

Tanabe und Mitarbeiter stellten eine andere Methode vor, bei der keine Dehydratisierungsmittel oder -techniken nötig sind.^[5] Diphenylammoniumtriflat, das aus Diphenylamin und Trifluormethansulfonsäure erhältlich ist, katalysiert die Konensation äquimolarer Mengen Carbonsäure und Alkohol (Tabelle 1). Die Reaktion verläuft unter Erhitzen der Reaktanten auf 80 °C, ohne dass auf Dehydrierungstechniken zurückgegriffen werden muss. Die Produkte konnten nach Säulenchromatographie in beträchtlichen Ausbeuten, aber nicht quantitativ isoliert werden (89–96 %, in einem Fall nur 78 %). Primäre und sekundäre Alkohole wurden eingesetzt, und einige Funktionalitäten wie Keto- und Cyclopropylgruppe wurden toleriert.

Bei den hier erwähnten Reaktionsvorschriften waren die Produkte zwar mit geringen Mengen der Ausgangsstoffen verunreinigt, doch die hohen Ausbeuten ermöglichen eine einfache Isolierung der Produkte mittels Säulenchromatographie.^[6] Die Aufarbeitung gelingt problemlos, so lange allein auf die Isolierung der Ester abgezielt wird. Der Fall liegt jedoch anders bei in der Praxis angewendeten Prozessen, bei denen zudem nicht umgesetzte Reaktanten zurückgewonnen werden müssen. Eine 1:1-Stöchiometrie ist nur wirklich effektiv bei 100 % Umsetzung, anderenfalls sollten die zwei Komponenten (zurückgewonnene Carbonsäure und Alkohol) von der Produktmischung abgetrennt werden. Im Vergleich ist dies jedoch weniger vorteilhaft als eine Reaktionsführung,

bei der eine der Komponenten im Überschuss vorgelegt wird. In diesem letzteren Fall ist die Zurückgewinnung nur eines Reaktanten notwendig aufgrund der leichteren Erreichbarkeit einer 100-prozentigen Umsetzung. Eine Ausbeute von 100 % unter Einsatz äquimolarer Mengen der Reaktanten ohne jeglichen Reinigungsschritt bleibt daher noch immer eine Herausforderung für die Zukunft. Die Umsätze und Ausbeuten, die in den beiden hier beschriebenen Studien erzielt werden konnten, sind in diesem strengen Sinne nicht befriedigend. Ohne Zweifel stellen die beiden Methoden jedoch einen großen Schritt vorwärts dar, und es ist zu erwarten, dass diese Erfolge den Weg zum Ziel ebnen werden.

- [1] T. W. Greene, P. G. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3. Aufl., Wiley, New York, **1999**, S. 149, S. 373.
- [2] B. M. Trost, *Science* **1991**, 254, 1471; B. M. Trost, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 285–307; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 259–281..
- [3] Repräsentative Beispiele: G. A. Olah, T. Keumi, D. Meidar, *Synthesis* **1978**, 929; A. K. Kumar, T. K. Chattopadhyay, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3713; J. Otera, N. Dan-oh, H. Nozaki, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5307; B. Das, B. Venkataiah, P. Madhusudhan, *Synlett* **2000**, 59; A. S.-Y. Lee, H.-C. Yang, F.-Y. Su, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 301.
- [4] K. Ishihara, S. Ohara, H. Yamamoto, *Science* **2000**, 290, 1140.
- [5] K. Kasugai, T. Misaki, K. Yamada, Y. Tanabe, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 5249.
- [6] Professor Hisashi Yamamoto, persönliche Mitteilung; die Isolierungsmethode ist nicht in Lit. [4] beschrieben.

Neues aus der hochauflösenden Festkörper-NMR-Spektroskopie**

Harald Schwalbe* und Anthony Bielecki

Es ist seit langem bekannt, dass Struktur und Dynamik von biologischen Makromolekülen mittels NMR-Spektroskopie genau bestimmt werden können. Die Mehrzahl der NMR-Untersuchungen wurde und wird an Proben durchgeführt, die in flüssigen Lösungsmitteln gelöst vorliegen, da unter diesen Bedingungen schmalere Linienbreiten und damit bessere Auflösungen als bei Festkörperproben beobachtet werden. Häufig ist es jedoch notwendig, Festkörperspektren aufzunehmen, z.B. wenn man unlösliche biologische Proben wie Aggregate oder Amyloide untersuchen will. Hinzu kommen

Systeme, deren Eigenschaften zwischen denen von Festkörpern und gelösten Systemen liegen. Membranen und membrangebundene Proteine sind beispielsweise im engen Sinn keine Festkörper, lassen sich aber wegen ihres hohen Grades an molekularer Ausrichtung als Flüssigkristalle beschreiben. Weitere Beispiele sind stark viskose Flüssigkeiten oder Gele, in denen die molekulare Beweglichkeit gering oder räumlich eingeschränkt ist. Für alle diese Systeme können Festkörper-NMR-Untersuchungen besonders wertvoll sein, vorausgesetzt man weiß, mit welchen Festkörper-NMR-Methoden man die interessantesten Informationen erhält.

