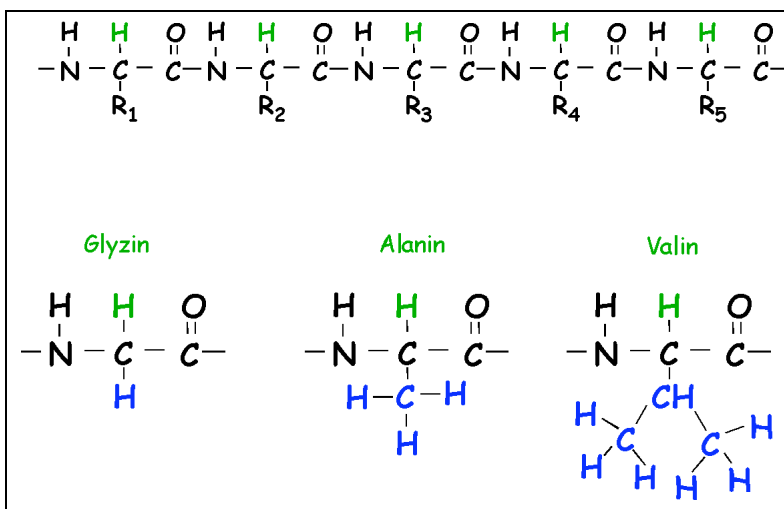
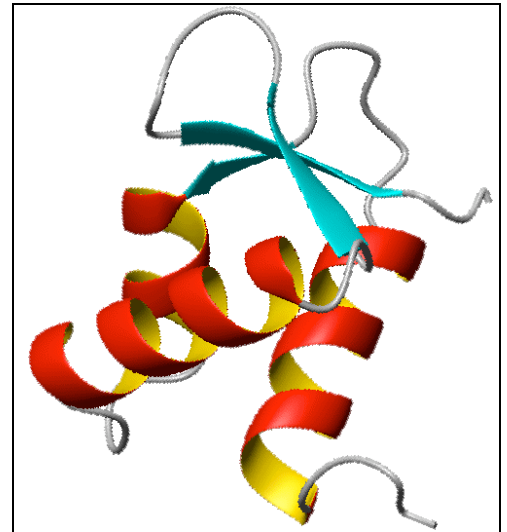


## 4.6 Strukturbestimmung in Proteinen

### 4.6.1 Aminosäuren und Proteine

Proteine gehören zu den wichtigsten Bestandteilen aller lebenden Organismen: sie spielen nicht nur für die Struktur eine wichtige Rolle, sondern vor allem auch für sämtliche chemischen Reaktionen, welche durch Enzyme gesteuert werden. Die Struktur und Funktion von Proteinen zu verstehen ist deshalb zu einer der wichtigsten Ziele von Biologie und Medizin geworden.

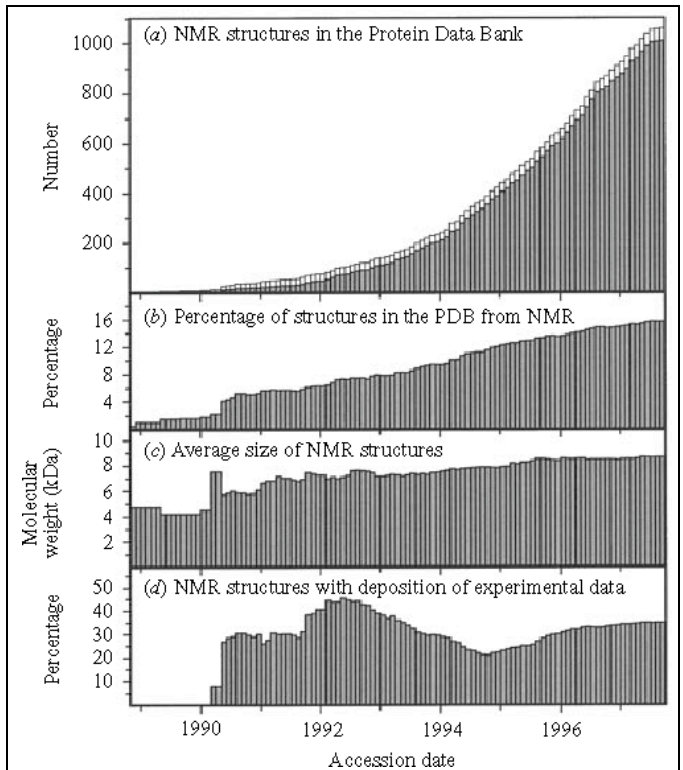


Chemisch sind Proteine Makromoleküle, welche aus einer Sequenz von Aminosäuren bestehen. Diese können jeweils durch die Formel  $\text{NH-CHR}_i\text{-CO}$  beschrieben werden, wobei der „Rest“  $\text{R}_i$  für die jeweilige Aminosäure charakteristisch ist.

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.

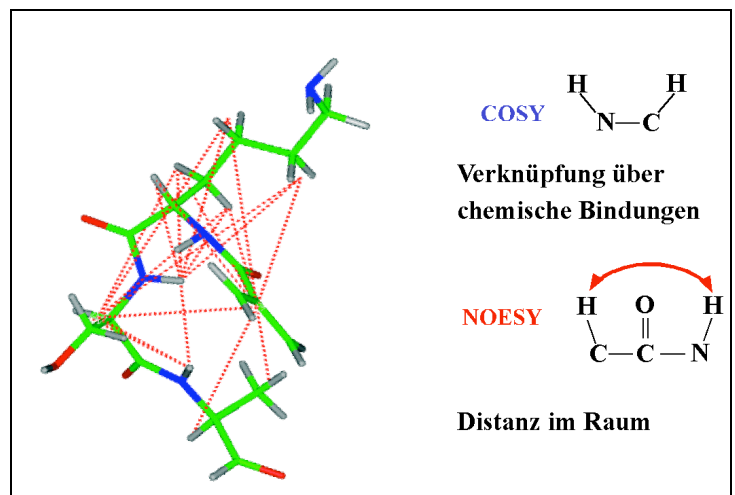
## 4.6.2 Strukturaufklärung

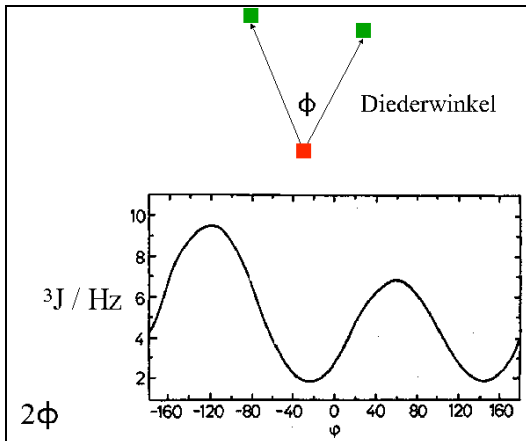
Der erste Schritt zum Verständnis der Funktion ist immer die Aufklärung der Struktur. Die wichtigste Methode für die Strukturaufklärung ist nach wie vor die Röntgenbeugung. Als zweitwichtigste Methode hat sich die NMR Spektroskopie etabliert (dafür wurde 2002 der Chemie-Nobelpreis an Kurt Wüthrich verliehen). Strukturbestimmung mit Hilfe der NMR ist zwar aufwändiger, hat aber auch gewisse Vorteile gegenüber der Röntgenmethode: Damit kann das Protein in wässriger Lösung, d.h. unter einigermaßen physiologischen Bedingungen untersucht werden, während für Untersuchungen mit Hilfe der Röntgenbeugung (gute!) Einkristalle benötigt werden. Da nicht alle Proteine kristallisiert werden können ist häufig die NMR die einzig mögliche Methode.



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.

Um die Struktur bestimmen zu können muss man möglichst viele Strukturelemente bestimmen. Direkt zugänglich über die NMR sind Abstände zwischen den Kernen  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ , sowie Bindungswinkel. Die Abstände im Raum erhält man aus sogenannten „NOESY“ Spektren. Verknüpfungen über chemische Bindungen sowie Bindungswinkel liefert das COSY Spektrum, welches wir als erstes diskutieren.





