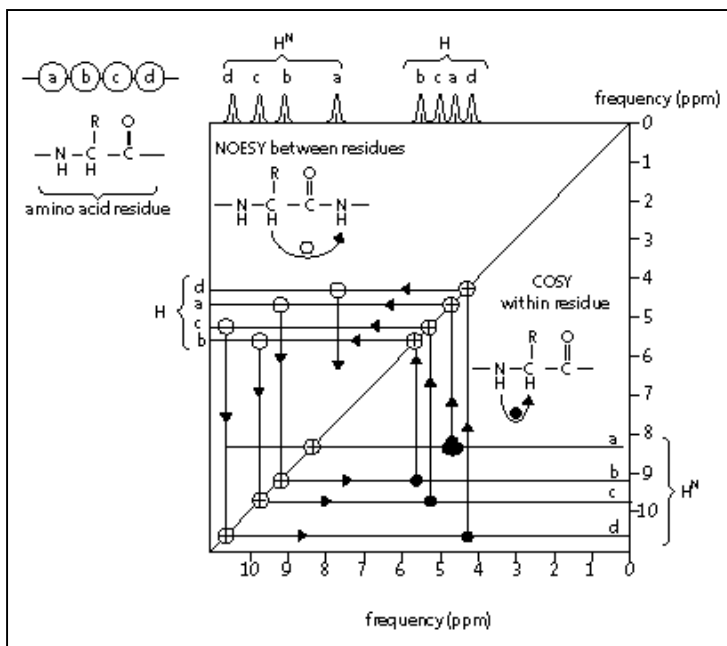
über wie viele chemische Bindungen die Atome aneinander gebunden sind, sondern auch wie die Substituenten gegeneinander verdreht sind.

4.5.7 Beispiel: BPTI

BPTI (Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor) ist ein aus 58 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das bei Bedarf das Verdauungsenzym Trypsin hemmen kann. Es enthält eine α -Helix und Bereiche mit einer β -Faltblattstruktur, aber auch Abschnitte mit einem nicht regelmäßigen Rückgrat. In der vergrößerten Darstellung eines Teils dieses kleinen Proteins ist die lokale Struktur eines Faltblatts dargestellt. Die Pfeile geben an, wo jeweils ein N-H Proton einer Aminosäure zum C-H Proton der vorangehenden Aminosäure benachbart ist.



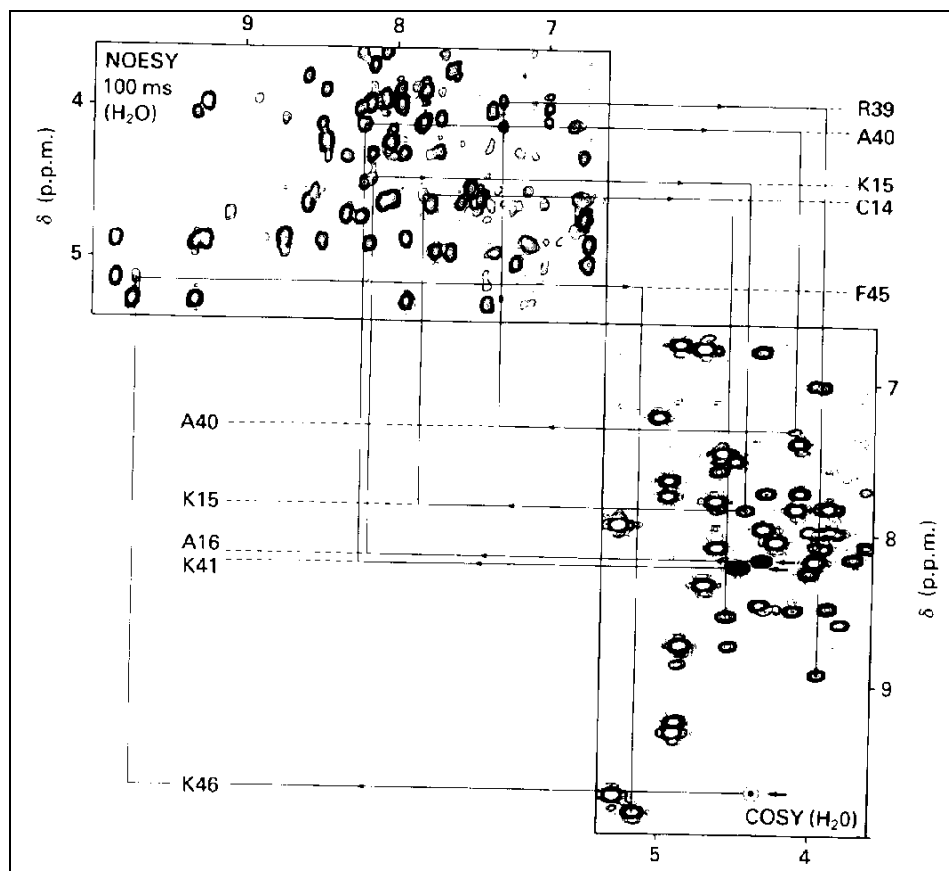
Die Distanzen können aus der Zeitabhängigkeit der Kreuzpeaks berechnet werden. In der Figur sind die gemessenen Zeitabhängigkeiten für einige Aminosäuren von BPTI dargestellt. In der dritten Kolonne sind auch einige Kurven sichtbar, die bei $\tau_m=0$ eine horizontale Tangente aufweisen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich hier um Prozesse höherer Ordnung handelt: die Magnetisierung wird von Spin I auf Spin M und erst von dort auf Spin S übertragen.