Die Herausforderungen der Festkörper-NMR-Spektroskopie liegen in den starken anisotropen Wechselwirkungen der durch den Raum vermittelten Dipol-Dipol-Kopplung, die häufig auch als dipolare Kopplung bezeichnet wird, und der orientierungsabhängigen chemischen Verschiebung, der chemischen Verschiebungsanisotropie (CSA). (Einige Kerne haben außerdem ein elektrisches Quadrupolmoment, das eine zusätzliche anisotrope Wechselwirkung erzeugt, auf die hier aber nicht eingegangen wird.) In Lösung werden diese anisotropen Wechselwirkungen durch schnelle molekulare Bewegung ausgemittelt, sodass lediglich der Einfluss auf die

[*] Prof. Dr. H. Schwalbe, Dr. A. Bielecki

Department of Chemistry
and
MIT/Harvard Center for Magnetic Resonance
at the Francis Bitter Magnet Laboratory
Massachusetts Institute of Technology
77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (USA)
Fax: (+1) 617-253-5405
E-mail: schwalbe@mit.edu

[**] Wir danken dem Massachusetts Institute of Technology, der Karl-Winnacker-Stiftung und dem NIH/NCRR-Programm (RR00995) für finanzielle Unterstützung sowie Elke Duchardt für Hilfe beim Anfertigen von Abbildungen.

Relaxation übrig bleibt. Im Festkörper hingegen sind die Wechselwirkungen ungemindert vorhanden und müssen daher bei der Wahl des Experiments berücksichtigt werden. Es gibt eine Reihe von Ansätzen in der Festkörper-NMR-Spektroskopie, die die anisotropen Wechselwirkungen entweder bei der Strukturbestimmung von biologischen Systemen unterdrücken oder für sie nutzen (siehe Abbildung 1).

Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie

Ein Ansatz besteht darin, Entkopplungen durch hohe Radiofrequenzfelder mit der Rotation der NMR-Probe im magischen Winkel zu kombinieren, um so die chemische Verschiebungsanisotropie und die dipolaren Kopplungen zu unterdrücken (Abbildung 1a). Festkörper-MAS-NMR-Spektren weisen häufig scharfe Linien bei einer Frequenz auf, die

nicht immer möglich, selektiv markierte Proben einzusetzen. Aus diesem Grund sind neue Berichte über die nahezu vollständige Signalzuordnung bei einheitlich ^{13}C , ^{15}N -markierten Proteinen mittels Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie von großem Interesse.

Die Gruppen McDermott, Zilm und Montelione^[1] haben das Protein BPTI untersucht, ein 6.5 kDa großes Protein mit 58 Resten, und die Gruppen Baldus, de Groot und Oschkinat^[2] haben die ^{13}C , ^{15}N -Signalzuordnung für eine SH3-Domäne mit 62 Resten veröffentlicht. Die Erfolge dieser beiden Arbeiten liegen zu einem guten Teil darin begründet, dass optimierte Bedingungen für die Festkörperproben gefunden wurden, unter denen MAS-NMR-Spektren mit schmalen Signalen erhalten werden konnten. Aus überexprimiertem BPTI konnten mit Dialysemethoden Mikrokristalle erzeugt werden. Für die SH3-Domäne wiederum wurden mehrere Probenpräparationsbedingungen getestet: 1) Lyophilisieren aus einer Pufferlösung mit niedriger Salzkonzentration, 2) Lyophilisieren zu einem hydratisierten Pulver, 3) Lyophilisieren aus einer Pufferlösung mit PEG-8000 und Sucrose sowie 4) Fällung aus einer konzentrierten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung.^[3] Die Unterschiede in der Spektrenqualität in Abhängigkeit von der Probenpräparation sind erstaunlich: Die Linienbreite konnte bei der SH3-Domäne durch das Fällen (Bedingung 4) von 190 auf 70 Hz reduziert werden. Pauli et al.^[2] zeigten, dass eine fast vollständige Signalzuordnung bei einem einheitlich ^{13}C , ^{15}N -markierten Protein durch Festkörper-NMR-Spektroskopie möglich ist, wenn man derartig optimierte Proben zur Verfügung hat. Abbildung 2 gibt ein typisches Spektrum wieder, in dem die Amidstickstoffatome mit den Kohlenstoffatomen der Seitenkette korreliert sind.

Die Verfügbarkeit zweier einheitlich markierter Proteinsysteme, die sich für die Festkörper-MAS-NMR-Spektroskopie eignen, ermöglichte es, Methoden der Signalzuordnung auch für größere Proteine unter realistischen Bedingungen zu optimieren. Auf der Grundlage vorheriger Methodenentwicklung an kleinen Peptiden^[4] haben Pauli et al. eine Reihe von Festkörper-NMR-Experimenten für ein Protein optimiert: Die ersten beiden Zuordnungsexperimente, NCO und NCA, wiesen die Konnektivität zwischen Amidstickstoffatom und direkt gebundenem C'- bzw. C_α -Atom nach. Ein solcher selektiver Transfer wird durch Frequenzband-selektive Experimente ermöglicht.^[5] In den nächsten beiden Experimenten wurde mit Hilfe eines zusätzlichen Transferschritts Kohärenz von den C'- und C_α -Atomen in das inter- bzw. intraresiduale Kohlenstoffnetzwerk transferiert. In Abhängigkeit von der verwendeten Kontaktzeit wird Kohärenz entweder auf die direkt gebundenen oder auf weiter entfernte Kohlenstoffatome transferiert.