Bindungswinkel erhält man in erster Linie über die Messung von Kopplungskonstanten. Die nach Karplus benannte Beziehung sagt, dass die Kopplungskonstante vom Diederwinkel wie

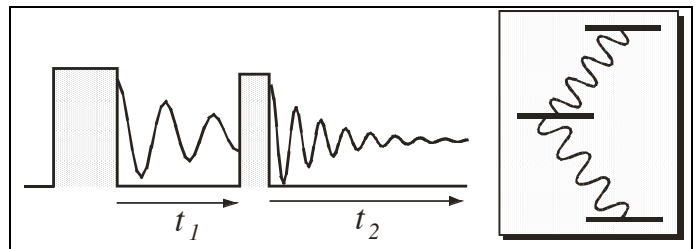
$$J = A + B \cos \phi + C \cos 2\phi$$

abhängt.

### 4.6.3 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 AX mit einem Hamiltonoperator



$$\mathcal{H} = \omega_A A_Z + \omega_B B_Z + J A_Z X_Z .$$

Die Gleichgewichtsmagnetisierung

$$\rho_0 = A_Z + X_Z$$

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

$$\rho(0) = A_y + X_y$$

umgewandelt. Während der Evolutionszeit  $t_1$  wird daraus

$$\begin{aligned} \rho(t_1) = & (A_y \cos(\omega_A t_1) - A_x \sin(\omega_A t_1) + X_y \cos(\omega_X t_1) - X_x \sin(\omega_X t_1)) \cos(Jt_1/2) \\ & + (-A_x X_z \cos(\omega_A t_1) - A_y X_z \sin(\omega_A t_1) - X_x A_z \cos(\omega_X t_1) - X_y A_z \sin(\omega_X t_1)) \sin(Jt_1/2) . \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} \rho(t_1, 0) = & (-A_z \cos(\omega_A t_1) - A_x \sin(\omega_A t_1) - X_z \cos(\omega_X t_1) - X_x \sin(\omega_X t_1)) \cos(Jt_1/2) \\ & + (-A_x X_y \cos(\omega_A t_1) + A_z X_y \sin(\omega_A t_1) - X_x A_y \cos(\omega_X t_1) + X_z A_y \sin(\omega_X t_1)) \sin(Jt_1/2) \end{aligned}$$

Von diesen Termen stellen nur die Komponenten  $A_x$ ,  $X_x$ ,  $A_z X_y$  und  $X_z A_y$  beobachtbare Magnetisierung dar.

Während der Detektionszeit  $t_2$  entwickelt sich die relevanten Komponenten des Dichteoperators wie

$$A_x \sin(\omega_A t_1) \cos(Jt_1/2) \rightarrow \sin(\omega_A t_1) \cos(Jt_1/2) [(A_x \cos(\omega_A t_2) + A_y \sin(\omega_A t_2)) \cos(Jt_2/2) + (A_y X_z \cos(\omega_A t_2) - A_x X_z \sin(\omega_A t_2)) \sin(Jt_2/2)]$$

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

$$s(t_1, t_2) = \sin(\omega_A t_1) \cos(Jt_1/2) \sin(\omega_A t_2) \cos(Jt_2/2)$$

#### 4.6.4 Form und Interpretation des Spektrums

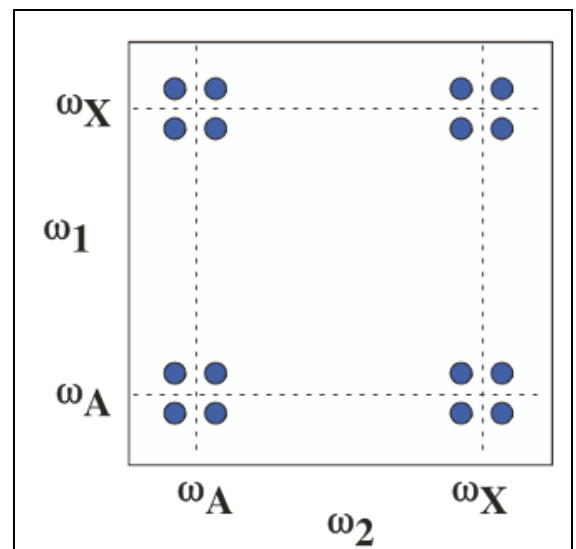
Eine zweidimensionale Fouriertransformation erzeugt daraus vier Linien bei den Frequenzen  $[\omega_1 = \omega_A \pm J/2, \omega_2 = \omega_A \pm J/2]$ . Einen entsprechenden Signalbeitrag bei der Frequenz  $[\omega_1 = \omega_X \pm J/2, \omega_2 = \omega_X \pm J/2]$  liefert der Term  $X_x \sin(\omega_X t_1) \cos(Jt_1/2)$ .

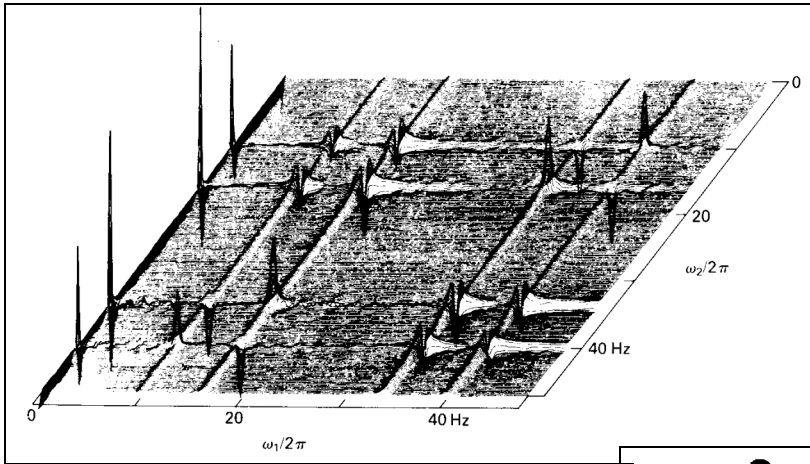
Einen weiteren Signalbeitrag erhält man von den Termen  $(A_z X_y \sin(\omega_A t_1) \sin(Jt_1/2))$  und  $X_z A_y \sin(\omega_X t_1) \sin(Jt_1/2)$ . Der erste entwickelt sich während der Detektion wie

$$A_z X_y \sin(\omega_A t_1) \sin(Jt_1/2) \rightarrow \sin(\omega_A t_1) \sin(Jt_1/2) [(A_z X_y \cos(\omega_X t_2) - A_z X_x \sin(\omega_X t_2)) \cos(Jt_2/2) - (X_x \cos(\omega_X t_2) + X_y \sin(\omega_X t_2)) \sin(Jt_2/2)]$$

Mit der Observablen  $X_y$  wird das Signal im Zeitbereich  $\sin(\omega_A t_1) \sin(Jt_1/2) \sin(\omega_X t_2) \sin(Jt_2/2)$  und im Frequenzbereich erhalten wir vier Linien bei  $[\omega_1 = \omega_A \pm J/2, \omega_2 = \omega_X \pm J/2]$ . Der Term  $X_z A_y \sin(\omega_X t_1) \sin(Jt_1/2)$  erzeugt dementsprechend Linien bei  $[\omega_1 = \omega_X \pm J/2, \omega_2 = \omega_A \pm J/2]$ .

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 den Kern 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 eliminiert.

In diesem Beispiel wurde das COSY Spektrum von  $^{11}\text{B}$  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.

