

**Fakultät für Physik und Astronomie
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

Diplomarbeit
im Studiengang Physik
vorgelegt von
Andreas Brinkmann
aus Hannover

1995

NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Dynamik von Proteinen

Die Diplomarbeit wurde ausgeführt am
Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie Heidelberg
unter der Betreuung von

Herrn Priv.-Doz. Ph. D. Christian Sander

sowie von

Herrn Prof. Dr. Siegfried Hunklinger

Institut für Angewandte Physik der Universität Heidelberg

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Hartmut Oshkinat am Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie in Heidelberg in der Zeit vom September 1994 bis zum Dezember 1995.

Ich möchte all jenen danken, die mich während meiner Diplomarbeit unterstützten:

- Herrn Dr. Hartmut Oshkinat für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten in seiner Arbeitsgruppe und die vielen Anregungen und Vorschläge,
- Herrn Priv.-Doz. Ph. D. Christian Sander vom Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie und Herrn Prof. Dr. Siegfried Hunklinger vom Institut für Angewandte Physik der Universität Heidelberg für ihre Bereitschaft, meine Arbeit zu verfolgen und zu begutachten,
- Herrn Dr. Lorenz Mitschang für die Idee des Projektes, die Einführung in die Geheimnisse der NMR-Spektroskopie, die Unterstützung bei den ersten Gehversuchen am Spektrometer (unvergessen bleibt die Vorbereitung einer Messung in der Nacht vom 23. zum 24. 12. 1994) und für die vielen fruchtbaren Diskussionen,
- Herrn Dr. Peter Neidig für die Anpassungen des Programms AURELIA,
- Frau Dr. Anne Ulrich, Herrn Dr. Johan Schultz und Herrn Dr. Mark Kelly für die vielen kleinen Hilfestellungen und den geballten Witz, der das Arbeiten in „unserem“ Zimmer so angenehm machte,
- Herrn David Grindrod und Herrn David Croft für die unersetzliche Betreuung der Computer und so manch lustige Kaffeepause,
- sowie den Damen Jennifer Ashurst, Dr. Maria Macias, Dr. Virginie Gervais, Helena Domingues, Maika Smalla und den Herren Berndt Simon, Stewart Moulton, Dr. Yihua Yu, Dr. Thomas Müller, Juri Rappsilber, Dr. Michael Gryk für die vielen hilfreichen Gespräche und Anregungen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung während des gesamten Studiums.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie	2
1.1 Beiträge zum Hamilton-Operator	4
1.1.1 Wechselwirkung mit dem statischen Magnetfeld	4
1.1.2 Indirekte Spin-Spin Wechselwirkung	5
1.1.3 Wechselwirkung mit dem Hochfrequenzfeld	6
1.1.4 Direkte dipolare Wechselwirkung	6
1.2 Der statistische Operator	7
1.3 Beschreibung von Pulsexperimenten	8
1.3.1 Zeitentwicklung des statistischen Operators	8
1.3.2 Signaldetektion	9
1.3.3 Produktoperatorformalismus und Beispiel	10
2 Relaxation	12
2.1 Der Relaxationssuperoperator $\hat{\Gamma}$	13
2.1.1 Semi-klassische Relaxationstheorie	13
2.1.2 Kreuzrelaxation und direkte Relaxation	14
2.2 Dipolare Relaxation in Intervallen freier Präzession	15
2.3 Dipolare Relaxation in Pulsintervallen	16
2.3.1 Der Hamilton-Operator im gekippten Koordinatensystem	17
2.3.2 Dipolare Relaxation im gekippten Koordinatensystem	18
2.4 Experimente zur Kreuzrelaxation	20
2.4.1 Das NOESY-Experiment	20
2.4.2 Das ROESY- und das O-ROESY-Experiment	25
3 Theoretische Grundlagen für Experimente zur Proteindynamik	29
3.1 Diskussion der Pulssequenzen	30
3.2 Aufbaukurven und Aufbauoberflächen	32
3.3 Reihenentwicklung der Intensitätsfunktionen	33
3.3.1 Nullstellen der Aufbaukurven für festes τ_{sl} in linearer Näherung	34
3.4 Intensitätsfunktionen für ein isolierte Zweispinsystem	36

3.4.1	Nullstellen der Aufbaukurven für ein isoliertes Zweispinsystem	41
3.4.2	Zusammenfassung der Untersuchungen zum isolierten Zweispinsystem	44
4	Messungen und Ergebnisse	45
4.1	Messungen	45
4.1.1	Die Probe	45
4.1.2	Aufnahme und Prozessierung der Spektren	45
4.1.3	Quantifizierung der Kreuzpeaks	47
4.1.4	Auswertung der Aufbaukurven	48
4.1.5	Die untersuchten Kreuzpeaks	49
4.2	Ergebnisse	51
4.2.1	Aufbauoberflächen	51
4.2.2	Aufbaukurven für die Experimente a und b	51
4.2.3	Nullstellen und Korrelationszeiten	58
5	Diskussion der Ergebnisse	62
5.1	Kreuzpeaks der Protonen in β -Faltblättern	62
5.2	Das Problem der Spindiffusion	62
5.3	Der adiabatische Puls	63
5.4	Fehler der Kreuzpeakvolumina	64
5.5	Grenzen des Modells der isotropen Rotation	64
5.6	Sensitivität der Experimente	64
5.7	Vergleichbare Experimente	65
	Zusammenfassung	66
A	Die Peptidbindung und das Protein BPTI	67
A.1	Die Peptidbindung	67
A.2	Das Protein BPTI	69
B	Symbole	70
C	Abkürzungen	74

Einleitung

Die NMR-Spektroskopie hat sich in den vergangenen Jahren neben der Röntgenkristallographie als Methode zur Bestimmung der Struktur von biologischen Makromolekülen etabliert [9, 59].

Neben der Struktur sind auch dynamische Prozesse von großer Bedeutung, weil die Funktion des Moleküls oft mit Konformationsänderungen einhergeht [54]. Mit Hilfe der Röntgenkristallographie kann die Dynamik nur in eingeschränktem Maße bestimmt werden, da gerade für flexible Molekülteile die Elektronendichte schwer zu interpretieren ist [24]. Hier kann die hochauflösende NMR-Spektroskopie als komplementäre Technik betrachtet werden, welche eine Vielzahl von Experimenten zur Messung dynamischer Prozesse ermöglicht.

Konformationsänderungen können unter Umständen als chemischer Austausch gemessen werden [26]. Dazu müssen aber für die verschiedenen Konformationen aufgelöste Resonanzlinien vorliegen.

Die Dynamik eines Moleküls kann durch Relaxationsmessungen erfaßt werden. Neben der Diffusionsbewegung des ganzen Moleküls in der Lösung ist es wichtig, die interne Bewegung zu messen, welche der Diffusionsbewegung des ganzen Moleküls überlagert ist. Für biologische Makromoleküle wird dazu oft der Ansatz von Lipari und Szabo benutzt [33]. Dabei werden zwei Korrelationszeiten, eine für die Gesamtbewegung des Proteins und eine für die interne Dynamik, und ein Ordnungsparameter bestimmt, welcher die Isotropie der internen Bewegung beschreibt. Für diese Experimente ist eine Probe notwendig, in der das Amid jeder Aminosäure mit dem Isotop ^{15}N markiert ist. Durch Relaxationsmessungen am Zweispinsystem aus Amid und Amidproton kann die Dynamik des Proteinerückgrates bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird ein anderer Weg beschritten. Es soll festgestellt werden, ob die Wechselwirkungen von Protonen im Protein zur Messung der Dynamik verwendet werden können. Damit wäre nicht nur die Dynamik des Rückgrates, sondern auch die Bewegung von Seitenketten erfaßbar und eine Isotopenmarkierung des Moleküls unnötig.

1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie

In der hochauflösenden NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance) werden Moleküle in Lösung untersucht. Die magnetischen Momente der Atomkerne eines Moleküls bilden ein Kernspinsystem. Die Entartung der Energieniveaus des Spinsystems wird durch das Einbringen der Probe in ein homogenes, statisches Magnetfeld \vec{B}_0 (Zeeman-Feld) aufgehoben. Die Gesamtheit aller Spinsysteme bildet ein statistisches Ensemble, so daß die Besetzungszahlen ihrer Energieniveaus im thermischen Gleichgewicht durch eine Boltzmann-Verteilung gegeben sind. Die Resonanzeigenschaften der Kernspinsysteme können grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten gemessen werden:

CW-Spektroskopie: Das Kernspinsystem wird durch kontinuierliche Einstrahlung eines elektromagnetischen Feldes mit fester Frequenz einer monochromatischen Störung ausgesetzt, und die Antwort des Systems wird detektiert. In der Praxis wird der interessierende Frequenzbereich langsam durchfahren, um ein kontinuierliches Spektrum zu bekommen, das CW-Spektrum (continuous wave) genannt wird [1]. Anregung und Detektion erfolgen bei dieser Methode zur gleichen Zeit. Diese Technik dominierte in den ersten 25 Jahre (1945–70) die hochauflösende NMR-Spektroskopie.

FT-Spektroskopie: Ein Puls ähnlich einer δ -Funktion stellt eine Multifrequenzquelle dar, welche die gleichzeitige Anregung aller Resonanzen erlaubt. Die Antwort des Systems ist äquivalent zu der Impulsantwort in der Systemtheorie [34]. Die Fouriertransformation (FT) der Antwort liefert das Spektrum [14, 15]. In der hochauflösenden NMR-Spektroskopie werden die Kernspinsysteme durch eine Folge von resonanten Hochfrequenzpulsen (HF-Pulsen) mit der zeitabhängigen Magnetfeldkomponente $\vec{B}_1(t)$ aus dem thermischen Gleichgewicht angeregt, und nach dem letzten Puls wird die Antwort der Spinsysteme als zeitabhängiges Signal, das FID (free induction decay) genannt wird, detektiert. Anregung und Detektion finden bei dieser Methode nacheinander statt. Während der Detektion der Antwort relaxieren die Spinsysteme wieder ins thermische Gleichgewicht. Die Hauptursache für die Relaxation in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie ist die Brownsche Bewegung der Moleküle. Ein Vorteil der FT-Spektroskopie gegenüber der CW-Spektroskopie ist, daß in der gleichen aufgewendeten Zeit mehr Experimente durchgeführt werden können und so das Signal-zu-Rausch-Verhältnis größer wird.

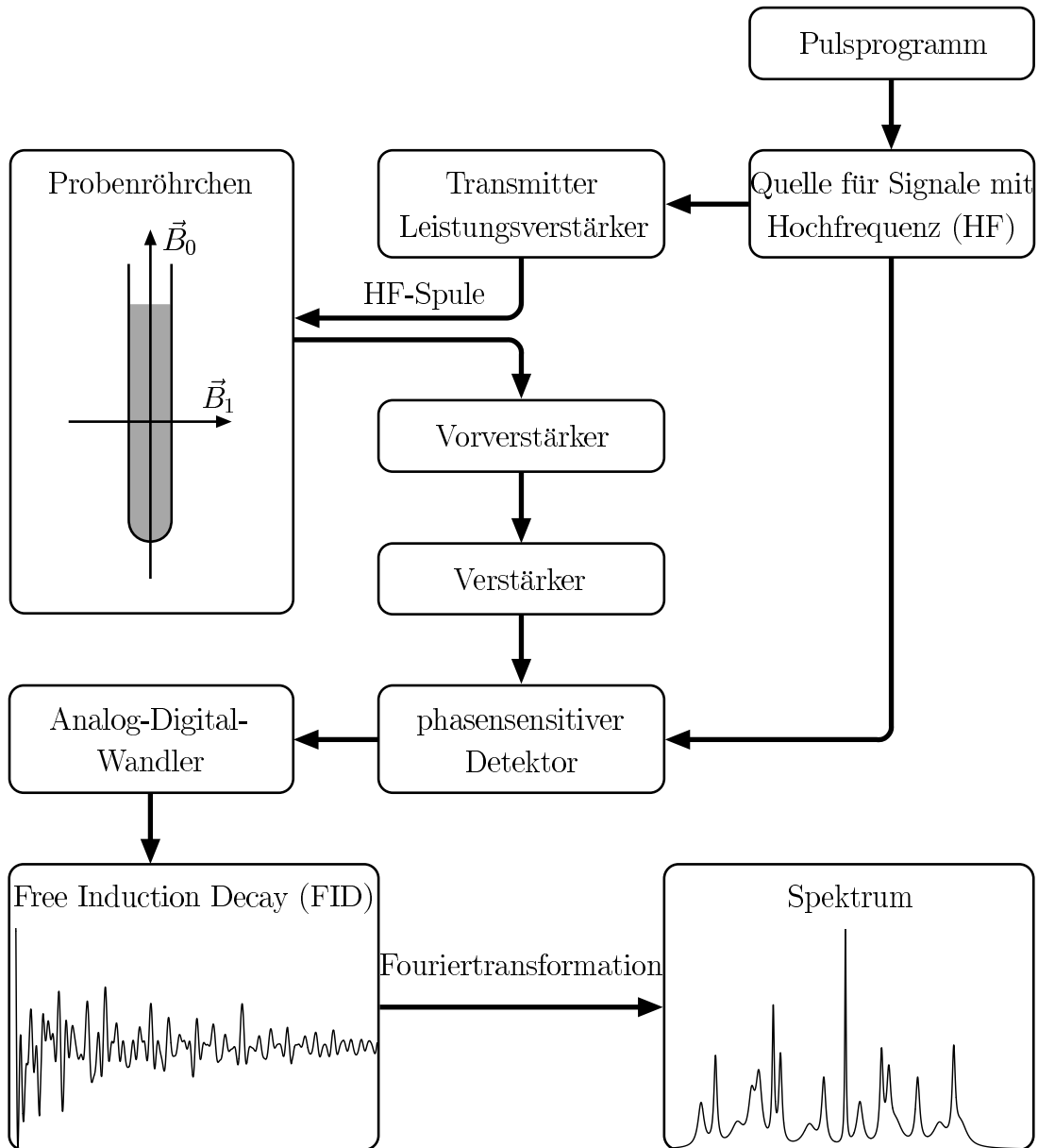


Abbildung 1.1: Blockdiagramm eines NMR-Spektrometers: Das Pulsprogramm bestimmt die Abfolge, Trägerfrequenz, Dauer, Stärke und Phase der Pulse, die von der HF-Quelle erzeugt und nach der Verstärkung an die $\vec{B}_1(t)$ -Spule des Probenkopfs gegeben werden. Die Antwort des Spinsystems wird detektiert, verstärkt und durch den phasensensitiven Detektor mit der Referenzfrequenz verglichen. Fouriertransformation des Zeitsignals ergibt das Spektrum.

Das Zeeman-Feld an den Kernorten wird durch die elektronische (chemische) Umgebung der Kerne beeinflusst, so daß sich jeweils unterschiedliche Resonanzfrequenzen ergeben. Sie bestimmen die Positionen der Linien im Spektrum. Kopplungen der Kerne führen zu einer Feinstruktur der Linien.

Die Frequenzabstände im Spektrum werden meist in Bezug auf einen Standard gemessen, der z. B. bei Protonen oft Tetramethylsilan (TMS), $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$, ist. Um die Abhängigkeit der Frequenzabstände vom Zeeman-Feld zu beseitigen, wird die chemische Verschiebung im Vergleich zu TMS

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{TMS}}}{\nu_0} \quad (1.1)$$

eingeführt, die in ppm (parts per million) angegeben wird. ν_0 bezeichnet die Basisfrequenz des Spektrometers, ν die Frequenz der betrachteten Resonanzlinie und ν_{TMS} die Resonanzfrequenz der Protonen in TMS. Bei einem typischen Spektrometer in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie (s. Abbildung 1.1) mit einem Zeeman-Feld von 14,1 T (Protonenresonanzfrequenz von 600,14 MHz) liegen die Frequenzabstände der Protonen in einem Protein im Vergleich zu TMS im Bereich von 0–9 KHz. Dies entspricht chemischen Verschiebungen von 0–15 ppm.

Die NMR-Spektroskopie kann im Fall isolierter Spins durch die Bloch-Gleichungen [4] für einen makroskopischen Magnetisierungsvektor, der das statistische Mittel der mikroskopischen magnetischen Momente ist, beschrieben werden. Werden dagegen gekoppelte Spins betrachtet, so wird eine quantenmechanische Beschreibung erforderlich.

1.1 Beiträge zum Hamilton-Operator für hochaufgelöste NMR-Experimente in flüssiger Phase

Der Hamilton-Operator des Kernspinsystems bei einem NMR-Experiment enthält die verschiedenen Wechselwirkungen der Kernspins untereinander und mit den äußeren Magnetfeldern \vec{B}_0 und $\vec{B}_1(t)$. Seine Eigenwerte sind im folgenden die Kreisfrequenzen der zugehörigen Energieniveaus. Das bedeutet, die Eigenwerte multipliziert mit der Planck-Konstanten \hbar ergeben die Energie des entsprechenden Niveaus.

In der vorliegenden Arbeit werden SI Einheiten benutzt und nur homonukleare NMR-Experimente an Protonen betrachtet, welche die Spinquantenzahl $I = \frac{1}{2}$ und das gyromagnetische Verhältnis $\gamma = 2,675 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ T}^{-1}$ besitzen. Der Spinoperator \vec{I}_i des Protons i ist im folgenden dimensionslos.

1.1.1 Wechselwirkung mit dem statischen Magnetfeld

Die Elektronen der Atome schirmen das äußere Magnetfeld am Kernort ab. Dies wird in der Zeeman-Wechselwirkung durch den Tensor der chemischen Abschirmung σ_i berücksichtigt [48] und der zugehörige Hamilton-Operator ergibt sich

zu

$$\mathcal{H}_Z = - \sum_i \gamma \vec{I}_i (\mathbb{1} - \sigma_i) \vec{B}_0. \quad (1.2)$$

In flüssigen Proben führt die Brownsche Bewegung der Moleküle zu einer Mittelung der Eigenwerte von σ_i und damit zu einer Abschirmkonstante σ_i , die für Protonen in der Größenordnung 10^{-5} liegt. Die Anisotropie des Tensors σ_i (Quadrate der Elemente außerhalb der Diagonalen verschwinden im Mittel nicht) führt zu einem Beitrag zur Relaxation des Spinsystems, die in Kapitel 2 diskutiert wird. Für ein kartesisches Laborsystem, gegeben durch die Einheitsvektoren \vec{e}_x , \vec{e}_y und \vec{e}_z , dessen z -Achse parallel zum äußeren Magnetfeld ist, aber die entgegengesetzte Orientierung besitzt ($\vec{B}_0 = -B_0 \cdot \vec{e}_z$), vereinfacht sich der Hamilton-Operator der Zeeman-Wechselwirkung zu

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_Z &= \sum_i \gamma (1 - \sigma_i) B_0 I_{iz} \\ &= \sum_i \omega_i I_{iz}. \end{aligned} \quad (1.3)$$

ω_i ist die Larmor-Frequenz des Protons i :

$$\omega_i := \gamma (1 - \sigma_i) B_0 \quad (1.4)$$

Die obige Definition des Laborsystems ist eine Konvention, die auf das Lösen der Bloch-Gleichungen zurückzuführen ist: Der makroskopische Magnetisierungsvektor präzidiert mit der Winkelgeschwindigkeit $\vec{\omega}_i = -\gamma (1 - \sigma_i) \vec{B}_0 = \omega_i \vec{e}_z$ um das Zeeman-Feld. Positive ω_i beschreiben eine positive Rotation ($x \rightarrow y \rightarrow -x \rightarrow -y$) des Magnetisierungsvektors um die z -Achse. Diese Konvention wird im folgenden für alle Magnetfelder benutzt.

1.1.2 Indirekte Spin-Spin Wechselwirkung

Die indirekte Spin-Spin Wechselwirkung zweier Kerne wird durch die Wechselwirkung der Kerne mit den Elektronen verursacht. Der zugehörige Hamilton-Operator hat mit dem Tensor der indirekten Spin-Spin Kopplung \mathbf{J}_{ij} [49] die Form

$$\mathcal{H}_J = 2\pi \sum_{i < j} \vec{I}_i \mathbf{J}_{ij} \vec{I}_j. \quad (1.5)$$

Wie bei der chemischen Abschirmung ist der einzige in Flüssigkeiten effektiv beitragene Teil dieser Wechselwirkung eine Mittelung über alle Orientierungen der Spins im Raum, so daß sich die Kopplungskonstante J_{ij} ergibt. Damit gilt für die indirekte Spin-Spin Wechselwirkung

$$\mathcal{H}_J = 2\pi \sum_{i < j} J_{ij} \vec{I}_i \vec{I}_j. \quad (1.6)$$

Bei Proteinen liegen die Kopplungskonstanten J_{ij} , die in Hertz angegeben werden, für Proton-Proton Kopplungen im Bereich von 0–24 Hz.

Sind die Eigenwerte von \mathcal{H}_J klein im Vergleich zu denen von \mathcal{H}_Z , so läßt sich mittels zeitunabhängiger Störungsrechnung zeigen, daß in 1. Ordnung die indirekte Spin-Spin Wechselwirkung gegeben ist durch

$$\mathcal{H}_J = 2\pi \sum_{i < j} J_{ij} I_{iz} I_{jz} \quad \text{für} \quad 2\pi J_{ij} \ll |\omega_i - \omega_j|. \quad (1.7)$$

Wenn die in Gleichung (1.7) angegebene Bedingung erfüllt ist, wie es für Protonen in Proteinen bei den verwendeten Zeeman-Feldern von 14 T größtenteils der Fall ist, so heißt dies *schwache Kopplung*.

1.1.3 Wechselwirkung mit dem Hochfrequenzfeld

Die Wechselwirkung des Kernspinsystems mit dem eingestrahlten Hochfrequenzfeld (HF-Feld), das die zeitabhängige Magnetfeldkomponente $\vec{B}_1(t)$ besitzt, ist von der gleichen Form wie die Zeeman-Wechselwirkung

$$\mathcal{H}_1(t) = - \sum_i \gamma \vec{I}_i \vec{B}_1(t). \quad (1.8)$$

Das eingestrahlte Feld mit der Frequenz ω ist linear polarisiert mit der Phase φ

$$\vec{B}_1^{lin}(t) = -2B_1(\vec{e}_x \cos \varphi + \vec{e}_y \sin \varphi) \cos \omega t. \quad (1.9)$$

Das negative Vorzeichen ist wie beim Zeeman-Feld eine Konvention. Ein makroskopischer Magnetisierungsvektor präzediert um dieses Magnetfeld mit einer Winkelgeschwindigkeit, die in die entgegengesetzte Richtung wie das Magnetfeld weist. Ein linear polarisiertes Feld kann in zwei entgegengesetzt zirkular polarisierte Felder zerlegt werden. Der Anteil mit der Frequenz $-\omega$ ist bei der Betrachtung von Resonanzen in der Nähe von ω vernachlässigbar

$$\vec{B}_1(t) = -B_1\{\vec{e}_x \cos(\omega t + \varphi) + \vec{e}_y \sin(\omega t + \varphi)\}. \quad (1.10)$$

Mit $\omega_1 := \gamma B_1$ ergibt sich daraus für den Hamilton-Operator

$$\mathcal{H}_1(t) = \sum_i \omega_1 \{I_{ix} \cos(\omega t + \varphi) + I_{iy} \sin(\omega t + \varphi)\}. \quad (1.11)$$

1.1.4 Direkte dipolare Wechselwirkung

Der Hamilton-Operator, der die direkte Dipol-Dipol Wechselwirkung der magnetischen Momente zweier Kerne i und j beschreibt, hat die Form

$$\mathcal{H}_D(t) = \frac{\mu_0}{4\pi} \hbar \gamma^2 \frac{\vec{I}_i \vec{I}_j r_{ij}^2 - 3(\vec{I}_i \vec{r}_{ij})(\vec{I}_j \vec{r}_{ij})}{r_{ij}^5}, \quad (1.12)$$

wobei μ_0 die magnetische Feldkonstante und $\vec{r}_{ij}(t)$ der Verbindungsvektor der beiden Kerne ist. Dieser Hamilton-Operator verschwindet in Flüssigkeiten im Mittel aufgrund der Rotationsdiffusion durch die Brownsche Bewegung. Wie in Kapitel 2 genauer ausgeführt wird, stellt er eine stochastische Störung dar, die Übergänge im Spinsystem induziert, welche zur Relaxation des Systems in den Gleichgewichtszustand führen.

1.2 Der statistische Operator

Da die Proben in der NMR-Spektroskopie aus einer sehr großen Anzahl von Molekülen in Lösung bestehen, um ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu bekommen, ist keine Aussage über den genauen Mikrozustand des Gesamtsystems möglich. Dies erfordert eine statistische Beschreibung, wobei bei der Betrachtung eines Spinsystems in flüssiger Phase das Gesamtsystem aus zwei schwach gekoppelten Teilsystemen besteht: zum einen dem Spinsystem mit all den Freiheitsgraden der Spinoperatoren und zum anderen dem *Gitter* mit all den anderen Freiheitsgraden der flüssigen Probe, bestehend aus der Rotation, Translation und interner Bewegung der Moleküle. Das Gesamtsystem wird vollständig beschrieben durch den statistischen Operator

$$\rho(t) := \sum_k p_k |\Psi_k(t)\rangle \langle \Psi_k(t)|. \quad (1.13)$$

p_k bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der sich das Gesamtsystem im Quantenzustand $|\Psi_k(t)\rangle$ befindet. Die zeitliche Entwicklung des statistischen Operators wird durch die Liouville-von Neumann Gleichung [17] beschrieben. Da nur die Zustände des Spinsystems interessant sind, während die des Gitters undetektiert bleiben, ist die Konstruktion eines reduzierten statistischen Operators $\sigma(t)$, der das Spinsystem alleine charakterisiert, und die Konstruktion eines reduzierten Hamilton-Operators $\mathcal{H}_S(t)$, der nur Spinoperatoren enthält und keine Kopplungen des Spinsystems an das Gitter mehr, notwendig

$$\sigma(t) := \text{Sp}_g[\rho(t)], \quad \mathcal{H}_S(t) := \text{Sp}_g[\mathcal{H}_{ges}(t)], \quad (1.14)$$

wobei Sp_g die Teilspur über die Gitterzustände und \mathcal{H}_{ges} den Hamilton-Operator des Gesamtsystems bezeichnet. Die Beiträge zu \mathcal{H}_S wurden in Abschnitt 1.1 diskutiert. Die Dynamik des reduzierten statistischen Operators wird durch die Gleichung

$$\dot{\sigma}(t) = -i[\mathcal{H}_S(t), \sigma(t)] - \hat{\Gamma} \{ \sigma(t) - \sigma_{eq} \} \quad (1.15)$$

beschrieben [16], wobei σ_{eq} den reduzierten statistischen Operator im thermischen Gleichgewicht und $\hat{\Gamma}$ den Relaxationssuperoperator bezeichnet, in dessen Berechnung die Kopplungen des Spinsystems an das Gitter eingehen und der den Zugang zu Relaxationsprozessen erlaubt. Er wird in Abschnitt 2.1 näher betrachtet.

1.3 Beschreibung von Pulsexperimenten

In der FT-NMR-Spektroskopie werden Intervalle freier Präzession, in denen kein HF-Feld eingestrahlt wird, und Pulsintervalle, in denen ein HF-Feld mit der Magnetfeldkomponenten $\vec{B}_1(t)$ eingestrahlt wird, unterschieden.

Statischer Hamilton-Operator: Der Hamilton-Operator des Spinsystems für Intervalle freier Präzession im Laborsystem ergibt sich aus der Summe der Hamilton-Operatoren der Zeeman- und der indirekten Dipol-Dipol Wechselwirkung

$$\begin{aligned}\mathcal{H}_0 &= \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_J \\ &= \sum_i \omega_i I_{iz} + 2\pi \sum_{i<j} J_{ij} \vec{I}_i \vec{I}_j.\end{aligned}\quad (1.16)$$

Hamilton-Operator während Pulseinstrahlung: In den Pulsintervallen addiert sich zu dem statischen Hamilton-Operator die Wechselwirkung mit dem eingestrahlten HF-Feld

$$\begin{aligned}\mathcal{H}(t) &= \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_J + \mathcal{H}_1(t) \\ &= \sum_i \omega_i I_{iz} + 2\pi \sum_{i<j} J_{ij} \vec{I}_i \vec{I}_j + \sum_i \omega_1 \{I_{ix} \cos(\omega t + \varphi) + I_{iy} \sin(\omega t + \varphi)\}.\end{aligned}\quad (1.17)$$

Die Zeitabhängigkeit dieses Hamilton-Operators kann durch eine unitäre Transformation mit $U = \exp(i\omega t \sum_i I_{iz})$ (*rotierendes Koordinatensystem*) entfernt werden

$$\begin{aligned}\mathcal{H}^{rot} &= U \mathcal{H}(t) U^{-1} \\ &= \underbrace{\sum_i \Omega_i I_{iz} + 2\pi \sum_{i<j} J_{ij} \vec{I}_i \vec{I}_j}_{=: \mathcal{H}_0^{rot}} + \underbrace{\sum_i \omega_1 (I_{ix} \cos \varphi + I_{iy} \sin \varphi)}_{=: \mathcal{H}_1^{rot}},\end{aligned}\quad (1.18)$$

wobei $\Omega_i := \omega_i - \omega$ als *Resonanzoffset* des Kerns i bezeichnet wird.

1.3.1 Zeitentwicklung des statistischen Operators

In kurzen Intervallen freier Präzession und kurzen Pulsintervallen (in der Größenordnung μs) kann Relaxation vernachlässigt werden, so daß sich in solchen Intervallen Gleichung (1.15) wieder zu einer Liouville-von Neumann Gleichung [17], diesmal für den reduzierten statistischen Operator, vereinfacht

$$\dot{\sigma}(t) = -i[\mathcal{H}_S(t), \sigma(t)].\quad (1.19)$$

Die Folge von HF-Pulsen und Intervallen freier Präzession bei einem NMR-Experiment wird *Pulssequenz* genannt. Eine Pulssequenz läßt sich in n Zeitintervalle zerlegen, in denen der zeitunabhängige Hamilton-Operator des Spinsystems

im rotierenden Koordinatensystem entweder durch \mathcal{H}_0^{rot} (Intervalle freier Präzession) oder \mathcal{H}^{rot} (Pulsintervalle) gegeben ist. Wenn mit t_k die Länge des k -ten Zeitintervalls bezeichnet wird, ergibt sich die Lösung der Liouville-von Neumann Gleichung (1.19) zu

$$\sigma(t) = U_n \dots U_1 \sigma_{eq} U_1^{-1} \dots U_n^{-1} \tag{1.20}$$

mit $U_k = \exp(-i\mathcal{H}_k^{rot}t_k)$ und $U_l = \exp(-i\mathcal{H}_0^{rot}t_l)$.

Da die unitären Transformationen U_k die Zeitentwicklung des statistischen Operators beschreiben, werden sie *Propagatoren* genannt. Die Hamilton-Operatoren \mathcal{H}_k^{rot} können für unterschiedliche Zeitintervalle verschieden sein, sich durch Phase, Dauer und Amplitude des eingestrahlten Feldes unterscheiden. Die Anteile im reduzierten statistischen Operator, die mit dem Hamilton-Operator im betrachteten Zeitintervall kommutieren bleiben konstant, sie ändern sich in dem entsprechenden Zeitintervall nicht.

Im thermischen Gleichgewicht gilt für den reduzierten statistischen Operator [21] mit dem Hamilton-Operator aus Gleichung (1.16)

$$\sigma_{eq} = \frac{\exp\left(-\frac{\hbar\mathcal{H}_0}{kT}\right)}{\text{Sp}\left\{\exp\left(-\frac{\hbar\mathcal{H}_0}{kT}\right)\right\}} \tag{1.21}$$

mit der Boltzmann-Konstanten k und der Temperatur T . Im Grenzfall hoher Temperaturen ($\hbar\omega_i \ll kT$) und der, immer gültigen, Voraussetzung, daß die Kopplungen klein gegenüber der Zeeman-Wechselwirkung sind ($2\pi J_{ij} \ll \omega_i$), vereinfacht sich das Ergebnis zu

$$\sigma_{eq} \approx \frac{\mathbb{1} - \frac{\hbar}{kT} \sum_i \omega_i I_{iz}}{\text{Sp}\mathbb{1}} = \mathbb{1} + \sum_i \beta_i I_{iz}. \tag{1.22}$$

Die Boltzmann-Faktoren $\beta_i := -(\text{Sp}\mathbb{1})^{-1} \hbar\omega_i/kT$ sind für verschiedenen Kerne eines Nuklids im Molekül nahezu gleich.

