

Biomolekulare NMR-Spektroskopie

DOI: 10.1002/ange.200601008

NMR-Spektroskopie von Laser-polarisiertem ^{129}Xe unter kontinuierlichem Fluss: eine Methode zur Untersuchung von Biomolekülen in wässrigen Lösungen**

Daniela Baumer, Eike Brunner,* Peter Blümller,
Paul Philipp Zänker und Hans Wolfgang Spiess*

Die NMR-Spektroskopie von ^{129}Xe ist eine wichtige Methode zur Untersuchung von chemischen Eigenschaften und Strukturen, z.B. von Wirt-Gast-Wechselwirkungen,^[1] mikroporösen Systemen,^[2] Oberflächen^[3] und vor allem Biomolekülen.^[4-6] Solche Untersuchungen werden meist in Lösung (hauptsächlich in Wasser) durchgeführt. Für Addukte und Adsorbate beträgt die chemische Verschiebung von ^{129}Xe (natürliche Häufigkeit 26.44%, $I=1/2$) mehr als $\delta = 300 \text{ ppm}$.^[7-9] Wegen der geringen Löslichkeit von Xenon in Wasser haben solche Messungen jedoch den Nachteil geringer Signalstärke. Durch die Verwendung von Laser-polarisiertem (LP) ^{129}Xe ^[10] kann dieses Problem prinzipiell überwunden werden. Dabei wird durch optisches Pumpen mit nachfolgendem Spinaustausch eine Kernspinpolarisation erreicht, die um mehrere Größenordnungen höher ist als die von ^{129}Xe im thermischen Gleichgewicht bei herkömmlichen Magnetfeldstärken von 5–25 T und Raumtemperatur. Laser-polarisiertes ^{129}Xe wird deshalb zunehmend in der Magnetresonanztomographie angewendet, z.B. in der Lungen- und Gehirnbildgebung^[11] oder in der Angiographie.^[12] Das Einbringen von Laser-polarisiertem ^{129}Xe -Gas in wässrige Lösungen ist jedoch weiterhin problematisch. Der Nachteil von Single-Batch-Experimenten ist die begrenzte Zeit des Experiments, da das Laser-polarisierte ^{129}Xe seine Polarisation auf der Zeitskala der longitudinalen Relaxationszeit T_1 (10–

100 s) verliert. Das depolarisierte Xenon sollte deshalb ständig durch frisch polarisiertes Gas ersetzt werden, was in Analogie zur NMR-Spektroskopie an Oberflächen durch Experimente mit kontinuierlichem Fluss zu realisieren wäre.^[13-15] Vor kurzem entwickelten Han et al.^[16] ein System, das geeignet ist, Laser-polarisiertes ^{129}Xe bei diskontinuierlichem Fluss in Lösung zu bringen. Dabei wird das Laser-polarisierte ^{129}Xe durch Mikrokapillaren in die Lösung injiziert. Während des NMR-Experiments muss der Xenongasfluss allerdings gestoppt werden, um die spektrale Auflösung aufrechtzuerhalten, die sonst durch den großen Unterschied der magnetischen Suszeptibilität zwischen der Gas- und Flüssigkeitsphase vermindert würde. Neue Studien zur Wechselwirkung von Xenon mit Phospholipidbicellen^[17] berichten explizit über Probleme beim Lösungsvorgang von Xenon durch das notwendige Schütteln der Probe und der daraus resultierenden Bildung von stabilen Schäumen.

Wir berichten hier über die ersten Anwendungen eines auf Membranen basierenden Systems, das unter kontinuierlichem Fluss (Durchfluss) arbeitet und dabei die spektrale Auflösung aufrechterhält, ohne dass der Gasfluss während der Messungen unterbrochen wird. Das Laser-polarisierte ^{129}Xe (2 % Polarisierung in der Gasphase) wird mit einem bereits beschriebenen Polarisator präpariert^[18] und unter kontinuierlichem Fluss durch ein neu entwickeltes Membransystem unter Verwendung kommerzieller Hohlfasermembranen (CELGARD, Membrana GmbH, Wuppertal; siehe Hintergrundinformationen) in Lösung gebracht.^[19] Ein weiteres Problem beim Lösen von Gasen z.B. in Lösungen von amphiphilen Molekülen, Proteinen usw. ist die Bildung von stabilen Schäumen. Durch unsere Methode wird auch dieses Problem umgangen, da die Gase auf einem „direkten“ Weg in Lösung gebracht werden. Das Gas diffundiert kontinuierlich durch die Nanoporen der Membran in die Flüssigkeit, ohne diese durch gebildete Blasen oder anderweitige mechanische Störungen, z.B. durch etwaiges Schütteln, zu beeinflussen. Um die Zuverlässigkeit unseres neuen Systems zu testen, wurde Laser-polarisiertes ^{129}Xe in Wasser, DMSO (Dimethylsulfoxid) und einer Lösung von Phospholipidbicellen untersucht. Die Phospholipidlösungen werden in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie für Proteinuntersuchungen verwendet^[20] und sind besonders anfällig für Schaumbildung.