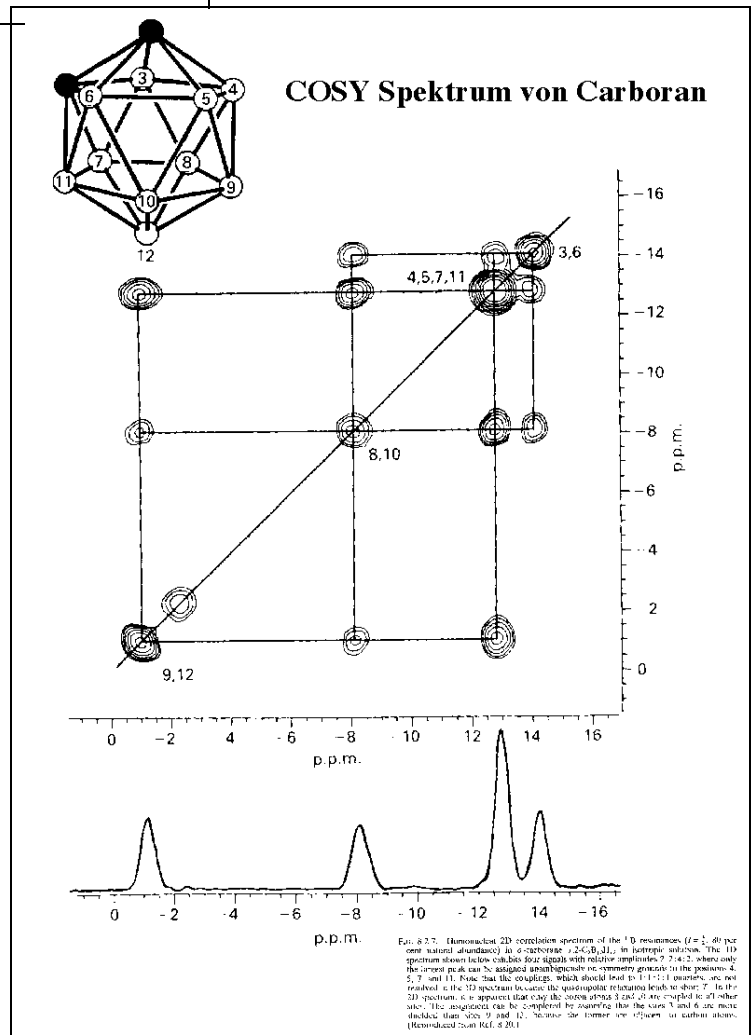
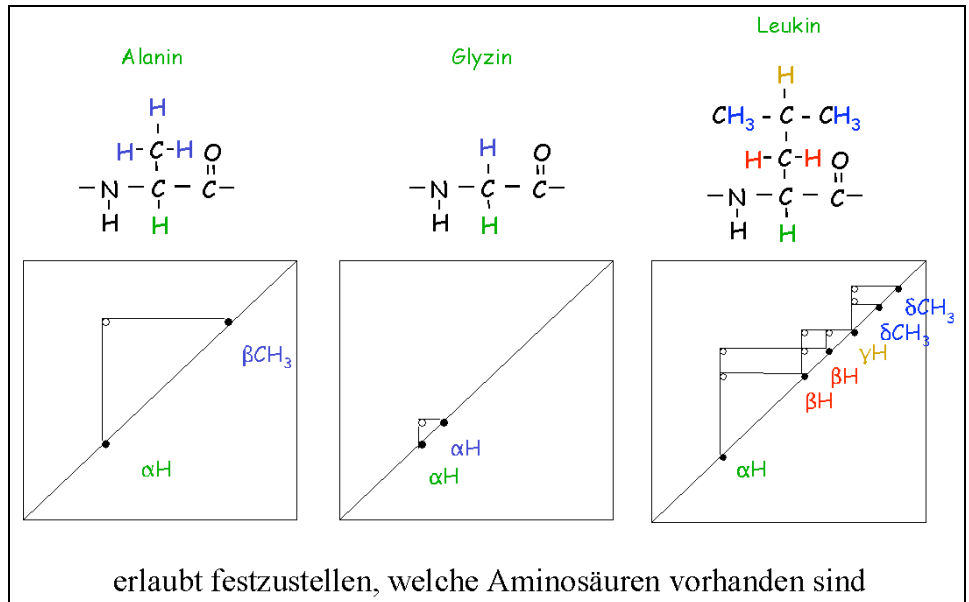


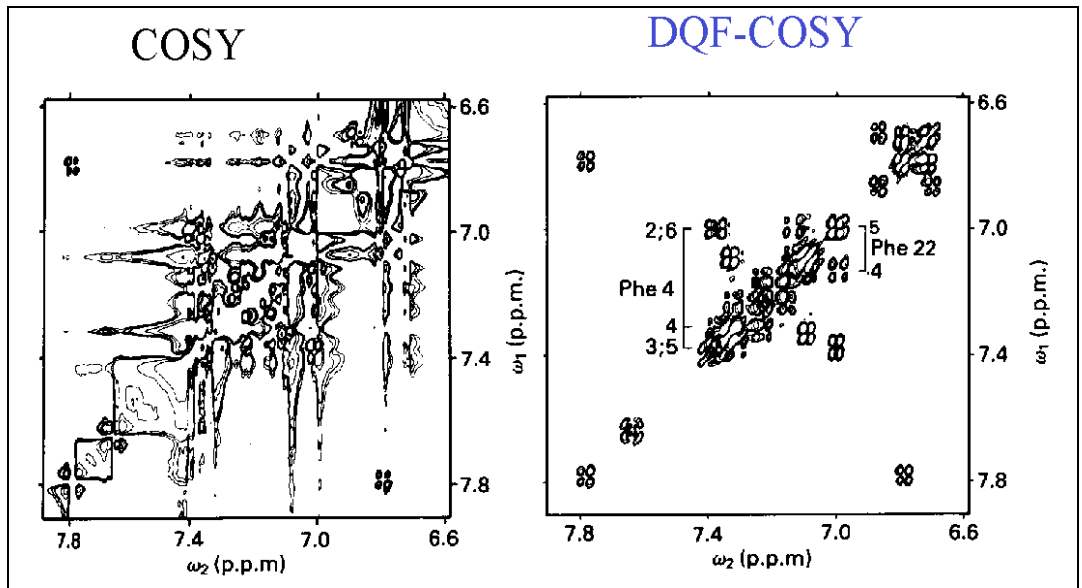
Fig. 8.27. Homonuclear 2D correlation spectrum of the  $^{11}\text{B}$  resonances ( $I=3/2$ , 80% natural abundance) in o-carborane ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{B}_{10}$ ) in isotropic solution. The 1D spectrum shown includes combined four signals with relative amplitudes 2:7:4:2, where only the largest peak can be assigned unambiguously to symmetry groups in the positions 4, 5, 7 and 11. Note that the couplings, which should lead to 1:1:1:1 quartets, are not resolved in the 2D spectrum because the quadrupolar relaxation leads to short  $T_2$ . In the 2D spectrum, it is apparent that only the cross-peaks 3 and 6 are coupled to all other sites. The assignments can be completed by summing the cross 9 and 6, one more doublet than with 9 and 12, because the former are efficient in carbon atoms. (Reproduced from Ref. 8.20.)

### 4.6.5 COSY: Anwendungen

Da COSY Spektren die chemischen Bindungen zwischen den Kernen reflektieren kann man sie benutzen, um unterschiedliche Aminosäuren zu unterscheiden. So ist im Alanin das  $\alpha$ -CH Proton an eine Methylgruppe gekoppelt, im Glyzin an ein weiteres  $\alpha$ -CH Proton, oder im Leukin an eine  $\text{CH}_2$ , eine CH und 2  $\text{CH}_3$  Gruppen.



Da die Spektren häufig zu voll sind verwendet man unterschiedliche Techniken, um den Überlapp der Signale zu reduzieren. Eine wichtige Technik, welche nur Signale von Gruppen von Spins (im Gegensatz zu isolierten Spins) übrig lässt, ist das Doppelquantenfilter. Wie hier am Beispiel von BPTI gezeigt werden damit die einzelnen Resonanzlinien getrennt sichtbar.

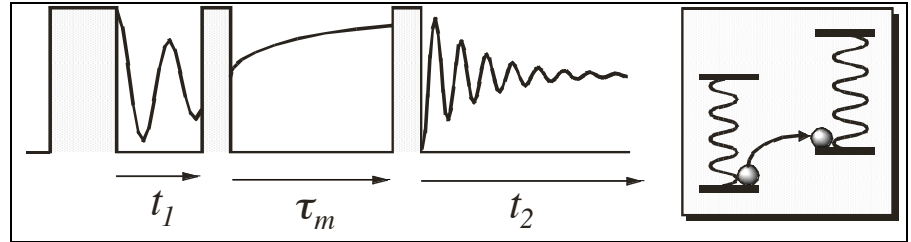


### 4.6.6 NOESY

Das zweite wichtige Experiment für die Untersuchung von Biomolekülen wird als NOESY (für Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) bezeichnet. In diesem Experiment 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  $A_+X_-$  enthält, welche (longitudinale) Polarisation zwischen A und X tauschen.