McDermott et al.^[1] berichten, dass die isotropen chemischen Verschiebungen für die Mehrzahl der beobachteten Kreuzpeaks im Festkörper und in Lösung sehr ähnlich sind. Damit können chemischen Verschiebungen, die aufgrund von Untersuchungen in Lösung zugeordnet wurden, zumindest zum Teil auf die Festkörperspektren übertragen werden. Besonders interessant ist eine solche Übertragung für eine vergleichende Untersuchung der chemischen Verschiebung vor und nach Bindung eines Liganden an das untersuchte Protein z.B. in einer Lipidumgebung. Gleichzeitig wurden

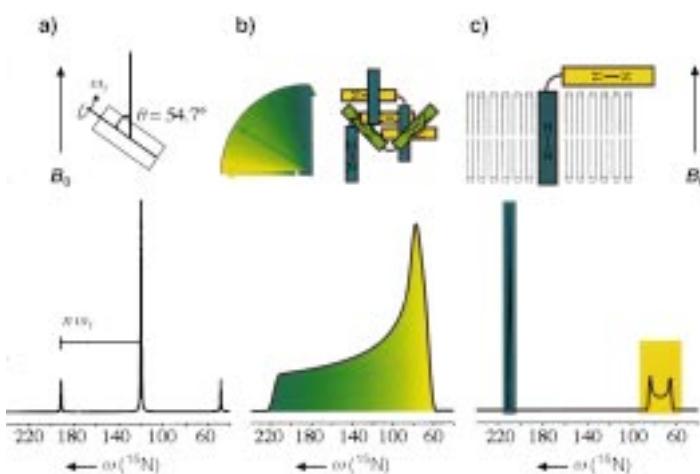


Abbildung 1. Drei Methoden der Festkörper-NMR-Spektroskopie. Oben ist jeweils der experimentelle Ansatz, unten ein mit diesem Ansatz erhaltenes eindimensionales ^{15}N -NMR-Spektrum gezeigt. a) MAS: Die Probe wird mit einer Rotationsfrequenz ω_r um eine Achse rotiert, die einen Winkel von 54.7° ($= \theta \approx \cos^{-1} \sqrt{1/3}$) mit dem Magnetfeld \mathbf{B}_0 bildet. Dies führt zu einer Mittelung der anisotropen Wechselwirkungen. Neben dem eigentlichen Resonanzsignal treten Rotationsseitenbanden im Abstand von Vielfachen der Rotorfrequenz ω_r auf. b) Statische, nichtorientierte Proben liefern eine breite Frequenzverteilung im NMR-Spektrum, die durch die CSA bedingt ist. c) Bei Proben, die in Lipiddoppelschichten orientiert sind, hängt die gemessene chemische Verschiebung von der Orientierung der betrachteten Amideinheit zur Normalen der Doppelschicht ab. In den Experimenten wird die Normale der Doppelschicht mechanisch parallel zum \mathbf{B}_0 -Feld ausgerichtet.

einzig von der isotropen chemischen Verschiebung bestimmt wird. In dieser Hinsicht sind sie mit Spektren in Lösung vergleichbar, und der Informationsgehalt ist zumindest qualitativ ähnlich. So werden in mehrdimensionalen MAS-NMR-Spektren chemische Verschiebungen korreliert, woraus wie in der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie in Lösung auf Konnektivität und räumliche Nähe geschlossen werden kann. In der Vergangenheit wurden für Festkörper-MAS-NMR-Experimente an biologischen Systemen häufig Proben verwendet, die an spezifischen Stellen mit NMR-aktiven Isotopen wie ^{13}C oder ^{15}N markiert waren. Diese Studien haben sich auf spezifische strukturelle Fragestellungen konzentriert, wobei es unter anderem möglich war, ausgewählte Atomabstände mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Es ist jedoch