Abbildung 1 zeigt charakteristische ^{129}Xe -NMR-Spektren von Laser-polarisiertem ^{129}Xe in Wasser (oben) und in DMSO (unten). Die Linienbreite des Signals des gelösten Xenons beträgt nur 0.3 bis 0.4 ppm (siehe vergrößerte Ausschnitte von Abbildung 1). Somit kann die chemische Verschiebung bis hin zu einer Genauigkeit von 0.03 bis 0.04 ppm gemessen werden. Die Verbreiterung des Gassignals auf der rechten Seite des Spektrums lässt sich auf rasch diffundierendes Gas in der heterogenen physikalischen Umgebung der Hohlfasern (Membran/freies Gas) zurückführen. Wie Kontrollexperimente zeigen, ist kein gasförmiges Xenon in der Flüssigkeit enthalten (siehe Hintergrundinformationen). Der Lösungsvorgang erfolgt dabei viel schneller als T_1 (siehe unten). Dadurch reicht die Polarisierung des gelösten Xenons an die maximal mögliche heran. Auf diese Weise werden durch das neue Membransystem Experimente mit Laser-polarisiertem ^{129}Xe in der biomolekularen hochauflösenden NMR-Spek-

[*] Dr. D. Baumer, Prof. E. Brunner
Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie
Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93040 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+ 49) 941-943-2479
E-Mail: eike.brunner@biologie.uni-regensburg.de

Dr. P. Blümller, Dipl.-Phys. P. P. Zänker, Prof. H. W. Spiess
Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)
Fax: (+ 49) 6131-379-100
E-Mail: spiess@mpip-mainz.mpg.de

Dr. P. Blümller
Forschungszentrum Jülich
ICG III, 52425 Jülich (Deutschland)

[**] Wir danken S. Appelt und W. Häsing (FZ Jülich) für die Entwicklung des Xenon-Polarisators und H.-D. Lemke (Membrana GmbH) für die Oxygenator-Hohlfasermembranen. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Br 1278/12-1 und Sp 98/6-2) unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

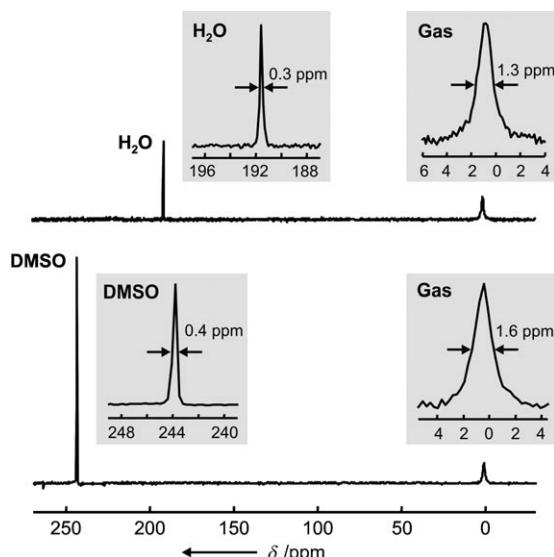


Abbildung 1. ^{129}Xe -NMR-Spektren von Laser-polarisiertem ^{129}Xe , gelöst in H_2O (oben) und DMSO (unten). Beide Spektren wurden mit zwei Scans bei $T=298\text{ K}$ aufgenommen. Als Referenz für die chemische Verschiebung diente das Gassignal. Die Linienbreite der Signale ist in den vergrößerten Ausschnitten angegeben.

troskopie unter kontinuierlichem Xenon-Fluss ermöglicht. Das Gassignal kann als interne Referenz der Spektren verwendet werden, da bei einem Xenonpartialdruck von 0.03 MPa eine chemische Verschiebung von 0.12 ppm zu erwarten ist.^[7,21] Der Einfluss von Helium in der Gasmischung kann vernachlässigt werden,^[8] wie aus Abbildung 2 deutlich wird: Im Unterschied zur Messung mit Laser-polarisiertem ^{129}Xe sind die Datenpunkte für reines Xenon ohne Helium aufgenommen. Die Vorteile dieser neuen Methode werden in zwei neuen Anwendungen aufgezeigt.

