NMR-Spektroskopie an Peptaibolen im Festkörper und in Lösung: Chemische Verschiebungstensoren in α-Aminoisobuttersäure und Strukturuntersuchungen an Chrysospermin C

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Physikalisch-Astronomischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Phys. Bert Heise

geboren am 06. 07. 1969 in Dortmund

Gutachter:

1. Prof. Dr. C. Jäger
2. Prof. Dr. A. S. Ulrich
3. Prof. Dr. H. Oschkinat

Tag der letzten Rigorosumsprüfung: 23. 11. 2001

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. 12. 2001

Gorter, C. J. and Broer, L. J. F. (1942).
Negative Result of an Attempt to Observe Nuclear Magnetic Resonance in Solids.
Physica **9**, 591.

Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde in der Arbeitsgruppe Molekulare Biophysik/NMR-Spektroskopie des Instituts für Molekulare Biotechnologie Jena e. V. durchgeführt.

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei den Personen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben:

I would like to thank Dr. Ramadurai Ramachandran for his enormous support, ideas and spirit throughout our struggling time of solid state NMR and the countless things I could learn from him about NMR.

Mein ganz besonderer Dank gilt Jörg Leppert, ohne dessen Simulations- und Optimierungsprogramme ein großer Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Es sollte auch nicht vergessen werden, daß er „nebenbei“ auch noch die NMR-Spektrometer in Schuß hielt. Ich wünsche ihm viel Erfolg für seine eigene Promotion!

Bei Prof. Dr. Christian Jäger möchte ich mich für die Übernahme des Hauptgutachtens bedanken.

Dr. Matthias Görlach hielt unsere Gruppe in schwierigen Zeiten zusammen und ermöglichte durch seinen großen Einsatz ein Fortbestehen unserer Forschung. Mein Dank hierfür kann nicht groß genug ausfallen. Außerdem bedanke ich mich für seine vielen Ideen und Anregungen rund um das „Laborleben“.

Für seine Unterstützung, insbesondere bei der Auswertung der NMR-Spektren in Lösung, möchte ich Dr. Oliver Ohlenschläger ganz herzlich danken.

Bei Dr. Matthias Stoldt und Dr. Jens Wöhnert bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Herstellung diverser von mir untersuchter Substanzen und für ihre Unterstützung bei der Aufnahme und Auswertung von NMR-Spektren in Lösung.

Für ihre Hilfe in Computerfragen sowie das Instandhalten des Computernetzes bedanke ich mich bei Manfred Semm, Jörg Leppert, Falk Tschierske und Fritz Haubensak.

Ein herzliches Dankeschön geht an die guten Seelen des Labors, Renate Lamprecht, Sabine Häfner und Antje Figuth, die mir immer mit Rat und Tat beiseite standen, wenn ich im Labor Hilfe benötigte.

Ilona Weih danke ich für ihre Hilfestellung in organisatorischen Belangen.

Dafür, daß ich für drei Monate Mitglied seiner Arbeitsgruppe sein durfte, möchte ich Dr. Dieter Willbold herzlich danken.

Dr. Klausjürgen Dornberger und Brigitte Schlegel möchte ich für die so erfolgreiche Herstellung uniform isotopenmarkierter Chrysospermine danken sowie für die Bereitstellung unmarkierten Chrysospermins.

Für die Herstellung selektiv isotopenmarkierten Chrysospermins und verschiedener markierter AibAib-Dipeptide bedanke ich mich bei Dr. Holger Wenschuh, Jerini BioTools, Berlin.

Dr. Gerald Simon und Dr. Eberhard Hoffmann, Varian Darmstadt, danke ich für ihre Hilfestellung bei Spektrometerfragen und für die Bereitstellung von NMR-Meßzeit im Applikationslabor der Firma Varian.

Maria Brandl gilt mein Dank für ihre Hilfe bei den quantenchemischen Berechnungen.

Dr. Roswitha Anders und Prof. Dr. Larry R. Brown möchte ich bei ihrer Unterstützung in der Anfangsphase meiner Arbeit danken.

Allen Mitarbeitern der NMR-Spektroskopie sei noch einmal für ihre kontinuierliche Unterstützung und für das freundliche Arbeitsklima gedankt.

Für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Jörg Leppert, Dr. Oliver Ohlenschläger, Dr. Matthias Görlach sowie Edith Heise.

Stoldti, Tens, CSich, Otti, den „Willbolds“, Heike, Andrea, Olaf und Regina möchte ich für die vielen netten Abende danken, ob bei Jever, Burger oder Uno, im TC, CC, Cheers und anderswo.

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich während meines Studiums und während meiner Doktorarbeit immer unterstützt haben.

Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht:

- Jörg Leppert, Bert Heise & Ramadurai Ramachandran (1999).
  Magic angle spinning NMR spectroscopy with composite RF pulses.
  Journal of Magnetic Resonance, 139, 382–388.

- Roswitha Anders, Oliver Ohlenschläger, Vukić Šoškić, Holger Wenschuh, Bert Heise & Larry R. Brown (2000).
  The NMR solution structure of the ion channel peptaibol chrysospermin C bound to dodecylphosphocholine micelles.
  European Journal of Biochemistry, 267(6), 1784–1794.

- Bert Heise, Jörg Leppert & Ramadurai Ramachandran (2000).
  Characterization of ^{15}N chemical shift tensors via ^{15}N-^{13}C REDOR and ^{15}N-^{1}H dipolar-shift CPMAS NMR spectroscopy.
  Solid State Nuclear Magnetic Resonance, 16/3, 177–187.

- Jörg Leppert, Bert Heise & Ramadurai Ramachandran (2000).
  ^{15}N CSA tensor magnitude and orientation in the molecular frame of uracil determined via MAS NMR.
  Journal of Magnetic Resonance, 145, 307–314.

- Bert Heise, Jörg Leppert & Ramadurai Ramachandran (2000).
  REDOR with adiabatic pulses.
  Journal of Magnetic Resonance, 146, 181–187.

- Jörg Leppert, Bert Heise & Ramadurai Ramachandran (2000).
  REDOR in IS_1S_2 systems.
  Journal of Biomolecular NMR, 18, 153–164.

- Bert Heise, Jörg Leppert, Holger Wenschuh, Oliver Ohlenschläger, Matthias Görlach & Ramadurai Ramachandran (2001).
  2D relayed anisotropy correlation NMR: Characterization of the ^{13}C′ chemical shift tensor orientation in the peptide plane of the dipeptide Aib-Aib.
  Journal of Biomolecular NMR, 19, 167–179.

- Jörg Leppert, Bert Heise, & Ramadurai Ramachandran (2001).
  Orientational information from TEDOR spectral sidebands.
  Solid State Nuclear Magnetic Resonance, 19, 1–18.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen **v**

Abkürzungsverzeichnis **x**

Programmnamen xi

1 Einleitung **1**

1.1 Magnetische Kernresonanz 1

1.2 Chrysospermin, ein Peptaibol 2

1.3 Magnetische Kernresonanz im Festkörper 3

1.3.1 Tensor der chemischen Verschiebung 4

1.3.2 Charaktierisierung chemischer Verschiebungstensoren mittels NMR-Methoden im Festkörper 5

1.3.2.1 Statische Methoden 5

1.3.2.2 MAS-NMR 6

1.3.2.3 Ausnutzen dipolarer Kopplungen 8

1.3.2.4 Der Fall $^{13}C'$ 8

1.3.2.5 Alternative Methoden zur Charakterisierung chemischer Verschiebungstensoren 9

1.3.3 Adiabatische Pulse 9

1.3.4 Magnetisch orientierte Bizellen 10

1.4 Magnetische Kernresonanz in Flüssigkeiten 11

1.4.1 Mizellare Lösungen 11

1.4.2 Isotrope Bizellen 11

1.5 Ziele der Arbeit 12

2 Herstellung isotopenmarkierter Proben für die NMR-Spektroskopie **15**

2.1 Markiertes Acetanilid und AibAib-Dipeptid 15

2.1.1 Homogenität des HF-Feldes in einem MAS-Rotor 16

2.2 Selektiv isotopenmarkiertes Chrysospermin C 17

2.3 Chrysospermin C in Liposomen 17

2.4 Magnetisch orientierbare Bizellen 17

2.5 Uniform isotopenmarkierte Chrysospermine 18

2.5.1 Trennung der Chrysospermine mittels HPLC 19
2.5.2 Chrysospermin-Proben für NMR-Experimente in Lösung 20

3 Charakterisierung chemischer Verschiebungstensoren mittels MAS NMR-spektroskopischer Methoden 22
3.1 Methoden 22
3.1.1 NMR-Spektroskopie 22
3.1.2 Numerische Berechnungen 23
3.2 Charakterisierung der chemischen Verschiebungsanisotropie von ^{15}N mittels CPMAS NMR 24
3.3 MAS NMR-Methoden zur Bestimmung der Orientierung von ^{15}N-CS-Tensoren 25
3.3.1 Orientierung der ^{15}N-^{13}C-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor: ^{15}N-^{13}C REDOR 25
3.3.1.1 „Purging“ 27
3.3.1.2 Sensitivität der ^{15}N-^{13}C REDOR-Spektren auf Euler-Winkel 27
3.3.1.3 ^{15}N-^{13}C REDOR-Spektren von Acetanilid 31
3.3.2 Orientierung der ^{15}N-^{1}H-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor . . 32
3.3.2.1 Sensitivität ^{15}N-^{1}H dipolar gekoppelter Spektren auf Euler-Winkel 32
3.3.2.2 ^{15}N-^{1}H dipolar gekoppelte Spektren von Acetanilid 33
3.3.3 Ergebnisse zum ^{15}N chemischen Verschiebungstensor in Acetanilid . . 34
3.4 MAS NMR-Methoden zur Bestimmung der Orientierung von ^{13}C-CS-Tensoren 35
3.4.1 Orientierung der ^{15}N-^{1}H-Bindungsachse relativ zum ^{13}C chemischen Verschiebungstensor: 2D vermittelte Anisotropie-Korrelation 36
3.4.1.1 NMR-Spektroskopie 36
3.4.1.2 Numerische Berechnungen 36
3.4.1.3 Winkelempfindlichkeit der vermittelten Anisotropie-Korrelation 38
3.4.1.4 Möglicher Einfluß der zweiten ^{15}N-Markierung im AibAib-Dipeptid 40
3.4.2 Vorbereitende Messungen 42
3.4.3 Orientierung der ^{13}C-^{15}N-Bindungsachse relativ zum ^{13}C chemischen Verschiebungstensor: ^{13}C-^{15}N-REDOR 43
3.4.4 2D Anisotropie-Korrelationsspektren von AibAib 44
3.4.5 Ergebnisse zum $^{13}C'$ CS-Tensor in AibAib 45

4 Charakterisierung chemischer Verschiebungstensoren in Aib 47
4.1 Charakterisierung des ^{15}N CS-Tensors im AibAib-Dipeptid mittels MAS NMR 47
4.1.1 ^{15}N CPMAS 48
4.1.2 ^{15}N-^{13}C REDOR 48

4.1.3 2D ^{15}N-^{1}H DIPSHIFT 49
4.1.4 MAS-Resultate 50
4.2 Statische NMR-Experimente 51
4.2.1 Polykristallines Aib-Aib 51
4.2.2 Selektiv ^{13}C,^{15}N-markiertes Chrysospermin C in DMPC 52
4.3 ^{15}N-Tensoren von Chrysospermin C in Lösung 53
4.3.1 Relaxation von ^{15}N-Kernen 53
4.3.2 NMR in mizellarer Lösung 53
4.3.3 Relaxationsmessungen 54
4.3.4 Auswertung der Relaxationsdaten 55
4.4 Quantenchemische Berechnungen 56
4.4.1 Verwendete Methoden 57
4.4.2 Berechnungen an Uracil 58
4.4.3 Berechnungen an verschiedenen Aib-Peptiden 60
4.5 Chemische Verschiebungstensoren in Aib 63

5 REDOR mit adiabatischen Inversionspulsen 65
5.1 Adiabatische Pulse 65
5.2 Adiabatische Pulse unter MAS-Bedingungen 66
5.3 Inversion der Magnetisierung 67
5.4 REDOR mit adiabatischen Inversionspulsen 70

6 Orientierung von Chrysospermin C relativ zur Lipidmembran 72
6.1 Magnetische Ausrichtung von Bizellen 72
6.1.1 Modell einer Peptidhelix in einer Bizelle 72
6.1.2 Ordnungsparameter der Bizellen 75
6.2 Orientierung von Chrysospermin C relativ zur Membranoberfläche 77
6.2.1 ^{15}N chemische Verschiebung in Bizellen 77
6.2.2 Skalierte ^{15}N-^{1}H dipolare Kopplung 78
6.2.3 Interpretation der Daten 79

7 Struktur von Chrysospermin C in isotropen Bizellen 81
7.1 Experimente in mizellarer Lösung 82
7.1.1 Zusätzlich gefundene Chrysospermine 83
7.2 NMR-Experimente in bizellarer Lösung 84
7.2.1 Resonanzzuordnung 86
7.3 Struktur von Chrysospermin C in Bizellen 86
7.3.1 Struktur eines Chrysospermin C-Monomers 89
7.3.2 NOEs zum Wasser und zum Lipid 90
7.4 Strukturuntersuchungen zur Bildung des Ionenkanals von Chrysospermin C . . 92

Zusammenfassung **94**

Literatur **96**

A Relaxationsraten von Chrysospermin C in mizellarer Lösung **I**

B Quantenchemische Berechnungen **II**

B.1 Referenzmoleküle II

B.2 Uracil II

B.3 Aib-Peptide IV

C NMR von Chrysospermin C in isotropen Bizellen **VI**

Abkürzungsverzeichnis

Aib	α-Aminoisobuttersäure
B3LYP	Dreiparameter-Hybridfunktional mit Korrelationsfunktional von Lee, Yang und Parr im GAUSSIAN-Programmpaket
CPMAS	Signalverstärkung durch Protonen-Kreuzpolarisation unter Ausnutzen der Hartmann-Hahn-Bedingung bei Probenrotation um den „magischen Winkel“ („cross-polarized magic angle spinning“)
CS-Tensor	Tensor der chemischen Verschiebung („chemical shift tensor“)
CSA	Anisotropie der chemischen Verschiebung („chemical shift anisotropy“)
CSC	Chrysospermin C
CSD	Chrysospermin D
CT	Die ^{13}C-Evolution findet während einer konstanten Zeitspanne statt, um ^{13}C-^{13}C-Kopplungen zu eliminieren („constant time“)
Da	Molmasse (1 Dalton = 1 g/mol)
DFT	Dichtefunktionaltheorie („density functional theory“)
DHPC	1,2-Dihexanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin
DMPC	1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin
DQDRAWS	Dipolare Doppelquanten-Rückkopplungspulssequenz ohne Zeitfenster („double quantum dipolar recoupling with a windowless pulse sequence“)
DPC	Dodecyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin
DRAWS	Dipolare Rückkopplungspulssequenz ohne Zeitfenster („dipolar recoupling with a windowless pulse sequence“)
DSS	2,2,Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonat (auch 3-(Trimethylsilyl)-1-Propan-Sulfonat), $C_6H_{15}O_3SSiNa$
FID	Freier Induktionszerfall („free induction decay“)
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GIAO	Eichinvariante Atomorbital-Methode („gauge invariant atom orbitals“)
HF	Hochfrequenz
HSQC	Heteronukleare Einquantenkohärenz („heteronuclear single quantum coherence“)
Kel-F	Markenname für 2-Chlor-1,1,2-Trifluorethylen (CTFE)

MAS	Rotation der Probe unter dem „magischen Winkel“ ($\theta_{\mathrm{m}} = 54.7°$, „magic angle spinning“)
NOESY	NMR-Experiment zur Bestimmung von ^{1}H-^{1}H-Abständen durch Ausnutzen des Kern-Overhauser-Effekts („nuclear Overhauser spectroscopy“)
NMR	Kernmagnetische Resonanz („nuclear magnetic resonance“)
REDOR	Rotationsecho-Doppelresonanz („rotational echo double resonance“)
rmsd	Standardabweichung („root mean square deviation“)
TEDOR	Transferierte Spinecho-Doppelresonanz („transferred echo double resonance“)

Programmnamen

DYANA	DYANA, version 1.5, © 1996-98 ETH Zürich
GNUPLOT	gnuplot Unix version 3.7, © 1986–1993, 1998 Thomas Williams, Colin Kelley
GAUSSIAN	Gaussian 98, Revision A.7, © 1988–1998 Gaussian, Inc., Pittsburgh PA (Frisch *et al.*, 1998)
MAPLE	Maple V Release 4, © 1981–1996 Waterloo Maple Inc.
MOLMOL	„Molecular Modelling“ MOLMOL 2.6, © 1994-98 ETH Zürich
SPINME	Programmpaket zur Simulation und iterativer Auswertung von MAS NMR-Spektren („simulation programs for iternuclear distance and other measurements via magic angle spinning experiments“)
SYBYL	Programmpaket für Molekülmodellierung, © Tripos Associates Inc. St. Louis, USA
TCL	Skriptsprache („tool command language“)
XEASY	Resonanzzuordnung in NMR-Spektren („ETH automated spectroscopy for X-Window systems“)

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Magnetische Kernresonanz

Die magnetische Kernresonanz beruht auf dem Effekt, daß sich bei Kernen mit einem Kerndrehimpuls („Spin“) $\neq 0$ der Kernspin in einem äußeren Magnetfeld $\vec{B}_0$ entweder parallel oder antiparallel zum Magnetfeld ausrichtet. Die Wahrscheinlichkeit, daß sich ein Kernspin in der einen oder anderen Ausrichtung befindet, folgt der Boltzmannverteilung. Durch Einstrahlen von Hochfrequenzquanten werden Übergänge zum energetisch höheren Zustand induziert, aus denen die Kerne nach einer Relaxationszeit unter Aussendung von HF-Quanten wieder in den Ausgangszustand zurückfallen. Diese vom Probenkern abgestrahlten Signale enthalten Informationen über die Umgebung des Kerns. So ist z. B. das äußere Magnetfeld $\vec{B}_0$ in einem Molekül durch den Einfluß der elektronischen Umgebung, z. B. durch chemische Bindungen, lokal verzerrt, wodurch sich die Resonanzfrequenz eines Kerns mit Spin $\geq 1/2$ verändert („chemische Verschiebung“).

Die Gewinnung spektraler Informationen wurde zunächst durch langsames Durchstimmen der eingestrahlten Frequenz erreicht („continuous wave/cw“-Methode). In den letzten Jahrzehnten hat sich jedoch die wesentlich vielseitigere und schnellere Methode der gepulsten Kernspinresonanz etabliert. Diese beruht auf Anregung des Frequenzspektrums mit Hilfe kurzer HF-Pulse und nachfolgender Fouriertransformation des aufgenommenen freien Induktionszerfalls („FID“). Vor allem die Möglichkeit, Spektren in zwei und mehr Dimensionen aufzunehmen (Jeener, 1971), machte die kernmagnetische Resonanz insbesondere der Wasserstoffkerne bei der Strukturaufklärung von Biomolekülen in Lösung so erfolgreich („hochauflösende NMR“). Die oft sehr vielen Signale können durch das vollständige Ersetzen der Heterokerne Kohlenstoff und Stickstoff durch ^{13}C und ^{15}N im Biomolekül und die Aufnahme von C-H- bzw. N-H-korrelierter Spektren voneinander getrennt beobachtet und zugeordnet werden (Bax & Lerner, 1986; Kay, 1995). Auch im Festkörper werden hochauflösende und mehrdimensionale NMR-Methoden immer wichtiger (Schmidt-Rohr & Spiess, 1994), um möglichst viele Strukturinformationen gleichzeitig zu erhalten, ohne mehrere Moleküle mit nur jeweils einem

isotopenmarkierten Kern herstellen zu müssen (z. B. Ketchem *et al.*, 1993; Kovacs & Cross, 1997).

1.2 Chrysospermin, ein Peptaibol

Peptaibole sind Polypeptide, welche Ionenkanäle in Membranen ausbilden können und in denen die unüblichen Aminosäuren α-Aminoisobuttersäure (Aib) sowie D-Isovalin (Iva) vorkommen (Benedetti *et al.*, 1982; Sansom *et al.*, 1993a,b). Ionenkanalbildner wie Alamethicin (Cafiso, 1994) und Chrysospermin (Dornberger *et al.*, 1995) gehören beispielsweise zu dieser Klasse von Peptiden (Tabelle 1.1). Aufgrund ihrer u. a. antibakterieller und fungizider Eigenschaften sind die Peptaibole von aktuellem Interesse.

Name	Sequenz
Alamethicin I	Ac- U P U A U A Q U V U G L U **P** V U U E Q F -ol
Antiamoebin I	Ac- F U U U J G L U U Y Q J **Y** U P F -ol
Chrysospermin C	Ac- F U S J L Q G U U A A U **P** U U U U Q W -ol
Chrysospermin D	Ac- F U S J L Q G U U A A U **P** J U U U Q W -ol
Harzianin HB I	Ac- U N L I U P J L U P L -ol
Harzianin HC I	Ac- U N L U P S V U P U L U **P** L -ol
Suzukacillin	Ac- U A U A U A Q U U U G L U **P** V U U Q Q F -ol
Trichorzianin TA VII	Ac- U A A U J Q U U U S L U **P** V U I Q Q F -ol
Trichotoxin A-50	Ac- U G U L U Q U U U A A U **P** L U J Q V -ol
Zervamicin IC	Ac- W I Q J I T U L U Y Q U **O** U P F -ol
Zervamicin IIA	Ac- W I Q U I T U L U Y Q U **O** U P F -ol
Zervamicin IIB	Ac- W I Q I I T U L U Y Q U **O** U P F -ol

Tabelle 1.1: Aminosäuresequenzen einiger bekannter Peptaibole.
U = α-Aminoisobuttersäure, J = D-Isovalin, O = L-4-trans-Hydroxyprolin, andere nach IUPAC. Hervorgehoben ist die Aminosäureposition 14, an der Prolin bzw. eine Prolin-ähnliche Aminosäure konserviert ist.

Das aus 19 Aminosäuren bestehende Peptaibol Chrysospermin C (CSC) wurde von Dornberger (1995) aus dem parasitären Schleimpilz *Apiocrea chrysosperma* isoliert, der vor allem auf dem Steinpilz *Boletus edulis* wächst (Abbildungen unter *http://www.nrm.se/kbo/svampbok/snylt.html.se* oder in Keizer, 1997). Eine interessante Eigenschaft von CSC ist, daß sich ein Ionenkanal bereits bei Gegenwart eines Salz-Konzentrationsgradienten ausbildet (Grigoriev *et al.*, 1995; Ternovsky *et al.*, 1997), also ohne zusätzliches elektrisches Potential, wie es z. B. bei Alamethicin notwendig ist. In NMR-Untersuchungen von CSC in Methanol (Anders *et al.*, 1998) wurden zwar Hinweise auf die Ausbildung einer rechtshändigen Helix gefunden, jedoch ließen die gewonnenen strukturellen

Einschränkungen lediglich auf transiente Konformationen schließen. In Dodecylphosphocholin (DPC)-Mizellen (Anders *et al.,* 2000) hingegen bildet CSC eine stabile Struktur aus, die aus einer N-terminalen und einer C-terminalen α-Helix besteht, welche durch eine leichte Biegung ($\approx 30°$) getrennt sind.

1.3 Magnetische Kernresonanz im Festkörper

Für strukturelle Studien an z. B. membrangebundenden Peptiden und Proteinen werden zwei verschiedene Ansätze angewandt, um mittels Festkörper-NMR hochaufgelöste Spektren zu gewinnen (Davis & Auger, 1999). Ein Ansatz beruht darauf, Lipidmembransysteme, in die zuvor das zu untersuchende Peptid eingebracht wurde, relativ zum Magnetfeld auszurichten. Auf diese Weise haben alle Kernspins den gleichen Polarwinkel relativ zu B_0 und deren Signale erscheinen an genau einer Position im Spektrum, ähnlich wie das Signal eines Einkristalls. Die Orientierung zum Feld läßt sich erreichen, indem man entweder Lipiddoppelschichten zwischen dünnen Glasplatten mechanisch ausrichtet (z. B. Opella *et al.,* 1987; Opella, 1999; Marassi & Opella, 1998; Fu & Cross, 1999) oder scheibchenförmige, aus Lipid und Detergens gemischte Mizellen („Bizellen“) herstellt, die sich aufgrund ihrer Anisotropie in der magnetischen Suszeptibilität spontan im Feld ausrichten. Letztere Methode wurde auch in dieser Arbeit verwandt, um die Orientierung eines Peptids relativ zur Membranoberfläche zu bestimmen (Sanders, 1994; siehe auch Abschnitt 1.3.4).

Alternativ kann man hochaufgelöste Festkörper-NMR Spektren durch schnelle Rotation (bislang ca. $1 \leq \nu_\mathrm{r} \leq 35$ kHz) der Probe unter dem „magischen Winkel“ $\theta_\mathrm{m} \approx 54.7°$ („magic angle spinning“, MAS) erreichen, wobei θ der Winkel zwischen Rotorachse und Magnetfeld ist (Schmidt-Rohr & Spiess, 1994; Smith *et al.,* 1996; Griffin, 1998). Wenn die Rotationsfrequenz ν_r größer ist als die anisotrope Wechselwirkung, beobachtet man eine Linie an der isotropen Position σ_iso, wobei die Linienbreite z. B. von der Probenreinheit, Kristallitgüte oder der lokalen Bewegung abhängig ist. Bei geringeren ν_r treten im Spektrum zusätzlich Seitenbanden in Abständen der Rotorfrequenz auf, die auf Spin-Echos bei Wiedererreichen der gleichen Rotorposition wie bei der Anregung der Spins zurückzuführen sind.

Die Probe besteht typischerweise entweder aus polykristallinem Pulver (Schmidt-Rohr & Spiess, 1994) oder aus Material, das sich spektroskopisch ähnlich wie Pulver verhält, wie z. B. Peptide in einer multilamellaren Liposomendispersion (z. B. Hing & Schaefer, 1993; Smith *et al.*, 1996; Hirsh *et al.*, 1996) oder eine gefrorene Proteinlösung (Li *et al.,* 1995). Homo- und heteronukleare dipolare Rückkopplungsexperimente (siehe auch Abschnitt 1.3.2.3) werden dann dazu benutzt, um unter MAS die Ausmittelung schwacher dipolare Kopplungen zu behindern und so die Kopplungsinformation zurückzugewinnen.

Im Gegensatz zur hochauflösenden NMR in Flüssigkeiten werden bei der Festkörper-NMR die Heterokerne direkt und nicht über die Protonen beobachtet, da die sehr großen dipolaren ^{1}H-^{1}H-Kopplungen im Festkörper nicht ausgemittelt werden. Mit Hilfe aufwendiger Methoden wie der Verwendung homonuklearer Entkopplungssequenzen und/oder extrem schneller

MAS-Probenrotation (für einen Überblick siehe Schmidt-Rohr & Spiess, 1994) oder der fast vollständiges Deuterieren des Moleküls (McDermott *et al.*, 1992) wird allerdings versucht, die aufgrund ihres hohen gyromagnetischen Verhältnisses spektroskopisch günstigen Wasserstoffkerne der Festkörper-NMR zugänglich zu machen.

1.3.1 Tensor der chemischen Verschiebung

Die am Ort des Kerns räumlich anisotrope Verzerrung des Magnetfelds kann durch einen Tensor der chemischen Verschiebung (im folgenden „CS-Tensor“ abgekürzt) repräsentiert werden (Veeman, 1984; Grant, 1996). Der CS-Tensor ist durch drei Hauptachsen $(\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33})$ gekennzeichnet, die üblicherweise in ppm gemessen werden. Strenggenommen wird in der NMR-Spektroskopie die relative chemische Verschiebung δ bezogen auf eine Referenzsubstanz gemessen und nicht die chemische Verschiebung σ des isolierten Kernspins im Vakuum. σ wird jedoch in der Literatur häufig auch zur Charakterisierung der relativen chemischen Verschiebung angewandt und soll auch hier im weiteren verwendet werden. Die Orientierung des CS-Tensors im Bezugssystem des umgebenden Moleküls kann durch Euler-Winkel von Bindungsvektoren relativ zu den Hauptachsen beschrieben werden.

Die Kenntnis von Größe und Orientierung des Tensors der chemischen Verschiebung von z. B. ^{15}N und ^{13}C im Peptidrückgrat ist für einige NMR-Methoden von Vorteil. Insbesondere sind oft Festkörper-NMR-Experimente abhängig von CS-Tensorparametern, da die chemische Anisotropie im Festkörper nicht durch sehr schnelle, isotrope Rotationsdiffusion ($1/\tau_c \gg \gamma B_0$) ausgemittelt ist und daher eine bedeutende Rolle spielt.

Im Spektrum einer im Magnetfeld orientierten Probe sind die beobachteten spektralen Parameter wie chemische Verschiebung oder dipolare Kopplungen vor allem abhängig von der Orientierung des Tensors der jeweiligen Wechselwirkung relativ zum Feld. Kennt man Größe und Orientierung des CS-Tensors im Koordinatensystem des Moleküls, so kann man Rückschlüsse über die Orientierung des lokalen Molekülbereichs, z. B. einer Peptid-Ebene, relativ zum Feld ziehen. Aus mehreren solcher Informationen läßt sich dann die relative Orientierung von Peptid-Ebenen zueinander bestimmen und somit Sekundärstrukturinformation gewinnen (z. B. Ketchem *et al.*, 1993; North *et al.*, 1995; Kovacs & Cross, 1997).

Einige der Rückkopplungsexperimente unter MAS-Bedingungen setzen ebenfalls die Kenntnis sowohl von Größe als auch Orienterung der beteiligten CS-Tensoren im Molekülsystem voraus. Ein Beispiel dazu ist die von Bower *et al.* (1999) entwickelte Methode, die Peptid-Rückgrat-Winkel (φ, ψ) über DRAWS/DQDRAWS-Experimente (Gregory *et al.*, 1997) in ^{13}C-markierten Peptiden zu bestimmen. Bisher werden in vielen solcher Untersuchungen Standardwerte benutzt, die an einigen wenigen Modellpeptiden experimentell bestimmt wurden (z. B. Hartzell *et al.*, 1987a; Oas *et al.*, 1987a,b). Die Verfügbarkeit genau bestimmter CS-Tensorparameter in dem jeweiligen untersuchten System sollte jedoch eine exakte Bestimmung von z. B. Torsionswinkeln erleichtern.

Weiterhin können CS-Tensorparameter auch in solchen NMR-Experimenten in Flüssigkeiten nützlich sein, in denen kreuzkorrelierte Relaxationsprozesse eine Rolle spielen (z. B. Yang *et al.*, 1997; Yang & Kay, 1998).

Die Kernspinresonanzspektroskopie ist die derzeit hauptsächlich angewandte Methode zur Charakterisierung chemischer Verschiebungstensoren (Schmidt-Rohr & Spiess, 1994; Asakawa *et al.*, 1998). Als weitere Methoden fanden numerische, quantenchemische *ab initio*-Berechnungen Verwendung (Cheeseman *et al.*, 1996; Grant, 1996). Diese erlauben mit Hilfe der Kenntnis der genauen Struktur des Moleküls, z. B. aus Röntgen- oder Neutronenstreuexperimenten, die Berechnung von NMR-Parametern wie der Größe und Orientierung der Tensoren der chemischen Verschiebung.

1.3.2 Charaktierisierung chemischer Verschiebungstensoren mittels NMR-Methoden im Festkörper

1.3.2.1 Statische Methoden

Traditionell wird die Festkörper-NMR dazu benutzt, anisotrope Informationen wie z. B. die Anisotropie des CS-Tensors zu bestimmen (Orendt, 1996). Hierzu werden vor allem Experimente an Einkristallen (Harbison *et al.*, 1984; Takeda *et al.*, 1999) sowie statischen Pulverproben (Linder *et al.*, 1980; Hartzell *et al.*, 1987; Oas *et al.*, 1987a,b; Teng & Cross, 1989; Teng *et al.*, 1992) durchgeführt.

Ein Einkristall, z. B. aus einer einfach ^{13}C-markierten Substanz, erzeugt nach HF-Anregung ein einzelnes, scharfes Signal, dessen Position im Spektrum davon abhängt, wie der Kristall und mit ihm der CS-Tensor des ^{13}C-Kerns relativ zum Magnetfeld orientiert ist. Dreht man den Kristall mittels eines Goniometers um alle Raumrichtungen, kann man aus der jeweiligen Position des Signals sowohl Größe als auch Orientierung des CS-Tensors berechnen. Aufgrund der Schwierigkeit, einen genügend großen Einkristall zu züchten, hat sich diese Methode lediglich bei sehr kleinen, leicht markiert herstellbaren und kristallisierbaren Substanzen bewährt – hinzu kommt die Notwendigkeit der Verwendung eines speziellen Goniometer-Probenkopfes.

Ein Pulver, bestehend aus vielen Einzelkristallen (auch Mikrokristalliten), zeigt im Spektrum die gesamte Verschiebungsanisotropie (CSA), da alle Kristallorientierungen relativ zum Magnetfeld gleichmäßig vorkommen. Aufgrund der Kugelverteilung der Molekülrichtungen erhält man ein charakteristisches „Pulverspektrum“ (Abb. 1.1A), woraus sich die chemische Verschiebungsanisotropie ($\sigma_{11}, \sigma_{22}, \sigma_{33}$) direkt ablesen bzw. durch spektrale Simulation bestimmen läßt (Linder *et al.*, 1980).

Zur Bestimmung der Orientierung kann man sich die Tatsache zunutze machen, daß der Tensor der dipolaren Wechselwirkung zweier NMR-aktiver Kerne ein Vektor ist, der parallel zur Verbindungslinie zwischen beiden Kernen ist. Im Falle zweier chemisch direkt gebundener Kerne ist dies die Bindungsachse. Bestimmt man die Euler-Winkel des CS-Tensors relativ zu zwei nicht parallelen Bindungsachsen, ist die Lage des Tensors relativ zum Molekülsystem eindeutig bestimmt (Abb. 1.1C; Hartzell *et al.*, 1987). Für einen ^{15}N-Kern im Peptidrückgrat

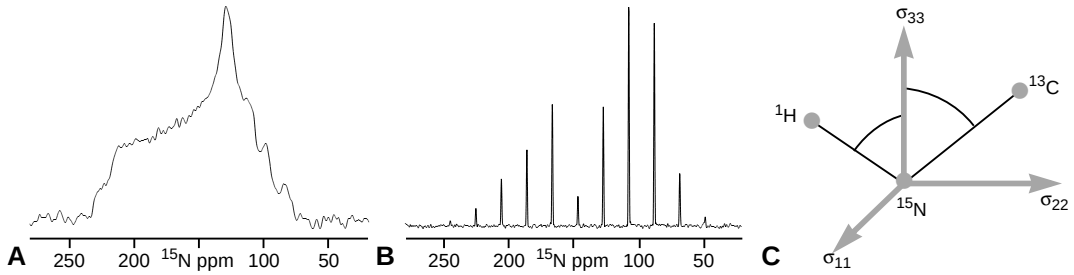

Abbildung 1.1:

Charakterisierung der chemischen Verschiebungsanisotropie mittels Festkörper-NMR. (A) Statisches ^{15}N Pulverspektrum eines ^{15}N-markierten AibAib-Dipeptids. (B) ^{15}N CPMAS-Spektrum desselben Dipeptids bei Probenrotation um den „magischen Winkel“ bei einer Rotationsfrequenz von 1 kHz. (C) Schematische Darstellung der Lage eines chemischen Verschiebungstensors von ^{15}N relativ zu zwei Bindungsachsen in einer Peptidbindung.

kommen hier z. B. die ^{15}N-^{13}C′ und die ^{15}N-^{1}H Bindungen in Frage. Ist ein über NMR beobachteter ^{15}N-Kern benachbart zu einem ^{13}C, so kann man im ^{15}N-Pulverspektrum zusätzliche Signalanteile („wings“) beobachten, die sich jeweils an die Hochfeld- bzw. Tieffeldflanke des Spektrums anschließen. Aus deren Form kann man Rückschlüsse auf die Orientierung der ^{13}C-^{15}N-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor ziehen (Hartzell *et al.*, 1987; Oas *et al.*, 1987a,b; Teng & Cross, 1989). Über Experimente zur partiellen Wiederherstellung der dipolaren ^{15}N-^{1}H-Kopplung unter gleichzeitiger Entkopplung der ^{1}H-^{1}H-Kopplungen mit Hilfe von Multipuls-Entkopplungssequenzen können auch Informationen über die Winkel zwischen ^{15}N-^{1}H-Bindungsvektor und ^{15}N CS-Tensor gewonnen werden (Linder *et al.*, 1980; Munowitz *et al.*, 1984; Wu *et al.*, 1995). Alternativ wurden auch dipolare Kopplungen zwischen Spin $\frac{1}{2}$-Kernen und Quadrupolkernen wie ^{15}N-^{2}H (Lumsden *et al.*, 1994) oder ^{13}C-^{14}N (Teng *et al.*, 1992) zur Gewinnung von Orientierungsinformationen der CS-Tensoren benutzt.

Enthält ein Molekül mehr als einen isotopenmarkierten Kern gleicher Sorte, wird die Auswertung der sich überlappenden Pulverspektren schwierig oder unmöglich. Bei einer geringen Anzahl überlagerter, nicht dipolar gekoppelter Spektren läßt sich durch iterative Simulation und nachfolgende Addition der Einzelspektren („De-Pakeing“, Bloom *et al.*, 1981) die Hauptachsenwerte der CS-Tensoren manchmal noch bestimmen. Bei nicht-trivialen, z. B. ^{15}N-^{13}C oder ^{15}N-^{1}H dipolar gekoppelten Pulverspektren versagt jedoch diese Methode, und die Gewinnung von Winkelinformationen ist nicht möglich.

1.3.2.2 MAS-NMR

Eine weitere, attraktive Methode zur Bestimmung der chemischen Verschiebungsanisotropie ist die Auswertung spektraler Seitenbanden, die bei einer Rotation der Probe unter dem „magischen Winkel“ $\theta_{\mathrm{m}} \approx 54.7°$ auftreten (Abb. 1.1B). Die Intensitätsverteilung der Seitenbanden ist abhängig von den Eigenwerten σ_{ii} des CS-Tensors (Herzfeld & Berger, 1980; de Groot *et*

al., 1991; Schmidt-Rohr & Spiess, 1994) und letztere lassen sich durch iterative, numerische Optimierung aus dem experimentellen Spektrum gewinnen. MAS NMR-Methoden haben gegenüber statischen Methoden den Vorteil eines meist vorteilhafteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und vor allem einer sehr hohen spektralen Auflösung.

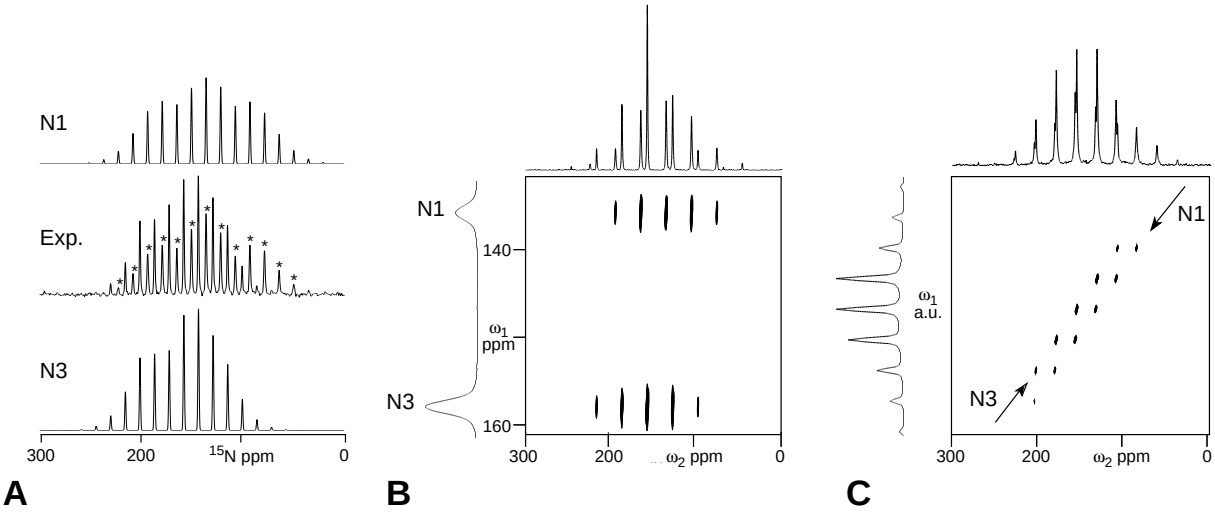

Abbildung 1.2:

Beispiele für MAS-Experimente an mehrfach isotopenmarkierten Substanzen. (A) Experimentelles ^{15}N CPMAS-Spektrum von [1,3-$^{15}N_2$]-Uracil bei ν_r = 730 Hz (Mitte) und optimiert angepaßte, simulierte Spektren von N1 und N3 (aus Leppert et al.*, 2000a). Im experimentellen Spektrum sind die Seitenbanden von N1 mit einem Stern markiert. (B) 2D ^{15}N CSA-Spektrum mit isotroper Separation in ω_1 von $^{15}N_2$-Uracil bei ν_r = 1500 Hz, aufgenommen mit einem Rotations-Spin-Echo-Experiment (aus Leppert* et al.*, 2000a). (C) 2D PASS-Spektrum von $^{15}N_2$-Uracil bei ν_r = 1200 Hz und mit ni = 16 Seitenbanden/Inkrementen in ω_1 (a. u. = willkürl. Einheiten). Der 2D-Datensatz konnte zur Erhöhung der Auflösung in ω_1 nachträglich repliziert und mehrfach an den FID angehängt werden (ni = 128), da die 16 Inkremente insgesamt genau eine Rotorperiode ausmachen und somit der FID in ω_1 periodisch ist.*

Bei geringen Rotationsfrequenzen ν_r und somit einer großen Anzahl von Rotationsseitenbanden, die zur Gewinnung von Tensorparametern nötig sind, können Seitenbanden eines Kerns mit denen eines anderen Kerns überlappen. Enthalten die untersuchten Moleküle nur wenige Isotopenmarkierungen, ist oft die Auflösung noch ausreichend, um in 1D-Spektren bei ausgewählten ν_r noch Informationen über die CS-Tensoren zu erhalten (Abb. 1.2A). Um spektrale Signalüberlappungen bei mehrfach markierten Substanzen zu vermeiden, kann man auf zweidimensionale MAS NMR-Methoden wie die Korrelation von isotroper und anisotroper chemischer Verschiebung (Aue *et al.*, 1981; Abb. 1.2B) oder 2D PASS (Antzutkin *et al.*, 1995; Abb. 1.2C) ausweichen, die auch mit den im folgenden beschriebenen homo- oder heteronuklearen Experimenten kombiniert werden können. Das 2D PASS-Spektrum von $^{15}N_2$-Uracil zeigt in der Frequenzdimension ω_2 die Anisotropie des CS-Tensors, während in ω_1 eine fest eingestellte Anzahl von Seitenbanden aufgelöst wird. Da der Abstand der isotropen Linien von N1 und N3 $\approx$ 1100 Hz beträgt, überlappen im 1D-Spektrum bei dieser Rotationsfrequenz alle

Rotationsseitenbanden (siehe ω_2-Projektion). Das PASS-Experiment kann also auch noch dann verwendet werden, wenn sich isotrope Linien und Seitenbanden anderer Kerne massiv überlappen. Daher ist das PASS-Experiment besonders in mehrfach markierten Proben und bei geringen ν_r interessant, die für eine genaue Auswertung der Seitenbandenintensitäten unerläßlich sind.