Wie man bei der Bestimmung der Proteinstruktur vorgeht ist hier zunächst schematisch illustriert. Links sind das COSY und das NOESY Spektrum in ein Spektrum kombiniert, wobei das linke obere Dreieck das NOESY Spektrum darstellt, das rechte untere das COSY Spektrum. Diese Darstellungsweise erlaubt eine relativ einfache Sequenzanalyse: wie durch die Linien markiert ist gelangt man jeweils über ein Viereck von einer Aminosäure zur nächsten. Die Figur oben rechts zeigt die Abhängigkeit der einzelnen Linienamplituden von der Mischzeit: die Diagonalpeaks haben die maximale Amplitude zu Beginn der

Mischzeit, während die Kreuzpeaks mit Amplitude 0 beginnen, aufgrund der Kreuzrelaxation wachsen und schließlich aufgrund der Relaxation wieder verschwinden. Man erkennt zwei Arten von Kreuzpeaks: diejenigen welche für niedrige Mischzeiten linear anwachsen und andere die zunächst eine verschwindende Steigung aufweisen. Hierbei handelt es sich um Transferprozesse höherer Ordnung, d.h. mehrstufige Transferprozesse.

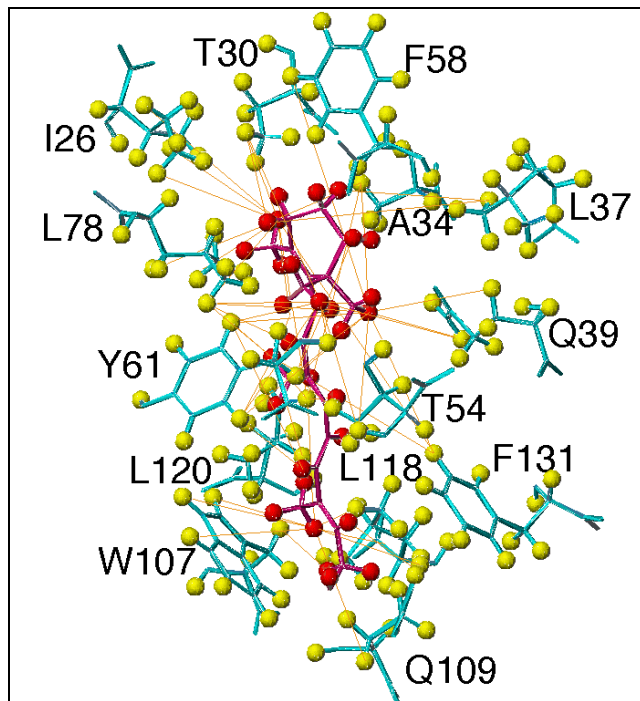
Kombiniert man das COSY und das NOESY Spektrum so kann man sich durch die Sequenz der Aminosäuren "durchhangeln": Im COSY Spektrum sind jeweils die 3-Bindungskopplungen H-C-