HIGHLIGHTS

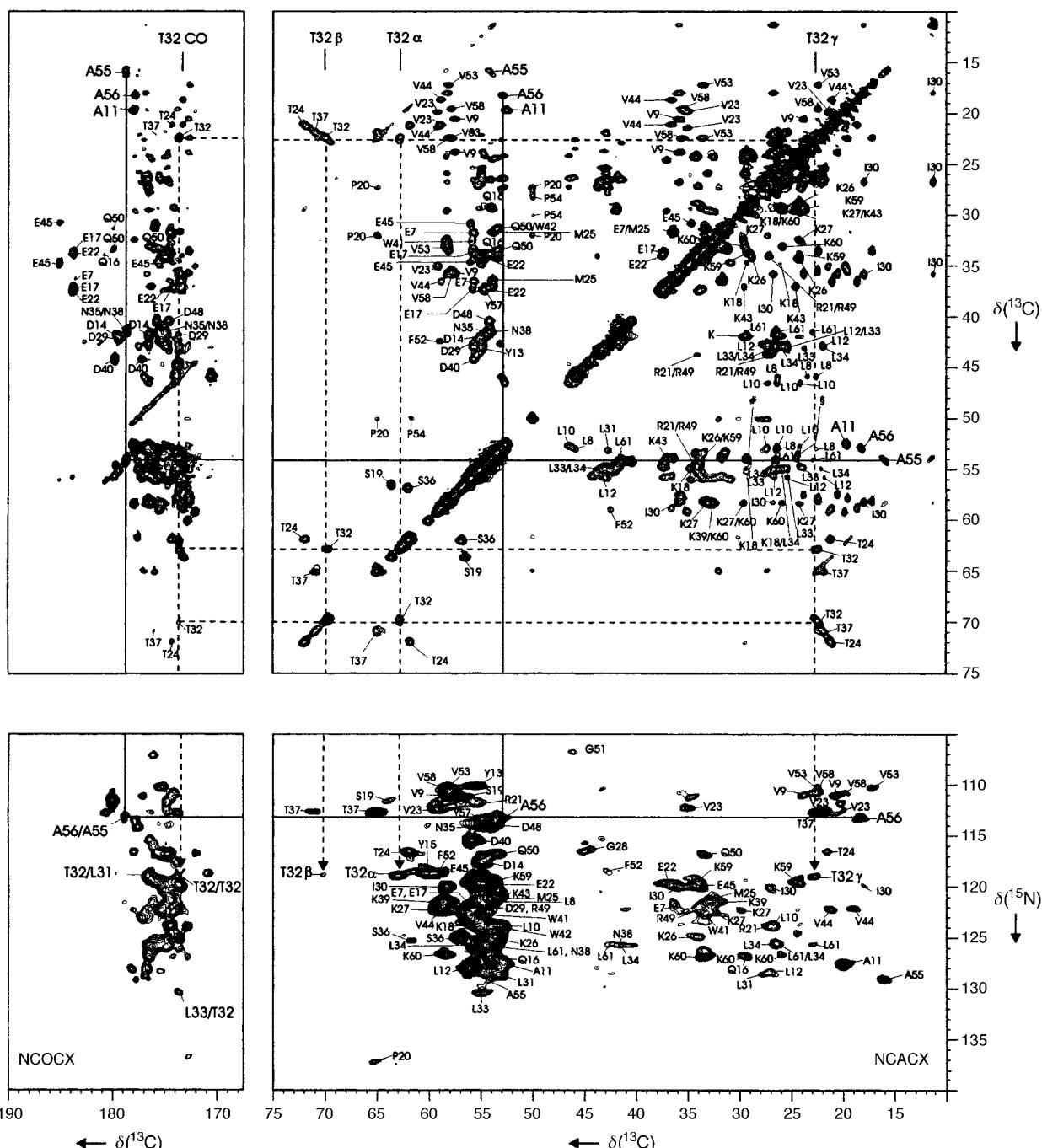


Abbildung 2. Zwei Bereiche des durch Protonen-Spins getriebenen Spindiffusions-Festkörper-MAS-NMR-Spektrums einer einheitlich ^{13}C , ^{15}N -markierten Probe einer SH3-Domäne (proton driven spin diffusion, PDSD). Oben: Das linke Bild enthält Kreuzpeaks zwischen aliphatischen und Carbonylkohlenstoffatomen, das rechte solche zwischen aliphatischen Kohlenstoffatomen. Unten: Die NCO- (links) und NCA-Bereiche (rechts) des NCOCX- bzw. NCACX-Spektrums. Die Abbildungen wurde freundlicherweise von H. Oschkinat^[2] zur Verfügung gestellt.

intensiv Methoden entwickelt, um ^{13}C - ^{13}C - und ^{13}C - ^{15}N -Abstände^[6] sowie Torsionswinkel-Einschränkungen^[7] in einheitlich markierten Proteinen zu messen. Damit ist die Möglichkeit, Proteinstrukturen im Festkörper mit Hilfe der NMR-Technik aufzuklären, in greifbare Nähe gerückt. Wie McDermott et al.^[1] zusätzlich durch Spektrenvergleich zeigten, wird es für die Bestimmung der Struktur größerer Systeme unverzichtbar sein, Höchstfeldspektrometer mit Protonenfrequenzen von 750 oder 800 MHz zur Verfügung zu haben, um die erforderliche Auflösung zu erreichen.

Festkörper-NMR-Spektroskopie an statisch orientierten Proben

Ganz anders sieht es aus, wenn man im Festkörper Spektren ohne MAS aufnimmt. Orientierungsabhängige magnetische Wechselwirkungen wie CSA und direkte Dipol-Dipol-Kopplungen zwischen kovalent gebundenen Kernen, z. B. zwischen ^1H und ^{15}N , dominieren das Spektrum, während mehrdimensionale Spektren die Korrelation zwischen verschiedenen anisotropen Wechselwirkungen zeigen. Der In-

formationsgehalt der Spektren hängt von der Orientierung der statischen Probe im Magnetfeld ab. Ist die Probe stark orientiert (Abbildung 1c), wie dies bei einem in einer Lipiddoppelschicht rekonstituierten Protein möglich ist, dann besteht das Spektrum aus diskreten Signalen. Auf den ersten Blick ähnelt es somit einem in Lösung oder mit der MAS-Technik aufgenommenen Spektrum, doch gibt es einen bedeutenden Unterschied: Die Frequenzen der Kreuzpeaks hängen in jeder Frequenzdimension von der Orientierung der Moleküle relativ zum magnetischen Feld ab. Diese Eigenschaft kann dazu genutzt werden, die Orientierung einzelner Strukturelemente eines Moleküls zu bestimmen, sodass weitere Untersuchungen die gesamte Molekülstruktur zugänglich machen sollten.