1.3.2 Signaldetektion

Das Ergebnis der *Quadraturdetektion* [53] entspricht der Detektion der zwei orthogonalen Komponenten $M_x(t)$ und $M_y(t)$ der makroskopischen Magnetisierung $\vec{M}(t)$ im rotierenden Koordinatensystem

$$M_x(t) = N\gamma\hbar \text{Sp}\left\{\sigma(t) \sum_i I_{ix}\right\}, \quad M_y(t) = N\gamma\hbar \text{Sp}\left\{\sigma(t) \sum_i I_{iy}\right\}, \tag{1.23}$$

wobei N die Anzahl der Spinsysteme in der Probe ist. $M_x(t)$ und $M_y(t)$ werden zu der komplexen Magnetisierung $M^+(t)$ zusammengefaßt

$$\begin{aligned} M^+(t) &= M_x(t) + iM_y(t) \\ &= N\gamma\hbar \text{Sp}\left\{\sigma(t) \sum_i I_i^+\right\} \quad \text{mit} \quad I^+ = I_{ix} + iI_{iy} \end{aligned} \tag{1.24}$$

Es können ausschließlich Terme proportional zu I_i^- im reduzierten statistischen Operator detektiert werden wegen

$$\text{Sp}(I_i^- I_i^+) = \frac{1}{2} \text{Sp } \mathbb{1}, \quad \text{Sp}(I_i^+ I_i^+) = 0. \quad (1.25)$$

1.3.3 Produktoperatorformalismus und Beispiel

Um die Berechnung der Zeitentwicklung des statistischen Operators nach Gleichung (1.20) für Spinsysteme mit $I = \frac{1}{2}$ und schwacher Kopplung zu vereinfachen, wird der reduzierte statistische Operator in eine Basis aus Produktoperatoren $\{B_s\}$ zerlegt. Die Zeitentwicklungen dieser Basisoperatoren kann dann getrennt berechnet werden. Dieses Verfahren wird *Produktoperatorformalismus* [52] genannt. Es folgen drei Beispiele, aus welchen Operatoren die Produkte gebildet werden können

$$\begin{aligned} \text{a)} & \{ \mathbb{1}, & I_{ix}, & I_{iy}, & I_{iz} \}, \\ \text{b)} & \{ \mathbb{1}, & I_i^+ = I_{ix} + iI_{iy}, & I_i^- = I_{ix} - iI_{iy}, & I_{iz} \}, \\ \text{c)} & \{ I_i^\alpha = \frac{1}{2}\mathbb{1} + I_{iz}, & I_i^\beta = \frac{1}{2}\mathbb{1} - I_{iz}, & I_i^+, & I_i^- \}, \end{aligned} \quad (1.26)$$

wobei die Produktbasis, die aus den Produkten der Spinoperatoren a) gebildet wird, als kartesische Produktbasis bezeichnet wird.

Der Ausgangspunkt der Zeitentwicklung ist der reduzierte statistische Operator im thermischen Gleichgewicht (1.22). Unter der zusätzlichen Vernachlässigung von $\mathbb{1}$, die zu keiner Observablen beiträgt, und der Boltzmann-Faktoren, welche die Signalintensitäten bestimmen, ergibt sich

$$\sigma_{eq} = \sum_i I_{iz}. \quad (1.27)$$

Als Beispiel dient ein kurzer resonanter HF-Puls der Länge τ mit anschließendem Intervall freier Präzession. Ist die Amplitude des eingestrahnten Feldes ausreichend groß,

$$\omega_1 \gg 2\pi J_{ij}, \quad |\Omega_i|, \quad (1.28)$$

dann ist der Hamilton-Operator während der Pulseinstrahlung im rotierenden Koordinatensystem im wesentlichen durch \mathcal{H}_1^{rot} gegeben, so daß die chemischen Verschiebungen der einzelnen Kerne keine Rolle spielen (*nichtselektiver* Puls). Der zugehörige Propagator U ist gegeben durch

$$\exp(-i\mathcal{H}_1^{rot}\tau) = \exp(-i\omega_1\tau \sum_i \{I_{ix} \cos \varphi + I_{iy} \sin \varphi\}). \quad (1.29)$$

Dies beschreibt eine Rotation um eine Achse $\vec{e}_x \cos \varphi + \vec{e}_y \sin \varphi$ in der x - y -Ebene um den Winkel

$$\alpha := \omega_1\tau. \quad (1.30)$$

An dieser Stelle wird die Konvention des negativen Vorzeichens im Magnetfeld \vec{B}_1 , Gleichung(1.9), deutlich. Wird ein HF-Feld in negative x -Richtung eingestrahlt ($\varphi = 0^\circ$), so beschreibt der Propagator U eine positive Rotation um die positive x -Achse. Wenn zusätzlich $\alpha = 90^\circ$ gewählt wird (90_x° -Puls), transformiert sich der reduzierte statistische Operator im thermischen Gleichgewicht zu

$$\sigma_{eq} = \sum_i I_{iz} \xrightarrow{90_x^\circ} \exp(-i\frac{\pi}{2} \sum_i I_{ix}) \sigma_{eq} \exp(i\frac{\pi}{2} \sum_i I_{ix}) = - \sum_i I_{iy}. \quad (1.31)$$

Diese Terme entwickeln sich in dem anschließenden Intervall freier Präzession unter dem Hamilton-Operator \mathcal{H}_0^{rot} . In diesem Beispiel sollen zur Vereinfachung isolierte Spins betrachtet werden ($J_{ij} = 0$). Der Operator $-I_{iy}$ entwickelt sich weiter zu

$$\begin{aligned} -I_{iy} &\xrightarrow{\mathcal{H}_0^{rot}t} -I_{iy} \cos \Omega_i t + I_{ix} \sin \Omega_i t \\ &= \frac{1}{2} \{ I_i^+ (\sin \Omega_i t + i \cos \Omega_i t) + I_i^- (\sin \Omega_i t - i \cos \Omega_i t) \}. \end{aligned} \quad (1.32)$$

Die mit der Methode der Quadraturdetektion gemessene komplexe Magnetisierung ergibt sich mit Gleichung (1.24) zu

$$M^+(t) = N\gamma\hbar \frac{1}{2} \text{Sp} \mathbb{1} \sum_i (\sin \Omega_i t - i \cos \Omega_i t) \quad (1.33)$$

Nach der Fouriertransformation in t ergibt sich für jedes Ω_i genau eine Resonanzlinie an der Position $\omega_i = \Omega_i + \omega$ im Spektrum.

2 Relaxation

Die Entwicklung eines makroskopischen Systems vom Nichtgleichgewicht zum Gleichgewicht wird mit Relaxation bezeichnet [50]. Die Ursache dafür ist die Kopplung des Systems an ein sehr viel größeres System (*Reservoir, Wärmebad*). Die große Zahl der Freiheitsgrade des Reservoirs führt effektiv zu einem Kontinuum aus Energieniveaus, so daß zu jedem möglichen Übergang im System ein energiegleicher im Reservoir existiert. Das Wärmebad ist dabei ein unendliches Reservoir, so daß sein thermisches Gleichgewicht nicht durch den Energieaustausch mit dem System, der während der Relaxation stattfindet, beeinflußt wird.

Bei der Betrachtung eines Kernspinsystems ist das Reservoir durch das in Abschnitt 1.2 eingeführte Gitter gegeben. Die Relaxation der Kernspins ist die Entwicklung des Kernspinsystems zum thermischen Gleichgewicht mit dem Gitter und wird mit *Spin-Gitter Relaxation* bezeichnet. Alle Wechselwirkungen, die das Kernspinsystem an das Gitter koppeln sind in der flüssigen Phase eine Ursache für Relaxationsprozesse. Sie stellen eine stochastische Störung dar, die im Mittel verschwindet aber wegen nicht verschwindender Komponenten im Leistungsspektrum Übergänge induzieren kann. Bei der Untersuchung von Proteinen in Lösung spielen nur zwei Kopplungen eine Rolle:

Anisotropie der chemischen Verschiebung: Wie in Abschnitt 1.1.1 ausgeführt, wird das Zeeman-Feld am Kernort durch die Elektronenhülle der Atome abgeschirmt, wobei diese Abschirmung durch den Tensor der chemischen Abschirmung σ_i ausgedrückt wird. Obwohl der im Hamilton-Operator der Zeeman-Wechselwirkung effektiv beitragene Teil der Abschirmung wegen der Brownschen Bewegung eine Abschirmkonstante σ_i ist, führt die Anisotropie von σ_i (Quadrate der Elemente außerhalb der Diagonalen verschwinden im Mittel nicht) zu einer stochastischen Störung, die aber bei Protonen vernachlässigt werden kann, da die Anisotropie sehr klein ist [58]. Für andere Kerne mit Spin $\frac{1}{2}$, wie ^{13}C , ^{15}N und ^{31}P , kann der Beitrag von der Anisotropie der chemischen Verschiebung zur Relaxation signifikant sein [35]. Dieser Relaxationsmechanismus kann von anderen aufgrund seiner Abhängigkeit vom äußeren Feld unterschieden werden.

Direkte Dipol-Dipol Wechselwirkung: Diese stellt wegen der großen magnetischen Momente und der zum Teil engen räumlichen Nachbarschaft der Protonen die wichtigste Spin-Gitter Kopplung für Protonen dar, sie führt zur *dipolaren Relaxation*. Gleichung (1.12) gibt den Hamilton-Operator der Dipol-Dipol

Wechselwirkung an, der eine zeitabhängige, im Mittel verschwindene Störung des Kernspinsystems darstellt.

2.1 Der Relaxationssuperoperator $\hat{\Gamma}$

Wenn im Gegensatz zu Abschnitt 1.3.1 Intervalle freier Präzession und Pulse mit Längen von einigen ms bis mehreren hundert ms betrachtet werden, darf der Relaxationsterm in Gleichung (1.15) nicht vernachlässigt werden.

2.1.1 Semi-klassische Relaxationstheorie

Zu Beginn der Berechnung des Relaxationssuperoperators $\hat{\Gamma}$ steht die Entwicklung des Hamilton-Operators der stochastischen Störung $\mathcal{H}_{sto}(t)$ in der folgenden Form

$$\mathcal{H}_{sto}(t) = \sum_q F^{(q)}(t)A^{(q)}, \quad (2.1)$$

wobei $A^{(q)}$ Operatoren sind, die nur auf das Spinsystem wirken [1]. In der quantenmechanischen Relaxationstheorie sind die $F^{(q)}(t)$ Gitteroperatoren, während sie in der hier vorgestellten semi-klassischen Relaxationstheorie Zufallsfunktionen sind, welche die Gitterdynamik beschreiben. Die Operatoren $A^{(q)}$ lassen sich ihrerseits in Eigenoperatoren des zeitunabhängigen Hamilton-Operators \mathcal{H}_{con} des Spinsystems entwickeln. In Intervallen freier Präzession ist $\mathcal{H}_{con} = \mathcal{H}_0$ während in Pulsintervallen nach einem Wechsel in das rotierende Koordinatensystem $\mathcal{H}_{con} = \mathcal{H}^{rot}$ ist.

$$A^{(q)} = \sum_p A_p^{(q)} \quad \text{mit} \quad [\mathcal{H}_{con}, A_p^{(q)}] = \omega_p^{(q)} A_p^{(q)}. \quad (2.2)$$

Die Frequenzen $\omega_p^{(q)}$ sind Differenzen von Eigenwerten von \mathcal{H}_{con} . Unter der Annahme, daß die Zufallsfunktionen $F^{(q)}(t)$ statistisch unabhängig voneinander sind, und der Vernachlässigung von schnell oszillierenden Termen (*Säkularapproximation*, [16]) gilt für den Relaxationssuperoperator

$$\hat{\Gamma} = \frac{1}{2} \sum_{p,q} J^{(q)}(\omega_p^{(q)}) [A_p^{(-q)}, [A_p^{(q)}, \{\sigma(t) - \sigma_{eq}\}]] \quad (2.3)$$

$$\text{mit} \quad J^{(q)}(\omega_p^{(q)}) = \int_{-\infty}^{\infty} d\tau \overline{F^{(q)}(t)F^{(-q)}(t+\tau)} \exp(-i\omega_p^{(q)}\tau). \quad (2.4)$$

Die spektrale Dichte $J^{(q)}(\omega_p^{(q)})$ ist die Fouriertransformierte der Autokorrelationsfunktion der Zufallsfunktionen $F^{(q)}(t)$, welche die stochastische Bewegung des

Gitters beschreiben und Ursache der Relaxation sind. Wenn die $F^{(q)}(t)$ nicht statistisch unabhängig voneinander sind, führt dies zu zusätzlichen Termen im Relaxationssuperoperator, welche die *Kreuzkorrelationsfunktionen* der Zufallsfunktionen enthalten. Ein Beispiel für Kreuzkorrelationen sind mehr als zwei dipolar gekoppelte Spins. Die Bewegung der Verbindungsvektoren ist korreliert [27]. Diese Effekte sind allerdings klein und können im folgenden vernachlässigt werden [29].

Zwei Voraussetzungen müssen erfüllt sein, damit der Relaxationssuperoperator nicht verschwindet und Relaxation stattfindet:

- Der Doppelkommutator $[A_p^{(-q)}, [A_p^{(q)}, \{\sigma(t) - \sigma_{eq}\}]]$ darf nicht verschwinden. Dies stellt eine Selektionsregel dar, ob der zugehörige Term im stochastischen Hamilton-Operator einen Beitrag zur Relaxation des reduzierten statistischen Operators leistet.
- Die spektrale Dichte des stochastischen Prozesses, welcher der Relaxation zugrunde liegt, muß eine signifikante Komponente bei einer Übergangsfrequenz $\omega_p^{(q)}$ des Spinsystems haben.

Da die Zufallsfunktionen $F^{(q)}(t)$ die stochastische Bewegung des Gitters beschreiben, können sie für verschiedene Bewegungsmodelle der Moleküle berechnet werden. Das einfachste Bewegungsmodell für den Abstandvektor \vec{r}_{ij} zweier Spins i und j ist eine isotrope Rotation mit konstantem Abstand r_{ij} (Brownsche Rotationsdiffusion eines starren Moleküls). Dieses Modell führt zu einer monoexponentiell abklingenden Autokorrelationsfunktion mit der Dämpfungskonstanten τ_c , der Korrelationszeit. Die spektrale Dichte ergibt sich in diesem Modell zu

$$J^{(q)}(\omega_p^{(q)}) = \overline{|F^{(q)}(t)|^2} 2 J(\omega_p^{(q)}) \quad (2.5)$$

$$\text{mit } J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}. \quad (2.6)$$

2.1.2 Kreuzrelaxation und direkte Relaxation

Die Gleichung (1.15) kann für ein schwach gekoppeltes Spin- $\frac{1}{2}$ System mit Hilfe des Relaxationssuperoperators (2.3) und einer Entwicklung des reduzierten statistischen Operators in Produktoperatoren (Abschnitt 1.3.3) in eine Relaxationsgleichung für je zwei Basisoperatoren umgeformt werden. Diese Relaxationsgleichung ist eine Raten- oder Transfergleichung, die den Transfer zwischen zwei verschiedenen Basisoperatoren beschreibt. Für die Relaxationsrate zwischen zwei Basisoperatoren B_i und B_j ergibt sich

$$\Gamma_{ij} = \Gamma_{j \rightarrow i} = \frac{\sum_{p,q} J^{(q)}(\omega_p^{(q)}) \text{Sp}\{B_i^\dagger [A_p^{(-q)}, [A_p^{(q)}, B_j]]\}}{\text{Sp}\{B_i^\dagger B_i\}}, \quad (2.7)$$

wobei die Notation $j \rightarrow i$ die Transferrichtung angibt [22]. Sind die beiden betrachteten Basisoperatoren verschieden, so heißt dies *Kreuzrelaxation*, sind sie gleich *direkte Relaxation*. Für ein System von Protonen läßt sich so eine Relaxationsmatrix Γ aufstellen.

2.2 Dipolare Relaxation in Intervallen freier Präzession

In Intervallen freier Präzession gilt $\mathcal{H}_{con} = \mathcal{H}_0$ und $\mathcal{H}_{sto}(t) = \mathcal{H}_D(t)$. Mit der Zerlegung von $\mathcal{H}_D(t)$ in Operatoren der Form (2.1) und (2.2) lassen sich die direkte Relaxationsrate Γ_{ii}^{noe} der longitudinalen Magnetisierung des Spins i ($B_i = B_j = I_{iz}$) und die Kreuzrelaxationsrate Γ_{ij}^{noe} für den Transfer von longitudinaler Magnetisierung von einem zweiten Spin j zum Spin i ($B_i = I_{iz}, B_j = I_{jz}$) berechnen

$$\Gamma_{ij}^{noe} = \begin{cases} \sum_k \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ik}^6} [J(0) + 3J(\omega_0) + 6J(2\omega_0)] + \rho_i^{noe} & \text{für } i = j, \\ \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ij}^6} [6J(2\omega_0) - J(0)] & \text{für } i \neq j. \end{cases} \quad (2.8)$$

Entsprechend ergeben sich die direkte Relaxationsrate Γ_{ii}^{roe} der transversalen Magnetisierung des Spins i ($B_i = B_j = I_{ix}$) und die Kreuzrelaxationsrate Γ_{ij}^{roe} für den Transfer von transversaler Magnetisierung von einem zweiten Spin j zum Spin i ($B_i = I_{ix}, B_j = I_{jx}$)

$$\Gamma_{ij}^{roe} = \begin{cases} \sum_k \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ik}^6} \left[\frac{5}{2}J(0) + \frac{9}{2}J(\omega_0) + 3J(2\omega_0)\right] + \rho_i^{roe} & \text{für } i = j, \\ \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ij}^6} [2J(0) + 3J(\omega_0)] & \text{für } i \neq j. \end{cases} \quad (2.9)$$

In beiden Fällen läuft die Summe in den direkten Relaxationsraten über alle dipolaren Kopplungspartner des Spins i . ω_0 bezeichnet die Mitte des betrachteten Ausschnitts des Protonenspektrums. Da die chemischen Verschiebungen klein gegenüber ω_0 sind, wird die spektrale Dichte nur bei Vielfachen von ω_0 ausgewertet.

Das Phänomen des Transfers von longitudinaler Magnetisierung wird *nuclear Overhauser effect* (NOE) [36, 44, 45], das Phänomen des Transfers von transversaler Magnetisierung wird *rotating-frame Overhauser effect* (ROE) [2, 7] genannt.

In den direkten Relaxationsraten wird mit ρ_i^{noe} und ρ_i^{roe} eine zusätzliche externe Relaxationsrate eingeführt, die alle Beiträge von Relaxationsprozessen enthält, deren Ursache nicht die intramolekulare (innermolekulare) Dipol-Dipol Wechselwirkung ist. Der Hauptbeitrag zu den externen Relaxationsraten stammt von intermolekularer (zwischenmolekularer) dipolarer Relaxation, vor allem durch paramagnetische Lösungsmittelmoleküle wie gelösten Sauerstoff.

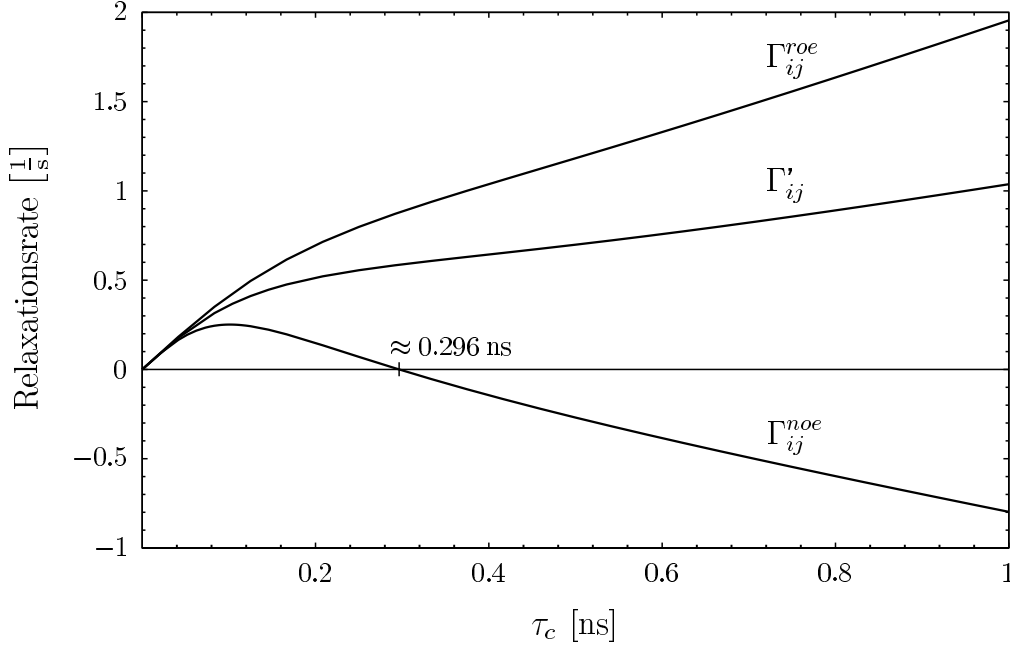


Abbildung 2.1: Kreuzrelaxationsraten Γ_{ij}^{noe} , Γ_{ij}^{roe} und Γ_{ij}^r der longitudinalen Magnetisierung, der transversalen Magnetisierung und der longitudinalen Magnetisierung entlang eines effektiven Feldes, das mit der z -Achse einen Winkel von $\Theta_i = \Theta_j = 125,26^\circ$ einschließt, zweier dipolar gekoppelter Protonen mit dem Abstand $r_{ij} = 2 \text{ \AA}$ und $\omega_0/2\pi = 600,141 \text{ MHz}$ als Funktion der Korrelationszeit der stochastischen Bewegung. Die Kreuzrelaxationsrate Γ_{ij}^{noe} hat eine Nullstelle bei $\tau_c = \omega_0^{-1}\sqrt{5}/2$.

Die Matrizen Γ^{noe} und Γ^{roe} , die aus den Kreuzrelaxationsraten und direkten Relaxationsraten der Spins in einem Spinsystem bestehen, sind symmetrisch.

Die Abbildung 2.1 zeigt die Kreuzrelaxationsraten bei einem festen Wert $\omega_0/2\pi = 600,141 \text{ MHz}$ für isotrope Rotation mit festem Abstand r_{ij} in Abhängigkeit von der Korrelationszeit τ_c . Während Γ_{ij}^{roe} immer größer als Null ist, wechselt Γ_{ij}^{noe} an der Stelle $\tau_c = \omega_0^{-1}\sqrt{5}/2$ das Vorzeichen. Im Grenzfall $\tau_c \rightarrow 0$ (kleine Moleküle in einer Lösung mit kleiner Viskosität) gilt

$$\Gamma_{ij}^{roe}(\tau_c \rightarrow 0) = \Gamma_{ij}^{noe}(\tau_c \rightarrow 0) = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ij}^6} 5 \tau_c. \quad (2.10)$$

Im Grenzfall $\tau_c \rightarrow \infty$ (große Moleküle in einer Lösung mit großer Viskosität) gilt

$$\Gamma_{ij}^{roe}(\tau_c \rightarrow \infty) = -2\Gamma_{ij}^{noe}(\tau_c \rightarrow \infty) = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ij}^6} 2 \tau_c. \quad (2.11)$$

2.3 Dipolare Relaxation in Pulsintervallen

In einigen Experimenten werden HF-Felder eingestrahlt, deren Werte für ω_1 in der Größenordnung der chemischen Verschiebung liegen ($\omega_1 \approx |\Omega_i|$). In diesem

Fall ist die Bedingung $\omega_1 \gg |\Omega_i|$, Gleichung (1.28), für den nichtselektiven Puls nicht erfüllt.

2.3.1 Der Hamilton-Operator im gekippten Koordinatensystem

Um die Bedeutung des Hamilton-Operators \mathcal{H}^{rot} , Gleichung (1.18), besser zu verstehen, wird er in ein für jeden Spin mit einem anderen Winkel gekipptes Koordinatensystem transformiert. Für ein entlang der negativen x -Achse eingestrahltes Feld $\vec{B}_1^{lin}(t)$ ($\varphi = 0^\circ$) vereinfacht sich \mathcal{H}^{rot} zu

$$\mathcal{H}^{rot} = \sum_i \Omega_i I_{iz} + 2\pi \sum_{i<j} J_{ij} \vec{I}_i \vec{I}_j + \sum_i \omega_1 I_{ix}, \quad (2.12)$$

Im rotierenden Koordinatensystem definieren der Resonanzoffset Ω_i entlang der z -Achse und ω_1 entlang der x -Achse für jeden Spin ein effektives Feld, für das die Larmor-Frequenz der Kerne

$$\Omega_i^{eff} = \sqrt{\Omega_i^2 + \omega_1^2} \quad (2.13)$$

beträgt (Abbildung 2.2). Seine Richtung ist durch den von der z -Achse und dem effektiven Feld eingeschlossenen Winkel Θ_i gegeben

$$\Theta_i = \begin{cases} \arctan\left(\frac{\omega_1}{\Omega_i}\right) & \text{für } \Omega_i > 0, \\ 180^\circ + \arctan\left(\frac{\omega_1}{\Omega_i}\right) & \text{für } \Omega_i < 0. \end{cases} \quad (2.14)$$

Für jeden Spin wird ein neues Koordinatensystem definiert, dessen z' -Achse parallel zum effektiven Feld liegt. In dem gekippten Koordinatensystem werden neue Operatoren I'_{ix} , I'_{iy} und I'_{iz} eingeführt gemäß

$$\begin{aligned} I'_{ix} &= I_{ix} \cos \Theta_i - I_{iz} \sin \Theta_i \\ I'_{iy} &= I_{iy} \\ I'_{iz} &= I_{ix} \sin \Theta_i + I_{iz} \cos \Theta_i. \end{aligned} \quad (2.15)$$

Mit der Bedingung $\omega_1 \gg 2\pi J_{ij}$, die praktisch immer zu erfüllen ist (für Protonen ist $\omega_1/2\pi$ im KHz und J_{ij} im Hz Bereich) und der Bedingung $|\Omega_i^{eff} - \Omega_j^{eff}| \gg 2\pi J_{ij}$, die für den betrachteten Fall mit $\omega_1 \approx |\Omega_i|$ erfüllt ist, ergibt sich der Hamilton-Operator im gekippten Koordinatensystem zu [3]

$$\mathcal{H}' = \sum_i \Omega_i^{eff} I'_{iz} + 2\pi \sum_{i<j} J_{ij} \cos(\Theta_i - \Theta_j) I'_{iz} I'_{jz}. \quad (2.16)$$

\mathcal{H}' hat die gleiche Form wie der Hamilton-Operator für ein schwach gekoppeltes Spinsystem im rotierenden Koordinatensystem in einem statischen Zeeman-Feld,

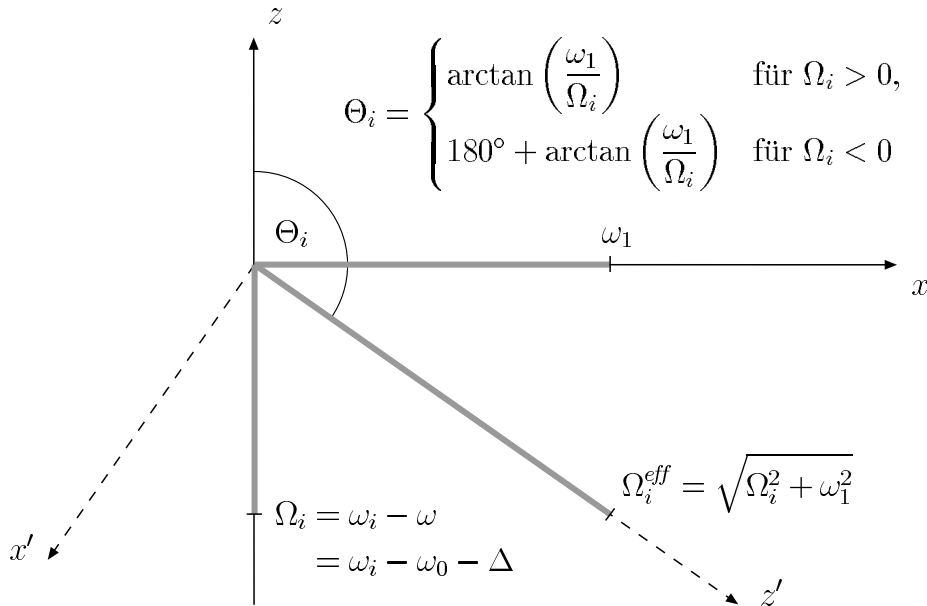


Abbildung 2.2: Im rotierenden Koordinatensystem für den Kern i (ungestrichene Achsen) wird durch ω_1 und Ω_i das effektive Feld mit der zugehörigen Larmor-Frequenz Ω_i^{eff} definiert. Die Magnetisierung parallel zum effektiven Feld wird konserviert, während die orthogonalen Komponenten mit der Frequenz Ω_i^{eff} um das effektive Feld präzedieren und rasch wegen der Inhomogenität des $\vec{B}_1(t)$ -Feldes gedämpft werden.

Gleichung (1.18). Die longitudinale Magnetisierung I'_{iz} entlang der z' -Achse ist invariant unter \mathcal{H}' , sie wird konserviert. Dieser Effekt heißt *spin-locking*. Die zu der z' -Achse orthogonalen Komponenten der Magnetisierung präzedieren mit der Frequenz Ω_i^{eff} um das effektive Feld. Sie werden aufgrund der Inhomogenität des $\vec{B}_1(t)$ -Feldes rasch gedämpft.

Der Winkel unter dem das spin-locking stattfindet, kann bei festem ω_1 des eingestrahlten Feldes durch die Einstrahlfrequenz ω verändert werden ($\Omega_i = \omega_i - \omega$). Bezeichnet ω_0 die Mitte des Protonenspektrums und damit in den meisten Fällen auch die Basisfrequenz des Spektrometers, so wird mit Δ die Differenz zwischen der tatsächlichen Einstrahlfrequenz ω und der Mitte des Spektrums bezeichnet ($\omega = \omega_0 + \Delta$). Gilt $\omega_0 + \Delta = \omega_i$ ($\Theta_i = 90^\circ$), so wird dies als *on-resonance spin-locking*, für $\omega_0 + \Delta \neq \omega_i$ als *off-resonance spin-locking* des Kerns i bezeichnet.

2.3.2 Dipolare Relaxation im gekippten Koordinatensystem

Die longitudinale Magnetisierung I'_{iz} entlang des effektiven Feldes relaxiert während des spin-locking. Von Kazuo Kuwata und Thomas Schleich wurde kürzlich (1995) [32] gezeigt, daß unter den Voraussetzungen $\omega_1 \tau_c \ll 1$ und $\omega_0 \gg \omega_1$, dies

entspricht der Voraussetzung

$$J(n\omega_0 \pm m\Omega_i^{eff}) \approx J(n\omega_0) \quad \text{mit} \quad m \leq n \leq 2, \quad (2.17)$$

die Relaxationsraten im rotierenden Koordinatensystem aus Gleichung (2.7) erhalten werden können, indem die Operatoren B_i und B_j durch die zugehörigen Operatoren im gekippten Koordinatensystem, B'_i und B'_j , ersetzt werden. Typischerweise liegt in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie $\omega_0/2\pi$ in der Größenordnung von einigen hundert MHz, τ_c bei höchstens einigen ns und $\omega_1/2\pi$ für die stärksten HF-Felder im Bereich von 40 KHz, so daß die Voraussetzung (2.17) erfüllt ist. Für die direkte Relaxationsrate Γ'_{ii} der longitudinalen Magnetisierung I'_{iz} entlang des effektiven Feldes und die Kreuzrelaxationsrate Γ'_{ij} der longitudinalen Magnetisierungen I'_{iz} und I'_{jz} entlang des effektiven Feldes ergibt sich

$$\begin{aligned} \Gamma'_{ii} &= \cos^2 \Theta_i \Gamma_{ii}^{noe} + \sin^2 \Theta_i \Gamma_{ii}^{roe} \\ \Gamma'_{ij} &= \cos \Theta_i \cos \Theta_j \Gamma_{ij}^{noe} + \sin \Theta_i \sin \Theta_j \Gamma_{ij}^{roe}. \end{aligned} \quad (2.18)$$

Die zugehörige Matrix Γ' ist symmetrisch, weil auch die beiden Matrizen Γ^{noe} und Γ^{roe} symmetrisch sind. Aus Gleichung (2.18) ist ersichtlich, daß die Beziehung

$$\Gamma'_{ij}(180^\circ - \Theta_i, 180^\circ - \Theta_j) = \Gamma'_{ij}(\Theta_i, \Theta_j) \quad (2.19)$$

gilt. Abbildung 2.1 zeigt die Kreuzrelaxationsrate der longitudinalen Magnetisierung entlang des effektiven Feldes in Abhängigkeit von der Korrelationszeit der Bewegung, wenn ω_1 und Δ des HF-Feldes so gewählt werden, daß die Winkel $\Theta_i = \Theta_j = 125,26^\circ$ (identisch mit $54,74^\circ$) sind.

