

- [6] N. A. Petasis, S.-P. Lu, E. I. Bzowej, D.-K. Fu, J. P. Staszewski, I. Akritopoulou-Zanze, M. A. Patane, Y.-H. Hu, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 667–670.
- [7] Übersicht: S. H. Pine, *Org. React.* **1993**, 43, 1–91.
- [8] Über die Olefinierung von Carbonylverbindungen unter Verwendung von Dibenzyl-, Bis[(trimethylsilyl)methyl]- und Dicyclopropyltitanocenonen wurde berichtet: a) N. A. Petasis, E. I. Bzowej, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1327–1330; b) N. A. Petasis, I. Akritopoulou, *Synlett* **1992**, 665–667; c) N. A. Petasis, E. I. Bzowej, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 943–946; d) N. A. Petasis, J. P. Staszewski, D.-K. Fu, *ibid.* **1995**, 36, 3619–3622.
- [9] a) K. Takai, Y. Hotta, K. Oshima, H. Nozaki, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 2417–2420; b) L. Lombardo, *ibid.* **1982**, 23, 4293–4296; c) *Org. Synth.* **1987**, 65, 81–87; J. Hibino, T. Okazoe, K. Takai, H. Nozaki, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 5579–5580; e) T. Okazoe, J. Hibino, K. Takai, H. Nozaki, *ibid.* **1985**, 26, 5581–5584; f) K. Takai, O. Fujimura, Y. Kataoka, K. Utimoto, *ibid.* **1989**, 30, 211–214.
- [10] K. Takai, T. Kakiuchi, Y. Kataoka, K. Utimoto, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 2668–2670.
- [11] a) T. Okazoe, K. Takai, K. Oshima, K. Utimoto, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4410–4412; b) K. Takai, Y. Kataoka, T. Okazoe, K. Utimoto, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 1065–1068.
- [12] a) T. Okazoe, K. Takai, K. Utimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 951–953; b) K. Takai, K. Nitta, K. Utimoto, *ibid.* **1986**, 108, 7408–7410; c) K. Takai, Y. Kataoka, T. Okazoe, K. Utimoto, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 1443–1446.
- [13] Y. Horikawa, M. Watanabe, T. Fujiwara, T. Takeda, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1127–1128.
- [14] Y. Horikawa, T. Nomura, M. Watanabe, T. Fujiwara, T. Takeda, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3678–3682.
- [15] T. Takeda, H. Shimokawa, Y. Miyachi, T. Fujiwara, *Chem. Commun.* **1997**, 1055–1056.
- [16] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, Thieme, Stuttgart, **1994**, S. 171–178.
- [17] a) D. Seebach, *Angew. Chem.* **1969**, 81, 690–700; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1969**, 8, 639–649; b) B. T. Gröbel, D. Seebach, *Synthesis* **1977**, 357–402; c) D. Seebach, *Angew. Chem.* **1979**, 91, 259–278; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, 18, 239–258; d) P. C. Bulman Page, M. B. van Niel, J. C. Prodger, *Tetrahedron* **1989**, 45, 7643–7677.

Die direkte Bestimmung von Diederwinkeln mit hochauflösender NMR-Spektroskopie

Marcel J. J. Blommers* und Wolfgang Jahnke

Seit der Entdeckung des Kern-Overhauser-Effektes (NOE)^[1] und der skalaren Kopplungskonstanten^[2] vor Jahrzehnten hängt die Berechnung der Strukturen von Biomolekülen aus NMR-Daten weitgehend von der Messung dieser beiden Parameter ab.^[3] Es war daher auch für viele Experten überraschend, daß nun ein weiterer Parameter zur Strukturbestimmung definiert werden konnte: Die Gruppe von Griesinger an der Universität Frankfurt berichtete kürzlich über eine neue NMR-Methode, mit der Winkel zwischen Bindungsvektoren direkt gemessen werden können.^[4] Der neue Parameter ist bei isotonenangereicherten Molekülen weithin anwendbar und sicherlich ein Meilenstein auf dem Weg zu neuen Experimenten zur Bestimmung der Strukturen von Biomolekülen durch NMR-Spektroskopie. Diese Experimente werden dazu beitragen, daß die Auflösung von aus NMR-Spektren abgeleiteten Strukturen entscheidend verbessert werden kann, und sie könnten neue Informationen über die Moleküldynamik liefern.