Die PISEMA-Methode^[8] ist die Methode der Wahl zur Untersuchung orientierter Systeme. Bei dieser zweidimensionalen NMR-Methode wird die dipolare Kopplung zwischen ^1H und ^{15}N in der Frequenzdomäne ω_1 mit der zugehörigen ^{15}N -CSA in der Frequenzdomäne ω_2 korreliert. Bei einheitlich ^{15}N -markierten Membranproteinen in orientierten Doppelschichten liefern PISEMA-Experimente Aussagen über die Winkel zwischen Amideinheiten und Doppelschicht-Normaler. Die Doppelschicht ist typischerweise mechanisch parallel zum \mathbf{B}_0 -Feld ausgerichtet.^[9] Der traditionelle Ansatz zur Analyse von PISEMA-Spektren erfordert eine sehr genaue Zuordnung der Kreuzpeaks, um Aussagen über die Proteinsekundärstruktur treffen zu können. Bei größeren Proteinen beobachtet man in zunehmendem Maße Signalüberlagerungen, was eine vollständige Zuordnung erschwert. Diese Überlagerungen können jedoch mit einem neuen dreidimensionalen PISEMA-Experiment zumindest teilweise aufgelöst werden, indem das zweidimensionale PISEMA-Experiment zusätzlich mit der CSA des Amidprotons korreliert wird.^[10]

Marassi und Opella^[11] sowie die Gruppe um Cross^[12] haben kürzlich festgestellt, dass Sekundärstrukturinformation auch durch einfache Analyse der 2D-PISEMA-Spektren erhalten werden kann. Erstaunlicherweise kann damit das Vorliegen einer Helix nachgewiesen werden. Zudem lassen sich ihr Neigungswinkel relativ zur Doppelschicht und auf der Grundlage vorläufiger Signalzuordnung auch die Orientierung einer Wiederholungseinheit innerhalb der Helix in Bezug auf die Rotation um die Helixachse sowie die Helixhändigkeit bestimmen. Die dipolare Kopplung zwischen ^1H und ^{15}N sowie die ^{15}N -CSA können als Tensoren geschrieben werden. Auch wenn die Unterschiede in Größe und Orientierung der CSA der ^{15}N -Kerne durchaus signifikant sein und interessante Informationen über Struktur und Dynamik enthalten können, wurde in der hier besprochenen Analyse von konstanten und einheitlichen Werten für die CSA-Tensoren in der Peptidebene^[13] ausgegangen. Unter diesen Annahmen beschreibt Gleichung (1) das zweidimensionale Signal $F(\omega_2, \omega_1)$ des PISEMA-Experiments in guter Näherung. In dieser Glei-

$$\begin{aligned} F(\omega_2, \omega_1) &= F(\text{CSA}(\rho, \tau), \text{Dipol-Dipol-Kopplung}(\rho, \tau)) \\ &= (\sigma_{11}(-0.828 \cos \rho \sin \tau - 0.558 \sin \rho \sin \tau - 0.047 \cos \tau)^2 \\ &\quad + \sigma_{22}(0.554 \cos \rho \sin \tau - 0.803 \sin \rho \sin \tau - 0.220 \cos \tau)^2) \\ &\quad + \sigma_{33}(-0.088 \cos \rho \sin \tau + 0.206 \sin \rho \sin \tau - 0.975 \cos \tau)^2, \\ &\quad \nu_{\parallel}/2((-0.326 \cos \rho \sin \tau + 0.034 \sin \rho \sin \tau - 0.946 \cos \tau)^2 - 1) \end{aligned} \quad (1)$$

chung sind $\sigma_{11} = 64$, $\sigma_{22} = 77$ und $\sigma_{33} = 217$ die Hauptkomponenten des ^{15}N -CSA-Tensors; der Dipoltensor und die σ_{33} -Komponente des CSA-Tensors stehen in einem Winkel von $\theta = 17^\circ$ zueinander (siehe Abbildung 3b). $\nu_{\parallel} = -10.4$ kHz ist die dipolare Kopplung für eine Amideeinheit, die parallel zu \mathbf{B}_0 liegt, τ beschreibt die Neigung der Helixachse bezogen auf das Magnetfeld \mathbf{B}_0 (und die Normale der Lipiddoppelschicht) und ρ die Orientierung einer Amideinheit bei Rotation um die Helixachse.

Wegen der Regelmäßigkeit einer helicalen Struktur sind die Amidbindungen gleichförmig entlang der Helix orientiert. Dies führt zu einer grob elliptischen Anordnung der Kreuzpeaks in einem 2D-PISEMA-Spektrum. Abbildung 3a zeigt simulierte PISEMA-Spektren als Funktion des Neigungswinkels τ der Helixachse bezogen auf die Normale der Lipiddoppelschicht und der Orientierung ρ spezifischer Aminosäurereste. Position und Form der im PISEMA-Spektrum beobachteten Ellipsen zeigen den Neigungswinkel τ der Helix an. Für einen Winkel $\tau = 15^\circ$ werden 2 Ellipsen aus jeweils 18 Peaks an den beiden Rändern des ^{15}N -Spektrums beobachtet. Die Feinstruktur jeder Ellipse, 18 Peaks für eine kanonische α -Helix, ist auf die verschiedenen Aminosäurereste innerhalb der Helix zurückzuführen. Die Signallage zeigt die Position der Amideinheiten nach Rotation um die Helixachse an. Die Zahlen für die einzelnen Aminosäurereste in Abbildung 3a belegen, dass die Abfolge der Kreuzpeaks innerhalb einer Ellipse durch die helicale Händigkeit bestimmt wird. Durch Analyse der Spektren können also Händigkeit, Neigung und Rotationsverschiebung eines jeden Restes einer Helix (idealerweise 3.6 Reste pro Helixwindung) bestimmt werden und die Signale allein aufgrund der Anordnung ihrer 2D-Korrelationspeaks im PISEMA-Spektrum zugeordnet werden.