Das NOESY Experiment verwendet eine Dreipulsfolge. Wir betrachten wiederum ein Zweispinsystem, welches aber nicht gekoppelt ist ( $J=0$ ). Wie beim COSY Experiment beginnt man mit einer Evolutionszeit. Danach der das Spinsystem durch den Dichteoperator



$$\rho(t_1) = A_y \cos(\omega_A t_1) - A_x \sin(\omega_A t_1) + X_y \cos(\omega_X t_1) - X_x \sin(\omega_X t_1) .$$

beschrieben wird. Der zweite Puls, welcher die Evolutionszeit abschließt erzeugt daraus

$$\rho(t_1, 0) = -A_z \cos(\omega_A t_1) - A_x \sin(\omega_A t_1) - X_z \cos(\omega_X t_1) - X_x \sin(\omega_X t_1) .$$

Die transversalen Terme  $A_x$  und  $X_x$  zerfallen während der Mischzeit  $\tau_m$  und werden nicht mehr berücksichtigt.

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

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_{dd} = \omega_d \{ & (1-3\cos^2\theta) (A_{1z} X_{2z} - \frac{1}{4}(A_{1+}X_{2-} + A_{1-}X_{2+})) \\ & - \frac{3}{2} \sin\theta \cos\theta [(A_{1z}X_{2+} + A_{1+}X_{2z}) e^{-i\phi} + (A_{1z}X_{2-} + A_{1-}X_{2z}) e^{i\phi}] \\ & - \frac{3}{4} \sin^2\theta [A_{1+}X_{2+} e^{-2i\phi} + A_{1-}X_{2-} e^{2i\phi}] \} . \end{aligned}$$

Aufgrund der molekularen Bewegung in einer Flüssigkeit verschwindet die Kopplung im zeitlichen Mittel. Die Terme  $(A_{1+}X_{2-} + A_{1-}X_{2+})$  und  $(A_{1+}X_{2+} + A_{1-}X_{2-})$  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, so ist der Zustand am Ende der Mischzeit

$$\rho(t_1, \tau_m) = -A_z [(1-x) \cos(\omega_A t_1) + x \cos(\omega_X t_1)] - X_z [(1-x) \cos(\omega_X t_1) + x \cos(\omega_A t_1)].$$

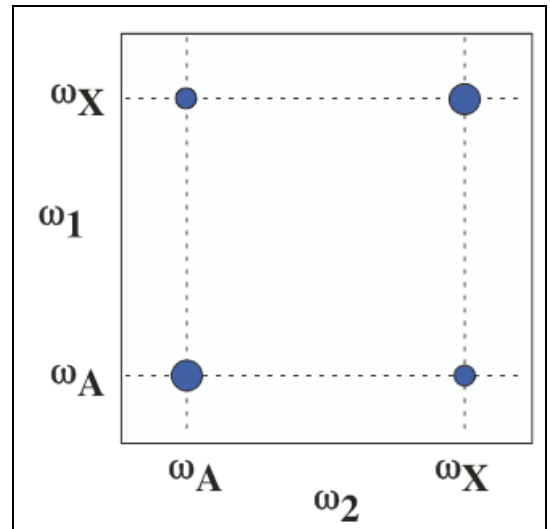
Der dritte Puls erzeugt daraus

$$\rho(t_1, \tau_m, 0) = -A_y [(1-x) \cos(\omega_A t_1) + x \cos(\omega_X t_1)] - X_y [(1-x) \cos(\omega_X t_1) + x \cos(\omega_A t_1)].$$



Wir erhalten somit insgesamt vier Linien:

$\omega_1$	$\omega_2$	Amplitude
$\omega_A$	$\omega_A$	-x
$\omega_A$	$\omega_X$	x
$\omega_X$	$\omega_A$	x
$\omega_X$	$\omega_X$	-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  $\sim d^{-6}$ .

Die Austauschamplitude  $x$  ist abhängig von der Mischzeit  $\tau_m$ . Der Austausch kann beschrieben werden durch ein lineares Differentialgleichungssystem

$$d/dt A_z = -w(A_z - X_z) - A_z/T_1$$

$$d/dt X_z = -w(X_z - A_z) - X_z/T_1,$$

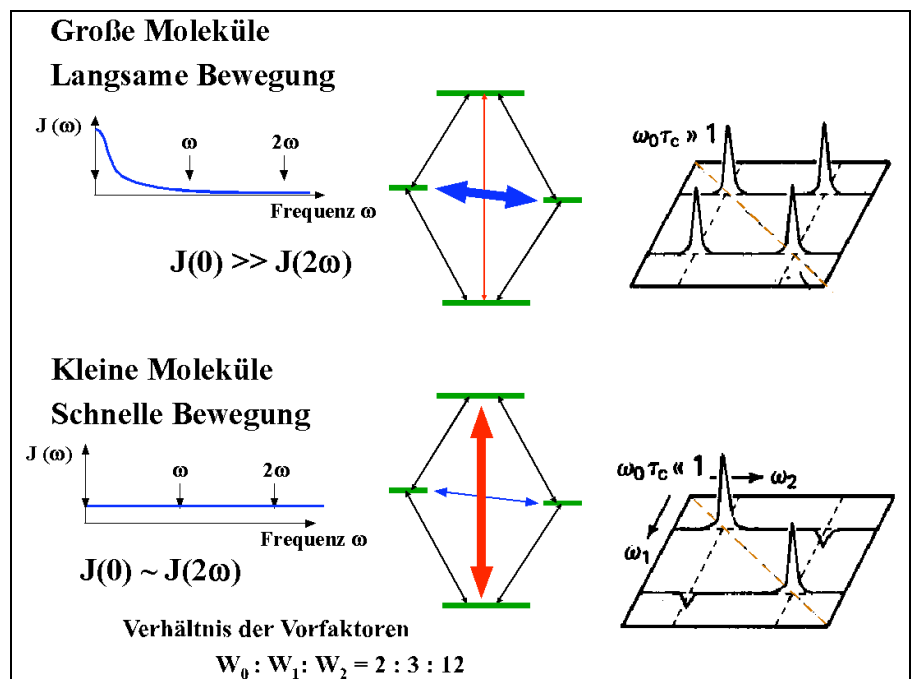
wobei  $T_1$  die Spin-Gitter Relaxationszeit beschreibt,  $w$  die Austauschrate durch die d-d Wechselwirkung.

#### 4.6.7 Vorzeichen

Der Austausch kann über Nullquanten- oder Doppelquantenprozesse erfolgen. Jede Rate ergibt sich als Produkt aus einem Vorfaktor

$$W_i = |\langle i | H_1 | j \rangle|^2$$

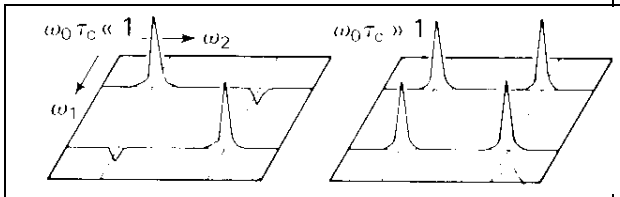
und der Spektralen Leistungsdichte  $J(0)$ , resp.  $J(2\omega)$  für den entsprechenden Übergang. Bei großen Molekülen, mit entsprechend langen Korrelations-