Die Relaxationsraten der longitudinalen Magnetisierung entlang des effektiven Feldes ergeben sich in den Grenzfällen $\Theta_i = \Theta_j = 0^\circ$ und $\Theta_i = \Theta_j = 90^\circ$ zu

$$\begin{aligned} \Gamma'_{ii}(\Theta_i = 0^\circ) &= \Gamma_{ii}^{noe} & \Gamma'_{ii}(\Theta_i = 90^\circ) &= \Gamma_{ii}^{roe} \\ \Gamma'_{ij}(\Theta_i = \Theta_j = 0^\circ) &= \Gamma_{ij}^{noe} & \Gamma'_{ij}(\Theta_i = \Theta_j = 90^\circ) &= \Gamma_{ij}^{roe}. \end{aligned} \quad (2.20)$$

$\Theta_i = \Theta_j = 0^\circ$ bedeutet, daß entweder kein HF-Feld eingestrahlt wird ($\omega_1 = 0$), oder daß $\Delta \rightarrow \infty$ gilt. In diesem Grenzfall gilt $I'_{iz} = I_{iz}$. Die Relaxationsraten für die longitudinale Magnetisierung I'_{iz} entlang des effektiven Feldes gehen in die Relaxationsraten für die longitudinale Magnetisierung I_{iz} in Intervallen freier Präzession über.

$\Theta_i = \Theta_j = 90^\circ$ bedeutet, daß für beide beteiligten Spins das HF-Feld on-resonance eingestrahlt wird. Dies kann für Spins mit unterschiedlicher Larmorfrequenz nur dadurch annähernd erreicht werden, daß ω_1 (und damit die Amplitude des HF-Feldes) sehr groß wird. In diesem Grenzfall ergeben sich für die Relaxationsraten der longitudinalen Magnetisierung im gekippten Koordinatensystem die Relaxationsraten für transversale Magnetisierung in Intervallen freier Präzession.

2.4 Experimente zur Kreuzrelaxation

2.4.1 Das NOESY-Experiment

Dieses Experiment ist für die Strukturbestimmung von Makromolekülen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie besonders wichtig, weil es die quantitative Abstandsbestimmung von Kernen erlaubt [25].

In Intervallen freier Präzession läßt sich die Gleichung (1.15) in eine Raten-gleichung für die Erwartungswerte der longitudinalen Magnetisierungen $\langle I_{iz} \rangle$ umschreiben. Da der Kommutator von \mathcal{H}_0 mit allen I_{iz} verschwindet, ergibt sich die Ratengleichung

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} (\langle I_{iz} \rangle - I_{i0}) &= - \sum_j \Gamma_{ij}^{noe} (\langle I_{jz} \rangle - I_{i0}) \\ &= -\Gamma_{ii}^{noe} (\langle I_{iz} \rangle - I_{i0}) - \sum_{j \neq i} \Gamma_{ij}^{noe} (\langle I_{jz} \rangle - I_{i0}), \end{aligned} \quad (2.21)$$

wobei I_{i0} die Gleichgewichtsmagnetisierung des Spins i ist. Das Gleichungssystem (2.21) heißt auch *Solomon-Gleichung* und beschreibt einen Magnetisierungstransfer durch Kreuzrelaxation und direkte Relaxation [51].

Der Transfer von longitudinaler Magnetisierung während eines Intervalls freier Präzession der Länge τ_m (*Mischzeit*) ist Grundlage des NOESY-Experiments (nuclear Overhauser effect spectroscopy), dessen Pulssequenz in Abbildung 2.3 gezeigt ist. Sie besteht aus drei 90° -Pulsen, die durch Intervalle freier Präzession getrennt sind, gefolgt von der Detektion des FID.

Da anhand dieses Experiments auch die 2D-NMR-Spektroskopie erklärt werden soll, werden zur Vereinfachung wieder isolierte Spins betrachtet ($J_{ij} = 0$). Wenn der erste Puls ein 90°_x -Puls ist, liegt der gleiche Fall vor, der in Abschnitt 1.3.3 diskutiert wurde. Der Operator I_{iz} hat sich entwickelt zu

$$-I_{iy} \cos \Omega_i t_1 + I_{ix} \sin \Omega_i t_1. \quad (2.22)$$

Ein zweiter 90°_x -Puls transformiert dies zu

$$-I_{iz} \cos \Omega_i t_1 + I_{ix} \sin \Omega_i t_1. \quad (2.23)$$

Der Erwartungswert der longitudinalen Magnetisierung $\langle I_{iz} \rangle$ ist durch den Faktor $-\cos \Omega_i t_1$ *frequenzmarkiert* und relaxiert während der Mischzeit τ_m gemäß der Solomon-Gleichung (2.21). Zunächst soll der Fall betrachtet werden, bei dem während τ_m kein Magnetisierungstransfer stattfindet (dieser Fall ist in Abbildung 2.3 gezeigt). Als dritter Puls wird ein 90°_{-x} -Puls mit dem nachfolgenden Intervall freier Präzession der Länge t_2 betrachtet. Der Term proportional zu I_{iz} transformiert sich zu

$$-I_{iy} \cos \Omega_i t_1 \cos \Omega_i t_2 + I_{ix} \cos \Omega_i t_1 \sin \Omega_i t_2 \quad (2.24)$$

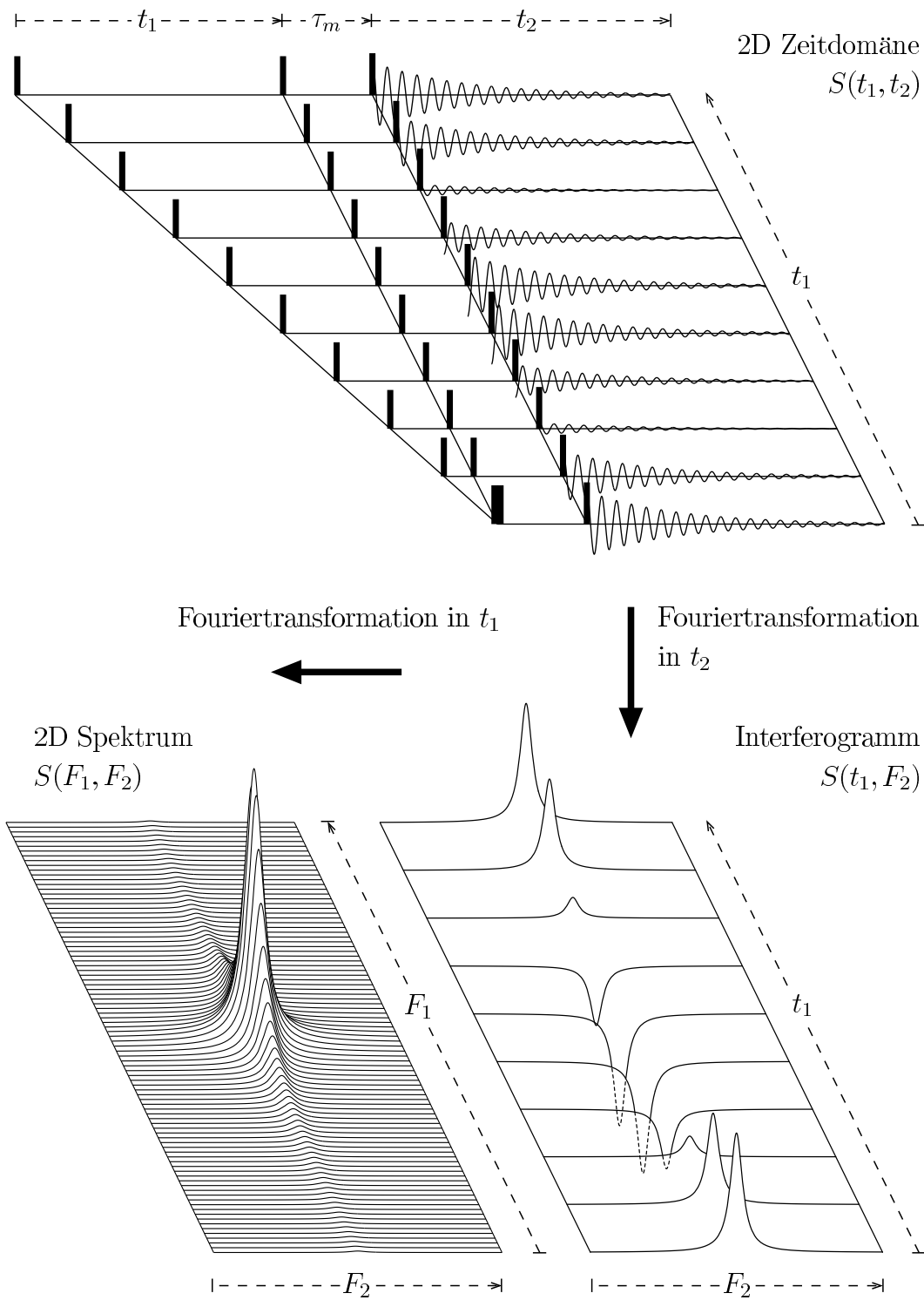


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines NOESY-Experiments

Während der Zeit t_2 wird das Signal gemäß Gleichung (1.33) detektiert. Es wird eine Serie von Experimenten aufgenommen, in der t_1 von Null bis zu einem bestimmten Maximalwert gleichmäßig inkrementiert wird. Es ergibt sich eine Serie von FIDs (Daten in der Zeitdomäne $S(t_1, t_2)$). Das Inkrement Δt_1 hat die gleiche Größe wie der Abstand Δt_2 der diskreten Datenpunkte, die während der Detektionszeit t_2 aufgenommen werden. Die spektrale Breite SW (sweep width), welche die Breite des aufzunehmenden Spektrums angibt, bestimmt durch $\Delta t_1 = \Delta t_2 = 1/(2\text{SW})$ das Inkrement Δt_1 und den Abstand der Datenpunkte Δt_2 . Bei Protonenspektren von Proteinen wird häufig $\Delta t_1 = \Delta t_2 = 60 \mu\text{s}$ gewählt, was einer spektralen Breite von 8333,33 Hz entspricht.

Der Term proportional zu I_{ix} in (2.23) kann dadurch entfernt werden, daß zu einem t_1 Wert mehrere Experimente, bei denen die Phase des letzten Pulses in einer bestimmten Weise geändert wird (*Phasenzzyklus*), aufgenommen und die FIDs aufaddiert werden [6, 57].

Nach der Fouriertransformation aller FIDs der Serie in t_2 liegt eine Reihe von 1D Spektren vor, deren Peakhöhen nach (2.24) proportional zu $\cos \Omega_i t_1$ sind (Interferogramm $S(t_1, F_2)$). Eine zweite Fouriertransformation, diesmal in t_1 , ergibt ein zweidimensionales Spektrum $S(F_1, F_2)$, das Diagonalpeaks bei den Frequenzen $(F_2, F_1) = (\omega_i, \omega_i)$, äquivalent zu (Ω_i, Ω_i) , besitzt. In einem solchen Fall enthält das 2D Spektrum die gleichen Informationen wie ein 1D Spektrum.

Findet dagegen ein Magnetisierungstransfer während der Mischzeit τ_m zwischen zwei Kernen i und j statt, so ergeben sich im Term (2.24) zusätzlich Terme der Art $-I_{iy} \cos \Omega_j t_1 \cos \Omega_i t_2$ und $I_{ix} \cos \Omega_j t_1 \sin \Omega_i t_2$, die vom Magnetisierungstransfer stammen. Diese führen zusätzlich zu Kreuzpeaks im Spektrum: Die Magnetisierung, die während τ_m vom Kern j auf den Kern i transferiert wird, präzediert während t_1 mit ω_j und während t_2 mit ω_i , so daß sich im 2D Spektrum ein Kreuzpeak an der Position $(F_2, F_1) = (\omega_i, \omega_j)$, äquivalent zu (Ω_i, Ω_j) , ergibt.

Die Intensitäten der Peaks im 2D Spektrum ergeben sich aus der Lösung der Solomongleichung (2.21) zu [36]

$$a_{ij}^{noe}(\tau_m) = a_{j \rightarrow i}^{noe}(\tau_m) = \exp(-\Gamma^{noe} \tau_m)_{ij} I_{j0}. \quad (2.25)$$

Abbildung 2.4 verdeutlicht die Kreuz- und Diagonalsignale in einem 2D Spektrum.

Da die Relaxationsmatrix Γ^{noe} symmetrisch ist, kann sie diagonalisiert werden

$$\Gamma^{noe} = X \Lambda X^T. \quad (2.26)$$

Λ ist eine Diagonalmatrix mit den reellen Eigenwerten λ_k von Γ^{noe} als Diagonalelementen und X ist eine orthogonale Matrix mit den normierten Eigenvektoren von Γ^{noe} als Spalten. Damit läßt sich die Intensitätsmatrix $a^{noe}(\tau_m)$ berechnen

$$a_{ij}^{noe}(\tau_m) = I_{j0} \sum_k X_{ik} X_{jk} \exp(-\lambda_k \tau_m). \quad (2.27)$$

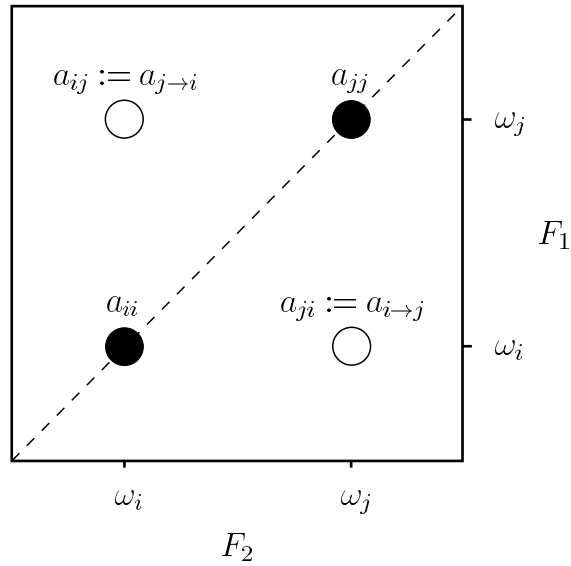


Abbildung 2.4: Schematisches Höhenliniendiagramm eines 2D Spektrums, gezeigt sind Kreuz- und Diagonalepeaks und die Notation ihrer Intensitätsfunktionen.

Wie die Form von Gleichung 2.27 zeigt, ist die Intensitätsfunktion eines Peaks in Abhängigkeit von τ_m (für Kreuzsignale heißt sie *Aufbaukurve*) eine Summe von Exponentialfunktionen.

Im Fall eines isolierten Zweispinsystems (der Einfluß der übrigen Spins im Molekül wird vernachlässigt) mit den Spins 1 und 2, läßt sich $a^{noe}(\tau_m)$ analytisch berechnen. Dabei wird häufig die Namenskonvention

$$\left. \begin{array}{l} \sigma := \Gamma_{12}^{noe} = \Gamma_{21}^{noe} \\ \rho := \Gamma_{11}^{noe} = \Gamma_{22}^{noe} \end{array} \right\} \Rightarrow \Gamma^{noe} = \begin{pmatrix} \rho & \sigma \\ \sigma & \rho \end{pmatrix} \quad (2.28)$$

verwendet. Die Gleichheit der beiden Diagonalelemente der Relaxationsmatrix gilt nur im Falle des isolierten Zweispinsystems. Die Aufbaukurven der Kreuzpeaks und die Intensitätsfunktionen der Diagonalepeaks zwischen den beiden Spins ergeben sich zu

$$\begin{aligned} a_{12}^{noe}(\tau_m) &= a_{21}^{noe}(\tau_m) = \frac{1}{2} \left(\exp\{-(\rho + \sigma)\tau_m\} - \exp\{-(\rho - \sigma)\tau_m\} \right) I_0 \\ a_{11}^{noe}(\tau_m) &= a_{22}^{noe}(\tau_m) = \frac{1}{2} \left(\exp\{-(\rho + \sigma)\tau_m\} + \exp\{-(\rho - \sigma)\tau_m\} \right) I_0 \end{aligned} \quad (2.29)$$

für $I_{10} = I_{20} = I_0$

Abbildung 2.5 zeigt eine berechnete NOESY-Aufbaukurve für den Kreuzpeak eines isolierten Zweispinsystems im Rückgrat des Proteins BPTI (basic pancreatic trypsin inhibitor). Die allgemeine Beschreibung von Polypeptidketten, die Aminosäuresequenz von BPTI und ein Bild der Struktur von BPTI befinden sich im

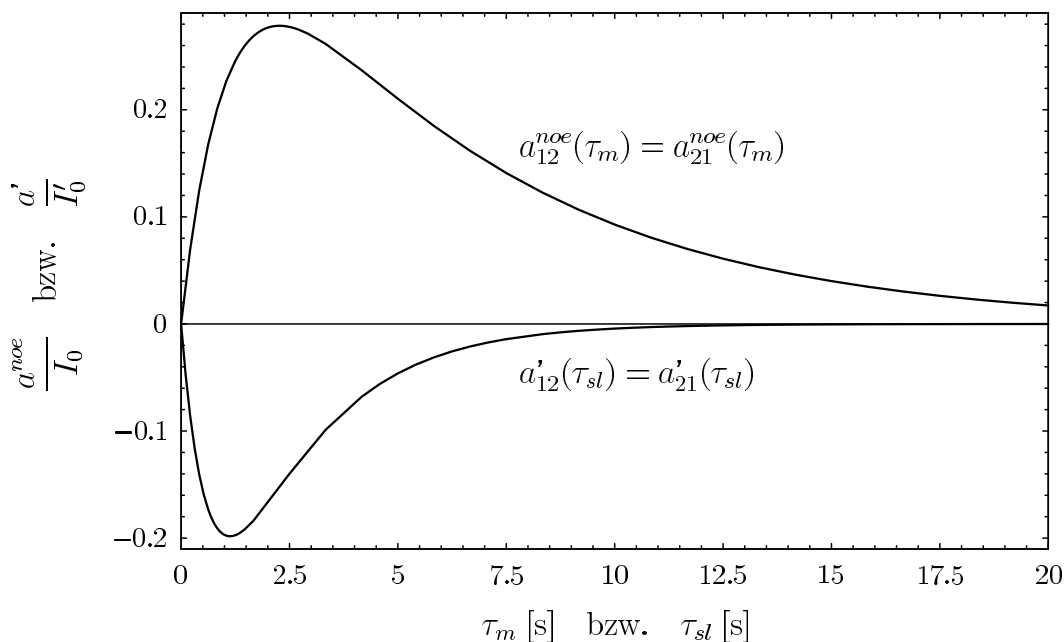
NH Phe 22/C $_{\alpha}$ H Tyr 21

Abbildung 2.5: Berechnete NOESY-Aufbaukurve $a_{12}^{noe}(\tau_m)$ und O-ROESY-Aufbaukurve $a'_{12}(\tau_{sl})$ für ein Protonenpaar aus dem Rückgrat von BPTI: NH der Aminosäure Phenylalanin an Position 22 und C $_{\alpha}$ H der Aminosäure Tyrosin an Position 21 der Aminosäurekette. Der Abstand beträgt 2,27 Å, die chemischen Verschiebungen sind $\delta(\text{NH}) = 9,79$ ppm und $\delta(\text{C}_{\alpha}\text{H}) = 5,68$ ppm in einer Lösung mit dem pH-Wert 4,5 und der Temperatur 310 K, $\omega_0/2\pi = 600,141$ MHz, $\omega_1/2\pi = 10870$ Hz und $\Delta/2\pi = 9331$ Hz. Daraus ergeben sich $\Theta(\text{NH}) = 119,9^\circ$ und $\Theta(\text{C}_{\alpha}\text{H}) = 128,7^\circ$. Es wurde das Modell der isotropen Rotation bei festem Abstand mit der Korrelationszeit $\tau_c = 1$ ns benutzt.

Anhang A, die vollständigen Namen der Aminosäuren im Anhang C. Alle Protonenabstände für die Berechnungen wurden aus der um die Protonen erweiterten Kristallstruktur 4PTI [37] bestimmt (Anhang A). Die NOESY-Aufbaukurve steigt für zunehmende Mischzeiten zunächst bis zu einem Maximum an und fällt dann wieder auf Null zurück. Dies entspricht einer Relaxation ins thermische Gleichgewicht während der Mischzeit.

Für kurze Mischzeiten läßt sich die Matrixexponentialfunktion in Gleichung (2.25) durch den konstanten und linearen Term einer Reihenentwicklung in τ_m ersetzen

$$a_{ij}^{noe} = (\delta_{ij} - \Gamma_{ij}^{noe} \tau_m) I_{j0}. \quad (2.30)$$

Für Kreuzpeaks ist die Steigung der Aufbaukurve nach Gleichung (2.8) durch das Verhältnis einer Funktion $f(J(\omega))$ der spektralen Dichte und des Abstands der

beiden Kerne zur 6. Potenz gegeben

$$\Gamma_{ij}^{noe} = \frac{f(J(\omega))}{r_{ij}^6} \quad \text{für} \quad i \neq j. \quad (2.31)$$

In der Praxis wird eine Serie von NOESY-Spektren als Funktion der Mischzeit τ_m aufgenommen, so daß für jeden Kreuzpeak eine experimentelle Aufbaukurve bestimmt werden kann. Aus der Steigung der Aufbaukurve kann bei Kenntnis der spektralen Dichte der Abstand der beiden Kerne berechnet werden. Es wird angenommen, daß die spektrale Dichte $J(\omega)$ für alle Spinpaare die gleiche ist. Dies ist tatsächlich der Fall, wenn das Molekül starr ist und isotrop rotiert. Aus dem Verhältnis der Steigung Γ_{ij}^{noe} der Aufbaukurve des interessierenden Spinpaares i, j mit dem Abstand r_{ij} und der Steigung Γ_{ref}^{noe} der Aufbaukurve eines Spinpaares mit bekanntem Abstand r_{ref} (z. B. der beiden Protonen in einer CH_2 Gruppe) kann der unbekannte Abstand berechnet werden

$$r_{ij} = r_{ref} \sqrt[6]{\frac{\Gamma_{ref}^{noe}}{\Gamma_{ij}^{noe}}}. \quad (2.32)$$

Das NOESY-Experiment, angewendet auf Protonen, ist eine der wichtigsten Techniken in der biologischen Spektroskopie, da für ein Makromolekül ein kompletter Satz von kurzreichweitigen ($\leq 5 \text{ \AA}$) Verbindungen durch den Raum bestimmt werden kann. Dies ermöglicht die Bestimmung der räumlichen Struktur der betrachteten Makromoleküle.

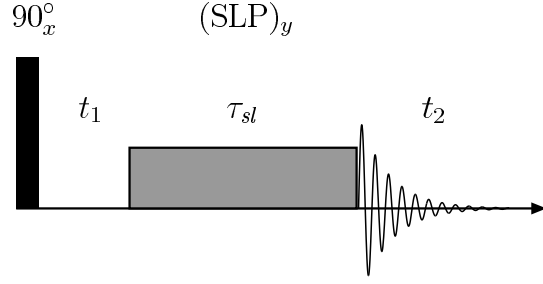
Dennoch hat die oben beschriebene Methode zwei offensichtliche Nachteile:

- In flexiblen Molekülen wird die Abstandsbestimmung ungenau, da die Annahme gleicher spektraler Dichten $J(\omega)$ im ganzen Molekül nicht zutreffen muß.
- Die Information über die interne Dynamik in einem Molekül, die in den spektralen Dichten enthalten ist, wird nicht genutzt.

2.4.2 Das ROESY- und das O-ROESY-Experiment

Der Transfer von longitudinaler Magnetisierung im gekippten Koordinatensystem während des spin-locking ist Grundlage einer weiteren Klasse von Kreuzrelaxationsexperimenten. Das ROESY-Experiment (rotating frame Overhauser effect spectroscopy [2]) und das O-ROESY-Experiment (off-resonance ROESY [11, 31]) sind vergleichbar mit dem NOESY-Experiment. Das Intervall freier Präzession τ_m , die Mischzeit, wird durch einen HF-Puls der Länge τ_{sl} ersetzt. Während dem HF-Puls kommt es zum Transfer von longitudinaler Magnetisierung entlang des effektiven Feldes. Während beim ROESY-Experiment das HF-Feld on-resonance eingestrahlt wird, geschieht dies beim O-ROESY-Experiment off-resonance. Das

Abbildung 2.6: Die Pulssequenz für ein ROESY-Experiment besteht aus einem 90_x° -Puls, dem nachfolgenden Intervall freier Präzession mit der Länge t_1 zur Frequenzmarkierung und einem HF-Puls der Länge τ_{sl} als SLP (spin-locking pulse).



ROESY-Experiment ist demnach nur ein Spezialfall des O-ROESY-Experiments. Die Pulssequenz für ein einfaches ROESY-Experiment ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Der erste 90_x° -Puls mit dem nachfolgenden Intervall freier Präzession der Länge t_1 dient wieder zur Frequenzmarkierung, s. Gleichung (1.32). Das entlang der y -Achse für die Zeit τ_{sl} eingestrahlte HF-Feld konserviert die Terme proportional zu I_{iy} . Während des spin-locking geschieht außerdem ein Magnetisierungstransfer. Im Detektionsintervall kann die Magnetisierung wieder frei in der x - y -Ebene präzedieren und induziert den FID. Das O-ROESY-Experiment besitzt eine ähnliche Pulssequenz, mit dem Unterschied, daß das HF-Feld off-resonance eingestrahlt wird, so daß nur die Projektion der Magnetisierung auf die Achse des effektiven Feldes konserviert wird. Es gibt Experimente, die es ermöglichen, vor dem spin-locking die Magnetisierung entlang des effektiven Feldes auszurichten. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von adiabatischen Pulsen, die in Abschnitt 3.1 diskutiert werden.

Die Intensitäten der Peaks im 2D Spektrum ergeben sich analog zu Gleichung (2.25) zu

$$a'_{ij}(\tau_{sl}) = \exp(-\Gamma' \tau_{sl})_{ij} I'_{j0}, \quad (2.33)$$

wobei I'_{j0} die longitudinale Magnetisierung entlang des effektiven Feldes bezeichnet, die zu Beginn des spin-locking vorliegt.

Auch hier läßt sich im Fall eines isolierten Zweispinsystems mit den Spins 1 und 2 die Matrix $a'(\tau_{sl})$ analytisch berechnen. Die Diagonalelemente der Matrix Γ' sind im Gegensatz zu den Diagonalelementen der Matrix Γ^{noe} voneinander verschieden. Bei der Berechnung der Intensitätsfunktionen für die Kreuz- und Diagonalpeaks der Spins 1 und 2 erweisen sich folgende Definitionen als sinnvoll

$$\begin{aligned} \beta &:= \Gamma'_{12} = \Gamma'_{21} \\ D &:= \beta \sqrt{1 + \left(\frac{\Gamma'_{11} - \Gamma'_{22}}{2\beta} \right)^2} \\ S &:= \frac{1}{2}(\Gamma'_{11} + \Gamma'_{22}) \\ T &:= \frac{1}{2}(\Gamma'_{11} - \Gamma'_{22}). \end{aligned} \quad (2.34)$$

Die Aufbaukurven der Kreuzpeaks und die Intensitätsfunktionen der Diagonalpeaks zwischen den beiden Spins ergeben sich damit zu

$$\begin{aligned}
a'_{12}(\tau_{sl}) &= a'_{21}(\tau_{sl}) = \frac{\beta}{2D} \left(\exp\{-(S+D)\tau_{sl}\} - \exp\{-(S-D)\tau_{sl}\} \right) I'_0 \\
a'_{11}(\tau_{sl}) &= \left(\frac{D+T}{2D} \exp\{-(S+D)\tau_{sl}\} + \frac{D-T}{2D} \exp\{-(S-D)\tau_{sl}\} \right) I'_0 \\
a'_{22}(\tau_{sl}) &= \left(\frac{D-T}{2D} \exp\{-(S+D)\tau_{sl}\} + \frac{D+T}{2D} \exp\{-(S-D)\tau_{sl}\} \right) I'_0 \\
&\quad \text{für } I'_{10} = I'_{20} = I'_0
\end{aligned} \tag{2.35}$$

Abbildung 2.5 zeigt eine berechnete O-ROESY-Aufbaukurve für den Kreuzpeak eines isolierten Zweispinsystems aus zwei Protonen des Rückgrats von BPTI. Die O-ROESY-Aufbaukurve fällt für zunehmende Mischzeiten zunächst bis zu einem (negativen) Minimum ab und steigt dann wieder auf Null an. Dies entspricht, wie bei der NOESY-Aufbaukurve, der Relaxation ins thermische Gleichgewicht während der Mischzeit. Abbildung 2.1 zeigt, daß für große Moleküle ($\tau_c > \omega_0^{-1}\sqrt{5}/2$), welche im folgenden nur betrachtet werden sollen, die Kreuzpeaks im ROESY-Spektrum ein umgekehrtes Vorzeichen im Vergleich zu den Kreuzpeaks im NOESY-Spektrum haben.

Genau wie beim NOESY-Experiment läßt sich die Matrixexponentialfunktion in Gleichung (2.35) für kurze Mischzeiten durch den konstanten und linearen Term einer Reihenentwicklung in τ_{sl} ersetzen

$$a'_{ij} = (\delta_{ij} - \Gamma'_{ij}\tau_{sl})I'_{j0}. \tag{2.36}$$

Für Kreuzpeaks ist die Steigung der Aufbaukurve nach den Gleichungen (2.18), (2.8) und (2.9) wie im Falle des NOESY-Experiments durch das Verhältnis einer Funktion $g(J(\omega))$ der spektralen Dichte und des Abstands der beiden Kerne zur 6. Potenz gegeben

$$\Gamma'_{ij} = \frac{g(J(\omega))}{r_{ij}^6} \quad \text{für } i \neq j. \tag{2.37}$$

Ein ROESY- oder O-ROESY-Experiment eignet sich also genauso zur experimentellen Abstandsbestimmung zwischen zwei Kernen wie das NOESY. Es ergeben sich aber genau die gleichen Nachteile, die auch für das NOESY gelten. Drei Bemerkungen sollen die Unterschiede deutlich machen:

Aufbaukurven für Moleküle mit $\tau_c = \omega_0^{-1}\sqrt{5}/2$: In Abbildung 2.1 ist zu sehen, daß die Kreuzrelaxationsrate $\Gamma'_{ij}{}^{noe}$ in diesem Bereich von τ_c einen Nulldurchgang hat. Für $\omega_0/2\pi = 600,141$ MHz liegt die Nullstelle bei $\tau_c \approx 0,3$ ns. Dies entspricht kleinen Molekülen, so daß in einem solchen Fall das ROESY- oder O-ROESY-Experiment vorzuziehen ist.

Abhängigkeit vom Resonanzoffset: Gleichung (2.18) macht deutlich, daß bei jeder Art von ROESY- oder O-ROESY-Experiment die Kreuzrelaxationsraten auch vom Resonanzoffset Ω_i der betrachteten Kerne abhängen. Dies muß bei der Abstandsbestimmung aus den Aufbaukurven berücksichtigt werden.

TOCSY-Transfer: Die indirekte Spin-Spin Kopplung zwischen zwei Protonen ist verantwortlich für einen oszillatorischen Austausch von longitudinaler Magnetisierung zwischen diesen Protonen. Dieser Prozeß ist Grundlage für das TOCSY-Experiment (total correlation spectroscopy) [2, 41]. Dies ist ein 2D Experiment, das im Spektrum Kreuzpeaks zwischen Spins liefert, zwischen denen es eine chemische Bindung gibt. Es spielt bei der Identifikation von Systemen aus chemisch gebundenen Spins in einem Protein, die charakteristisch für einzelne Aminosäuren sind, eine ähnlich wichtige Rolle wie das NOESY-Experiment bei der Strukturbestimmung. Es läßt sich zeigen, daß der Magnetisierungsaustausch zwischen zwei Protonen i und j möglich ist, wenn

$$|\Omega_i^{eff} - \Omega_j^{eff}| < 2\pi J_{ij} \quad (2.38)$$

gilt. Diese Bedingung kann für Protonen nur erfüllt werden, wenn $\omega_1 \gg |\Omega_i|$ ist. In den hier betrachteten Experimenten gilt jedoch $\omega_1 \approx |\Omega_i|$, so daß diese Form des Magnetisierungsaustauschs (TOCSY-Transfer) vernachlässigt werden kann.