Lipidbicellen sind in zwei Bereichen von wachsendem Interesse:^[17] Zum einen dienen sie als Modellsysteme für Zellmembranen, da diese in der Regel aus Lipid-Doppelschichten bestehen. Zum zweiten werden heute viele biomolekulare NMR-Untersuchungen in Bicellen enthaltenden Lösungen ausgeführt, um eine partielle Orientierung der Moleküle zu erreichen.^[20] Bei der Verwendung von thermisch

polarisiertem Xenon müssen die Messungen bei hohen Gasdrücken (bis zu 2 MPa) ausgeführt werden, um ausreichende Signalintensität zu erhalten. Um die reine Xenon-Molekül-Wechselwirkung aus solchen Messungen zu bestimmen, muss die chemische Verschiebung auf einen Xenonpartialdruck von null extrapoliert werden, um Xenon-Xenon-Wechselwirkungen auszuschließen. Solche Messreihen sind folglich sehr zeitaufwändig. Messungen mit Laser-polarisiertem ^{129}Xe bieten dagegen die Möglichkeit, in einem einzelnen Experiment die chemische Verschiebung bei sehr niedrigem Xenonpartialdruck zu messen (hier 0.02 MPa).

Entsprechend wurde die chemische Verschiebung von thermisch polarisiertem ^{129}Xe in einer wässrigen Lösung der Phospholipide DMPC/DHPC^[*] als Funktion des Xenonpartialdrucks im Bereich von 0.25 bis 2 MPa bestimmt (siehe Hintergrundinformationen). Diese Ergebnisse wurden mit den Daten der Messungen mit Laser-polarisiertem ^{129}Xe unter kontinuierlichem Fluss bei 0.02 MPa verglichen (Abbildung 2). Die gemessene chemische Verschiebung steigt linear mit dem Druck an, d.h. mit wachsender Xenonkonzentration. Für die chemische Verschiebung δ bei 305 K ergab sich Zusammenhang (1).

$$\delta [\text{ppm}] = 188.46 + 0.88 p [\text{MPa}] \quad (1)$$

Die mit Laser-polarisiertem ^{129}Xe (188.5 ppm) bestimmte chemische Verschiebung bei niedrigem Druck (0.02 MPa) passt ausgezeichnet zu den mit thermisch polarisiertem Xenon gemessenen Werten (Abbildung 2). Dies bestätigt die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der spektroskopischen Messungen mit Laser-polarisiertem ^{129}Xe im Durchflussbetrieb unter Verwendung der neuen Membranapparatur.

Aus dem Vergleich der chemischen Verschiebung von Laser-polarisiertem ^{129}Xe in H_2O ($\delta = 190.9$ ppm) und in DMPC/DHPC ($\delta = 188.5$ ppm) lässt sich außerdem folgern, dass Xenon mit den Bicellen interagiert, da diese eine induzierte chemische Verschiebung von -2.4 ppm bei 305 K verursachen. Diese Größe kann sowohl zur Untersuchung der Xenon-Molekül-Wechselwirkungen als auch zur Unterscheidung zwischen spezifischen und nichtspezifischen Wechselwirkungen genutzt werden.^[4] Die Relaxationszeit T_1 von Xenon in der Lösung mit Bicellen betrug 40 s bei 311 K. Während die Messung mit Laser-polarisiertem ^{129}Xe nur etwa 5 Minuten dauerte, nahm ein einzelner Datenpunkt der druckabhängigen Messreihe im Durchschnitt 2 Stunden in Anspruch, entsprechend einer Gesamtmesszeit von etwa 12 Stunden.

Diese verringerte Messzeit ermöglicht es nun, auch zweidimensionale NMR-Spektren^[22] von ^{129}Xe aufzunehmen. Mit 2D-Austauschspektroskopie (EXSY) kann der Lösungsprozess des Laser-polarisierten ^{129}Xe in Wasser unter kontinuierlichem Fluss in Echtzeit verfolgt werden (Abbildung 3). Das Signal auf der Diagonalen bei ca. 0 ppm stammt von Xenongas in den Mikropipetten, das Signal bei ca. 190 ppm führt von dem im Wasser gelösten Xenon her. Bereits bei