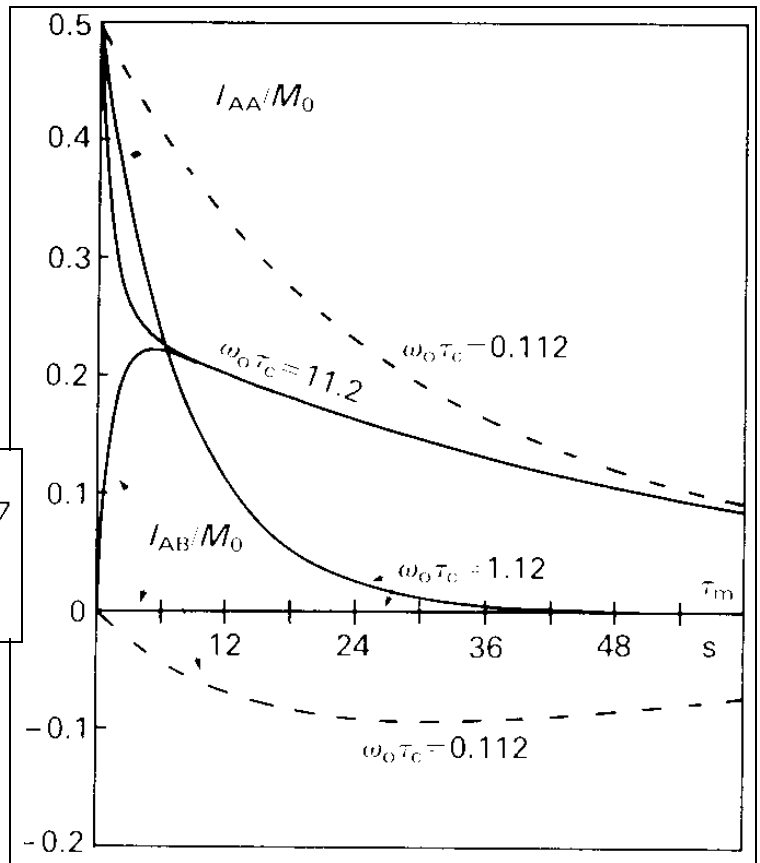


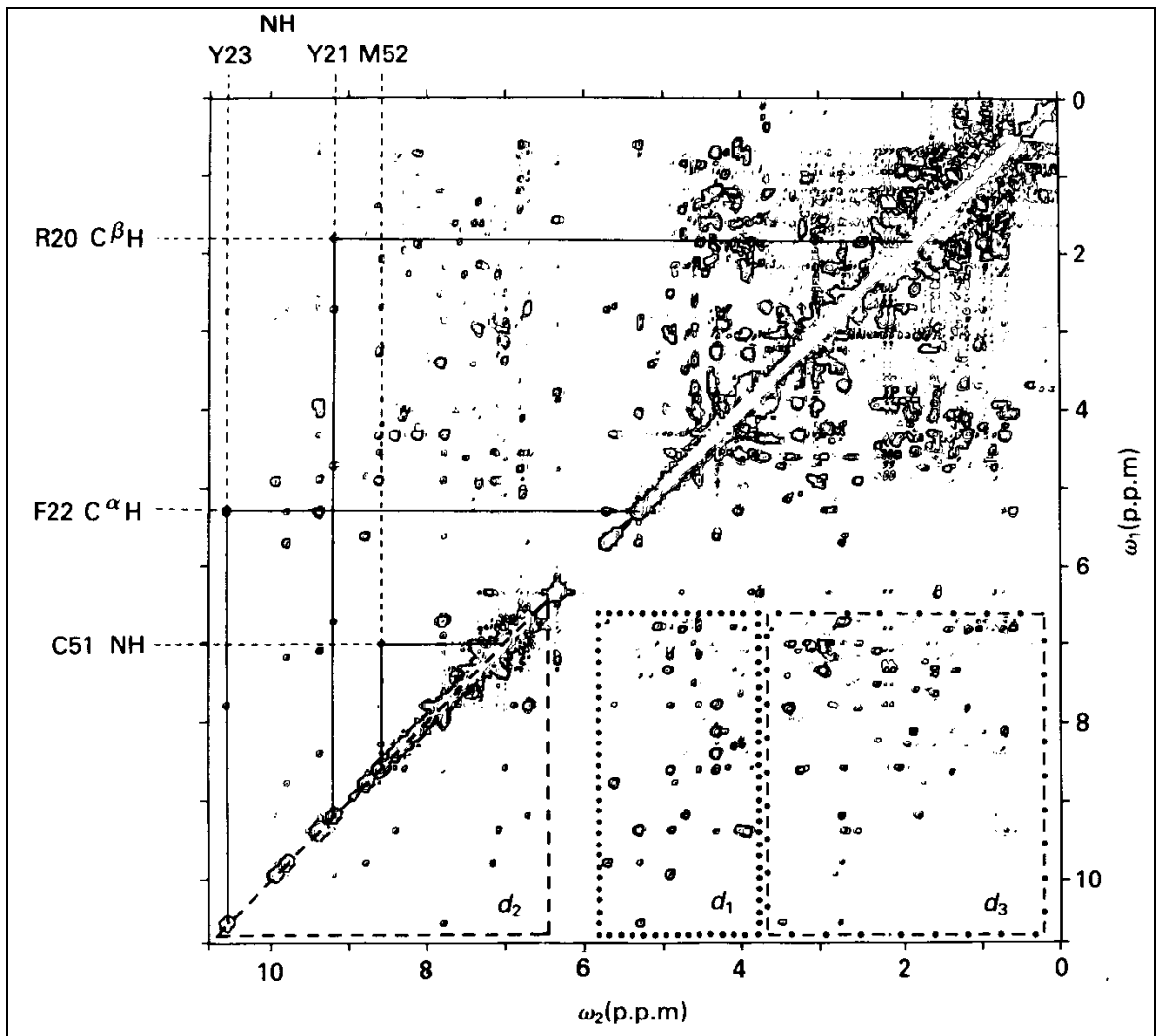
zeiten ist die Spektrale Leistungsdichte bei der Frequenz 0 deutlich höher als bei  $2\omega$ , so dass in diesem Fall der Nullquanten (=Flip-Flop) Prozess dominiert. Dieser Prozess überträgt Magnetisierung zwischen den beiden Spins, so dass die Außerdiagonalpeaks das gleiche Vorzeichen haben wie die Linien auf der Diagonalen. Bei kleinen Molekülen sind jedoch die Korrelationszeiten so kurz, dass die spektralen Leistungsdichten vergleichbar sind. In diesem Fall dominiert, aufgrund der unterschiedlichen Vorfaktoren, der Doppelquantenprozess. Dieser tauscht das Vorzeichen der Magnetisierung bei der Übertragung und führt deshalb zu negativen Außerdiagonalpeaks.

Der Austauschprozess führt mit der Rate  $w$  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.



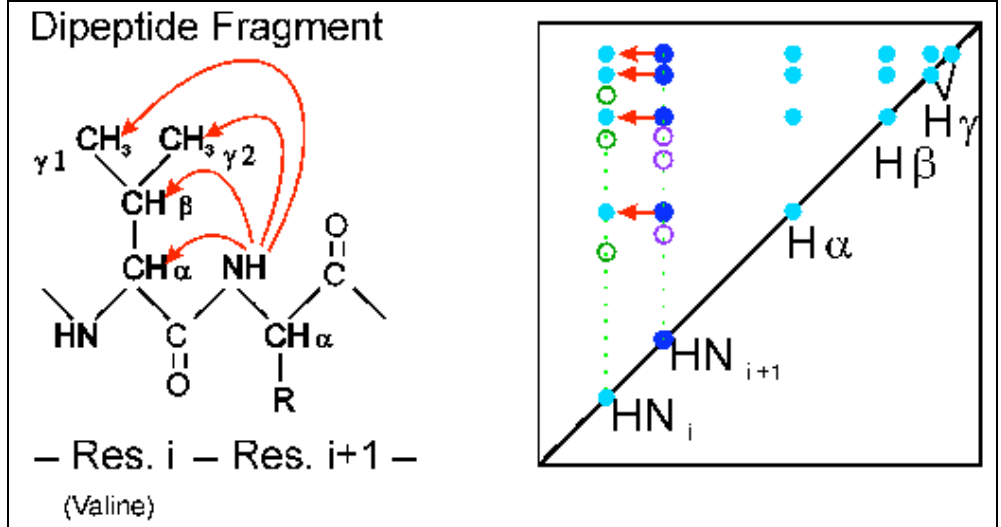


In der Figur ist das NOESY Spektrum von BPTI, einem kleinen Protein dargestellt. Auf der Diagonalen erscheint das 1D Spektrum, welches sehr wenig Auflösung zeigt. Die gestrichelten Linien geben die Bereiche an, in denen die wichtigsten Kreuzpeaks für die Zuordnung liegen: Die Amidprotonen NH liegen im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

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.