3 Theoretische Grundlagen für Experimente zur Proteindynamik

In Abschnitt 2.4 wurden das NOESY-, das ROESY- und das O-ROESY-Experiment vorgestellt. Diese Experimente dienen dazu, räumlich benachbarte Protonen zu identifizieren. Die Abstandsbestimmung mit Hilfe dieser Experimente ist möglich unter der Annahme, daß die spektrale Dichte der stochastischen Bewegung für alle Spinpaare die gleiche ist. Zum einen hat dies zur Folge, daß die Abstandsbestimmung ungenau wird, wenn diese Annahme nicht zutrifft. Zum anderen bleibt die Information über die interne Dynamik in einem Molekül ungenutzt, die in den spektralen Dichten enthalten ist.

Schon 1987 hat Donald G. Davis vorgeschlagen, experimentelle Aufbaukurven sowohl mit dem NOESY-Experiment als auch mit dem ROESY-Experiment aufzunehmen [10]. Der Quotient der Steigungen (2.31) und (2.37) der jeweiligen Aufbaukurven ist dann nur eine Funktion der spektralen Dichte und nicht mehr des Abstandes der betrachteten Protonen. Im Bewegungsmodell der isotropen Rotation bei festem Abstand kann so die Korrelationszeit für das jeweilige Spinpaar bestimmt werden. Sie kann für eine genauere Abstandsbestimmung benutzt werden. Die Aufnahme und Auswertung von zwei Aufbaukurven ist jedoch experimentell sehr aufwendig, so daß die Entwicklung eines Experiments sinnvoll ist, das dieselben Informationen in einer Aufbaukurve enthält.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Experimente, welche Relaxation während Intervallen freier Präzession und Relaxation während Pulseinstrahlung kombinieren, auf die Möglichkeit zu untersuchen, Korrelationszeiten für die Bewegung von Spinpaaren zu bestimmen. Zum einen kann dadurch die Messung des Abstandes zwischen zwei Spins präzisiert werden, zum anderen können Aussagen über die interne Dynamik von Molekülen (in diesem Fall Proteinen) erhalten werden.

Ein Experiment, das Relaxation während Intervallen freier Präzession und während Pulseinstrahlung kombiniert, ist das nullquantenkompenzierte NOESY-Experiment. Lorenz Mitschang et al. haben dieses Experiment 1992 entwickelt, um unerwünschte Signale, die von Nullquantenkohärenzen (ZQC, zero-quantum coherences) stammen, in einem NOESY-Experiment zu unterdrücken [39, 40]. ZQC sind Terme der Form $I_i^+ I_j^- - I_i^- I_j^+$ und $I_j^+ I_i^- - I_j^- I_i^+$ im statistischen Operator, die aufgrund der indirekten Spin-Spin Kopplung zwischen zwei Protonen entstehen. Im Detektionsintervall sind nur die Terme I_{ix} , I_{jx} , I_{iy} und I_{jy} erwünscht,

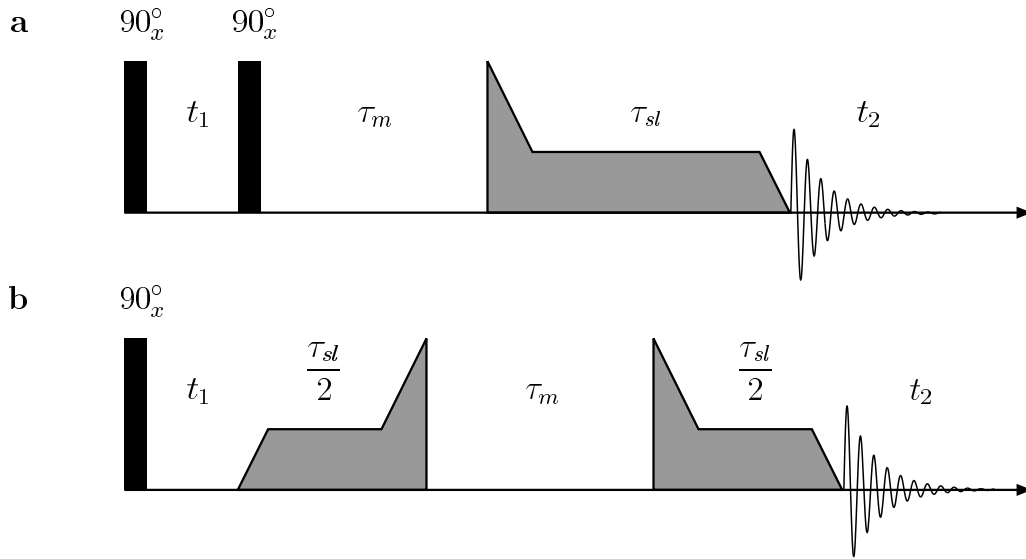


Abbildung 3.1: Pulssequenzen für das nullquantenkompenzierte NOESY-Experiment. **a** enthält nach der Mischzeit τ_m einen adiabatischen Puls, der die longitudinale Magnetisierung in x - y -Ebene rotiert und für die Zeit τ_{sl} unter einem bestimmten Winkel zur z -Achse haltmacht (spin-locking unter diesem Winkel). **b** verteilt die Perioden des spin-locking gleichmäßig vor und nach die Mischzeit τ_m . Der erste adiabatische Puls rotiert die Magnetisierung aus der x - y -Ebene parallel zur z -Achse, der zweite hat die gleiche Wirkung wie bei **a**.

weil sie gemessen werden können und während der Mischzeit τ_m als I_{iz} und I_{jz} longitudinal relaxiert sind (Abschnitt 2.3). Die ZQC liegen im Detektionsintervall zusätzlich zu den erwünschten Termen vor. Andere unerwünschte Signale lassen sich durch Phasenzyklen entfernen, während sich die ZQC auf diese Weise nicht unterdrücken lassen. Sie führen zu Signalen mit unerwünschter Linienform, welche die gewünschten NOESY-Kreuzpeaks überlagern. Abbildung 3.1 zeigt zwei Pulssequenzen, die es ermöglichen, die ZQC zu unterdrücken. Im nächsten Abschnitt werden sie ausführlich diskutiert.

Im folgenden wird untersucht, wie mit Hilfe der nullquantenkompenzierten NOESY-Experimente im Modell der isotropen Rotation des Abstandsvektors zweier Spins Korrelationszeiten für die Bewegung von Spinpaaren bestimmt werden können.

3.1 Diskussion der Pulssequenzen

Abbildung 3.1 zeigt zwei mögliche Pulssequenzen für das nullquantenkompenzierte NOESY-Experiment, bei dem ZQC unterdrückt werden. Die Beschreibung erfolgt wieder für isolierte Spins, obwohl sich in diesem Bild nicht die Entstehung von ZQC erklären läßt. Bei dem Experiment **a** erzeugen die ersten beiden 90° -Pulse

und das Intervall freier Präzession wie beim herkömmlichen NOESY-Experiment frequenzmarkierte z -Magnetisierung. Während der Mischzeit τ_m kommt es zum Magnetisierungstransfer. Statt des abschließenden 90° -Pulses wie im NOESY-Experiment, folgt ein Puls, der die z -Magnetisierung adiabatisch in die x - y -Ebene rotiert. In der Praxis besteht der adiabatische Puls aus einer Folge kurzer Pulse, deren Frequenzoffsets relativ zur Mitte des Protonenspektrums $\Delta = \omega - \omega_0$ langsam von sehr großen Werten (off-resonance) zu Null (on-resonance) verringert werden. Wenn die Geschwindigkeit $\dot{\Delta}(t)$ die adiabatische Bedingung (Bloch-Bedingung [4, 5])

$$|\dot{\Delta}(t)| \ll \omega_1^2 \quad (3.1)$$

erfüllt, bleibt die anfängliche z -Komponente der Magnetisierung (longitudinale Magnetisierung) stets entlang der momentanen Achse des effektiven Feldes ausgerichtet. Am Ende wird das HF-Feld on-resonance eingestrahlt, so daß die Magnetisierung in die x - y -Ebene rotiert ist. Die verschiedenen Kerne folgen ihrem jeweiligen effektiven Feld, das durch die chemische Verschiebung bestimmt ist. Die Bloch-Bedingung ist z. B. erfüllt, wenn $\Delta(t)$ proportional zu einer Tangensfunktion ist, deren Argument linear von der Zeit abhängt [23]. In diesem Fall ist $\Theta_i(t)$ linear von der Zeit abhängig. Der Transfer von Magnetisierung durch Kreuzrelaxation während des adiabatischen Pulses wird im folgenden vernachlässigt, weil seine Gesamtdauer ($\approx 0,2$ ms) klein gegen die betrachteten Mischzeiten ist.

Unter einem bestimmten Winkel Θ_i zur z -Achse wird der adiabatische Puls angehalten, indem das HF-Feld für eine Zeitdauer τ_{sl} eingestrahlt wird. Während dieser Zeit kommt es zum effizienten Magnetisierungstransfer zwischen den longitudinalen Magnetisierungen entlang des effektiven Feldes. Die ZQC zweier Kerne i und j präzedieren mit der Frequenz $\Omega_{ZQ} = \Omega_i^{eff} - \Omega_j^{eff}$ und werden aufgrund der Inhomogenität des HF-Feldes $\vec{B}_1(t)$ rasch gedämpft. Die Dämpfung ist am schnellsten wenn $\Theta_i \approx \Theta_j \approx 125,26^\circ$ (identisch mit $54,74^\circ$) gilt. Der TOCSY-Transfer kann während dieser Mischzeit vernachlässigt werden, wenn $\omega_1 \approx |\Omega_i|$ (Abschnitt 2.4.2) gilt. Im folgenden werden Experimente betrachtet, die diese Bedingung erfüllen.

Bei dem Experiment **b** ist die Mischzeit während des spin-locking in zwei Teile aufgeteilt. Der erste adiabatische Puls ersetzt den zweiten 90° -Puls des Experiments **a**, indem er die Magnetisierung adiabatisch aus der x - y -Ebene parallel zur z -Achse rotiert.

Die Wirkung für die Nullquantenkompensierung ist bei beiden Experimenten die gleiche. Die Intensitäten der Kreuzpeaks ergeben sich dagegen auf verschiedene Weise, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird.

3.2 Aufbaukurven und Aufbauoberflächen

Der Austausch von longitudinaler Magnetisierung während der Mischzeit τ_m findet gemäß Γ^{noe} und der von longitudinaler Magnetisierung im gekippten Koordinatensystem während der Mischzeit τ_{sl} findet gemäß Γ' statt. Die Intensitäten der Kreuzpeaks zwischen zwei Spins i und j ergeben sich in Experiment **a** und **b** aus allen möglichen Transfers während τ_m und τ_{sl} zu

$$\begin{aligned} a_{ij}(\tau_m, \tau_{sl}) &= [\exp(-\Gamma' \tau_{sl}) \cdot \exp(-\Gamma^{noe} \tau_m)]_{ij} I_{j0} \\ &= \sum_k \exp(-\Gamma' \tau_{sl})_{ik} \exp(-\Gamma^{noe} \tau_m)_{kj} I_{j0} \end{aligned} \quad (3.2-a)$$

$$\begin{aligned} a_{ij}(\frac{\tau_{sl}}{2}, \tau_m, \frac{\tau_{sl}}{2}) &= [\exp(-\Gamma' \frac{\tau_{sl}}{2}) \cdot \exp(-\Gamma^{noe} \tau_m) \cdot \exp(-\Gamma' \frac{\tau_{sl}}{2})]_{ij} I_{j0} \\ &= \sum_{k,l} \exp(-\Gamma' \frac{\tau_{sl}}{2})_{ik} \exp(-\Gamma^{noe} \tau_m)_{kl} \exp(-\Gamma' \frac{\tau_{sl}}{2})_{lj} I_{j0}. \end{aligned} \quad (3.2-b)$$

Die Summen laufen über alle Spins des Spinsystems. Die Reihenfolge der Argumente in den Funktionsdefinitionen gibt die Reihenfolge der zugehörigen Mischzeiten in der Pulssequenz an.

Die Terme in den Summen mit $k, l \neq i, j$ beschreiben den Magnetisierungsaustausch über dritte Spins. Dieser Prozeß wird *Spindiffusion* genannt. Wenn ein isoliertes Zweispinsystem betrachtet wird, fallen diese Terme weg.

Der Vorteil des Experiments **b** gegenüber dem Experiment **a** ist die Symmetrie des entstehenden 2D Spektrums um die Diagonale, wenn die Gleichgewichtsmagnetisierungen der Spins gleich sind ($I_{i0} = I_{j0}$). Dies wird im folgenden generell angenommen. Das 2D Spektrum des Experiments **a** ist nur symmetrisch unter Spiegelung an der Diagonalen und Umkehr der Pulssequenz (erst die Mischzeit τ_{sl} und dann die Mischzeit τ_m)

$$\begin{aligned} \mathbf{a} \quad & a_{ij}(\tau_m, \tau_{sl}) = a_{ji}(\tau_{sl}, \tau_m) \\ \mathbf{b} \quad & a_{ij}(\frac{\tau_{sl}}{2}, \tau_m, \frac{\tau_{sl}}{2}) = a_{ji}(\frac{\tau_{sl}}{2}, \tau_m, \frac{\tau_{sl}}{2}). \end{aligned} \quad \text{für} \quad I_{i0} = I_{j0}. \quad (3.3)$$

Generell gibt es drei Möglichkeiten, mit Hilfe der Pulssequenzen aus Abbildung 3.1 eine Serie von Spektren aufzunehmen:

τ_m und τ_{sl} werden variiert: Dies liefert die experimentellen Intensitätsfunktionen (*Aufbauoberflächen*) der Kreuzpeaks in Abhängigkeit der beiden Mischzeiten τ_m und τ_{sl} .

τ_{sl} fest, τ_m wird variiert: Dies liefert eine Aufbaukurve vergleichbar mit der NOESY-Aufbaukurve. Da bei geeigneter Wahl von Δ und ω_1 für das HF-Feld zum spin-locking Γ'_{ij} und Γ^{noe}_{ij} unterschiedliche Vorzeichen besitzen, ergibt sich in der Aufbaukurve eine Nullstelle, die in den folgenden Abschnitten für zwei verschiedene Näherungen der Intensitätsfunktionen berechnet wird.

τ_m fest, τ_{sl} wird variiert: Analog zum vorhergehenden Fall ergibt sich eine Aufbaukurve vergleichbar mit der eines O-ROESY-Experiments. Wegen der zusätzlichen Mischzeit τ_m ist sie nach oben verschoben. Dieser Fall wird im folgenden nicht näher betrachtet.

Da die Intensitätsfunktionen Produkte von Matrixexponentialfunktionen der Kreuzrelaxationsmatrizen enthalten, sind sie in dieser Form nicht analytisch auswertbar. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten der Approximation, welche die Intensitätsfunktionen stark vereinfachen:

Reihenentwicklung der Intensitätsfunktionen Für kurze Mischzeiten τ_m und τ_{sl} können die Intensitätsfunktionen durch ihre Reihenentwicklung in τ_m und τ_{sl} ersetzt werden.

Isoliertes Zweispinsystem Die zwei Spins, deren Intensitätsfunktion der Kreuzpeaks betrachtet werden soll, werden als isoliertes Zweispinsystem angenommen. Der Einfluß der anderen Spins im Molekül bleibt unberücksichtigt.

3.3 Reihenentwicklung der Intensitätsfunktionen

Für kleine Zeiten τ_m und τ_{sl} lassen sich die Intensitätsfunktionen in guter Näherung durch ihre Reihenentwicklung bis zur quadratischen Ordnung ersetzen

$$a_{ij}(\tau_m, \tau_{sl}) = \left\{ -\Gamma_{ij}^{noe} \tau_m - \Gamma'_{ij} \tau_{sl} + \sum_k \Gamma'_{ik} \Gamma_{kj}^{noe} \tau_m \tau_{sl} + \frac{1}{2} \sum_k \Gamma_{ik}^{noe} \Gamma_{kj}^{noe} \tau_m^2 + \frac{1}{2} \sum_k \Gamma'_{ik} \Gamma'_{kj} \tau_{sl}^2 \right\} I_{j0} \quad (3.4-a)$$

$$a_{ij}\left(\frac{\tau_{sl}}{2}, \tau_m, \frac{\tau_{sl}}{2}\right) = \left\{ -\Gamma_{ij}^{noe} \tau_m - \Gamma'_{ij} \tau_{sl} + \frac{1}{2} \sum_k (\Gamma'_{ik} \Gamma_{kj}^{noe} + \Gamma_{ik}^{noe} \Gamma'_{kj}) \tau_m \tau_{sl} + \frac{1}{2} \sum_k \Gamma_{ik}^{noe} \Gamma_{kj}^{noe} \tau_m^2 + \frac{1}{2} \sum_k \Gamma'_{ik} \Gamma'_{kj} \tau_{sl}^2 \right\} I_{j0}. \quad (3.4-b)$$

Bis zur quadratischen Ordnung ergibt sich die Intensitätsfunktion eines Kreuzpeaks für das Experiment **b** als Mittel der Intensitätsfunktionen der Kreuzpeaks oberhalb und unterhalb der Diagonalen im Spektrum für das Experiment **a**. In höherer Ordnung der Reihenentwicklung gilt dies nicht mehr.

Die Reihenentwicklungen (3.4-a) und (3.4-b) sind eine gute Näherung, wenn die Mischzeiten klein gegen die Kehrwerte der Beträge der einzelnen Kreuzrelaxationsraten sind. Diese Kehrwerte sind nach den Gleichungen (2.31) und (2.37), proportional zum Abstand der betrachteten Kerne zur 6. Potenz und fallen mit zunehmender Korrelationszeit der stochastischen Bewegung ab (Abbildung 2.1). Die Näherung gilt um so besser, je größer der Abstand und je kleiner die Korrelationszeit ist. Bei Proteinen in Lösung mit einer Korrelationszeit um 1 ns,

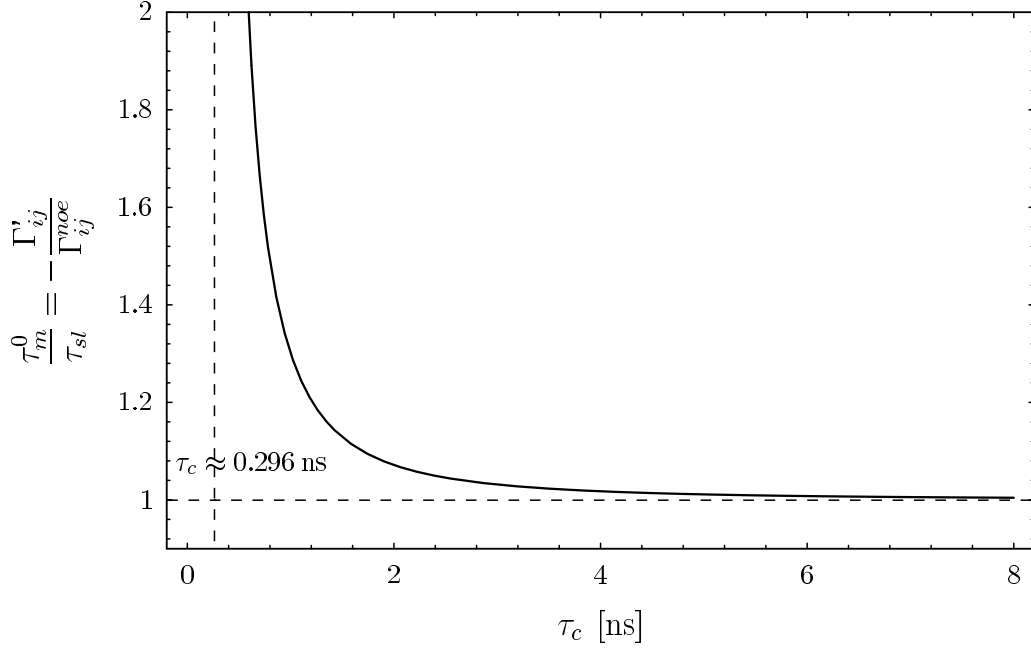


Abbildung 3.2: Sensitivität der Experimente mit den Pulssequenzen in Abbildung 3.1 für die Bestimmung der Korrelationszeit aus der Nullstelle der Aufbaukurve für den Kreuzpeak eines Protonenpaares. Das Verhältnis der Nullstelle zur Dauer des spinlocking ist für $\omega_0/2\pi = 600,141$ MHz und $\Theta_i = \Theta_j = 125,26^\circ$ in Abhängigkeit von der Korrelationszeit der stochastischen Bewegung der Protonen aufgetragen.

Kernabständen von 2 Å und $\omega_0/2\pi = 600,141$ MHz liegen die Beträge der Relaxationsraten in der Größenordnung von 1 s^{-1} (Abbildung 2.1). Die experimentell verwendeten Mischzeiten τ_m und τ_{sl} liegen im Bereich bis zu 50 ms, sind also tatsächlich klein gegenüber den Kehrwerten der Beträge der Relaxationsraten.

3.3.1 Nullstellen der Aufbaukurven für festes τ_{sl} in linearer Näherung

Die Nullstellen der Aufbaukurven bei festem τ_{sl} lassen sich leicht berechnen, wenn so kleine Zeiten τ_m und τ_{sl} angenommen werden, daß die Aufbaukurven bereits in guter Näherung durch die in τ_m und τ_{sl} linearen Terme der Gleichungen (3.4-a) und (3.4-b) gegeben sind

$$a_{ij}(\tau_m, \tau_{sl}) = a_{ij}\left(\frac{\tau_{sl}}{2}, \tau_m, \frac{\tau_{sl}}{2}\right) = \left\{ -\Gamma_{ij}^{noe} \tau_m - \Gamma'_{ij} \tau_{sl} \right\} I_{j0}. \quad (3.5)$$

Für Moleküle mit $\tau_c > \omega_0^{-1} \sqrt{5}/2$ ist die Kreuzrelaxationsrate Γ_{ij}^{noe} negativ. Das Vorzeichen von Γ'_{ij} hängt von den Winkeln Θ_i und Θ_j ab. Werden diese so gewählt, daß Γ'_{ij} positiv ist, dann beschreibt Gleichung (3.5) für festes τ_{sl} eine

Gerade mit positiver Steigung und negativem y -Achsenabschnitt. Da in der linearen Näherung die Aufbaukurven der Kreuzpeaks für die Experimente **a** und **b** identisch sind, wird hier nur von *der* Aufbaukurve gesprochen. Das Verhältnis der Nullstelle τ_m^0 der Aufbaukurve für den Kreuzpeak zweier Kerne i und j bei der festen Zeit τ_{sl} ergibt sich in dieser Näherung zu

$$\frac{\tau_m^0}{\tau_{sl}} = -\frac{\Gamma'_{ij}}{\Gamma_{ij}^{noe}} = -\cos \Theta_i \cos \Theta_j - \sin \Theta_i \sin \Theta_j \frac{8\omega_0^4 \tau_c^4 + 22\omega_0^2 \tau_c^2 + 5}{-4\omega_0^4 \tau_c^4 + \omega_0^2 \tau_c^2 + 5}. \quad (3.6)$$

Der zweite Ausdruck ergibt sich mit dem hier verwendeten Modell der isotropen Rotation mit festem Abstand für die Bewegung der Spinpaare. Wenn experimentell eine Aufbauoberfläche in Abhängigkeit von τ_m und τ_{sl} aufgenommen wird, ergibt sich der Quotient τ_m^0/τ_{sl} aus dem Verhältnis der in τ_m und τ_{sl} linearen Terme (Abschnitt 4.1.4). Der Quotient τ_m^0/τ_{sl} ist unabhängig vom Abstand r_{ij} der beiden Spins. Aus der Nullstelle läßt sich die Korrelationszeit der Bewegung direkt berechnen

$$\begin{aligned} q &:= \frac{\tau_m^0}{\tau_{sl}} \\ s &:= \sin \Theta_i \sin \Theta_j \\ c &:= \cos \Theta_i \cos \Theta_j \end{aligned}$$

$$\tau_c = \frac{1}{2\omega_0} \sqrt{\frac{q + c + 22s + 3\sqrt{9q^2 + 18qc + 9c^2 - 4cs - 4qs + 36s^2}}{2(q + c - 2s)}}. \quad (3.7)$$

Damit erlaubt die Aufbaukurve (3.5) für den Kreuzpeak des Spinpaares i, j sowohl die Bestimmung der Korrelationszeit der Bewegung des Abstandsvektor aus der Nullstelle als auch die Berechnung des Abstands aus der Steigung.

Die Abbildung 3.2 zeigt τ_m^0/τ_{sl} als Funktion von τ_c für den Fall $\Theta_i = \Theta_j = 125,26^\circ$. Die Funktion hat bei der Nullstelle der Kreuzrelaxationsrate Γ_{ij}^{noe} ($\tau_c = \omega_0^{-1}\sqrt{5}/2$) eine Polstelle. Im Grenzfall großer Korrelationszeiten (große Moleküle in einer Lösung mit großer Viskosität) gilt

$$\lim_{\tau_c \rightarrow \infty} \frac{\tau_m^0}{\tau_{sl}} = 2 \sin \Theta_i \sin \Theta_j - \cos \Theta_i \cos \Theta_j. \quad (3.8)$$

Für $\Theta_i = \Theta_j = 126,26^\circ$ ist dieser Grenzwert gerade 1. Die Messung der Korrelationszeiten über die Nullstelle der Aufbaukurve ist nur in der Nähe der Nullstelle der Kreuzrelaxationsrate Γ_{ij}^{noe} sensitiv, weil die Änderung von τ_m^0/τ_{sl} mit τ_c in diesem Bereich groß ist. Da die Nullstelle der Kreuzrelaxationsrate Γ_{ij}^{noe} über ω_0 mit der Zeeman-Feldstärke zusammenhängt, müßte diese variabel sein, damit verschiedene Bereiche von τ_c mit maximaler Sensitivität erfaßt werden können. In kommerziellen Spektrometern zur hochauflösenden NMR-Spektroskopie ist die

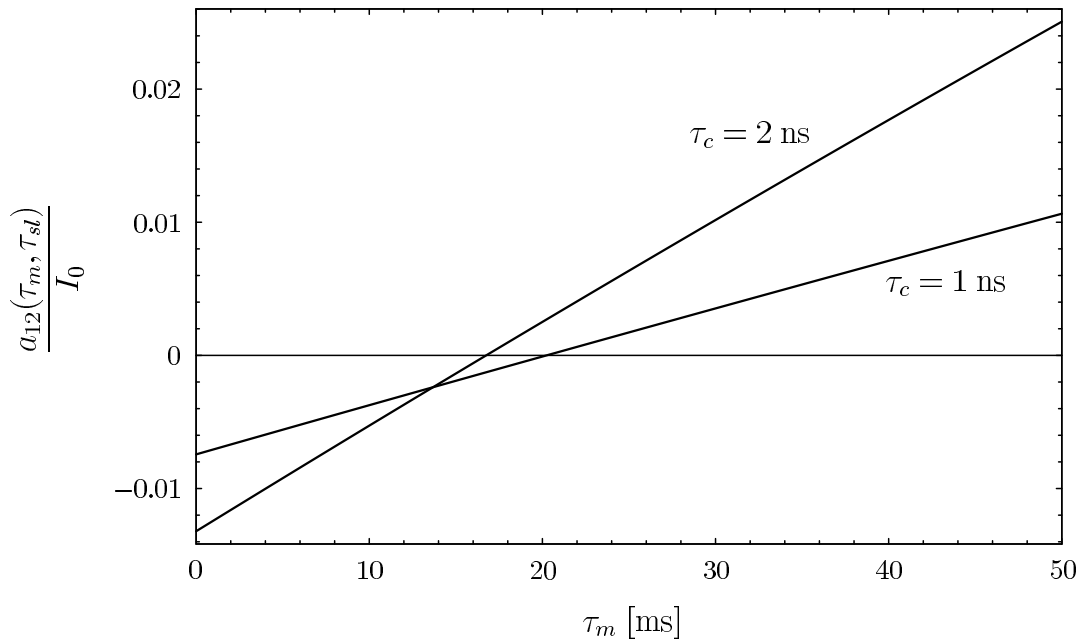
NH Phe 22/C $_{\alpha}$ H Tyr 21

Abbildung 3.3: Für zwei Korrelationszeiten berechnete Aufbaukurven $a_{12}(\tau_m, \tau_{sl})$ zum Experiment **a** für den Kreuzpeak des Zweispinsystems aus den gleichen Protonen und bei den gleichen Bedingungen wie in Abbildung 2.5. Die Dauer des spin-locking beträgt $\tau_{sl} = 15$ ms.

Zeeman-Feldstärke aber nicht variabel. Für $\omega_0/2\pi = 600,141$ MHz können über die Nullstellenmessung nur Korrelationszeiten in einem Molekül unterschieden werden, wenn $\tau_c \lesssim 6$ ns gilt. Je größer die Korrelationszeit, desto kleiner wird der Wert der Nullstelle der Aufbaukurve. Abbildung 3.3 zeigt die für zwei verschiedene Korrelationszeiten berechneten Aufbaukurven für den Kreuzpeak eines Zweispinsystems im Rückgrat von BPTI.

3.4 Intensitätsfunktionen für ein isolierte Zweispinsystem

Im vorhergehenden Abschnitt wurde die Nullstelle der Aufbaukurve eines Kreuzpeaks für festes τ_{sl} in linearer Näherung berechnet. Diese Näherung ist aber nur gut für Mischzeiten, die klein gegen den Kehrwert der Relaxationsraten sind. Wenn das Spinpaar, dessen Aufbaukurve betrachtet wird, als isoliertes Spinpaar angenommen wird, ist die lineare Näherung der Aufbaukurve zur Berechnung der Nullstelle nicht nötig. Deshalb wird im folgenden die Aufbaukurve und ihre Nullstelle für ein isoliertes Zweispinsystem berechnet und mit dem Ergebnis der

linearen Näherung verglichen.

Die Intensitätsfunktionen der Kreuzpeaks zweier Spins 1 und 2 ergeben sich mit den Notationen (2.28) und (2.34) für die Experimente **a** und **b** zu

$$\begin{aligned} \frac{a_{12}(\tau_m, \tau_{sl})}{I_{20}} = & \frac{\beta+D+T}{4D} \exp\{-(S+D)\tau_{sl} - (\rho+\sigma)\tau_m\} \\ & - \frac{\beta+D-T}{4D} \exp\{-(S-D)\tau_{sl} - (\rho-\sigma)\tau_m\} \\ & + \frac{\beta-D-T}{4D} \exp\{-(S+D)\tau_{sl} - (\rho-\sigma)\tau_m\} \\ & - \frac{\beta-D+T}{4D} \exp\{-(S-D)\tau_{sl} - (\rho+\sigma)\tau_m\}. \end{aligned} \quad (3.9\text{-a})$$

$$\begin{aligned} \frac{a_{12}(\frac{\tau_{sl}}{2}, \tau_m, \frac{\tau_{sl}}{2})}{I_{20}} = & \frac{(\beta+D+T)(\beta+D-T)}{8D^2} \left[\begin{aligned} & \exp\{-(S+D)\tau_{sl} - (\rho+\sigma)\tau_m\} \\ & - \exp\{-(S-D)\tau_{sl} - (\rho-\sigma)\tau_m\} \end{aligned} \right] \\ & + \frac{(\beta-D+T)(\beta-D-T)}{8D^2} \left[\begin{aligned} & \exp\{-(S-D)\tau_{sl} - (\rho+\sigma)\tau_m\} \\ & - \exp\{-(S+D)\tau_{sl} - (\rho-\sigma)\tau_m\} \end{aligned} \right] \\ & + \frac{\beta^2-D^2-T^2}{4D^2} \left[\begin{aligned} & \exp\{-S\tau_{sl} - (\rho-\sigma)\tau_m\} \\ & - \exp\{-S\tau_{sl} - (\rho+\sigma)\tau_m\} \end{aligned} \right]. \end{aligned} \quad (3.9\text{-b})$$

Die Abbildungen 3.3 und 3.4 zeigen Aufbaukurven für die Kreuzpeaks von Zweispinsystemen in BPTI, die mit den obigen Gleichungen bei $\tau_{sl} = 15$ ms berechnet wurden. In Abbildung 3.4 sind Aufbaukurven für die Experimente **a** und **b** im Vergleich zu sehen. Die beiden Protonen 1 und 2 sind durch das NH und das $C_\gamma H$ der Aminosäure Leucin an Position 29 der Aminosäurekette gegeben. Der Abstand dieser beiden Protonen ist mit $1,48 \text{ \AA}$ sehr klein. Wenn für die Berechnung zusätzlich eine große Korrelationszeit von $\tau_c = 7$ ns angenommen wird, sind die Aufbaukurven in dem gezeigten Bereich nicht mehr linear und die Ungleichheit der Aufbaukurven für Peaks oberhalb und unterhalb der Diagonalen im 2D Spektrum wird deutlich. Die Aufbaukurve für das Experiment **b** liegt zwischen den Aufbaukurven für Peaks oberhalb und unterhalb der Diagonalen des Spektrums für Experiment **a**. Nach den Gleichungen (3.4-a) und (3.4-b) ist die zum Experiment **b** gehörige Aufbaukurve bis zu Termen quadratischer Ordnung das Mittel der beiden Aufbaukurven zum Experiment **a**.