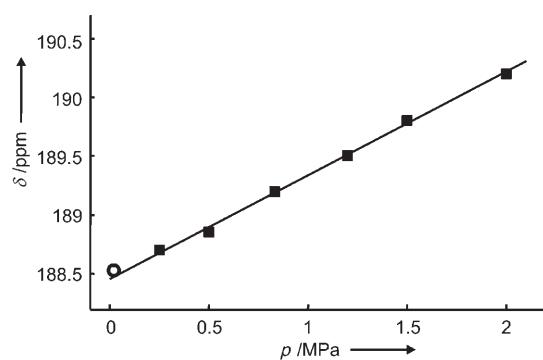


Abbildung 2. Chemische Verschiebung von ^{129}Xe in Abhängigkeit vom Xenonpartialdruck bei 308 K in einer wässrigen Lösung mit DMPC/DHPC-Bicellen. Der offene Kreis kennzeichnet die mit Laser-polarisiertem ^{129}Xe und der Membranmethode ausgeführte Messung, während die anderen Punkte mit thermisch polarisiertem ^{129}Xe aufgenommen sind.

[*] Dihexanoylphosphatidylcholin/Dimyristoylphosphatidylcholin; Einzelheiten zur Probenpräparation finden sich in den Hintergrundinformationen.

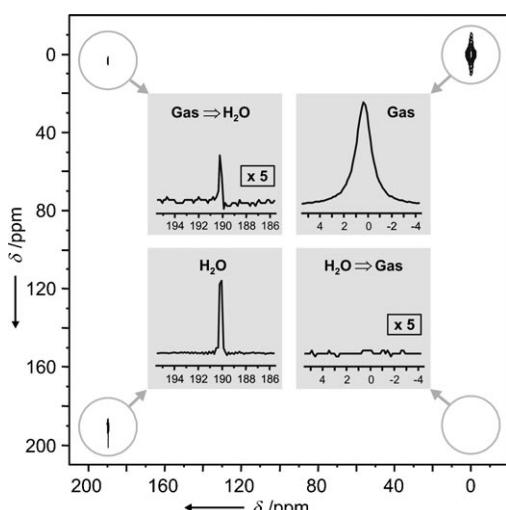


Abbildung 3. 2D-EXSY-Spektrum von Laser-polarisiertem ^{129}Xe , gelöst in H_2O ($T = 308 \text{ K}$, $t_{\text{mix}} = 1 \text{ ms}$). Messzeit: 68 min. Zu beachten ist die Asymmetrie des Spektrums: Nur ein Kreuzsignal tritt auf, das sich auf gasförmiges Xenon während der Evolutionszeit zurückführen lässt.

einer Mischzeit von nur 1 ms ist ein Kreuzsignal zu messen. Daraus lässt sich folgern, dass der Lösungsprozess von Xenon durch die Membran auf einer Zeitskala von Millisekunden abläuft (weitere Details in den Hintergrundinformationen). Die 2D-EXSY-Technik wird z. B. zur Untersuchung von Systemen, in denen ein langsamer Austausch von Xenon zwischen unterschiedlichen chemischen Umgebungen auftritt, von Nutzen sein. Dies ist z. B. in Blut^[23] oder Emulsionen der Fall. Der mit dieser Methode quantifizierbare dynamische Bereich erstreckt sich über etwa fünf Größenordnungen, von 100 μs bis 10 s.

Die hier vorgestellte Methode, Laser-polarisiertes ^{129}Xe im Durchflussbetrieb über Hohlfasermembranen in Lösung einzubringen, hat folgende wichtige Vorteile: Sie ist einfach anzuwenden, zuverlässig, robust und bedarf keiner speziellen Probenvorbereitung. Das neue System verhindert die Entstehung von Blasen und Schäumen und die damit einhergehende Linienverbreiterung. Die Polarisation bleibt erhalten, und die Relaxationszeit T_1 wird nicht verkürzt. Der kontinuierliche Betrieb ermöglicht das Aufaddieren der Signale und somit auch mehrdimensionale NMR-Messungen. Die Membranen sind außerdem in den meisten Flüssigkeiten stabil, die für das Lösen von Biomolekülen verwendet werden (Wasser, Alkohole, DMSO).