Festkörper-NMR-Spektroskopie an statischen, nichtorientierten Proben

Spektren von statischen, nichtorientierten Festkörperproben (Abbildung 1b) weisen große qualitative Unterschiede zu den Spektren orientierter Proben auf. Durch die unterschiedliche Ausrichtung der Moleküle im Magnetfeld ergibt sich eine Frequenzverteilung, d.h., das Signal jeder molekularen Einheit liefert ein sogenanntes Pulverspektrum. Dies führt häufig zu unerwünschter spektraler Überlagerung, wenn die Probe nicht spezifisch markiert ist. In mehrdimensionalen Spektren von statischen Proben beobachtet man in jeder Dimension breite Signale, was typischerweise das Bild einer hügeligen Landschaft ergibt, aus dem sich die anisotropen Wechselwirkungen und die Art ihrer Korrelation ablesen lassen. Das Spektrum einer statischen, nichtorientierten Probe, in dem ^1H - ^{15}N -Dipol-Dipol-Kopplungen mit den ^{15}N -CSAs korreliert sind, ist in Abbildung 3c wiedergegeben; es kann als gewichtete Summe über alle Helixorientierungen τ und ρ aus Abbildung 3a interpretiert werden. Solche 2D-Pulverspektren werden gewöhnlich durch Simulation und iteratives Anpassen analysiert und letztlich aufgrund der relativen Orientierung der Dipol- und CSA-Tensoren bestimmt.

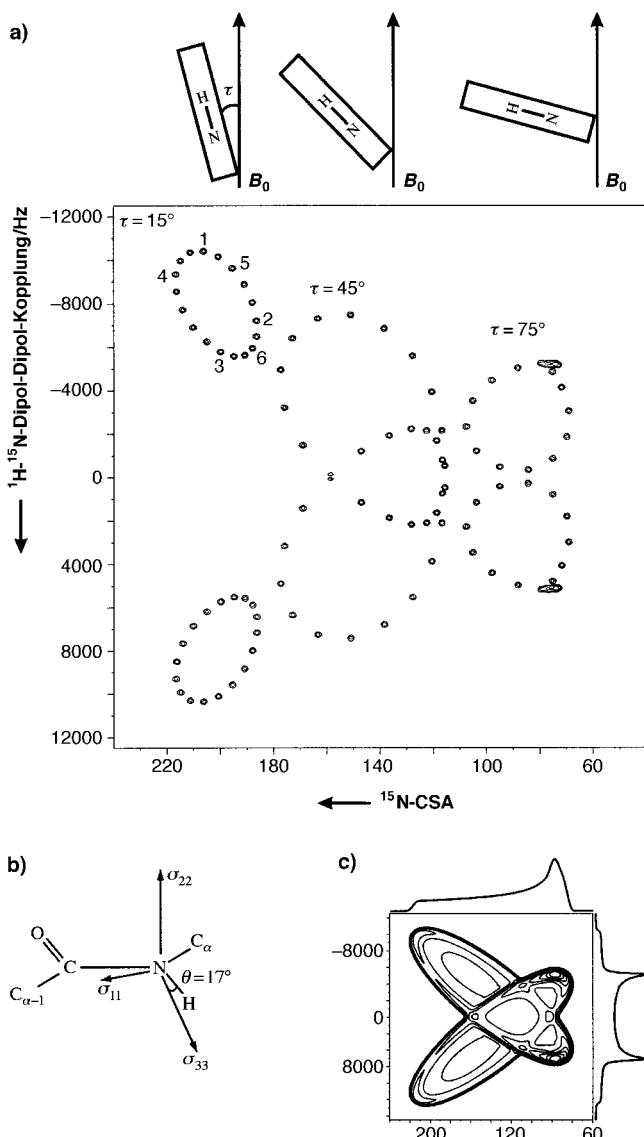


Abbildung 3. a) Für verschiedene Orientierungen τ einer Helix bezogen auf die Normale der Doppelschicht simulierte 2D-PISEMA-Spektren. Die Simulationen gehen von einer idealisierten Helix, von Standardbindungs- winkeln in der Peptidebene und von Standardwerten für die relative Orientierung der Dipol- und CSA-Tensoren aus. Für jedes der helicalen Räder wurde ρ (die Rotation um die Helixachse) in Inkrementen von 100° (d.h. 3.6 Reste pro Helixwindung) berechnet. Jeder Kreuzpeak innerhalb einer Ellipse entspricht einem einzigen Aminosäurerest einer kanonischen α -Helix, die mit dem angegebenen Winkel τ zur Normalen der Doppelschicht ausgerichtet ist. Eine rechtshändige Helix führt zu einer Verteilung der Signallagen der Aminosäurereste im Uhrzeigersinn (1–6 für $\tau = 15^\circ$). b) Orientierung der ${}^{15}\text{N}$ -CSA-Tensorelemente in der Peptidebene. c) Simulation des Dipol-CSA-Korrelationsspektrums einer nichtorientierten Probe. Die Projektionen zeigen auf der horizontalen Achse das CSA- Pulverspektrum und auf der vertikalen Achse das dipolare Pake-Spektrum. Die Parameter für die CSA und für die dipolare Kopplung wurden wie in Abbildung 3a gewählt; auch die Achsenbeschriftungen sind identisch. Es wurde eine isotrope Verteilung aller Orientierungen im Pulver angenommen.