1.3.2.3 Ausnutzen dipolarer Kopplungen

Um die enorme spektrale Verbreiterung durch die im Festkörper sehr ausgeprägten dipolaren Wechselwirkungen zwischen Protonen zu eliminieren, werden normalerweise alle NMR-Experimente an Festkörpern, die Protonen enthalten, unter Einstrahlung hoher HF-Leistung auf dem Protonenkanal aufgenommen. Hierbei werden auch die dipolaren ^{15}N-^{1}H- bzw. ^{13}C-^{1}H-Kopplungen eliminiert. Diese enthalten jedoch nützliche Informationen, weswegen Experimente zur teilweisen Rückgewinnung dieser Kopplungen entwickelt wurden. Die Entkopplung der N-H-Wechselwirkungen von den H-H-Wechselwirkungen führt zur Beobachtung einer skalierten ^{15}N-^{1}H dipolaren Kopplung in der indirekten Dimension des 2D-Experiments („separated local field spectroscopy“, auch 2D dipolar-shift „DIPSHIFT“-Experiment genannt, Waugh, 1976; Linder *et al.*, 1980). Diese Experimente können ebenso unter MAS-Bedingungen eingesetzt werden (Munowitz & Griffin, 1982; Munowitz & Griffin, 1983; Palmas *et al.*, 1998).

Heteronukleare dipolare Kopplungen, deren Stärke nicht deutlich größer ist als die MAS-Rotorfrequenz, werden durch die Probenrotation herausgemittelt. Im REDOR-Experiment (Gullion & Schaefer, 1989; Pan *et al.*, 1990) wird diese Kopplung durch Einstrahlen rotorsynchroner 180°-Pulse wiederhergestellt, die die nicht beobachteten Kerne dephasieren („dipolar recoupling“). Durch den stattfindenden Magnetisierungstransfer über die dipolare Kopplung wird das Ursprungssignal in Abhängigkeit von der Stärke der Kopplung verringert. Üblicherweise wird das REDOR-Experiment zur Bestimmung der dipolaren Kopplung und somit des Abstands zwischen den gekoppelten Kernen benutzt. Zur Abstandsbestimmung genügt es, die Gesamtmagnetisierung zu kennen, d. h. die integrierte Intensität aller Seitenbanden im REDOR-Experiment. Daher wird das REDOR-Experiment oft bei Frequenzen von ν_r = 3–6 kHz durchgeführt. Im Falle von ^{15}N bzw. ^{13}C verschwinden die Seitenbanden und die gesamte Intensität des Spektrums befindet sich bei der isotropen chemischen Verschiebung, was dem Signal-zu-Rausch-Verhältnis zugute kommt.

Bei geringeren ν_r verändert der Einfluß der dipolaren Kopplung die Intensitätsverteilung der beobachteten Rotationsseitenbanden in Abhängigkeit von den Euler-Winkeln des dipolaren Tensors, der ein Vektor entlang der Bindungsachse ist, relativ zum CS-Tensor des beobachteten Kerns (Goetz und Schaefer, 1997). Über numerische Optimierungsrechnungen lassen sich diese Winkel berechnen.

1.3.2.4 Der Fall ^{13}C′

In dipolaren Netzwerken des Typs ^{15}N1-^{13}C-^{15}N2, wie sie z. B. in Nukleotidbasen wie Guanin und Uracil vorkommen, konnte in Zusammenarbeit mit J. Leppert gezeigt werden, daß ein ^{13}C-

^{15}N-REDOR- (Leppert *et al.*, 2000b) oder ein $^{15}\mathrm{N} \rightarrow {}^{13}$C-TEDOR-Experiment (Leppert *et al.*, 2001b) dazu benutzt werden kann, die Orientierung des $^{13}C'$ CS-Tensors im Molekülsystem zu bestimmen, welches durch die zwei dipolaren Vektoren (^{13}C′-N1) und (^{13}C′-N2) aufgespannt wird. Im Peptidrückgrat hingegen ist, wie auch für C4 in Uridin und C6 in Guanin, lediglich *ein* Stickstoffatom an das Carbonylkohlenstoffatom gebunden, und die im vorigen Absatz genannten Rückkopplungsexperimente sind nicht anwendbar.

1.3.2.5 Alternative Methoden zur Charakterisierung chemischer Verschiebungstensoren

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, daß sich auch aus NMR-Experimenten in Flüssigkeiten anisotrope Informationen gewinnen lassen. Anhand von Messungen der kreuzkorrelierten Relaxation zwischen der chemischen Verschiebungsanisotropie von z. B. ^{15}N und der ^{15}N-^{1}H dipolaren Kopplung kann man Informationen über die Größe des ^{15}N-Tensors und dessen Orientierung relativ zur ^{15}N-^{1}H-Achse gewinnen (Tjandra *et al.*, 1996; Fushman *et al.*, 1998a,b; Kroenke *et al.*, 1998). Dieser Ansatz wurde auch auf andere Kerne wie ^{1}H (Tjandra & Bax, 1997a), $^{13}\mathrm{C}^{\alpha}$ (Tjandra & Bax, 1997b) oder carbonyl-$^{13}C'$ (Ghose *et al.*, 1998) erweitert.

Ab initio-Berechnungen zur Strukturvorhersage und auch zur Ermittlung von NMR-Parametern (Chesnut, 1996; Cheeseman *et al.*, 1996; Fleischer *et al.*, 1998) erfreuen sich aufgrund der stetig steigenden verfügbaren Rechenleistung moderner Computer immer höherer Beliebtheit (von Schleyer, 1998). Mußte man sich lange Zeit auf sehr kleine Modellsysteme beschränken, können auch Eigenschaften größerer Moleküle untersucht werden. Für die Berechnung von NMR-Parametern wie Größe und Orientierung von CS-Tensoren ist es allerdings von Vorteil, wenn die Struktur des untersuchten Moleküls bereits bekannt ist, da diese Parameter sehr empfindlich auf strukturelle Änderungen sind.

1.3.3 Adiabatische Pulse

Die zuvor beschriebenen MAS NMR-Experimente zur Charakterisierung von Größe und Orientierung von CS-Tensoren wurden meist bei relativ niedrigen Rotationsfrequenzen ν_{r} durchgeführt, besonders im Fall von ^{15}N als beobachtetem Kern. Hierdurch und aufgrund der oft angewendeten Rückkopplungsexperimente, die üblicherweise Spektren mit nicht besonders hohem Signal-zu-Rausch-Verhältnis liefern, ist man versucht, den MAS-Rotor mit möglichst viel Signal lieferndem Material zu füllen, sofern davon genug vorhanden ist. Allerdings zeigte sich, daß gerade die Rückkopplungsexperimente empfindlich von der Homogenität des HF-Feldes abhängig sind. Daher kann man nicht ohne weiteres den MAS-Rotor mit der Probe auffüllen, sondern die Füllung muß auf den zentralen Teil des Rotors beschränkt werden. Man könnte versuchen, statt der Probenlänge den Probendurchmesser zu erhöhen (durch Verwendung eines Probenkopfes mit größerem Rotordurchmesser). Dies würde jedoch eine Verringerung der magnetischen Flußdichte B_1 mit sich bringen, was besonders in solchen Fällen unerwünscht ist, in denen eine hohe Frequenzbreite für die Anregung bzw. Inversion (für Kerne großer chemischer

Verschiebungsanisotropie wie z. B. $^{13}C'$) und/oder eine hohe Feldstärke für die Entkopplung der Protonen benötigt wird.

Eine ganz andere Möglichkeit, diesen Nachteilen zu begegnen ist, die Empfindlichkeit der Rückkopplungsexperimente auf B_1-Inhomogenitäten zu reduzieren. Es wurde bereits gezeigt, daß der Einfluß des Resonanz-Offsets, resultierend aus einer Verteilung isotroper chemischer Verschiebungen, in solchen REDOR-Experimenten verringert werden kann, die viele ($n \geq 8$) Rotorperioden dipolarer Rückkopplung verwenden. Hierzu werden die 180°-Pulse in der Phase zueinander im XY8-Schema verändert (Gullion & Schaefer, 1991). Diese Methode ist allerdings nur eingeschränkt anwendbar, sobald zum Resonanz-Offset noch Effekte durch Inhomogenität von B_1 hinzukommen bzw. wenn weniger Inversionspulse benutzt werden. Es wurde gezeigt, daß hierzu breitbandig anregende, adiabatische Pulse verwendet werden können, die bereits bei der NMR in Flüssigkeiten breite Verwendung finden (z. B. Tannus & Garwood, 1996; Kupce & Freeman, 1996).

1.3.4 Magnetisch orientierte Bizellen

Bei der Festkörper-NMR an orientierten Systemen kann man sich die Anisotropie bestimmter Wechselwirkungen des Kernspins wie chemische Verschiebung und dipolare bzw. quadrupolare Kopplung zunutze machen, um daraus Informationen über die Orientierung des jeweiligen Wechselwirkungstensors relativ zum Magnetfeld zu gewinnen (Seelig, 1977; Seelig, 1978).

Ein Gemisch aus einem Lipid und einem Detergens bildet bei einem Lipid:Detergens-Verhältnis von ca. 2:1–6:1 gemischte Mizellen „Bizellen“ aus, die sich aufgrund der Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität der DMPC-Moleküle im statischen Magnetfeld $\vec{B}_0$ spontan mit ihrer Flächennormalen senkrecht zum Feld ausrichten (Sanders & Prestegard, 1990; Sanders *et al.*, 1994; Vold & Prosser, 1996). Im Falle einheitlicher Ausrichtung kann man z. B. für isotopenmarkierte $^{15}N/^{13}C$-Kerne relativ scharfe Spektrallinien beobachten, ähnlich wie für einen Einkristall. Änderungen chemischer Verschiebungen und dipolarer Kopplungen in zusammen mit den Bizellen ausgerichteten, membranständigen Peptidmolekülen lassen sich dazu benutzen, die Orientierungen der beteiligten Wechselwirkungstensoren relativ zum Magnetfeld zu bestimmen und so strukturelle Informationen zu gewinnen (Howard & Prestegard, 1996; Salvatore *et al.*, 1996; Struppe *et al.*, 1998b).

Mittlerweile haben magnetisch orientierte Bizellen auch in der NMR in Lösung eine Anwendung bei der Gewinnung zusätzlicher Strukturparameter gefunden: In sehr geringer Konzentration (ca. 5% $^{w}/_{v}$) dienen sie dazu, für Proteine, die sich in der Lösung befinden, ein mechanisches Hindernis zu bilden, ohne jedoch ihre isotrope Bewegung wesentlich zu behindern. Durch Stoßprozesse an diesen ausgerichteten „Hindernissen“ ergibt sich für nicht perfekt globuläre Moleküle eine leichte Vorzugsrichtung relativ zum Magnetfeld, wodurch stark skalierte dipolare Kopplungen von bis zu einigen Hz sichtbar werden („residual dipolar couplings“, Bax & Tjandra, 1997). Diese Informationen lassen dann Rückschlüsse auf die Orientierung von z. B. NH-Bindungen relativ zur Achse der mittleren Ausrichtung des Moleküls zu.

1.4 Magnetische Kernresonanz in Flüssigkeiten

1.4.1 Mizellare Lösungen

Zur Strukturbestimmung membranständiger Peptide und Proteine mittels NMR in Lösung erfreuen sich (deuterierte) sphärische Mizellen aus Detergentien großer Beliebtheit (Brown, 1979; Brown *et al.*, 19982; Franklin *et al.*, 1994; Henry & Sykes, 1994; Condamine *et al.*, 1998). Zum einen stellen sie ein minimales Modellsystem für die Lipiddoppelschicht dar, zum anderen sind sie klein genug (ca. 50 Detergensmoleküle pro Mizelle), um noch eine ausreichend schnelle isotrope Reorientierung für hochaufgelöste NMR-Spektren zuzulassen. Durch die isotrope Diffusion des eingebetteten Moleküls innerhalb der Mizelle bzw. entlang der Oberfläche wird die Linienbreite in NMR-Spektren zusätzlich positiv beeinflußt.

1.4.2 Isotrope Bizellen

Die α-helikale Struktur von Chrysospermin C in DPC-mizellarer Umgebung wurde bereits charakterisiert (Anders *et al.*, 2000). Sphärische Mizellen können allerdings möglicherweise aufgrund ihrer starken Oberflächenkrümmung (Durchmesser ca. 20–30 Å) die Struktur assoziierter Moleküle beeinflussen. Zum anderen ermöglichen Mizellen aufgrund ihrer geringen Größe meist nur den Einbau eines einzelnen Moleküls pro Mizelle – die Ausbildung von Helixbündeln, aus denen die Ionenkanäle bestehen, ist also praktisch nicht möglich. Vor kurzem wurde die Verwendung von gemischten DHPC/DMPC-Bizellen in der NMR in Lösung vorgeschlagen (Vold *et al.*, 1997). Diese sind von so kleinem Durchmesser, daß sie sich nicht mehr im Magnetfeld ausrichten, sondern sich isotrop in der Lösung bewegen. Die im Vergleich zu Mizellen hingegen deutlich größeren Bizellen sollten z. B. das Einbringen mehrerer Peptidmoleküle pro Bizelle erlauben. Diese könnten sich dort zu Aggregaten zusammenfinden und z. B. ionenkanalähnliche Strukturen bilden, die dann mittels NMR untersucht werden können. Zudem bieten sie in ihrer Mitte einen Bereich, der hauptsächlich aus dem längerkettigen DMPC besteht und eine Lipiddoppelschicht ausbildet, was eventuell ein besseres Modellmembransystem für die Untersuchung von membranständigen Peptiden und Proteinen darstellt.

Der Einsatz von DHPC und DMPC in der Lösungsmittel-NMR ist allerdings einigen Beschränkungen unterworfen. Während DPC in vollständig deuterierter Form erhältlich ist, sind in DHPC bzw. DMPC mit dem derzeit höchsten erhältlichen Deuterierungsanteil (DHPC-d35 bzw. DMPC-d67, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) am Glycerolrückgrat noch immer einige Protonen enthalten, deren Ersatz durch ^{2}H chemisch sehr schwierig ist. Zudem ist der Deuterierungsgrad der deuterierten Positionen nicht 100%, so daß in homonuklearen ^{1}H-^{1}H-Experimenten noch immer Signalanteile des Lipids sichtbar sind, welche die Signale des eingebrachten Peptids besonders im H$^\alpha$-Bereich überdecken (Abb. 1.3A). Diese Signale sind zusätzlich zu den Peptidpsignalen in ihrer Phase verschoben, was zur Ausbildung spektraler Störungen führt („ridges“). Die Rotationskorrelationszeit der Bizellen ist aufgrund ihrer Größe deutlich höher ist als die von Mizellen. Dies äußert sich in einer erhöhten Linienbreite des Pep-

tids ($\approx$ 30 statt $\approx$ 17 Hz). Daher ist die erwartete spektrale Auflösung deutlich geringer als in Mizellen.

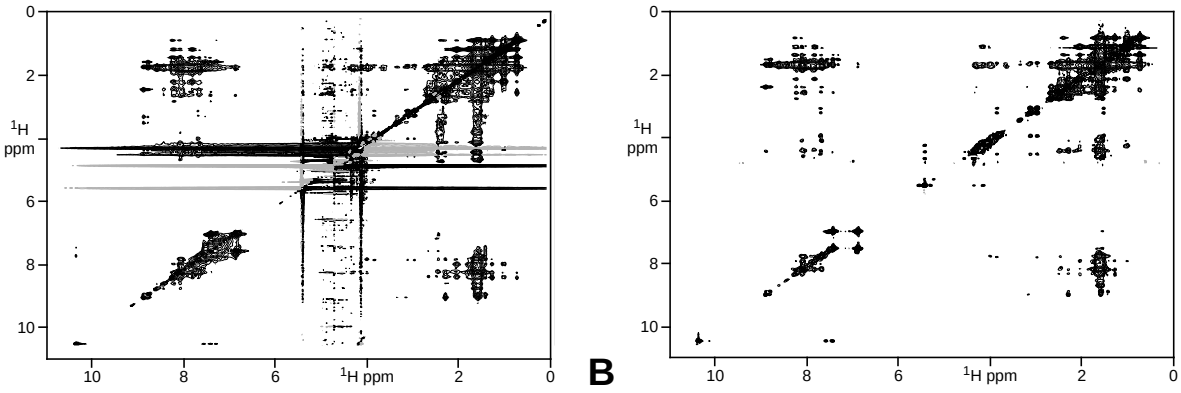

Abbildung 1.3:
2D NOESY-Spektren von U-^{13}C, ^{15}N-Chrysospermin C in deuterierten, isotropen Bizellen. (A) Konventionelles ^{1}H-^{1}H-NOESY- und (B) simultan ^{13}C- und ^{15}N-editiertes NOESY-HSQC-Spektrum. Negative, zu den Peptidsignalen nicht phasenkohärente Signalanteile der Lipidprotonen sind in (A) als graue Konturen dargestellt. In (B) sind die aromatischen Protonen nicht sichtbar, da die bei $\approx$ 120 ppm liegenden aromatischen Kohlenstoffkerne in dieser Pulssequenz nicht mit angeregt werden.

1.5 Ziele der Arbeit

Ein Abschnitt der hier durchgeführten Arbeiten behandelt die Charakterisierung chemischer Verschiebungstensoren. Es soll vor allem MAS NMR zum Einsatz kommen, da nur mit dieser hochauflösenden Methode die Möglichkeit besteht, mehrere isotopenmarkierte Kerne gleichzeitig zu untersuchen, was für Biomakromoleküle erstrebenswert ist. Der Schwerpunkt liegt bei den ^{15}N- und ^{13}C′-Kernen im Peptidrückgrat, da diese oft in Wasserstoffbrückenbindungen involviert sind und die CS-Tensoren hierauf empfindlich sind.

Experimente, welche dipolare Kopplungen zwischen isotopenmarkierten Kernen zur Gewinnung von Orientierungsinformationen ausnutzen, beschränkten sich bislang darauf, jeweils nur ein Winkelpaar relativ zu einer Bindungsachse zu bestimmen. Dies reicht allerdings nicht zur vollständigen Bestimmung der Orientierung im Molekülsystem aus – hierzu sollten immer die Euler-Winkel zu mindestens zwei Bindungsvektoren bestimmt werden. Es soll daher anhand des Modellsystems Acetanilid, dessen CS-Tensordaten bereits bekannt sind (Lumsden *et al.*, 1994) überprüft werden, ob eine Kombination aus ^{15}N-^{13}C-REDOR- und ^{15}N-^{1}H-„dipolar-shift“-Experimenten es erlaubt, die Orientierung eines ^{15}N CS-Tensors vollständig zu bestimmen.

Aufgrund ihrer verschiedenen Bindungspartner müssen ^{15}N- und ^{13}C′-Kerne mit unterschiedlichen Experimenten untersucht werden. Es gibt bislang noch keine Methode, um die

Orientierung eines $^{13}C'$ CS-Tensors relativ zu einer anderen als der C-N-Bindungsachse zu bestimmen (^{13}C-^{15}N-REDOR). Um dies zu ermöglichen, soll eine neue MAS NMR-Methode etabliert werden, die den CS-Tensor von $^{13}C'$ mit der ^{15}N-^{1}H dipolaren Kopplung in Relation setzt. Da Vergleichsdaten zu den somit bestimmten Winkeln nicht vorliegen, soll das Experiment an einem ^{13}C,^{15}N-markierten AibAib-Dipeptid demonstriert werden, für das diese Tensorinformationen von späterem Nutzen im Rahmen dieser Arbeit sind.

Für Festkörper-NMR-Untersuchungen zur Orientierung des Peptaibols Chrysospermin C (CSC) relativ zur Membranoberfläche werden Informationen über Größe und Orientierung der beteiligten chemischen Verschiebungstensoren benötigt. Da CSC mit ^{15}N- und $^{13}C'$-isotopenmarkiertem Aib untersucht wurde und CS-Tensorinformationen von Aib in der Literatur nicht bestimmt wurden, soll neben dem $^{13}C'$-Tensor auch der ^{15}N CS-Tensor in einem ^{13}C,^{15}N-markierten AibAib-Dipeptid charakterisiert werden. Hierzu sollen vor allem die anhand von Acetanilid etablierten Methoden dienen.

Die hier vorgestellten MAS NMR-Methoden sollen auch mit anderen Methoden der Tensorcharakterisierung verglichen werden: Die Größe der CS-Tensoren von ^{15}N und $^{13}C'$ soll anhand von statischen Pulverspektren des isotopenmarkierten AibAib-Dipeptids sowie von selektiv ^{13}C,^{15}N-markiertem CSC in Liposomen bestimmt werden. Hieraus soll abgeschätzt werden, ob das AibAib-Dipeptid ein mögliches Modellsystem für größere Peptide ist. Für die Bestimmung der Struktur von CSC in isotropen Bizellen wurde u. a. uniform ^{15}N markiertes (U-^{15}N) CSC hergestellt. Um CS-Tensorparameter von möglichst vielen verschiedenen Aib-Resten zu gewinnen, soll anhand von U-^{15}N CSC in DPC-mizellarer Lösung die Anwendbarkeit von Experimenten zur Bestimmung der CS-Tensorparameter über Relaxationsmessungen auf kleine Peptide untersucht werden. Als eine weitere Vergleichsmethode sollen quantenchemische *ab initio*-Berechnungen an kleinen Aib-Peptidsystemen dienen. Zuvor soll untersucht werden, welchen Einfluß die verwendeten Basissätze und Funktionen sowie das Vorhandensein von Wasserstoffbrücken auf die Ergebnisse haben können. Als Testsystem soll hierzu das unter geringem Aufwand berechenbare Uracil dienen, dessen CS-Tensorparameter von N1, C2 und N3 in Zusammenarbeit mit J. Leppert bereits eingehend mittels MAS NMR untersucht wurden (Leppert *et al.*, 2000a; Leppert *et al.*, 2000b).

Die meisten in dipolaren Rückkopplungsexperimenten verwendeten Pulssequenzen enthalten mehrere 180°-Pulse, die jeweils so exakt wie möglich eingestellt werden müssen. Da konventionelle Rechteckpulse eine beschränkte Anregungs- bzw. Invertierungsbandbreite besitzen, soll untersucht werden, welche Vorteile sich bei Verwendung adiabatischer 180°-Pulse in MAS NMR-Experimenten wie REDOR ergeben.

Ein zweiter Abschnitt der hier vorgestellten Arbeit beschäftigt sich mit den strukturellen Eigenschaften des Ionenkanal-Peptids Chrysospermin C (CSC) in einer Membranumgebung. Um die Orientierung von CSC relativ zur Membran zu bestimmen, soll selektiv isotopenmarkiertes CSC in DHPC/DMPC-Bizellen eingebracht werden, welche sich spontan im Magnetfeld ausrichten. Hierzu sollen chemische Verschiebungen von ^{15}N und $^{13}C'$ sowie ^{15}N-^{1}H dipolare

Kopplungen herangezogen werden, wofür auch die zuvor bestimmten CS-Tensorparameter von Aib benötigt werden.

Zur Charakterisierung der Struktur des von CSC gebildeten Ionenkanals soll CSC in DHPC/DMPC-Bizellen eingebracht werden, die von so kleinem Durchmesser sind, daß sie sich nicht mehr zum Magnetfeld ausrichten, sondern sich isotrop in der Lösung bewegen. Durch den Vergleich der Struktur von CSC in Mizellen (Anders *et al.*, 2000) und Bizellen soll zum einen überprüft werden, ob Mizellen möglicherweise die Struktur negativ beeinflussen bzw. ob Bizellen ein geeigneteres System darstellen, in dem membranassoziierte Moleküle strukturell untersucht werden können. Außerden soll mit Hilfe isotopengefilterter NMR-Experimente untersucht werden, ob sich in isotropen Bizellen Ionenkanal-ähnliche Strukturen aus CSC-Helices ausbilden.

Die spektrale Auflösung in isotropen Bizellen ist aufgrund ihrer Größe allerdings wesentlich geringer und die Relaxationszeit ungünstiger, weswegen viele konventionelle ^{1}H-^{1}H-homonukleare Experimente nicht mehr durchführbar sein werden. Daher sollen uniform isotopenmarkierte Peptide (U-^{15}N- bzw. U-^{13}C, ^{15}N- Chrysospermine) hergestellt werden, die einige dieser Nachteile wettmachen: ^{15}N- bzw. ^{13}C-editierte Spektren filtern unerwünschte Lipidsignale aus (Abb. 1.3B). Ferner wird es möglich, ^{15}N- und ^{13}C-aufgelöste, dreidimensionale Spektren für die Resonanzzuordnung und Abstandsbestimmung aufzunehmen, die die besonders bei Peptaibolen auftretende starke Überlappung von H^{β}-Signalen aufzulösen vermögen. Zudem werden isotopengefilterte NMR-Experimente möglich, mit Hilfe derer intermolekulare Abstände gewonnen werden können.

Kapitel 2

Herstellung isotopenmarkierter Proben für die NMR-Spektroskopie

2.1 Markiertes Acetanilid und AibAib-Dipeptid

Als Testsysteme für hier vorgestellte MAS NMR-Experimente zur Charakterisierung von CS-Tensoren im Peptidrückgrat wurden isotopenmarkiertes Acetanilid (Abb. 2.1A) und carboxyterminal amidiertes AibAib-Dipeptid (Abb. 2.1B) hergestellt.

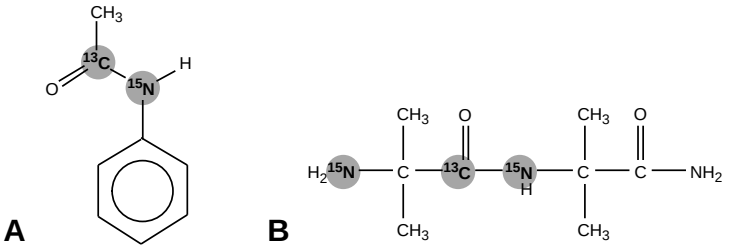

Abbildung 2.1:
(A) Isotopenmarkiertes Acetanilid (B) AibAib-NH_2 Dipeptid.

^{15}N- und ^{13}C,^{15}N-isotopenmarkiertes Acetanilid (Abb. 2.1A) wurde aus Acetylchlorid und Anilin hergestellt wie bei Lumsden *et al.* (1994) beschrieben. Das Acetanilid wurde anschließend in Chloroform-Lösung tropfenweise auf Mikroskop-Objektträger aufgetragen, um dort auszukristallisieren. Die entstandenen Kristalle ließen sich sehr leicht und praktisch verlustfrei in Pulverform von den Objektträgern abstreifen.

^{15}N- sowie ^{13}C,^{15}N-isotopenmarkiertes AibAib-NH_2 mit den Markierungen wie in (Abb. 2.1B) angegeben, wurde von H. Wenschuh (Jerini BioTools GmbH, Berlin) über FMOC-Festphasen-Peptidsynthese hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt – die genaue Prozedur ist in Heise *et al.*, (2001) beschrieben. Zur Herstellung der isotopenmarkierten, Aib-haltigen Peptide waren nur Vorstufen für ^{15}N- und ^{15}N,^{13}C′-Aib, nicht aber ^{13}C′-Aib verfügbar. Daher konnte das mit ^{15}N,^{13}C doppelt markierte Dipeptid statt mit einer lediglich mit zwei ^{15}N-Markierungen hergestellt werden – eine in der Peptidbindung und eine am N-Terminus. Die zur Synthese verwendeten ^{15}N- und ^{13}C,^{15}N-markierten Aminosäuren waren von

V. Šoškić und S. Fischer-Frühholz hergestellt worden (Anders *et al.*, 1998). Das lyophilisierte, noch amorphe Pulvermaterial wurde dann in einem Butanol/Ethanolgemisch (1.5:1) gelöst und durch langsames Abdampfen ($\approx$ 1 Tag) des Ethanols bei Raumtemperatur auf Objektträgern kristallisiert.

2.1.1 Homogenität des HF-Feldes in einem MAS-Rotor

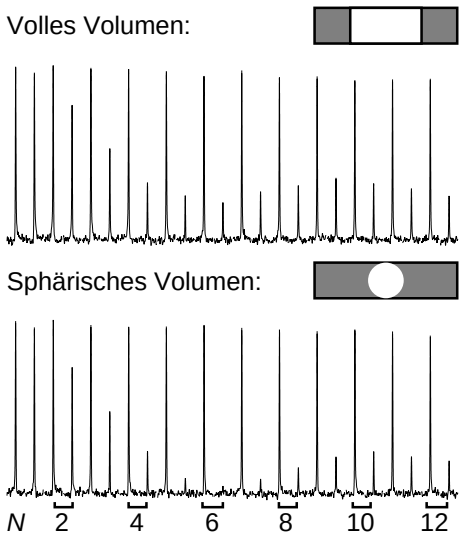

Abbildung 2.2:
Auswirkung der Homogenität des HF-Feldes auf REDOR-Experimente. ^{15}N-^{13}C-REDOR an [1-^{13}C,^{15}N]-Glycin in Abhängigkeit von der REDOR-Mischzeit $N\tau_r$, mit zylindrischem (oben, Rotor komplett gefüllt) und sphärischem Probenvolumen (unten).

10 mg Acetanilid bzw. AibAib-Dipeptid wurden unter Verwendung sphärischer Einsätze aus dem Fluorchlorpolymer Kel-F (Doty Scientific, Columbia, USA) in einen 5 mm MAS-Rotor gefüllt. Die Verwendung der Einsätze erhöht die Homogenität des eingestrahlten HF-(B_1-)Feldes über die Probe, da die zylinderförmigen HF-Spulen im MAS-Probenkopf relativ kurz sind ($\approx$ 1 cm Länge). Ein Maß für die Homogenität des HF-Feldes ist der Signalverlust, der sich beim Verwenden eines 810°- statt eines 90°-Pulses in einer Einpuls-Sequenz ergibt. Hierzu kann das scharfe ^{13}C-Signal von Adamantan herangezogen werden. Bei diesen Experimenten zeigten sich auch Unterschiede in den beiden verwendeten 5 mm MAS-Probenköpfen: Der Signalverlust ($90° \leftrightarrow 810°$) des zunächst verwendeten „Supersonic“-Kopfes ohne Einsätze ($\approx$ 60 μl Probenvolumen) liegt bei 65%, mit sphärischen Einsätzen ($\approx$ 20 μl) bei 86% und mit flachen, nur noch ellipsoidförmigen Einsätzen ($\approx$ 10 μl) bei 98%. Ein Probenkopf neuerer „XC5“-Technologie zeigte mit 71% (ohne Einsätze, $\approx$ 120 μl) und 96% (zylindrischer Einsatz, $\approx$ 50 μl) eine vergleichbare Homogenität bei jeweils deutlich vergrößertem Probenvolumen (Spektren nicht gezeigt), was der Verwendung bei verdünnten oder wenig angereicherten Proben sehr entgegenkommt. Abb. 2.2 zeigt die möglichen gravierenden Auswirkungen der Probengröße in der HF-Spule anhand des REDOR-Experiments, welches sich als sehr empfindlich auf Inhomogenitäten im HF-Feld herausstellte. Die Reduzierung des Ursprungssignals durch REDOR nähert sich unter Verwendung von sphärischen Einsätzen dem Maximum $\Delta S/S_0 \approx 1$ (Intensität $\approx$ 0) an, während dieses mit vollständig gefülltem Rotor nicht erreicht wird. Da im folgenden die Intensitäten von REDOR-Seitenbanden ausgewertet werden sollen, spielt die

Sicherstellung eines homogenen HF-Feldes eine entscheidende Rolle. Die Pulsbreite der verwendeten 180°-Pulse wurde vor Aufnahme der Spektren jeweils exakt neu kalibriert.

2.2 Selektiv isotopenmarkiertes Chrysospermin C

Selektiv ^{15}N- und ^{13}C,^{15}N-isotopenmarkiertes CSC war von H. Wenschuh für NMR-Untersuchungen von CSC in Methanol (Anders *et al.*, 1997) und DPC-Mizellen (Anders *et al.*, 2000) mittels FMOC-Festphasensynthese hergestellt worden. Es besitzt folgende Isotopenmarkierungen: Ac-Phe-Aib-Ser-Aib-[D-Iva]-Leu-Gln-Gly-[^{15}**N,**^{13}**C**′ -Aib]-[^{15}**N,**^{13}**C**′ -Aib]-Ala-Ala-[^{15}**N,**^{13}**C**′ -Aib]-Pro-[^{13}**C**$^{\beta}$ -Aib]-[^{13}**C**$^{\beta}$ -Aib]-[^{13}**C**$^{\beta}$ -Aib]-Gln-Trp-ol.

2.3 Chrysospermin C in Liposomen

12.8 mg markiertes CSC wurde mit Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) (SIGMA, München) im molaren Verhältnis 1:13 in Methanol aufgenommen und homogenisiert. Nach zweimaliger Lyophilisation zur Entfernung des Methanols und Wiederaufnahme in Wasser wurde das Peptid/Lipidgemisch als 50%ige Lösung ($^{w}/_{v}$) in 10 mM Phosphatpuffer (pH 5.0) aufgenommen. Die so erhaltene 70 μl Probe wurde dann in einen verschließbaren Kel-F-Einsatz für 5 mm MAS-Rotoren pipettiert. Von der Probe wurden anschließend bei 40 °C über mehrere Stunden ^{31}P-Spektren der DMPC-Kopfgruppe aufgenommen, um Umlagerungsprozesse der Lipide zu verfolgen, z. B. in Schichten, die nach der Lyophilisation noch nicht vollständig hydratisiert sind. Es ergaben sich während der ersten 30 Minuten noch leichte Änderungen im ^{31}P-Pulverspektrum (Spektren nicht gezeigt).

2.4 Magnetisch orientierbare Bizellen

Um CSC relativ zum Magnetfeld zu orientieren, wurde es in DHPC/DMPC-Bizellen eingebracht, welche sich spontan mit ihrer Flächennormalen senkrecht zu $\vec{B}_0$ ausrichten. Im folgenden soll das optimale molare Verhältnis CSC:DHPC:DMPC ermittelt werden, damit genügend CSC-Moleküle pro Bizelle vorhanden sind, um eine Ausbildung von Aggregaten/Ionenkanälen zu ermöglichen. Die „Stirnfläche“, die von einem DMPC-Molekül beansprucht wird, entspricht ca. 52–72 Å^2 (Shen *et al.*, 1997). Es wurde im folgenden ein Mittelwert von ca. 67 Å^2 angenommen. Die Stirnfläche einer α-Helix entspricht ca. 133 Å^2 (aus SYBYL-Molekülmodellierungsdaten gewonnen). Der Radius der Bizell-Oberfläche, der hauptsächlich DMPC enthält und einen Lipiddoppelschicht-ähnlichen Aufbau hat, läßt sich zu für ein molares DHPC:DMPC-Verhältnis von 1:3 zu $R \approx 200$ Å berechnen (Abb. 2.3; Vold & Prosser, 1996). Hieraus ergibt sich eine Gesamtanzahl von $\approx$ 3800 DMPC-Molekülen/Bizelle. Der 50 μl Kel-F-Einsatz enthält bei 25% $^{w}/_{v}$ Bizellen:Wasser-Gehalt 15 μmol DMPC bzw. 3.9 nmol Bizellen ($M_{\mathrm{DMPC}} =$

$677.9, M_{\mathrm{DHPC}} = 453.5$). Es wurden 0.8 mg $\widehat{=}$ 0.4 μmol (8 mM) selektiv markiertes CSC eingesetzt. Dies entspricht einem CSC:DMPC-Verhältnis von 1:38. Eine Bizelle enthält demnach ca. 102 CSC-Moleküle. Diese vergrößern die Bizell-Oberfläche um ca. 1/9, was die Orientierbarkeit der Bizelle im Magnetfeld nicht entscheidend beeinflussen sollte (unter der Annahme, daß sich die Helixbündel so ausbilden, daß die Helices jeweils die Membrane durchspannen).

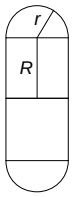

Abbildung 2.3:
Schematische Seitenansicht einer idealisierten Bizelle. R = Radius der Lipiddoppelschicht, hauptsächlich gebildet aus DMPC, r = Radius des Randes, hauptsächlich gebildet aus DHPC.

DHPC und DMPC wurden von SIGMA (München) bezogen und im Verhältnis 1:3 gemischt. Hierzu wurde zunächst eine Stammlösung einer größeren, genauer abwägbaren Menge DHPC in Wasser hergestellt. Ketten-teildeuteriertes 1-Myristoyl-2-Myristoyl(d27)-sn-Glycero-Phosphocholin (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) ersetzte das „normale“ DMPC im molaren Verhältnis von 1:40, um Veränderungen in den Lipidketten bei Hinzugabe des Peptids mittels der ^{2}H-Quadrupolaufspaltung zu detektieren. Die Mischung wurde dann für einige Stunden bei 4 °C geschüttelt. Bei dieser Temperatur bildet das Detergens/Lipidgemisch eine klare, niedrigviskose Lösung, bei welcher sich DHPC und DMPC besonders gut in Wasser lösen (Gel $\rightarrow$ Flüssigkristall-Phasenübergangstemperatur von DMPC $T_{\mathrm{m}} = 23$ °C). Um das starke isotrope HDO-Signal in den ^{2}H-Spektren zu vermeiden, wurde von Deuterium befreites Wasser (Cambridge Isotope Labs, Inc., Andover, MA, USA) als Lösungsmittel benutzt (10 mM Phosphat, pH 5.0).

2.5 Uniform isotopenmarkierte Chrysospermine

Für die in Kapitel 7 beschriebene Strukturbestimmung von CSC in isotropen Bizellen wurde vollständig ^{15}N- und ^{13}C,^{15}N-isotopenmarkiertes CSC benötigt. Für die Kreuzrelaxations-Experimente zur Charakterisierung von ^{15}N-Tensoren wurde ein Teil des U-^{15}N-CSC in DPC-mizellare Lösung überführt.

Die Synthese größerer Peptide aus markierten Aminosäuren ist teuer. Zudem ist aufgrund der unüblichen Aminosäuren, die in den Chrysosperminen in großer Anzahl vorhanden sind, eine rekombinante Überexpression in Bakterien wie *Escherichia coli* ebenfalls nicht möglich. Daher wurde im Labor von K. Dornberger (HKI Jena) erprobt, ob der Pilz *Apiocrea chrysosperma*, in welchem die Chrysospermine gefunden wurden (Dornberger *et al.*, 1995), für eine quantitative Gewinnung isotopenmarkierter Peptide geeignet ist.

Tatsächlich fanden B. Schlegel und K. Dornberger Bedingungen, unter denen *A. chrysosperma* auf Minimalmedium (Glukose/Ammoniumsulfat) wächst und Chrysospermine in ausreichender Menge produziert. Hierzu wurde mit einem Stück reifer Schrägkultur des Pilzstammes

Ap 101 (Kultursammlung HKI Jena), gewachsen auf Malzextrakt-Agar, das flüssige, synthetische Medium angeimpft. Das Medium bestand aus 1.5% (^{13}C-)Glukose, 0.35% Ammonium-$^{15}N_2$-Sulfat (Cambridge Isotope Lab. Inc., USA), 0.1% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.0008% $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 0.51% $CaCO_3$ und entionisiertem Wasser, pH 5.3. Die Oberflächenkultur wurde bei 28 °C in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Medium angesetzt. Die Produktion des CSC wurde während der fünf Wochen dauernden Kultivierung über RP-HPLC kontrolliert ($\lambda = 210$ nm). Die Chrysospermine wurden isoliert, wie beschrieben (Dornberger *et al.*, 1995). Hierzu wurde die gesamte Kultur mit Ethylacetat extrahiert und der Extrakt mittels „Flash"-Chromatographie auf Silikagel und semipräparativer RP-HPLC in Mischungen der Chrysospermine A/B bzw. C/D fraktioniert (resultierende Gesamtmenge: 20 bzw. 35.7 mg). Diese Schritte zur Herstellung der markierten Chrysospermine wurden freundlicherweise von K. Dornberger durchgeführt.

2.5.1 Trennung der Chrysospermine mittels HPLC

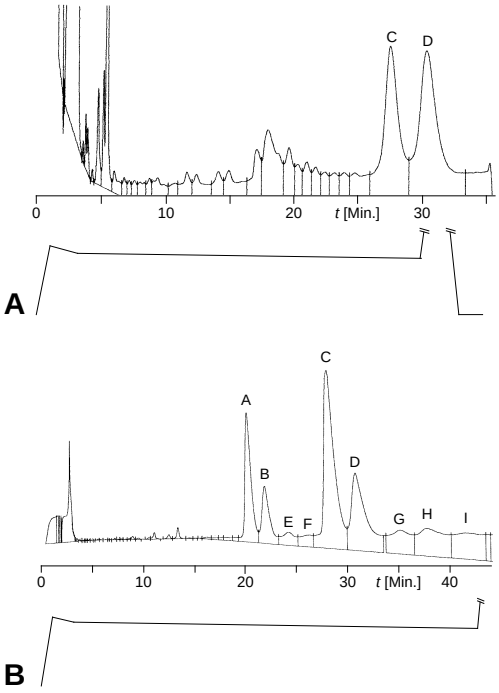

Abbildung 2.4:
Trennung von U-^{15}N- (A) bzw. U-^{13}C,^{15}N- (B) markiertem Chrysospermin-Gemisch mittels semipräparativer HPLC. Dargestellt ist die UV-Absorption bei 210 nm (jeweils oben) sowie der verwendete Gradientenverlauf (jeweils unten): (A): 0...1 Min.: 0 → 54% b, 1...3 Min.: 54 → 49%, 3...30 Min.: 49 → 45%, 30...31 Min.: 45 → 100% (B): 0...1 Min.: 0 → 53% b, 1...3 Min.: 53 → 49%, 3...43 Min.: 49 → 44%, 43...44 Min.: 44 → 100% (Puffer a = 0.1% TFE in H_2O, b = Acetonitril). Die Säulentemperatur betrug 57 °C, die Pumpgeschwindigkeit 1.4 ml/Min. und die Auftragsmenge 20 μl einer 24 mg/ml Lösung Chrysosperminmischung in Methanol. In (B) sind neben den bekannten Chrysosperminen A–D die kleinen Signale anderer Produkte zu sehen, hier mit E–I bezeichnet.

Für die Separation der Chrysospermin A/B bzw. C/D-Mischungen, die jeweils fast identische Retentionszeiten aufweisen, wurde bislang eine zyklische Wiederauftragung des Eluats auf die HPLC angewandt (Dornberger *et al.*, 1995). Nach ca. 8 Schritten war die Separation gut genug, um durch Sammeln während des zentralen Signalanteils ein praktisch reines Produkt zu erhalten. Ein Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, daß sie nur auf relativ große Auftragsmengen anwendbar ist ($\geq$ 50 mg/Lauf), da das Eluat in jedem Zyklusschritt stark verdünnt wird. Da die Gesamtmenge der produzierten U-^{15}N bzw. U-^{13}C,^{15}N Chrysospermingemische jedoch mit 10–35 mg selbst für einen einzigen HPLC-Lauf zu gering war, mußte die Trennung auf eine andere Weise erfolgen.