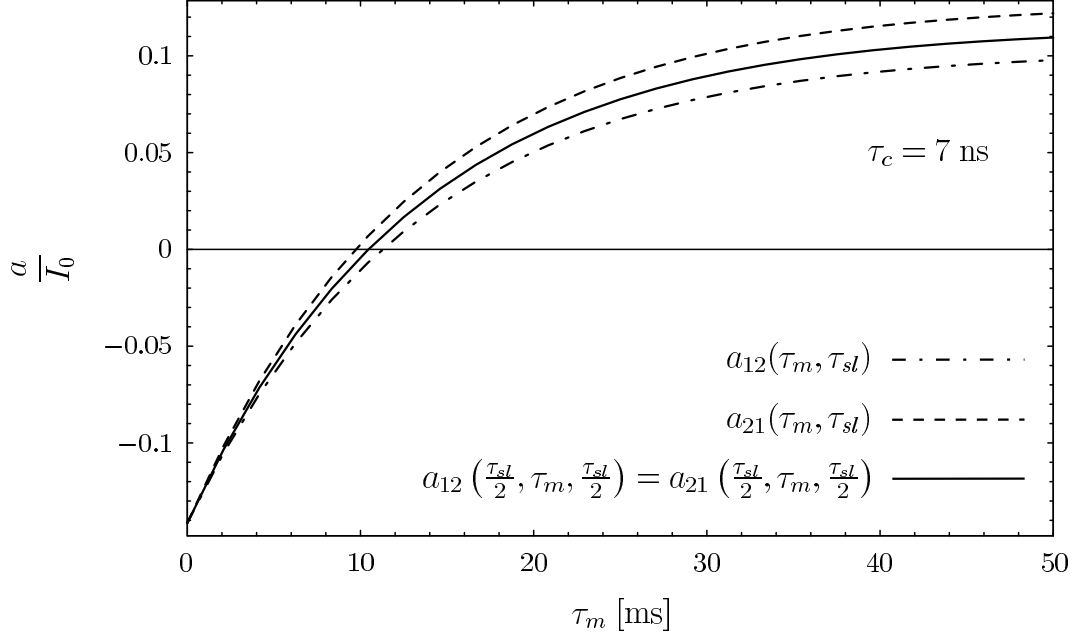
NH Leu 29/C_γH Leu 29

Abbildung 3.4: Berechneten Aufbaukurven $a_{12}(\tau_m, \tau_{sl})$, $a_{21}(\tau_m, \tau_{sl})$ zum Experiment **a** und $a_{12}(\frac{\tau_{sl}}{2}, \tau_m, \frac{\tau_{sl}}{2})$ zum Experiment **b**, deren Pulssequenzen in Abbildung 3.1 dargestellt sind, für ein Protonenpaar aus dem Rückgrat von BPTI: NH und C_γH der Aminosäure Leucin an Position 29 der Aminosäurekette. Der Abstand beträgt 1,48 Å, die chemischen Verschiebungen sind $\delta(\text{NH}) = 6,83$ ppm und $\delta(\text{C}_{\gamma}\text{H}) = 1,44$ ppm in einer Lösung mit dem pH-Wert 4,5 und der Temperatur 310 K, $\omega_0/2\pi = 600,141$ MHz, $\omega_1/2\pi = 10870$ Hz und $\Delta/2\pi = 9331$ Hz. Daraus ergeben sich $\Theta(\text{NH}) = 126,4^\circ$ und $\Theta(\text{C}_{\gamma}\text{H}) = 136,0^\circ$. Die Dauer des spin-locking ist $\tau_{sl} = 15$ ms und die Korrelationszeit der Bewegung des Spinpaares beträgt $\tau_c = 7$ ns.

Im Grenzfall $(\Theta_1 - \Theta_2) \rightarrow 0$ ergibt sich

$$\lim_{(\Theta_1 - \Theta_2) \rightarrow 0} T = 0, \quad \lim_{(\Theta_1 - \Theta_2) \rightarrow 0} D = \beta, \quad \lim_{(\Theta_1 - \Theta_2) \rightarrow 0} S = \Gamma'_{11}|_{\Theta_1 = \Theta_2} = \Gamma'_{22}|_{\Theta_1 = \Theta_2} \quad (3.10)$$

$$\begin{aligned} \lim_{(\Theta_1 - \Theta_2) \rightarrow 0} a_{12}(\tau_m, \tau_{sl}) &= \lim_{(\Theta_1 - \Theta_2) \rightarrow 0} a_{12}(\frac{\tau_{sl}}{2}, \tau_m, \frac{\tau_{sl}}{2}) \\ &= \frac{1}{2} \left(\exp\{-(\Gamma'_{11} + \beta)\tau_{sl} - (\rho + \sigma)\tau_m\} \right. \\ &\quad \left. - \exp\{-(\Gamma'_{11} - \beta)\tau_{sl} - (\rho - \sigma)\tau_m\} \right) I_{20}. \end{aligned} \quad (3.11)$$

Die Differenz $(\Theta_1 - \Theta_2)$ kann aus zwei Gründen gegen Null gehen:

- Es werden Kreuzpeaks in der Nähe der Diagonalen betrachtet. Da sich die chemischen Verschiebungen der beiden Kerne annähern, gleichen sich auch die beiden Winkel Θ_1 und Θ_2 an.

- Wenn ω_1 des HF-Feldes zum spin-locking vergrößert wird, muß nach Gleichung (2.14) auch Δ vergrößert werden, damit die Winkel ungefähr gleichbleiben. Wird Δ groß im Vergleich zur Differenz der Resonanzoffsets der beiden Kerne ($\Delta \gg |\Omega_1 - \Omega_2|$), so gleichen sich die Winkel Θ_1 und Θ_2 an.

In diesem Grenzfall fallen nach Gleichung (3.11) die Intensitätsfunktionen der Kreuzpeaks für das Experiment **a** und **b** zusammen. Nach Gleichung (3.10) nähert sich der Quotient D/β für $(\Theta_1 - \Theta_2) \rightarrow 0$ dem Wert 1. Da dieser Quotient unabhängig von r_{12} ist, lohnt es sich, ihn für $\Theta_1 \neq \Theta_2$ näher zu betrachten und seine Abweichung vom Wert 1 für beliebige Spinpaare zu untersuchen. Der Quotient ergibt sich zu

$$\begin{aligned} s_1 &:= \sin \Theta_1 & c_1 &:= \cos \Theta_1 \\ s_2 &:= \sin \Theta_2 & c_2 &:= \cos \Theta_2 \end{aligned} \quad (3.12)$$

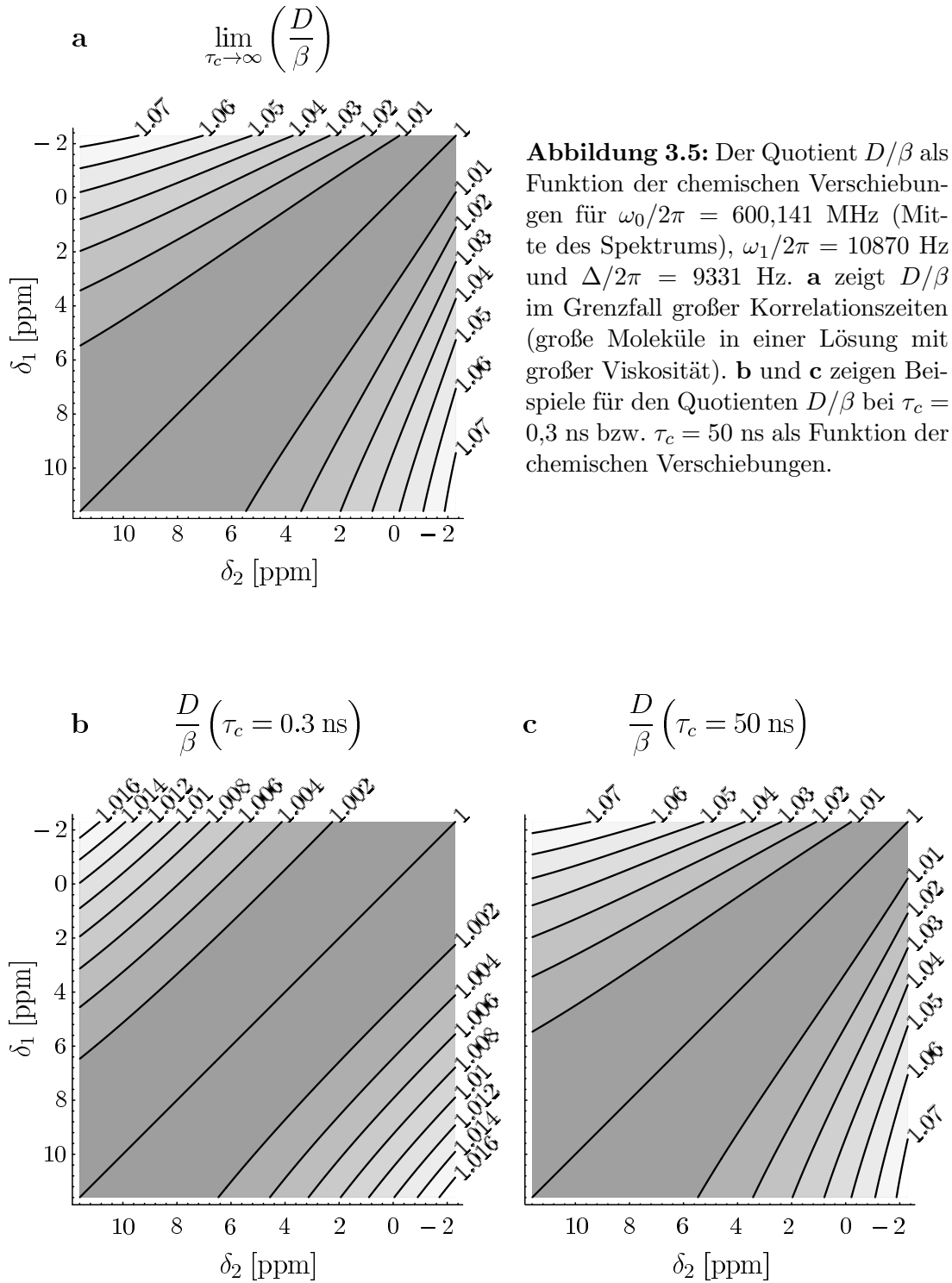
$$\frac{D}{\beta} = \sqrt{1 + \frac{9}{16}(s_1^2 - s_2^2)^2 \left[\frac{4\omega_0^4\tau_c^4 + 7\omega_0^2\tau_c^2}{4(c_1c_2 - 2s_1s_2)\omega_0^4\tau_c^4 - (c_1c_2 + 22s_1s_2)\omega_0^2\tau_c^2 - 5(c_1c_2 + s_1s_2)} \right]^2}. \quad (3.13)$$

Im Grenzfall großer Korrelationszeiten vereinfacht sich der Quotient zu

$$\lim_{\tau_c \rightarrow \infty} \left(\frac{D}{\beta} \right) = \sqrt{1 + \frac{9}{16} \cdot \left[\frac{s_1^2 - s_2^2}{c_1c_2 - 2s_1s_2} \right]^2}. \quad (3.14)$$

Abbildung 3.5 zeigt Höhenliniendiagramme für den Quotienten D/β mit festem ω_0 bei verschiedenen Werten von τ_c in Abhängigkeit von den chemischen Verschiebungen der beiden Kerne. Die Achsen sind die eines 2D Spektrums: δ_1 ist die zur Frequenzachse F_1 , δ_2 ist die zur Frequenzachse F_2 gehörende Achse der chemischen Verschiebungen. Wenn δ^1 die chemische Verschiebung des Kerns 1 und δ^2 die chemische Verschiebung des Kerns 2 bezeichnet, so gibt $D/\beta(\delta^1, \delta^2)$ den Quotienten für die Aufbaukurve des Kreuzpeaks an der Stelle $(\delta_2, \delta_1) = (\delta^1, \delta^2)$ an (Magnetisierungstransfer vom Kern 2 zum Kern 1), während $D/\beta(\delta^2, \delta^1)$ den Quotienten für die Aufbaukurve des Kreuzpeaks an der Stelle $(\delta_2, \delta_1) = (\delta^2, \delta^1)$ angibt (Magnetisierungstransfer vom Kern 1 zum Kern 2). Der Bereich für die chemischen Verschiebungen entspricht dem einer typischen Einstellung des Spektrometers bei der Aufnahme des Spektrums eines Proteins. Die Breite des Spektrums ist 13,886 ppm (8333,33 Hz bei $\omega_0/2\pi = 600,141$ MHz). Wenn $\omega_0/2\pi$ die Mitte des Spektrums bezeichnet, so ergibt sich ein Bereich von 11,59 ppm bis $-2,296$ ppm. Der Quotient D/β ist symmetrisch zur Diagonalen des Spektrums.

Die Abbildung 3.5-a zeigt das Höhenliniendiagramm des Quotienten D/β im Grenzfall großer Korrelationszeiten. Zur Diagonalen hin nähert sich der Quotient dem Wert 1, weil sich durch die Annäherung der chemischen Verschiebungen der beiden Kerne auch die Winkel Θ_1 und Θ_2 angleichen. Die Abweichung des Quotienten von 1 nimmt mit zunehmender Entfernung zur Diagonalen zu, aber



bleibt sehr klein (maximal 7 % für den Fall $\omega_1/2\pi = 10870$ Hz). Wenn ω_1 vergrößert wird, so muß nach Gleichung (2.14) auch Δ vergrößert werden, damit der Winkel Θ_i der gleiche bleibt. Wird Δ groß im Vergleich zur Differenz der Resonanzoffsets der beiden Kerne ($\Delta \gg |\Omega_1 - \Omega_2|$), so gleichen sich die Winkel Θ_1 und Θ_2 an, und im gesamten Spektrum wäre der Quotient D/β sehr nahe an 1 (Abweichung $\ll 7\%$). Für die Aufbaukurven der Kreuzpeaks gilt dann sehr gut die Näherung (3.11).

Die Betrachtungen des Quotienten D/β für Beispiele von endlichen Werten für τ_c sind in Abbildung 3.5-b und 3.5-c gezeigt. Während das Ergebnis für $\tau_c = 0,3$ ns in Abbildung 3.5-b zu sehen ist, zeigt Abbildung 3.5-c das Ergebnis für $\tau_c = 50$ ns. Für kleinere Korrelationszeiten liegt der Quotient D/β näher an 1 als bei größeren Korrelationszeiten. Je kleiner die Korrelationszeit, desto besser läßt sich die Aufbaukurve durch die Näherung (3.11) beschreiben.

3.4.1 Nullstellen der Aufbaukurven für ein isoliertes Zweispinsystem

Die Nullstellen der Aufbaukurven bei festem τ_{sl} für ein Zweispinsystem können aus den Gleichungen (3.9-a) und (3.9-b) berechnet werden. Sie werden in eine Form umgeschrieben, die den Vergleich mit der Nullstelle der linearen Näherung der Aufbaukurve ermöglicht

$$\left(\frac{\tau_m^0}{\tau_{sl}}\right)_{12}^{\mathbf{a/b}} = -\frac{\Gamma'_{12}}{\Gamma_{12}^{noe}} \cdot Q_{12}^{\mathbf{a/b}}. \quad (3.15)$$

Die Faktoren $Q_{12}^{\mathbf{a/b}}$ sind ein Maß für die Abweichung von den Ergebnissen für die Aufbaukurven in linearer Näherung

$$Q_{12}^{\mathbf{a}} = \frac{1}{2\beta\tau_{sl}} \ln \left[\frac{(\beta-D+T) \exp(-D\tau_{sl}) - (\beta+D+T) \exp(D\tau_{sl})}{(\beta-D-T) \exp(D\tau_{sl}) - (\beta+D-T) \exp(-D\tau_{sl})} \right] \quad (3.16-a)$$

$$Q_{12}^{\mathbf{b}} = \frac{1}{2\beta\tau_{sl}} \ln \left[\frac{2(\beta^2 - D^2 - T^2) - (\beta+D+T)(\beta+D-T) \exp(D\tau_{sl}) - (\beta-D+T)(\beta-D-T) \exp(-D\tau_{sl})}{2(\beta^2 - D^2 - T^2) - (\beta+D+T)(\beta+D-T) \exp(-D\tau_{sl}) - (\beta-D+T)(\beta-D-T) \exp(D\tau_{sl})} \right]. \quad (3.16-b)$$

Die Faktoren $Q_{12}^{\mathbf{a/b}}$ sind bei festem ω_0 Funktionen der Mischzeit τ_{sl} , der Korrelationszeit τ_c , des Abstands r_{12} und der Winkel Θ_1 und Θ_2 . Im Gegensatz dazu ist τ_m^0/τ_{sl} in linearer Näherung der Aufbaukurven keine Funktion des Abstands r_{12} . Im Grenzfall $(\Theta_1 - \Theta_2) \rightarrow 0$ ergeben die beiden Faktoren $Q_{12}^{\mathbf{a/b}}$ gerade den Wert 1, d. h. er Quotient τ_m^0/τ_{sl} in der Näherung des isolierten Zweispinsystems geht in den der linearen Näherung der Aufbaukurve über.

Abbildung 3.6 zeigt die Höhenliniendiagramme der Faktoren in Abhängigkeit von den chemischen Verschiebungen der beiden Kerne mit festen Werten für τ_{sl} , τ_c und r_{12} . Die Achsen sind wie bei Abbildung 3.5 die eines 2D Spektrums: $Q_{12}^{\mathbf{a/b}}(\delta^1, \delta^2) = Q_{12}^{\mathbf{a/b}}$ gibt die Faktoren für den Kreuzpeak an der Stelle $(\delta_2, \delta_1) = (\delta^1, \delta^2)$ im Spektrum an (Magnetisierungstransfer vom Kern 2 zum Kern 1), während $Q_{21}^{\mathbf{a/b}}(\delta^2, \delta^1) = Q_{21}^{\mathbf{a/b}}$ die Faktoren für den Kreuzpeak an der

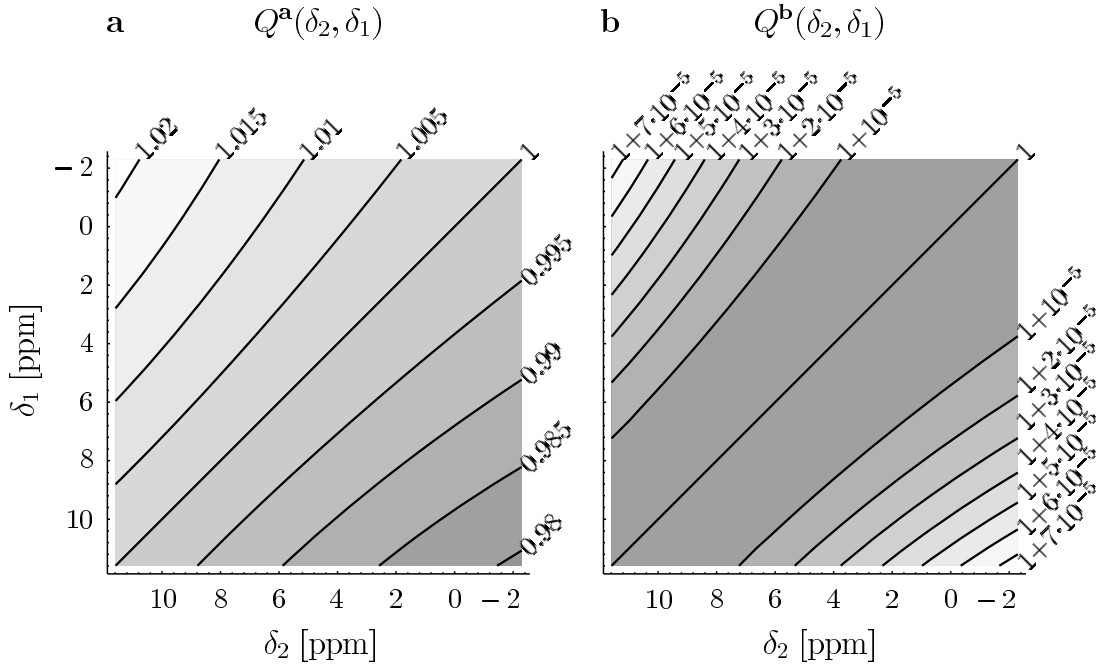


Abbildung 3.6: Berechnete Höhenliniendiagramme der Faktoren Q^a und Q^b in Abhängigkeit von den chemischen Verschiebungen der beiden Kerne, dessen Aufbaukurven der Kreuzpeaks betrachtet werden. Der Abstand der beiden Kerne beträgt 2 \AA , $\omega_0/2\pi = 600,141 \text{ MHz}$ (Mitte des Spektrums), $\omega_1/2\pi = 10870 \text{ Hz}$ und $\Delta/2\pi = 9331 \text{ Hz}$. Die Dauer des spin-locking ist $\tau_{sl} = 15 \text{ ms}$ und die Korrelationszeit beträgt 5 ns .

Stelle $(\delta_2, \delta_1) = (\delta^2, \delta^1)$ im Spektrum angibt (Magnetisierungstransfer vom Kern 1 zum Kern 2).

Die Abbildung 3.6-a zeigt, daß die Nullstellen der Aufbaukurven für Kreuzpeaks oberhalb und unterhalb der Diagonalen in unterschiedliche Richtungen von der Nullstelle in linearer Näherung abweichen. Die Nullstellen der Aufbaukurven für Kreuzpeaks oberhalb der Diagonalen sind zu größeren Werten, die Nullstellen der Aufbaukurven für Kreuzpeaks unterhalb der Diagonalen sind zu kleineren Werten verschoben. Für den aufgetragenen Fall ($\tau_c = 5 \text{ ns}$, $r_{12} = 2 \text{ \AA}$, $\tau_{sl} = 15 \text{ ms}$) liegen die Abweichungen in der Größenordnung 2% und sind damit sehr klein. Die Abbildung 3.6-b zeigt, daß im Gegensatz zum Faktor $Q^a(\delta_1, \delta_2)$ der Faktor $Q^b(\delta_1, \delta_2)$ symmetrisch zur Diagonalen des Spektrums ist. Die Abweichungen des Faktors $Q^b(\delta_1, \delta_2)$ von 1 sind um den Faktor 10^{-3} – 10^{-2} kleiner als die Abweichungen des Faktors $Q^a(\delta_1, \delta_2)$ von 1.

Das Ergebnis einer genaueren Untersuchung ist in Abbildung 3.7 gezeigt. Das Maximum und Minimum der Faktoren $Q^{a/b}$ auf einem bestimmten Bereich von δ_1 und δ_2 ist in Abhängigkeit vom Abstand r_{12} der Spins und der Korrelationszeit τ_c der Bewegung aufgetragen. In allen drei Höhenliniendiagrammen ist die Abweichung der Faktoren von 1 für kurze Abstände und lange Korrelationszeiten

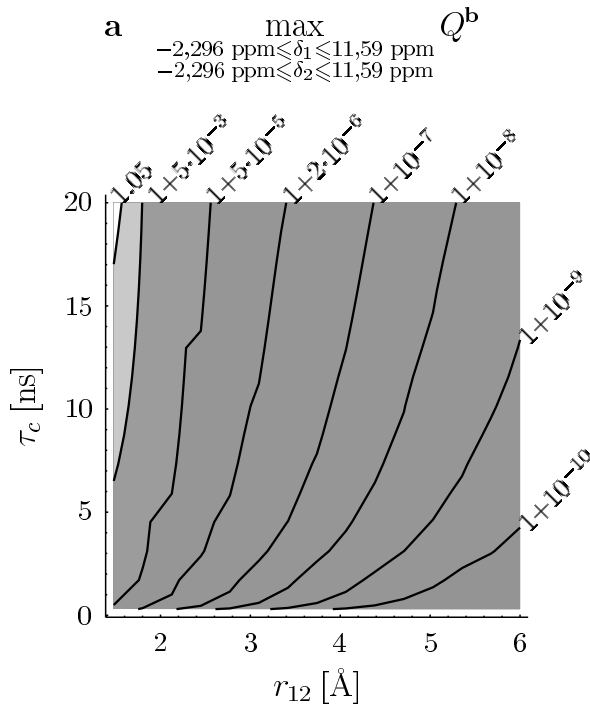
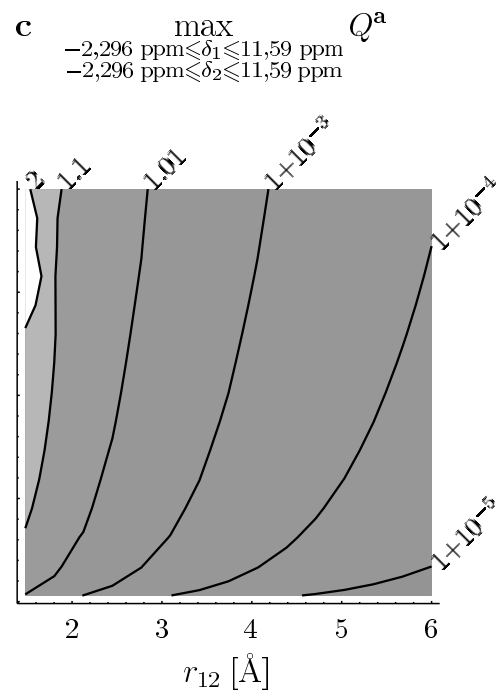
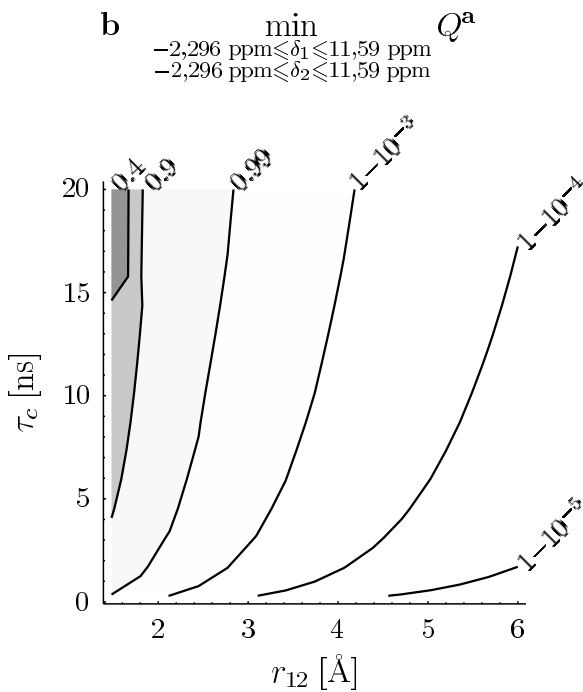


Abbildung 3.7: Höhenlinien-
 diagramme des Minimums und
 Maximums der Faktoren Q^a und
 Q^b auf einem bestimmten Bereich
 der chemischen Verschiebungen der
 beiden Kerne, deren Aufbaukurven
 der Kreuzpeaks betrachtet werden,
 als Funktion des Abstands r_{12} der
 beiden Kerne und der Korrelati-
 onszeit τ_c . Die Mitte des Spek-
 trums ist $\omega_0/2\pi = 600,141 \text{ MHz}$,
 $\omega_1/2\pi = 10870 \text{ Hz}$ und
 $\Delta/2\pi = 9331 \text{ Hz}$. **a** zeigt das
 Ergebnis für für Q^b , wobei das Mini-
 mum nicht aufgetragen wurden, da es
 auf 10^{-15} genau mit 1 übereinstimmt.
b und **c** zeigen die Ergebnisse für Q^a .



am größten. In diesem Bereich weichen die Aufbaukurven am stärksten von der linearen Näherung aus Gleichung (3.5) ab. Die Ergebnisse für das Experiment **a** sind in den Abbildungen 3.7-b und 3.7-c zu sehen. Die häufigsten Abstände zwischen zwei Protonen in einem Protein liegen in einem Bereich von $\gtrsim 1,7 \text{ \AA}$, die Korrelationszeiten in einem Bereich von $\lesssim 5 \text{ ns}$. In diesem Bereich sind die Abweichungen des Faktors $Q^{\mathbf{a}}$ von 1 in der Größenordnung 1%–10%. Für größere Abstände und kleinere Korrelationszeiten sind die Abweichungen in der Größenordnung 10^{-5} – 10^{-3} und damit sehr gering.

Die Abbildung 3.7-a zeigt das Ergebnis für das Experiment **b**. Die Abweichungen des Faktors $Q^{\mathbf{b}}$ von 1 sind um den Faktor 10^{-5} – 10^{-2} kleiner als bei Experiment **a**. Das Minimum für den Faktor $Q^{\mathbf{b}}$ in Abhängigkeit vom Abstand und der Korrelationszeit wurde nicht aufgetragen, weil es bis auf den Faktor 10^{-15} mit dem Wert 1 übereinstimmt.

3.4.2 Zusammenfassung der Untersuchungen zum isolierten Zweispinsystem

- Die Nullstelle der Aufbaukurve des Kreuzpeaks zweier Protonen 1 und 2, die ein isoliertes Zweispinsystem bilden, geht im Grenzfall $(\Theta_1 - \Theta_2) \rightarrow 0$ in die der linearen Näherung der Aufbaukurve des Kreuzpeaks der zwei Protonen in einem beliebigen Spinsystem über. Dies gilt für beide Experimente, **a** und **b**
- Für Korrelationszeiten, bei denen die Experimente sensitiv für die Messung von Korrelationszeitunterschieden in einem Protein sind ($\tau_c \lesssim 6 \text{ \AA}$), und bei Abständen der beiden Protonen von $\gtrsim 1,7 \text{ \AA}$ ist die Nullstelle für ein isoliertes Zweispinsystem sehr gut durch die Nullstelle der linearen Näherung in τ_{sl} und τ_m der Aufbaukurve für ein nicht isoliertes Zweispinsystem gegeben.
- Die Abweichung der Nullstelle für das isolierte Zweispinsystem von der der linearen Näherung ist bei Experiment **b** in dem interessanten Bereich für r_{12} und τ_c um den Faktor 10^{-3} kleiner als bei dem Experiment **a**.

Für die Praxis ergibt sich aus dieser Untersuchung, daß aus den Nullstellen der experimentell bestimmten Aufbaukurven der Kreuzpeaks von Protonenpaaren mit Gleichung (3.7) die Korrelationszeiten der Bewegung der Protonenpaare bestimmt werden können.

4 Messungen und Ergebnisse

Die in Kapitel 3 vorgestellten Experimente **a** und **b** eröffnen die Möglichkeit, die Korrelationszeit der Bewegung einzelner Spinpaare zu bestimmen. Die Experimente wurden an einer wässrigen Lösung des Proteins BPTI ausgeführt.

4.1 Messungen

4.1.1 Die Probe

Als Probe wurde eine 5 mM Lösung des Proteins BPTI in 90 % H₂O und 10 % D₂O bei einem pH-Wert von 4,5 verwendet.

BPTI ist ein globuläres (kugelförmiges) Protein (Molekulargewicht 6 kDa) mit einem Durchmesser von ca. 30 Å, das aus 58 Aminosäuren besteht. Es hemmt die Funktion von Trypsin und anderen Proteasen (Enzyme, die den Abbau von Proteinen katalysieren), indem es das aktive Zentrum der Proteasen blockiert [55]. Ein Bild der Struktur von BPTI befindet sich im Anhang A.

4.1.2 Aufnahme und Prozessierung der Spektren

Alle Messungen wurden an einem Bruker AMX 600 Spektrometer bei der Basisfrequenz von $\omega_0/2\pi = 600,141$ MHz (Zeeman-Feldstärke 14,1 T) ausgeführt. Der Probenkopf, der die Sende- und Empfangsspulen enthält, war ein kommerzieller Tripelresonanz-Probenkopf der Firma Bruker AG, Karlsruhe (¹H-, ¹³C-, ¹⁵N-Anregung; ¹H-Detektion; 5 mm Probendurchmesser).