Der neue Parameter ist die kreuzkorrelierte dipolare Relaxation (CCDR), die in vereinfachter Form leicht erklärt werden kann. Alle Kohärenzen zwischen Kernspins, die die NMR-Signale verursachen, relaxieren mit charakteristischen Geschwindigkeiten und verschwinden schließlich. Die dipolare Relaxation eines Spins wird durch das fluktuierende magnetische Feld von benachbarten Spins verursacht. Kreuzkorrelierte dipolare Relaxation zeigt an, daß ein dipolar

koppelndes Spinpaar nicht isoliert ist, sondern das fluktuierende magnetische Feld anderer Spinpaare wahrnimmt, das seine Relaxationsgeschwindigkeit beeinflusst. Die dipolare Wechselwirkung zwischen diesen magnetischen Momenten hängt vom Winkel zwischen den Dipolvektoren ab [Gl. (1)], wobei k gemäß Gleichung (2) definiert ist.^[5] θ ist der Winkel

$$\text{CCDR}_{ijkl} = k(3 \cos^2 \theta - 1) \quad (1)$$

$$k = \frac{2}{5} \frac{\gamma_i \gamma_j}{r_{ij}^3} \frac{\gamma_k \gamma_l}{r_{kl}^3} \left[\frac{\hbar \mu_0}{4\pi} \right]^2 \tau_c \quad (2)$$

zwischen den Vektoren, die die Kerne i und j bzw. k und l verbinden (Abb. 1), r der Abstand der Kerne voneinander

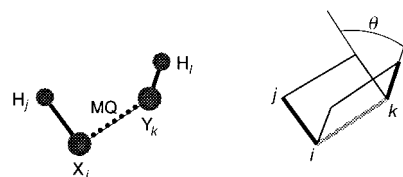


Abb. 1. Schematische Darstellung eines Paares von Bindungsvektoren. Die Relaxationsgeschwindigkeit der Multiquantenkohärenz (MQ) hängt vom Winkel θ zwischen den Bindungsvektoren ab.

und τ_c die Korrelationszeit der Rotation, die unabhängig gemessen werden kann. Alle anderen Faktoren sind Konstanten. Der Winkel θ zwischen den Bindungsvektoren ist also die einzige Unbekannte in Gleichung (1) und kann somit einfach und mit hoher Genauigkeit durch die Messung der Geschwindigkeit der dipolaren Kreuzrelaxation bestimmt werden. Es muß betont werden, daß θ direkt gemessen

[*] Dr. M. J. J. Blommers, Dr. W. Jahnke
Core Technologies, Novartis Pharma AG
Postfach, CH-4002 Basel (Schweiz)
Telefax: Int. + 61/697 3704
E-mail: marcel_jj.blommers@pharma.novartis.com

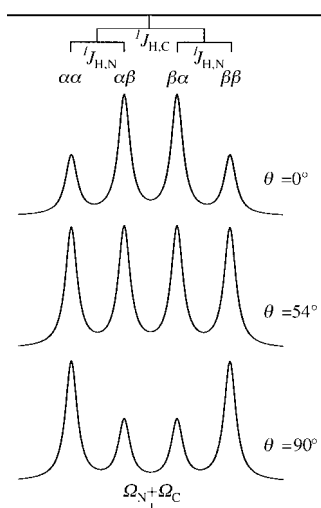


Abb. 2. Querschnitt durch ein Doppeldublettsignal, das für jedes Paar von korrelierten Bindungsvektoren erhalten wird. Das Signal stellt Doppelquantenkohärenz zwischen N_i und C_{i-1} dar und wird durch die Kopplungen $^1J_{H,N}$ und $^1J_{H,C}$ aufgespalten. Die Population der Spinzustände $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\alpha$ und $\beta\beta$ wird durch die Intensität der einzelnen Linien repräsentiert und ist mit dem Winkel θ zwischen dem H^N -N- und dem $H-C_\alpha$ -Bindungsvektor korreliert. Der mittlere Graph zeigt die Situation für den Fall des magischen Winkels ($\theta = 54.7^\circ$), bei dem die CCDD Null ist.