### 4.6.8 Proteinfragmente

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.

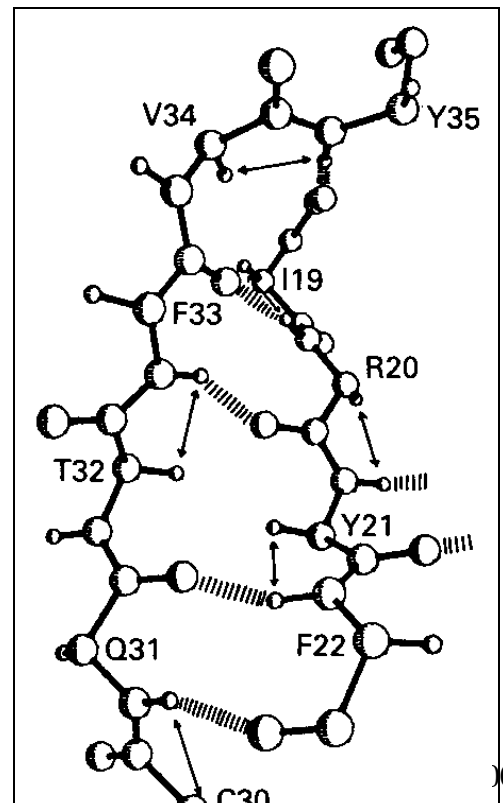
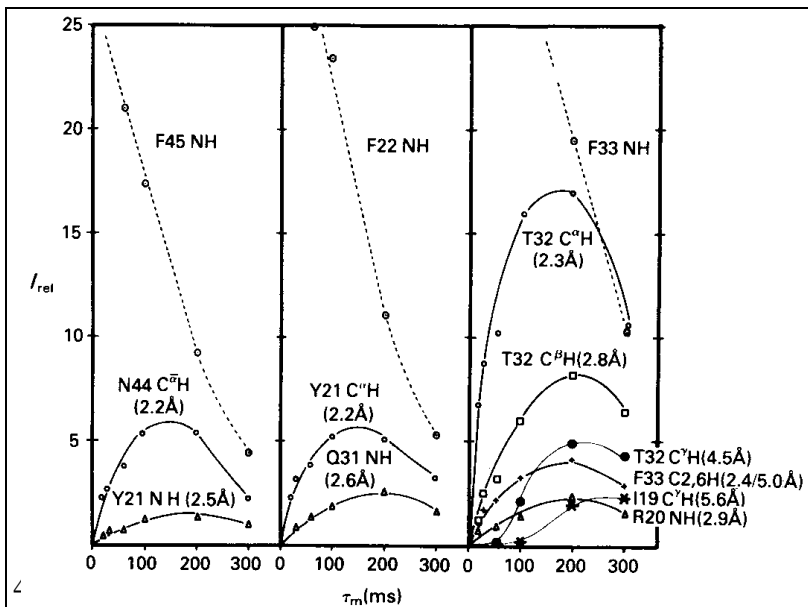


So können NOESY Kreuzpeaks verwendet werden, um ein Amidproton einer bestimmten Aminosäure zuzuordnen: Im gezeigten Beispiel werden dafür die Abstände zu einem benachbarten Valin verwendet.

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.

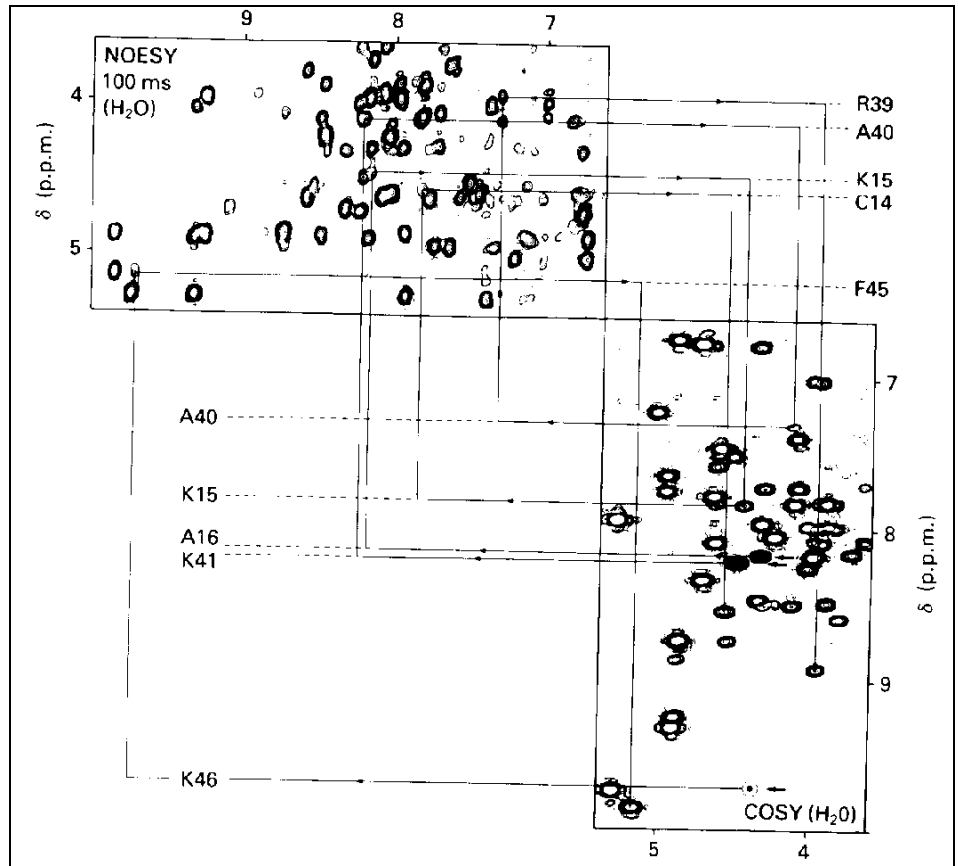
### 4.6.9 Beispiel: BPTI

In der Figur ist ein Teil des Proteins BPTI 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 A auf Spin M und erst von dort auf Spin X übertragen.

Hier ist als Beispiel die Bestimmung der Struktur von BPTI dargestellt. Links oben ist die Struktur des beta-Faltblattes dargestellt. Unten 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

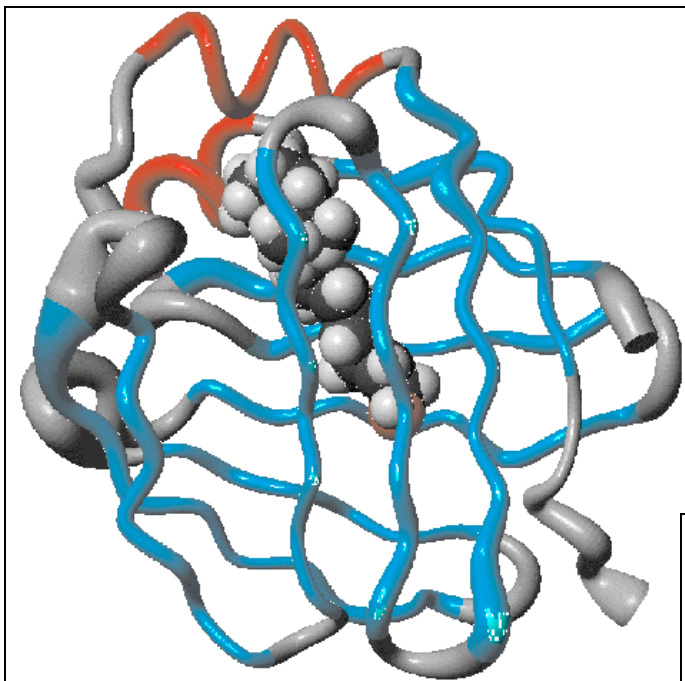
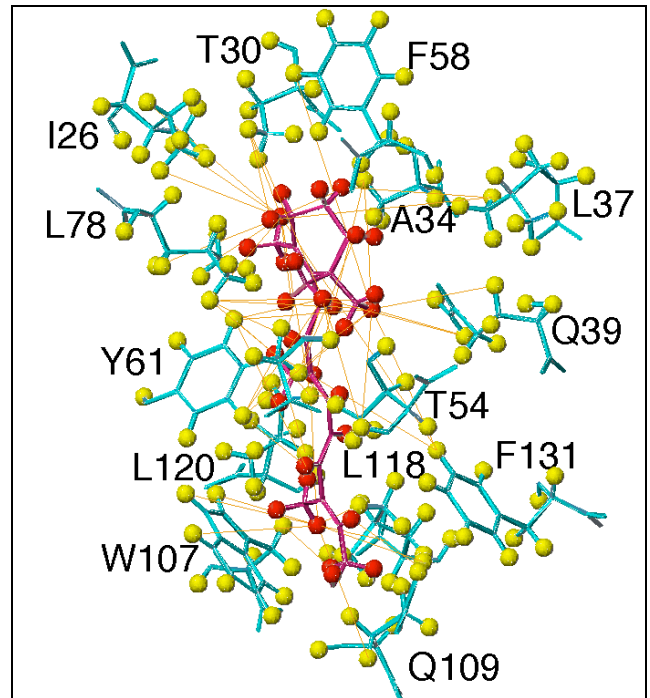