Es konnte eine semipräparative Methode etabliert werden, die das hohe Trennungspotential einer analytischen HPLC-Säule ausnutzt. Eine 25 cm lange analytische C_{18}-Säule mit 4 mm Durchmesser und 100 Å Porengröße (ET 250/4 Nucleosil 100-5 C_{18}, Macherey-Nagel, Düren) stellte sich bei 57 °C als geeignet heraus. Als Laufmittel wurden 0.1% TFE in Wasser (Puffer a) und Acetonitril (Puffer b) benutzt. In Optimierungsläufen mit unmarkiertem Chrysospermin-Gemisch wurde die Trennung mit zunehmend flacherem Gradienten (Puffer a $\rightarrow$ b) immer besser. Es stellte sich heraus, daß sogar ein *negativer* Gradient verwendet werden konnte, um die Trennung noch einmal drastisch zu verbessern (Abb. 2.4A). Für die endgültige Trennung der markierten Peptide wurde ein Gradientenverlauf von 0…1 Min.: 0 $\rightarrow$ 54% b, 1…3 Min.: 54 $\rightarrow$ 49% b, 3…30 Min.: 49 $\rightarrow$ 45% b benutzt (Abb. 2.4A, unten). Die Auftragsmenge pro Lauf konnte auf bis zu $\approx$ 0.5 mg CSC/D in Methanol erhöht werden, wobei eine fortwährende Reoptimierung des Gradientenverlaufs nötig war. Um eine möglichst hohe Reinheit des Eluats zu erhalten, wurde jeweils nur während des Durchlaufs die mittlere Fraktion eines Signals gesammelt und die immer noch leicht überlappenden Zwischenanteile für eine spätere Trennung aufbewahrt.

Die Herstellung der vollständig ^{13}C,^{15}N-isotopenmarkierten Chrysospermine wurde analog zur Herstellung der U-^{15}N-Chrysospermine durchgeführt, nur wurde statt unmarkierter Glukose U-^{13}C-Glukose eingesetzt. Da die Vorfraktionierung der U-^{13}C,^{15}N Chrysospermine nicht vollständig verlaufen war, lagen zunächst noch alle Chrysospermine A–D als Gemisch vor (zwei Fraktionen, 16.6 und 29.3 mg). Um die Verluste bei der Trennung mittels HPLC möglichst gering zu halten, wurde das im vorangegangenen Abschnitt etablierte HPLC-Trennungsprotokoll so reoptimiert, daß die Chrysospermine A–D in einem einzigen Lauf getrennt werden konnten (Abb. 2.4B).

Letztere Trennung war in der Tat so hochauflösend, daß eine Reihe weiterer, kleinerer Signale gefunden wurde, die sich in der Retentionszeit zwischen Chrysospermin A/B und C/D bzw. nach C/D befinden (Abb. 2.4B). Diese wurden für eine weitere Untersuchung mittels Massenspektrometrie und NMR (siehe Abschnitt 7.1.1) ebenfalls getrennt gesammelt und vorläufig mit E–I bezeichnet.

2.5.2 Chrysospermin-Proben für NMR-Experimente in Lösung

Zunächst wurden Fraktionen der Chrysospermine A–D (U-^{15}N) bzw. A–I (U-^{13}C, ^{15}N) in Methanol-d3 aufgenommen, um mittels 2D (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektren deren Reinheit zu überprüfen und um erste Erkenntnisse über die Zusammensetzung der neu gefundenen Chrysospermine zu erhalten.

Für einen Vergleich der ^{2}H -Austauschraten von CSC in Mizellen und Bizellen wurde von U-^{15}N CSC eine Lösung in deuterierten DPC-Mizellen in einem molaren Verhältnis Peptid:Detergens = 1:50 hergestellt. Für 2 mg U-^{15}N CSC wurden 17.6 mg d-DPC verwendet ($M_{\mathrm{DPC}} = 351.5$ g/mol). Das verwendete d-DPC wurde freundlicherweise von L. R. Brown zur Verfügung gestellt (Herstellung: siehe Brown, 1979). Die Lösung enthielt einen leichten Phos-

phatpuffer (10 mM, pH 5.0). Zur Erhöhung der Probenkonzentration innerhalb der NMR-Spule bei gleichzeitiger Sicherstellung guter Shimming-Bedingungen wurden Suszeptibilitätsstopfen (DOTY Scientific, Columbia, USA) verwendet.

Mit steigendem Detergens-Gehalt wird der Anteil der Membranoberfläche, die durch die DMPC-Lipidmoleküle gebildet wird, relativ zum hauptsächlich durch die kurzkettigen DHPC-Moleküle eingenommenen Rand der Bizellen immer geringer. Der Radius der Membranfläche verkleinert sich, bis sich die Anisotropie der magnetischen Suszeptibilität der gleich ausgerichteten DMPC-Moleküle nicht mehr gegen die thermische Bewegung durchsetzen kann: Die Bizellen orientieren sich im Magnetfeld nicht mehr und rotieren isotrop um alle Raumachsen, es wird auch nur noch eine ^{31}P-Linie an der isotropen Position beobachtet. Um das optimale Mischungsverhältnis von DHPC:DMPC für ein isotropes Bizell-System (Vold *et al.*, 1997) zu bestimmen, wurde eine Probe deuterierter Bizellen vom Verhältnis 1:3 ausgehend immer weiter mit DHPC verdünnt. Bei zu hohem Verhältnis sind die sich bildenden Bizellen zu groß und ihre Rotationsdiffusion ist zu gering – die Linienbreite eingebrachter Moleküle ist zu groß, um für hochauflösende NMR-Untersuchungen in Betracht zu kommen. Andererseits soll die Bizelloberfläche möglichst groß sein, um ein gutes Modell einer flachen Lipidmembran darzustellen. Das eingebrachte, selektiv markierte CSC zeigte in (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektren schließlich bei 0.7:1 eine befriedigende ^{1}H-Linienbreite von ca. 35 Hz (Spektren nicht gezeigt). Struppe und Vold (1998) hatten in ihren Versuchen sogar ein Verhältnis von 0.5:1 benutzt – da dieses Verhältnis in dem vorliegenden Fall keine wesentliche Verkleinerung der Linienbreite erbrachte, wurde das Verhältnis von 0.7:1 zugunsten einer größeren Bizellenoberfläche beibehalten. Hierfür ergibt sich ein Bizell-Radius von $R = 55$ Å (im Vergleich zu 200 Å bei orientierten Bizellen mit einem Verhältnis von 3:1) mit ca. 285 DMPC-Molekülen/Bizelle.

Da die erwartete Signalintensität einiger Experimente aufgrund des schlechten Relaxationsverhaltens der sehr großen Bizell-Aggregate recht gering ausfallen dürfte, soll soviel Peptid wie möglich im Bizell-System eingesetzt werden. Zudem soll sichergestellt werden, daß ausreichend Peptidmoleküle in jeder Bizelle vorhanden sind, um die Bildung von Ionenkanal-Aggregaten zu ermöglichen. Damit sich Helixbündel von mindestens 6 CSC-Molekülen pro Bündel ausbilden können (Ternovsky *et al.*, 1997), sollten ca. 12 Peptidmoleküle pro Bizelle ausreichen, was einem Verhältnis von 1:23 Peptid:DMPC entspricht. Abzüglich der in der U-^{15}N Mizell-Probe verwendeten Menge waren 2.9 mg U-^{15}N sowie 2.2 mg U-^{15}N, ^{13}C CSC verfügbar. Es wurden 24.9/18.9 mg DMPC-d67 ($M = 745.5$ g/mol) und 23.3/17.7 mg DHPC-d35 ($M = 488.8$ g/mol) für die U-^{15}N-/U-^{15}N, ^{13}C-Proben mit der jeweiligen Peptidmenge in 350 μl Wasser aufgenommen (10 mM Phosphatpuffer, pH 5.0) und unter Verwendung von Suszeptibilitätsstopfen in 5 mm NMR-Röhrchen gefüllt. Es waren 10% D_2O nötig, um ein klar definiertes Lock-Signal zu erhalten, da mit den deuterierten Lipiden ein zweites Lock-Signal auftrat, welches das Shimming erschwerte.

Kapitel 3

Charakterisierung chemischer Verschiebungstensoren mittels MAS NMR-spektroskopischer Methoden

Im folgenden soll auf die Entwicklung und Anwendung von Festkörper-NMR-Methoden eingegangen werden, mit Hilfe derer sowohl die Anisotropie als auch die vollständige Orientierung des Tensors der chemischen Verschiebung (CS-Tensor) z. B. von ^{15}N und ^{13}C in einem Protein-Rückgrat bestimmt werden kann.

Anhand von ^{15}N- und ^{13}C,^{15}N-isotopenmarkiertem Acetanilid wird gezeigt, daß nach Bestimmung der Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA) von ^{15}N durch CPMAS-Experimente eine Kombination von ^{15}N-^{13}C-REDOR- und ^{15}N-^{1}H dipolar gekoppelten Experimenten zur vollständingen Bestimmung der Orientierung des ^{15}N-Tensors im Bezugssystem des Moleküls geeignet ist. Am Beispiel eines AibAib-Dipeptids wird demonstriert, wie eine Korrelation von ^{13}C′ CS-Tensor und ^{15}N-^{1}H dipolarer Kopplung unter MAS genutzt werden kann, um zusammen mit ^{13}C-^{15}N-REDOR-Experimenten die Orientierung auch des ^{13}C′ CS-Tensors im Bezugssystem des Moleküls zu bestimmen.

3.1 Methoden

3.1.1 NMR-Spektroskopie

Zum Einsatz kam ein 500 MHz „wide-bore“ $^{\text{UNITY}}$*INOVA* NMR-Spektrometer von Varian (Varian, Palo Alto, USA) sowie Tripelresonanz-MAS-Probenköpfe mit einem Rotordurchmesser von 5 mm (Doty, Scientific, Columbia, USA). Bis auf an entsprechender Stelle erwähnte Ausnahmen wurden alle MAS NMR-Spektren mit vorhergehender ^{1}H-(^{15}N,^{13}C) Kreuzpolarisation unter Hartmann-Hahn-Anpassung (Hartmann & Hahn, 1962) aufgenommen. Breitbandiges Entkoppeln der Protonen mittels der TPPM-Pulsfolge (Bennett *et al.*, 1995) verbesserte das Signal-zu-Rausch-Verhältnis um bis zu 50–100%, besonders bei Kernen mit direkt gebunde-

nem Proton wie z. B. Amid-^{15}N. Die typische 90°-Pulslänge betrug 3.8 (^{1}H), 4.5 (^{13}C) und 7.3 μs (^{15}N). Die Referenzierung der Heterokern-Spektren erfolgte mit Hilfe der von Wishart *et al.*, 1995 vorgestellten indirekten Methode. Hierbei wird zunächst die absolute Spektrometerfrequenz des ^{1}H-Methylsignals von DSS (2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonat) ermittelt, welche als 0 ppm definiert wird. Dann wird über sehr genau bestimmte gyromagnetische Verhältnisse von ^{1}H zu Heterokernen wie ^{13}C, ^{15}N und ^{31}P deren absolute Spektrometerfrequenz bei 0 ppm berechnet (^{1}H-^{13}C: 0.251449530, ^{1}H-^{15}N: 0.101329118, ^{1}H- ^{31}P: 0.404807356).

3.1.2 Numerische Berechnungen

Alle numerischen Optimierungen und Simulationen von NMR-Spektren wurden mit Hilfe der Programmsammlung SPINME durchgeführt (Leppert, 2001a). Die Programme zur Simulation von NMR-Spektren benutzen die VNMR Software (Varian, Palo Alto, USA) zur Fouriertransformation und Ausgabe der Spektren. Bei der Optimierungsrechnung und Simulation wird, dem jeweiligen Experiment entsprechend, zur Näherung ein isoliertes Ein- bzw. Mehrspinsystem angenommen. Im Einspinsystem-Fall eines Ensembles von Spin $\frac{1}{2}$-Kernen eines einzelnen Kristallites unter MAS ist der zeitabhängige Hamiltonoperator, dessen Eigenwert die NMR-Signalintensität ist, im rotierenden Koordinatensystem gegeben als (Olejniczak *et al.*, 1984; Leppert *et al.*, 1999):

$$\hat{\mathcal{H}}(t) = -\Delta\omega I_z - \omega\left[g_1\cos(\omega_{\mathrm{r}}t+\varphi_1) + g_2\cos(2\omega_{\mathrm{r}}t+\varphi_2)\right]I_z, \tag{3.1}$$

wobei

$$\begin{aligned}
\Delta\omega &= \omega_0\frac{1}{3}(\sigma_{11}+\sigma_{22}+\sigma_{33}) + \omega_{\text{off}} = \omega_0\sigma_{\text{iso}} + \omega_{\text{off}} && (3.2)\\
\omega &= \omega_0(\sigma_{33}-\sigma_{\text{iso}}) && (3.3)\\
g_1 &= \frac{1}{2}\sin 2\theta_{\mathrm{m}}\sin\beta\sqrt{(\eta\cos 2\gamma+3)^2\cos^2\beta + \eta^2\sin^2\beta\,\sin^2\,2\gamma} && (3.4)\\
g_2 &= \frac{1}{2}\sin^2\theta_{\mathrm{m}}\sqrt{\left[\frac{3}{2}\sin^2\beta - \frac{1}{2}\eta\cos 2\gamma(1+\cos^2\beta)\right]^2 + \eta^2\cos^2\beta\,\sin^2 2\gamma} && (3.5)\\
\varphi_1 &= \alpha+\psi_1, \qquad \varphi_2 = 2\alpha+\psi_2 && (3.6)
\end{aligned}$$

Hierbei sind ψ_1, ψ_2 und η definiert über

$$\begin{aligned}
\tan\psi_1 &= \frac{\eta\sin 2\gamma}{\cos\beta(\eta\cos 2\gamma+3)} && (3.7)\\
\tan\psi_2 &= \frac{-\eta\cos\beta\sin 2\gamma}{\frac{3}{2}\sin^2\beta - \frac{1}{2}\pi\cos 2\gamma(1+\cos^2\beta)} && (3.8)\\
\eta &= \frac{\sigma_{22}-\sigma_{11}}{\sigma_{33}-\sigma_{\text{iso}}} && (3.9)
\end{aligned}$$

(α, β, γ) sind die Euler-Winkel, die die Orientierung des CS-Tensors relativ zum rotierenden Bezugssystem des MAS-Rotors definieren und (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) die Hauptachsenelemente des CS-Tensors. In der hier verwendeten Notation bezeichnet σ_{33} die am wenigsten und σ_{11} die am stärksten abgeschirmte Komponente des CS-Tensors. ω_0 ist die Larmorfrequenz des Kerns, θ_{m} der „magische Winkel“ und ω_{off} die Frequenzdifferenz zwischen ω_0 und der eingestrahlten Spektrometerfrequenz („Resonanzoffset“). Experimentelle Fehlerquellen wie nicht unendlich kurze HF-Pulse, Inhomogenitäten im B_1-Feld, Fluktuationen in der Rotationsfrequenz usw. sind in den Berechnungen nicht berücksichtigt.

Um ein experimentelles MAS–Spektrum iterativ anzupassen (de Groot *et al.*, 1991), wird in SPINME (Leppert, 2001a) das mit vorgegebenen Startwerten für die zu bestimmenden Parameter berechnete Pulverspektrum einer diskreten Fouriertransformation unterworfen. Die einzelnen theoretischen Intensitäten ergeben sich hierbei aus den Fourierkoeffizienten. Mit Hilfe des Nelder-Mead Simplex-Algorithmus (Press *et al.*, 1992) werden die Startwerte dann iterativ optimiert, bis die gewünschte Genauigkeit und Übereinstimmung mit den experimentellen Daten erreicht ist.

Für die Fouriertransformation und Darstellung in VNMR wird die Periodizität des MAS Hamiltonoperators mit der Rotorfrequenz ausgenutzt: Ein mit den optimierten Parametern simuliertes Signal wird zur Rechenzeitoptimierung lediglich für eine einzige Rotorperiode berechnet und dann repliziert angehängt, um die spektrale Auflösung zu erhöhen (de Groot *et al.*, 1991; Schmidt-Rohr & Spiess, 1994).

3.2 Charakterisierung der chemischen Verschiebungsanisotropie von ^{15}N mittels CPMAS NMR

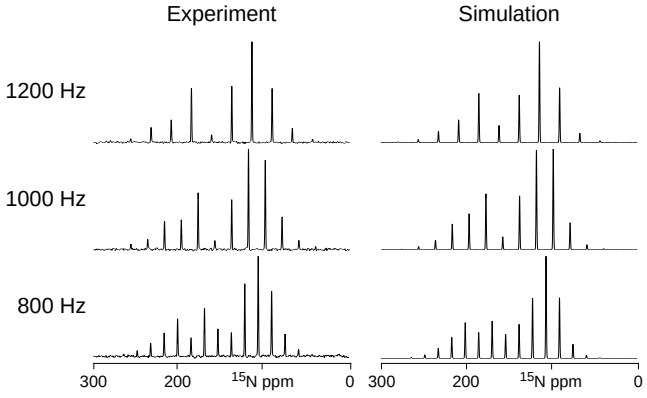

Abbildung 3.1:
Experimentelle und angepaßte simulierte, ^{15}N CPMAS-Spektren von Acetanilid bei verschieden ν_{r}. Zur Simulation wurden optimierte CS-Tensorwerte aus Tab. 3.1 (S. 34) benutzt. Die Experimente wurden mit 32 (1200, 1000 Hz) und 48 Wiederholungen (800 Hz) bei einer Wiederholzeit von 100 s aufgenommen.

Die Anisotropie der chemischen Verschiebung äußert sich in MAS NMR-Spektren in einer spezifischen Intensitätsverteilung der Rotationsseitenbanden. Sie hängt von der Breite des CS-Tensors $\Delta\sigma = \sigma_{33} - \sigma_{11}$, dessen Asymmetrie $\eta = (\sigma_{22} - \sigma_{11})/(\sigma_{33} - \sigma_{\mathrm{iso}})$ und von der Rotationsfrequenz ν_{r} ab (Gleichung 3.1). Hier sind σ_{33} als die Tieffeld-verschobene (maximale Ab-

schirmung) und σ_{11} als die Hochfeld-verschobene Tensorkomponente (kleinste Abschirmung) definiert. Die Empfindlichkeit der CS-Parameter nimmt mit zunehmender Drehfrequenz und somit abnehmender Anzahl von Seitenbanden stark ab. Zum Beispiel ist bei nur geringer Asymmetrie ($0 \lesssim \eta \lesssim 0.2$), wie es bei Acetanilid der Fall ist ($\eta = 0.12$), die Asymmetrie bei $\nu_{\mathrm{r}} \gtrsim 1200$ Hz nicht mehr bestimmbar. Zur genauen und zuverlässigen Bestimmung des CS-Tensors wurden daher immer mehrere Experimente bei unterschiedlichen MAS-Drehfrequenzen ν_{r} durchgeführt (Abb. 3.1) und über deren Resultate gemittelt. Die Ergebnisse für ^{15}N-Acetanilid sind in Tabelle 3.1 auf S. 34 zusammengefaßt.

3.3 MAS NMR-Methoden zur Bestimmung der Orientierung von ^{15}N-CS-Tensoren

3.3.1 Orientierung der ^{15}N-^{13}C-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor: ^{15}N-^{13}C REDOR

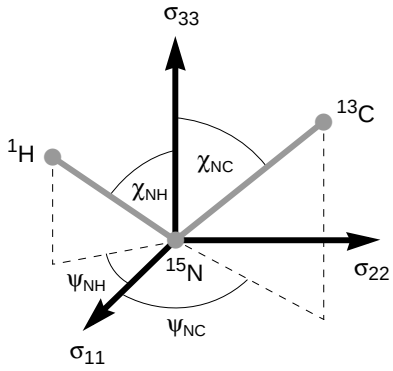

Abbildung 3.2:
Schema zur Bestimmung des Orientierung des ^{15}N-Tensors relativ zu zwei Bindungsvektoren ^{15}N-^{13}C und ^{15}N-^{1}H in einem Molekül, welches ein Spin-Netzwerk des Typs ^{1}H-^{15}N-^{13}C enthält.

Führt man ein REDOR-Experiment bei geringen Drehfrequenzen durch, so daß Rotationsseitenbanden auftreten, ist deren Intensitätsverteilung abhängig von der Größe des Tensors der chemischen Verschiebung des beobachteten Kerns sowie von dessen Orientierung relativ zu der dipolaren Bindungsachse (Goetz & Schaefer, 1997). Die Probe, anhand welcher Goetz und Schaefer diesen Effekt zeigten, L-[1,3-^{13}C,^{15}N] Alanin, hatte allerdings eine relativ schwache dipolare ^{13}C-^{15}N-Zweibindungskopplung von nur $\approx$ 190 Hz (Abstand $\approx$ 2.47 Å). Daher war der Einfluß der dipolaren Kopplung auf das REDOR-dephasierte Spektrum relativ gering, und ein ^{13}C-^{15}N-REDOR Experiment mit sechs Rotorperioden dipolarer Rückkopplung kam zum Einsatz. Hierbei wurde eine relativ hohe Anzahl von 180°-Pulsen nötig, die sehr exakt eingestellt werden müssen, da sich sonst die Intensitätsverteilung in den Rotationsseitenbanden ändern kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher Substanzen verwendet, deren ^{13}C- und ^{15}N-Markierungen direkt gebunden sind wie z. B. ^{13}C′ und ^{15}N in einem Peptidrückgrat. Auf diese Weise ergibt sich eine deutlich größere dipolare Kopplung von $\approx$ 1200 Hz (Abstand $\approx$ 1.02

Å). REDOR-Experimente mit einer bzw. zwei Rotorperioden Rückkopplungszeit sind daher ausreichend, um genügend Einfluß der dipolaren Kopplung auf das Spektrum zu beobachten, wobei die Anzahl der Fehlerquellen in Form nicht perfekter 180°-Pulse minimiert ist (Abb. 3.3). Die Verwendung des REDOR-Experiment mit einer Rotorperiode ist allerdings auf Proben mit einem einzelnen isotopenmarkierten Kern beschränkt. Das Experiment wird mit dem Trägersignal auf der isotropen chemischen Verschiebung des beobachteten Kerns aufgenommen, um die chemische Verschiebung mit dem Rotations-Echo zu refokussieren. Signale, die nicht bei Frequenzen des ganzzahligen Vielfachen der Rotorfrequenz liegen (also den Rotationsseitenbanden), wären zu dem auf dem Trägersignal liegenden phasenverschoben. In mehrfach markierten Proben müssen daher mindestens zwei Rotorperioden mit dazwischenliegendem 180°-Refokussierungspuls (Spin-Echo) auf dem I-Kanal verwendet werden.

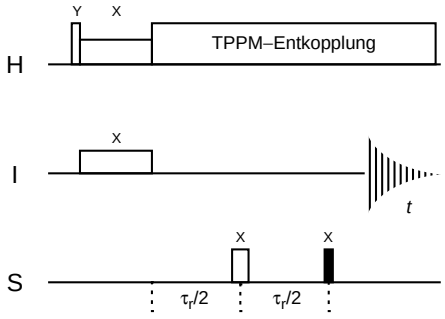

Abbildung 3.3:
REDOR-Pulssequenz mit einer Rotorperiode, optionalem 90° Purge-Puls und ^{1}H-Breitbandentkopplung. Ausgefüllte Balken stellen 90°-Pulse dar, gerahmte Balken sind 180°-Pulse. Die Phasen der Pulse sind jeweils darüber angegeben.

Für ein dipolar gekoppeltes Zweispinsystem ist das beobachtete NMR-Signal eines Kristallites nach einer Rotorperiode dipolarer Rückkopplung im REDOR-Experiment (Abb. 3.3) gegeben als:

$$\left\langle I^+ \right\rangle = (\cos A \cos B + \sin A \sin B) e^{iC} \tag{3.10}$$

wobei

$$A = 2D \frac{\omega_{\mathrm{IS}}}{\omega_{\mathrm{r}}} \sin \alpha_D, \tag{3.11}$$

$$\begin{aligned} B = \frac{\omega_{\mathrm{IS}}}{4\omega_{\mathrm{r}}} \big[& 2D \sin(\omega_{\mathrm{r}} t - \alpha_D) + G \sin 2(\omega_{\mathrm{r}} t - \alpha_D) \\ & + 2D \sin \alpha_D + G \sin 2\alpha_D \big] \end{aligned} \tag{3.12}$$

$$\begin{aligned} C = \frac{\omega}{2\omega_{\mathrm{r}}} \Big[& (2g_1 \sin \varphi_1 + g_2 \sin \varphi_2) \\ & - \big(2g_1 \sin(\omega_{\mathrm{r}} t + \varphi_1) + g_2 \sin(2\omega_{\mathrm{r}} t + \varphi_2)\big) \Big] \end{aligned} \tag{3.13}$$

Hierbei ist $D = 2\sqrt{2} \sin \beta_D \cos \beta_D$ und $G = \sin^2 \beta_D$. ω, g_1, g_2, φ_1 und φ_2 sind wie in Gleichungen 3.3–3.6 definiert (Abschnitt 3.1.2). ω_{IS} ist die dipolare Kopplungsstärke und (β_D, α_D) sind die Polar- und Azimutwinkel des dipolaren Tensors im rotierenden Koordinatensystem. Letztere sind definiert über

$$\cos\beta_D = \cos\chi_D\cos\beta - \sin\chi_D\sin\beta\cos(\gamma+\psi_D), \tag{3.14}$$

$$\cos(\alpha_D-\alpha) = \frac{\cos\chi_D - \cos\beta\cos\beta_D}{\sin\beta\sin\beta_D}, \tag{3.15}$$

wobei (α,β,γ) die Euler-Winkel des chemischen Verschiebungstensors relativ zum rotierenden Koordinatensystem und (χ_D,ψ_D) die Polar- und Azimutwinkel des dipolaren Tensors im Koordinatensystem des CS-Tensors sind. χ repräsentiert eine Rotation um σ_{22} und ψ, gefolgt von einer Rotation um σ_{33}. Um das Gesamtsignal einer polykristallinen Probe zu berechnen, wird die Pulsantwort des Einzelkristallits in Gleichung 3.10 einer gewichteten Mittelung über alle Kristallitorientierungen (α,β,γ) unterzogen. Typischerweise sind hierzu $32\times32\times32$ diskrete Orientierungen ausreichend, um das Spektrum hinreichend genau zu simulieren.

3.3.1.1 „Purging“

Die beiden Terme in Gleichung 3.10 repräsentieren den In-Phase-Operator I_x und den Anti-Phase-Operator I_yS_z am Zeitpunkt des Beginns der Datenaufnahme eines REDOR-Experiments. Wenn durch eine langsame MAS-Frequenz die dipolare Wechselwirkung nicht vollständig herausgemittelt wird, kann der Anti-Phase-Term während der Datenaufnahme zu einer observablen Magnetisierung I_x refokussieren und zum beobachteten REDOR-dephasierten Signal beitragen. Es ist möglich, diesen Beitrag entweder durch Entkopplung der S-Spins während der Datenaufnahme oder mit Hilfe eines 90°-„Purge“-Pulses direkt vor dem Beginn der Datenaufnahme zu eliminieren (Abb. 3.3), welcher auch in NMR-Experimenten in Lösung Verwendung findet. In diesem Fall muß der zweite Term in Gleichung 3.10 nicht mehr mitberechnet werden. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Genauigkeit bei der Auswertung von REDOR-Spektren leicht erhöht, wenn dieser Anti-Phase-Beitrag eliminiert wird. In REDOR-Experimenten zur Bestimmung von Distanzen bzw. dipolaren Kopplungen wird lediglich die integrierte Signalintensität benötigt, in die der Anti-Phase-Term nicht eingeht. In diesem Fall kann er also vernachlässigt werden.

In anderen dipolaren Rückkopplungsexperimenten wie z. B. ^{15}N $\rightarrow$ ^{13}C-TEDOR in einem ^{15}N-^{13}C-^{15}N Dreispinsystem können u. U. noch deutlich mehr Anti-Phase-Terme auftreten – im Falle dieses TEDOR-Experimentes insgesamt 8, davon 6 Anti-Phase (Leppert *et al.*, 2001b). Es konnte in Zusammenarbeit mit J. Leppert gezeigt werden, daß die Eliminierung dieser Anti-Phase-Beiträge hier signifikant zur Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beiträgt (Leppert *et al.*, 2001b). Zudem verringert sich die benötigte Rechenzeit des numerischen Anpassungsprogramms, da 3/4 der nötigen Rechenschritte entfallen.

3.3.1.2 Sensitivität der ^{15}N-^{13}C REDOR-Spektren auf Euler-Winkel

Zunächst sollen am Beispiel des ^{15}N CS-Tensors die Unterschiede in der Intensitätsverteilung der Rotationsseitenbanden in REDOR-dephasierten Spektren vorgestellt werden, die aufgrund

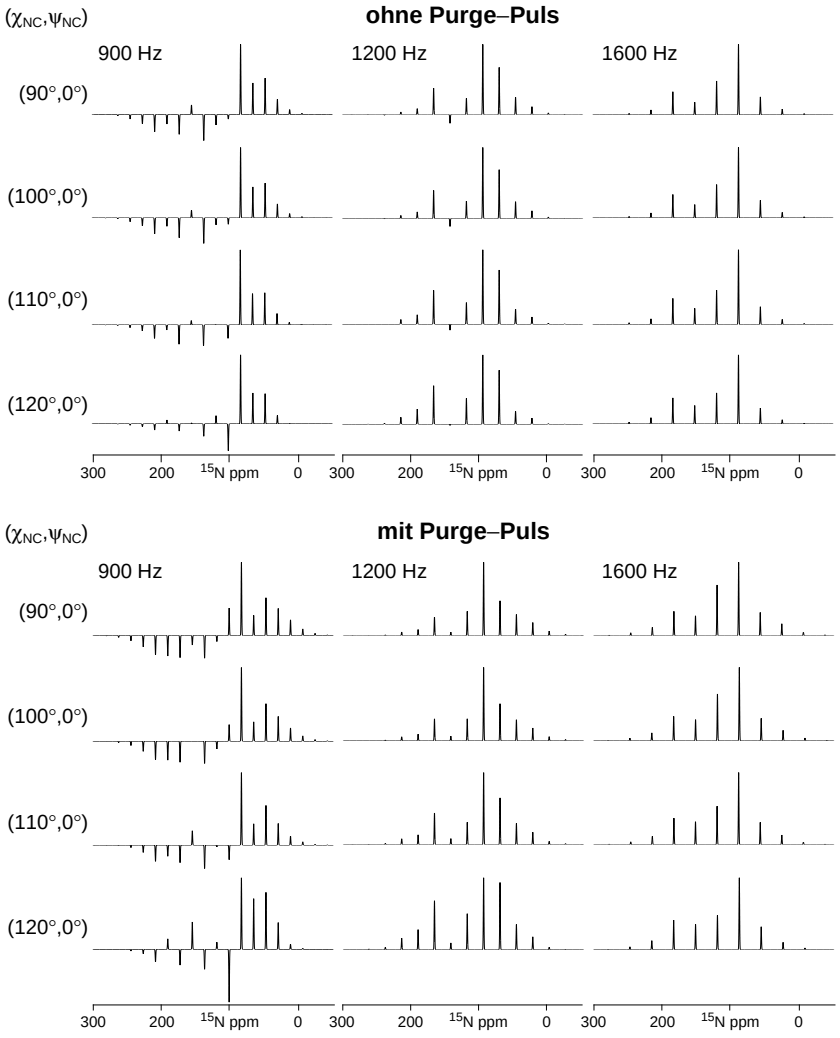

Abbildung 3.4: *Simulierte ^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren mit einer Rotorperiode, mit und ohne 90°-Purge-Puls, bei ν_r = 900, 1200 und 1600 Hz, in Abhängigkeit vom Polarwinkel χ_{NC} bei fixiertem Azimutwinkel ψ_{NC} = 0°. In den Simulationen wurde eine dipolare ^{15}N-^{13}C-Kopplung von 1200 Hz angenommen und CS-Tensorwerte von AcGlyAla (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) = (42.4 ppm, 87.3 ppm, 229.4 ppm) (Oas* et al.*, 1987a).*

von Unterschieden in der Orientierung des Tensors relativ zur ^{15}N-^{13}C-Achse herrühren. Da die Asymmetrie des fast axialsymmetrischen ^{15}N-Tensors in Acetanilid mit $\eta = 0.12$ sehr klein ist, wird lediglich eine geringe Abhängigkeit der Spektren vom Azimutwinkel ψ_{NC} erwartet. Zur prinzipiellen Demonstration der Winkelabhängigkeiten wird daher das Dipeptid AcGlyAla benutzt, dessen Tensorparameter bereits bekannt sind (Oas *et al.*, 1987a) und dessen Asymmetrie mit $\eta = 0.41$ deutlich größer ist. Gerade aufgrund dieser etwas erschwerten Bedingungen ist Acetanilid jedoch als experimentelles Testmolekül geeignet, um zu untersuchen, wie genau Größe und Orientierung des ^{15}N CS-Tensors in solchen Fällen noch bestimmt werden können. Die Abhängigkeit von REDOR-dephasierten Spektren vom Polarwinkel χ_{NC} wird in Abb. 3.4 für einen typischerweise in Peptiden auftretenden Winkelbereich gezeigt, wobei der Azimutwinkel auf $\psi_{\mathrm{NC}} = 0°$ fixiert ist.

In Abbildung 3.5 ist χ_{NC} auf 100° fixiert und ψ_{NC} wird variiert. Es ist offensichtlich, daß die Sensitivität der Spektren auf beide Winkel mit abnehmender Rotationsfrequenz deutlich zunimmt, da sich die REDOR-Dephasierungskurve dem Maximum annähert ($t_{\mathrm{mix}} \approx 1.4$ ms $\widehat{=}$ 700 Hz, siehe auch Abschnitt 3.3.1.3), in dem die Rückkopplung der dipolaren Wechselwirkung am

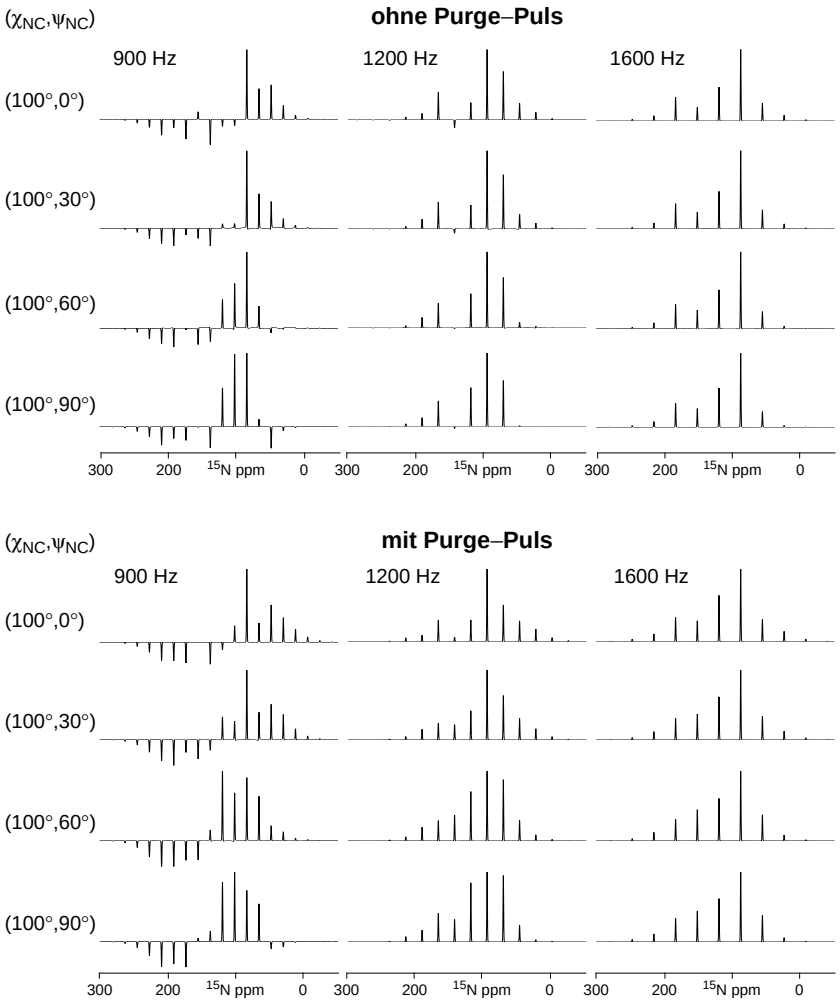

Abbildung 3.5: *Simulierte ^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren mit einer Rotorperiode, mit und ohne 90°-Purge-Puls, bei ν_r = 900, 1200 und 1600 Hz, in Abhängigkeit vom Azimutwinkel ψ_{NC} bei fixiertem Polarwinkel χ_{NC} = 100°. Es wurden die gleiche dipolare Kopplung und die gleichen CS-Tensorparameter wie in Abb. 3.4 benutzt.*

größten ist. Hinzu kommt, daß auch die Anzahl Rotationsseitenbanden ansteigt und somit mehr Freiheitsgrade für eine iterative Anpassung zur Verfügung stehen. Allerdings muß man damit rechnen, daß bei größerer REDOR-Dephasierung das zu messende Signal besonders klein und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis sehr schlecht ist. Somit wird eine genaue Winkelbestimmung besonders im Falle von geringer Probenkonzentration bzw. -menge erschwert. Im Fall von z. B. 900 Hz ist $\Delta S/S_0$, das Verhältnis von Intensitätsdifferenz mit/ohne 180°-Dephasierungspulse zur vollen Signalintensität (ohne Pulse) gleich 0.96, d. h. daß die über alle Seitenbanden integrierte Intensität nur noch 4% des Ursprungssignals ausmacht.

Vergleicht man die simulierten Spektren mit und ohne Purge-Puls (Abb. 3.4 bzw. 3.5 jeweils oben und unten), erkennt man den deutlichen, in beiden Experimenten ähnlichen Einfluß der Euler-Winkel. Es zeigt sich allerdings eine Tendenz dazu, daß das Experiment mit Purge-Puls etwas sensitiver auf Winkeländerungen reagiert. Man vergleiche z. B. in Abb. 3.4 unten die starke Änderung der intensiven negativen Seitenbande bei 900 Hz, (120°,0°), die im oberen Spektrensatz deutlich weniger ausgeprägt ist. Diese Tendenz ist bei anderen Experimenten wie z. B. TEDOR, die mehr mögliche Anti-Phase-Anteile im Signal besitzen können (siehe

Abschnitt 3.3.1.1), noch deutlich stärker sichtbar, was an dem Dreispinsystem [1,3-^{15}N, 2-^{13}C] Uracil gezeigt werden konnte (Leppert, 2001a; Leppert *et al.*, 2001b).

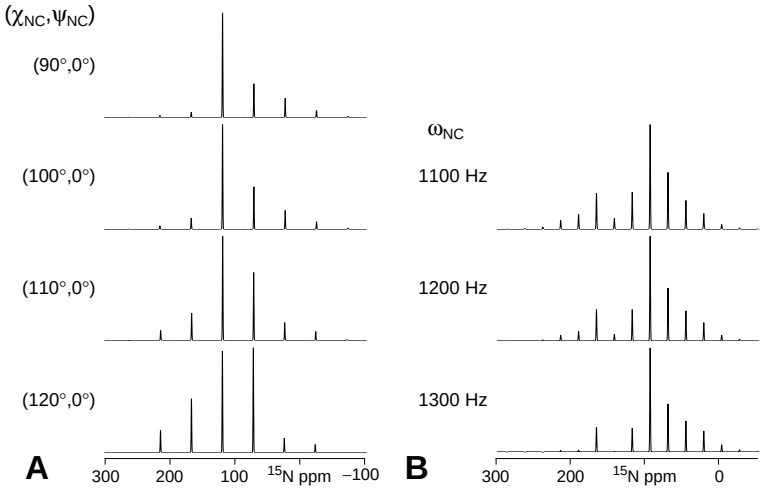

Abbildung 3.6:
(A) Simulierte ^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren mit zwei Rotorperioden, 90°-Purge-Puls, bei ν_r = 2400 Hz und einer dipolaren Kopplung von 1200 Hz in Abhängigkeit vom Polarwinkel χ_{NC} bei fixiertem Azimutwinkel ψ_{NC} = 0°.

(B) Simulierte ^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren mit einer Rotorperiode, 90°-Purge-Puls, bei einer MAS-Frequenz von 1200 Hz und Euler-Winkeln von (χ_{NC}, ψ_{NC}) = 100°, 0° in Abhängigkeit von der dipolaren Kopplung. In A und B wurden CS-Tensorparameter wie in Abb. 3.4 benutzt.

Obwohl die Sensitivität der Seitenbandenintensitäten mit steigender Rotationsfrequenz (> 1200 Hz) stark abnimmt, kann man die Sensitivität bei höheren Frequenzen mit Hilfe eines REDOR-Experiments mit mehr als einer Rotorperiode wiederherstellen (Abb. 3.6A). Hier ist die Anzahl der Seitenbanden, die die Winkelinformation enthalten, jedoch geringer und daher ein limitierender Faktor für die Genauigkeit der Winkelbestimmung. Im Falle einer mehrfach isotopenmarkierten Probe ist eine höhere Rotationsfrequenz allerdings eine der Möglichkeiten, einer spektralen Überlappung von Seitenbanden der verschiedenen Kerne entgegenzuwirken, wie auch in Zusammenarbeit mit J. Leppert (Leppert et al., 2000a; Leppert, 2001a) gezeigt werden konnte. Zudem muß bei Spektren, die mehrere Signale enthalten, der Effekt der chemischen Verschiebung (min. ein Signal ist nun „off-resonant“ vom Trägersignal) mittels eines Spin-Echos refokussiert werden. Eine REDOR-Sequenz mit z. B. zwei Rotorperioden besitzt den hierzu nötigen 180°-Refokussierungspuls auf dem Akquisitionskanal zwischen den beiden Rotorperioden sowie zwei 180°-Dephasierungspulse auf dem nicht beobachteten Kanal.

3.3.1.3 ^{15}N-^{13}C REDOR-Spektren von Acetanilid

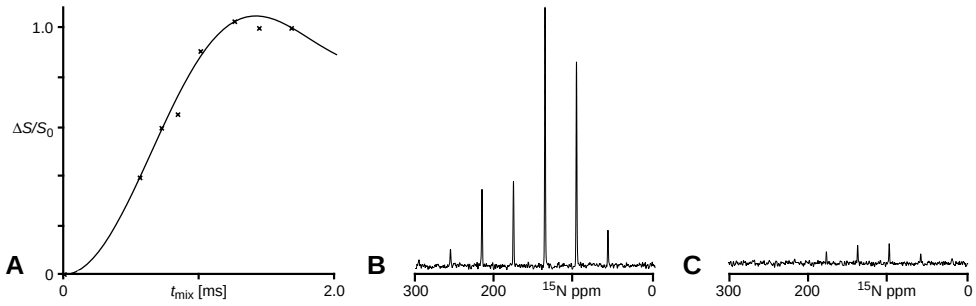

Abbildung 3.7:
Bestimmung der dipolaren ^{15}N-^{13}C-Kopplung in Acetanilid mittels ^{15}N-^{13}C-REDOR. (A) Verhältnis zwischen REDOR-Differenzsignal ΔS und nicht-dephasiertem Signal S_0 als Funktion der dipolaren Dephasierungszeit. Experimentelle Daten wurden mit einem zwei Rotorperioden-Experiment mit 90°-Purge-Puls aufgenommen. Verschiedene Dephasierungszeiten wurden durch Verwendung von ν_r = 3600, 2800, 2400, 2000, 1600, 1400 und 1200 Hz erreicht. Die kontinuierliche Kurve wurde unter Annahme einer dipolaren Kopplung von 1200 Hz generiert. (B) Beispielspektrum des nicht-dephasierten und (C) des dazugehörigen, ^{15}N-^{13}C dipolar dephasierten REDOR-Experiments bei ν_r = 2000 Hz.