Man kann allerdings auch verschiedene CSA-Tensoren entlang des Polypeptidrückgrats miteinander korrelieren. Die Gruppe von Meier hat einen solchen Ansatz gewählt, um die Rückgratkonformation eines Seidenproteins zu bestimmen. Dazu analysierten sie die Korrelation der ${}^{13}\text{C}$ -CSAs benach-

barter Carbonylkohlenstoffatome in ${}^{13}\text{C}$ -markierten Seidenproben.^[14] Hierzu wurde ein Doppelquanten-Einquanten-Korrelationsspektrum aufgenommen, bei dem Doppelquanten benachbarter Carbonylkohlenstoffkerne in der ersten Evolutionsperiode des 2D-Korrelationsexperiments (DOQSY) korreliert werden.^[15] Die Ausrichtung der Carbonyl-CSA bezogen auf die C-O- und C-N-Bindungen ist bereits bekannt. Dies und die Kenntnis typischer Bindungswinkel und -längen reichen aus, um aus dem DOQSY-Spektrum Torsionswinkel des Proteintrückgrats zu bestimmen. Für jedes Paar von Rückgratwinkeln (ϕ, ψ) ergibt sich ein charakteristisches 2D-Pulverspektrum (Abbildung 4). Zu jedem experimentellen Pulverspektrum könnte das Torsionswinkelpaar durch iteratives Fitten bestimmt werden, d.h., indem man so lange die Werte von ϕ und ψ ändert, bis die Simulation dem gemessenen Spektrum entspricht. Van Beek et al.^[14] haben eine genauere Analyse durchgeführt, indem sie simulierte Spektren mit der jeweiligen Wahrscheinlichkeitsfunktion $P(\phi, \psi)$ gewichtet haben, um das experimentelle 2D-Pulverspektrum zu rekonstituieren.

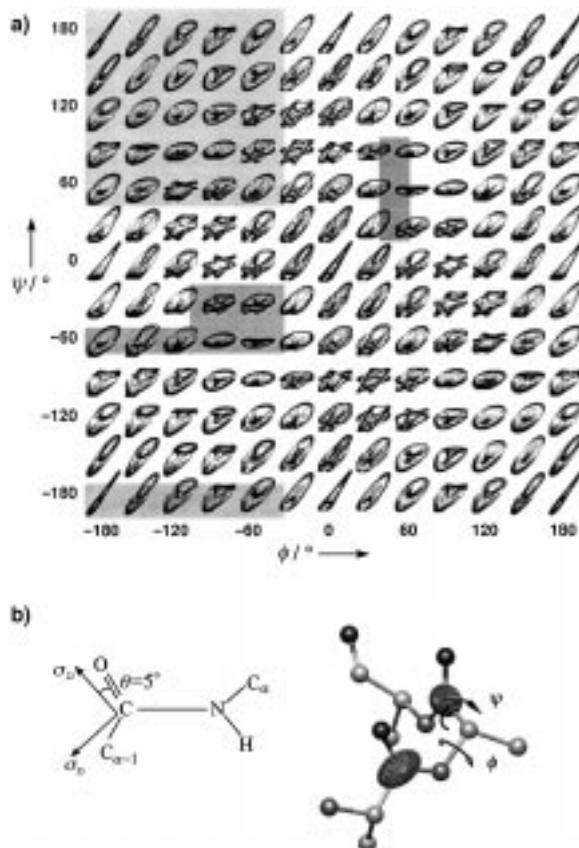


Abbildung 4. (ϕ, ψ)-Abhängigkeit der DOQSY-Spektren in der Zweispinnäherung. a) Simulierte DOQSY-Spektren als Funktion von ϕ und ψ . Die energetisch bevorzugten Bereiche des Ramachandran-Diagramms sind grau unterlegt. Jedes Teilbild ist ein ${}^{13}\text{C}$ -DOQSY-Spektrum, das einen chemischen Verschiebungsbereich von ungefähr 490 bis 180 ppm auf der vertikalen Doppelquantendimension und von 245 bis 90 ppm auf der horizontalen Einquantendimension überstreicht. b) Torsionswinkel eines Polypeptids und Orientierung der ${}^{13}\text{C}$ -CSA-Tensorelemente in der Peptidebene. Folgenden CSA-Werte wurden angenommen: $\sigma_{33} = 244.8$, $\sigma_{22} = 194.7$, $\sigma_{11} = 91.6$, $\theta = 5^\circ$ (mit Genehmigung von *Nature* leicht modifiziert wiedergegeben).

Symmetriebeziehungen sind in Abbildung 4 deutlich zu erkennen: Man erhält identische Spektren für (ϕ, ψ) und $(-\phi, -\psi)$. Dies hat zur Folge, dass man links- und rechts-händige Helices im DOQSY-Experiment nicht unterscheiden kann. Zudem sind die Spektren der Torsionswinkelpaare (ϕ, ψ) und (ψ, ϕ) sehr ähnlich. Wie van Beek et al.^[14] berichten, haben die beiden Konformationen sehr ähnliche CSA-CSA-Korrelationen, woraus sich ähnliche DOQSY-Spektren ergeben. Dagegen bestehen Unterschiede in der Dipol-CSA-Korrelation, was zu einer unterschiedlichen Intensitätsverteilung über jedes der in Abbildung 4a dargestellten Spektren führt. Dadurch wird bei ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis der Experimente die strikte Symmetrie durchbrochen und eine Unterscheidung der beiden Torsionswinkelpaare möglich.