zur nächsten. Die Figur oben rechts zeigt die Abhängigkeit der einzelnen Linienamplituden von der Mischzeit: die Diagonalpeaks haben die maximale Amplitude zu Beginn der Mischzeit, während die Kreuzpeaks mit Amplitude 0 beginnen, aufgrund der Kreuzrelaxation wachsen und schließlich aufgrund der Relaxation 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  $\beta$ -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.

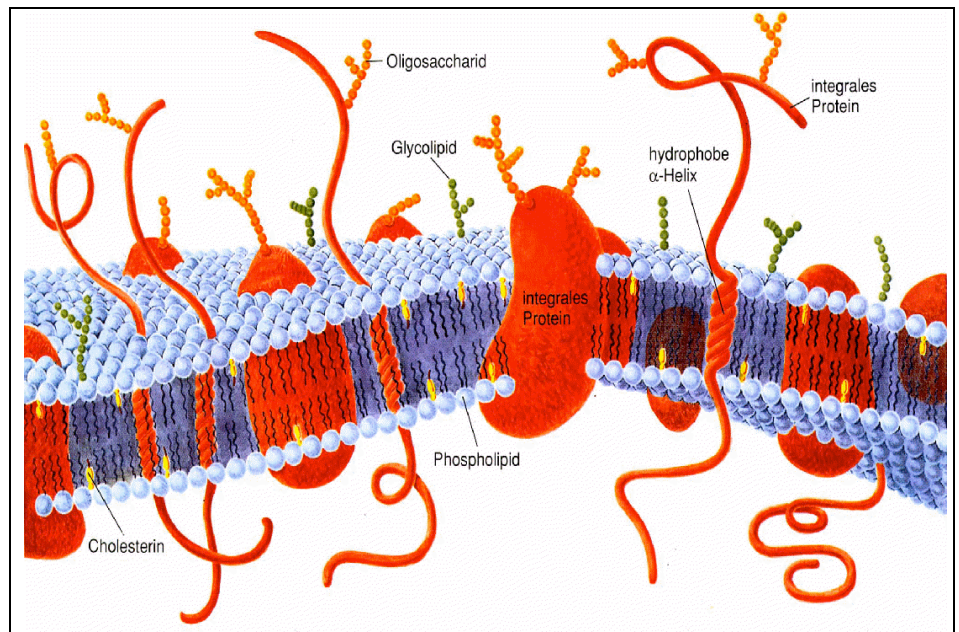
Auch die Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Molekülen, z.B. zwischen Enzym und Substrat liefert wertvolle Informationen.

#### 4.6.10 Festkörper

Die meisten NMR Experimente an Proteinen werden in Lösung durchgeführt, weil hier die spektrale Auflösung optimiert wird. Außerdem ist Wasser für die meisten interessanten Proteine die natürliche Umgebung.

Dies trifft jedoch nicht für alle Proteine zu. Insbesondere Transmembran-Proteine, also Proteine, welche in eine biologische Membran eingebettet sind. Diese sind stark lipophil und lösen sich deshalb in Wasser nicht.

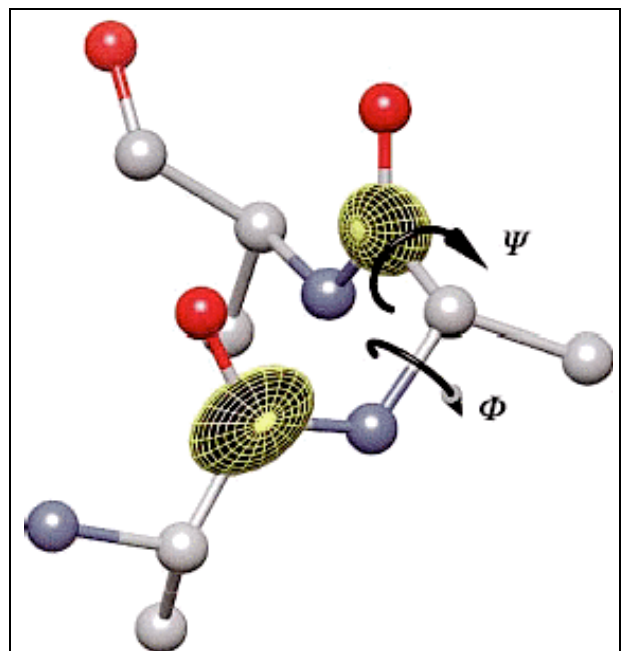
Solche Moleküle können mit den Methoden der Festkörper-NMR untersucht werden. Um eine genügend gute Auflösung zu erhalten wird hierbei fast immer mit MAS gearbeitet.



Es gibt auch Proteine, welche natürlicherweise in fester Form vorliegen. Dazu gehört z.B. Seide, welche als halb-kristallines Material vorliegt. Seide ist eines der Materialien mit der größten Reißfestigkeit – wesentlich höher als Stahl. Um diese besonderen Eigenschaften besser zu verstehen werden Daten über die Struktur benötigt.

Die Sequenz der Seide ist bekannt, nicht aber ihre sekundäre und tertiäre Struktur. Diese wird wesentlich durch die Rotation um C-C und C-N Bindungen bestimmt. Sie kann z.B. bestimmt werden, wenn man die relative Orientierung von benachbarten C=O Kohlenstoff bestimmt. Beugungsmethoden helfen wir kaum weiter, da die langreichweitige Ordnung sehr gering ist.