Abgesehen von der chemischen Verschiebungsanisotropie, die bereits in Abschnitt 3.2 bestimmt wurde, und der Orientierung der ^{15}N-^{13}C-Bindungsachse zum ^{15}N-Tensor, die es zu bestimmen gilt, wird die Intensitätsverteilung eines REDOR-dephasierten Spektrums durch die Stärke der dipolaren ^{15}N-^{13}C-Kopplung beeinflußt (Abb. 3.6B). Es ist zu sehen, daß die Abhängigkeit von der ^{15}N-^{13}C-Kopplung nicht sehr stark ausgeprägt ist und daher geringe Fehler bei der Bestimmung der Kopplung tolerierbar sind. Geringe Abweichungen bei den CS-Tensorkomponenten von ca. 2 ppm stellen ebenfalls kein Problem dar (Daten nicht gezeigt). Die ^{15}N-^{13}C-Kopplung in Acetanilid wurde mit einem Standard-REDOR-Experiment mit zwei Rotorperioden bestimmt, in dem das Intensitätsverhältnis zwischen dephasierten und nicht dephasierten Spektren $(S - S_0)/S_0 = \Delta S/S_0$ gegen die Dephasierungszeit $N\tau_\mathrm{r}$ aufgetragen wird (Abb. 3.7). Verschiedene Werte für die Dephasierungszeit wurden durch Ändern der Rotationsfrequenz zwischen 1200 und 3600 Hz erreicht. Hier können solche höheren Frequenzen benutzt werden, da die dipolare Kopplung nur von der integrierten Intensität aller Seitenbanden abhängt und nicht von deren individuellen Intensitäten.

Der pulvergemittelte, theoretische Verlauf (Gleichung 3.16) wurde dann an die experimentellen Daten angepaßt (Abb. 3.7A) und so die Kopplung bzw. der Abstand der direkt gebundenen Kerne bestimmt (Gullion & Schaefer, 1989).

$$\frac{\Delta S}{S_0} = 1 - \frac{1}{4\pi} \iint \cos\left(N\tau_\mathrm{r} D_{ij}\sqrt{2}/\pi \sin 2\beta \sin\alpha\right) \sin\beta \, d\beta \, d\alpha, \tag{3.16}$$

Hierbei ist $D_{ij} = \mu_0/(4\pi)(\gamma_i\gamma_j\hbar)/(2\pi r_{ij}^3)$ [Hz] die heteronukleare dipolare Kopplung zweier Kerne (i, j) mit Abstand r_{ij} und (β, α) sind die Polar- bzw. Azimutwinkel für die Pulvermittlung. Aus der Anpassung (Abb. 3.7A) wurde eine dipolare ^{15}N-^{13}C-Kopplung von 1200 Hz

abgeleitet, was einem ^{15}N-^{13}C-Abstand von 1.37 Å entspricht. Dieser Wert wurde im folgenden für alle iterativen Anpassungen der ^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren verwendet.

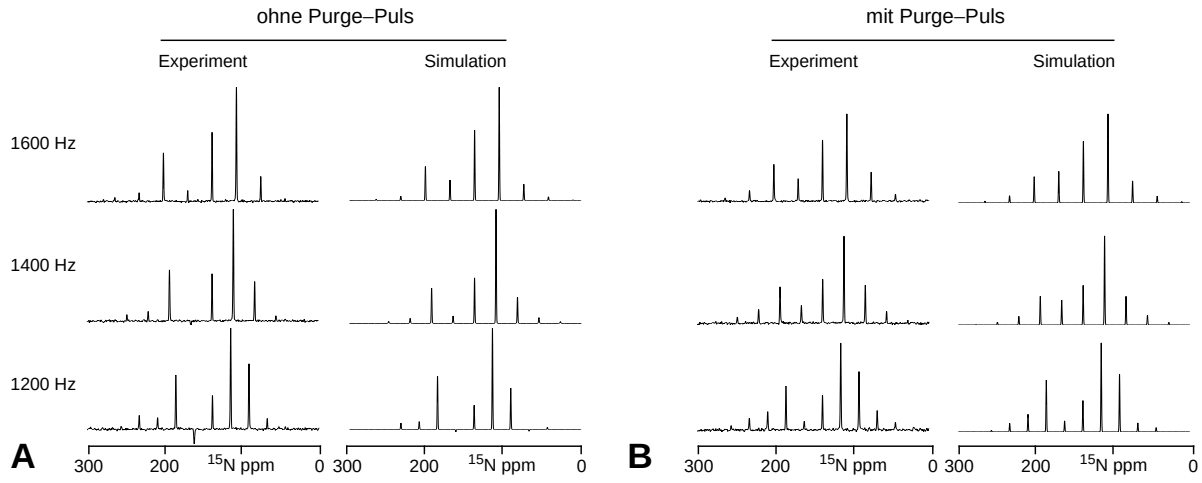

Abbildung 3.8:
Experimentelle und angepaßte simulierte ^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren von Acetanilid bei verschiedenen Rotationsfrequenzen. (A) Ohne 90°-Purge-Puls (B) mit 90°-Purge-Puls. Für die simulierten Spektren wurden die optimierten Werte für χ_{NC} und ψ_{NC} aus Tabelle 3.1 (S. 34) benutzt. Die Experimente wurden mit einer Rotorperiode durchgeführt und es wurden 200 (1600 Hz), 256 (1400 Hz) und 400 Wiederholungen (1200 Hz) bei einer Wiederholzeit von 100 s aufgenommen.

^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren mit einer Rotorperiode bei verschiedenen ν_{r} wurden nun iterativ ausgewertet und die optimal passenden Euler-Winkel (χ_{NC}, ψ_{NC}) bestimmt. Experimentelle und passend dazu simulierte Spektren sind in Abb. 3.8 gezeigt. Zur Winkeloptimierung wurde wiederum der gleiche Nelder-Mead-Algorithmus wie bei der Bestimmung der chemischen Verschiebungsanisotropie (Abschnitt 3.1.2) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 (S. 34) aufgelistet und werden dort im Detail besprochen.

3.3.2 Orientierung der ^{15}N-^{1}H-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor

3.3.2.1 Sensitivität ^{15}N-^{1}H dipolar gekoppelter Spektren auf Euler-Winkel

Um die Orientierung des chemischen Verschiebungstensors von ^{15}N relativ zu einer zweiten Achse im Molekül zu bestimmen, wurde die Orientierung der ^{15}N-^{1}H-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor bestimmt. Erreicht wurde dies mittels eindimensionaler Spektren, die während der Datenaufnahme der heteronuklearen dipolaren ^{15}N-^{1}H-Kopplung unterliegen. Die Empfindlichkeit auf Euler-Winkel ist in Abb. 3.9 für typischerweise auftretende Winkel (χ_{NH} klein, $\psi_{\mathrm{NH}} \approx 0°$) gezeigt.

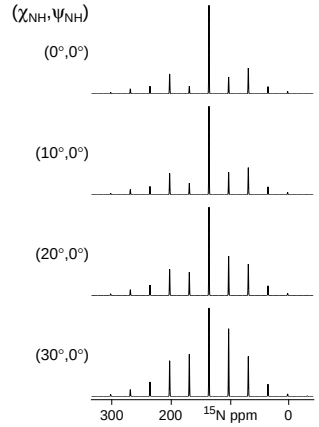

Abbildung 3.9:
Simulierte, ^{15}N-^{1}H dipolar gekoppelte CPMAS-Spektren von Acetanilid bei ν_r = 1800 Hz als eine Funktion des Polarwinkels χ_{NH} bei fixiertem Azimutwinkel ψ_{NH} = 0°. Zur Simulation wurden eine skalierte dipolare Kopplung von 4500 Hz sowie die experimentell bestimmten CS-Tensorwerte aus Tabelle 3.1 benutzt.

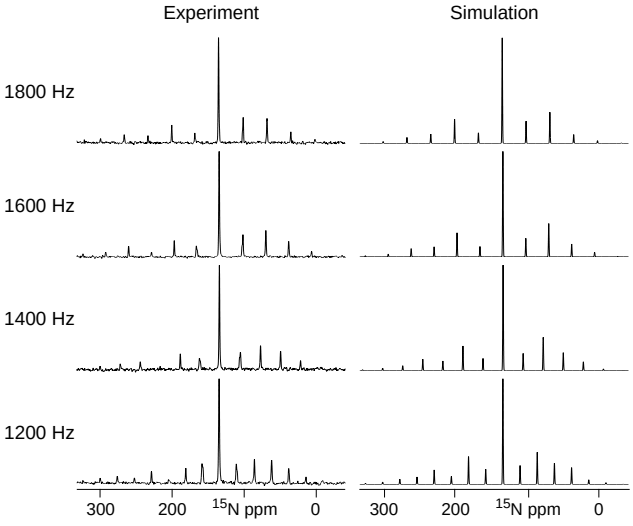

Abbildung 3.10:
Experimentelle und angepaßte simulierte, ^{15}N-^{1}H dipolar gekoppelte CPMAS-Spektren von Acetanilid bei verschiedenen ν_r. Zur Simulation wurden eine skalierte dipolare Kopplung von 4500 Hz sowie optimierte CS-Tensorwerte und Euler-Winkel aus Tabelle 3.1 benutzt. Die Experimente wurden mit 16 (1800 Hz) und 32 Wiederholungen (1600–1200 Hz) bei einer Wiederholzeit von 100 s aufgenommen.

3.3.2.2 ^{15}N-^{1}H dipolar gekoppelte Spektren von Acetanilid

Zur Aufnahme ^{15}N-^{1}H dipolar gekoppelter Spektren wurde während der Akquisitionszeit statt breitbandiger TPPM ^{1}H-Entkopplung die MREV-8-Sequenz (Rhim *et al.*, 1973) eingestrahlt. Diese eliminiert zwar die homonukleare ^{1}H-^{1}H-Kopplung weitestgehend, läßt aber eine skalierte heteronukleare ^{15}N-^{1}H-Kopplung wirksam werden. Der Skalierungsfaktor κ, der von vor allem von der verwendeten Entkopplungssequenz sowie der H_1-Feldstärke abhängt, wurde zuvor mit Hilfe der ^{13}C-^{1}H-Aufspaltung in einer gleich großen Adamantan-Probe auf $\kappa \approx 0.43$ bestimmt. Adamantan eignet sich gut als Testsystem für Festkörper-NMR-Experimente, da aufgrund der hohen internen Beweglichkeit des Systems auch für eine statische Pulverprobe ein scharfes, isotropes ^{13}C-Signal beobachtet wird. Abbildung 3.10 zeigt experimentelle Spektren bei verschiedenen ν_r zusammen mit den jeweils optimal angepaßten simulierten Spektren. Alternativ zu eindimensionalen, dipolar gekoppelten Spektren können auch 2D DIPSHIFT Spektren (Waugh, 1976; Munowitz & Griffin, 1983) eingesetzt werden, um die Winkel zwischen ^{15}N-^{1}H-Bindungsvektor und ^{15}N-Tensor zu bestimmen. Diese Spektren besitzen eine größere Anzahl Seitenbanden, die gleichzeitig an einen Parametersatz angepaßt werden müssen und sind eine mögliche Alternative zu den hier verwendeten 1D-Spektren, soweit sie mit ausreichendem

Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufnehmbar sind (Leppert *et al.*, 2000a). Bei der Bestimmung der Orientierung des ^{15}N CS-Tensors in der Peptidbindung des Dipeptids AibAib (siehe Abschnitt 4.1.3) beispielsweise wurden 2D DIPSHIFT-Spektren ausgewertet.

3.3.3 Ergebnisse zum ^{15}N chemischen Verschiebungstensor in Acetanilid

	CPMAS			1D-DIPSHIFT	REDOR		REDOR + Purge	
ν_r [Hz]	σ_{11} [ppm]	σ_{22} [ppm]	σ_{33} [ppm]	χ_{NH} [°][a]	χ_{NC} [°][b]	ψ_{NC} [°]	χ_{NC} [°][b]	ψ_{NC} [°]
700	80	95	240	9	–	–	–	–
800	81	91	242	8	(112)	(10)	(120)	(12)
900	82	97	235	7	(104)	(0)	(111)	(11)
1000	84	94	236	6	(112)	(0)	(113)	(0)
1200	(87)[c]	(87)[c]	(240)[c]	0	123	0	121	0
1400	(87)	(87)	(239)	0	90	0	108	0
1600	(91)	(91)	(232)	4	101	0	105	0
1800	(91)	(91)	(232)	6	–	–	–	–
Mittel	82 ± 2	94 ± 3	238 ± 4	5 ± 4	105 ± 23	0 ± 5	111 ± 12	0 ± 5
Lit.	77 ± 1	90 ± 3	247 ± 1	(7 ± 3)[d]			(110 ± 2)[e]	(0 ± 8)[e]

Tabelle 3.1: ^{15}N CS-Tensorparameter in Acetanilid.

[a] *Bei sehr kleinem χ_{NH} hat ψ_{NH} keinen Einfluß auf die Intensitäten der Seitenbanden und kann nicht bestimmt werden.*

[b] *$(180 - \chi_{NC})$ ist auch eine erlaubte Lösung.*

[c] *Der optimierte Asymmetrieparameter η war 0 bei $\nu_r \geq$ 1200 Hz, der Mittelwert für σ_{ii} wurde daher nur aus 700 Hz $\leq \nu_r \leq$ 1 kHz berechnet.*

[d] *Bestimmt aus statischen ^{15}N-^{2}H dipolar gekoppelten Pulverspektren.*

[e] *Bestimmt aus statischen ^{15}N-^{13}C dipolar gekoppelten Pulverspektren.*

Die Intensitätsverteilung der REDOR-Spektren zwischen ν_r = 800 und 1600 Hz erwies sich als sensitiv genug auf die Euler-Winkel, daß unabhängig von den gewählten Startwerten für die Euler-Winkel immer dieselben Winkel als Lösung erhalten wurden. Experimente bei $\nu_r \geq$ 1000 Hz, deren Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgrund $\Delta S/S_0 \approx 1$ sehr schlecht war, zeigten eine deutlich höhere Abweichung zwischen experimentellem und optimal angepaßtem Spektrum und wurden in der Mittelwertbildung nicht berücksichtigt. Die Winkelempfindlichkeit bei diesen Spektren war allerdings so hoch, daß dieselben Werte wie bei $\nu_r \geq$ 1200 Hz erhalten wurden. Bei ν_r = 800 und 900 Hz zeigten sich sogar Tendenzen, daß ψ_{NC} eventuell von 0 verschieden sein könnte. Bei $\nu_r \geq$ 1800 Hz traten „Triviallösungen“ wie χ_{NC} = 0° und 90° auf, weswegen diese Werte verworfen wurden. Im Fall des REDOR-Experiments ohne Purge-Puls trat χ_{NC} = 90° bei ν_r = 1400 Hz auf (nicht allerdings χ_{NC} = 0°), was möglicherweise auf die leicht verminderte Winkelempfindlichkeit im Vergleich zu dem Experiment mit Purge-Puls zurückzuführen

ist. Daher ist auch die Standardabweichung für dieses Experiment deutlich höher, obwohl eine Mittelung über lediglich drei Werte keine eindeutigen Schlüsse erlaubt. Die erhaltenen Werte für χ_{NC} und ψ_{NC} stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit den Ergebnissen in der Literatur (aus statischen, ^{13}C-gekoppelter ^{15}N-Pulverspektren, Lumsden *et al.*, 1994) gut überein.

Da der Winkel χ_{NH} sehr klein ist, wie es typischerweise in einer Peptidbindung beobachtet wird (Oas *et al.*, 1987a), und sich für kleine Polarwinkel im Spektrum kaum Änderungen zwischen verschiedenen Azimutwinkeln ergeben, ist ψ_{NH} nicht bestimmbar. Während des iterativen Anpassungsprozesses kann ψ_{NH} praktisch alle Werte annehmen. In solch einem Fall ist es besonders von Vorteil, die Euler-Winkel zu einem zweiten dipolaren Vektor zu bestimmen, z. B. mittels REDOR.

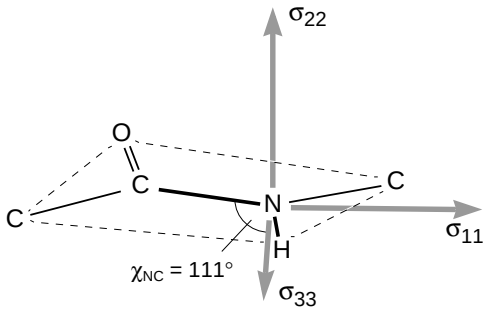

Abbildung 3.11:
Orientierung des chemischen Verschiebungstensors von ^{15}N in Acetanilid.

3.4 MAS NMR-Methoden zur Bestimmung der Orientierung von ^{13}C-CS-Tensoren

Der Ansatz, der bei der hier vorgestellten Methode zur Bestimmung der Orientierung von ^{13}C′-Tensoren gewählt wurde, entspricht im Prinzip dem für ^{15}N (Abschnitt 3.3) beschriebenen: Die Lage des ^{13}C′-Tensors wird relativ zu zwei dipolaren Achsen bestimmt, um dessen Orientierung relativ zum Molekülkoordinatensystem zu erhalten. Im Fall von ^{13}C′ ist jedoch kein direkt gebundenes Proton vorhanden, so daß eine direkte Korrelation von ^{1}H und ^{13}C nicht möglich ist. Hier soll statt dessen eine Methode verwendet werden, die es erlaubt, in einem ^{1}H-^{15}N-^{13}C dipolaren Netzwerk die Winkel zwischen ^{15}N-^{1}H-Bindungsachse und ^{13}C′-Tensor zu bestimmen. Dazu wird eine vermittelte („relayed“) Korrelation zwischen dipolarer ^{15}N-^{1}H-Kopplung und der ^{13}C chemischen Verschiebungsanisotropie verwendet. Anhand numerischer Simulationen und experimenteller Bestimmung der Orientierung des ^{13}C′ CS-Tensors in einem ^{13}C,^{15}N-isotopenmarkierten AibAib-Dipeptid wird die Anwendbarkeit dieser Methode demonstriert.

3.4.1 Orientierung der ^{15}N-^{1}H-Bindungsachse relativ zum ^{13}C chemischen Verschiebungstensor: 2D vermittelte Anisotropie-Korrelation

3.4.1.1 NMR-Spektroskopie

Für die Aufnahme der ^{13}C CPMAS und ^{13}C-^{15}N-REDOR-Spektren an (^{13}C,^{15}N)-AibAib-NH_2 wurden Standard-Pulssequenzen verwendet. Die REDOR-Sequenz wurde mit Purge-Puls benutzt. Abbildung 3.12 zeigt den Aufbau der Pulssequenz für die 2D vermittelten („relayed“) Anisotropie-Korrelation.

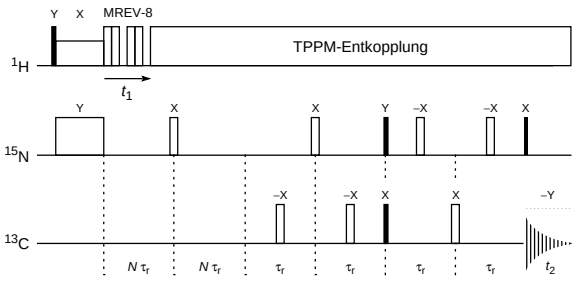

Abbildung 3.12:
Pulssequenz für die 2D-Korrelation der Wechselwirkungen von ^{15}N-^{1}H dipolarer Kopplung und $^{13}C'$ chemischer Verschiebung. Gezeigt ist die Teilsequenz für normale (Vorwärts-) Evolutionszeit in t_1. Alle 180°-Pulse werden entweder genau in der Mitte oder am Ende einer Rotorperiode eingestrahlt.

In diesem zweidimensionalen Experiment entwickelt sich die transversale ^{15}N-Magnetisierung nach Kreuzpolarisation in (ω_1) unter einer skalierten ^{15}N-^{1}H-dipolaren Kopplung und wird dann über einen TEDOR-Schritt zum $^{13}C'$ transferiert (Hing *et al.*, 1992; Hing *et al.*, 1993). Da die ^{15}N- und $^{13}C'$-Kerne direkt gebunden sind, reichen für den TEDOR-Schritt zwei Rotorperioden dipolarer Rückkopplung vor und nach dem Magnetisierungstransfer (simultane 90°-Pulse) aus, um die Magnetisierung bei den hier verwendeten Rotationsfrequenzen zu übertragen. Zu Beginn der Datenaufnahme wird ein 90°-Purge-Puls auf dem ^{15}N-Kanal eingestrahlt, um Signalanteile von Anti-Phase-Termen zu eliminieren (siehe Abschnitt 3.3.1.1). Weiterhin wurden Standard-Phasenzyklen verwendet, um Signalanteile auszulöschen, die von unerwünschten Magnetisierungstransfer-Pfaden herrühren könnten. Die skalierte ^{15}N-^{1}H-Kopplung ist durch homonukleare ^{1}H-Entkopplung mittels der MREV8-Sequenz (Rhim *et al.*, 1973) während t_1 aktiv. Phasensensitive 2D-Spektren wurden mittels normaler (vorwärts-) und zeitinvertierter dipolarer Evolution aufgenommen (Munowitz & Griffin, 1983). ^{1}H TPPM-Entkopplung und Referenzierung wurden wie in Abschnitt 3.1.1 verwendet.

3.4.1.2 Numerische Berechnungen

Um die Größe des $^{13}C'$ CS-Tensors und dessen Orientierung relativ zur ^{13}C-^{15}N-Achse zu bestimmen, wurden $^{13}C'$ CPMAS- und ^{13}C-^{15}N-REDOR-Spektren mit dem Programmpaket SPINME ausgewertet, wie in den Abschnitten 3.2 und 3.3 beschrieben. Die Programme wurden so erweitert, daß eine Simulation von 2D-Spektren der vermittelten Anisotropiekorrelation möglich war (Leppert, 2001a). Hierbei wurde ein dipolar gekoppeltes Spin-$\frac{1}{2}$-Netzwerk

vom Typ ^{1}H-^{15}N-^{13}C angenommen. In den Dichtematrixberechnungen werden skalare Kopplungen vernachlässigt und ideale experimentelle Bedingungen angenommen (ideale Pulse, stabile Probenrotation etc.). In einem Kristallit ist die Orientierung der Tensorhauptachsen des ^{13}C′-Tensors relativ zum Bezugssystem des Rotors durch die Euler-Winkel (α, β, γ) definiert. Für einen einzelnen Kristallit ergibt sich dann das Signal bei einer Rotatonsfrequenz ν_{r}(hier für normale dipolare Evolution angegeben):

$$\left\langle I^{+}(t_1,t_2)\right\rangle = \sin^2 A \cos E_{\mathrm{f}} \cos B \cdot e^{iC} \tag{3.17}$$

wobei

$$A = \frac{\omega_{\mathrm{CN}}}{\omega_{\mathrm{r}}}\, 4D_{\mathrm{CN}} \sin\alpha_{D_{\mathrm{CN}}} \tag{3.18}$$

$$\begin{aligned} E_{\mathrm{f}} = \frac{\omega_{\mathrm{NH}}}{4\omega_{\mathrm{r}}}\big[&2D_{\mathrm{NH}} \sin(\omega_{\mathrm{r}}t_1 - \alpha_{D_{\mathrm{NH}}}) + G_{\mathrm{NH}} \sin 2(\omega_{\mathrm{r}}t_1 - \alpha_{D_{\mathrm{NH}}}) \\ &+ 2D_{\mathrm{NH}} \sin\alpha_{D_{\mathrm{NH}}} + G_{\mathrm{NH}} \sin 2\alpha_{D_{\mathrm{NH}}}\big] \end{aligned} \tag{3.19}$$

$$\begin{aligned} B = \frac{\omega_{\mathrm{CN}}}{4\omega_{\mathrm{r}}}\big[&2D_{\mathrm{CN}} \sin(\omega_{\mathrm{r}}t_2 - \alpha_{D_{\mathrm{CN}}}) + G_{\mathrm{CN}} \sin 2(\omega_{\mathrm{r}}t_2 - \alpha_{D_{\mathrm{CN}}}) \\ &+ 2D_{\mathrm{CN}} \sin\alpha_{D_{\mathrm{CN}}} + G_{\mathrm{CN}} \sin 2\alpha_{D_{\mathrm{CN}}}\big] \end{aligned} \tag{3.20}$$

$$C = \frac{\omega}{2\omega_{\mathrm{r}}}\Big[(2g_1 \sin\varphi_1 + g_2\varphi_2) - \big(2g_1 \sin(\omega_{\mathrm{r}}t_2 + \varphi_1) + g_2 \sin(2\omega_{\mathrm{r}}t_2 + \varphi_2)\big)\Big] \tag{3.21}$$

Hierbei ist $D_{\mathrm{CN}} = 2\sqrt{2} \sin\beta_{D_{\mathrm{CN}}} \cos\beta_{D_{\mathrm{CN}}}$, $G_{\mathrm{CN}} = \sin^2\beta_{D_{\mathrm{CN}}}$ und $\omega = \omega_0(\sigma_{33} - \sigma_{\mathrm{iso}})$. D_{NH} und G_{NH} sind auf die gleiche Weise wie D_{CN} und G_{CN} definiert. ω_{CN} und ω_{NH} sind die Stärken der dipolaren Kopplungen von ^{13}C-^{15}N und ^{15}N-^{1}H, ($\beta_{D_{\mathrm{CN}}}$, $\alpha_{D_{\mathrm{CN}}}$) und ($\beta_{D_{\mathrm{NH}}}$, $\alpha_{D_{\mathrm{NH}}}$) bezeichnen die Euler-Winkel der dipolaren ^{13}C-^{15}N- und ^{15}N-^{1}H-Vektoren im Koordinatensystem des MAS-Rotors. g_1, g_2, φ_1 und φ_2 sind wie in Gleichungen 3.3–3.6 definiert. Die Euler-Winkel der dipolaren Vektoren im rotierenden Koordinatensystem des MAS-Rotors hängen mit den Euler-Winkeln (χ_{CN}, ψ_{CN}) und (χ_{NH}, ψ_{NH}) im Hauptachsensystem des ^{13}C′ CS-Tensors über die Winkel (α, β, γ) zusammen, die schon in Gl. 3.14–3.15 eingeführt wurden. Ein gewichtetes Mittel über alle Kristallorientierungen der Pulsantwort ergibt schließlich das simulierte Signal.

3.4.1.3 Winkelempfindlichkeit der vermittelten Anisotropie-Korrelation

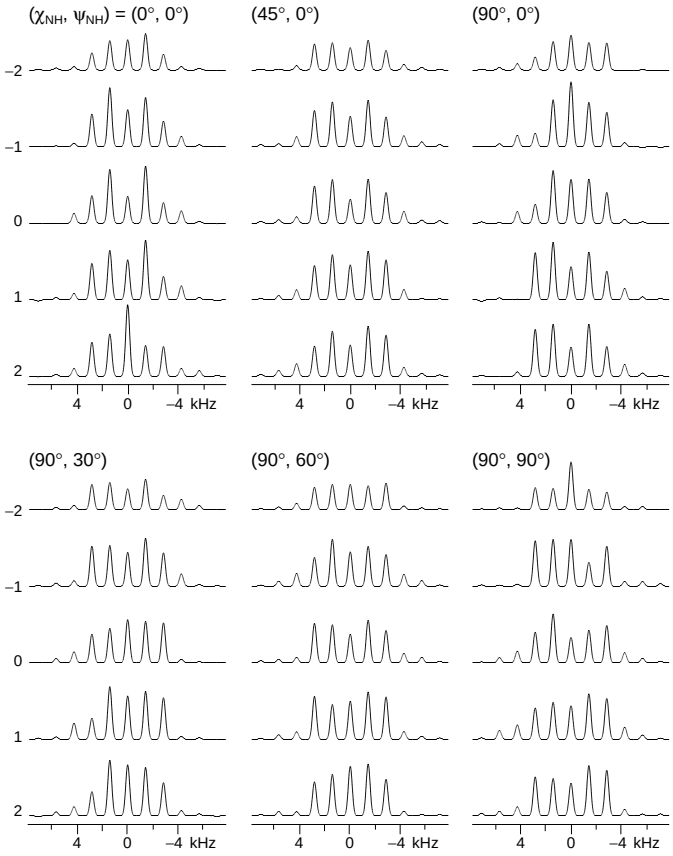

Abbildung 3.13:
Simulierte dipolare Querschnitte in ν_1 (auf Höhe der markierten Seitenbanden in ν_2) eines 2D vermittelten Anisotropie-Korrelationsspektrums bei ν_r = 1400 Hz und einer Variation der Euler-Winkel (χ_{NH}, ψ_{NH}) über einen großen Winkelbereich. Für die Simulationen wurden $^{13}C'$-Tensorwerte von (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) = (92.1 ppm, 191.4 ppm, 239.1 ppm), eine dipolare ^{15}C-^{13}N-Kopplung von ν_{CN}= 1200 Hz, eine skalierte dipolare ^{15}N-^{1}H-Kopplung von ν_{NH}= 5500 Hz und Euler-Winkel (χ_{CN}, ψ_{CN}) = (34°, 88°) verwendet.

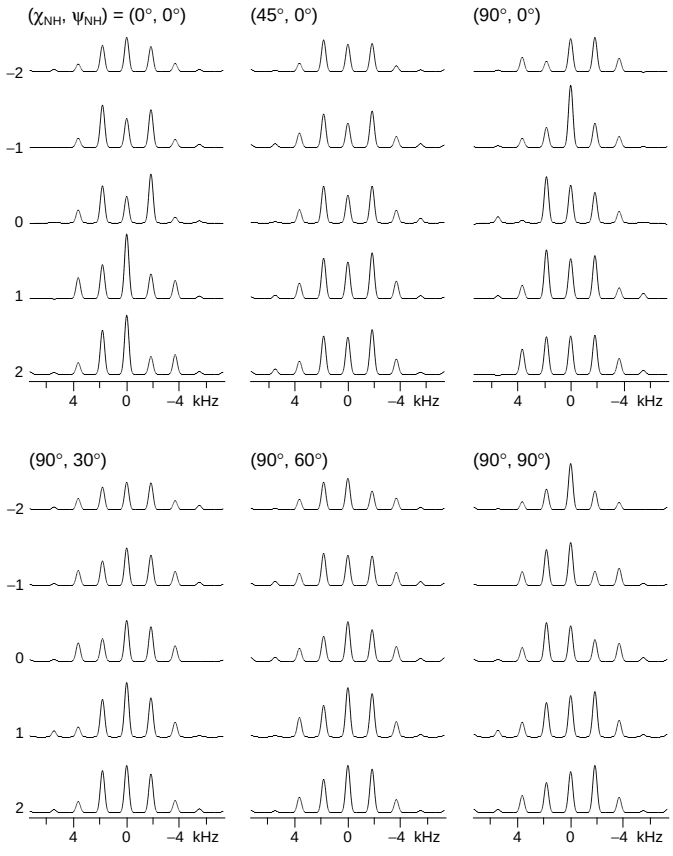

Abbildung 3.14:
Simulierte dipolare Querschnitte in ν_1 eines 2D vermittelten Anisotropie-Korrelationsspektrums bei ν_r = 1800 Hz und einer Variation der Euler-Winkel (χ_{NH}, ψ_{NH}) über einen großen Winkelbereich. Alle weiteren Parameter waren dieselben wie in Abb. 3.13.

Zunächst wurde die Empfindlichkeit der 2D vermittelten Anisotropie-Korrelationsspektren auf Änderungen in den beteiligten Winkeln mit Hilfe numerischer Simulation von Spektren bei verschiedenen ν_{r} untersucht. Hierbei stellte sich heraus, daß die 2D-Querschnitte kaum sensitiv auf die Winkel $(\chi_{\mathrm{CN}}, \psi_{\mathrm{CN}})$ sind (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich hierzu wurde in Zusammenarbeit mit J. Leppert gezeigt, daß in anderen Dreispinsystemen wie ^{15}N1-^{13}C-^{15}N2 in Uracil experimentelle Spektren durchaus von allen Euler-Winkeln der zwei dipolaren Vektoren relativ zum ^{13}C CS-Tensor abhängen können (Leppert *et al.*, 2000b). Die Winkel $(\chi_{\mathrm{CN}}, \psi_{\mathrm{CN}})$, die trotzdem für die Berechnung der spektralen 2D-Datensätze benötigt werden, wurden daher, wie in Abschnitt 3.3 vorgestellt, mit Hilfe von ^{13}C-^{15}N-REDOR-Experimenten gewonnen. Die Anisotropie des ^{13}C′-Tensors wurde wiederum zuvor mittels CPMAS-Experimenten bestimmt. Die benutzte ^{13}C-^{15}N dipolare Kopplungsstärke ν_{CN}wurde aus mischzeitabhängigen REDOR-Experimenten ermittelt.

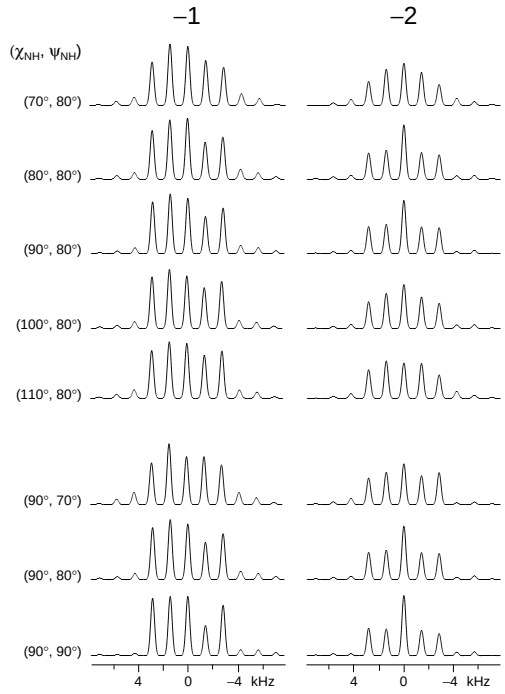

Abbildung 3.15:
Simulierte dipolare Querschnitte in ν_1 (auf Höhe der $-1.$ und $-2.$ Seitenbande in ν_2) eines 2D vermittelten Anisotropie-Korrelationsspektrums bei ν_r = 1400 Hz und einer Variation der Euler-Winkel (χ_{NH}, ψ_{NH}) innerhalb eines kleinen Winkelbereichs um das experimentelle Endergebnis. Alle weiteren Parameter waren dieselben wie in Abb. 3.13.

Die Abhängigkeit von $(\chi_{\mathrm{NH}}, \psi_{\mathrm{NH}})$ der 2D-Datensätze ist in Abb. 3.13 und 3.14 anhand von 2D-Querschnitten gezeigt, die exemplarisch für ν_{r} = 1400 und 1800 Hz berechnet wurden. Die Variation der Winkel ist in den Abbildungen angegeben. Zur Berechnung der Spektren wurden Werte für σ_{ii}, ν_{CN}, ν_{NH}und $(\chi_{\mathrm{CN}}, \psi_{\mathrm{CN}})$ benutzt, wie sie für AibAib-NH_2 experimentell bestimmt wurden (Tabelle 3.2, S. 46). Um die erreichbare Genauigkeit bei der Winkelbestimmung zu verdeutlichen, ist in Abb. 3.15 eine feinere Abstufung in dem Winkelbereich dargestellt, der für AibAib-NH_2 schließlich die beste Anpassung lieferte (siehe Abschnitt 3.4.4). Bei kleineren Variationen in $(\chi_{\mathrm{NH}}, \psi_{\mathrm{NH}})$ kann es vorkommen, daß die Intensitätsmuster in einigen 2D-Querschnitten kaum Variation zeigen. Es gibt jedoch meist noch genug andere 2D-Querschnitte, in denen die Intensitätsmuster genug Winkelabhängigkeit zeigen, um eine genaue Winkelbestimmung zu ermöglichen. Es ist also möglich, die Euler-Winkel χ_{NH} und ψ_{NH} mit Hilfe der

vermittelten Anisotropie-Korrelation von $^{13}C'$ CSA- und ^{15}N-^{1}H dipolarer Wechselwirkung hinreichend genau zu bestimmen.

3.4.1.4 Möglicher Einfluß der zweiten ^{15}N-Markierung im AibAib-Dipeptid

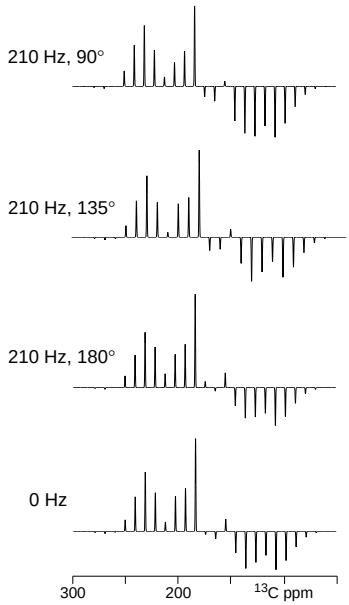

Abbildung 3.16:
Simulierte ^{15}C-^{13}N-REDOR-Spektren mit zwei Rotorperioden dipolarer Rückkopplung und Purge-Puls bei ν_r = 1200 Hz unter Berücksichtigung eines $^{15}N1$-$^{13}C\cdots{}^{15}N2$-Netzwerks. Die Spektren wurden mit einer $^{13}C\cdots{}^{15}N2$ dipolaren Kopplung von 210 Hz, (χ_{CN}, ψ_{CN}) = (34°, 88°) und verschiedenen Polarwinkeln χ_{CN2} generiert. Das unterste Spektrum wurde zum Vergleich ausschließlich mit der 1200 Hz Einbindungskopplung berechnet.

Wie schon in Abschnitt 2.1 beschrieben, konnte das ^{15}N,^{13}C-doppelt markierte Dipeptid nur mit zwei ^{15}N-Markierungen hergestellt werden. Da sich im Gegensatz zum Acetanilid ein zweiter ^{15}N-Kern im Abstand von zwei Bindungslängen in der Nähe des $^{13}C'$-Kerns befindet, könnte diese zusätzliche Kopplung einen Einfluß auf ^{13}C-^{15}N dipolar gekoppelte Spektren haben. Der Einfluß der Zweibindungskopplung ($\approx$ 2.43 Å $\widehat{=}$ 210 Hz) sollte allerdings im Vergleich zur Einbindungskopplung ($\approx$ 1.36 Å $\widehat{=}$ 1200 Hz) nicht sehr gravierend und in manchen Fällen vernachlässigbar sein. Um hierüber eine Aussage machen zu können, wurde der Einfluß einer zusätzlichen Zweibindungskopplung auf die Seitenbanden-Intensitäten in ^{13}C-^{15}N-REDOR-Spektren untersucht. In Abbildung 3.16 sind ^{13}C-^{15}N-REDOR-Spektren gezeigt, die die Kopplung des $^{13}C'$-Kerns zu zwei ^{15}N-Kernen in einer Dreispin-Simulation ($^{15}N1$-$^{13}C\cdots{}^{15}N2$) berücksichtigen und in denen der Polarwinkel χ_{CN2} der dipolaren ^{13}C-^{15}N-Achse zum entfernten $^{15}N2$ variiert wurde. Eine Änderung der Spektren bei Variation des Azimutwinkels ψ_{CN2} wurde nicht beobachtet. Eine Zweispin-Simulation ist zum Vergleich mit dargestellt (Abb. 3.16 unten). Wie man sehen kann, ändert sich die Einhüllende der Seitenbanden-Intensitäten kaum, jedoch sind einige Unterschiede in den individuellen Intensitäten sichtbar. Es zeigte sich weiterhin, daß die Intensitätsverteilung in ^{13}C-^{15}N-REDOR-Spektren sowohl mit einer ($1\tau_r$) als auch zwei Rotorperioden ($2\tau_r$) praktisch nicht von Änderungen in der Stärke der dipolaren Zweibindungskopplung abhängig war, zumindest nicht in deren erwarteten Bereich von ca. 190–230 Hz (Simulationen hierzu sind nicht gezeigt). Daher wurde im weiteren eine Zweibindungskopplung von 210 Hz angenommen. Die Auswertung der experimentellen ^{13}C-^{15}N-REDOR-Spektren erfolgte unter Berücksichtigung eines dipolaren $^{15}N1$-$^{13}C\cdots{}^{15}N2$-

Netzwerks. Die verwendeten numerischen Simulations- und Optimierungsmethoden wurden von J. Leppert entwickelt und sind in (Leppert *et al.*, 2000b) beschrieben.

Das beobachtete Signal in 2D vermittelten Anisotropie-Korrelationsspektren des hier verwendeten AibAib-Dipeptids kann im Prinzip durch den $^{15}\mathrm{N} \rightarrow {}^{13}\mathrm{C}$ TEDOR-Schritt von beiden ^{15}N-Kernen herrühren. ^{15}N-Spektren von (^{13}C, ^{15}N)-AibAib zeigen jedoch trotz der eingebauten zwei ^{15}N-Spins nur das Signal des Amid-Stickstoffkerns (Abb. 3.17, Mitte).

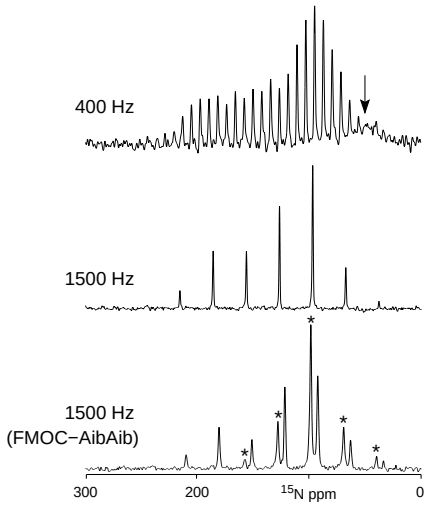

Abbildung 3.17:
^{15}N CPMAS-Spektren von AibAib. Oben: ν_r = 400 Hz, das „fehlende“ $^{15}NH_2$-Signal ist als Hügel bei $\approx$ 50 ppm erkennbar (Pfeil). Mitte: ν_r = 1500 Hz, nur ein Signal wird beobachtet. Unten: Das ^{15}N CPMAS-Spektrum von FMOC-AibAib bei ν_r = 1500 Hz zeigt eine zweite Linie bei 100 ppm (mit $*$ gekennzeichnet).

Das N-terminale ^{15}N (NH_2)-Signal taucht lediglich bei sehr geringen Rotationsfrequenzen als breiter Hügel bei ca. 50 ppm auf, welches einer typischen chemischen Verschiebung für $^{15}NH_2$ entspricht (Pfeil in Abb. 3.17 oben). Ein Grund hierfür ist nicht bekannt, die massenspektroskopisch bestimmte Masse des Dipeptids stimmt zumindest mit einem N-terminalen $^{15}NH_2$ überein. Bei einem analogen Peptid mit noch angekoppelter FMOC-Schutzgruppe ist das Stickstoffsignal, jetzt in einer Aminofunktion, zwar nach 100 ppm verschoben, aber deutlich vorhanden (Abb. 3.17 unten). Da also zu Beginn auch des 2D-Experimentes keine beobachtbare Magnetisierung des zwei Bindungen entfernten ^{15}N-Kerns vorliegt, kann dieser zumindest bis zum Zeitpunkt des 90°-Transferpulses in der Mitte des TEDOR-Schrittes (Abb. 3.12) keinen Einfluß auf den ^{13}C′-Kern ausüben.