Das DOQSY-Experiment liefert sehr eindeutig interpretierbare Ergebnisse, wenn das Protein an spezifischen Stellen markiert ist. In der Studie an Seide wurde dies durch Fütterung der Seidenraupen mit Carbonyl-¹³C-markiertem Alanin erreicht; hiermit erhoffte man sich vor allem eine Anreicherung in Polyalaninbereichen. Die Anwendung des DOQSY-Experiments auf andere Proteine wird ähnlich spezifische Markierungsschemata erfordern. Die mechanischen Eigenschaften von Seide hängen vom Zustand der als kleine Kristallite in die Faser eingebetteten Polyalanindomänen ab.^[16] Für natürliche Seidenfasern zeigt das DOQSY-Spektrum, dass die Polyalanindomänen hauptsächlich in einer β -Faltblattkonformation vorliegen. In der gleichen Studie^[14] wurde ein „Seidenfilm“ aus der von der Seidendrüse abgegebenen Flüssigkeit präpariert, dessen Polyalanindomänen nach dem DOQSY-Spektrum eine α -helicale Konformation einnehmen. Diese experimentellen Befunde machen deutlich, dass die Konformation des Seidenproteins kritisch von der Präparationsmethode abhängt.

Die wenigen hier vorgestellten Beispiele heben einige neue Höhepunkte der Festkörper-NMR-Spektroskopie hervor: Es scheint möglich zu sein, die NMR-Signale einheitlich markierter Proteine im Festkörper zuzuordnen. Tensorkorrelationen in orientierten und nichtorientierten Proben ermöglichen eine sehr genaue Bestimmung von Sekundärstruktur-elementen. Zusätzlich haben Tensorkorrelationsexperimente^[15] eine große Bedeutung für die Entwicklung von Methoden der NMR-Spektroskopie in Lösung.^[17–19] Damit kommen sich zwei in der Vergangenheit getrennte Bereiche der NMR-Spektroskopie näher.

- [1] A. McDermott, T. Polenova, A. Bockmann, K. W. Zilm, E. K. Paulsen, R. W. Martin, G. T. Montelione, *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*, 209–219.
- [2] J. Pauli, M. Baldus, B. van Rossum, H. de Groot, H. Oschkinat, *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 272–281.
- [3] J. Pauli, B. van Rossum, H. Förster, H. J. M. de Groot, H. Oschkinat, *J. Magn. Reson.* **2000**, *143*, 411–416.
- [4] R. G. Griffin, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 508–512 (Supplement), zit. Lit.
- [5] M. Baldus, A. T. Petkova, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *Mol. Phys.* **1998**, *95*, 1197–1207.
- [6] K. Nomura, K. Takegoshi, T. Terao, K. Uchida, M. Kainoshio, *J. Biomol. NMR* **2000**, *17*, 111–123; S. Dusold, A. Sebald, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2000**, *41*, 185–264.
- [7] K. Schmidt-Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7601–7603; X. Feng, Y. K. Lee, D. Sandström, M. Edén, H. Maisel, A. Sebald, M. H. Levitt, *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *257*, 314–320; X. Feng, P. J. E. Verdegem, Y. K. Lee, D. Sandström, M. Edén, P. Bovee-Geurts, J. W. de Grip, J. Lugtenburg, H. J. M. de Groot, M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6853–6857; P. R. Costa, J. D. Gross, M. Hong, R. G. Griffin, *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *280*, 95–103; M. Hohwy, C. P. Jaroniec, B. Reif, C. M. Rienstra, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3219–3219.
- [8] H. Wu, A. Ramamoorthy, S. J. Opella, *J. Magn. Reson. A* **1994**, *109*, 270–272.
- [9] S. J. Opella, Y. Kim, P. McDonnell, *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 536–560.
- [10] F. M. Marassi, C. Ma, J. J. Gesell, S. J. Opella, *J. Magn. Reson.* **2000**, *144*, 156–161.
- [11] F. M. Marassi, S. J. Opella, *J. Magn. Reson.* **2000**, *144*, 150–155.
- [12] J. Wang, J. Denny, C. Tian, S. Kim, Y. Mo, F. Kovacs, Z. Song, K. Nishimura, Z. Gan, R. Fu, J. R. Quine, T. A. Cross, *J. Magn. Reson.* **2000**, *144*, 162–167.
- [13] G. S. Harbison, L. W. Jelinski, R. E. Stark, D. A. Torchia, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **1984**, *60*, 79–82; C. J. Hartzell, M. Whitfield, T. G. Oas, G. P. Drobny, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5862–5866; Q. Teng, T. A. Cross, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 439–447.
- [14] J. D. van Beek, L. Beaulieu, H. Schäfer, M. Demura, T. Asakura, B. H. Meier, *Nature* **2000**, *405*, 1077–1079.
- [15] M. Linder, A. Hoehner, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 4959–4970; P. M. Henrichs, M. Linder, *J. Magn. Reson.* **1984**, *58*, 458–461; K. Schmidt-Rohr, *Macromolecules* **1996**, *29*, 3975–3981.
- [16] Z. Yang, P. T. Grubb, L. W. Jelinski, *Macromolecules* **1997**, *30*, 8254–8261.
- [17] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366–12371.
- [18] B. Reif, M. Hennig, C. Griesinger, *Science* **1997**, *276*, 1230–1233; D. Yang, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9880–9887; I. C. Felli, C. Richter, C. Griesinger, H. Schwalbe, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1956–1957; P. Pelupessy, E. Chiarparin, R. Ghose, G. Bodenhausen, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 375–380.
- [19] J. Boyd, C. Redfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7441–7442; J. Boyd, C. Redfield, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9692–9693.