In allen Experimenten betrug die Temperatur der Probe 310 K und die spektrale Breite in beiden Frequenzdimensionen 8333,33 Hz. Dies entspricht $\Delta t_1 = \Delta t_2 = 60 \mu\text{s}$ (Abschnitt 2.4.1). Es wurden die Pulssequenzen **a** und **b** aus Abbildung 3.1 verwendet, wobei für die nichtselektiven 90°-Pulse $\omega_1/2\pi = 10640$ Hz (**a**) bzw. 10870 Hz (**b**) gewählt wurde.

Zur Unterdrückung des starken Signals der Protonen des Wassers (um den Faktor 10⁵ größer als die interessierenden Proteinsignale) wurde die Pulssequenz um das WATERGATE-Schema (water suppression by gradient tailored excitation) ergänzt [46].

Jeder adiabatische Puls bestand aus 32 Teilpulsen mit gleichem $\omega_1/2\pi = 8065$ Hz (**a**) bzw. 10870 Hz (**b**) und der gleichen Dauer von 7 μs (**a**) bzw. 5,2 μs (**b**) [38]. Der Offset $\Delta/2\pi$ der Teilpulse beschrieb in der Zeit eine Tangensfunktion,

so daß sich der Winkel $\Theta_i(t)$, der von der z -Achse und dem effektiven Feld für den Kern i eingeschlossen wird, linear mit der Zeit änderte (Abschnitt 3.1). Der HF-Puls zum spin-locking sollte für die Mitte des Bereichs zwischen den NH und CH₂ Protonen im Spektrum ($\approx 7,3$ ppm) den Winkel zwischen dem effektiven Feld und der z -Achse auf $125,26^\circ$ einstellen, weil in diesem Bereich die ZQC optimal gedämpft werden sollten. Da $\Delta/2\pi$ nur in diskreten Schritten verändert werden kann, mußte ein Wert möglichst nahe dem Optimum ausgewählt werden.

Geplant war für Experiment **a** ein Wert von $\Delta/2\pi = 7666$ Hz, der dem spin-locking der Protonen mit der chemischen Verschiebung von $7,3$ ppm unter einem Winkel von $\Theta_i = 127,0^\circ$ entsprochen hätte. Aufgrund eines Fehlers im Pulsprogramm, das dem Spektrometer die gewünschte Abfolge und Eigenschaften der Pulse mitteilt, wurde jedoch tatsächlich ein Wert von $\Delta/2\pi = 6923$ Hz eingestellt. Dies entspricht dem spin-locking der obigen Protonen unter einem Winkel von $\Theta_i = 123,5^\circ$. Dies ist nur eine kleine Abweichung vom optimalen Wert für die Dämpfung der Nullquanten, so daß der Unterschied in dieser Hinsicht nicht bemerkt wurde. Für das Experiment **b** war $\Delta/2\pi = 9331$ Hz geplant. Dies hätte dem spin-locking der obigen Protonen unter einem Winkel von $\Theta_i = 125,4^\circ$ entsprochen. Für den ersten HF-Puls zum spin-locking wurde aufgrund des gleichen Fehlers im Pulsprogramm $\Delta/2\pi = 10332$ Hz und für den zweiten $\Delta/2\pi = 8414$ Hz eingestellt. Dies entspricht dem spin-locking der obigen Protonen während des ersten HF-Pulses unter einem Winkel von $\Theta_i = 128,8^\circ$ und während des zweiten HF-Pulses unter einem Winkel von $\Theta_i = 122,1^\circ$. Auch hier ist die Abweichung vom optimalen Wert für die Nullquantenkompensation so gering, daß dies nicht bemerkt wurde. Bei der Berechnung der Korrelationszeiten aus den Nullstellen der Aufbaukurven lassen sich die tatsächlich benutzten Werte ohne Probleme benutzen, so daß sich der Fehler im Pulsprogramm insgesamt nicht auswirkte.

Es wurden unterschiedliche Serien von Experimenten aufgenommen:

Experiment	τ_{sl} [ms]	τ_m [ms]								
a	20	0,	5,	10,	30,	40,	50			
	0		10,	20,	30,	40				
	10	0,		20,	30,	40				
	20	0,	10,		30,	40				
	30	0,	10,	20,		40				
	40	0,	10,	20,	30					
b	15	0,	2,	4,	6,	8,	10,	20,	24,	28

Die Mischzeiten, bei denen fast verschwindene Signalamplituden im Spektrum erwartet wurden, sind ausgelassen worden. Die Experimente in der ersten und letzten Zeile der Tabelle dienten zur Aufnahme von Aufbaukurven $a_{ij}(\tau_m, \tau_{sl})$ bzw. $a_{ij}(\frac{\tau_{sl}}{2}, \tau_m, \frac{\tau_{sl}}{2})$ mit festem τ_{sl} , die übrigen zur Aufnahme einer Aufbauoberfläche $a_{ij}(\tau_m, \tau_{sl})$.

Die experimentell gewonnenen Daten in der Zeitdomäne $S(t_1, t_2)$ wurden mit dem Programm UXNMR der Firma Bruker prozessiert. Hierzu zählen die Multiplikation der Daten in der Zeitdomäne mit einer Filterfunktion, die Fouriertransformation, um die 2D Spektren $S(F_1, F_2)$ zu erhalten, und die Korrektur der Basislinien.

4.1.3 Quantifizierung der Kreuzpeaks

Die Bestimmung der Aufbaukurven der Kreuzpeaks erfordert eine quantitative Bestimmung der Intensitäten der betrachteten Kreuzpeaks. Eine einfache Bestimmung der Kreuzpeakamplituden ist nur dann sinnvoll, wenn alle Kreuzpeaks die gleiche Linienform (Lorentz- oder Gaußlinienform) und Linienbreite besitzen. Genauer ist es, die Volumina der Kreuzpeaks auf eine der folgenden Arten zu bestimmen:

- durch Summation der Intensitäten aller Datenpunkte innerhalb vorher definierter Gebiete um die Kreuzpeaks. Das Problem hierbei ist die Wahl des Integrationsgebietes. In den üblichen Programmen zur Auswertung von Spektren steht nur die Möglichkeit zur Verfügung, ein rechteckiges Integrationsgebiet um den Kreuzpeak im 2D Spektrum zu legen. Da die Basislinie niemals vollständig glatt ist, können hier Fehler durch die Integration von Störungen in der Basislinie entstehen. Hinzu kommt, daß diese Methode sehr mühsam ist, wenn mehrere tausend Peaks integriert werden sollen.
- durch Multiplikation der Amplituden der Kreuzpeaks mit den Linienbreiten der Peaks in halber Höhe in F_2 - und F_1 -Richtung. Diese Methode hat den Nachteil, daß sie exakte Lorentz- oder Gaußlinien voraussetzt. Peaks mit kleiner Amplitude können aber durch überlagertes Rauschen von der idealen Peakform abweichen. Zusätzlich bereiten überlappende Peaks bei dieser Methode erhebliche Probleme.
- durch das Fitten der Kreuzpeaks an eine bestimmte vorgegebene Linienform. Dies ist eine sehr zeitaufwendige Methode und auch hier wird durch die Auswahl der Fitfunktion eine ideale Peakform vorgegeben, die in der Realität nicht vorliegen muß.

Aufgrund der Nachteile der oben beschriebenen Verfahren wurde deshalb das Programm AURELIA (automatic resonance line assignment), welches von Klaus-Peter Neidig et. al. entwickelt wurde [42], zur Integration der Kreuzpeaks benutzt. AURELIA verwendet eine optimierte Version [18, 19] einer Segmentationsmethode zusammen mit einem region-growing Algorithmus [20, 43]. Das Programm erkennt alle Datenpunkte, die zu einem gegebenen Kreuzpeak gehören, indem es die lokale Intensitätsdichte analysiert. Parallel dazu werden benachbarte Peaks betrachtet, so daß die Integration von überlappenden Peaks, deren Maxima noch getrennt sind, möglich ist. Die Segmentation kann durch die Wahl von zusätzlichen Parametern sehr fein abgestimmt werden. Anzugeben sind das relative

Niveau im Vergleich zur Peakamplitude, bis zu dem segmentiert werden soll (typischerweise das 0,5-fache der Amplitude), und die Anzahl der Iterationsschritte. Das Volumen eines Peaks ergibt sich aus der Summe der Intensitäten der Datenpunkte, die mit der Segmentation dem jeweiligen Peak zugeordnet wurden. Die Segmentationsmethode arbeitet vollautomatisch und ist sehr effizient. Die Integration mit der Segmentationsmethode wurde für isolierte Peaks mit der Integration der Peaks durch Aufsummation der Intensitäten auf einer rechteckigen Grundfläche verglichen. Es ergab sich eine hervorragende Übereinstimmung des Verlaufs der resultierenden Aufbaukurven, so daß zur Integration der Kreuzpeaks in den Spektren die Segmentationsmethode verwendet wurde. Eine Zusammenarbeit mit Klaus-Peter Neidig hat es ermöglicht, daß die Integrationsroutine die Volumina der Peaks mit ihrem Vorzeichen ausgibt, so daß eine Aufbaukurve der Volumina mit Vorzeichenwechsel als Funktion der Mischzeit erstellt werden kann.

4.1.4 Auswertung der Aufbaukurven

Die Liste der Volumina der Kreuzpeak, deren Aufbaukurve betrachtet werden soll, wurde von AURELIA erzeugt und mit zwei dafür entwickelten Programmen weiterverarbeitet:

sortau Dieses Programm sortiert die Volumina nach der Position der Protonenpaare in der Aminosäuresequenz des Proteins. Das Ziel ist es, die Aufbaukurven von Spinpaaren entlang der Sequenz der Aminosäuren miteinander zu vergleichen, um so Aussagen über die Beweglichkeit des Proteins in verschiedenen Bereichen zu bekommen.

Build.m Dies ist ein für das Programm Mathematica entwickeltes Paket, welches den Fit von Aufbaukurven und -oberflächen, die Berechnung der Korrelationszeiten (für das Bewegungsmodell der isotropen Rotation) und die Auftragung der Ergebnisse in Abhängigkeit von der Position der Spinpaare innerhalb der Aminosäuresequenz ermöglicht. Zusammen mit der Integrationsroutine von AURELIA können mit diesem Paket Aufbaukurven und -oberflächen sehr effizient bestimmt und ausgewertet werden. Eine vorgegebene Anzahl von Kreuzpeaks kann automatisch in verschiedenen Spektren integriert und die Ergebnisse von dem Paket **Build.m** ausgewertet werden. Für eine Analyse einer großen Menge von Kreuzpeaks ist es daher hervorragend geeignet.

Die Aufbaukurven für festes τ_{sl} in Abhängigkeit von τ_m werden durch ein quadratisches Polynom in τ_m gefittet [36]

$$a_{ij}^{fit}(\tau_m) = a + b\tau_m + c\tau_m^2, \quad (4.1)$$

so daß die Summe der quadratischen Abweichungen der Datenpunkte von der Fitfunktion ein Minimum annimmt. Für Aufbaukurven mit $\tau_{sl} = 0$ ms wird $a = 0$ verwendet.

Die Aufbauoberflächen in Abhängigkeit von τ_m und τ_{sl} werden durch ein quadratisches Polynom in τ_m und τ_{sl} mit der gleichen Methode gefittet

$$\alpha_{ij}^{fit}(\tau_m) = a\tau_m + b\tau_{sl} + c\tau_m\tau_{sl} + d\tau_m^2 + e\tau_{sl}^2. \quad (4.2)$$

Aus der Nullstelle der Aufbaukurve bzw. dem Verhältnis der linearen Koeffizienten von τ_m und τ_{sl} der Fitfunktion für die Aufbauoberfläche kann die Korrelationszeit des jeweiligen Spinpaares nach Gleichung (3.7) berechnet werden.

Über einen Fehler für die so gewonnene Korrelationszeit kann leider keine Aussage gemacht werden. Eine exakte Berechnung des Fehlers setzt die Kenntnis einer Verteilungsfunktion der Volumina voraus. Sind die Volumina gemäß einer Normalverteilung (Gaußverteilung) verteilt, so kann unter Einbeziehung der Standardabweichungen der Volumenwerte mit dem χ^2 -Fit die Standardabweichung der Fitparameter (in diesem Fall der Koeffizienten des Polynoms) gewonnen werden. Der χ^2 -Fit minimiert die Summe der quadratischen Abweichungen geteilt durch die Quadrate der Standardabweichungen (Varianzen) der Meßpunkte. Die Aufnahme einer Verteilungsfunktion für das Volumen eines Kreuzpeaks erfordert viel Meßzeit, so daß dies in der Praxis zu aufwendig ist. Hinzu kommt, daß nicht sicher ist, ob die Verteilungsfunktion einer Normalverteilung entspricht. Wenn sie dies nicht tut, müßte mit Hilfe von Simulationen bestimmt werden, welche Bedeutung die mit dem χ^2 -Fit bestimmten Fehler der Fitparameter haben [47].

4.1.5 Die untersuchten Kreuzpeaks

Es wurden die Aufbaukurven und -oberflächen für Kreuzpeaks zwischen NH Protonen und C_α H Protonen betrachtet, die sich in jeweils sequentiell benachbarten Aminosäuren befinden (Anhang A). Diese Protonen eignen sich zur Untersuchung der Dynamik des Rückgrates eines Proteins. Da die Messung aber für beliebige Protonenpaare geeignet ist, kann sie auch für Untersuchungen in den Seitenketten der Aminosäuren verwendet werden. Abbildung 4.1 zeigt den *Fingerabdruckbereich* eines NOESY-Spektrums von BPTI ($\tau_m = 40$ ms). Die Kreuzpeaks, deren Aufbaukurven und -oberflächen im folgenden betrachtet werden, sind mit den Namen der beiden zugehörigen Protonen benannt. Die Zuordnung erfolgte mit Hilfe von [56]. Die NH Protonen besaßen chemischen Verschiebungen von 6,6–10,6 ppm, die C_α H Protonen von 3,6–5,7 ppm. Wenn Mischzeiten um 100 ms verwendet werden, ergeben sich im Spektrum Kreuzpeaks zwischen Protonen, deren Abstand nicht größer als 5 Å ist. Die Mischzeiten, die für die Bestimmung der Aufbaukurven und -oberflächen benutzt wurden, liegen dagegen bei 0–50 ms, so daß einige Kreuzpeaks nicht zu sehen sind. Dies gilt z. B. für die Kreuzpeaks zwischen den NH und C_α H Protonen in der α -Helix von BPTI. Ihr Abstand beträgt 3,5 Å und ist damit größer als der in einem β -Faltblatt (2,2 Å) [59]. Die Abstände dieser Protonen in den übrigen Bereichen ist meist auch größer als in einem β -Faltblatt, so daß von den zugehörigen Kreuzpeaks nicht alle im Spektrum zu sehen sind.

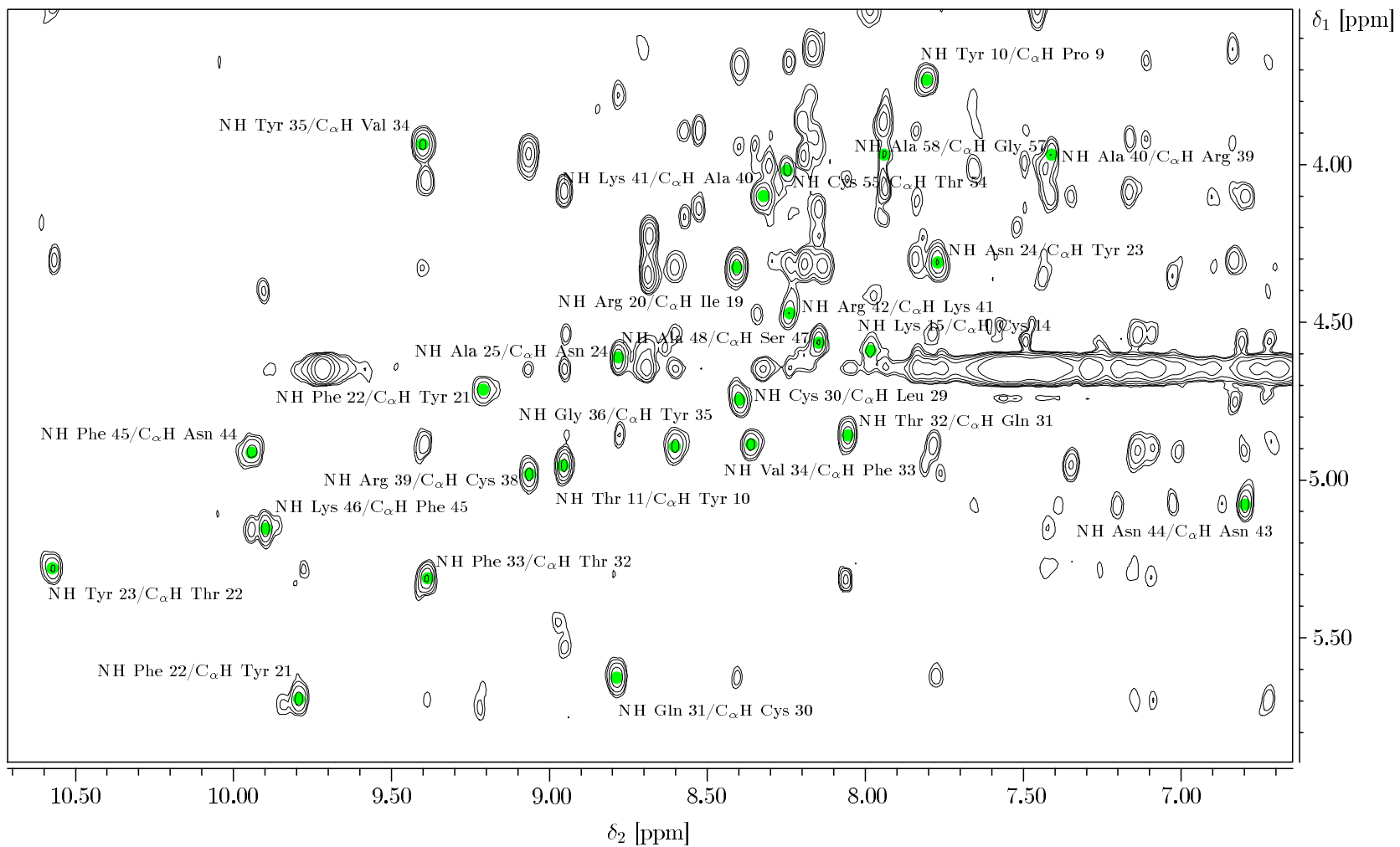


Abbildung 4.1: Fingerabdruckbereich eines NOESY-Spektrums ($\tau_m = 40$ ms) von BPTI

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Aufbauoberflächen

Grundlage für die Bestimmung der Aufbauoberflächen der Kreuzpeaks ist die Serie von 20 Experimenten, während der sowohl τ_m als auch τ_{sl} variiert wurden (Abschnitt 4.1.2). Die Aufbauoberfläche ergibt sich durch einen quadratischen Fit der gemessenen Volumina in τ_m und τ_{sl} . Die Tabelle 4.1 zeigt die gefitteten Koeffizienten des quadratischen Polynoms für die jeweiligen Kreuzpeaks. Das Volumen der Kreuzpeaks ist die Summe der Intensitäten der Datenpunkte, die zu einem Peak gehören. Die Intensitäten selber sind vom Spektrometer skaliert, so daß sie als einheitenlos angenommen werden. Um die Terme linearer und quadratischer Ordnung miteinander vergleichen zu können, werden als Beispiel die Mischzeiten τ_m und τ_{sl} als 10 ms angenommen. Beim Einsetzen in die Fitfunktionen ergibt sich, daß die Terme quadratischer Ordnung um den Faktor 10 kleiner sind als die Terme linearer Ordnung. Dies bestätigt, daß die Aufbauoberfläche bei Mischzeiten bis zu 10–20 ms gut durch die lineare Näherung gegeben ist. Die Abbildungen 4.2 und 4.3 zeigen einige Beispiele für gefittete Aufbauoberflächen. Die Höhenliniendiagramme sind auf das maximale Peakvolumen im jeweiligen Diagramm normiert. Im Idealfall, wenn die Aufbauoberflächen tatsächlich durch eine in τ_m und τ_{sl} lineare Funktion gegeben sind, ergeben sich Ebenen, welche die τ_m - τ_{sl} -Ebene in Ursprungsgeraden schneiden. Die beiden Abbildungen verdeutlichen anschaulich die Tatsache, daß die quadratischen Terme in den Aufbauoberflächen um eine Größenordnung kleiner sind als die linearen. Die Schnittkurven der Oberflächen mit der τ_m - τ_{sl} -Ebene sind in guter Näherung durch Ursprungsgeraden gegeben.

Während Aufbaukurven zu festem τ_{sl} Schnitte parallel zur τ_m -Achse durch die Aufbauoberflächen sind, ergeben sich Aufbaukurven zu festem τ_m als Schnitte parallel zur τ_{sl} -Achse. Die Aufbaukurven in τ_{sl} für $\tau_m = 0$ ms sind O-ROESY-Aufbaukurven. Sie können dazu verwendet werden, abzuschätzen, welche Werte für τ_{sl} bei Aufbaukurven in τ_m noch klein genug sind, um in τ_{sl} von einer linearen Näherung auszugehen. Die Abbildung 4.4 zeigt solche Aufbaukurven in τ_{sl} mit $\tau_m = 0$ ms. Diese Aufbaukurven sind auf das Maximum bzw. Minimum der Peakvolumen aller Kreuzpeaks der vier gezeigten Aufbaukurven normiert. Es läßt sich erkennen, daß die Aufbaukurven in τ_{sl} bis zu einer Mischzeit von 10–20 ms gut durch die lineare Näherung gegeben sind. Die Wahl der Werte von τ_{sl} für die Aufbaukurven in τ_m aus diesem Bereich ist erforderlich, damit zum einen in τ_{sl} die lineare Näherung noch gültig ist und zum anderen die Mischzeit τ_{sl} möglichst groß ist, um ein genügendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis im Spektrum zu erhalten.

4.2.2 Aufbaukurven für die Experimente a und b

Mit Hilfe der Experimente **a** und **b** wurden die Aufbaukurven der Kreuzpeaks bestimmt. Das Experiment **a** wurde mit $\tau_{sl} = 20$ ms und das Experiment **b** mit

Fitfunktion: $\alpha_{ij}^{fit}(\tau_m, \tau_{sl}) = a\tau_m + b\tau_{sl} + c\tau_m\tau_{sl} + d\tau_m^2 + e\tau_{sl}^2$					
Kreuzpeak	a [ms ⁻¹]	b [ms ⁻¹]	c [(ms) ⁻²]	d [(ms) ⁻²]	e [(ms) ⁻²]
NH Tyr 10/C _α H Pro 9	3,0 · 10 ⁵	-2,8 · 10 ⁵	-3,0 · 10 ³	-7,6 · 10 ²	3,1 · 10 ³
NH Thr 11/C _α H Tyr 10	3,9 · 10 ⁵	-4,0 · 10 ⁵	-3,2 · 10 ³	-1,7 · 10 ³	3,7 · 10 ³
NH Lys 15/C _α H Cys 14	1,4 · 10 ⁵	-1,5 · 10 ⁵	-1,4 · 10 ³	-7,7 · 10 ²	1,9 · 10 ³
NH Arg 20/C _α H Ile 19	5,8 · 10 ⁵	-5,5 · 10 ⁵	-5,6 · 10 ³	-1,9 · 10 ³	6,1 · 10 ³
NH Tyr 21/C _α H Arg 20	1,7 · 10 ⁵	-2,1 · 10 ⁵	-2,3 · 10 ³	-2,0 · 10 ²	2,9 · 10 ³
NH Phe 22/C _α H Tyr 21	2,6 · 10 ⁵	-2,9 · 10 ⁵	-2,4 · 10 ³	-1,4 · 10 ³	3,2 · 10 ³
NH Tyr 23/C _α H Thr 22	2,0 · 10 ⁵	-2,4 · 10 ⁵	-2,4 · 10 ³	-8,7 · 10 ²	3,1 · 10 ³
NH Asn 24/C _α H Tyr 23	4,2 · 10 ⁵	-4,2 · 10 ⁵	-3,5 · 10 ³	-1,7 · 10 ³	5,0 · 10 ³
NH Ala 25/C _α H Asn 24	2,8 · 10 ⁵	-3,6 · 10 ⁵	-1,8 · 10 ³	-1,1 · 10 ³	3,6 · 10 ³
NH Cys 30/C _α H Leu 29	2,5 · 10 ⁵	-2,1 · 10 ⁵	-3,4 · 10 ³	3,5 · 10 ²	2,0 · 10 ³
NH Gln 31/C _α H Cys 30	3,5 · 10 ⁵	-3,9 · 10 ⁵	-3,6 · 10 ³	-1,0 · 10 ³	4,3 · 10 ³
NH Thr 32/C _α H Gln 31	2,6 · 10 ⁵	-2,3 · 10 ⁵	-2,1 · 10 ³	-8,0 · 10 ²	1,6 · 10 ³
NH Phe 33/C _α H Thr 32	3,7 · 10 ⁵	-4,0 · 10 ⁵	-3,0 · 10 ³	-1,6 · 10 ³	4,6 · 10 ³
NH Val 34/C _α H Phe 33	2,4 · 10 ⁵	-2,5 · 10 ⁵	-1,8 · 10 ³	-1,0 · 10 ³	2,7 · 10 ³
NH Tyr 35/C _α H Val 34	4,4 · 10 ⁵	-4,5 · 10 ⁵	-4,5 · 10 ³	-1,5 · 10 ³	5,1 · 10 ³
NH Gly 36/C _α H Tyr 35	2,6 · 10 ⁵	-2,8 · 10 ⁵	-2,4 · 10 ³	-1,2 · 10 ³	3,6 · 10 ³
NH Arg 39/C _α H Cys 38	2,4 · 10 ⁵	-2,3 · 10 ⁵	-2,5 · 10 ³	-1,2 · 10 ³	-2,4 · 10 ³
NH Ala 40/C _α H Arg 39	1,6 · 10 ⁵	-1,6 · 10 ⁵	-1,8 · 10 ³	-1,7 · 10 ²	2,4 · 10 ³
NH Lys 41/C _α H Ala 40	3,9 · 10 ⁵	-3,8 · 10 ⁵	-4,0 · 10 ³	-1,5 · 10 ³	4,4 · 10 ³
NH Arg 42/C _α H Lys 41	2,1 · 10 ⁵	-1,9 · 10 ⁵	-1,9 · 10 ³	-1,2 · 10 ³	1,9 · 10 ³
NH Asn 44/C _α H Asn 43	2,7 · 10 ⁵	-2,0 · 10 ⁵	-2,3 · 10 ³	-1,5 · 10 ³	1,4 · 10 ³
NH Phe 45/C _α H Asn 44	3,3 · 10 ⁵	-3,4 · 10 ⁵	-3,2 · 10 ³	3,7 · 10 ³	-1,9 · 10 ³
NH Lys 46/C _α H Phe 45	2,2 · 10 ⁵	-3,0 · 10 ⁵	-2,0 · 10 ³	-5,2 · 10 ²	3,6 · 10 ³
NH Ala 48/C _α H Ser 47	3,0 · 10 ⁵	-2,8 · 10 ⁵	-2,7 · 10 ³	-1,3 · 10 ³	2,9 · 10 ³
NH Cys 55/C _α H Thr 54	7,8 · 10 ⁴	-8,8 · 10 ⁴	-5,7 · 10 ²	4,0 · 10 ²	7,8 · 10 ²
NH Ala 58/C _α H Gly 57	1,2 · 10 ⁵	-7,6 · 10 ⁴	-7,6 · 10 ²	-9,1 · 10 ²	3,6 · 10 ²

Tabelle 4.1: Koeffizienten der quadratischen Fits der Aufbauoberflächen in τ_m und τ_{sl} , die mit dem Experiment **a** aufgenommen wurden.

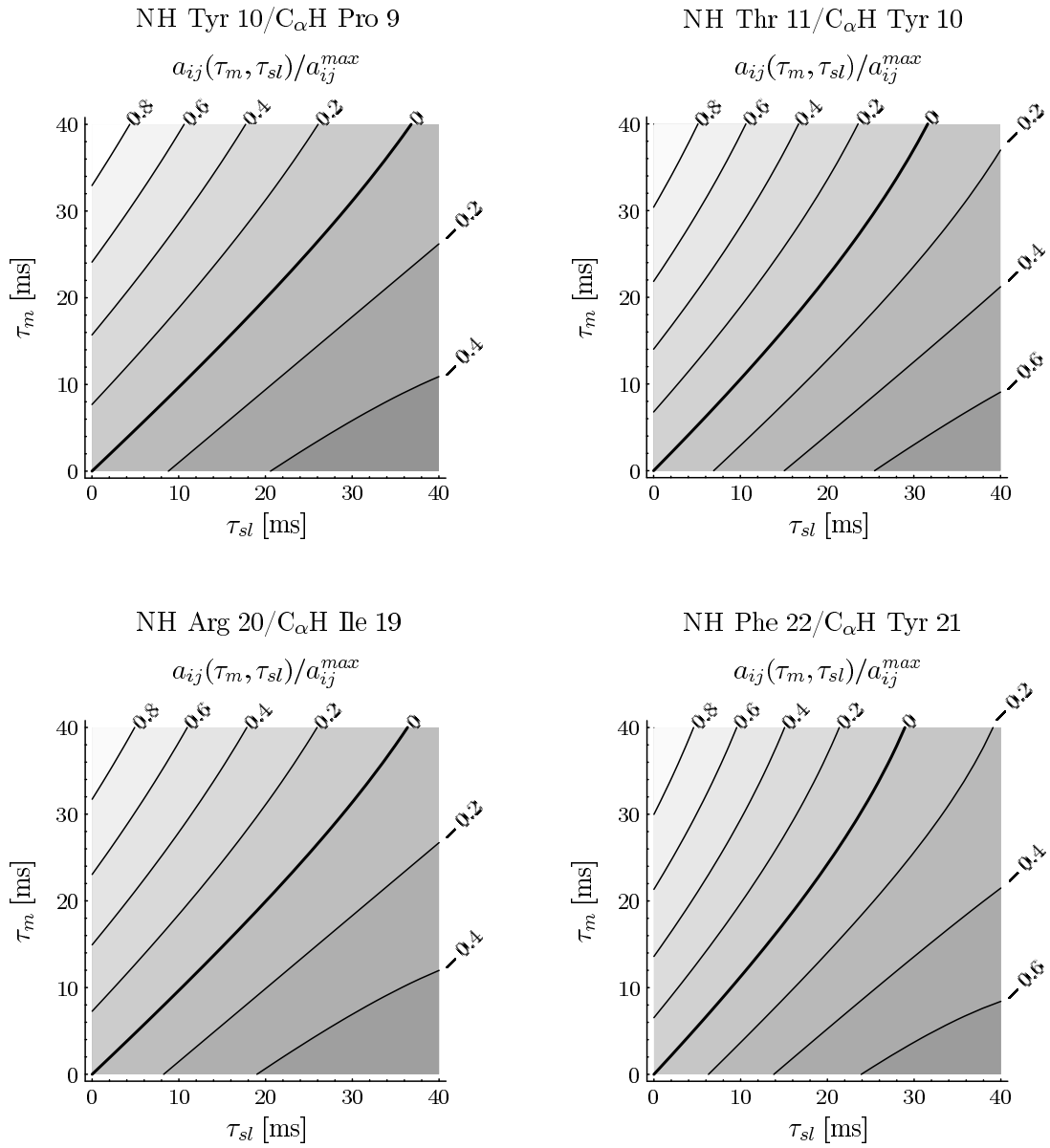


Abbildung 4.2: Höhenliniendiagramme von den Aufbauoberflächen einiger Kreuzpeaks. Die Diagramme sind jeweils auf das maximale bzw. minimale Peakvolumen im Diagramm normiert. Die Aufbauoberflächen wurden mit dem Experiment **a** aufgenommen.