Eine Beeinflussung der beobachteten ^{13}C′-Magnetisierung kann lediglich nach dem Transferpuls erfolgen, da dieser letzte Teil der Pulssequenz praktisch einen ^{13}C-^{15}N-REDOR-Schritt darstellt. In diesem kann die zusätzliche dipolare ^{13}C-^{15}N2-Zweibindungskopplung einer Rückkopplung unterliegen und die beobachteten ^{13}C′-Signalintensitäten der Rotationsseitenbanden beeinflussen. Da für ^{13}C-^{15}N-REDOR oben bereits festgestellt wurde, daß sich durch die Zweibindungskopplung praktisch keine Änderungen für die zu bestimmenden Euler-Winkel ergeben, wurde dieser Effekt bei der 2D vermittelten Anisotropie-Korrelation im folgenden vernachlässigt, um die Berechnungen zu vereinfachen.

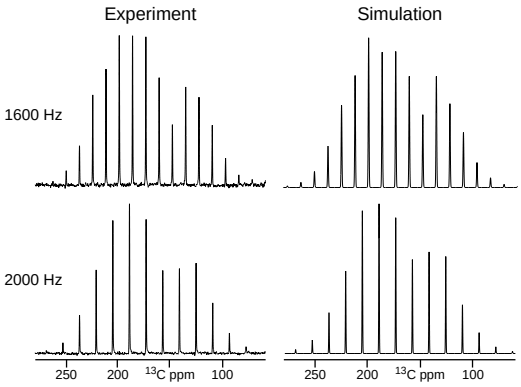

Abbildung 3.18:
Experimentelle und angpaßte simulierte, ^{13}C CPMAS-Spektren von AibAib bei verschieden ν_r. Zur Simulation wurden optimierte CS-Tensorwerte aus Tab. 3.2 (S. 46), eine ^{15}C-^{13}N dipolare Kopplung von 1200 Hz und Euler-Winkel (χ_{CN}, ψ_{CN}) = (34°, 88°) benutzt. Die Experimente wurden mit 256 Wiederholungen und einer Wiederholzeit von 2 s aufgenommen.

3.4.2 Vorbereitende Messungen

Die Gewinnung von Information über die Orientierung von Tensoren aus ^{13}C-^{15}N-REDOR- und 2D vermittelten Anisotropiespektren setzt die Kenntnis der Hauptachsenelemente des ^{13}C-Tensors sowie der Stärke der ^{13}C-^{15}N dipolaren Kopplung voraus. Für die Auswertung der 2D-Anisotropiespektren werden zusätzlich die Euler-Winkel (χ_{CN}, ψ_{CN}) benötigt, die gerade aus dem ^{13}C-^{15}N-REDOR-Experiment gewonnen werden. Zur Bestimmung der Hauptachsenelemente werden ^{13}C CPMAS-Spektren bei Raumtemperatur und bei mehreren ν_{r} aufgenommen, wie schon in 3.2 beschrieben wurde. Repräsentative experimentelle Spektren und daran optimal angepaßte Simulationen sind in Abb. 3.18 dargestellt.

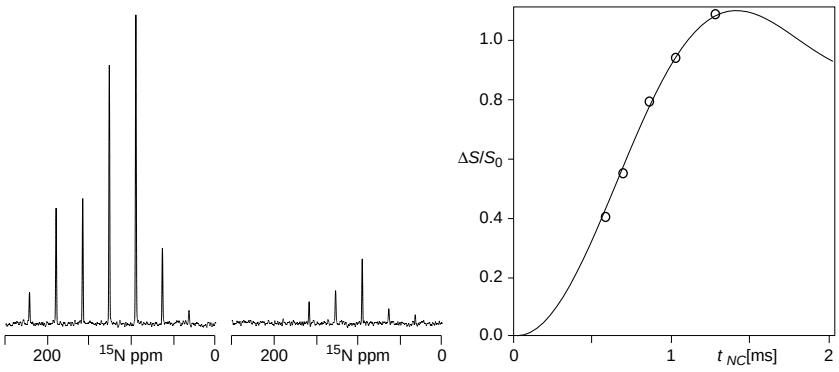

Abbildung 3.19:
Bestimmung der dipolaren ^{15}N-^{13}C-Kopplung in AibAib mittels ^{15}N-^{13}C-REDOR. Links: Beispielspektrum des ^{15}N-^{13}C-REDOR-Experimentes bei ν_r = 1600 Hz ohne ^{13}C-Dephasierung, Mitte: mit Dephasierung. Rechts: Verhältnis zwischen REDOR-Differenzsignal ΔS und nicht-dephasiertem Signal S_0 als Funktion der dipolaren Dephasierungszeit t_{NC}. Experimentelle Daten (∘) wurden mit $2\tau_r$ Rückkopplungszeit und mit 90°-Purge-Puls aufgenommen. Verschiedene Dephasierungszeiten wurden durch Verwendung von ν_r = 3600, 3000, 2400, 2000 und 1600 Hz erreicht. Die kontinuierliche Kurve wurde unter Annahme einer dipolaren Kopplung von 1200 Hz generiert.

Die ^{13}C-^{15}N dipolare Kopplung ist möglicherweise bei Rotationsfrequenzen in der Größenordnung der Kopplung ($\nu_{\mathrm{r}} \not\gg \nu_{\mathrm{CN}}$) nicht vollständig durch die Probenrotation ausgemittelt. Obwohl sich ihr Einfluß bei den hier verwendeten ν_{r} als extrem gering herausstellte, wurde

bei der iterativen Auswertung dieser CPMAS-Spektren auch die ^{13}C-^{15}N dipolare Kopplung berücksichtigt. Die Hauptachsenwerte des $^{13}C'$-Tensors wurden zu (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) = (92.1 ppm, 191.4 ppm, 239.1 ppm) bestimmt (siehe Tabelle 3.2, S. 46).

Mittels ^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren wurde die ^{13}C-^{15}N dipolare Kopplungsstärke bestimmt (beobachteter Kern = ^{15}N). Die Spektren wurden in Abhängigkeit von der Rotationsfrequenz und somit der effektiven dipolaren Rückkopplungszeit t_{NC} aufgenommen, wie in Abschnitt 3.3.1.3 beschrieben. Abbildung 3.19 zeigt hierfür Beispielspektren und die experimentell bestimmte Kurve $\Delta S/S_0(t_{\mathrm{NC}})$, aus der sich eine ^{15}N-^{13}C dipolare Kopplung von 1200 Hz ergibt und einem ^{15}N-^{13}C-Abstand von 1.37 Å entspricht.

3.4.3 Orientierung der ^{13}C-^{15}N-Bindungsachse relativ zum ^{13}C chemischen Verschiebungstensor: ^{13}C-^{15}N-REDOR

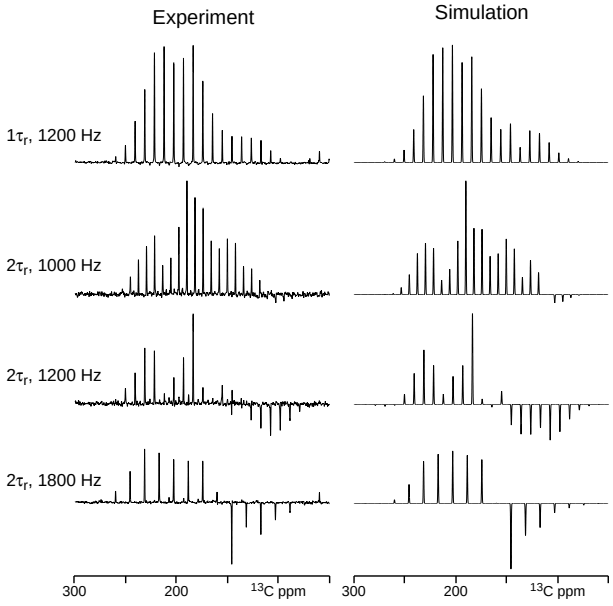

Abbildung 3.20:
Experimentelle und angepaßte simulierte ^{15}C-^{13}N-REDOR-Spektren mit einer ($1\tau_r$)/zwei ($2\tau_r$) Rotorperioden dipolarer Rückkopplung von Aib-Aib bei verschiedenen ν_r. Die Experimente wurden mit Purge-Puls und 8192 ($2\tau_r$, 1000 Hz, 1 & $2\tau_r$, 1200 Hz) bzw. 4096 Wiederholungen ($2\tau_r$, 1800 Hz) bei einer Wiederholzeit von 2 s aufgenommen. Für die simulierten Spektren (Dreispin-Simulation) wurden die jeweils optimierten Werte für (χ_{CN}, ψ_{CN}, χ_{CN2}) und Hauptachsenwerte des $^{13}C'$-Tensors aus Tabelle 3.1 benutzt sowie Kopplungsstärken für die Ein- und Zweibindungskopplungen von 1200 und 210 Hz.

Derselbe Ansatz, der in Abschnitt 3.3 für die Bestimmung der Orientierung der ^{13}C-^{15}N-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensors benutzt wurde, läßt sich auch für die Charakterisierung von ^{13}C CS-Tensoren verwenden. Um die Euler-Winkel (χ_{CN}, ψ_{CN}) zu bestimmen, wurden daher ^{13}C-^{15}N-REDOR-Spektren (mit Purge-Puls) mit einer und zwei Rotorperioden Rückkopplungszeit ($1\tau_{\mathrm{r}}/2\tau_{\mathrm{r}}$) jeweils bei verschiedenen ν_{r} aufgenommen, um einen ausreichenden Basissatz an experimentellen Daten zu gewinnen (Abb. 3.20). Eine iterative Auswertung der experimentellen Spektren ergab die Winkel (χ_{CN}, ψ_{CN}) = ($34° \pm 2°$, $88° \pm 3°$). Aus der Dreispin-Analyse ergab sich zudem der Polarwinkel der zweiten ^{13}C-^{15}N2-Bindungsachse χ_{CN2} = $143° \pm 12°$. Informationen über ψ_{CN2} konnten nicht gewonnen werden, da die Spektren nicht auf diesen Winkel empfindlich waren. Eine iterative Analyse der ^{13}C-^{15}N-REDOR-Spektren

unter Vernachlässigung der zusätzlichen Zweibindungskopplung führte zu nahezu identischen Winkeln (χ_{CN}, ψ_{CN}) führte – die Variation in den Intensitäten der REDOR-Seitenbanden wird also hauptsächlich durch diese Winkel bestimmt, wie sich auch schon aus den simulierten Spektren ergeben hatte (Abschnitt 3.4.1.4).

3.4.4 2D Anisotropie-Korrelationsspektren von AibAib

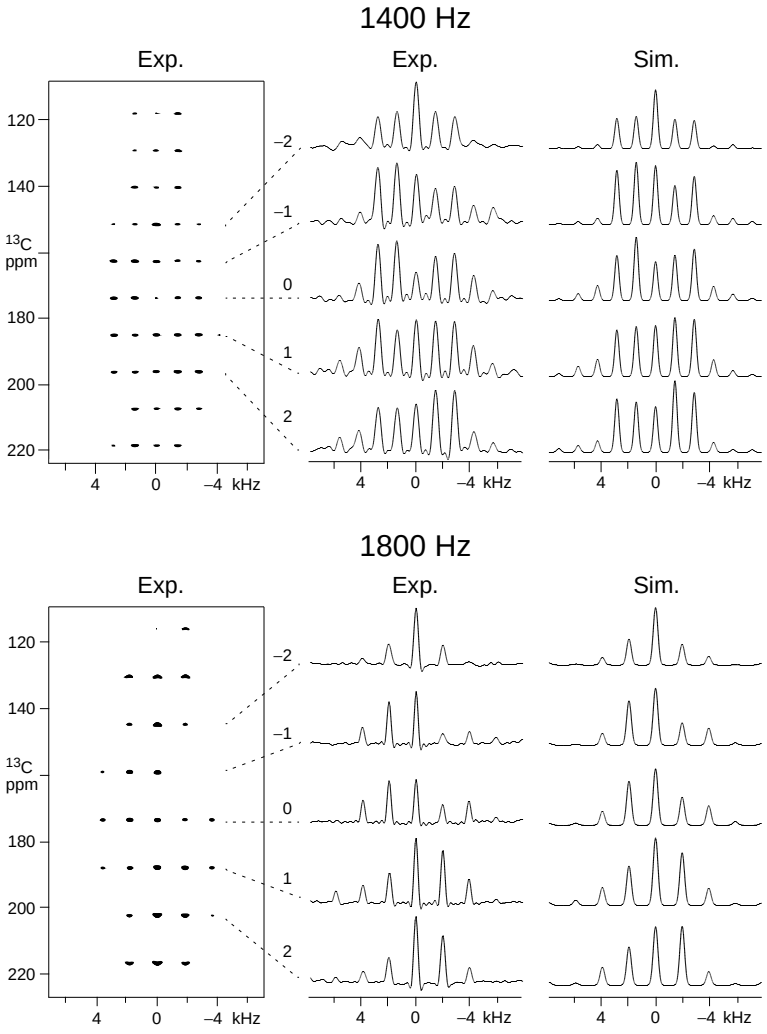

Abbildung 3.21:
Vermittelte 2D Anisotropie-Korrelationsspektren von AibAib bei ν_r = 1400 und 1800 Hz. Links: 2D-Spektren, Mitte: 1D-Querschnitte auf Höhe der Rotationsseitenbanden in der direkten ^{13}C-Dimension, rechts: Querschnitte eines an die experimentellen Daten optimal angepaßten simulierten 2D-Spektrums. Experimentelle 2D-Datensätze wurden mittels der in Abb. 3.12 gezeigten Pulssequenz und 6 τ_r (1400 Hz) bzw. 10 τ_r ^{15}N-^{1}H dipolarer Evolutionszeit (1800 Hz) aufgenommen. Simulierte Spektren wurden mit den mittleren $^{13}C'$-Tensor-Hauptachsenwerten und Euler-Winkeln (χ_{CN}, ψ_{CN}; aus Tabelle 3.2), 1200 Hz ^{15}C-^{13}N dipolarer Kopplung sowie den am besten passenden Winkeln (χ_{NH}, ψ_{NH}) = (90°, 80°) berechnet.

Da in den Experimenten aufgrund unerwarteter Spannungsüberschläge im Probenkopf unterschiedliche ^{1}H-Feldstärken während der MREV8-Entkopplung benutzt werden mußten, wurden die am besten passenden Spektren mit effektiven, skalierten ^{15}N-^{1}H dipolaren Kopplungsstärken von 5500 (ν_r = 1400 Hz) und 5000 Hz (ν_r = 1800 Hz) generiert.

Um die Euler-Winkel (χ_{NH}, ψ_{NH}) zu bestimmen, wurden 2D vermittelte Anisotropie-Korrelationsspektren bei 5 verschiedenen Rotationsfrequenzen ν_r zwischen 1200 und 2000 Hz aufgenommen. Zur Auswertung der Signalintensitäten in den 2D-Spektren wurden 1D-Querschnitte in ν_1 auf Höhe der Rotationsseitenbanden in der direkten Dimension ν_2 betrach-

tet. Diese wurden dann mit 1D-Querschnitten aus simulierten 2D-Daten verglichen, die für verschiedene Wertepaare für (χ_{NH}, ψ_{NH}) berechnet wurden. Aufgrund des erheblich höheren Aufwands is derzeit noch kein Programm für die iterative Auswertung von 2D-Datensätzen verfügbar. Daher wurde für die 2D vermittelten Anisotropie-Korrelationsspektren ein manueller Ansatz zur Bestimmung der Euler-Winkel benutzt. Zunächst wurden Spektren für den gesamten Winkelbereich in groben Schritten ($\pm 30°$) generiert und nach der Auswahl der besten Winkelpaarung die Schrittweite auf ($\pm 5°$) verkleinert, um die beste Anpassung zu erhalten. Die Euler-Winkel (χ_{NH}, ψ_{NH}) wurden auf diese Weise manuell zu ($90° \pm 10°$, $80° \pm 10°$) bestimmt; Abb. 3.21 zeigt zwei repräsentative 2D-Spektren sowie die dazugehörigen experimentellen und optimal angepaßten, simulierten 1D-Querschnitte. Die angegebenen Fehlergrenzen von $\pm 10°$ sind aufgrund des manuellen Verfahrens sicherheitshalber recht groß gewählt – eine automatische, iterative Auswertung solcher 2D-Spektren könnte den Fehler minimieren.

3.4.5 Ergebnisse zum $^{13}C'$ CS-Tensor in AibAib

Alle experimentell bestimmten Tensorparameter für $^{13}C'$ in AibAib sind in Tabelle 3.2 angegeben. Aus den bestimmten Orientierungen der ^{13}C-^{15}N- und ^{15}N-^{1}H-Bindungsachsen relativ zum $^{13}C'$ CS-Tensor läßt sich durch Molekülmodellierung (SYBYL, Tripos Associates Inc., St. Louis, USA) die Orientierung des $^{13}C'$ CS-Tensors relativ zum Molekülkoordinatensystem ableiten (Abb. 3.22).

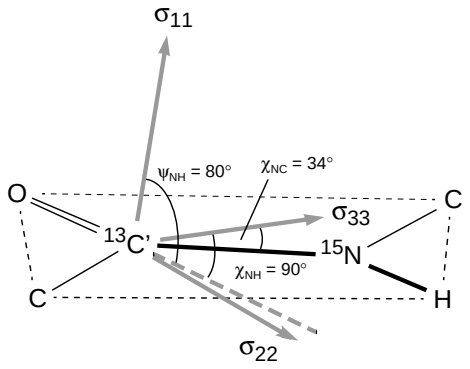

Abbildung 3.22:
Orientierung des chemischen Verschiebungstensors von $^{13}C'$ in der Peptid-Ebene des Dipeptids AibAib. Die dicke, grau gestrichelte Linie repräsentiert die Richtung der NH-Bindung.

Da der Winkel zwischen den Bindungen N-C′ und N-H in einer Peptidbindung mit $\approx 120°$ bekannt ist, ergibt sich aus $\chi_{\mathrm{CN}} = 34°$ und $\chi_{\mathrm{NH}} = 90°$, daß die am geringsten abgeschirmte Komponente σ_{33} in der Peptid-Ebene liegt. Aufgrund der experimentellen Fehlergrenzen, besonders in χ_{NH}, wäre allerdings auch eine geringe Abweichung von der Ebene erlaubt. Die Lage der mittleren und stark abgeschirmten Komponenten σ_{22} und σ_{11} wird durch die Azimutwinkel ψ_{CN} und ψ_{NH} definiert. Da σ_{33}, die N-C′ und die N-H-Bindungsvektoren ungefähr in einer Ebene liegen, sollten ψ_{CN} und ψ_{NH} im Prinzip den gleichen Wert haben. Dies wird, innerhalb des Meßfehlers, auch durch die Bestimmung von $\psi_{\mathrm{CN}} \approx \psi_{\mathrm{NH}} \approx 90°$ bestätigt. Da ψ_{NH} hier nicht genau $90°$ ist, steht σ_{11} nicht exakt senkrecht auf der Peptid-Ebene und σ_{22} weicht etwas von der Peptid-Ebene ab, wobei der Winkel zwischen σ_{22} und der C′=O-Bindung $\approx 9°$ beträgt. Der Winkel $\chi_{\mathrm{CN2}} = 143° \pm 12°$, der aus der Dreispin-Analyse der ^{13}C-^{15}N-REDOR-Spektren

gewonnen wurde, würde mit einem Torsionswinkel $\psi = -106°$ übereinstimmen. Da jedoch die Struktur des AibAib-Dipeptids im Kristall noch nicht bekannt ist, kann dies zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht überprüft werden.

	^{13}C CPMAS			Korrelation ^{15}N-^{1}H dipolar $\leftrightarrow$ ^{13}C′ CSA		$1\tau_r/2\tau_r$ ^{13}C-^{15}N-REDOR[a]		
ν_r [Hz]	σ_{11} [ppm]	σ_{22} [ppm]	σ_{33} [ppm]	χ_{NH} [°][bc]	ψ_{NH} [°][bc]	χ_{CN} [°][c]	ψ_{CN} [°][c]	χ_{CN2} [°][d]
1000	95.5	188.4	238.7	–	–	31 / 38	90 / 90	155 / 146
1200	93.0	189.1	240.5	90	80	31 / 36	90 / 90	136 / 166
1400	92.3	191.2	239.1	90	80	33 / 35	80 / 81	129 / 153
1600	91.1	191.1	240.3	90	80	35 / 35	90 / 82	142 / 147
1800	90.6	191.8	240.2	90	80	33 / 36	90 / 88	143 / 138
2000	92.8	191.6	238.2	90	80	35 / 34	90 / 89	–
2200	92.0	193.2	237.4	–	–	–	–	0
2400	91.6	194.9	236.1	–	–	–	–	–[e]/ 122
Mittel	92.1 ± 1.5[f]	190.3 ± 1.9[f]	239.8 ± 1.5[f]	90 ± 10	80 ± 10	34 ± 2[g]	88 ± 3[g]	143 ± 12[g]

Tabelle 3.2: ^{13}C CS-Tensorparameter im Dipeptid AibAib.

[a] *Daten wurden mit einer/zwei Rotorperioden dipolarer Rückkopplung aufgenommen.*

[b] *Werte und Fehlerangaben wurden durch visuelles Anfitten aller 2D-Schnitte bestimmt.*

[c] *$(180 - \chi_{CN})$, $-\psi_{CN}$, $\pm(180 - \psi_{CN})$ und $(180 - \psi_{NH})$ sind ebenfalls erlaubte Lösungen.*

[d] *χ_{CN2} konnte aufgrund zu geringer Winkelabhängigkeit nicht bestimmt werden. Eine ^{15}C-^{13}N dipolare Zweibindungskopplung von 210 Hz wurde in den Dreispin REDOR-Rechnungen zusätzlich zur 1200 Hz Einbindungskopplung verwendet.*

[e] *Während der iterativen Fitprozedur wurde keine stabile Lösung gefunden.*

[f] *Berechnet aus der mittleren Anisotropie $\delta_a = \sigma_{33} - \sigma_{iso}$ = 64.9 ppm und dem Asymmetrieparameter $\eta = (\sigma_{22} - \sigma_{11})/(\sigma_{33} - \sigma_{iso})$ = 1.53, da die Fitprozedur die isotrope chemische Verschiebung σ_{iso} = 174.2 ppm nicht berücksichtigt.*

[g] *Mittelwert über beide $1\tau_r/2\tau_r$ REDOR-Resultate.*

Kapitel 4

Charakterisierung chemischer Verschiebungstensoren in Aib

In Kapitel 3 wurden MAS NMR-Methoden vorgestellt, die dazu verwendet wurden, Größe und Orientierung der Tensoren der chemischen Verschiebungsanisotropie von ^{15}N und ^{13}C in einem Peptidrückgrat zu bestimmen. Diese Methoden sollen zur Charakterisierung der CS-Tensoren in der ungewöhnlichen Aminosäure α-Aminoisobuttersäure (Aib) angewendet werden sowie mit alternativen Methoden zur Bestimmung von CS-Tensorparametern verglichen werden. Hierzu wurde statische Festkörper-NMR an kristallinem AibAib und an selektiv markiertem Chrysospermin C (CSC) in einer Lipiddispersion, Kreuzrelaxationsexperimente an uniform ^{15}N-markiertem CSC in mizellarer Lösung sowie quantenchemische *ab initio*-Berechnungen durchgeführt. Viele dieser Alternativmethoden waren allerdings entweder aufgrund prinzipieller oder experimenteller Beschränkungen nur für ^{15}N-Tensoren anwendbar. Daher und weil der ^{13}C CS-Tensor im Dipeptid AibAib bereits bei der Einführung des vermittelten Anisotropiekorrelations-Experimentes charakterisiert wurde, werden im folgenden im wesentlichen CS-Tensorparameter von ^{15}N betrachtet. Diese sind Voraussetzung für die in Kapitel 6 beschriebenen Experimente zur Bestimmung der Orientierung von CSC in magnetisch orientierten Bizellen.

4.1 Charakterisierung des ^{15}N CS-Tensors im AibAib-Dipeptid mittels MAS NMR

Zum Einsatz kamen ein ^{15}N- und ein $^{13}C'$, ^{15}N-isotopenmarkiertes AibAib-NH_2-Dipeptid (siehe Abschnitt 2.1). An der ^{15}N-markierten Probe wurden ^{15}N CPMAS-Experimente zur Bestimmung der Hauptachsenelemente des ^{15}N CS-Tensors und 2D ^{15}N-^{1}H-DIPSHIFT-Experimente zur Bestimmung der Orientierung der ^{15}N-^{1}H-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor durchgeführt. ^{15}N-^{13}C-REDOR-Experimente am doppelt markierten Dipeptid dienten dazu, die Orientierung der ^{15}N-^{13}C-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor zu charakterisieren.

An der CSC-Probe in multilamellaren Liposomen konnten keine MAS NMR-Untersuchungen durchgeführt werden, da die Unterschiede in der isotropen chemischen Verschiebung der markierten Aib-Reste für eine exakte Auswertung von Rotationsseitenbanden zu gering war. Hinzu kam, daß das Signal-zu-Rausch-Verhältnis in REDOR-Messungen bei niedrigen Rotationsfrequenzen zu gering war. Daher wurden an dieser Probe lediglich statische Messungen zur Bestimmung der Breite des CS-Tensors durchgeführt (Abschnitt 4.2).

4.1.1 ^{15}N CPMAS

Um die Hauptachsenwerte des ^{15}N CS-Tensors zu bestimmen, wurden ^{15}N CPMAS-Experimente am ^{15}N-Dipeptid bei unterschiedlichen Rotationsfrequenzen ν_r durchgeführt. Abb. 4.1 zeigt hiervon repräsentative Spektren zusammen mit Simulationen, die mit den jeweils iterativ optimierten Parametern generiert wurden (Tabelle 4.1, S. 50). Es wurden (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) = (69.2 ppm, 86.7 ppm, 224.2 ppm) gefunden.

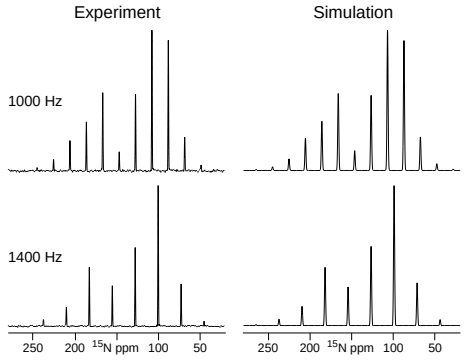

Abbildung 4.1:
Repräsentative experimentelle und simulierte ^{15}N CPMAS-Spektren des ^{15}N-markierten AibAib-Dipeptids bei ν_r = 1000 und 1400 Hz. Die simulierten Spektren wurden mit CS-Tensorparametern von (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) = (69.2 ppm, 86.7 ppm, 224.2 ppm) generiert.

4.1.2 ^{15}N-^{13}C REDOR

Um die Euler-Winkel der ^{15}N-^{13}C-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor zu gewinnen, wurden am ^{13}C′, ^{15}N-markierten Dipeptid ^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren mit und ohne Purge-Puls bei verschiedenen ν_r aufgenommen. Die ^{15}N-^{13}C dipolare Kopplung im AibAib Dipeptid wurde bereits in Abschnitt 3.4.2 zu 1200 Hz bestimmt. In Abb. 4.2 sind einige experimentelle Spektren (mit Purge-Puls) und daran optimal iterativ angepaßte Simulationen gezeigt, die mit (χ_{NC}, ψ_{NC}) = (105° ± 3°, 36° ± 4°) generiert wurden – siehe Tabelle 4.1. Jene Spektren, die ohne Purge-Puls aufgenommen worden waren (Spektren nicht gezeigt) und dementsprechend unter Berücksichtigung des Antiphase-Terms $I_y S_z$ ausgewertet wurden, führten zu ähnlichen Winkeln (χ_{NC}, ψ_{NC}), wie die mit Purge-Puls aufgenommenen Spektren (Tab. 4.1). Die Konvergenz in den Iterationen war jedoch deutlich schlechter als für die Spektren, die mit Purge-Puls aufgenommen worden waren. Daher wurde in den Daten keine überzeugende Konsistenz erreicht. Hier führt die Aufnahme der REDOR-Spektren mit Purge-Puls zu einer erhöhten Datenkonsistenz.

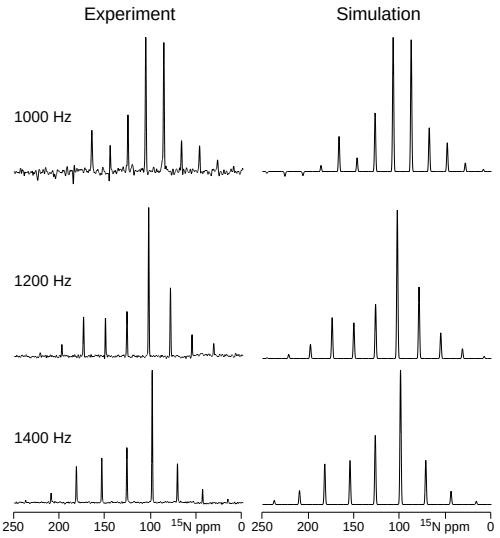

Abbildung 4.2:
Experimentelle und simulierte ^{15}N-^{13}C REDOR-Spektren des ^{13}C, ^{15}N-markierten AibAib-Dipeptids bei ν_r = 1000, 1200 und 1400 Hz. Die REDOR-Pulssequenz zur Aufnahme der experimentellen Spektren hatte eine Rotorperiode dipolarer Rückkopplung und beinhaltete einen Purge-Puls am Start der Datenaufnahme (Abschnitt 3.3.1.1). Simulierte Spektren wurden mit CS-Tensorparametern wie in Abb. 4.1 sowie einer ^{15}N-^{13}C dipolaren Kopplung von 1200 Hz und optimalen Euler-Winkeln von (χ_{NC}, ψ_{NC}) = (105°, 36°) generiert.

4.1.3 2D ^{15}N-^{1}H DIPSHIFT

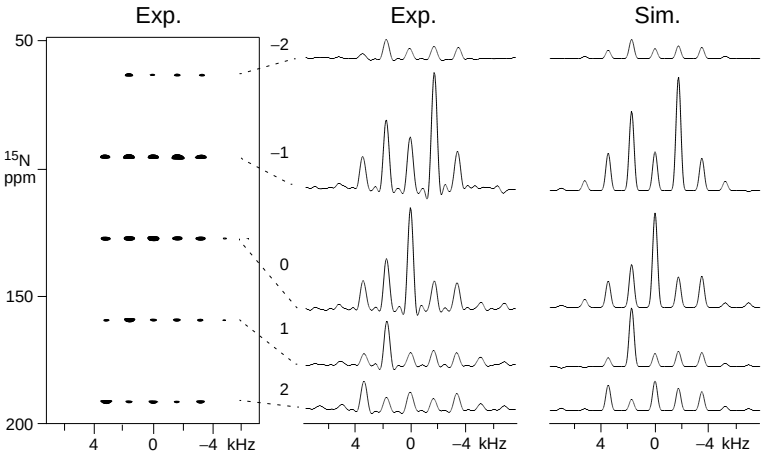

Abbildung 4.3:
Experimentelles 2D ^{15}N-^{1}H DIPSHIFT-Spektrum des ^{15}N-markierten AibAib-Dipeptids bei ν_r = 1600 Hz und experimentelle/simulierte 2D-Schnitte in der dipolaren Dimension ν_1. Simulierte Schnitte wurden mit CS-Tensorparametern wie in Abb. 4.1, einer skalierten ^{15}N-^{1}H Kopplung von 5500 Hz sowie Euler-Winkeln von (χ_{NH}, ψ_{NH}) = (15°, 0°) generiert.

Aufgrund des mit 0.18 sehr kleinen Asymmetrieparameters $\eta = (\sigma_{22} - \sigma_{11})/(\sigma_{33} - \sigma_{\mathrm{iso}})$ des ^{15}N CS-Tensors zeigten 1D dipolar gekoppelte Experimente kaum Abhängigkeit von (χ_{NH}, ψ_{NH}) (Spektren nicht gezeigt). 2D DIPSHIFT-Experimente hingegen hatten sich als bereits als empfindlicher auf Euler-Winkel als 1D dipolar gekoppelte Experimente erwiesen (Leppert *et al.*, 2000a; Leppert, 2001a; siehe auch Abschnitt 3.3.2.2). Daher wurden für die Charakterisierung der Orientierung der ^{15}N-^{1}H-Bindungsachse relativ zum ^{15}N CS-Tensor 2D DIPSHIFT-Experimente bei ν_{r} = 1200 und 1600 Hz eingesetzt. Das 2D-Experiment bei 1600 Hz ist in Abb. 4.3 zusammen mit experimentellen und simulierten Schnitten durch die dipolare Dimension ν_1 gezeigt. Die Euler-Winkel von (χ_{NH}, ψ_{NH}) = (15°, 0°) wurden über visuelles Anpassen aller 2D-Schnitte gewonnen. Ausgehend vom Startwert (0°, 0°), der aus den 1D dipolar gekoppelten Experimenten gewonnen wurde, wurden 2D-Spektren in 5°-Schritten berechnet und mit den experimentellen 2D-Schnitten verglichen. Die Genauigkeit dieser Prozedur entspricht ca.

$\pm 5°$ für χ_{NH} bzw. $\pm 10°$ für ψ_{NH}, welche bei Verfügbarkeit automatischer Fit-Routinen für 2D MAS-Spektren sicher noch zu übertreffen wäre.

4.1.4 MAS-Resultate

Die mit Hilfe etablierter MAS NMR-Methoden gewonnenen Daten zur Größe und Orientierung des ^{15}N CS-Tensors im AibAib-Dipeptid sind in Tabelle 4.1 zusammengefaßt. Es zeigt sich, wie wichtig eine möglichst große Anzahl Rotationsseitenbanden (ν_{r} klein) zur exakten Datenauswertung ist und daß in REDOR-Experimenten Anteile des Antiphase-Terms $I_y S_z$ nach Möglichkeit entfernt werden sollten, z. B. durch Einstrahlen eines Purge-Pulses.

	^{15}N CPMAS			^{15}N-^{1}H DIPSHIFT		^{15}N-^{13}C-REDOR mit/ohne Purge-Puls	
ν_{r} [Hz]	σ_{11} [ppm]	σ_{22} [ppm]	σ_{33} [ppm]	χ_{NH} [°][a]	ψ_{NH} [°][a]	χ_{NC} [°][a]	ψ_{NC} [°][a]
800	68.3	87.7	224.1	–	–	– / –	– / –
1000	69.9	86.1	224.1	–	–	105.6/106.8	34.1/22.2
1080	–	–	–	–	–	108.6/90.0	39.2/0.0
1200	71.2	58.3	223.7	15	0	106.8/90.0	40.5/14.1
1300	–	–	–	–	–	101.9/93.8	31.5/24.7
1400	69.5	86.6	224.0	–	–	103.8/99.1	34.2/0.0
1600	66.8	89.3	224.0	15	0	(103.8)/(99.4)[b]	(22.4)/(0.0)[b]
1800	70.6	84.5	225.1	–	–	(103.8)/(90.0)	(24.5)/(0.0)
Mittel	69.2 ± 1.6[c]	86.7 ± 1.7[c]	224.2 ± 0.5[c]	15 ± 5[d]	0 ± 10[d]	105.3 ± 2.6/ 95.9 ± 7.1	35.9 ± 3.8/ 12.2 ± 11.8

Tabelle 4.1: ^{15}N CS-Tensorparameter im Dipeptid AibAib.

[a] *(180 − χ_{NH}), (180 − χ_{NC}), −ψ_{NC} und ±(180 − ψ_{NC}) sind auch erlaubte Werte.*

[b] *Oberhalb ν_r = 1400 Hz nahm die Konvergenz in den Iterationen deutlich ab, diese Werte wurden hier nicht berücksichtigt.*

[c] *Berechnet aus der mittleren Anisotropie $\delta_a = \sigma_{33} - \sigma_{iso}$ = 97.5 und dem Asymmetrieparameter $\eta_a = (\sigma_{22} - \sigma_{11})/(\sigma_{33} - \sigma_{iso})$ = 0.18, da die Fitprozedur die isotrope chemische Verschiebung σ_{iso} = 126.7 ppm nicht berücksichtigt.*

[d] *Werte und Fehlerangaben wurden durch visuelles Anfitten aller 2D-Schnitte bestimmt.*

4.2 Statische NMR-Experimente

4.2.1 Polykristallines Aib-Aib

Um einen direkten Vergleich zwischen den vorgestellten MAS NMR-Experimenten und statischen Experimenten zu ermöglichen, wurden statische, dipolar gekoppelte Pulverspekten an derselben Probe aufgenommen, an denen zuvor die MAS-Experimente durchgeführt worden waren.

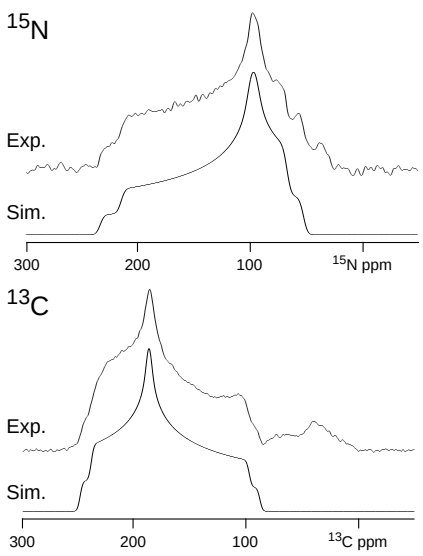

Abbildung 4.4:
Experimentelle und simulierte statische Pulverspektren des $^{13}C'$, ^{15}N-markierten Aib-Aib-Dipeptids. Experimentelle Spektren wurden mit 19200/4096 Wiederholungen bei 2 s/3 s Wiederholzeit für $^{15}N/^{13}C$ aufgenommen. Simulierte Spektren wurden mit (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) = (69 ppm, 87 ppm, 224 ppm)/(93 ppm, 188 ppm, 243 ppm) und optimalen Euler-Winkeln von (χ_{NC}, ψ_{NC})/(χ_{CN}, ψ_{CN}) = (105°, 36°)/(35°, 90°) für $^{15}N/^{13}C$ sowie einer ^{15}N-^{13}C dipolaeren Kopplung von 1200 Hz generiert.

Im ^{15}N-Spektrum sind zwischen 40–70 ppm noch Signalanteile der $^{15}NH_2$-Markierung zu sehen (siehe auch Abschnitt 3.4.1.4). Daher konnten vor allem σ_{11} und die Winkel (χ_{NC}, ψ_{NC}) nicht eindeutig bestimmt werden, und es wurde sich darauf beschränkt zu zeigen, daß die zuvor mittels MAS-NMR gefundenen Werte eine gute Anpassung an das Spektrum liefern (Abb. 4.4 oben). Wie aus der Abbildung deutlich zu entnehmen ist, ist das Hauptproblem statischer Pulverspektren die mögliche Überlappung des auszumessenden Signals mit solchen, die z. B. von anderen isotopenmarkierten Kernen oder von ^{13}C-Kernen natürlicher Häufigkeit herrühren. Im ^{13}C-Spektrum waren die Signalanteile von $^{13}C^{\beta}$ und $^{13}C^{\alpha}$ bei natürlicher Häufigkeit gerade entfernt genug, um eine visuelle Anpassung der Verschiebungsanisotropie und der Euler-Winkel zu erlauben. Es wurden Werte von (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) = (93 ppm, 188 ppm, 243 ppm), je ± 3 ppm, und (χ_{CN}, ψ_{CN}) = (35° $\pm$ 5°, 90° $\pm$ 30°) gefunden, die somit gut mit den zuvor bestimmten Werten übereinstimmen (Tabelle 4.1). Die Empfindlichkeit des Spektrums gegenüber ψ_{CN} war allerdings nur sehr gering, was sich in einem sehr großen Fehlerbereich äußerte. Aufgrund der spektralen Überlappung wurde auch auf 1D- oder 2D-Experimente verzichtet, aus denen die Orientierung des NH-Bindungsvektors relativ zum ^{15}N CS-Tensor in statischen Pulverproben erhalten werden kann (Ramamoorthy *et al.*, 1997).

4.2.2 Selektiv ^{13}C,^{15}N-markiertes Chrysospermin C in DMPC

Zur Bestimmung der Anisotropie der chemischen Verschiebung von ^{15}N und ^{13}C′ der markierten Aib-Reste in CSC wurden statische, ^{1}H kreuzpolarisierte 1D ^{15}N-Spektren an dem selektiv isotopenmarkierten CSC in Liposomen aufgenommen (Abb. 4.5). Die ^{15}N-Spektren zeigen eine im wesentlichen axialsymmetrische Verschiebungsanisotropie. Das ^{15}N-Spektrum bei 0 °C zeigt eine um 11 ppm geringere Dispersion als das bei -60 °C aufgenommene. Dies ist auf eine Ausmittelung der Anisotropie durch die Molekülbewegung innerhalb der Lipiddoppelschicht zurückzuführen (Cross, 1994). Oberhalb der Phasenübergangstemperatur T_{m} = 27 °C war dieser Effekt so groß, daß die Flanke bei σ_{33} praktisch nicht mehr zu beobachten war (Spektrum nicht gezeigt). Es wurden die in Abb. 4.5 aufgeführten CS-Tensorwerte durch visuelle Anpassung mit einer geschätzten Abweichung von je ± 4 ppm gefunden.

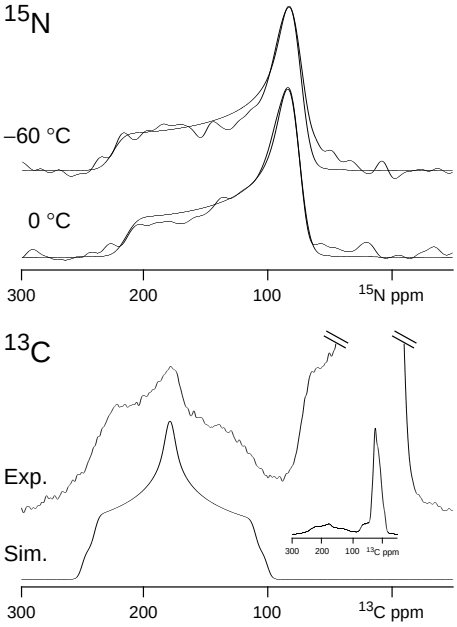

Abbildung 4.5:
Experimentelle und simulierte statische Pulverspektren von selektiv $^{13}C'$, $^{13}C^{\beta}$, ^{15}N-markiertem CSC in Liposomen. Experimentelle Spektren wurden mit 10000/10000/40000 Wiederholungen bei 2 s/2 s/3 s Wiederholzeit und bei Temperaturen von –60/0/–75 °C aufgenommen ($^{15}N/^{15}N/^{13}C'$). Simulierte Spektren wurden entsprechend mit (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) = (77.5 ppm, 77.5 ppm, 225 ppm)/(79 ppm, 79 ppm, 215 ppm)/(105 ppm, 180 ppm, 245 ppm) generiert, im simulierten ^{13}C-Spektrum wurden zusätzlich eine dipolaren Kopplung von 1200 Hz und Euler-Winkel von (χ_{NC}, ψ_{NC}) = (35°, 90°) angenommen. Das kleine, eingesetzte Spektrum zeigt das vollständige ^{13}C-Spektrum.