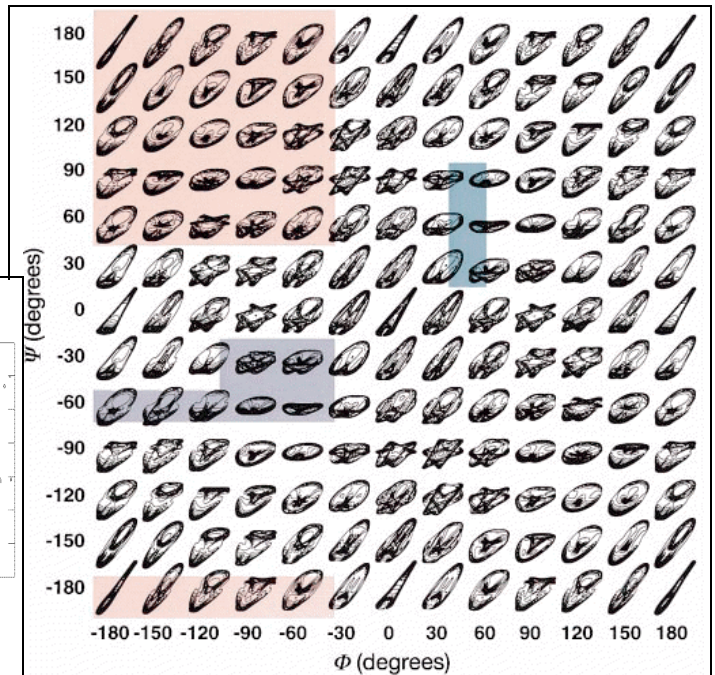
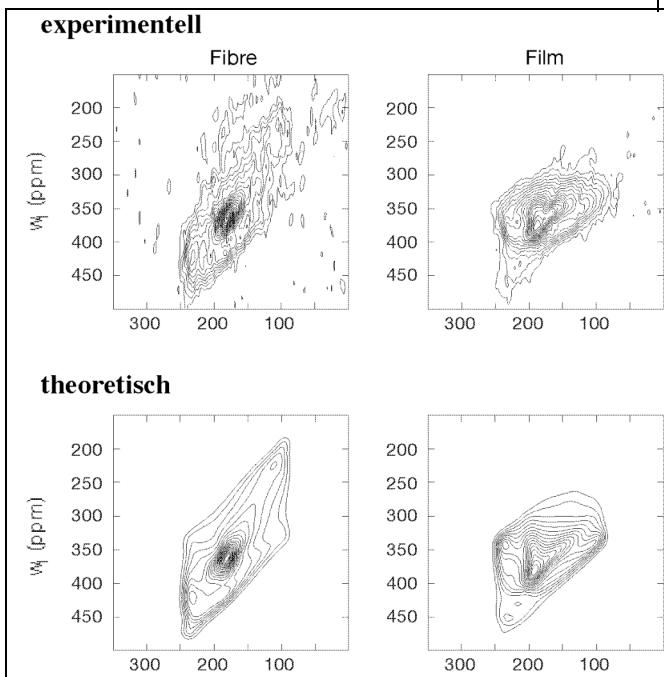
Hingegen ist es möglich, mit NMR die relative Orientierung der CSA-Tensoren zu bestimmen (J.D.v. Beek, L. Beaulieu, H. Schäfer, M. Demura, T. Asakura, and B.H. Meier, Nature **405**, 1077





(2000).). Da diese immer an die chemischen Bindungen gekoppelt sind erhält man daraus die gewünschte Information.

Die Figur zeigt die erwarteten Pulverspektren als Funktion der beiden Winkel  $\Psi$  und  $\Phi$ . Die farbig unterlegten Bereich sind energetisch günstig (gemäß MD-Simulationen).

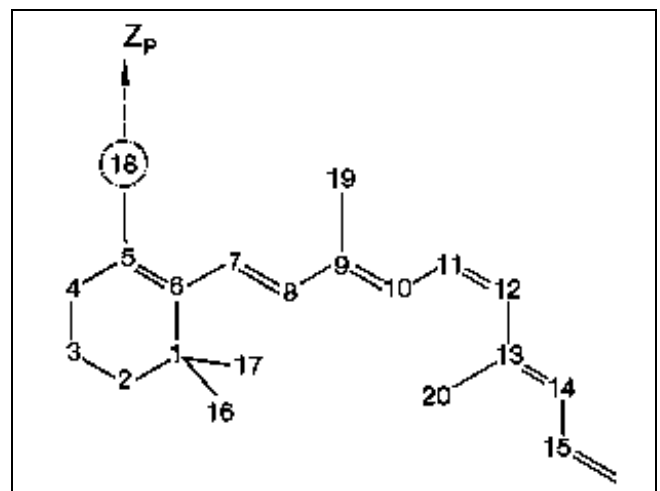


Vergleicht man die gemessenen Spektren mit Spektren, welche für bestimmte dihedrale Winkel gerechnet wurden, so kann man den Bereich der möglichen Winkel stark einschränken. In Kombination mit Kraftfeldrechnungen kann die vorliegende Orientierungsverteilung bestimmt werden.

Die beste Übereinstimmung wird für die Wertepaare  $(-140^\circ, 35^\circ)$  und  $(-57^\circ, -47^\circ)$  erhalten.

#### 4.6.11 Lichtinduzierte Konformationsänderung

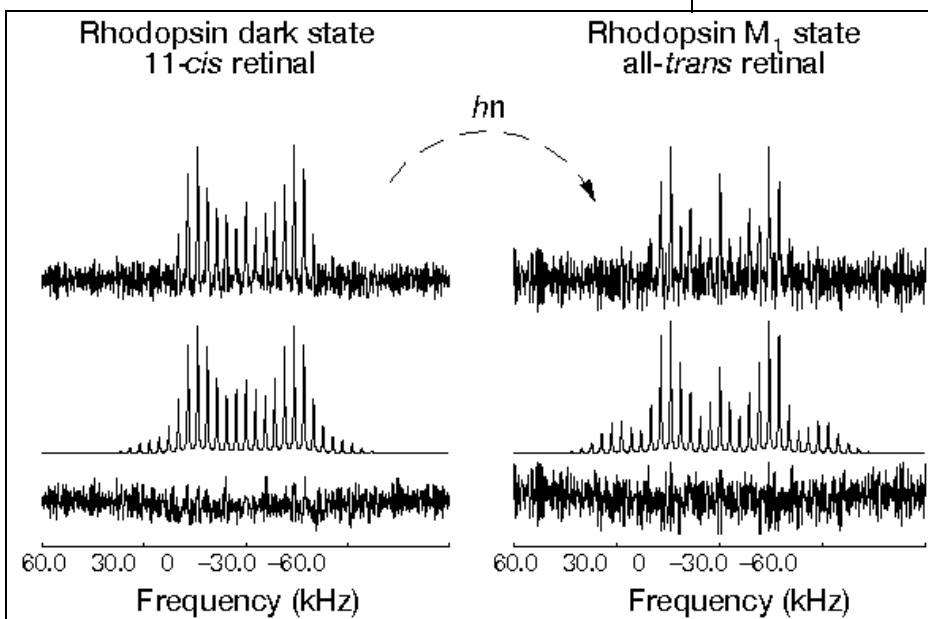
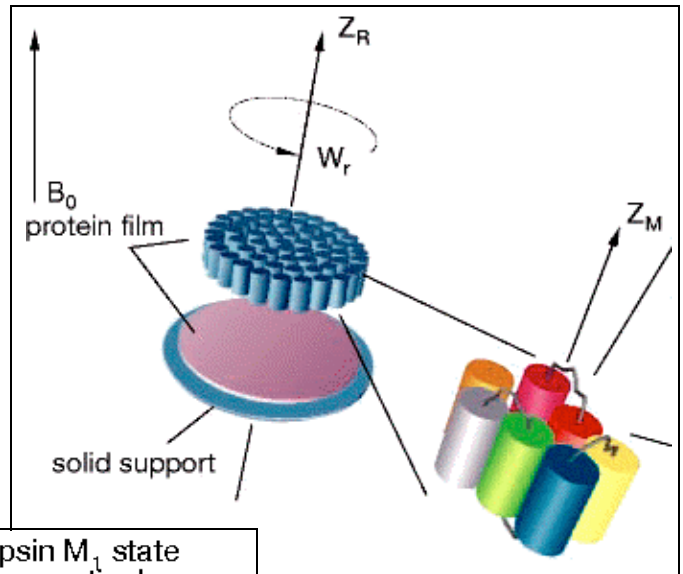
Ein weiteres Beispiel für die Möglichkeiten der Festkörper NMR für die Untersuchung von großen Biomolekülen ist die Untersuchung der Aktivierung von Retinal im photosynthetischen Komplex Rhodopsin. Hier wird nicht das Protein, sondern ein darin eingelagertes kleines Molekül, welches für die Funktion des Proteins eine entscheidende Bedeutung hat, untersucht. Retinal weist eine Reihe von benachbarten Doppelbindungen auf, welche die planare Struktur stabilisieren und die Absorption von Licht





ermöglichen. Es war bereits bekannt, dass sich das Molekül bei der Absorption bewegt.

Um die Art der Umordnung zu bestimmen wurden orientierte Proben hergestellt, in der jeweils eine der Methylgruppen 18, 19 oder 20 deuteriert waren.



Das Muster der MAS Seitenbanden hängt von der Orientierung der C-C(<sup>2</sup>H)<sub>3</sub> Bindung bezüglich der Rotationsachse ab. Die gemessenen Spektren wurden verglichen mit Rechnungen.

Aus dem Vergleich der gerechneten mit den gemessenen Spektren können die Winkel bestimmt werden. In der Figur ist

dargestellt wie die Spitze des Moleküls sich während der Belichtung bewegt.