Linien dieses Doppeldubletts relaxieren wegen der kreuzkorrelierten dipolaren Relaxation unterschiedlich schnell. Somit kann die Relaxationsgeschwindigkeit direkt aus der Intensität der einzelnen Linien abgelesen werden [Gl. (3)]. CCDD ist die Relaxations-

$$CCDD_{ijkl} = \frac{1}{4t} \ln \left[\frac{I(\alpha\beta)I(\beta\alpha)}{I(\alpha\alpha)I(\beta\beta)} \right] \quad (3)$$

geschwindigkeit, t die Zeit, in der die entsprechenden Kohärenzen der Relaxation unterliegen, und I symbolisiert die Signalintensitäten der Spinzustände $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\alpha$ und $\beta\beta$. Die relative Intensität der individuellen Linien reflektiert damit direkt die relative Orientierung der involvierten Kerne.

Kreuzkorrelierte dipolare Relaxation kann zwischen verschiedenen Kernen gemessen werden. Benötigt werden zwei zentrale Kerne, die jeweils mit einem weiteren Kern verknüpft sind (Abb. 1). Der zentrale Kern und der mit ihm verbundene müssen durch eine große skalare Kopplung verknüpft sein, und der verbundene Kern muß die Hauptquelle der dipolaren Relaxation des zentralen Kernspins sein. Die zwei zentralen Kerne brauchen dagegen nicht skalar gekoppelt zu sein. Die Notwendigkeit, Multiquantenkohärenz zwischen ihnen zu erzeugen, bedeutet allerdings, daß sie in ein skalar oder dipolar koppelndes Netzwerk eingebunden sind. In der Praxis werden die zentralen Kerne Heteroatome sein, z.B. ^{13}C oder ^{15}N in isotonenangereicherten Biomolekülen, und die weiteren Kerne werden die an sie gebundenen Protonen sein.

werden kann, ohne daß – wie bei der Karplus-Beziehung für die Diederwinkelabhängigkeit der Kopplungskonstanten J – eine experimentelle Eichung erforderlich ist.

Die Geschwindigkeit der kreuzkorrelierten dipolaren Relaxation kann durch neue Tripelresonanz-Experimente bequem bestimmt werden, in denen man die ^1H -, die ^{13}C - und die ^{15}N -Kerne isotonenangereicherter Biomoleküle nutzt. In geeigneten Experimenten dieser Art, z.B. in einem heteronuclearen Multiquantenexperiment ohne Entkopplung, hat jedes Signal eine Doppeldublett-Feinstruktur. Die Signalaufspaltung wird durch die großen Kopplungskonstanten über eine Bindung, $^1J_{H,N}$ und $^1J_{C,H}$, verursacht (Abb. 2). Die einzelnen

Reif et al.^[4] haben die ^{15}N -Kerne der Amidbindung und den in der Proteinsequenz vorhergehenden ^{13}C -Kern als zentrale Kerne gewählt und entsprechend die an sie gebundenen Protonen als weitere Kerne. Anhand dieser Atome kann der Winkel θ zwischen dem H^N -N- und dem C^α - H^α -Bindungsvektor des vorausgehenden Aminosäurerestes bestimmt werden (Abb. 3). Nimmt man eine planare *trans*-Peptidbindung

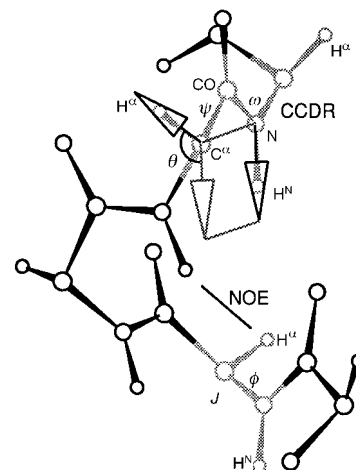


Abb. 3. Die Messung der CCDD liefert den Winkel zwischen Bindungsvektoren, z.B. den Winkel θ zwischen dem H^N -N-Vektor und dem $H-C^\alpha$ -Vektor der sequentiell vorausgehenden Aminosäure eines Proteins. Sie ergänzt die Information, die man aus NOE- und J -Werten erhält und die schematisch im unteren Teil der Abbildung gezeigt ist.

zwischen den beiden Aminosäureresten an, so hängt der Winkel θ nur vom Proteinhauptkettenwinkel ψ ab. Daher entspricht die Messung von θ einer indirekten Messung des Winkels ψ , der mit bisherigen NMR-Techniken kaum zugänglich ist.