Eine Auswertung der Euler-Winkel in den ^{15}N-Spektren ist aufgrund des zu starken Untergrundsignals nicht möglich – die Signalflanken, die die dipolare Information enthalten, sind nicht genügend aufgelöst. Aufgrund der Signalüberlappung mit Lipidsignalen von DMPC mit natürlicher Häufigkeit sollte das ^{13}C′-Spektrum ebenfalls nicht überbewertet werden. Hinzu kommt sowohl bei den ^{15}N- als auch bei den ^{13}C′-Spektren, daß jeweils drei Isotopenmarkierungen gleichzeitig vorhanden waren, welche möglicherweise leicht unterschiedliche Verschiebungsanisotropien zeigen können. Im Rahmen der beobachteten spektralen Auflösung scheinen die Anisotropien jedoch fast gleich zu sein. Ein Indiz hierfür ist z. B. die relativ breite Spitze im ^{13}C-Spektrum bei σ_{22}, die nicht allein durch homogene Linienverbreiterung erklärbar ist (vergl. experimentelles und simuliertes Spektrum in Abb. 4.5). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller statischen Experimente ist in Tabelle 4.5 auf Seite 64 aufgeführt.

4.3 ^{15}N-Tensoren von U-^{15}N Chrysospermin C in mizellarer Lösung

4.3.1 Relaxation von ^{15}N-Kernen

In der NMR in Lösung kann man die Kreuzrelaxation zwischen der ^{15}N-CSA- und der ^{15}N-^{1}H dipolaren Wechselwirkung zusammen mit der ^{15}N transversalen T_2-Relaxation dazu benutzen, Information über den chemischen Verschiebungstensor von ^{15}N zu gewinnen. Hierzu wird die Ähnlichkeit der Abhängigkeiten der Relaxationsraten η bzw. R_2 von der Spektraldichte $J(\omega)$ ausgenutzt (Fushman *et al.*, 1998):

$$\eta = dc\big[4J(0) + 3J(\omega_{\mathrm{N}})\big] \cdot (3\cos^2\theta - 1)/2 \tag{4.1}$$

$$R_2 = \frac{1}{2}(d^2 + c^2)\big[4J(0) + 3J(\omega_{\mathrm{N}})\big] + P_{\mathrm{HF}} + R_{\mathrm{ex}} \tag{4.2}$$

wobei P_{HF} der Anteil an R_2 durch hochfrequente Bewegungen ist, R_{ex} der Anteil durch Konformationsänderungen, ω_{N} und ω_{H} die Larmorfrequenzen von ^{15}N und ^{1}H, θ der Winkel zwischen ^{15}N-^{1}H-Bindungsvektor und σ_{33} und d die ^{15}N-^{1}H dipolare Kopplung, definiert über $d = (\mu_0\gamma_{\mathrm{H}}\gamma_N\hbar)/(8\pi^2 r_{\mathrm{NH}}^3)$ sowie $c = \omega_{\mathrm{N}}\Delta\sigma/3$ mit $\Delta\sigma = \sigma_{33} - \sigma_{11}$. r_{NH} ist der internukleare Abstand zwischen ^{15}N und ^{1}H und $\Delta\sigma$ die näherungsweise als axialsymmetrisch angenommene Anisotropie der chemischen Verschiebung von ^{15}N. P_{HF} und R_{ex} sind für Amid-Stickstoffkerne meist vernachlässigbar (Fushman *et al.*, 1998; Fushman & Cowburn, 1998). Nach Umformung ergibt sich:

$$\frac{\eta}{R_2} = \frac{2dc}{d^2 + c^2} \cdot (3\cos^2\theta - 1)/2 \quad \text{bzw.} \tag{4.3}$$

$$\frac{2R_2}{\eta} \cdot \omega_{\mathrm{N}} = \frac{3d}{\Delta\sigma(3\cos^2\theta - 1)/2} + \frac{\Delta\sigma}{3d(3\cos^2\theta - 1)/2} \cdot \omega_{\mathrm{N}}^2 \tag{4.4}$$

wobei Gl. 4.3 in 4.4 in eine solche Form gebracht wurde, daß sich die Methode der kleinsten Quadrate anwenden und die linke Seite linear gegen ω_{N}^2 anfitten läßt (Fushman *et al.*, 1998). Aus der Steigung m und dem Achsenabschnitt b kann man dann direkt den Winkel θ über $(3\cos^2\theta - 1)/2 = 1/\sqrt{mb}$ und die Anisotropie $\Delta\sigma = \sqrt{m/b}$ bestimmen.

4.3.2 NMR in mizellarer Lösung

Feldabhängige NMR-Experimente an CSC in DPC-mizellarer Lösung wurden an 500, 600 und 750 MHz Varian $^{\mathrm{UNITY}}$*INOVA* NMR-Spektrometern bei 45 °C aufgenommen. Die Bestimmung der Kreuzrelaxationsrate η wurde mit einer Pulssequenz von Tjandra *et al.*, (1996) durchgeführt. Diese Sequenz liefert 2D (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektren unter Einwirkung der Kreuzrelaxation („Experiment A“) bzw. wahlweise ein Referenzspektrum („Experiment B“). Die Relaxationsrate kann dann aus der Mischzeitabhängigkeit des Verhältnisses der jeweiligen Signalin-

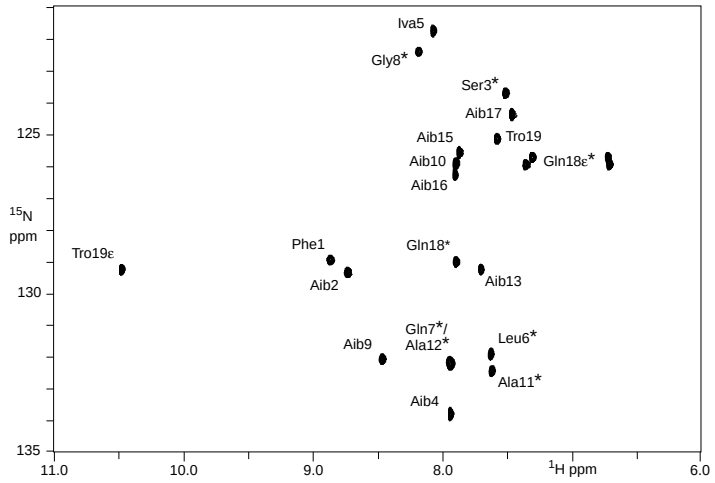

Abbildung 4.6:
*Zugeordnetes 2D (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektrum von U-^{15}N CSC, gelöst in deuterierten DPC-Mizellen. Mit * markierte Signale sind in der ^{15}N-Dimension einmal gefaltet.*

tensitäten gewonnen werden: $I_\mathrm{A}/I_\mathrm{B} = \tanh(\eta \cdot 2\Delta)$ mit der Mischzeit 2Δ (Tjandra *et al.*, 1996). Die transversale Relaxationsrate R_2 wurde mittels einer Standard-(^{15}N,^{1}H)-HSQC-Sequenz bestimmt. Die Signale im (^{15}N,^{1}H)-HSQC wurden über die in DPC-Mizellen bekannten chemischen Verschiebungen der Amidprotonen (Anders *et al.*, 2000) zugeordnet. Individuelle Meßwerte für η und R_2 sind im Anhang, Tab. A.1 aufgelistet.

4.3.3 Relaxationsmessungen

Die Bestimmung von θ und $\Delta\sigma$ über Gl. 4.4 ist sehr empfindlich auf kleine Änderungen in den Relaxationsraten, die deswegen mit möglichst hoher Präzision gemessen wurden. Hierzu wurden die 2D-Experimente zur Bestimmung von R_2 bzw. η mit je 64 Inkrementen in der ^{15}N-Dimension, 16 bzw. 32 Wiederholungen, 3.5 bzw. 3 s Wiederholzeit und je 10 Werten für die Mischzeit zwischen 5 und 200 ms aufgenommen, im Falle des Kreuzkorrelationsexperiments jeweils Experiment A und B. Experimente Bei nur 4 verschiedenen Mischzeiten aufgenommene Experimente lieferten zu ungenaue Ergebnisse – das Vorhandensein von Oszillationen in den T_2-Kurven von Ser3 und Gly8 beispielsweise wurde erst deutlich, als mit 10 Datenpunkten die Zeitauflösung ausreichend hoch war (siehe Tabelle 4.2). Aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bei langen Mischzeiten mußte auf analoge Messungen an einem isotropen Bizell-System verzichtet werden.

Bei der Auswertung der NMR-Spektren erwies es sich als ebenso entscheidend, ob die Signalhöhe oder das Integral eines Signals benutzt wurde: In den Relaxationsraten selbst waren zunächst keine größeren Abweichungen einzelner Datenpunkte erkennbar, obwohl sich die Werte der Raten je nach Auswertmethode leicht änderten. Bei der Endauswertung jedoch waren die Abweichungen der einzelnen Datenpunkte von einer mittleren Geraden unter Verwendung der Integrale weitaus höher als bei Verwendung der Signalhöhe. Diese Beobachtung wurde auch von einer anderen Forschungsgruppe bestätigt (D. Fushman, private Mitteilung).

Die Bestimmung der Relaxationsraten R_2 und η durch iteratives Anpassung der aufgenommenen Datenpunkte sowie die anschließende lineare Regression von Gl. 4.4 und Darstellung

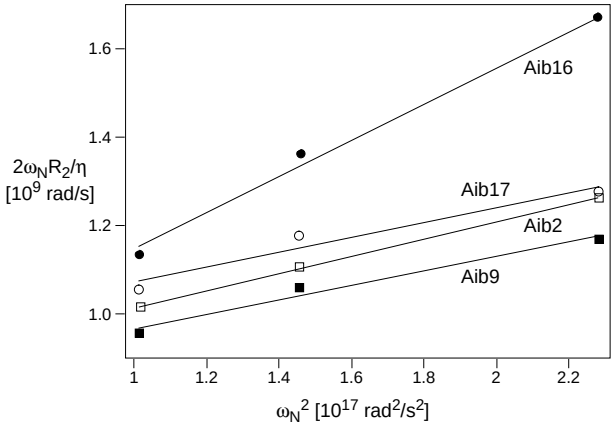

Abbildung 4.7:
Lineare Regression nach Gl. 4.4 am Beispiel von Aib2, 9, 16 und 17 bei den drei Feldstärken 500, 600 und 750 MHz (ausgedrückt durch ω_N^2).

von Abb. 4.7 wurde mit dem Programm GNUPLOT durchgeführt. Die Ergebnisse der linearen Regression sind in Tabelle 4.2 aufgelistet.

4.3.4 Auswertung der Relaxationsdaten

Rest	Phe1	Aib2	Ser3	Aib4	Iva5	Leu6	Gln7	Gly8	Aib9	Aib10
χ_{NH}	22.8	21.8	(15.3)[a]	(22.8)[b]	(27.5)[b]	19.6	(20.6)[c]	(13.4)[a]	17.0	20.7
$\Delta\sigma$	188	166	(186)	(211)	(220)	155	(176)	(196)	155	166

Rest	Ala11	Ala12	Aib13	Pro14	Aib15	Aib16	Aib17	Gln18	Tro19	Tro19ε
χ_{NH}	21.8	(20.6)[c]	0	(–)[e]	25.8	32.1	20.7	22.7	22.2	(0)[d]
$\Delta\sigma$	173	(176)	121	(–)	218	254	147	178	164	(48)

Tabelle 4.2: ^{15}N CS-Tensorparameter in U-^{15}N CSC in mizellarer Lösung.

[a] *Der Exponentialfunktion in T_2 war eine Oszillation überlagert, was eine genaue Bestimmung von R_2 verhinderte; die Anpassung von η war ebenfalls unbefriedigend.*

[b] *Die Anpassung der Exponentialfunktion in T_2 war unzureichend, eine genaue Bestimmung von R_2 nicht möglich.*

[c] *Die Signale von Gln7 und Ala12 überlappen im 2D (^{15}N,^{1}H)-HSQC.*

[d] *Obwohl die Anpassungen von R_2 und η sehr gut waren, war es in der linearen Regression (Gl. 4.4) praktisch unmöglich, eine Gerade durch die 3 Punkte zu legen.*

[e] *Prolin besitzt kein Amidproton.*

Von 17 prinzipiell auswertbaren Signalen, die sich nicht im (^{15}N,^{1}H)-HSQC überlappen – also außer Gln7 und Ala12 – konnten 5 Signale nicht konsistent ausgewertet werden (siehe auch Anmerkungen in Tab. 4.2). Diese Probleme traten vor allem bei der Anpassung von R_2 auf und wurden unabhängig bei allen Spektrometerfrequenzen beobachtet. Wie aus Tabelle 4.2 ebenfalls ersichtlich ist, ergeben sich selbst innerhalb eines Aminosäuretyps relativ große Abweichungen, sowohl in χ_{NH} als auch in $\Delta\sigma$, innerhalb der (auswertbaren) Aminosäurereste von CSC. Die Mittelwerte betragen χ_{NH} = (20.6 $\pm$ 7.5)° und $\Delta\sigma$ = (174 $\pm$ 34) ppm. Drei extreme Beispiele

sind hier Aib13, Aib16 und Aib17, wobei Aib16 und Aib17 strukturell die gleiche Umgebung besitzen (Anders *et al.*, 2000) aber eine Differenz in der Breite der chemischen Verschiebung von über 100 ppm aufweisen, was sehr unwahrscheinlich ist. Ein $\Delta\sigma$-Wert von 254 ppm wurde für Amid-^{15}N ebenfalls noch nicht gefunden (Asakawa *et al.*, 1998; Lumsden *et al.*, 1994).

Aufgrund dieser Schwierigkeiten sollten alle hier mit dieser Methode gewonnenen Tensorinformationen mit Vorsicht betrachtet werden – zumal mit den anderen hier vorgestellten Methoden deutlich genauere und weniger fehlerempfindliche Daten gewonnen werden konnten. Es sollte erwähnt werden, daß auch von anderen Gruppen in vergleichbaren Experimenten ähnliche Abweichungen beobachtet wurden. Fushman *et al.* charakterisierten 1998 die ^{15}N CS-Tensoren in Ubiquitin; es wurden Werte von χ_{NH} = (15.7 $\pm$ 5.0)° und $\Delta\sigma$ = (157 $\pm$ 19) ppm bestimmt, wobei die Streuung im α-helikalen Bereich mit (16.6 $\pm$ 2.8)°/(151 $\pm$ 7) ppm geringer ausfielen (Fushman *et al.*, 1998). Tjandra *et al.* hatten allerdings zuvor deutlich geringere Abweichungen in Ubiquitin beobachtet (Tjandra *et al.*, 1996). In den Experimenten an Ribonuclease H von Kroenke *et al.* (1999) trat wiederum eine Abweichung von ± 13 ppm bei einem Mittelwert von 172 ppm auf. Reduziert man die in der vorliegenden Arbeit bestimmten Daten um die beiden statistisch besonders stark abweichenden (Aib13, Aib16), ergeben sich für die Mittelwerte mit (21.5 $\pm$ 2.3)° und (171 $\pm$ 20) ppm bereits deutlich geringere Streubreiten, die mit den obengenannten durchaus vergleichbar sind. Allerdings sind dann nur noch 10 von 19 Signalen berücksichtigt. Aus den hier vorgestellten Daten läßt sich abschließend nicht sagen, ob die Methode der Charakterisierung von ^{15}N CS-Tensoren mittels Relaxationsmessungen in Lösung generell für kleine Moleküle ungeeignet ist oder sich speziell in mizellarer Lösung nicht anwenden läßt.

4.4 Quantenchemische Berechnungen

Die verfügbaren Informationen über CS-Tensor-Parameter, die mittels *ab initio*-Methoden berechnet wurden, ist noch relativ beschränkt (Lumsden *et al.*, 1994; Anderson-Altmann *et al.*, 1995; Walling *et al.*, 1997; Asakawa *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998; Czernek *et al.*, 2000), vor allem in Hinsicht auf die Orientierung der CS-Tensoren relativ zu den Molekülkoordinaten. In diesem Abschnitt sollen Größe und Orientierung der CS-Tensoren von Amid-^{15}N und Carbonyl-^{13}C von Aib in verschiedenen Peptidsystemen berechnet werden. Diese Berechnungen liefern einen ebenso kompletten Datensatz wie die in Abschnitt 4.1 vorgestellten Messungen mittels MAS-NMR und können mit diesem detailliert verglichen werden.

Es wurde bereits gezeigt, daß das Einbeziehen von Wasserstoffbrücken in die *ab initio*-Berechnungen deutliche Änderungen in den CS-Tensorparametern hervorruft (Lumsden *et al.*, 1994; Anderson-Altmann, 1995; Hu *et al.*, 1998; Czernek *et al.*, 2000). Diese Tatsache wurde in Uracil für ^{13}C2, ^{15}N1 und ^{15}N3 vor allem in Hinblick auf die Orientierungen der CS-Tensoren untersucht, da hierfür einerseits in Zusammenarbeit mit J. Leppert ein kompletter, mittels MAS-NMR bestimmter Datensatz aufgenommen wurde (Leppert *et al.*, 2000a; Leppert *et al.*, 2000b; Leppert, 2001a) und andererseits die Kristallstruktur von Uracil bekannt ist (Par-

ry, 1954; Stewart, 1967). Diese *ab initio*-Voruntersuchungen an Uracil sollen vor allem dazu dienen, den Einfluß von Wasserstoffbrücken auf CS-Tensorparameter abschätzen zu können. Da für Aib-Dipeptide bislang keine Kristallstruktur verfügbar ist, konnten die hier untersuchte Dipeptide nur einzeln „im Vakuum“ berechnet werden. Um trotzdem den Einfluß von Wasserstoffbrücken auf CS-Tensorparameter in Aib untersuchen zu können, wurde zusätzlich ein Hexapeptid (Gly8–Aib13 aus CSC) berechnet.

4.4.1 Verwendete Methoden

Ab initio-Berechnungen wurden mit dem Programm GAUSSIAN 98 (Frisch *et al.*, 1998) durchgeführt. Es wurde eine eichinvariante Atomorbital-Methode (GIAO; Chesnut, 1996) in der Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Implementation von Becke („B3LYP“; Becke, 1993) angewandt, die für die Berechnung von NMR-Parametern geeignet ist (Cheeseman *et al.*, 1996). Als Basissätze wurden 6-31G* und alternativ 6-311+G(d,p) benutzt, wobei letzterer zusätzliche diffuse Funktionen zur Berechnung von Elektronenkorrelationen enthält.

Alle untersuchten Moleküle wurden zunächst mit derselben Funktion/Basissatz-Kombination energieoptimiert, mit der danach die NMR-Parameter berechnet wurden. Eine Ausnahme hierzu war das Hexapeptid, welches zu groß für eine Optimierung mit dem Basissatz 6-311+G(d,p) war, um mit vertretbarer Rechenzeit ein Ergebnis zu liefern. Zudem ergab sich lediglich ein geringer Unterschied, wenn die Optimierung mit einem kleineren Basissatz berechnet wurde als die nachfolgende NMR-Rechnung (vergl. „kl/gr“ und „gr/gr“ im Anhang, Tab. B.2, B.3). Zur Gewinnung von Hauptachsenwerten der CS-Tensoren, die mit den über MAS-NMR ermittelten verglichen werden können, wurden zusätzlich die absoluten isotropen Abschirmungen zweier Referenzsubstanzen berechnet: NH_3 für ^{15}N und TMS für ^{13}C (Anhang, Tab. B.1). Da die Abschirmungswerte ebenfalls von den verwendeten Basissätzen abhängig sind, wurde zum Referenzieren jeweils derjenige Wert benutzt, der mit denselben Basissätzen berechnet worden war wie der zu referenzierende Wert. Da GAUSSIAN in kartesischen Koordinaten rechnet, wurden die resultierenden Richtungscosinusse der CS-Tensoren mit Hilfe von TCL-Programmen in die zuvor experimentell bestimmten Euler-Winkel umgerechnet.

Alle Rechnungen wurden auf Computern von Silicon Graphics durchgeführt (Power Challenge L/4×R10000-195, Origin 2000/4×R12000-270) und benötigten, je nach Molekül und verwendetem Basissatz, einige Minuten bis zu wenigen Tagen pro Rechnung. Für größere Moleküle wurden jeweils alle 4 Prozessoren parallel eingesetzt.

4.4.2 Berechnungen an Uracil

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Konfigurationen von Wasserstoffbrückenbindungen wurden Tensorparameter von Uracil als Monomer, Paar und Tripel berechnet. Die verwendeten Startgeometrien für die Energieoptimierung stammen aus der Kristallstruktur von Stewart (1967). Abbildung 4.8 zeigt die Struktur des Tripels nach erfolgter Optimierung mit der hier verwendeten Numerierung der Kerne. Die Ringgeometrien erscheinen leicht verzerrt, da die Uracil-Monomere nach der Energieoptimierung nicht mehr exakt in einer Ebene lagen, die leichte Verzerrung entsteht rein projektionsbedingt.

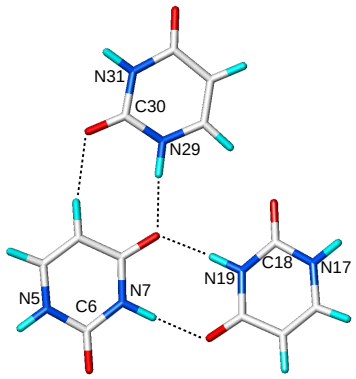

Abbildung 4.8:
Modell eines Tripels aus Uracil zur Nachbildung des Musters der Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien). Die Molekülabstände und -winkel wurden der Kristallstruktur von Uracil entnommen, anschließend erfolgte eine Energieminimierung – im hier abgebildeten Fall mit den B3LYP-Funktionen und dem 6-31G-Basissatz.*

In Tabelle 4.3 sind die mit B3LYP/6-311G+(d,p) berechneten Daten zusammengefaßt und mit experimentell bestimmten Daten (Leppert *et al.*, 2000a; Leppert *et al.*, 2000b; Leppert, 2001) sowie mit Literaturdaten (Anderson-Altmann *et al.*, 1995) verglichen. Ausführliche Tabellen mit den Daten aus allen Berechnungen befinden sich im Anhang (Tabellen B.2, B.3). Kerne, die in eine Wasserstoffbrücke eingebunden sind, wurden in Tabelle 4.3 mit (*) gekennzeichnet.

Auffallend ist zunächst die recht gute Übereinstimmung der berechneten Tensordaten mit den aus MAS-Experimenten gewonnenen Daten. Vor allem die Orientierung der CS-Tensoren von ^{15}N1, ^{15}N3 und ^{13}C2 stimmt extrem gut zwischen *ab initio*-Rechnung und Experiment überein. Die Schwierigkeiten der Rechnungen scheinen vor allem in der korrekten Berechnung der isotropen Verschiebung σ_{iso} zu bestehen, denn die Anisotropie δ_{a} der CS-Tensoren wird im wesentlichen korrekt wiedergegeben. Dieses Verhalten ist auch in den mitaufgeführten Literaturdaten zu finden. Es zeigt sich, daß die isotrope chemische Verschiebung maßgeblich von der Wahl des Basissatzes beeinflußt wird – es kommt durchaus vor, daß die mit einem höher korrigierten Basissatz berechneten Werte mehr von den experimentell bestimmten Daten abweichen als die mit einem geringer korrigierten Basissatz.

Struktur	Atom Nr.[a]	Basissatz Opt/NMR[b]	σ_{iso} [ppm][c]	δ_a [ppm][c]	σ_{11} [ppm][c]	σ_{22} [ppm][c]	σ_{33} [ppm][c]	χ_{NH} [°][d]	ψ_{NH} [°][d]	χ_{NC} [°][d]	ψ_{NC} [°][d]
N1											
Monomer	N5	gr/gr	150	82	100	118	232	12	−90	103	90
Paar	N5	gr/gr	153	82	103	121	235	11	−90	104	90
Tripel	N5	gr/gr	156	85	102	126	241	11	−90	104	89
Tripel	N17	gr/gr	152	83	100	122	235	11	−90	104	90
Tripel	N29*	gr/gr	157	84	84	146	241	15	−90	102	90
Exp.[e]	–	–	136	81	48	142	217	15	−80	92	100
Exp. Lit.[f]	–	–	135	83	51	135	217	18	–	–	–
Sim. Lit.[g]	–	–	89–108	74–96	16–48	72–94	173–196	13–17	–	–	–
N3											
Monomer	N7	gr/gr	183	67	148	150	250	8	0	124	0
Paar	N7*	gr/gr	187	68	124	181	255	11	90	128	90
Tripel	N7*	gr/gr	186	69	123	180	255	11	90	127	90
Tripel	N19*	gr/gr	187	69	125	179	256	11	90	127	90
Tripel	N31	gr/gr	183	69	146	152	252	8	0	123	0
Exp.[e]	–	–	158	66	94	155	224	15	90	132	88
Exp. Lit.[f]	–	–	157	63	100	152	221	9	–	–	–
Sim. Lit.[g]	–	–	128–146	67–84	66–90	109–134	202–222	7–12	–	–	–
C2								χ_{CN1}	ψ_{CN1}	χ_{CN3}	ψ_{CN3}
Monomer	C6	gr/gr	154	89	102	116	243	32	−90	145	−90
Paar	C6	gr/gr	153	90	103	114	244	30	−90	144	−90
Tripel	C6	gr/gr	153	92	103	111	245	32	−90	145	−90
Tripel	C18*	gr/gr	155	85	101	123	239	31	−90	144	−90
Tripel	C30*	gr/gr	158	80	101	134	238	34	−90	148	−90
Exp.[e]	–	–	153	77	95	135	230	33	−90	147	−90

Tabelle 4.3: Chemische Verschiebungstensoren von ^{15}N1, ^{15}N3 und ^{13}C2 in Uracil.
** Kern ist in eine Wasserstoffbrücke eingebunden.*

[a] *In Abbildung 4.8.*

[b] *Es wurden die Basissätze 6-31G* („kl“) bzw. 6-311+G(d,p) („gr“) benutzt.*

[c] *Relativ zu NH_3 (^{15}N) bzw. TMS (^{13}C), siehe Anhang, Tab. B.1.*

[d] *$(180 - \chi_{NH})$, $(180 - \chi_{NC})$, $-\psi_{NH}$ und $-\psi_{NC}$ sind auch erlaubte Werte.*

[e] *Aus (Leppert* et al.*, 2000a; Leppert* et al.*, 2000b).*

[f] *Aus statischen Pulverspektren (Anderson-Altmann* et al.*, 1995), umgerechnet vom Referenzstandard NH_4NO_3 auf NH_3.*

[g] *Aus GIAO* ab initio*-Berechnungen von Uracil gebunden an zwei Formaldehyd-Moleküle (Anderson-Altmann* et al.*, 1995), abs. Abschirmung relativ zu NH_3 = 255 ppm (Anhang, Tab. B.1) unter Verwendung verschiedener Basissätze.*

Die Abhängigkeit der Tensorparameter vom Vorhandensein einer Wasserstoffbrücke („H-Brücke“) ist insgesamt nicht sehr groß, zeigt sich aber doch in systematischen Änderungen sowohl von Größe als auch Orientierung des Tensors. So ist z. B. im N1 für das in eine H-Brücke eingebundene N29 die am stärksten abgeschirmte CS-Tensorkomponente σ_{11} deutlich kleiner bei gleichzeitig größerem σ_{22} als für die exponierten N5 und N17, der Tensor entfernt sich also von der Axialsymmetrie. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch für N3-Kerne, z. B. zwischen N7 und N19 (H-Brücke) und N31 (keine H-Brücke). Im Experiment wurde sogar

eine noch größere Asymmetrie bestimmt als durch die hier vorgestellten *ab initio*-Rechnungen vorhergesagt wurde.

Eine systematische Änderung ist auch in den Winkeln des CS-Tensors relativ zur NH-Bindungsachse zu beobachten: χ_{NH} vergrößert sich bei Vorhandensein einer H-Brücke und nähert sich dem experimentell bestimmten Wert von 15° an, selbst unter Verwendung anderer Basissätze (Anhang, Tab. B.3). Die Orientierung relativ zur NC-Bindungsachse ändert sich hingegen kaum. Beim N3 ist der CS-Tensor für die nicht in H-Brücken eingebundenen ^{15}N-Kerne fast genau axialsymmetrisch und χ_{NH} beinahe Null, womit eine geometrische Abhängigkeit vom Azimutwinkel ψ_{NH} und ψ_{NC} praktisch entfällt und diese nicht bestimmt werden können. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Czernek *et al.*, (2000) und Hu *et al.*, (1998). Erstere hatten die die Abhängigkeit von Größe und Orientierung des CS-Tensors eines Imino-Stickstoffkerns von der Länge der Wasserstoffbrücke in einem G-C-Basenpaar untersucht, während Hu *et al.* nur den Effekt intermolekularer Wechselwirkungen auf die Hauptachsenwerte von ^{15}N CS-Tensoren in verschiedenen RNA-Basen untersucht hatten, nicht aber auf deren Orientierung. Aus den für Uracil berechneten Literaturdaten (Anderson-Altmann *et al.*, 1995, siehe auch Tabelle 4.3) war diese Tendenz nicht so deutlich erkennbar, allerdings war die die Übereinstimmung von Experiment und *ab initio*-Rechnung auch hier besser, wenn die Ausbildung von H-Brücken berücksichtigt wurde.

Für den Carbonylkern C2 ergibt sich im Vergleich zu den Imino-Stickstoffkernen keine so große Abhängigkeit des CS-Tensors vom Vorhandensein einer H-Brücke, obwohl auch hier eine Tendenz zu größerer Asymmetrie von σ_{11} und σ_{22} unter Präsenz einer H-Brücke beobachtet wird. Die Orientierung des CS-Tensors von C2 ist hierauf allerdings praktisch unempfindlich.

4.4.3 Berechnungen an verschiedenen Aib-Peptiden

Aufgrund der im vorhergehenden Abschnitt vorgestellten Daten wird deutlich, daß es für die korrekte Berechnung von Größe und Orientierung von CS-Tensoren wichtig ist, intermolekulare Wechselwirkungen im Molekülmodell zu berücksichtigen. Die Struktur des in den hier vorgestellten MAS-NMR-Untersuchungen verwendeten Dipeptids AibAib-NH_2 ist noch nicht bekannt. Da das intermolekulare H-Brückenbindungsmuster somit auch nicht bekannt ist, wurden hier CS-Tensorparameter für isolierte Dipeptide mit denen für ein helikales Hexapeptid verglichen, welches intramolekulare H-Brücken ausbildet. Strukturuntersuchungen an z. B. *N*-Acetyl-L-Valyl-L-Leucin mittels Röntgenstrukturanalyse hatten allerdings gezeigt, daß das Stickstoffatom in der Peptidbindung tatsächlich eine intermolekulare H-Brücke ausbildet (Carroll *et al.*, 1990).

Als Startstruktur für die Energieminimierung wurde aufgrund der bereits bekannten Mizellstruktur von Chrysospermin C (Anders *et al.*, 2000) eine ideale α-Helix modelliert. Während der Energieminimierung mittels B3LYP/6-31G* ergab sich hieraus allerdings eine nahezu ideale 3_{10}-Helix (Abbildung 4.9). Dies könnte möglicherweise aufgrund der besseren Kompensation der negativen Teilladungen der Sauerstoffatome in einer so kurzen Helix geschehen sein – in der

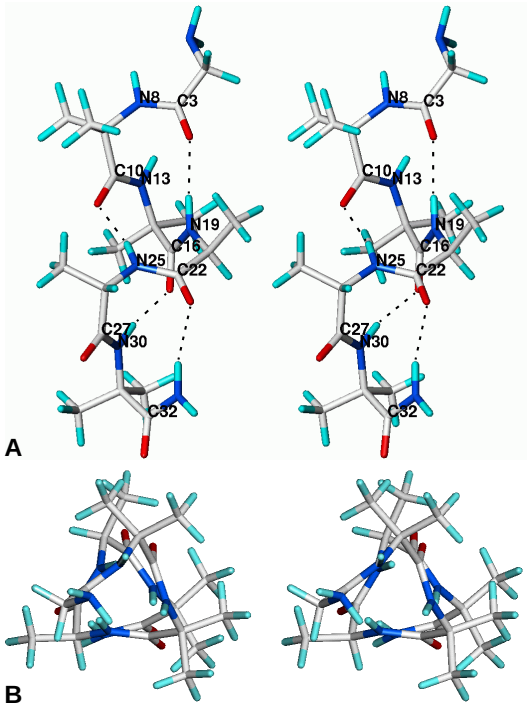

Abbildung 4.9:
Stereodarstellung eines Modells des Teilabschnittes Gly8–Aib13 aus Chrysospermin C nach B3LYP/6-31G-Energieminimierung. (A) Seitenansicht, Numerierung und Wasserstoffbrücken sind eingezeichnet. (B) zeigt die fast perfekte 3_{10}-Helix vom N-Terminus aus gesehen.*

3_{10}-Helix sind zwei Sauerstoffatome „exponiert“, in der α-Helix jedoch drei. Ein zur Kontrolle energieminimiertes $(Ala)_6$-Hexapeptid zeigte das gleiche Verhalten – ein Einfluß der Methylgruppe, die im Aib das H_α ersetzt, kann also in diesem Fall ausgeschlossen werden, obwohl gerade Aib-reiche Peptide zur Bildung von 3_{10}-Helices neigen (Geßmann *et al.*, 1997; Sansom, 1993a).

Die Hauptachsenwerte der CS-Tensoren werden in den Rechnungen insgesamt recht gut wiedergegeben, zeigen allerdings eine geringere Abhängigkeit von einer Präsenz von H-Brücken als bei Uracil. Der Winkel χ_{NH} des CS-Tensors von ^{15}N tendiert bei Vorhandensein einer H-Brücke zu größeren Werten, die dem experimentell bestimmten Wert entsprechen; alle anderen Winkel zeigen keine erkennbare Tendenz. Erstaunlich ist, daß sich für ψ_{NC} des CS-Tensors von ^{15}N große Abweichungen in den einzelnen Rechungen ergaben, die keiner bestimmten Tendenz zu folgen scheinen, obwohl der experimentell bestimmte Wert von 36° ungefähr in der Mitte des sich ergebenden Winkelbereichs von $8 \leq \psi_{\mathrm{NC}} \leq 57°$ liegt. Im Gegensatz zum Winkel ψ_{NH}, dessen Änderung bei sehr kleinem χ_{NH} nicht ins Gewicht fällt, wäre eigentlich zu erwarten gewesen, daß ψ_{NC} in den *ab initio*-Berechnungen ähnlich genau bestimmt werden kann wie im NMR-Experiment. Eine Begründung hierfür ist nicht bekannt.

Peptid	Atom Nr.[a]	Basissatz Opt/NMR[b]	σ_{iso} [ppm][c]	δ_a [ppm][c]	σ_{11} [ppm][c]	σ_{22} [ppm][c]	σ_{33} [ppm][c]	χ_{NH} [°][d]	ψ_{NH} [°][d]	χ_{NC} [°][d]	ψ_{NC} [°][d]
Amid-^{15}N											
GU	N	gr/gr	154	111	86	110	265	7	32	106	44
AU	N	gr/gr	152	106	83	116	258	7	35	106	41
SU	N	gr/gr	152	119	87	98	271	8	10	107	21
FU	N	gr/gr	148	112	74	110	260	8	4	107	31
PU	N	gr/gr	158	112	93	110	270	8	45	105	57
UU	N	gr/gr	152	102	86	116	254	7	26	106	44
UUU	N10	kl/gr	153	112	83	110	265	10	9	107	40
UUU	N15	kl/gr	142	109	64	111	251	11	17	107	8
GUUAAU	N8	kl/gr	154	120	81	106	274	10	6	107	42
GUUAAU	N13	kl/gr	148	110	72	115	258	12	13	105	9
GUUAAU	N19*	kl/gr	142	113	67	105	255	18	25	103	15
GUUAAU	N25*	kl/gr	145	118	69	103	263	16	25	104	20
GUUAAU	N30*	kl/gr	146	112	75	105	258	11	15	108	11
Experiment	–	–	127	97	69	87	224	15	0	105	36
Carbonyl-^{13}C											
GU	C	gr/gr	178	81	94	182	259	72	88	41	89
AU	C	gr/gr	183	78	96	191	260	77	88	37	88
SU	C	gr/gr	177	86	98	171	263	77	87	37	87
FU	C	gr/gr	179	84	97	176	263	80	88	34	86
PU	C	gr/gr	182	80	96	189	262	78	89	35	87
UU	C	gr/gr	184	76	98	195	261	102	89	35	89
UUU	C4	kl/gr	185	79	97	194	264	97	83	30	89
UUU	C12	kl/gr	178	87	100	168	265	96	89	33	86
GUUAAU	C3*	kl/gr	180	79	95	187	260	102	84	36	88
GUUAAU	C10*	kl/gr	179	82	96	181	261	95	90	32	87
GUUAAU	C16*	kl/gr	181	81	99	182	262	87	86	34	88
GUUAAU	C22*	kl/gr	180	80	96	185	260	94	86	35	86
GUUAAU	C27	kl/gr	177	86	98	171	263	96	86	34	87
GUUAAU	C32	kl/gr	183	85	100	182	268	94	79	31	85
Experiment	–	–	174	66	92	190	240	90	80	34	88

Tabelle 4.4: Chemische Verschiebungstensoren von Amid-^{15}N und Carbonyl-^{13}C in Aib-Peptiden.

** Kern ist in eine Wasserstoffbrücke eingebunden.*

[a] *In Abbildung 4.9.*

[b] *Es wurden die Basissätze 6-31G* („kl“) bzw. 6-311+G(d,p) („gr“) benutzt.*

[c] *Relativ zu NH_3 bzw. TMS (Anhang, Tab. B.1).*

[d] *$(180 - \chi_{NH})$, $(180 - \chi_{NC})$, $-\psi_{NH}$ und $-\psi_{NC}$ sind auch erlaubte Werte.*

Abschließend sollte erwähnt werden, daß sich, ebenso wie bei der Auswertung der MAS-NMR-Spektren, bei den Berechnungen der Euler-Winkel des öfteren auch die geometrisch identischen Winkel von $(180 - \chi_{NH})$, $(180 - \chi_{NC})$, $-\psi_{NH}$ und $-\psi_{NC}$ ergaben. Es ist erkennbar, daß sich *ab initio*-Berechnungen an kleinen Systemen durchaus dazu eignen, sinnvolle Informationen über chemische Verschiebungstensoren zu gewinnen. Dies trifft insbesondere auf die

Orientierung eines Tensors relativ zu den Molekülkoordinaten zu – solche Berechnungen sind nach wie vor eine der Hauptquellen für derartige Winkelinformationen. Eine exakte Bestimmung der Hauptachsenwerte von CS-Tensoren ist allerdings noch recht stark abhängig von der Wahl des verwendeten Basissatzes, vor allem in Hinsicht auf die isotrope chemische Verschiebung – die Anisotropie wird im allgemeinen recht gut wiedergegeben. Wie Cheeseman *et al.*, (1996) zeigten, liefert die MP2-Methode (Gauss, 1993) möglicherweise noch genauere Daten, allerdings ist hier ein erheblicher Mehraufwand bei den Berechnungen erforderlich, insbesondere was die temporär anfallenden Datenmengen betrifft. Versuche, solche Rechnungen auf die in Abschnitt 4.4.2 vorgestellten Monomere, Paare und Tripel von Uracil anzuwenden, führten zu Temporärdaten von nicht unter 10 GByte, was den in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden lokalen Speicherplatz weit überschritt und solche Rechnungen unmöglich machten. Bei der stark ansteigenden Speicherdichte moderner Speichermedien sowie der stetig steigenden Rechenleistung sollten derartige MP2-Rechnungen auch an größeren Systemen möglich werden.

In Tabelle 4.4 sind berechnete Tensordaten für verschiedene Aib enthaltende Peptide zusammengefaßt, die mit dem Basissatz 6-311+G(d,p) („gr“) berechnet wurden wie zuvor die von Uracil in Tabelle 4.3. Mit dem kleineren Basissatz 6-311G* berechnete Daten zeigten zwar eine etwas geringere Abweichung zu den experimentell bestimmten Werten (Anhang, Tab. B.4, B.5), werden aber aus Konsistenzgründen zum vorhergehenden Abschnitt hier nicht berücksichtigt. Wie bei Uracil zeigt sich, daß insbesondere die Orientierungen der CS-Tensoren sehr gut zwischen Theorie und Experiment übereinstimmen.

4.5 Chemische Verschiebungstensoren in Aib

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten erlauben einen Vergleich verschiedener Methoden zur Charakterisierung von Größe und Orientierung der chemischen Verschiebungstensoren von $^{13}C'$ und ^{15}N in biologischen Molekülen. In Tabelle 4.5 sind alle CS-Tensordaten zusammengefaßt, die an Aib enthaltenden Systemen experimentell bestimmt bzw. berechnet wurden. Die mit Hilfe von Relaxationsexperimenten in mizellarer Lösung ermittelten Daten wurden allerdings nicht berücksichtigt, da sich diese Methode zumindest in dem hier vorliegenden Fall als ungeeignet erwiesen hatte. In Abbildung 4.10 ist die Orientierung des CS-Tensors von ^{15}N in der Peptidbindung dargestellt; die Orientierung des ^{13}C-Tensors wurde bereits in Abschnitt 3.4.5 (S. 45) vorgestellt.

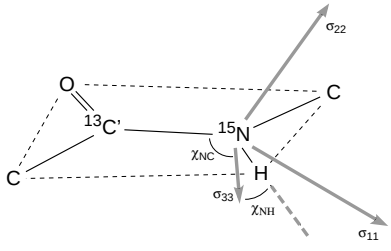

Abbildung 4.10:
Orientierung des ^{15}N chemischen Verschiebungstensors von Aib in der Peptid-Ebene. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Richtung der NH-Bindung.

Methode	Molekül	Atom Nr.[a]	σ_{iso} [ppm]	δ_a [ppm]	σ_{11} [ppm]	σ_{22} [ppm]	σ_{33} [ppm]	χ_{NH} [°]	ψ_{NH} [°]	χ_{NC} [°]	ψ_{NC} [°]
Amid-^{15}N											
Stat. NMR[b]	UU	N	(127)	(97)	(69)	(87)	(224)	–	–	(105)	(36)
Stat. NMR	Aib in CSC	N	127	97	78 ± 4	78 ± 4	224 ± 4	–	–	–	–
MAS NMR	UU	N	127	97	69.2 ± 1.6	86.7 ± 1.7	224.2 ± 0.5	15 ± 5	0 ± 10	105.3 ± 2.6	35.9 ± 3.8
GIAO[c]	GUUAAU	N19	142	113	67	105	255	18	25	103	15
GIAO[c]	GUUAAU	N25	145	118	69	103	263	16	25	104	20
GIAO[c]	GUUAAU	N30	146	112	75	105	258	11	15	108	11
Carbonyl-^{13}C											
Stat. NMR	UU	C	175	68	93 ± 3	188 ± 3	243 ± 3	–	–	35 ± 5	90 ± 30
Stat. NMR	Aib in CSC	C	177	68	105 ± 5	180 ± 5	245 ± 5	–	–	–	–
MAS NMR	UU	C	174	66	92.1 ± 1.5	190.3 ± 1.9	239.8 ± 1.5	90 ± 10	80 ± 10	34 ± 2	88 ± 3
GIAO[c]	GUUAAU	C3	180	79	95	187	260	102	84	36	88
GIAO[c]	GUUAAU	C10	179	82	96	181	261	95	90	32	87
GIAO[c]	GUUAAU	C16	181	81	99	182	262	87	86	34	88
GIAO[c]	GUUAAU	C22	180	80	96	185	260	94	86	35	86

Tabelle 4.5: CS-Tensoren von Amid-^{15}N und Carbonyl-^{13}C in Aib-Peptiden.