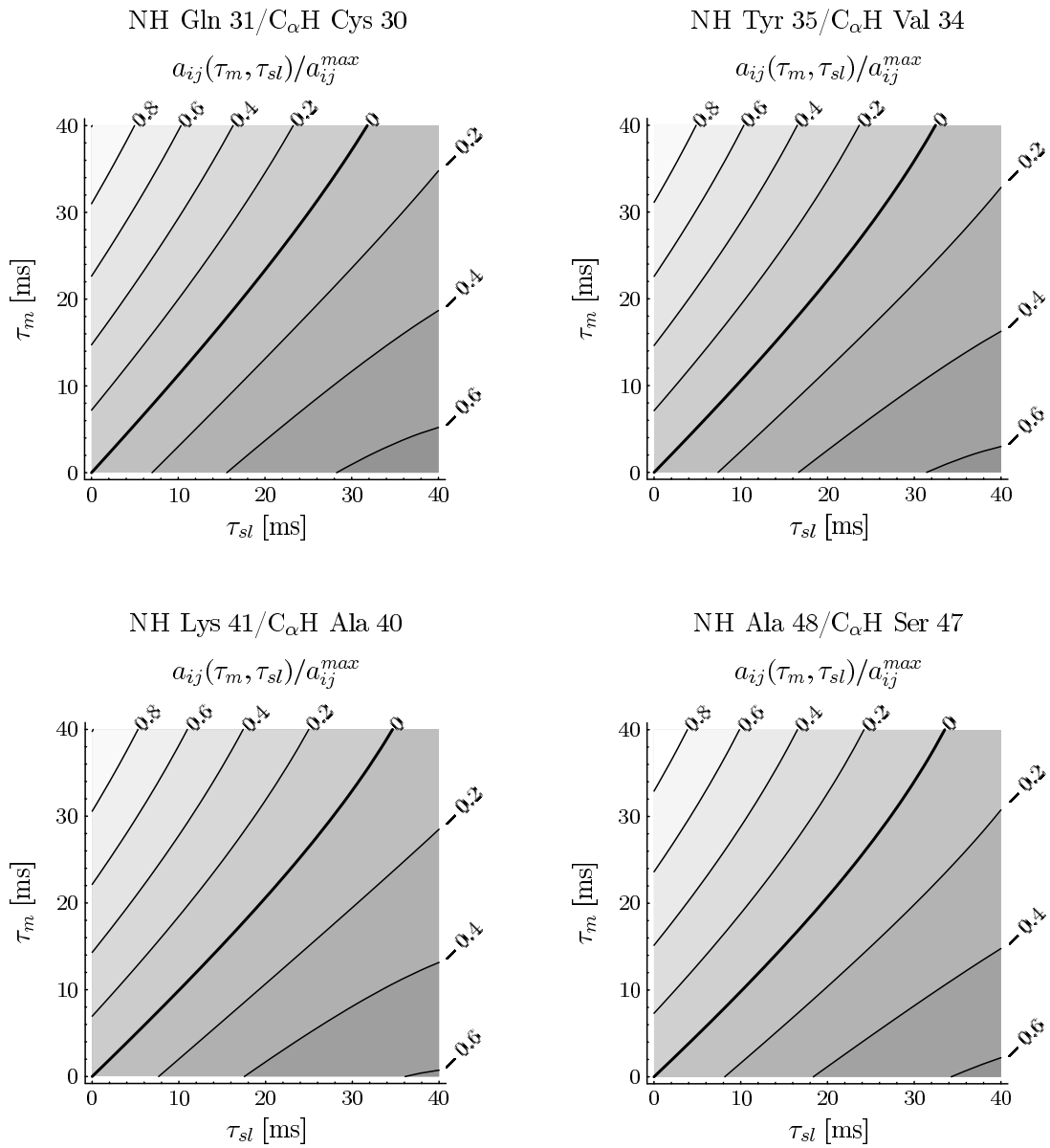


Abbildung 4.3: Weitere Höhenliniendiagramme von Aufbauoberflächen

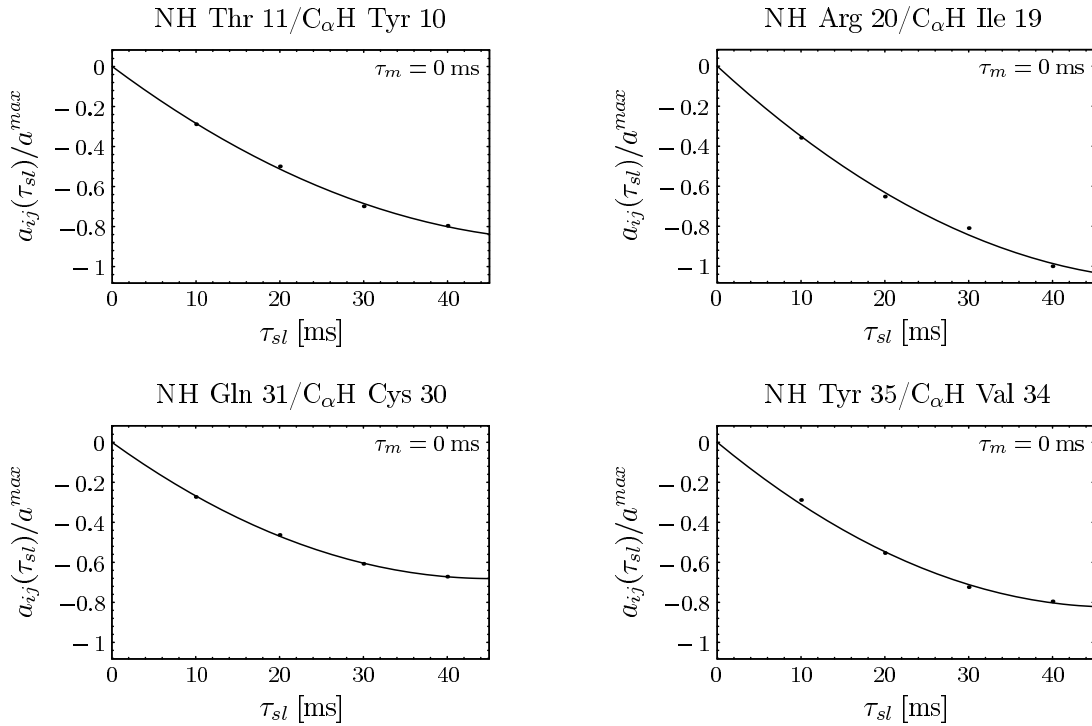
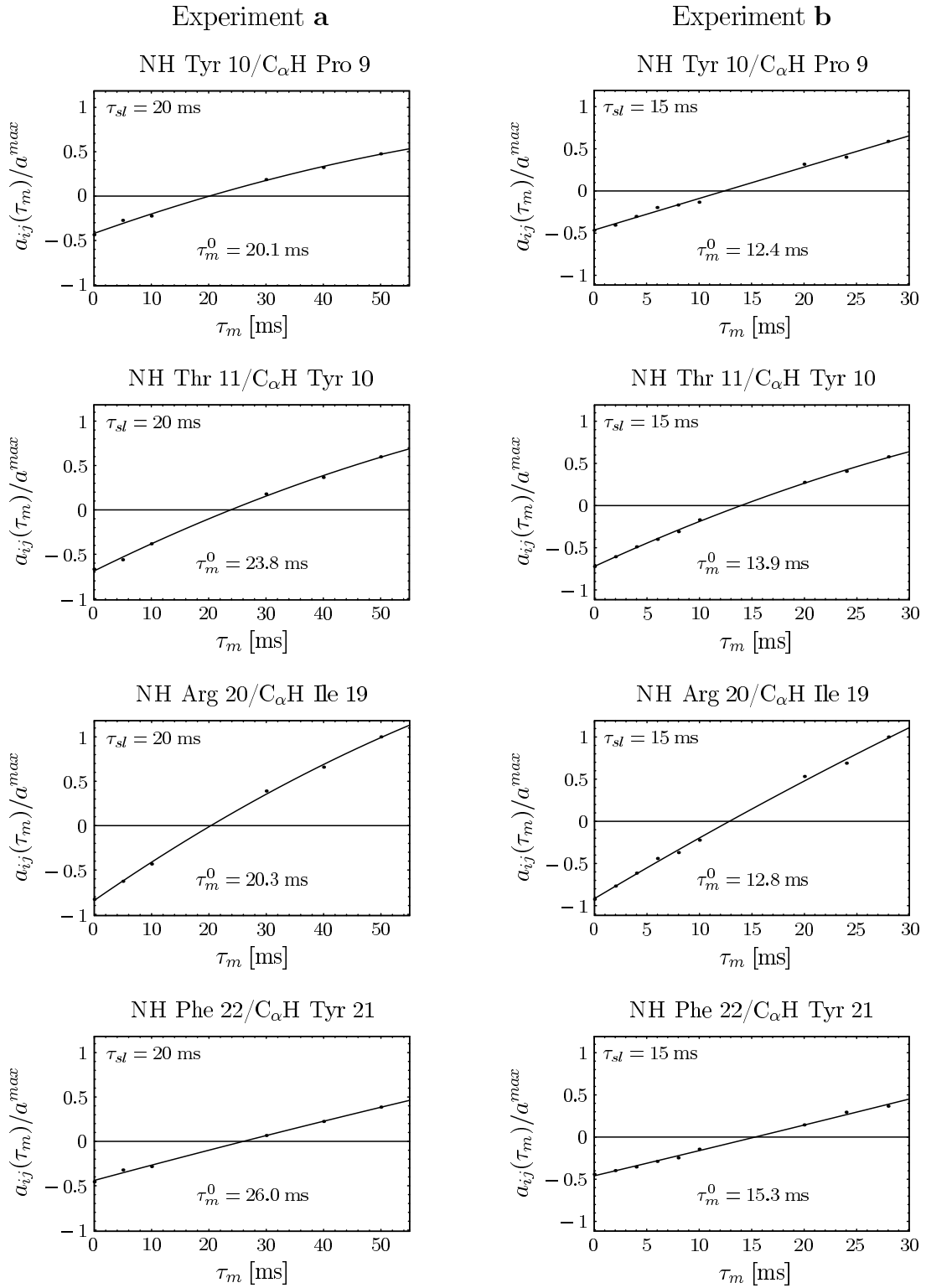


Abbildung 4.4: Aufbaukurven einiger Kreuzpeaks als Funktion von τ_{sl} bei $\tau_m = 0$ ms. Die Aufbaukurven wurden mit Experiment **a** aufgenommen.

$\tau_{sl} = 15$ ms ausgeführt. Die Einstellung der HF-Felder wurde in Abschnitt 4.1.2 beschrieben. Während beim Experiment **b** 6 Punkte für die Aufbaukurve eines Kreuzpeaks aufgenommen wurden, waren es beim Experiment **a** 9 Punkte. Einige ausgewählte Aufbaukurven von Kreuzpeaks sind in Abbildung 4.5 und 4.6 zu sehen. Das Protein BPTI besitzt eine α -Helix und zwei β -Faltblätter, die von verbundenen Regionen unterbrochen sind (Anhang A). Die meisten ausgewerteten Kreuzpeaks stammen von Protonenpaaren in den beiden β -Faltblättern, weil hier der Abstand der NH und C $_{\alpha}$ H Protonen kleiner als in den anderen Bereichen ist (intensivere Signale). Die Aufbaukurven sind für jedes Experiment auf das maximale bzw. minimale Peakvolumen aller Kreuzpeaks, die gezeigt werden, normiert. Insgesamt verlaufen alle Aufbaukurven nahezu linear. Die Nullstellen der Aufbaukurven für das Experiment **a** sind bei größeren Werten als für das Experiment **b**, weil für **b** eine kleinere Mischzeit τ_{sl} gewählt wurde. Es wird deutlich, daß die Wahl der kleineren Mischzeit τ_{sl} im Experiment **b** Probleme bereitet. Die Punkte der Messungen streuen stärker um die Fitfunktion als beim Experiment **a**, bei dem eine größere Mischzeit benutzt wurde. Dies ist auf die kleineren Peakhöhen im Spektrum zurückzuführen.

Abbildung 4.5: Aufbaukurven einiger Kreuzpeaks für die Experimente **a** und **b**

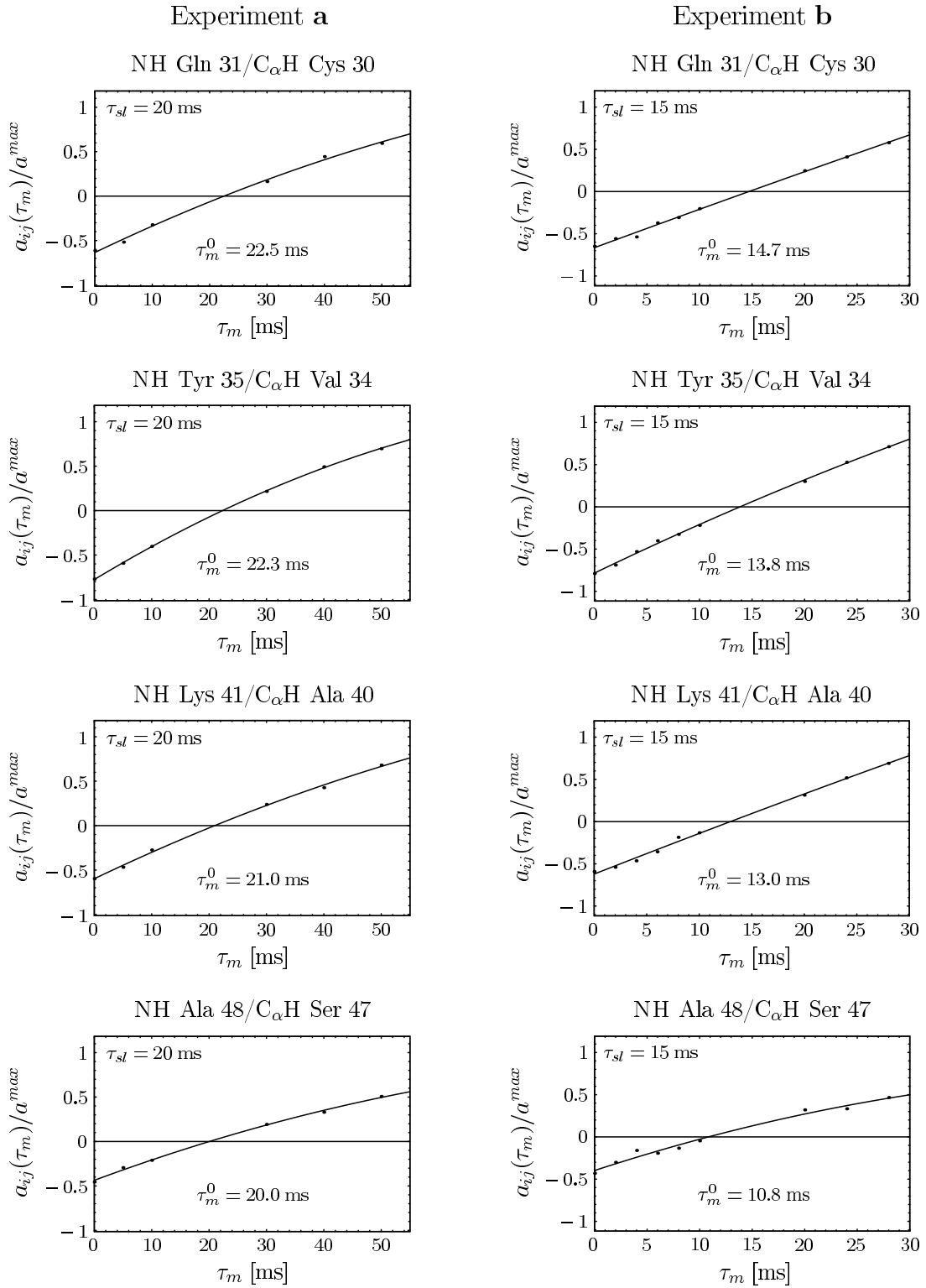


Abbildung 4.6: Weitere Aufbaukurven

4.2.3 Nullstellen und Korrelationszeiten

Aus den gefitteten Funktionen für die Aufbaukurven und -oberflächen wurden die Nullstellen der Aufbaukurven bzw. die Koeffizienten der linearen Terme in τ_m und τ_{sl} bestimmt. Für jedes Protonenpaar läßt sich τ_m^0/τ_{sl} im Modell der isotropen Rotation bei festem Abstand im Grenzfall großer Korrelationszeiten nach Gleichung (3.8) berechnen. Die Abbildung 4.7-a zeigt das Ergebnis dieser Rechnungen für die beiden Experimente **a** und **b** für die betrachteten Protonenpaare. Auf der Abzisse ist die Position i der Aminosäure abgetragen, die das $C_\alpha H$ des betrachteten Protonenpaares enthält. Da i eine Numerierung ist, haben die Verbindungslinien zwischen den Punkten keine andere Bedeutung als ihre Verfolgung zu erleichtern. Die Werte für τ_m^0/τ_{sl} im Grenzfall großer Korrelationszeiten sind nicht für alle Protonenpaare die gleichen, da die chemischen Verschiebungen der Protonen in die Berechnung der Winkel Θ_i eingehen. Der Wert von 1 entspräche genau einem spin-locking der beiden Protonen unter einem Winkel von $125,26^\circ$. Die beiden Kurven sind nicht identisch. Dies liegt an der unterschiedlichen Wahl von Δ und ω_1 in beiden Experimenten. Die berechneten Grenzfälle der Quotienten τ_m^0/τ_{sl} für große Korrelationszeiten stellen im Modell der isotropen Rotation mit festem Abstand einen unteren Grenzwert der Werte von τ_m^0/τ_{sl} bei endlichen Korrelationszeiten dar (Abschnitt 3.3.1, Abbildung 3.2).

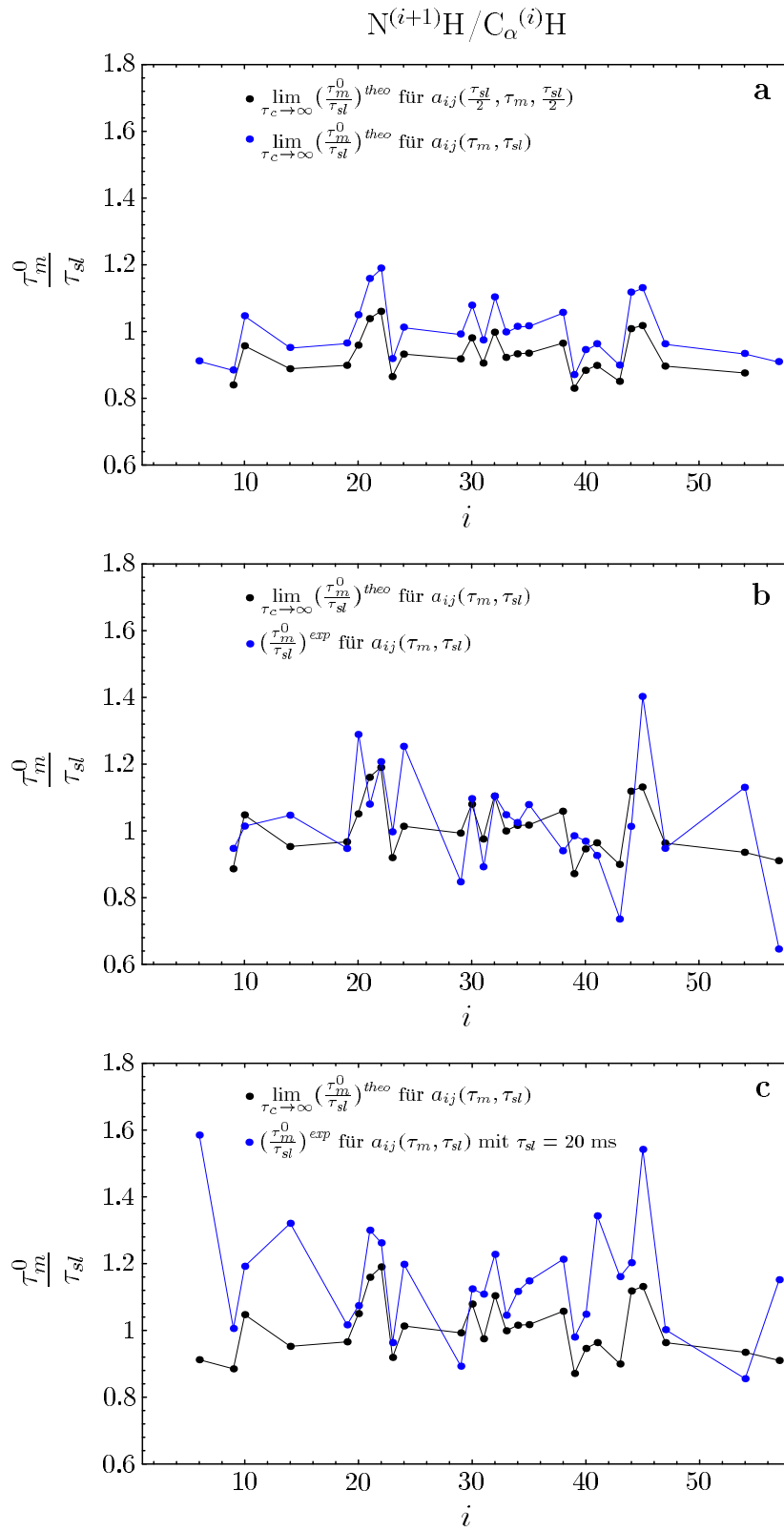
Für die Aufbauoberflächen wurde τ_m^0/τ_{sl} aus den linearen Koeffizienten in τ_m und τ_{sl} der Fitfunktion bestimmt, Gleichung (3.6). Der Vergleich mit den berechneten Werten für große Korrelationszeiten ist in Abbildung 4.7-b zu sehen. Die experimentell bestimmten Werte müßten eigentlich immer größer als die berechneten Werte sein. Tatsächlich trifft dies jedoch nicht für alle Protonenpaare zu, so daß in diesen Fällen, keine Korrelationszeiten berechnet werden können, weil das Modell der isotropen Rotation keine experimentellen Werte dieser Art zuläßt.

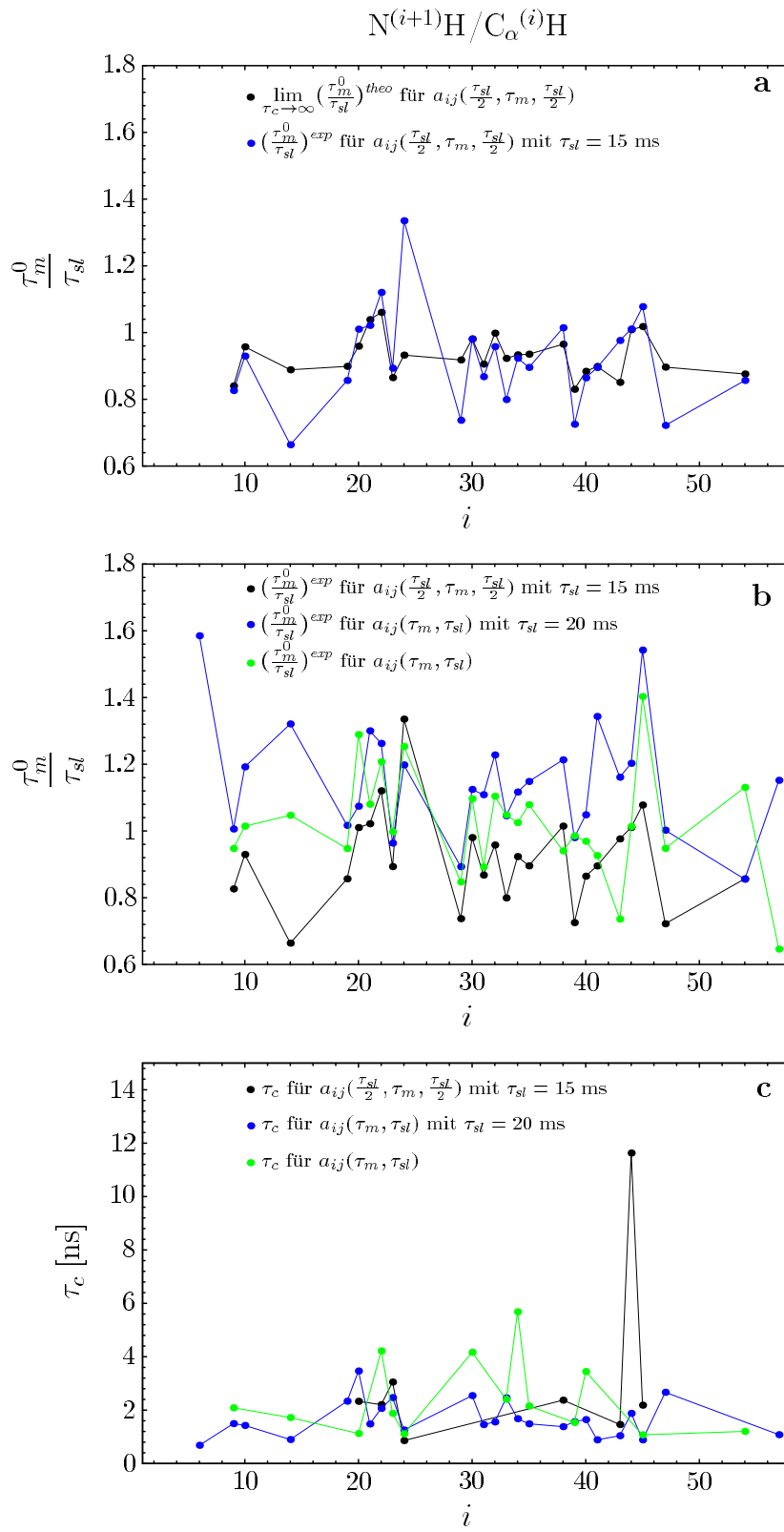
Aus den Nullstellen der Aufbaukurven für $\tau_{sl} = 20$ ms, die mit Experiment **a** gemessen wurden, ergeben sich die in Diagramm 4.7-c aufgetragenen Werte für τ_m^0/τ_{sl} . Auch hier fallen einige gemessene Punkte unter die für den Grenzfall großer Korrelationszeiten berechneten. Allerdings sind es in diesem Fall, im Gegensatz zum vorigen, nur wenige Punkte, für die sich kein τ_c berechnen läßt.

Das Ergebnis für die Aufbaukurven mit $\tau_{sl} = 15$ ms, die mit Experiment **b** gemessen wurden, ist in Abbildung 4.8-a gezeigt. In diesem Fall liegen die experimentell bestimmten Werte nahe den berechneten, aber zum großen Teil darunter, so daß in diesem Fall die Berechnung von τ_c nur für wenige Punkte möglich ist.

Die Abbildung 4.8-b zeigt einen Vergleich der gemessenen Werte für τ_m^0/τ_{sl} zwischen den drei oben einzeln besprochenen Experimenten. Deutlich zu erkennen ist, daß die Kurven für die beiden Aufbaukurven mit $\tau_{sl} = 20$ ms bzw. 15 ms im Bereich $i \geq 19$ annähernd parallel verlaufen, während dies für die Kurve der Werte aus den Aufbauoberflächen nur eingeschränkt gilt.

Als letztes wurden für die Werte von τ_m^0/τ_{sl} , für die es möglich war, die Korre-

Abbildung 4.7: Ergebnisse für τ_m^0/τ_{sl}

Abbildung 4.8: Ergebnisse für τ_m^0/τ_{sl} und τ_c

lationszeiten für die Bewegung der Abstandsvektoren der Protonenpaare berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.8-c zu sehen. Die Korrelationszeiten, die berechnet werden konnten, liegen mit einer Ausnahme alle in dem Bereich von 1–5 ns. Dies stimmt mit dem Bereich überein, in dem die Messung sensitiv ist.

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Kreuzpeaks der Protonen in β -Faltblättern

In Abschnitt 4.2 wurde ausgeführt, daß die Korrelationszeiten für einige Spinpaare nicht berechnet werden konnten, weil der experimentell bestimmte Wert für τ_m^0/τ_{sl} kleiner ist als der theoretische im Grenzfall großer Korrelationszeiten. Das Protein BPTI besitzt eine β -Faltblattstruktur sowohl zwischen den Aminosäuren an den Positionen 16 und 25 der Aminosäurekette als auch zwischen den Aminosäuren an den Positionen 28 und 36 der Aminosäurekette. Dies bedeutet, daß die Protonenpaare, die zu den gemessenen Kreuzpeaks gehören, von dem Kreuzpeak NH Arg 20/ C_α H Ile 19 bis zu dem Kreuzpeak NH Gly 36/ C_α H Tyr 35 in β -Faltblättern liegen. In den Abbildungen 4.7 und 4.8 gelten die Werte $19 \leq i \leq 36$ für die β -Faltblätter. In diesem Bereich verlaufen die drei Kurven für die Quotienten τ_m^0/τ_{sl} tatsächlich annähernd parallel (Abbildung 4.8-b), und hier konnten auch die meisten Korrelationszeiten berechnet werden (Abbildung 4.8-c). Die β -Faltblattstruktur ist eine in sich sehr starre Konformation. Diese Protonen führen nur die Bewegung des ganzen Moleküls aus, welche durch die Brownsche Rotationsdiffusion (isotrope Rotation bei festen Abständen) gegeben ist. Das Modell, das für die Ableitung der Gleichungen zur Berechnung der Korrelationszeiten benutzt wurde, gilt strenggenommen nur für solche Protonen. Die Spinpaare außerhalb der β -Faltblätter bereiten größere Probleme, weil sie in keine starre Struktur eingebettet sind. Die Bewegungsanteile, die sich nicht durch eine Rotationsdiffusion mit nur einer Korrelationszeit beschreiben lassen, könnten die Ursache dafür sein, daß in diesen Bereichen die Experimente keine konsistenten Ergebnisse liefern. In Bereichen des Moleküls, in denen die Bewegung der Spinpaare durch eine isotrope Rotation mit festem Abstand beschrieben werden kann, liefern die verschiedenen Experimente dagegen nahezu gleiche Ergebnisse.

5.2 Das Problem der Spindiffusion

Obwohl bei den Experimenten sehr kurze Mischzeiten für die Bestimmung der Aufbaukurven benutzt wurden und die Aufbaukurven tatsächlich annähernd linear verlaufen, kann Spindiffusion nicht ausgeschlossen werden. Der Magnetisierungstransfer über dritte Spins kann nur verhindert werden, indem entweder bestimmte Protonenpaare selektiv angeregt werden, oder ein bestimmter Teil der

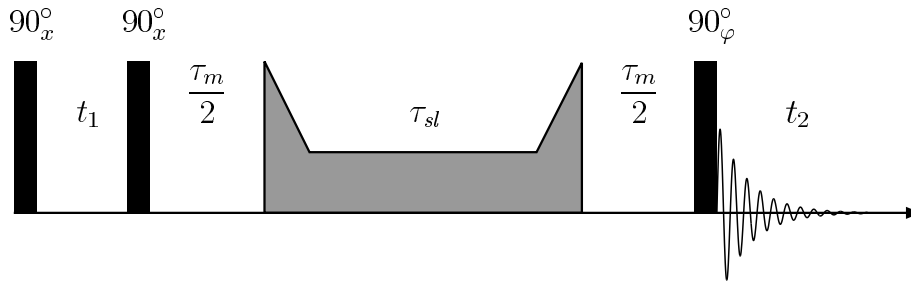


Abbildung 5.1: Vorschlag für eine neuen Pulssequenz: Statt der Mischzeit τ_{sl} wird die Mischzeit τ_m aufgeteilt, so daß ein symmetrisches Spektrum entsteht. Der adiabatische Puls beginnt und endet mit der off-resonance Einstrahlung des HF-Feldes. Er rotiert die longitudinale Magnetisierung um einen bestimmten Winkel, unter dem anschließend spin-locking stattfindet. Danach wird die Magnetisierung wieder parallel zur z -Achse rotiert.

Protonen im Protein durch Deuterium ersetzt wird. Letzteres wird zur Zeit eine weitverbreitete Methode, um eine zu schnelle Relaxation der Signale von sehr großen Proteinen zu verhindern. Ein partiell deuteriertes Protein könnte Aufschluß darüber geben, ob die Probleme der Messung auf Spindiffusion zurückzuführen sind.