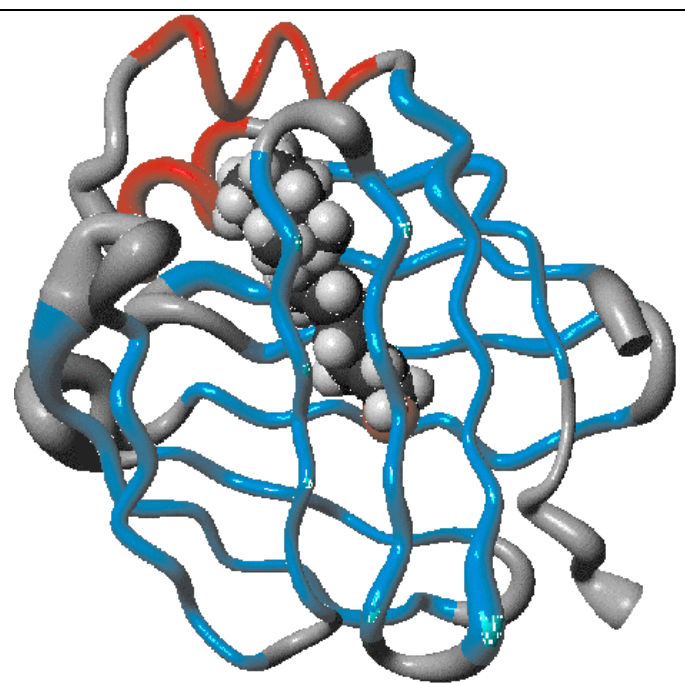
N-H innerhalb einer Aminosäure sichtbar, während im NOESY Spektrum die räumliche Nachbarschaft zwischen den CH und NH Protonen aufeinanderfolgender Aminosäuren gemessen werden kann. Im Bereich von 7-10 ppm sind die Amid-Protonen im Spektrum zu

finden, während die CH-Protonen im Bereich von 4-5 ppm zu finden sind. Die COSY und NOESY Spektren führen deshalb jeweils von einem Bereich in den anderen; jeweils zwei Kreuzpeaks verbinden eine Aminosäure mit der nächsten.

In diesem Beispiel sind einige der insgesamt 3980 Distanzen eingezeichnet, welche aus NOESY Experimenten bestimmt wurden. Es handelt sich um das „retinol binding protein II“; dargestellt ist der Teil des Proteins, der für die Bindung verantwortlich ist, zusammen mit dem Liganden Retinol. Dargestellt sind diejenigen Distanzen, welche zwischen dem Protein (gelb) und dem Liganden (rot) bestimmt wurden.



Die zweite Figur stellt das gesamte Protein dar. Der blaue Strang stellt das Rückgrat des Proteins dar, das Retinol befindet sich im Inneren und wird von insgesamt zehn Strängen eines β -Faltblattes umgeben.



Die NMR Messungen werden immer mit Simulationsrechnungen (v.a. Molekulardynamik) kombiniert, um zuverlässige Aussagen zu erhalten. In vielen Fällen stellt man dann fest, dass nicht für das gesamte Molekül eine eindeutige Lösung erhalten wird. Dies deutet darauf hin, dass in der Lösung Teile des Moleküls relativ flexibel sind.

Neben den rein statischen Informationen sind auch dynamische Informationen sehr wichtig. So kann man nicht nur die Struktur untersuchen, sondern auch Bewegungsprozesse, z.B. als Antwort auf externe Stimuli wie z.B. chemische Substanzen oder Licht. Auch die Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Molekülen, z.B. zwischen Enzym und Substrat liefert wertvolle Informationen.