[a] *In Abbildung 4.9.*

[b] *Spektrum konnte aufgrund der Überlappung mit dem $^{15}NH_2$-Signal nicht unabhängig ausgewertet werden, der sichtbare Teil paßt jedoch zu den mittels MAS NMR bestimmten Werten.*

[c] *Atome sind in eine Wasserstoffbrücke eingebunden, der Basissatz 6-311+G(d,p) wurde benutzt, die Verschiebungen sind relativ zu NH_3 (^{15}N) bzw. TMS (^{13}C) (Anhang, Tab. B.1).*

Die Charakterisierung von CS-Tensoren mit Hilfe von Festkörper-NMR unter MAS-Bedingungen ist eine genaue und zuverlässige Methode. Ihre Stärken liegen in der Vollständigkeit der gewonnenen Datensätze – meist können alle vier Euler-Winkel von zwei Bindungsvektoren bestimmt werden, der hohen Empfindlichkeit der Spektren auf die zu bestimmenden Winkel bzw. Hauptachsenwerte sowie der Unempfindlichkeit auf spektrale Überlappung mit Nachbar- oder Hintergrundsignalen.

Ab initio-Berechnungen sind ebenfalls dazu geeignet, zuverlässige Daten über die Orientierung von CS-Tensoren zu liefern. Die gewonnenen isotropen bzw. Hauptachsenwerte der CS-Tensoren stimmen allerdings nicht immer mit den mittels Festkörper-NMR bestimmten überein, zumindest bei den hier verwendeten Funktionen und Basissätzen. Es sollte zudem darauf geachtet werden, ein möglichst gutes Strukturmodell für die Einbindung der Kerne in Wasserstoffbrücken zu wählen, da die Tensorparameter hierauf empfindlich sind. Es muß sich allerdings noch zeigen, ob eine Kombination von experimentellen Bestimmung der Größe und Orientierung von CS-Tensoren und quantenchemischen Rechnungen strukturelle Aussagen z. B. über Wasserstoffbrücken zuläßt, ohne die genaue Struktur des Moleküls zu kennen.

Kapitel 5

REDOR mit adiabatischen Inversionspulsen

In den vorangegangenen Kapiteln wurden MAS NMR-Experimente vorgestellt und angewandt, die darauf beruhen, Informationen über anisotrope Eigenschaften des beobachteten Kerns aus Rotationsseitenbanden zu gewinnen. In solchen Experimenten ist es wichtig, stets eine gleichmäßige Anregung der Spins über den gesamten Frequenzbereich der chemischen Anisotropie zu gewährleisten, um Fehler in der Auswertung der Intensitäten der Seitenbanden zu vermeiden. Im folgenden soll eine Möglichkeit zur Umgehung solcher Probleme vorgestellt werden, die auf der Verwendung breitbandig anregender und anpassungsunempfindlicher, adiabatischer Pulse basiert.

5.1 Adiabatische Pulse

Das Funktionsprinzip adiabatischer Pulse besteht darin, daß während des Einstrahlens eines HF-Pulses die Frequenz des HF-Feldes innerhalb des beobachteten Spektralbereich durchgestimmt wird. Die Geschwindigkeit des Durchstimmens, die Durchstimmrate $d\varphi/dt$, muß die adiabatische Bedingung $|d\varphi/dt| < \gamma B_{\text{eff}}$ erfüllen. B_{eff} ist die effektive magnetische Flußdichte des eingestrahlten HF-Feldes – die Resultierende aus γB_1 und der Offset-Frequenz $\Delta\omega$. φ ist der Polarwinkel des effektiven Feldes relativ zur $+x$-Achse des rotierenden Koordinatensystems, welches mit der momentanen Frequenz des eingestrahlten Feldes rotiert (Baum *et al.*, 1985; Kupce und Freeman, 1995; Tannus und Garwood, 1996; Kupce und Freeman, 1996). Ist die Flußdichte von B_{eff} ausreichend hoch, so wird die Magnetisierung entlang der Richtung des effektiven Magnetfelds fixiert, und alle Kernspins können perfekt invertiert werden. Wird φ während eines adiabatischen Inversionspulses zwischen $+\pi/2$ und $-\pi/2$ variiert, wird eine perfekte Inversion erreicht, die unabhängig von der Homogenität des HF-Feldes ist. Das Ausmaß, in dem ein Puls die adiabatische Bedingung erfüllt, wird durch den Adiabatizitätsparameter $Q = \omega_{\text{eff}}/|d\varphi/dt|$ beschrieben. Es wird angenommen, daß ein adiabatischer Inversionspuls eine zufriedenstellende Charakteristik besitzt, wenn $Q \gg 1$ erfüllt ist. Eine adiabatische Inversion

der Magnetisierung kann im Prinzip erreicht werden, indem die Amplitude des eingestrahlten HF-Feldes konstant gehalten wird und lediglich die Frequenz durchgestimmt wird. Um allerdings sicherzustellen, daß B_{eff} exakt auf der $+z$-Achse startet und auf $-z$ endet, ist es im allgemeinen nötig, die Amplitude des HF-Feldes an den zwei Extrempunkten des Durchstimmbereichs weich auf Null zu reduzieren (Kupce und Freeman, 1995; Tannus und Garwood, 1996; Kupce und Freeman, 1996). In diesem Kontext ist eine Vielzahl von Amplituden- und Frequenzmodulationsfunktionen für adiabatische Inversionspulse entwickelt worden (Tannus und Garwood, 1996; Kupce und Freeman, 1996).

5.2 Adiabatische Pulse unter MAS-Bedingungen

Bei der Verwendung adiabatischer Pulse in Festkörper-NMR-Experimenten ergibt sich im Vergleich zur NMR in Flüssigkeiten nur dann ein Unterschied, wenn die Experimente unter MAS-Bedingungen durchgeführt werden, wie es hier vorgesehen ist. In diesem Fall ist die Zeitabhängigkeit des Resonanzoffset-Terms $\Delta\omega(t)$ während des Pulses nicht nur durch die zeitliche Variation des eingestrahlten Feldes $\omega(t)$ gegeben, sondern auch durch die periodische Modulation (aufgrund der Probenrotation) anisotroper Wechselwirkungen wie der chemischen Verschiebungsanisotropie (CSA). Die Zeit, die adiabatische Pulse für eine Inversion der Spins benötigen, ist, verglichen mit Rechteckpulsen, relativ hoch. Aus den hier vorgestellten Untersuchungen geht jedoch hervor, daß es ohne weiteres möglich ist, adiabatische Pulse in MAS NMR-Experimenten zu verwenden, zumindest bei relativ geringen Rotationsfrequenzen $\nu_{\text{r}} \leq 2$ kHz.

Um die Effizienz adiabatischer Inversionspulse in MAS NMR-Experimenten zu untersuchen, wurde einer der vielen Inversionssequenzen benutzt, die von der Varian-Software PBOX zur Erstellung geformter HF-Pulse zur Verfügung gestellt werden. Das Amplitudenprofil $\omega_1(t)$ und die dazugehörige, optimierte Durchstimm-Funktion $\Delta\omega(t)$ (um einen konstanten Q-Faktor über den Durchstimmbereich zu erreichen) des verwendeten Inversionspulses waren (Kupce und Freeman, 1996):

$$\omega_1(t) = \omega_{1,\text{max}} \cos(\beta t)$$

und

$$\Delta\omega(t) = \frac{1}{2}\lambda\big(\beta t + \sin(\beta t)\cos(\beta t)\big)$$

Hierbei sind $\beta = \pi/2\tau$, $\lambda = \omega_{1,\text{max}}^2/\beta Q$ und 2τ die Gesamtdauer des adiabatischen Pulses mit $-\tau < t < +\tau$. Die Durchstimmung der Frequenz wird in der Spektrometerkonsole als eine Phasenmodulation $\Phi(t) = \int \Delta\omega(t)dt$ implementiert. Der geformte Puls wird hierbei in eine endliche Anzahl (hier 200) Zeitintervalle gleicher Dauer geteilt. Jedem Intervall wird dabei eine eigene Amplitude und Phase zugeordnet, um so die benötigte Amplituden- und Frequenzmodulation zu erreichen. Diese Amplituden- und Phaseninformation der Teilintervalle ist in einer Textdatei verfügbar und kann mit dem Varian-Programm PULSETOOL dazu benutzt werden, das Inversionsprofil des jeweiligen Pulses zu untersuchen.

Die Antwort eines Ensembles von Spin-$\frac{1}{2}$-Kernen wurde mittels standardisierter Spektraldichtematrix-Berechnungen bestimmt, wobei der zeitabhängige MAS-Hamiltonoperator $\hat{\mathcal{H}}(t)$ im rotierenden Koordinatensystem wie bereits definiert (Gl. 3.1) verwendet wurde. Bei der Berechnung der zeitabhängigen Spektraldichte $\rho(t)$ wurde angenommen, daß die Zeitabhängigkeit während der einzelnen Teilintervalle des Pulses vernachlässigt werden kann. Die Annahme ist also, daß sich die Änderung des Resonanz-Offsets aufgrund der Probenrotation nur von einem Intervall zum nächsten äußert. Der gesamte Propagator $\rho(t)$ des Pulses ergibt sich dann aus einem (dem Zeitablauf nach geordneten) Produkt der Propagatoren der einzelnen Zeitintervalle.

Es wurden $\approx$ 33000 Kristallit-Orientierungen verwendet, um das Pulvermittel zu berechnen. Alle numerischen Rechnungen wurden mit dem Programmpaket SPINME durchgeführt. MAS NMR-Experimente an ^{13}C′, ^{15}N-Acetanilid wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt, wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Der verwendete adiabatische Puls „CaCos“ besitzt einen konstanten Adiabatizitätsfaktor von $Q = 4$. Pulssequenzen zur Untersuchung der Magnetisierungsinversion durch einen adiabatischen Puls sind in Abb. 5.1A bzw. zur Charakterisierung der Effizienz eines REDOR-Experimentes mit einem adiabatischen Inversionspuls in Abb. 5.1B dargestellt.

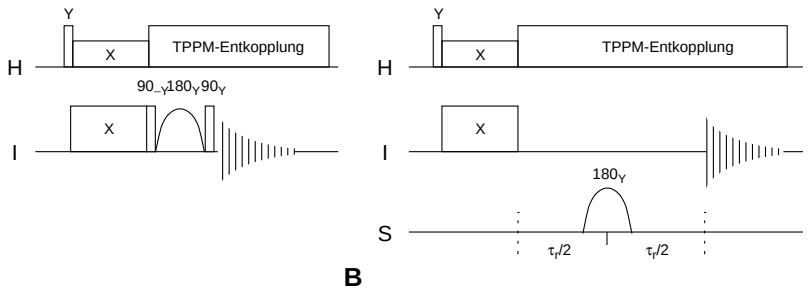

Abbildung 5.1:
(A) CPMAS-Pulssequenz zur Untersuchung der Effizienz adiabatischer Pulse. (B) REDOR-Sequenz mit einer Rotorperiode und einem adiabatischen Inversionspuls in der Mitte der Rotorperiode.

5.3 Inversion der Magnetisierung

In simulierten Spektren eines Spin-$\frac{1}{2}$-Ensembles wird, beginnend mit der Spektraldichte im thermischen Gleichgewicht $\rho(0) = I_z$, die Inversionscharakteristik des jeweilig verwendeten Pulses durch einen idealen 90°-Puls beobachtbar gemacht. Zunächst wurden numerische Simulationen adiabatischer Pulse unter statischen Bedingungen und unter Vernachlässigung der chemischen Verschiebungsanisotropie durchgeführt. Aus diesen Simulationen wurde deutlich, daß sich unter Verwendung einer Durchstimmbreite von 80 kHz für ^{13}C′ (ν_0 = 125 MHz, Bereich der chemischen Verschiebung: $+20 \ldots -20$ kHz) eine ausreichende Bandbreite ergibt, innerhalb derer $>$ 95% Inversion erreicht wird (Spektren nicht gezeigt). Die Durchstimmbreite der adiabatischen Pulse wurde daher im folgenden auf 80 kHz beschränkt ($+40 \ldots -40$ kHz).

In Abb. 5.2 sind simulierte Spektren nach Anwendung verschiedener Inversionspulse dargestellt. Zum Vergleich wurde auch die Pulsantwort nach einem 180°-Rechteckpuls von 8 μs

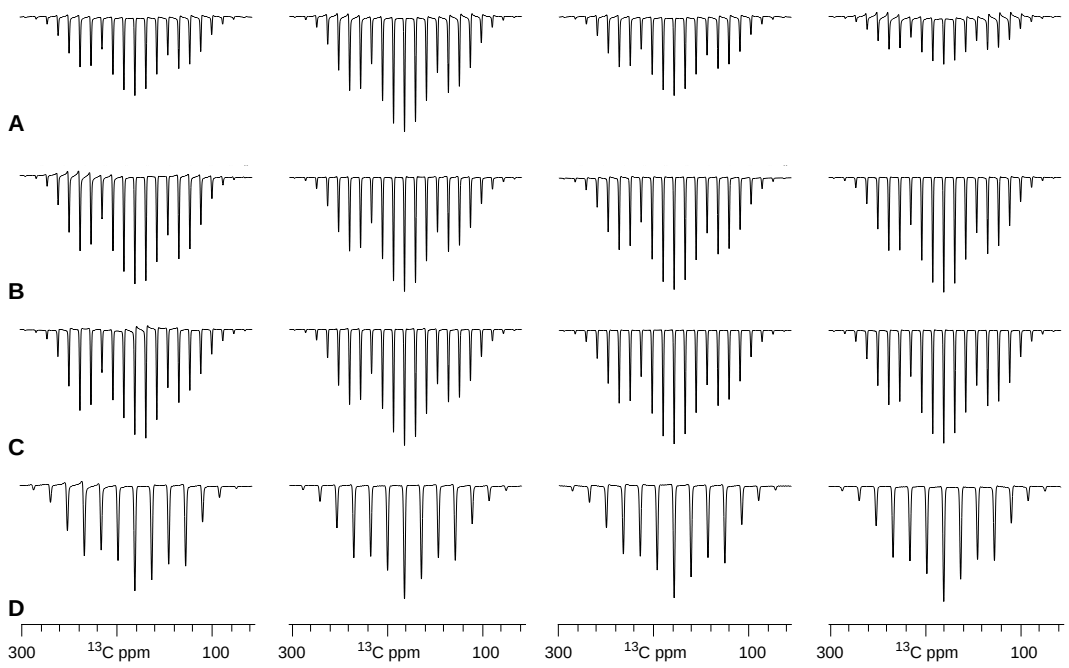

Abbildung 5.2:

Simulierte Spektren nach Anwendung verschiedener Inversionspulse auf eine I_z-Startmagnetisierung bei unterschiedlichen HF-Feldstärken (von links nach rechts). Die Feldstärken sind in relativen Sendeverstärker-Leistungsniveaus angegeben, die MAS-Rotationsfrequenzen sind ν_r = 1300 Hz (A–C) und 2000 Hz (D). (A) Rechteckiger 180°-Puls von 8 μs Länge bei Leistungsniveaus von $+2$, 0 (ideal, 62.5 kHz γB_1), -2 und -4 dB; (B) 80 kHz überstreichender adiabatischer Puls von 120 μs Länge bei -2, 0 (minimales Schwellenniveau, 31.3 kHz γB_1), $+2$ und $+6$ dB; (C) 80 kHz überstreichender adiabatischer Puls von 200 μs Länge bei -2, 0 (minimales Schwellenniveau, 24.9 kHz γB_1), $+2$ und $+6$ dB; (D) wie (B), allerdings bei ν_r = 2000 Hz. In den Simulationen wurden ω_0 = 125 MHz und CS Tensor-Parameter von (σ_{11}, σ_{22}, σ_{33}) = (90 ppm, 175 ppm, 248 ppm) benutzt.

Länge berechnet. Um die Verwendbarkeit adiabatischer Pulse bei einer inhomogenen Verteilung des HF-Feldes zu demonstrieren, wurden die Berechnungen für verschiedene HF-Feldstärken durchgeführt. Weiterhin wurde die Rotationsfrequenz ν_{r} variiert (1300 und 2000 Hz), um die Leistungsfähigkeit des adiabatischen Pulses bei verschieden großen Anteilen des Pulses an der Gesamtdauer einer Rotorperiode zu untersuchen. Aus den Spektren ist ersichtlich, daß alle adiabatischen Pulse im Vergleich zum Rechteckpuls eine sehr gute Inversionscharakteristik besitzen. Diese verschlechtert sich lediglich dann, wenn die minimale Schwellenleistung unterschritten wird, die zum Erreichen der adiabatischen Bedingung nötig ist. Selbst bei ν_{r} = 3 kHz zeigte der adiabatische Puls von 120 μs Länge noch ein zufriedenstellendes Inversionsprofil (Spektren nicht gezeigt).

Die Inversionscharakteristik adiabatischer Pulse wurde im Experiment mittels der Pulssequenz in Abb. 5.1A untersucht. Die transversale Magnetisierung nach erfolgter Kreuzpolarisation wird mit einem 4 μs 90°-Puls zur z-Achse gedreht und die I_z-Magnetisierung dann durch den jeweiligen Inversionspuls invertiert. Das Inversionsprofil wird dann nach Einstrahlen eines

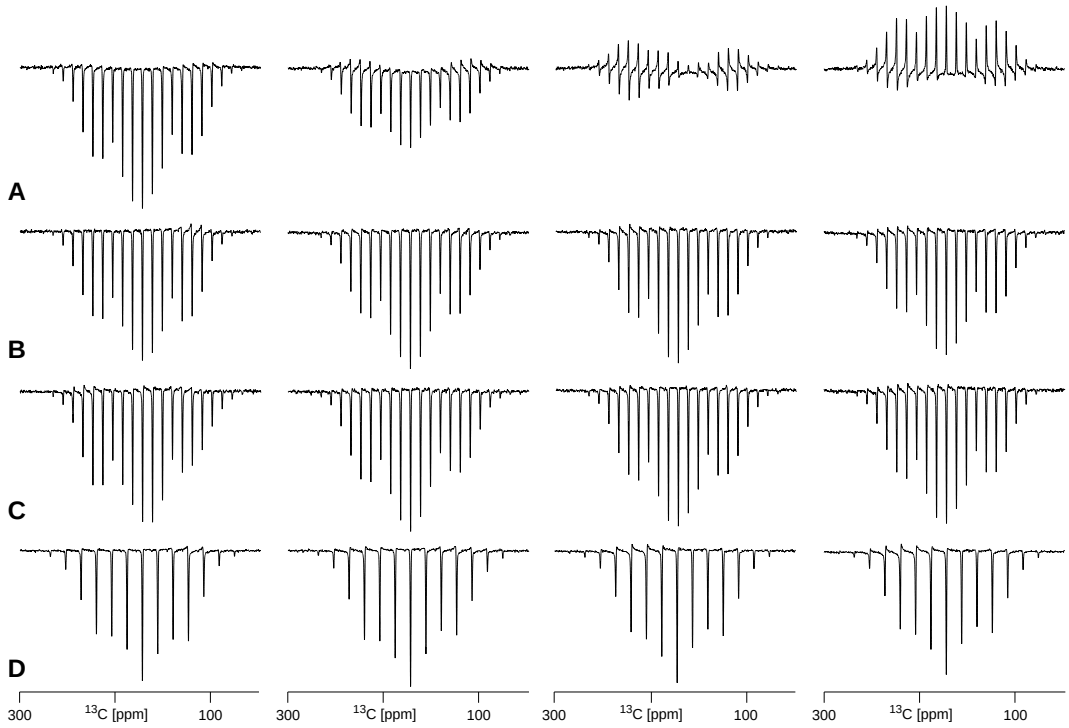

Abbildung 5.3:
^{13}C CPMAS-Spektren von $^{13}C'$, ^{15}N-Acetanilid nach der Pulssequenz in Abb. 5.1A unter Verwendung verschiedener Inversionspulse und bei unterschiedlichen HF-Feldstärken (von links nach rechts). Die MAS-Rotationsfrequenzen sind ν_r = 1300 Hz (A–C) und 2000 Hz (D). (A) Rechteckpuls von 8 μs Länge, bei Sendeverstärker-Leistungsniveaus von 0 (ideal, 62.5 kHz γB_1), -2, -4 und -6 dB; (B) 80 kHz überstreichender adiabatischer Puls von 120 μs Länge bei -2, 0 (minimales Schwellenniveau, 31.3 kHz γB_1), $+2$, $+4$ und $+6$ dB; (C) 80 kHz überstreichender adiabatischer Puls von 200 μs Länge bei -2, 0 (minimales Schwellenniveau, 24.9 kHz γB_1), $+2$, $+4$ und $+6$ dB; (D) wie (B), allerdings bei ν_r = 2000 Hz. Alle Spektren wurden mit 16 Wiederholungen, 64 s Wiederholzeit und 1 ms Kreuzpolarisation aufgenommen.

weiteren 90°-Pulses beobachtet. In Abb. 5.3 sind die resultierenden ^{13}C CPMAS-Spektren von Acetanilid unter Verwendung der gleichen Inversionspulse wie in Abb. 5.2 dargestellt. Experimentell bedingt wurden allerdings etwas unterschiedliche Verstärkerniveaus benutzt. Generell zeigte sich, daß die durch einen adiabatischen Puls invertierten Spektren nicht ganz frei von leichten Phasenfehlern waren, die allerdings auch bei einem perfekt eingestellten 180°-Rechteckpuls auftraten. Die große Überlegenheit der adiabatischen Pulse ist aber deutlich erkennbar – eine zeitraubende Kalibrierung von Pulsbreiten kann entfallen, sobald der minimale Schwellenwert für H_1 erreicht ist, bei dem die adiabatische Bedingung erfüllt ist.

In Abb. 5.4 ist am Beispiel des adiabatischen Pulses mit 120 μs Länge ein Inversionsprofil als Funktion des Transmitter-Offsets dargestellt ($+20 \ldots -20$ kHz). Die Inversionsbandbreite einfacher Rechteckpulse ist im wesentlichen durch die eingestrahlte HF-Energie $\hbar\gamma B_1$ beschränkt. Unter Anwendung adiabatischer Pulse ist es allerdings möglich, eine wesentlich größere Inversionsbandbreite mit der typischerweise vorhandenen Verstärkerleistung zu erhalten.

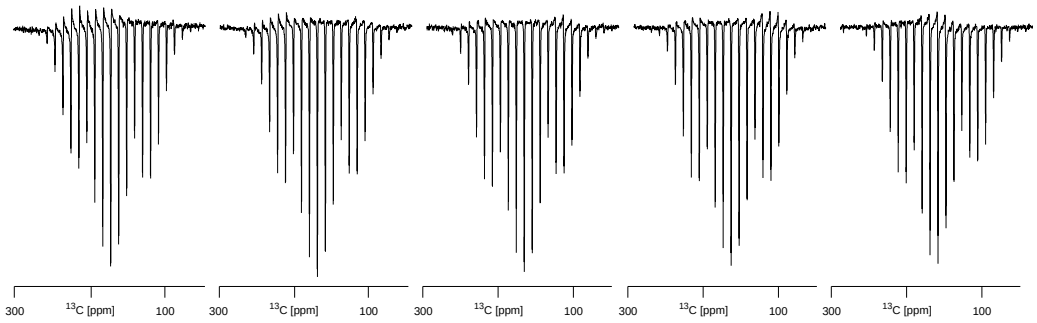

Abbildung 5.4:
^{13}C CPMAS-Spektren von $^{13}C'$, ^{15}N-Acetanilid nach der Pulssequenz in Abb. 5.1A unter Verwendung eines 80 kHz überstreichenden adiabatischen Pulses von 120 μs Länge in Abhängigkeit vom Frequenz-Offset des Inversionspulses. Von links nach rechts: -20, -10, 0, $+10$, $+20$ kHz. Die Spektren wurden bei ν_r = 1300 Hz mit 16 Wiederholungen, 64 s Wiederholzeit und 1 ms Kreuzpolarisation aufgenommen.

5.4 REDOR mit adiabatischen Inversionspulsen

Wie bereits in Abschnitt 2.1.1 gezeigt wurde, ist besonders das REDOR-Experiment sehr von der Homogenität des HF-Feldes abhängig. Daher wurde untersucht, welches Potential adiabatische Pulse bei der Verwendung in einem REDOR-Experiment besitzen. Hierzu wurden ^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren an ^{13}C′, ^{15}N-Acetanilid aufgenommen (siehe auch Abschnitt 3.3.1). Es wurde eine Rotorperiode Dephasierungszeit benutzt und als Dephasierungspuls entweder ein 8 μs Rechteckpuls oder ein 120 μs adiabatischer Puls mit 80 kHz Durchstimmbreite verwendet (Abb. 5.1B). Das Verstärkerniveau wurde wiederum variiert, um ein inhomogenes HF-Feld zu simulieren (Abb. 5.1). Wie zu erwarten war, zeigten die Intensitäten der Rotationsseitenbanden in den dephasierten REDOR-Spektren eine wesentlich geringere Abweichung von der idealen Intensitätsverteilung, wenn der adiabatische Inversionspuls statt des Rechteckpulses verwendet wurde. Die Intensitätsverteilung entspricht ebenso der Orientierung des ^{15}N-^{13}C-Bindungsvektors relativ zum ^{15}N CS-Tensor, die bereits in Abschnitt 3.3.1 bestimmt wurde. Dies trifft für die Intensitätsverteilung unter nicht-optimaler Einstellung des Rechteckpulses nicht zu. Auch wäre eine REDOR-Abstandsbestimmung in diesem Fall sehr ungenau – es würde ein zu großer Abstand bestimmt, da die Gesamtintensität aller Seitenbanden für inkorrekte bzw. inhomogen verteilte 180°-Pulslängen deutlich ansteigt.

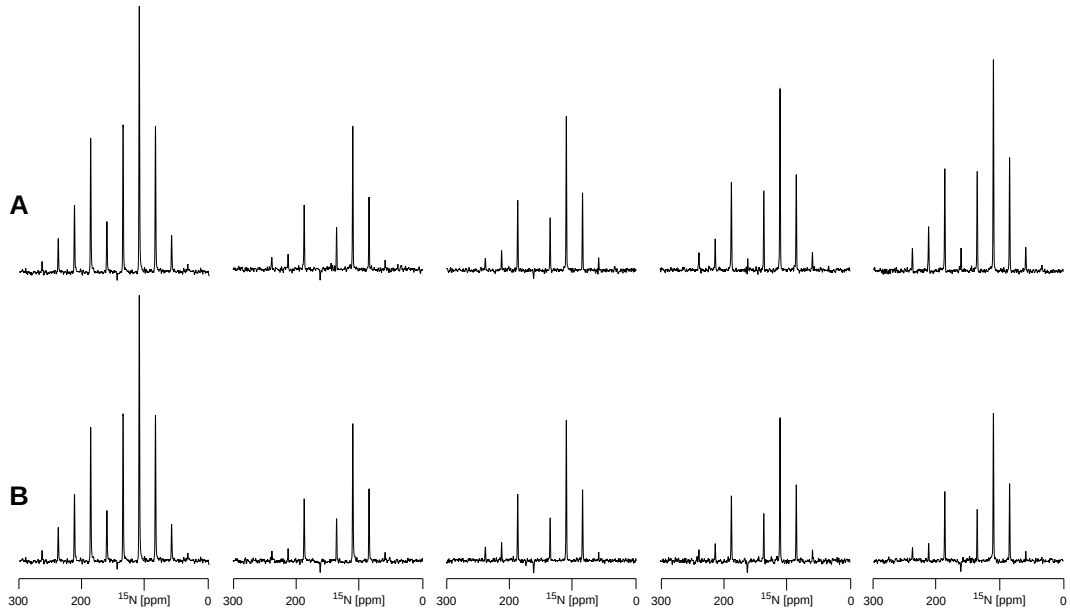

Abbildung 5.5:
^{15}N-^{13}C-REDOR-Spektren von $^{13}C'$, ^{15}N-Acetanilid unter Verwendung der Pulssequenz in Abb. 5.1B in Abhängigkeit vom Sendeverstärker-Leistungsniveau. Von links nach rechts: CPMAS-Spektrum ohne Rückkopplungspuls (ganz links) und Spektren mit dipolarer Rückkopplung unter Verwendung (A) eines Rechteckpulses von 8 μs Länge und Leistungsniveaus von 0 (ideal, 62.5 kHz γB_1), -2, -4 und -6 dB; (B) eines 80 kHz überstreichenden adiabatischen Pulses von 120 μs Länge und Leistungsniveaus von -2, 0 (minimales Schwellenniveau, 31.3 kHz γB_1), $+2$, $+4$ und $+6$ dB. Die Spektren wurden mit 128 Wiederholungen, 64 s Wiederholzeit und 1 ms Kreuzpolarisation aufgenommen.

In REDOR-Experimenten sollte die Pulslänge der 180°-Dephasierungspulse mittels der REDOR-Pulssequenz selbst kalibriert werden (minimales Signal bei korrekter Einstellung). Die Beobachtung eines möglichst kleinen Signals ist jedoch in Fällen geringer Probenkonzentration u. U. sehr schwierig und zeitaufwendig. Adiabatische Pulse besitzen diesen Nachteil nicht, da sie korrekt arbeiten, solange das minimale Schwellenniveau erreicht bzw. überschritten ist. Es ist somit demonstriert, daß die Verwendung adiabatischer Pulse als Dephasierungspulse in REDOR-Experimenten Vorteile besitzt, indem mögliche Effekte durch Inhomogenitäten im HF-Feld bzw. nicht optimal eingestellte Pulslängen vermieden werden.

Kapitel 6

Orientierung von Chrysospermin C relativ zur Lipidmembran

Um die Orientierung von Chrysospermin C (CSC) relativ zur Lipid-Membranoberfläche zu bestimmen, wurde CSC in scheibchenförmige Lipid/Detergens (DMPC/DHPC)-Aggregate „Bizellen“ eingebracht. Im folgenden soll die mittlere Ausrichtung der CS-Tensoren von ^{15}N und ^{13}C relativ zur Feldrichtung aus der Position der Linien im orientierten Spektrum relativ zur jeweiligen isotropen chemischen Verschiebung ermittelt werden. Aus diesen Informationen lassen sich Rückschlüsse auf die Orientierung der CSC-Moleküle relativ zur Membranoberfläche ziehen, wenn die Orientierung der CS-Tensoren relativ zu den Molekülkoordinaten bekannt ist. Letztere Daten wurden in den vorangegangenen Kapiteln 3.4 bzw. 4 für Aib bereits ermittelt. Redundante Informationen kann man aus der skalierten ^{15}N-^{1}H dipolaren Kopplung gewinnen, die Aussagen über die Orientierung der NH-Bindungsvektoren relativ zur Membranoberfläche erlaubt.

6.1 Magnetische Ausrichtung von Bizellen

6.1.1 Modell einer Peptidhelix in einer Bizelle

In den hier vorgestellten Untersuchungen wurden die ^{15}N-^{1}H dipolare Kopplung sowie die chemische Verschiebung von Amid-^{15}N- bzw. Carbonyl-^{13}C-Kernen in selektiv ^{13}C, ^{15}N-markiertem CSC in DHCP/DMPC-Bizellen bestimmt. Hierbei hängt die ^{15}N-^{1}H dipolare Kopplung von der Orientierung des ^{15}N-^{1}H-Bindungsvektors relativ zum externen Magnetfeld $\vec{B}_0$ ab, während die chemische Verschiebung von ^{15}N bzw. ^{13}C von der Orientierung des jeweiligen CS-Tensors relativ zu $\vec{B}_0$ abhängt. In diese NMR-Spektralparameter gehen sowohl Orientierung und Bewegung der ganzen Bizelle ein als auch Orientierung und Bewegung des Moleküls innerhalb der bizellaren Umgebung. Um die Beweglichkeit der Lipidkette unter Einfluß eingebrachter „Fremd“moleküle zu untersuchen, bietet es sich an, den Wasserstoff dort durch Deuterium zu ersetzen und die ^{2}H -Quadrupolaufspaltung entlang der Lipidkette zu messen.

In Bizellen, die erst oberhalb der Gel/Flüssigkristall-Übergangstemperatur von $T_{\mathrm{m}} \approx 23$ °C entstehen, sind die Phospholipide, eingebrachte Peptidmoleküle sowie die gesamte Bizelle in stetiger, schneller Bewegung ($\approx 10^7$–10^{10} s^{-1}) durch Lateral- und Rotationsdiffusionsprozesse (Seelig, 1977; Seelig, 1978). Außerdem können oszillatorische Winkelabweichungen der Lipid- und Peptidmoleküle von deren mittleren Ausrichtung auftreten. Solange alle diese Bewegungen schneller als die jeweils beobachtete NMR-Frequenz ablaufen, kann man deren Einfluß auf die NMR-Parameter in Form von Ordnungsparametern S beschreiben, ähnlich wie sie für die Notation statischer Orientierungen verwendet werden (Seelig, 1977; Seelig, 1978). Es soll nun ein vereinfachtes Modell eingeführt werden, in dem jeder auftretenden mittleren Orientierung und Bewegung ein eigener, getrennter Ordnungsparameter zugeordnet wird (Abb. 6.1).

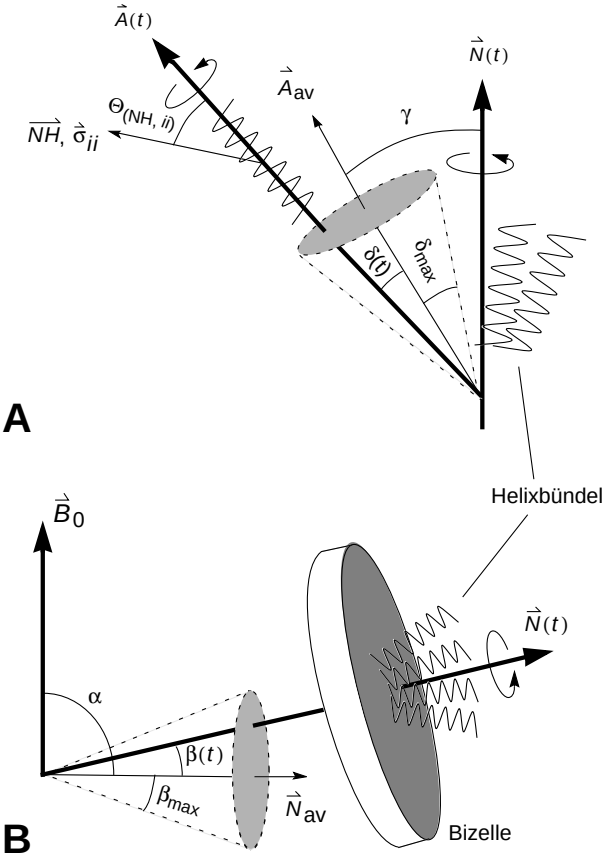

Abbildung 6.1:
Vereinfachtes Modell möglicher Bewegungsfreiheitsgrade einer N-H-Bindung bzw. eines CS-Tensors in einer Peptidhelix, die in eine magnetisch ausgerichtete Bizelle eingebettet ist. (A) Die mittlere Richtung der Helixachse $\vec{A}_{av}$ steht im Winkel γ relativ zur momentanen Bizell-Flächennormalen $\vec{N}(t)$ und (B) die mittlere Richtung der Bizell-Flächennormalen $\vec{N}_{av}$ steht im Winkel α relativ zum externen Magnetfeld $\vec{B}_0$. Die momentane Orientierung der Helixachse $\vec{A}(t)$ ist durch den Winkel $\delta(t)$ charakterisiert (A) und die momentane Orientierung der Bizell-Flächennormalen $\vec{N}(t)$ durch $\alpha + \beta(t)$ (B). Die grauen Konusse repräsentieren eine mögliche „taumelnde“ Bewegung der Helixachse/Bizell-Flächennormale, welche durch die maximalen Öffnungswinkel δ_{max} bzw. β_{max} charakterisiert sind.

In diesem Modell wird angenommen, daß sich die Peptidhelix und mit ihr der NH-Bindungsvektor bzw. die CS-Tensoren schnell um die Helixachse drehen, wobei Θ_{NH} bzw. Θ_{ii} die Winkel zwischen NH-Bindung bzw. der Hauptachsen des ^{15}N CS-Tensors und der Helixachse sind. Hinzu kommt eine mögliche oszillierende Abweichung der Helixachse $\vec{A}(t)$ mit Maximalamplitude δ_{max} von ihrer mittleren Richtung $\vec{A}_{\mathrm{av}}$. Die mittlere Orientierung der Peptidhelix, die hier von besonderem Interesse ist, wird durch den Winkel γ zwischen der mittleren Helixachse und der momentanen Bizell-Flächennormalen $\vec{N}(t)$ beschrieben. Der Winkel zwischen $\vec{N}(t)$ und dem Magnetfeld $\vec{B}_0$ ist $\alpha + \beta(t)$, da die Bizelle als Ganzes ebenfalls „Taumelbewegungen“ ausführt (Sanders *et al.*, 1994). Im hier untersuchten Fall ist α = 90°, da die

Anisotropie des diamagnetischen Suszeptibilitätstensors der DMPC-Moleküle dazu führt, daß in der energetisch bevorzugten Orientierung der DMPC-Moleküle und somit der Bizellen die Bizell-Flächennormale senkrecht zum Magnetfeld steht (Sanders *et al.*, 1994). Zudem wird davon ausgegangen, daß die Bizellen auch schnell um ihre Flächennormale rotieren (Howard & Prestegard. 1996).

Die Skalierung der Wechselwirkungstensoren durch Ausmittelung aufgrund verschiedener Orientierungen und Bewegungsprozessen kann mittels einer Transformation vom Koordinatensystem des Tensors (z. B. des CS-Tensors) in das Laborsystem des externen Magnetfelds bestimmt werden. Diese Transformationen können in Form von Ordnungsparametern ausgedrückt werden, wenn die beteiligten Bewegungsprozesse schneller als die inverse Stärke der magnetischen Kernwechselwirkungen ablaufen. Der Ordnungsparameter des Gesamtsystems S_{tot} kann dann geschrieben werden (Saupe, 1964; Seelig, 1977):

$$S_{\text{tot}} = \underbrace{\left(\frac{3\cos^2\alpha-1}{2}\right)\left\langle\frac{3\cos^2\beta(t)-1}{2}\right\rangle}_{S_{\text{sys}}}\underbrace{\left(\frac{3\cos^2\gamma-1}{2}\right)}_{S_{\text{tilt}}}\underbrace{\left\langle\frac{3\cos^2\delta(t)-1}{2}\right\rangle}_{S_{\text{mol}}}\left(\frac{3\cos^2\Theta_{\text{NH},ii}-1}{2}\right) \tag{6.1}$$

Die Klammerung $\langle\ \rangle$ bezeichnet eine Zeitmittelung. Der erste Term im Ordnungsparameter der Bizellen S_{sys} ist $-1/2$, da $\alpha = 90°$ bekannt ist. Die Ordnungsparameter der Helix, S_{tilt} und S_{mol}, können hier nicht getrennt bestimmt werden und liefern einen gemeinsamen Satz erlaubter Orientierungen bzw. maximaler Winkel der Auslenkung der Helices von der Bizellnormalen. Solange diese Bewegungen schneller ablaufen als die inverse Stärke der Wechselwirkungen der Kernspins, kann man die Zeitmittel in Gl. 6.1 durch gewichtete Mittel über alle möglichen δ bzw. β ersetzen: $\langle f(\delta)\rangle = \int F(\delta)f(\delta)\,d\delta$, wobei $F(\delta)$ die Gewichtsfunktion ist, die die räumliche Verteilung von δ beschreibt. Sie ist durch das Verhältnis vom Umfang $2\pi\sin\delta$ des Konus in Abb. 6.1A zu dessen Oberfläche $2\pi\int_0^{\delta_{\max}}\sin\delta\,d\delta$ gegeben. Somit kann S_{mol} geschrieben werden als:

$$S_{\text{mol}} = \left\langle\frac{3\cos^2\delta(t)-1}{2}\right\rangle = \left[\int_0^{\delta_{\max}}\sin\delta\,d\delta\right]^{-1}\cdot\int_0^{\delta_{\max}}\frac{1}{2}(3\cos^2\delta-1)\sin\delta\,d\delta \tag{6.2}$$

Die beobachtete chemische Verschiebung σ_{obs} und die ^{15}N-^{1}H dipolare sowie ^{13}C-^{2}H quadrupolare Aufspaltung $\Delta\nu_{\text{obs}}$ bzw. $\Delta\nu_{\text{q}}$ sind dann gegeben durch (Sanders *et al.*, 1994):

$$\sigma_{\text{obs}} = \sigma_{\text{iso}} + \frac{2}{3}S_{\text{sys}}S_{\text{tilt}}S_{\text{mol}}\sum_{i=1}^{3}\sigma_{ii}\frac{1}{2}(3\cos^2\Theta_{ii}-1) \tag{6.3}$$

$$\Delta\nu_{\text{obs}} = \nu_{\|}S_{\text{sys}}S_{\text{tilt}}S_{\text{mol}}(3\cos^2\Theta_{ii}-1) \tag{6.4}$$

$$\Delta\nu_{\text{q}} = \frac{3e^2qQ}{2h}S_{\text{sys}}S_{\text{CD}} \tag{6.5}$$

wobei $\nu_{\|} = (\mu_0/4\pi)\gamma_{\text{N}}\gamma_{\text{H}}h/(4\pi^2r_{\text{NH}}^3)$ die ^{15}N-^{1}H dipolare Kopplungskonstante ist, die aus der Entfernung r_{NH} der beiden Kerne berechnet werden kann, und $3e^2qQ/(2h)$ ist die statische quadrupolare Kopplungskonstante mit dem maximalen elektrischen Feldgradienten $eq = V_{zz}$ und dem Quadrupolmoment Q. S_{CD} in Gl. 6.5 ist ein Ordnungsparameter für eine ^{13}C-^{2}H-Bindung

in der Acylkette eines deuterierten DMPC-Moleküls, der sowohl die lokale Flexibilität der Lipidkette berücksichtigt als auch die Orientierung und Bewegung des ganzen Moleküls. Die einzigen Parameter, die in Gleichungen 6.3–6.5 nicht direkt experimentell bestimmbar sind, sind $S_{\text{tilt}}S_{\text{mol}}$ – die maximale Auslenkung und mittlere Orientierung der Peptidhelices. Der Ordnungsparameter S_{sys} kann aus ^{31}P-Messungen der Lipidkomponente der Bizellen bestimmt, Θ_{NH} für eine ideale α-Helix abgeschätzt und σ_{obs} sowie $\Delta\nu_{\text{obs}}$ aus den Spektren des Peptids in orientierten Bizellen abgelesen werden. Die CS-Tensorparameter σ_{iso} und σ_{ii} wurden bereits in Kapitel 4 bestimmt, während die Winkel Θ_{ii} relativ zur Helixachse aus den ebenfalls in Kapitel 4 bestimmten Winkeln relativ zur Peptidebene umgerechnet werden können, wenn man eine α-helikale Struktur von Chrysospermin C (Anders *et al.*, 2000) zugrunde legt.