Die Pulsfolge ist dem konventionellen HN(CO)CA-Experiment^[6] ähnlich, das die Amidprotonen und die an sie gebundenen ^{15}N -Atome mit den C^α -Atomen der vorausgehenden Aminosäurereste korreliert. Der wesentliche Unterschied ist, daß das Signal von C^α als Doppelquantenkohärenz mit dem Amid-Stickstoffatom aufgezeichnet wird, ohne die Protonen zu entkoppeln. Ein Schnitt durch das resultierende 3D-Spektrum ergibt daher für jeden Aminosäurerest das in Abbildung 2 gezeigte Doppeldublettmuster. Aus den Signalintensitäten der einzelnen Linien können die Geschwindigkeit der kreuzkorrelierten dipolaren Relaxation nach Gleichung (3) und die Winkel θ und ψ nach Gleichung (1) berechnet werden. Reif et al. demonstrierten das Experiment am Beispiel des kleinen Proteins Rhodniin, für das sie eine große Zahl von Winkeln ψ bestimmen konnten.

Wie bei fast allen NMR-Experimenten gibt es auch hier Beschränkungen in der Größe der zu untersuchenden Biomoleküle. Die Linienbreiten der individuellen Doppeldublettlinien (Abb. 2) müssen kleiner sein als die skalare Kopplung zwischen dem zentralen Kern (^{13}C , ^{15}N) und dem direkt an ihn gebundenen Kern (Proton) (90 bzw. 140 Hz). Die Empfindlichkeit des Experiments wiederum kann die Anwendung auf größere Biomoleküle verhindern: Diese reorientieren sich in Lösung langsam und relaxieren entspre-

chend schnell. Während der (notwendigerweise) langen Delay-Zeiten in der Pulssequenz wird daher ein Großteil der Magnetisierung bereits relaxiert sein, bevor er in detektierbare Magnetisierung umgewandelt ist. Das ist besonders kritisch, weil diese Art der Multiquantenkohärenz ohne Entkopplung sehr schnell relaxiert. Allerdings steigt die Geschwindigkeit der kreuzkorrelierten Relaxation mit zunehmender relativer Molekülmasse in der gleichen Weise an wie die „normalen“ Relaxationsgeschwindigkeiten. Zu beachten ist außerdem, daß Gleichung (2) eine Näherung ist, die auf der Annahme isotroper Beweglichkeit der Moleküle beruht. Daher können die Winkelbestimmungen nach Gleichung (1) durch anisotrope Beweglichkeit und durch schnelle intramolekulare Beweglichkeit verfälscht werden.

Die kreuzkorrelierte dipolare Relaxation eignet sich nicht nur zur Strukturbestimmung, sondern auch zur Untersuchung der Moleküldynamik. Sie findet auf einer anderen Zeitskala statt als die skalare Kopplung. Im Falle innerer Beweglichkeit gibt daher die Messung der drei unabhängigen Parameter NOE, J und CCDD nicht notwendigerweise die gleichen Resultate. Strukturen, in deren Berechnung auch die „constraints“ aus CCDD-Messungen eingeflossen sind, können daher richtiger sein als Strukturen, die ohne diese Daten berechnet wurden, obwohl sie nicht notwendigerweise präziser sein müssen. Die zusätzliche Information aus CCDD-Daten könnte daher speziell für die Analyse von Gleichgewichten zwischen energetisch ähnlichen Zuständen (Konformationsensembles) wichtig sein, bei denen die Zahl der Observablen (NOE- und J -Werte) oft nicht ausreicht, das Problem also unterbestimmt ist. In diesen Fällen kann der neue Parameter dazu beitragen, ein genaues Bild der Molekülstruktur zu erhalten, das sowohl strukturelle als auch dynamische Aspekte berücksichtigt.