5.3 Der adiabatische Puls

Der adiabatische Puls stellt die beste Methode dar, die Magnetisierung parallel zum effektiven Feld während des spin-locking auszurichten. Da der Puls aber aus einer endlichen Anzahl von Teilpulsen besteht, gibt es zwischen den Pulsen immer einen kleinen Magnetisierungsverlust, weil nur die Projektion der Magnetisierung auf das jeweilige effektive Feld während eines Teilpulses konserviert wird. Wenn der adiabatische Puls off-resonance beginnt ($\Theta_i = 0^\circ$), ist im ersten Schritt der Verlust von Magnetisierung durch die Projektion auf die Achse des effektiven Feldes, die der erste Teilpuls bestimmt, für alle Kerne nahezu gleich. Dies liegt daran, daß Δ in diesem Fall groß gegenüber den Differenzen $|\Omega_i - \Omega_j|$ der Resonanzoffsets der verschiedenen Kerne ist. Beginnt der adiabatische Puls dagegen on-resonance ($\Theta_i = 90^\circ$), so verschwindet Δ und der Unterschied in den Winkeln, die von den effektiven Feldern und der z -Achse eingeschlossen werden, ist für verschiedene Spins groß, so daß die Projektion der Magnetisierung auf die Achsen der effektiven Felder für alle Kerne unterschiedlich ist. Dies wurde in die theoretischen Betrachtungen nicht einbezogen, so daß dies eine Fehlerquelle im Experiment sein kann. Die Abbildung 5.1 zeigt einen Vorschlag für eine verbesserte Pulssequenz. Der adiabatische Puls beginnt und endet off-resonance. Die longitudinale Magnetisierung entlang der z -Achse des Laborsystems wird um den gewünschten Winkel Θ_i rotiert, relaxiert während der Mischzeit τ_{sl} und wird wieder auf die z -Achse zurückrotiert. Dieser Ablauf erfordert es, daß in diesem Fall

die Mischzeit τ_m in zwei gleiche Teile vor und nach der Mischzeit τ_{sl} aufgeteilt wird, damit ein symmetrisches Spektrum resultiert.

5.4 Fehler der Kreuzpeakvolumina

Wie in Abschnitt 4.1.4 ausgeführt wurde, kann über den Fehler der, aus der Nullstelle der Aufbaukurve berechneten, Korrelationszeit eines Spinpaars keine Aussage gemacht werden, weil dies die Kenntnis einer Verteilungsfunktion der Volumina voraussetzt. Da die Aufnahme einer Verteilungsfunktion für das Volumen eines Kreuzpeaks in der Praxis zu aufwendig ist, kann nicht klar entschieden werden, ob die inkonsistenten Ergebnisse der verschiedenen Messungen für die Bereiche außerhalb der β -Faltblätter auf die Fehler der Volumina oder auf das Versagen des Modells der isotropen Rotation der Abstandsvektoren der Spinpaare in diesen Bereichen zurückzuführen sind.

5.5 Grenzen des Modells der isotropen Rotation

Das Modell der isotropen Rotation des Abstandsvektors konstanter Länge zweier Spins ist das einfachste Modell, um die Bewegung eines Spinpaars zu beschreiben. In der Realität führen Proteine in Lösungen als ganzes eine isotrope Rotation durch (Brownschen Rotationsdiffusion). Diese Bewegung wird zusätzlich von der internen Bewegung des Proteins überlagert. Die Gesamtbewegung der Spinpaare muß deshalb keine isotrope Rotation mehr sein. Die Messungen bestätigen, daß sich für Bereiche, die keine zusätzlichen internen Bewegungen ausführen, bessere Ergebnisse ergeben als für Bereiche mit zusätzlicher interner Dynamik. Ein verbreitetes Modell für die spektrale Dichte der Bewegung von Spinpaaren ist das Modell von Lipari und Szabo [33]. Die spektrale Dichte enthält zwei Korrelationszeiten, eine für die Gesamtbewegung des Proteins und eine für die interne Dynamik, und einen Ordnungsparameter, der die Isotropie der internen Bewegung beschreibt. Die spektrale Dichte für die isotrope Rotation der Abstandsvektoren konstanter Länge enthält nur einen einzigen freien Parameter, die Korrelationszeit. Diese kann neben dem Abstand mit den Experimenten **a** und **b** bestimmt werden. Da die spektrale Dichte im Modell von Lipari und Szabo drei Parameter enthält, reichen die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente nicht aus, diese zu bestimmen.

5.6 Sensitivität der Experimente

In Abschnitt 3.3.1 wurde gezeigt, daß die Messung der Korrelationszeiten über die Nullstelle der Aufbaukurven, die mit den Experimenten **a** und **b** aufgenommen werden, nur in der Nähe der Nullstelle der Kreuzrelaxationsrate Γ_{ij}^{noe} sensitiv ist. Für $\omega_0/2\pi = 600,141$ MHz bedeutet dies, daß nur Korrelationszeiten in einem Molekül unterschieden werden können, wenn $\tau_c \lesssim 6$ ns gilt. Um auch andere

Bereiche der Korrelationszeit abzudecken, muß die NOESY-Mischzeit τ_m in den Experimenten **a**, **b** und in Abbildung 5.1 durch eine weitere Mischzeit während spin-locking ersetzt werden. Der Winkel zwischen dem effektiven Feld und der z -Achse muß sich dabei von dem während der Mischzeit τ_{sl} unterscheiden.

5.7 Vergleichbare Experimente

Andere Arbeitsgruppen versuchen auch, die Dynamik in einem Protein mit Hilfe von Experimenten zu bestimmen, die off-resonance spin-locking benutzen. Namentlich seien hier Kazuo Kuwata et al. [30, 31, 32] und Hervé Desvaux et al. [11, 12, 13] erwähnt. Diese Gruppen verwenden allerdings ein reines O-ROESY-Experiment, um Aussagen über die Dynamik zu erhalten. Sie betrachten dazu die Kreuzpeakintensitäten in Abhängigkeit vom Winkel Θ_i zwischen der z -Achse und dem effektiven Feld während der Einstrahlung des HF-Pulses. So ergibt sich eine Aufbaukurve in Abhängigkeit vom Winkel Θ_i . Diese wird von ihnen durch die Summe zweier Exponentialfunktionen gefittet. Die Summe aus zwei Exponentialfunktionen beschreibt nur den Fall eines isolierten Spinpaares. Ein Vergleich des in der vorliegenden Arbeit gewählten Ansatzes mit dem dieser beiden Arbeitsgruppen ist noch nicht möglich, weil diese Arbeitsgruppen noch keine Untersuchungen an einem vergleichbaren Protein veröffentlicht haben.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Experimente zur Bestimmung der internen Dynamik von biologischen Makromolekülen untersucht. Dazu wurde die Kreuzrelaxation zwischen je zwei Protonen ausgenutzt.

Für die Abstandsmessung (Strukturbestimmung) wird üblicherweise eine Aufbaukurve durch Kreuzrelaxation longitudinaler Magnetisierung (NOESY mit positiven Intensitäten) oder durch Kreuzrelaxation transversaler Magnetisierung erstellt (ROESY mit negativen Intensitäten). Die Steigung der Aufbaukurven ist eine Funktion der spektralen Dichte (Bewegung) und des Abstandes der Protonen. In den hier gezeigten Experimenten wurden diese zwei Ansätze kombiniert, so daß eine Aufbaukurve mit einem Wechsel von negativen zu positiven Intensitäten aufgenommen werden konnte.

Es wurde gezeigt, daß der Nulldurchgang der Aufbaukurve nur eine Funktion der spektralen Dichte ist, wohingegen die Steigung wieder eine Funktion der spektralen Dichte und des Abstandes ist. Es ist damit prinzipiell möglich, die Information über die Bewegung (spektrale Dichte) von der Abstandsmessung zu entkoppeln. Aus der funktionalen Abhängigkeit des Nulldurchganges von der spektralen Dichte kann eine Korrelationszeit für das jeweilige Protonenpaar berechnet werden. Diese lokalen Korrelationszeiten spiegeln den Bewegungszustand des Proteins wider.

Es wurden zwei Pulssequenzen für das Experiment vorgeschlagen und für beide die Aufbaukurve theoretisch berechnet. Es zeigte sich, daß zur Berechnung der Korrelationszeit aus der Nullstelle der Aufbaukurve entweder eine lineare Näherung für die Aufbaukurve oder die Näherung eines isolierten Spinpaares gemacht werden muß. Beide Näherungen wurden ausführlich diskutiert, wobei die lineare Näherung für die Auswertung der Experimente benutzt wurde, die an einer wässrigen Lösung des Proteins BPTI (6 kDa) ausgeführt wurden. Die Korrelationszeiten wurden für Protonenpaare aus dem Rückgrat von BPTI bestimmt. Für die β -Faltblätter ergaben sich Korrelationszeiten von ungefähr 1 ns, was dem erwarteten Wert für die Brownsche Rotationsdiffusion eines Moleküls dieser Größe entspricht.

A Die Peptidbindung und das Protein BPTI

A.1 Die Peptidbindung

In Proteinen ist die α -Carboxylgruppe einer Aminosäure mit der α -Aminogruppe einer zweiten Aminosäure durch eine *Peptidbindung* verknüpft. Viele durch Peptidbindungen verknüpfte Aminosäuren bilden eine unverzweigte *Polypeptidkette* (Abbildung A.1). Eine solche Kette hat eine bestimmte Richtung, weil ihre Bausteine zwei unterschiedliche Enden besitzen. Vereinbarungsgemäß wird das Aminoende als der Beginn der Polypeptidkette genommen. Ein Polypeptid besteht aus sich regelmäßig wiederholenden Einheiten, die das *Rückgrat* bilden, und einem variablen Anteil, den einzelnen *Seitenketten*.

Polypeptidketten können sich zu regelmäßigen Strukturen falten, der α -Helix und dem β -Faltblatt. Die α -Helix weist eine stabförmige Struktur auf, wobei das eng aufgewickelte Rückgrat den inneren Teil des Stabes bildet, während die Seitenketten in schraubenartiger Anordnung nach außen weisen. Im Gegensatz dazu weist das β -Faltblatt eine plattenförmige Struktur auf. Die Polypeptidkette eines β -Faltblatts ist fast völlig gestreckt. Eine genauere Beschreibung findet sich z. B. in [54].

In der vorliegenden Arbeit werden Kreuzpeaks in nullquantenkompensierten NOESY-Spektren zwischen NH Protonen und C_α H Protonen betrachtet, die sich in jeweils sequentiell benachbarten Aminosäuren befinden (Abschnitt 4.1.5), das heißt es handelt sich um $N^{(i+1)}H/C_\alpha^{(i)}H$ Kreuzpeaks. Die $N^{(i)}H/C_\alpha^{(i)}H$ Kreuzpeaks werden nicht betrachtet, weil sie durch TOCSY-Peaks (Abschnitt 2.4.2) oder ZQC-Peaks (Kapitel 3) überlagert sein können.

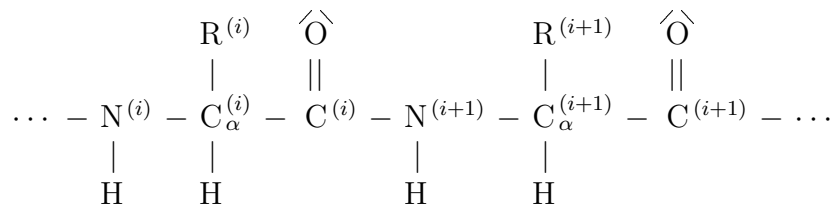


Abbildung A.1: Eine Polypeptidkette besteht aus einem Rückgrat mit sich wiederholenden Untereinheiten und unterschiedlichen Seitenketten ($R^{(i)}$, $R^{(i+1)}$).

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Aminosäure	Arg	Pro	Asp	Phe	Cys	Leu	Glu	Pro	Pro	Tyr	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys
Position	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Aminosäure	Ala	Arg	Ile	Ile	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Asn	Ala	Lys	Ala	Gly	Leu	Cys
Position	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
Aminosäure	Gln	Thr	Phe	Val	Tyr	Gly	Gly	Cys	Arg	Ala	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe
Position	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58		
Aminosäure	Lys	Ser	Ala	Glu	Asp	Cys	Met	Arg	Thr	Cys	Gly	Gly	Ala		

Tabelle A.1: Die Aminosäuresequenz des Proteins BPTI

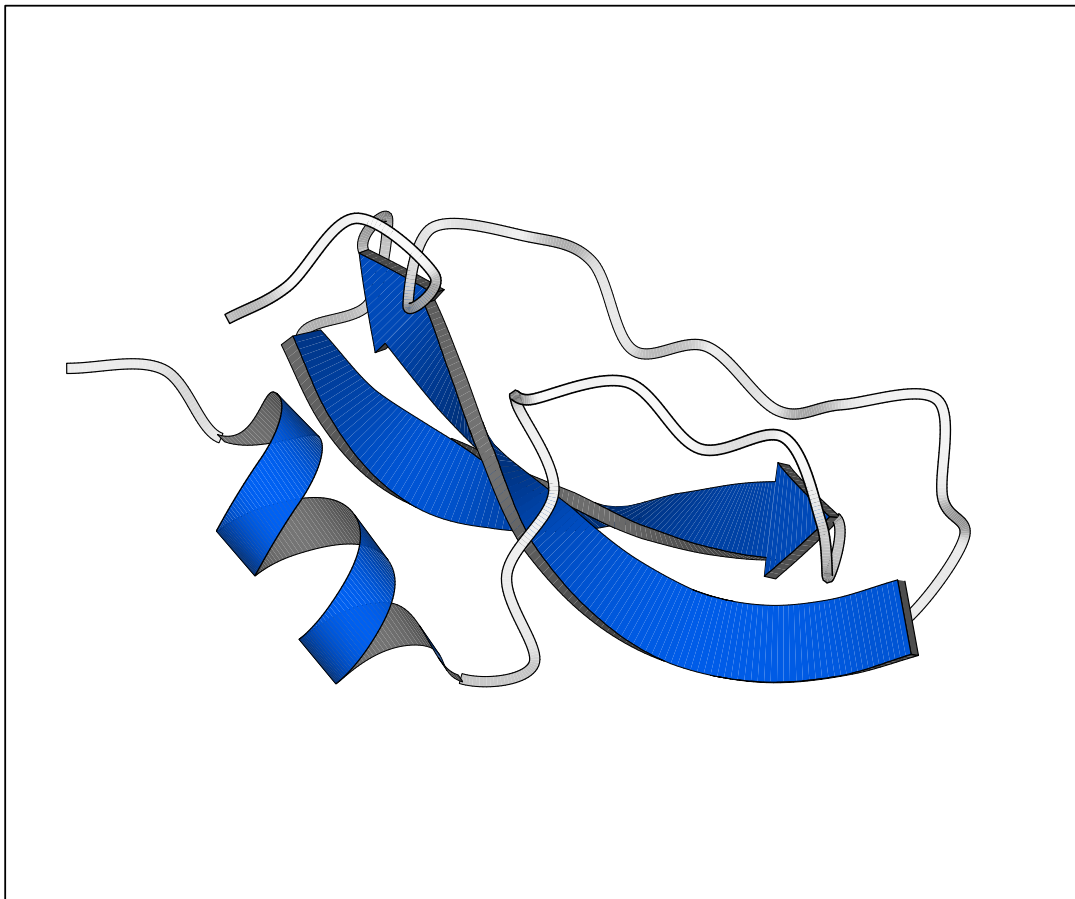


Abbildung A.2: Bändermodell der Struktur des Proteins BPTI

A.2 Das Protein BPTI

Das Protein BPTI (basic pancreatic trypsin inhibitor) ist ein globuläres (kugelförmiges) Protein (Molekulargewicht 6 kDa), das aus 58 Aminosäuren besteht. Die Tabelle A.1 gibt die Aminosäuresequenz von BPTI an. Die vollständigen Namen der Aminosäuren finden sich im Anhang C.

Die Struktur eines Proteins kann auf stark schematische Weise dadurch symbolisiert werden, daß β -Faltblätter als breite, flache Pfeile, α -Helices als gedrehte Bänder und die verbindenden Regionen als Fäden wiedergegeben werden.

Ein solches Bändermodell des Proteins BPTI ist in Abbildung A.2 gezeigt. Es wurde mit dem Programm MOLSCRIPT [28] erzeugt. Zugrunde liegt dabei die Kristallstruktur 4PTI [37], wobei die Protonen mit dem Programm X-PLOR [8] hinzugefügt wurden. Im wesentlichen besteht die Struktur aus zwei β -Faltblättern (zwischen den Aminosäuren an Position 16 und 25 und zwischen den Aminosäuren an Position 28 und 36) und einer α -Helix (zwischen den Aminosäuren an Position 47 und 56). Der Bereich zwischen den Aminosäuren an Position 3 und 7 stellt eine stabile Schleife dar.

B Symbole

$\mathbb{1}$	Einheitsmatrix
a_{ij}	Intensität eines Peaks im nullquantenkompensierten NOESY-Spektrum.
a'_{ij}	Intensität eines Peaks im ROESY- bzw. O-ROESY-Spektrum.
a_{ij}^{noe}	Intensität eines Peaks im NOESY-Spektrum.
a_{ij}^{fit}	gefittete Intensität eines Peaks im nullquantenkompensierten NOESY-Spektrum.
α	Winkel, um den ein HF-Puls die Magnetisierung rotiert.
$A^{(q)}, A_p^{(q)}$	Operatoren, die nur auf das Spinsystem wirken.
\vec{B}_0	magnetische Flußdichte des Zeemann-Feldes.
$\vec{B}_1^{lin}, \vec{B}_1(t)$	magnetische Flußdichten des eingestrahlten Feldes.
$B_0, B_1(t)$	Beträge der magnetischen Flußdichten.
B_i	Basisoperator einer Produktbasis.
β	Kreuzrelaxationsrate der longitudinalen Magnetisierung entlang des effektiven Feldes für ein isoliertes Zweispinsystem während des spin-locking.
D	Namenskonvention (Seite 26).
$\delta, \delta_1, \delta_2$	chemische Verschiebungen im Vergleich zu TMS. δ_1 und δ_2 gehören zu F_1 und F_2 .
δ_{ij}	Kronecker- δ .
Δ	Resonanzoffset des eingestrahlten HF-Feldes im Vergleich zu ω_0 .
Δt_1	Inkrement der Zeit t_1 .
Δt_2	Abstand der Datenpunkte in t_2 .
$\vec{e}_x, \vec{e}_y, \vec{e}_z$	Einheitsvektoren in positive x -, y - und z -Richtung.
$f(J(\omega)), g(J(\omega))$	Funktionen der spektralen Dichte.
F_1, F_2	Frequenzachsen eines 2D Spektrums. Ein Signal $S(t_1, t_2)$ wird durch Fouriertransformation in t_1 und t_2 das Signal $S(F_1, F_2)$.

$F^{(q)}(t)$	Zufallsfunktionen.
g	g -Faktor eines Kerns.
$\gamma = g \cdot \frac{\mu_N}{\hbar}$	gyromagnetisches Verhältnis eines Kerns, für Protonen gilt $\gamma = 2.675 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ T}^{-1}$.
$\hat{\Gamma}$	Relaxationssuperoperator.
Γ_{ij}	Relaxationsrate.
Γ'_{ij}	Relaxationsrate der longitudinalen Magnetisierung im gekippten Koordinatensystem während des spin-locking.
Γ_{ij}^{noe}	Relaxationsrate der longitudinalen Magnetisierung in Intervallen freier Präzession.
Γ_{ij}^{roe}	Relaxationsrate der transversalen Magnetisierung in Intervallen freier Präzession.
\hbar	Planck-Konstante geteilt durch 2π ($1.055 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$).
$\mathcal{H}(t)$	zeitabhängiger Hamilton-Operator während Pulseinstrahlung.
\mathcal{H}^{rot}	Hamilton-Operator während Pulseinstrahlung im rotierenden Koordinatensystem.
\mathcal{H}_0	statischer Hamilton-Operator in Intervallen freier Präzession im Laborsystem.
\mathcal{H}_0^{rot}	statischer Hamilton-Operator im rotierenden Koordinatensystem.
$\mathcal{H}_1(t)$	Hamilton-Operator der Wechselwirkung mit dem eingestrahlten Feld $\vec{B}_1(t)$.
\mathcal{H}_1^{rot}	Hamilton-Operator der Wechselwirkung mit dem eingestrahlten Feld im rotierenden Koordinatensystem.
\mathcal{H}_{con}	zeitunabhängiger Hamilton-Operator des Spinsystems.
$\mathcal{H}_D(t)$	Hamilton-Operator der direkten Dipol-Dipol Wechselwirkung.
\mathcal{H}_{ges}	Hamilton-Operator des Gesamtsystems: Gitter und Spinsystem.
\mathcal{H}_J	Hamilton-Operator der indirekten Spin-Spin Wechselwirkung.
\mathcal{H}_S	Hamilton-Operator des Spinsystems.
$\mathcal{H}_{sto}(t)$	Hamilton-Operator einer stochastischen Störung.
\mathcal{H}_Z	Hamilton-Operator der Zeeman-Wechselwirkung.
I	Spinquantenzahl, für Protonen gilt $I = \frac{1}{2}$.
\vec{I}_i	Spinoperator eines Kerns i .
I_{ix}, I_{iy}, I_{iz}	kartesische Komponenten des Spinoperators \vec{I}_i .

$I'_{ix}, I'_{iy}, I'_{iz}$	Spinoperatoren im gekippten Koordinatensystem
$I_i^+, I_i^-, I_i^\alpha, I_i^\beta$	Operatoren, aus denen eine Produktbasis gebildet werden kann.
I_{i0}	Gleichgewichtsmagnetisierung des Spins i .
I'_{i0}	longitudinale Magnetisierung entlang des effektiven Feldes zu Beginn des spin-locking für den Kern i .
\mathbf{J}_{ij}	Tensor der indirekten Spin-Spin Wechselwirkung zwischen zwei Kernen i und j
J_{ij}	Kopplungskonstante zweier Kerne i und j .
$J(\omega), J^{(q)}(\omega_p^{(q)})$	spektrale Dichten.
k	Boltzmann-Konstante ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$).
λ_k	Eigenwerte.
Λ	Diagonalmatrix.
μ_0	magnetische Feldkonstante ($4\pi \cdot 10^{-7} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$).
μ_N	Kernmagneton.
ν	Frequenz einer Resonanzlinie.
ν_{TMS}	Larmor-Frequenz der Protonen in TMS.
ω	Trägerfrequenz des HF-Feldes $\vec{B}_1(t)$.
$\omega_0 = 2\pi\nu_0$	Mitte des Spektrums, meist identisch mit der Basisfrequenz des Spektrometers.
ω_1	Larmor-Frequenz die zu $\vec{B}_1(t)$ gehört.
ω_i	Larmor-Frequenz des Kerns i .
Ω_i	Resonanzoffset des Kerns i .
$\omega_p^{(q)}$	Differenz von Eigenwerten von \mathcal{H}_{con} .
Ω_i^{eff}	Larmor-Frequenz, die zum effektiven Feld für den Kern i gehört.
Ω_{ZQ}	Präzessionsfrequenz der ZQC.
p_k	Wahrscheinlichkeiten.
φ	Phase des HF-Feldes $\vec{B}_1(t)$.
$ \Psi_k(t)\rangle$	Quantenmechanische Zustandsvektoren.
Q^a, Q^b	Abweichungsfaktoren.
r_{ij}	Abstand der beiden Kerne i und j .
ρ	direkte Relaxationsrate der longitudinalen Magnetisierung in Intervallen freier Präzession für ein isoliertes Zweispinnsy-

	stem.
$\rho(t)$	Statistischer Operator.
$\rho_i^{noe}, \rho_i^{roe}$	externe Relaxationsraten.
S	Namenskonvention (Seite 26).
$S(t_1, t_2)$	Signal eines 2D Experiments in der Zeitdomäne.
$S(t_1, F_2)$	Signal eines 2D Experiments nach der Fouriertransformation von $S(t_1, t_2)$ in t_2 .
$S(F_1, F_2)$	Signal eines 2D Spektrums in der Frequenzdomäne (2D Spektrum), nach der Fouriertransformation von $S(t_1, F_2)$ in t_1 .
SW	spektale Breite.
σ	Kreuzrelaxationsrate der longitudinalen Magnetisierung in Intervallen freier Präzession für ein isoliertes Zweispinssystem.
$\sigma(t)$	reduzierter statistischer Operator.
σ_{eq}	reduzierter statistischer Operator im thermischen Gleichgewicht.
σ_i	Tensor der chemischen Verschiebung für den Kern i .
σ_i	Abschirmkonstante für den Kern i .
t, t_k	Zeit, Zeitintervall.
T	Temperatur oder Namenskonvention (Seite 26).
t_1	inkrementierte Zeit in 2D Experimenten zur Frequenzmarkierung.
t_2	Detektionszeit in 2D Experimenten
τ	Pulslänge.
τ_c	Korrelationszeit.
τ_m	Mischzeit beim NOESY-Experiment.
τ_m^0	Nullstelle einer Aufbaukurve.
τ_{sl}	Dauer des spin-locking.
Θ_i	Winkel, der von der z -Achse und dem effektiven Feld für den Kern i eingeschlossen wird.
U	unitäre Transformation.
U_k	Propagator.
X	orthogonale Matrix.

C Abkürzungen

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
BPTI	basic pancreatic trypsin inhibitor
CW	continous wave
Cys	Cystein
FID	free induction decay
FT	Fouriertransformation
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	2D nuclear Overhauser effect spectroscopy
O-ROESY	off-resonance rotating frame Overhauser spectroscopy
ppm	parts per million
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin

HF	Hochfrequenz
ROE	rotating-frame Overhauser effect
ROESY	rotating-frame Overhauser spectroscopy
Ser	Serine
TOCSY	total correlation spectroscopy
Thr	Threonin
TMS	Tetramethylsilan, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
ZQC	zero-quantum coherences

Literatur

- [1] A. ABRAGAM. „Principles of Nuclear Magnetism“. Clarendon Press, Oxford, 11 Aufl. (1994).
- [2] A. BAX UND D. G. DAVIS. *J. Magn. Reson.* **63**, 207–213 (1985).
- [3] R. BAZZO UND J. BOYD. *J. Magn. Reson.* **75**, 452 (1987).
- [4] F. BLOCH. *Phys. Rev* **70**, 460 (1946).
- [5] F. BLOCH, W. W. HANSEN UND M. PACKARD. *Phys. Rev* **70**, 474 (1946).
- [6] G. BODENHAUSEN, H. KOGLER UND R. R. ERNST. *J. Magn. Reson.* **58**, 370 (1984).
- [7] A. A. BOTHNER-BY, R. L. STEPHENS, J. LEE, C. D. WARREN UND R. W. JEANHOLZ. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 811–813 (1984).
- [8] A. T. BRÜNGER. „X-PLOR. A System for X-ray Crystallography and NMR“. Yale University Press, New Haven und London (1992).
- [9] T. E. CREIGHTON. „Proteins. Structures and Molecular Properties“. W. H. Freeman and Company, New York, 2 Aufl. (1993).
- [10] D. G. DAVIS. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3471–3472 (1987).
- [11] H. DESVAUX, P. BERTHAULT, N. BIRLIRAKIS UND M. GOLDMAN. *J. Magn. Reson. A* **108**, 219–229 (1994).
- [12] H. DESVAUX, P. BERTHAULT, N. BIRLIRAKIS, M. GOLDMAN UND M. PIOTTO. *J. Magn. Reson. A* **113**, 47–52 (1995).
- [13] H. DESVAUX UND M. GOLDMAN. *Mol. Phys.* **81**, 955–974 (1994).
- [14] R. R. ERNST. *Adv. Mag. Reson* **2**, 1 (1966).
- [15] R. R. ERNST UND W. A. ANDERSON. *Rev. Sci. Instr.* **37**, 93–101 (1966).
- [16] R. R. ERNST, G. BODENHAUSEN UND A. WOKAUN. „Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions“. Clarendon Press, Oxford, 5 Aufl. (1988).
- [17] U. FANO. *Rev. Mod. Phys* **29**, 74 (1957).
- [18] M. GEYER. Dissertation, Universität Heidelberg (1995).
- [19] M. GEYER, K.-P. NEIDIG UND H. R. KALBITZER. *J. Magn. Reson.B*

- 109, 31–38 (1995).
- [20] S. GLASER UND H. R. KALBITZER. *J. Magn. Reson.* **74**, 450–463 (1987).
- [21] M. GOLDMAN. „Quantum Description of High-Resolution NMR in Liquids“. Clarendon Press, Oxford, 2 Aufl. (1990).
- [22] C. GRIESINGER UND R. R. ERNST. *J. Magn. Reson.* **75**, 261–271 (1987).
- [23] C. J. HARDY, W. A. EDELSTEIN UND D. VATIS. *J. Magn. Reson.* **66**, 470–482 (1986).
- [24] K. C. HOLMES UND D. M. BLOW. „The Use of X-Ray Diffraction in the Study of Protein and Nucleic Acid Structure“. Wiley-Interscience, New York (1965).
- [25] J. JEENER, B. H. MEIER, P. BACHMANN UND R. R. ERNST. *J. Chem. Phys.* **71**, 4546–4553 (1979).
- [26] J. I. KAPLAN UND G. FRAENKEL. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 2907 (1972).
- [27] J. KEELER, D. NEUHAUS UND M. P. WILLIAMSON. *J. Magn. Reson.* **73**, 45 (1987).
- [28] P. J. KRAULIS. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 946–950 (1991).
- [29] A. KUMAR. „5th chianti workshop on magnetic resonance: Nuclear and electron relaxation“. San Miniato, Italien (1993).
- [30] K. KUWATA, D. BROOKS, H. YANG UND T. SCHLEICH. *J. Magn. Reson. B* **104**, 11–25 (1994).
- [31] K. KUWATA UND T. SCHLEICH. *J. Magn. Reson. A* **111**, 43–49 (1994).
- [32] K. KUWATA UND T. SCHLEICH. *J. Magn. Reson. A* **114**, 219–229 (1995).
- [33] G. LIPARI UND A. SZABO. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546–4570 (1982).
- [34] I. J. LOWE UND R. E. NORBERG. *Phys. Rev* **107**, 46 (1957).
- [35] E. L. MACKOR UND C. MACLEAN. *Prog. NMR Spectrosc.* **3**, 152 (1967).
- [36] S. MACURA UND R. R. ERNST. *Mol. Phys.* **41**, 95–117 (1980).
- [37] M. MARQUART, J. WALTER, J. DEISENHOFER, W. BODE UND R. HUBER. *Acta Crystallogr. B* **39**, 480–490 (1983).
- [38] L. MITSCHANG (1994). private Mitteilung.
- [39] L. MITSCHANG. „Entwicklung und Anwendung neuer Methoden zur Signalselektion in der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie“. Dissertation, Technische Universität München (1994).
- [40] L. MITSCHANG, J. KEELER, A. L. DAVIS UND H. OSCHKINAT. *J. Biomol. NMR* **2**, 545–556 (1992).
- [41] L. MÜLLER UND R. R. ERNST. *Mol. Phys.* **38**, 963–992 (1979).
- [42] K.-P. NEIDIG, M. GEYER, A. GÖRLER, C. ANTZ, R. SAFFRICH, W. BE-

- NEICKE UND H. R. KALBITZER. *J. Biomol. NMR* **6**, 255–270 (1995).
- [43] K.-P. NEIDIG UND H. R. KALBITZER. *J. Magn. Reson.* **88**, 155–160 (1990).
- [44] A. OVERHAUSER. *Phys. Rev* **89**, 689 (1953).
- [45] A. OVERHAUSER. *Phys. Rev* **92**, 477 (1953).
- [46] M. PIOTTO, V. SAUDEK UND V. SKLENÁŘ. *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665 (1992).
- [47] W. H. PRESS, B. P. FLANNERY, S. A. TEUKOLSKY UND W. T. VETTERLING. „Numerical Recipes in C. The Art of Scientific Computing“. Cambridge University Press, Cambridge (1988).
- [48] N. F. RAMSAY. *Phys. Rev* **78**, 699 (1950).
- [49] N. F. RAMSAY UND E. M. PURCELL. *Phys. Rev* **85**, 143 (1952).
- [50] F. REIF. „Statistische Physik und Theorie der Wärme“. Walter de Gruyter, Berlin (1987).
- [51] I. SOLOMON. *Phys. Rev* **99**, 559–565 (1955).
- [52] O. W. SØRENSEN, M. RANCE UND R. R. ERNST. *J. Magn. Reson.* **56**, 527–534 (1984).
- [53] E. O. STEJSKAL UND J. SCHAEFER. *J. Magn. Reson.* **14**, 160 (1974).
- [54] L. STRYER. „Biochemie“. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg (1990).
- [55] H. TSCHESCHE. *Angew. Chem. internat. Edit.* **13**, 10–28 (1974).
- [56] G. WAGNER, W. BRAUN, T. F. HAVEL, T. SCHAUMANN, N. GÖ UND K. WÜTHRICH. *J. Mol. Biol.* **196**, 611–639 (1987).
- [57] A. WOKAUN UND R. R. ERNST. *Chem. Phys. Lett.* **52**, 407 (1977).
- [58] K. WÜTHRICH. „NMR in Biological Research: Peptides and Proteins“. Holland Publishing Company, Amsterdam (1976).
- [59] K. WÜTHRICH. „NMR of Proteins and Nucleic Acids“. John Wiley & Sons, New York (1986).