Obwohl durch Laserpolarisation das NMR-Signal so stark erhöht werden konnte, dass selbst kleine Mengen von Xenon in Biomolekülen oder Gast-Strukturen nachgewiesen werden können, sind Anwendungen bisher noch relativ selten, da der Lösungsprozess ein Haupthindernis ist. Unsere Methode vereinfacht durch die Verbesserung des Lösungsvorgangs die Anwendung von Laser-polarisiertem ^{129}Xe (oder anderen Gasen mit kurzlebigen physikalischen Eigenschaften) in spektroskopischen Experimenten. Es wurde gezeigt, dass das vorgestellte Verfahren die Anwendung von Laser-polarisiertem ^{129}Xe in der biomolekularen hochauflösenden NMR-Spektroskopie unter kontinuierlichen Flussbedingungen bei niedrigem Xenonpartialdruck ermöglicht. Außerdem lassen

sich erstmals 2D-NMR-Spektren in Lösung unter kontinuierlichem Xenonfluss aufnehmen. Wir hoffen, mit dieser Entwicklung einen Beitrag zur breiteren Anwendung von hyperpolarisierten Gasen in diesem wachsenden Forschungsgebiet geleistet zu haben.

Eingegangen am 14. März 2006,
veränderte Fassung am 27. Juli 2006
Online veröffentlicht am 2. Oktober 2006

Stichwörter: Gaslösungen · Laserpolarisation · Lipidbicellen · NMR-Spektroskopie · Xenon

- [1] Y.-Q. Song, B. M. Goodson, R. E. Taylor, D. D. Laws, G. Navon, A. Pines, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2464–2466; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2368–2370.
- [2] D. V. Soldatov, I. L. Moudrakovski, J. A. Ripmeester, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6468–6471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6308–6311.
- [3] D. Raftery, H. Long, T. Meersmann, P. J. Grandinetti, L. Reven, A. Pines, *Phys. Rev. Lett.* **1991**, *66*, 584–587.
- [4] S. M. Rubin, M. M. Spence, B. M. Goodson, D. E. Wemmer, A. Pines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9472–9475.
- [5] C. Landon, P. Berthault, F. Vovelle, H. Desvaux, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 762–770.
- [6] T. J. Lowery, M. Doucette, E. J. Ruiz, S. M. Rubin, A. Pines, D. E. Wemmer, *Protein Sci.* **2005**, *14*, 848–855.
- [7] C. J. Jameson, A. K. Jameson, S. M. Cohen, *J. Chem. Phys.* **1973**, *59*, 4540–4546.
- [8] A. K. Jameson, C. J. Jameson, H. S. Gutowsky, *J. Chem. Phys.* **1970**, *53*, 2310–2321.
- [9] T. Ito, J. Fraissard, *J. Chem. Phys.* **1982**, *76*, 5225–5229.
- [10] T. G. Walker, W. Happer, *Rev. Mod. Phys.* **1997**, *69*, 629–642.
- [11] M. Albert, G. Cates, B. Driehuys, W. Happer, B. Saam, C. S. Springer, A. Wishnia, *Nature* **1994**, *370*, 199–201.
- [12] H. E. Möller, M. S. Chawla, X. J. Chen, B. Driehuys, L. W. Hedlund, C. T. Wheeler, G. A. Johnson, *Magn. Reson. Med.* **1999**, *41*, 1058–1064.
- [13] M. Haake, A. Pines, J. A. Reimer, R. Seydoux, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11711–11712.
- [14] E. Brunner, R. Seydoux, M. Haake, A. Pines, J. Reimer, *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 145–148.
- [15] A. Nossov, F. Guenneau, M.-A. Springuel-Huet, E. Haddad, V. Montouillout, B. Knott, F. Engelke, C. Fernandez, A. Gédéon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 4479–4483.
- [16] S. Han, S. Garcia, T. J. Lowery, E. J. Ruiz, J. A. Seeley, L. Chavez, D. S. King, D. E. Wemmer, A. Pines, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4008–4012.
- [17] X. Li, C. Newberry, I. Saha, P. Nikolaou, N. Whiting, B. M. Goodson, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *419*, 233–239.
- [18] N. J. Shah, T. Ünlü, H.-P. Wegener, H. Halling, K. Zilles, S. Appelt, *NMR Biomed.* **2000**, *13*, 214–219.
- [19] P. P. Zänker, P. Blümller, H. D. Lemke, H. W. Spiess, Deutsche Patentanmeldung (DE 102005026604.5): „Verfahren zum Lösen von Gasen mit kurzlebigen physikalischen Eigenschaften in einer Flüssigkeit (Xenonizer)“, **2005**, eingereicht.
- [20] N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, *278*, 1111–1114.
- [21] D. Baumer, A. Fink, E. Brunner, *Z. Phys. Chem.* **2003**, *217*, 289–293.
- [22] J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4533–4546.
- [23] A. Bifone, Y.-Q. Song, R. Seydoux, R. E. Taylor, B. M. Goodson, T. Pietrass, T. F. Budinger, G. Navon, A. Pines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12932–12936.