Neben den hier beschriebenen Mechanismen können auch andere Relaxationsmechanismen, wie die Kreuzkorrelation zwischen der dipolaren Kopplung und der Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA), Strukturinformationen liefern.^[7] Allerdings ist die Extraktion der Information aus diesen Relaxationsgeschwindigkeiten weniger direkt als bei der CCDD-Methode. Dies liegt hauptsächlich daran, daß die CSA-Tensoren nicht bekannt sind; sie können aber aus Festkörper-NMR-Messungen bestimmt werden. Man darf davon ausgehen, daß auch diese Relaxationsmessungen in Kürze genauer daraufhin geprüft werden, inwieweit sie sich dazu eignen, Strukturinformationen zu gewinnen.

Bei hohen Magnetfeldern nehmen Proteine, die ein intrinsisches magnetisches Dipolmoment aufweisen, bevorzugt eine bestimmte Orientierung im Magnetfeld ein. In diesen Fällen kann die restliche dipolare Kopplung gemessen werden, die Aussagen darüber ermöglicht, wie die Kern-Kern-Vektoren relativ zum Gesamtmolekülgerüst orientiert sind.^[8] Diese Methode ist deshalb besonders interessant, weil

sie Beziehungen zwischen weit voneinander entfernten Molekülbereichen enthüllt.

Die Messung der kreuzkorrelierten Relaxation wurde für homonucleare Fälle bereits früher beschrieben^[9] und wird in der Festkörper-NMR-Spektroskopie oft genutzt.^[10] Erst durch die Verfügbarkeit von isopenangereicherten Biomolekülen und ihre Verwendung in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie wird die hier beschriebene neue Methode so interessant. Vermutlich wird die Methode zur Bestimmung weiterer Strukturparameter, wie der Winkel ϕ oder χ_1 oder sogar der Winkel zwischen Bindungsvektoren, die räumlich eng benachbart, aber in der Sequenz fern voneinander sind, ausgeweitet werden. Selbstverständlich kann sie nicht nur auf Proteine, sondern z.B. auch auf Nucleinsäuren oder kleine organische Moleküle angewendet werden. Der neue Strukturparameter ist direkt meßbar und benötigt keine experimentelle Kalibrierung. Außerdem ist es ein glücklicher Umstand, daß er leicht zu bestimmen ist, ohne daß neue Proteinproben hergestellt werden müssen oder viel Geld in eine neue NMR-Ausstattung investiert werden müßte. Das Experiment basiert auf existierenden Tripelresonanz-Experimenten und nutzt nur leicht modifizierte Pulssequenzen. Es ist anzunehmen, daß die Methode für die NMR-Spektroskopie von Biomolekülen schnell akzeptiert werden wird und bald zum Standardrepertoire der Strukturermittlung durch NMR-Spektroskopie zählen wird.

Stichwörter: Konformationsanalyse • NMR-Spektroskopie • Proteine • Strukturaufklärung

- [1] a) S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1980**, *41*, 95–117; b) D. Neuhaus, M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH, New York, **1989**.
- [2] a) M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11–15; b) V. F. Bystrov, *Prog. NMR Spectrosc.* **1976**, *10*, 41–81.
- [3] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [4] B. Reif, M. Hennig, C. Griesinger, *Science* **1997**, *276*, 1230–1233.
- [5] J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer III, N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy*, Academic Press, San Diego, **1996**, S. 265–270.
- [6] A. Bax, M. Ikura, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 99–104.
- [7] M. Tessari, H. Vis, R. Boelens, R. Kaptein, G. Vuister, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8985–8990.
- [8] J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, J. H. Prestegard, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 292–297; *PNAS* **1995**, *92*, 9279–9283; H. S. Kung, K. Y. Wang, I. Goljer, P. H. Bolton, *J. Magn. Reson. B* **1995**, *109*, 323–325; N. Tjandra, S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6264–6272; N. Tjandra, J. G. Omichinski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 732–738.
- [9] a) C. Dalvit, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7924–7926; b) *Adv. Magn. Reson.* **1990**, *14*, 1–33.
- [10] a) X. Feng, Y. K. Lee, D. Sandström, M. Eden, H. Maisel, A. Sebald, M. H. Levitt, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *257*, 314–320; b) X. Feng, P. J. E. Verdegem, Y. K. Lee, D. Sandström, M. Eden, P. Bovee-Geurts, W. J. de Grip, J. Lugtenburg, H. J. M. de Groot, M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6853–6857; c) K. Schmidt-Rohr, *ibid.* **1996**, *118*, 7601–7603.