6.1.2 Ordnungsparameter der Bizellen

In Übereinstimmung mit Ergebnissen in der Literatur (Sanders & Schwonek, 1992) konnten bei 40 °C und einem DHPC:DMPC-Verhältnis von 1:3 sowie einem Peptid:Lipid-Verhältnis von 1:50 Bizellen erhalten werden, die sich spontan im Magnetfeld ausrichteten. Unter diesen Bedingungen wurden getrennte ^{31}P-Signale für DHPC und DMPC beobachtet, da DHPC hauptsächlich den Rand der Bizellen ausbildet, daher im Mittel nicht so stark zum Magnetfeld ausgerichtet ist wie DMPC, weswegen die chemische Verschiebung von DHPC näher an σ_{iso} liegt als die von DMPC (Abb. 6.2C). Die Signale in der Nähe von σ_{iso} legen nahe, daß ein kleiner Anteil des Lipids isotroper Bewegung unterworfen ist, möglicherweise in Form gemischter DHPC/DMPC- oder DMPC/lyso-DMPC-Mizellen . Da das ^{15}N-Signal des selektiv markierten Chrysospermins allerdings keinen Signalanteil bei σ_{iso} zeigte (siehe Abb. 6.3, S. 77), kann davon ausgegangen werden, daß das CSC zum überwiegenden Anteil in den orientierten Bizellen eingebunden war. Bei Voruntersuchungen mit Bizellen verschiedener DHPC:DMPC-verhältnisse waren solche Signale nicht aufgetreten. Daher ist es möglich, daß deren Auftreten von der Vorgeschichte bzw. dem Herstellungsprozeß abhängt (Sternin *et al.*, 2000, siehe auch Abschnitt 2.4).

$$S_{\text{sys}} = -\frac{1}{2}\frac{\sigma_{\text{aniso,obs}}}{\sigma_{\text{aniso},\perp}} = -\frac{1}{2}\frac{\sigma_{\text{obs}} - \sigma_{\text{iso}}}{\sigma_{\perp} - \sigma_{\text{iso}}} \tag{6.6}$$

Der Ordnungsparameter des Bizellsystems S_{sys} kann entweder über die dipolare ^{13}C-^{31}P-Kopplung (Sanders, 1993) oder über die beobachtete, orientierte ^{31}P chemische Verschiebung σ_{obs} der Kopfgruppe von DMPC gemessen werden. Letzterer Ansatz wurde hier gewählt, wobei σ_{obs} mit der isotropen chemischen Verschiebung σ_{iso} (Abb. 6.2B) und der chemischen Verschiebung $\sigma_{\text{aniso},\perp}$ derjenigen Spins in Relation gesetzt wird, deren CS-Tensorkomponente σ_{33} senkrecht zum Magnetfeld ausgerichtet ist (Sanders *et al.*, 1994):

Die orientierte ^{31}P chemische Verschiebung σ_{obs} der Lipidkopfgruppe ist allerdings auch durch Bewegungen der einzelnen Lipidmoleküle bestimmt. Daher muß $\sigma_{\perp}$ aus einem Pulverspektrum von DMPC gewonnen werden, welches bei derselben Temperatur aufgenommen wurde wie das Spektrum der orientierten Bizellen, also bei 40 °C (Abb. 6.2A). In diesem Fall heben

sich die Anteile der Einzelmolekülbewegung in $\sigma_{\text{aniso,obs}}$ und $\sigma_{\text{aniso},\perp}$ auf. Für σ_{obs}, σ_{iso} und $\sigma_{\perp}$ wurden Werte von -11.5 ppm, -1 ppm und -16 ppm gemessen. Der Ordnungsparameter der Bizellen (Gl. 6.6) beträgt somit -0.35 ± 0.02.

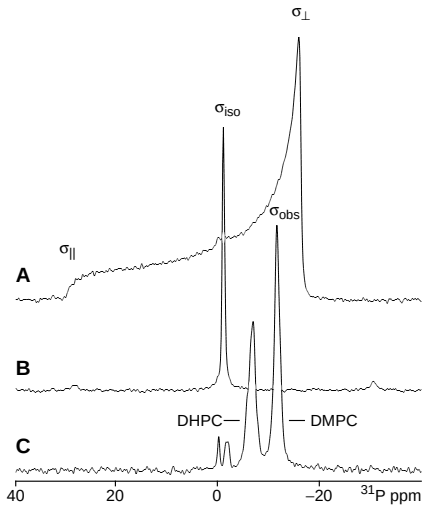

Abbildung 6.2:
^{31}P-Spektren der Phospholipid-Kopfgruppen bei 40 °C. (A) Pulverspektrum von reinen DMPC-Liposomen, $\sigma_{||}$ = +29 ppm, $\sigma_{\perp} = -16$ ppm. (B) Isotropes Spektrum der Probe aus (A) unter 6 kHz MAS, $\sigma_{iso} = -1$ ppm. (C) Spektrum orientierter Bizellen mit CSC, DHPC:DMPC = 1:3, CSC:Lipid = 1:50, σ_{obs}(DMPC) = −11.5 ppm.

Die ^{31}P-Spektren einer Bizell-Probe mit einem 1:200 Peptid:Lipid-Verhältnis (unmarkiertes CSC) sowie einer reinen Bizell-Probe ohne CSC zeigten im Rahmen des Meßfehlers keine signifikante Abweichung der chemischen Verschiebung im Vergleich zur 1:50-Probe. Eine 1:20-Probe hingegen zeigte mit $\sigma_{\text{obs}} = -9.0$ eine deutliche Abweichung. Hieraus kann vermutet werden, daß ab einem DHPC:DMPC-Verhältnis von 1:50 keine nennenswerten Veränderungen der Lipiddoppelschicht der Bizellen auftreten.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von CSC auf die Lipidschicht wurden ^{2}H Quadrupolecho-Experimente durchgeführt, da in den Proben DMPC im Verhältnis von 1:40 gegen Ketten-teildeuteriertes DMPC(d27) ersetzt worden war (s. Abschnitt 2.4). Die ^{2}H-Spektren (hier nicht abgebildet), sowohl mit als auch ohne CSC, waren praktisch identisch und zeigten gut aufgelöste Signale der ^{2}H-Kerne entlang der Lipidkette, was ein weiteres Indiz für das Vorhandensein gut orientierter Bizellen ist (Sanders & Schwonek, 1992). Die Quadrupolaufspaltungen betrugen zwischen 3 und 20 kHz. Daraus und aus den ^{31}P-Resultaten läßt sich schließen, daß orientierte Bizellen vorliegen, in denen DMPC eine typische Doppelschicht ausbildet.

Um die Effekte der Ausrichtung im Magnetfeld auf die Wechselwirkungstensoren zu maximieren, wäre es erstrebenswert, die Bizellen mit ihrer Flächennormalen parallel statt senkrecht zum Magnetfeld auszurichten, wie es z. B. beim Orientieren von Lipiddoppelschichten zwischen Glasplatten Praxis ist (Opella *et al.*, 1987). In diesem Fall ($\alpha = 0$, Abb. 6.1) ist z. B. die dipolare Kopplung doppelt so groß wie bei $\alpha = 90$. Solch eine Ausrichtung der Bizellen ließe sich z. B. durch Hinzugabe von Lanthanid-Ionen erreichen (Prosser *et al.*, 1996; Prosser *et al.*, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich dieser Ansatz auch für die Gewinnung der hier benötigten ^{31}P- und ^{15}N-Spektren verwenden läßt. Es wurden Bizell-Lösungen hergestellt, die verschiedene Lanthanidionen (Eu^{3+}, Er^{3+}, Tm^{3+}, Yb^{3+}, jeweils im Ion:Lipidmolekül-Verhältnis von 1:10) enthielten. In ^{2}H-Spektren von hinzugemischtem, Ketten-teildeuteriertem DMPC konnte für Eu^{3+}, Er^{3+} und Tm^{3+} eine Verdoppelung der Quadrupolaufspaltung beob-

achtet werden (Spektren nicht gezeigt). Die ^{31}P-Spektren waren allerdings sowohl extrem verbreitert ($\approx$ 40 ppm Linienbreite statt der üblichen 1–2 Hz) als auch verschoben (DHPC: ca. -30 ppm, DMPC: ca. -100 ppm, je nach Lanthanid), so daß eine Bestimmung des Ordnungsparameters der Bizellen nicht mehr möglich war (Spektren nicht gezeigt). Die Linienverbreiterung und -verschiebung war für Thulium am stärksten und für Europium am geringsten. Das ^{15}N-Signal von selektiv markiertem CSC, welches in Bizellen unter Einfluß von Eu^{3+} eingebracht wurde, konnte nicht mehr beobachtet werden, auch nicht unter Verwendung von Chelatbildnern, die die Lanthanidionen von der Lipidschicht fernhalten sollen (Prosser *et al.*, 1999). Vermutlich war der Effekt der Linienverbreiterung immer noch zu stark, so daß das ohnehin schwache ^{15}N-Signal nicht mehr detektiert werden konnte. Von einer weiteren Verwendung von Lanthanidsalzen wurde daher abgesehen.

6.2 Orientierung von Chrysospermin C relativ zur Membranoberfläche

6.2.1 ^{15}N chemische Verschiebung in Bizellen

Abbildung 6.3A zeigt das isotrope ^{15}N-Spektrum des selektiv markierten CSC in DMPC-Liposomen unter MAS-Bedingungen (ν_r = 10 kHz). In orientierten DHPC/DMPC-Bizellen kann man eine Verschiebung der ^{15}N-Signale in Richtung der zum Feld senkrechten Komponente $\sigma_\perp$ des ^{15}N CS-Tensors beobachten (Abb. 6.3B). Hieraus kann bereits qualitativ geschlossen werden, daß die mittlere Richtung der Rotationsachse, also der Helixachse $\vec{A}_{av}$, ungefähr senkrecht zum Magnetfeld sein muß und somit parallel zur Flächennormalen der Bizellen.

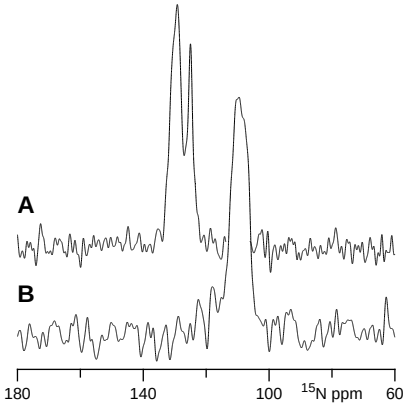

Abbildung 6.3:
^{15}N-Spektren von Chrysospermin C bei 40 °C unter Festkörper-Bedingungen. (A) ^{15}N CPMAS-Spektrum von CSC in DMPC-Liposomen, ν_r = 10 kHz, 1000 Wiederholungen. (B) ^{15}N-Spektren von CSC in orientierten Bizellen, 32000 Wiederholungen. Die Kreuzpolarisationszeit betrug für beide Spektren 200 μs.

Die einzelne Hochfeld-verschobene, isotrope ^{15}N Amid-Resonanz bei 125 ppm (Abb. 6.3A) konnte unter MAS mit Hilfe eines ^{15}N-^{13}C-REDOR-Experiments der Aminosäure Aib10 zugeordnet werden, da nur dieses eine starke ^{15}N-^{13}C-Einbindungskopplung zusätzlich zur *intra*-Rest-Zweibindungskopplung zeigt. Die Signale von Aib9 und Aib13 überlappten zu stark, so daß eine weitere Zuordnung, z. B. basierend auf der in einer α-Helix für Aib9 erwarteten Kopplung zwischen dessen Amid-Stickstoff und dem markierten Carbonylkern von Aib13, nicht

möglich war. Eine Zuordnung der Amidresonanzen im orientierten Spektrum war ebenfalls nicht möglich, weswegen für die drei Resonanzen eine mittlere isotrope chemische Verschiebung von 128.4 $\pm$ 3 ppm und eine mittlere orientierte chemische Verschiebung von 110 $\pm$ 3 ppm angenommen werden mußten. Die recht geringe Dispersion der chemischen Verschiebungen in beiden Spektren stimmt mit dem Modell einer Helix überein, in der die Reste Aib9, 10 und 13 in einer ähnlichen lokalen Konformation vorliegen (alle NH-Bindungsvektoren zeigen ungefähr in Richtung der Helixachse) und die Helixachsen ungefähr in die gleiche Richtung relativ zum Magnetfeld zeigen.

Unter Benutzung der zuvor bestimmten Orientierung des ^{15}N CS-Tensors (Tabelle 4.1) und unter Annahme einer idealen α-Helix sind die Winkel zwischen den Tensorkomponenten und der Helixachse Θ_{11} = 90°, Θ_{22} = 82° und Θ_{33} = 8° (Abb. 6.1A). Über Gl. 6.3 ergibt sich dann aus der beobachteten chemischen Verschiebung von ^{15}N in orientierten Bizellen bzw. in Liposomen unter MAS-Bedingungen eine Abschätzung des Bereichs für $S_{\text{tilt}}S_{\text{mol}}$ = 0.44 …0.70 (Abb. 6.5A). Die Fehlerabweichungen, welche durch experimentelle Ungenauigkeiten und vor allem die beschränkte spektrale Auflösung gegeben sind, wurden hierbei sehr konservativ gewählt.

6.2.2 Skalierte ^{15}N-^{1}H dipolare Kopplung

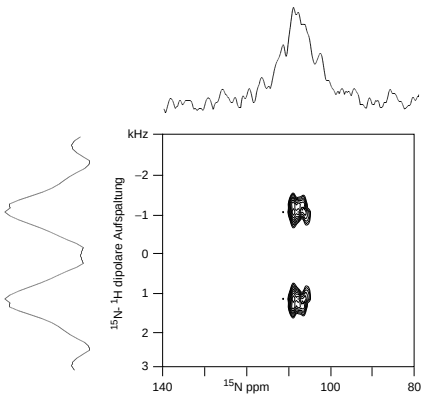

Abbildung 6.4:
Heteronukleares ^{15}N-^{1}H DIPSHIFT-Spektrum von CSC in orientierten Bizellen bei 40 °C, die reduzierte dipolare ^{15}N-^{1}H-Aufspaltung beträgt 2200 Hz. Während der t_1-Evolutionszeit wurde die homonukleare MREV8-Entkopplungssequenz eigestrahlt. Die Kreuzpolarisationszeit betrug 250 μs bei 32 Inkrementen in t_1 sowie 7000 Wiederholungen pro Inkrement bei einer spektralen Weite von 12650 Hz in ν_1.

Die Größe der dipolaren ^{15}N-^{1}H-Kopplung in CSC eingebunden in orientierten Bizellen wurde mit Hilfe eines 2D DIPSHIFT-Experiments bestimmt, ähnlich dem in Abschnitt 4.1.3 verwendeten, hier allerdings unter statischen Bedingungen (Abb. 6.4). Trotz der wie in Abb. 6.3 nicht einzeln aufgelösten Signale ist deutlich zu sehen, daß die dipolaren Aufspaltungen der drei Kerne mit 2200 $\pm$ 200 Hz sehr ähnlich sind. Der Skalierungsfaktor von 0.525 der im DIPSHIFT-Experiment verwendeten, heteronuklearen MREV8-Entkopplungssequenz (Rhim *et al.*, 1973) wurde experimentell aus der C-H-Aufspaltung in Adamantan gewonnen (Spektrum nicht gezeigt). Angewendet auf die in CSC beobachtete Aufspaltung ergibt sich eine effektive dipolare Kopplung von 4190 $\pm$ 380 Hz. Die ^{15}N-^{1}H dipolare Kopplungskonstante $\nu_{||}$ beträgt für einen NH-Abstand von 1.02 Å ca. 11500 Hz mit einer Unsicherheit von $\pm$ 300 Hz aufgrund der verschiedenen in der Literatur zu findenden NH-Abstände (z. B. Opella & Stewart, 1989).

In einer idealen α-Helix beträgt der Winkel zwischen NH-Bindungsvektor und Helixachse ca. Θ_{NH} = 11°. Aus diesen Werten ergibt sich über Gl. 6.4 eine Abschätzung für $S_{\text{tilt}}S_{\text{mol}}$ von 0.41 …0.72 (Abb. 6.5B). Trotz der recht großen möglichen relativen Abweichungen von $S_{\text{tilt}}S_{\text{mol}}$ stimmen die aus der ^{15}N chemischen Verschiebung gewonnenen Werte mit den aus der ^{15}N-^{1}H dipolaren Kopplung gewonnenen gut überein.

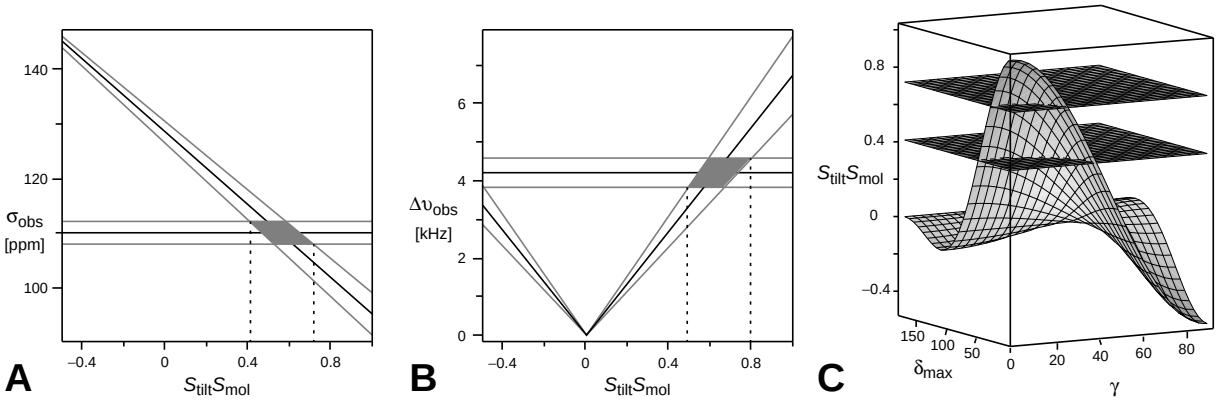

Abbildung 6.5:
Abschätzung der Ordnungsparameter $S_{tilt}S_{mol}$ (A) aus der ^{15}N chemischen Verschiebung σ_{obs} über Gleichung 6.3 bzw. (B) der ^{15}N-^{1}H dipolaren Kopplung $\Delta\nu_{obs}$ über Gl. 6.4. Graue Linien zeigen die maximalen Fehlergrenzen an, die durch die spektrale Auflösung gegeben sind. (C) Abhängigkeit der Ordnungsparameter $S_{tilt}S_{mol}$ vom Kippwinkel γ der Helixachse relativ zur Flächennormalen der Bizelle und vom maximalen Öffnungswinkel δ_{max} einer Taumelbewegung der Helixachse.

6.2.3 Interpretation der Daten

In magnetisch Orientierten Bizellen hängt die große der beobachteten orientierten chemischen Verschiebung bzw. der dipolaren Kopplung von einer Reihe von Parametern ab, die zum Teil nicht getrennt voneinander bestimmbar sind. So läßt sich der Ordnungsparameter der Bizellen aus ^{31}P-Spektren bestimmen; die für die Auswertung der orientierten Verschiebung essentiellen Informationen über Größe und Orientierung des chemischen Verschiebungstensors lassen sich aus Festkörper-NMR-Experimenten gewinnen, wie auch hier gezeigt wurde. Die Orientierung der in die Bizelle eingebrachten Moleküle und eine mögliche Reorientierung der Moleküle um ihre mittlere Ausrichtung lassen sich jedoch nicht experimentell getrennt bestimmen. Abb. 6.5C gibt die Winkelabhängigkeit der miteinander korrelierten Ordnungsparameter S_{tilt} und S_{mol} wieder. (aus Gl. 6.2). Die eingezeichneten Ebenen geben den durch sehr konservativ abgeschätzte experimentelle Fehler bedingten Winkelbereich an, in dem der Kippwinkel der Helix γ und der maximale Öffnungswinkel δ_{max} einer „Taumelbewegung“ der Helixachse liegen können. Alle zwischen den Ebenen liegenden Winkelpaarungen sind erlaubt. Es ergibt sich, daß wenn z. B. die mittlere Helixorientierung parallel zur Flächennormalen der Lipidmembran ist ($\gamma = 0°$), die Helix gleichzeitig eine große Taumelbewegung durchführen muss ($40° \leq \delta_{\text{max}} \leq 60°$), um die in den Experimenten beobachtete Skalierung der Ordnungsparameter zu ermöglichen. Mit

zunehmender Abweichung der mittleren Helixachse von der Flächennormalen braucht die Helix keine so großen Taumelbewegungen mehr zu erfahren – ab einer mittleren Orientierung von ca. $\gamma = 25°$ wird eine solche Bewegung nicht mehr benötigt, um die experimentellen Daten zu erklären. Da es in einem hochflexiblen System wie einer in Bizellen vorliegenden Lipidmembran oberhalb der Gel-Flüssigkristall-Phasenübergangstemperatur ($T = 45$ °C) sehr unwahrscheinlich ist, daß in ihr enthaltene Moleküle keinerlei Taumelbewegungen erfahren, erscheint es sinnvoll, für die mittlere Orientierung der Chrysospermin-Helices ca. 10-25° anzugeben.

Kapitel 7

Struktur von Chrysospermin C in isotropen Bizellen

Um die Struktur eines aus mehreren Einzelmolekülen zusammengesetzten Peptidionenkanals mittels NMR zu bestimmen, können übliche Membran-Modellsysteme wie Detergens-Mizellen (Brown, 1979; Kallick *et al.*, 1995; Vinogradova *et al.*, 1998) nicht verwendet werden, da diese zu klein sind, um mehr als ein Peptidmolekül gleichzeitig aufzunehmen. Daher wurden bislang lediglich Monomerstrukturen in Mizellen aufgeklärt, bei denen das Peptid:Detergens-Verhältnis so eingestellt wurde, daß im Mittel nicht mehr als ein Molekül pro Mizelle vorhanden ist (z. B. Franklin *et al.*, 1994; Condamine *et al.*, 1998; Anders *et al.*, 2000). Zudem ist der mögliche Einfluß, den die starke Oberflächenkrümmung kleiner, sphärischer Mizellen auf die Struktur darin enthaltener Molekülen hat, noch unklar.

Die Chrysospermine werden nach ihrer Ionenleitfähigkeit (Chrysospermin A/C: 290 pS, Chrysospermin B/D: 720 pS; Ternovsky *et al.*, 1997) bzw. nach ihrer Retentionszeit auf einer „Reverse-Phase“ C18-HPLC-Säule gruppiert. Bei einer Trennung mittels HPLC zeigen Chrysospermin A/B und C/D ein fast identisches Retentionsverhalten an der verwendeten C18-Matrix. Um weitere Indizien für die Unterschiede zwischen den in der Sequenz nur geringfügig unterschiedlichen Chrysosperminen (Tabelle 7.1) zu erhalten, wurden ^{15}N-markierte Chrysospermine A–D in DPC-Mizellen überführt und mittels hochauflösender NMR in Lösung untersucht.

Aminosäureposition	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Chrysospermin A	Ac-	F	U	S	U	**U**	L	Q	G	U	U	A	A	U	P	**U**	U	U	Q	W	-ol
Chrysospermin B	Ac-	F	U	S	U	**U**	L	Q	G	U	U	A	A	U	P	**J**	U	U	Q	W	-ol
Chrysospermin C	Ac-	F	U	S	U	**J**	L	Q	G	U	U	A	A	U	P	**U**	U	U	Q	W	-ol
Chrysospermin D	Ac-	F	U	S	U	**J**	L	Q	G	U	U	A	A	U	P	**J**	U	U	Q	W	-ol

Tabelle 7.1:
Aminosäuresequenzen der Chrysospermine (U = α-Aminoisobuttersäure, J = D-Isovalin), variable Aminosäurepositionen sind hervorgehoben.

Ein alternatives Membransystem bieten die aus einem Lipid/Detergensgemisch bestehenden, scheibenförmigen Bizellen (Sanders *et al.*, 1994), welche erstmals von Vold *et al.*, 1997 für die Verwendung in hochauflösender NMR in Lösung vorgeschlagen wurden. Große, sich im Magnetfeld spontan ausrichtende Bizellen wurden bereits in Kapitel 6 dazu verwendet, um die Orientierung von Chrysospermin C relativ zur Membranoberfläche zu bestimmen. Bislang wurde allerdings keine Struktur eines Biomoleküls in Bizellen veröffentlicht, da diese Systeme aufgrund ihrer Größe die technischen Grenzen in der Lösungs-NMR erreichen: Der Membrandurchmesser der Bizellen beträgt bei einem Lipid:Detergens-Verhältnis von 0.7:1 zirka 55 Å (siehe Abschnitt 2.5.2), was ungefähr 300 DMPC- und 400 DHPC-Molekülen entspricht ($M_{d\text{-}DMPC}$ = 745.5 g/mol, $M_{d\text{-}DMPC}$ = 488.8 g/mol), hinzu kommen noch die 12 CSC-Moleküle mit jeweils 2 kDa. Die Gesamtmasse einer „beladenen“ Bizelle beträgt daher ca. 435 kDa und gehört damit zu den größten mittels NMR in Lösung studierten Systemen (Pervushin *et al.*, 1999; Riek *et al.*, 1999).

7.1 Experimente in mizellarer Lösung

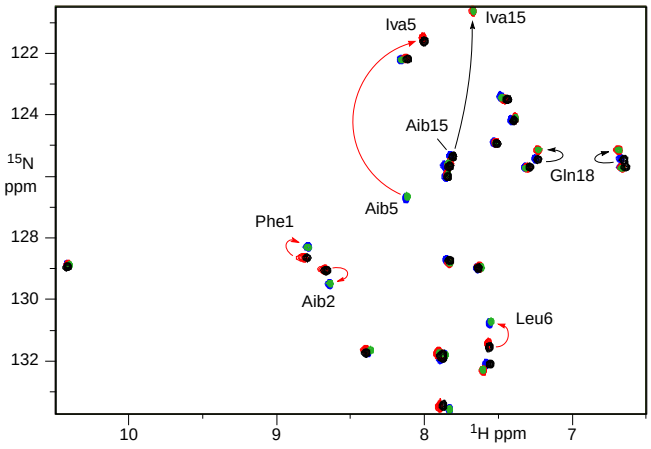

Abbildung 7.1:
(^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektren der Chrysospermine A-D in deuterierten DPC-Mizellen bei 45 °C. Blau = Chrysospermin A, Grün = B, Schwarz = C, Rot = D. Rote Pfeile zeigen Änderungen beim Ersetzen von Aib5 durch Iva5, schwarze Pfeile diejenigen beim Ersetzen von Aib15 durch Iva15.

Überlagert man die (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektren der Chrysospermine, so wird zum einen der Austausch Aib gegen Iva (Aib/Iva5, Aib/Iva15) evident. Dazu ergeben sich auch gruppenweise (AB/CD bzw. AC/BD) Unterschiede in den restlichen chemischen Verschiebungen (Abb. 7.1). Während sich beim Ersetzen von Aib5 durch Iva5 die Resonanzen von Phe1, Aib2 und Leu6 verschieben, beobachtet man beim Ersetzen von Aib15 durch Iva15 nur eine Verschiebung der NH_2^{ε}-Resonanzen von Gln18. Letztere Aminosäure-Differenz tritt zwischen Chrysospermin A und B bzw. C und D auf. Diese Differenz korreliert mit einem Sprung in der Leitfähigkeit der gebildeten Ionenkanäle (Grigoriev *et al.*, 1995). Die strukturelle Umgebung um Gln18 NH_2^{ε}, welche die chemische Verschiebung beeinflußt, sollte also von Bedeutung für die Bildung bzw. Form des Ionenkanals sein. Die Aminosäuredifferenz in Position 5 am N-Terminus, die zwischen Chrysospermin A und C bzw. B und D vorliegt, scheint für die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals keine Rolle zu spielen, sondern nur die Löslichkeit des Peptids leicht zu beeinflussen.

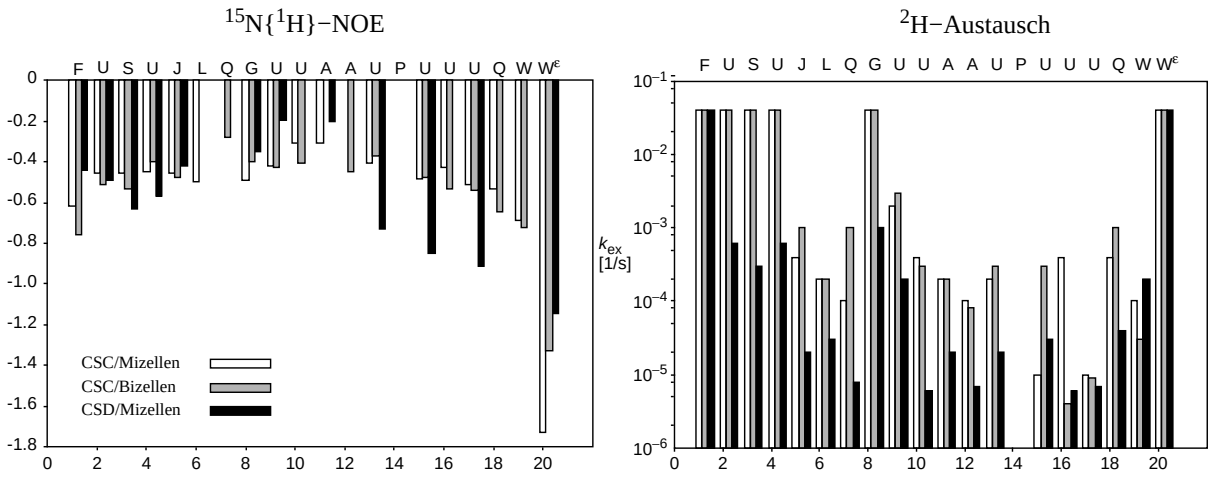

Abbildung 7.2:
$^{15}N\{^{1}H\}$ Hetero-NOE (links) und ^{2}H-Austauschdaten (rechts) für CSC in Mizellen und Bizellen sowie CSD in Mizellen.

^{2}H-Austauschexperimente zur Bestimmung der Lösungsmittelzugänglichkeit der einzelnen Aminosäuren entlang der Peptidsequenz zeigen zum einen, daß die Amidprotonen von CSC in Mizellen und Bizellen im wesentlichen ähnlich schnell austauschen. Eine Ausnahme bildet das Amidproton von Aib16, welches in Bizellen einen drastisch verringerten Austausch aufweist (Abb. 7.2 unten). Zum anderen ist erkennbar, daß die Amidprotonen von CSD in Mizellen praktisch in jedem Fall langsamer austauschen, was in einigen Fällen, vor allem am N-Terminus, sehr stark hervortritt. Die Amidprotonen der N-terminalen Reste Aib2, Ser3 und Aib4 tauschen in CSC so schnell aus, daß sie bereits im ersten Spektrum (ca. 5-8 Minuten nach Lösen in D_2O) nicht detektierbar sind; in CSD ergeben diese Protonen aber noch bis zu einer Stunde lang Signale. Dies ist erstaunlich, da die Änderung des Aminosäuretyps (Aib $\rightarrow$ Iva) von CSC nach CSD in der Nähe des C-Terminus stattfand. Auch der auf molekulare Beweglichkeit empfindliche $^{15}N\{^{1}H\}$ Hetero-NOE zeigt für CSD deutlich andere Werte als für CSC in Mizellen oder Bizellen. Hier ist CSD im C-terminalen Bereich beweglicher als CSC (Abb. 7.2 oben). CSC hingegen zeigt in beiden Lipidsystemen ein recht ähnliches Verhalten. Die gezeigten Austausch- und Hetero-NOE-Daten weisen zumindest darauf hin, daß sich im Falle von CSC in Bizellen ähnliche Wasserstoffbrückenbindungen, die die Amidprotonen vor Austausch mit dem Lösungsmittel schützen, ausbilden wie in Mizellen. Isotrope Bizellen stellen somit ein zu DPC-Mizellen mindestens gleichwertiges Membranmodell dar.

7.1.1 Zusätzlich gefundene Chrysospermine

Bei der hochaufgelösten Trennung der Chrysospermine mittels semipräparativer HPLC wurden fünf zusätzliche Peptide (E–I) gefunden, die im Chrysospermin-Gemisch enthalten waren (siehe Kapitel 2). Deren Menge war jedoch so gering, daß sie für eine vollständige Sequenzanalyse nicht ausreichte. Von den Peptiden wurden (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektren in Methanol-d3 aufgenommen, welche aufgrund der sehr geringen Konzentration ein schlechtes Signal-Rausch-

Verhältnis aufwiesen (Spektren nicht gezeigt). Zudem stellte sich heraus, daß vor allem die in extrem geringer Menge auftretenden Peptide E und F (im HPLC-Diagramm zwischen Chrysospermin A/B und C/D, Abb. 2.4, Abschnitt 2.5.1) stark mit den Hauptprodukten Chrysospermin A-D verunreinigt waren. Dies ist auf die ungenügende Trennung bei der HPLC-Aufreinigung zurückzuführen, die eine Identifizierung der Peptide E-I und damit deren Abtrennung von den Hauptkomponenten A-D sehr erschwert. Es war in den (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektren jedoch deutlich zu sehen, daß es sich bei den Peptiden E-H um Chrysospermin-ähnliche Moleküle handelt, bei denen im Vergleich mit Spektren von Chrysospermin A-D meist nur ein Signal verschoben ist. Dies spricht dafür, daß hier ein Austausch einzelner Aminosäurepositionen vorliegt. Möglicherweise ist dies auf einen nicht exakt spezifischen Einbau der unüblichen Aminosäuren Aib und Iva in diese Peptaibole *in vivo* in *A. chrysosperma* zurückzuführen. Das in der geringsten Konzentration auftretende Peptid I zeigte im (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektrum 15 von CS A–D völlig verschiedenen Resonanzen und gehört vermutlich nicht zur Familie der Chrysospermine.

7.2 NMR-Experimente in bizellarer Lösung

Um erstmals die Strukturbestimmung eines aus einem Peptid-Oligomer bestehenden Ionenkanals mittels NMR zu versuchen, wurden isotrope Bizellen als Membran-Modellsystem gewählt. Dieses System wirft aus der Sicht der NMR-Spektroskopie einige Probleme auf. So ist z. B. eine Bizelle mit $\approx$ 435 kDa sehr groß, was eine langsame Rotationsdiffusion mit entsprechend höherer Linienbreite der NMR-Signale erwarten ließ. Die hier beobachteten ^{1}H-Linienbreiten von ca. 25-35 Hz entsprechen allerdings eher denen eines viel kleineren, sich schneller bewegenden Systems. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Bizelle kein rigides System darstellt, sondern z. B. entlang der Lipidoberfläche sehr schnelle Lateraldiffusion sowie Rotation der in die Bizelle eingebrachten Moleküle stattfinden kann. Diese Prozesse können den verbreiternden Effekt der chemischen Anisotropie zusätzlich ausmitteln und führen zu geringeren Linienbreiten, zudem konnten die NMR-Experimente bei 50 °C durchgeführt werden, was die Linienbreite weiter verminderte. Andererseits führen schnelle Relaxationsprozesse dazu, daß in Standard-NMR-Experimenten mit längeren Magnetisierungstransferzeiten, wie z. B. TOCSY oder HN-CACB, die Magnetisierung noch während der Transferzeit verschwindet. Somit verkleinert sich die Anzahl anwendbarer NMR-Experimente drastisch, und es muß eine sorgfältige Auswahl der durchzuführenden Experimente, vor allem zur Resonanzzuordnung, getroffen werden.

Die Gesamtzahl der Resonanzen in dem 19 Aminosäuren zählenden CSC ist nicht sehr hoch, allerdings stammt ein wesentlicher Anteil hiervon aus den acht Aib-Resten, deren Methylprotonenresonanzen nahezu bei derselben chemischen Verschiebung liegen. Die zwei Methylresonanzen eines jeden Aib sind Grundlage eines substantiellen Anteils der Strukturinformation über das Peptid, vor allem im C-terminalen Bereich, wo drei Aibs in Folge auftreten (Aib15–17) sowie im Segment um Prolin 14, welches aufgrund seiner sterischen Eigenschaften einen typischen Einfluß auf die lokale Konformation des Peptidrückgrats haben kann (Kaduk *et al.*, 1997; Condamine *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 1994). Es sollte daher darauf geachtet werden, die Me-

thylresonanzen einerseits eindeutig zuzuordnen und andererseits NOE-Abstandsdaten von ihnen zu gewinnen. Normalerweise reichen für die Bestimmung der Raumstruktur kleinerer Peptide in Lösungsmitteln wie Methanol/Wasser oder in Mizellen ^{1}H-^{1}H-homonukleare Spektren aufgrund der geringen Linienbreiten und der Signaldispersion aus (Franklin *et al.*, 1994; Condamine *et al.*, 1998; Anders *et al.*, 2000). Bei der Verwendung isotroper Bizellen und besonders im Falle für darin eingebrachte Peptaibole mit geringer Signaldispersion müssen allerdings Methoden angewandt werden, die sonst nur für größere Proteine und Nukleinsäuren Verwendung finden. Diese bedingen die Aufnahme mehrdimensionaler, isotopen-editierter NMR-Spektren, um durch die zusätzlich eingeführte ^{13}C-, ^{15}N- bzw. ^{31}P-Dimension an Signalauflösung zu gewinnen. Hierzu muß das zu beobachtende Molekül in vollständig ^{13}C,^{15}N-isotopenmarkierter Form vorliegen – daher wurde Chrysospermin *in vivo* aus doppelt isotopenmarkierten Kulturen von *A. chrysosperma* gewonnen. Hinzu kommt, daß die hier verwendeten deuterierten Lipide, DMPC-d67 und DHPC-d35 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) zum gegenwärtigen Zeitpunkt vom Hersteller nicht zu 100% deuteriert hergestellt werden können – im Glycerolrückgrat sind noch fünf Protonen vorhanden (H1-4). Diese liegen im Bereich der H$^{\alpha}$-Protonen und verursachen in homonuklearen ^{1}H-^{1}H-Spektren extreme Störungen aufgrund ihrer von den CSC-Signalen unterschiedlichen Phase (siehe Einleitung, Abb. 1.3). Andererseits bieten gerade diese Protonen eine Gelegenheit, spezifische NOE-Kontakte von CSC mit der Lipidumgebung zu beobachten.

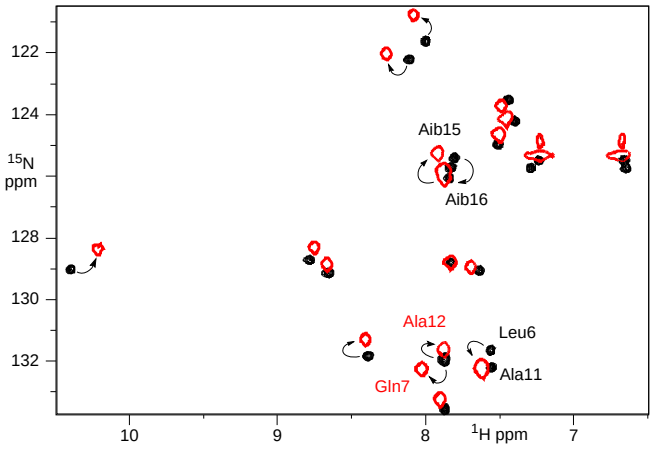

Abbildung 7.3:
2D (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektrum von Chrysospermin C in Mizellen (ausgefüllte Punkte) und isotropen Bizellen (Kreise) bei 45 °C (Mizellen) bzw. 50 °C (Bizellen).

Das (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Experiment zur Korrelation von Amidproton- und Amidstickstoffresonanzen ist ein gutes Kontrollexperiment, welches sensitiv auf Änderungen der lokalen Konformation und/oder der chemischen Umgebung der betrachteten Amidgruppe ist (Oldfield, 1995; Görlach *et al.*, 1992). Vergleicht man die (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Spektren von CSC in Mizellen und Bizellen (Abb. 7.3), so fallen einige Änderungen auf, die in der gleichen Größenordnung liegen wie die durch den Austausch einzelner Aminosäuren verursachten Änderungen (Abb. 7.1). Fast alle Resonanzen aus der Mitte der Peptidsequenz sind leicht verschoben, während die N-terminalen Signale bis Aib4 und die C-terminalen Signale Aib17, Gln18 und Tro19 kaum Änderungen aufweisen. Aufgrund der von Mizellen unterschiedlichen Membranumgebung sowie der veränderten lokalen Membrangeometrie in Bizellen sind solche leichten Verschiebungen durch-

aus zu erwarten und müssen nicht zwangsläufig auf eine signifikant unterschiedliche Struktur des Peptids hindeuten.

7.2.1 Resonanzzuordnung

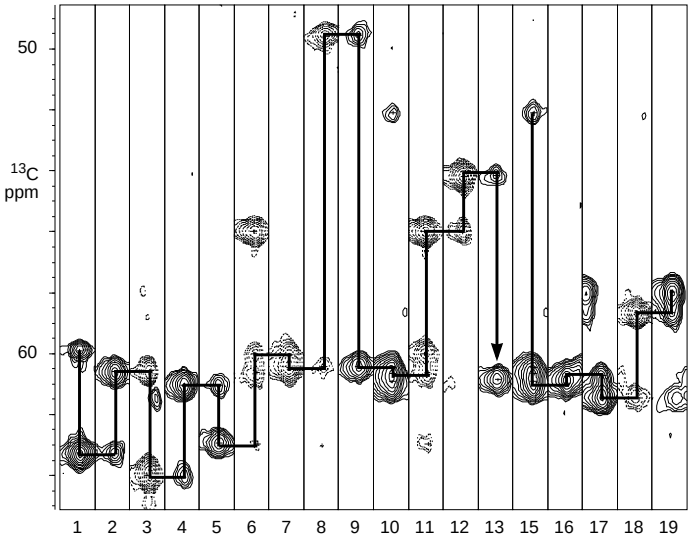

Abbildung 7.4:
Streifen aus dem 3D HNCA-Spektrum von CSC in Bizellen zur sequentiellen Zuordnung der (^{15}N,^{1}H) Amid- und $^{13}C^{\alpha}$-Kohlenstoffresonanzen.

Viele der üblicherweise verwendeten, multidimensionalen und isotopen-editierten NMR-Experimente wie TOCSY-HSQC, HCCH-TOCSY oder HNCACB benötigen relativ lange Magnetisierungstransfer-Zeiten, innerhalb derer die Magnetisierung von Chrysospermin verschwand. Zur sequentiellen Zuordnung der Amidprotonen im (^{15}N,^{1}H)-HSQC (Abb. 7.3) wurde daher das sensitive 3D HNCA-Experiment benutzt, welches H^N-Signale zum eigenen (i) sowie zum benachbarten ($i+1$)-Amidproton über die $^{13}C^{\alpha}$-Kohlenstoffresonanzen liefert (Abb. 7.4).

Die ^{13}C-Methylresonanzen wurden anschließend mit Hilfe eines CBCACONH-Experimentes zugeordnet (Abb. 7.5A), welches mit der relativ starken H^{β}-Magnetisierung startet (drei Methylprotonen ergeben ein Signal) anstatt mit der schwächeren Amidproton-Magnetisierung. Zudem muß der Magnetisierungstransfer entlang der Bindungen hier nur einmal erfolgen anstatt zweimal („out-and-back“) wie beim HNCACB-Experiment. Die $^{13}C^{\beta}$-Zuordnung wurde dann über ein im $^{13}C^{\beta}$-Bereich hochaufgelöstes (^{13}C,^{1}H)-HSQC-Spektrum auf die H^{β}-Methylresonanzen übertragen (Abb. 7.5B). Die spektrale Zuordnung der meisten übrigen Seitenkettenresonanzen mußte über die ^{15}N- bzw. ^{13}C-editierten NOESY-Spektren erfolgen, da aus einem 2D TOCSY-Spektrum aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses nur sehr wenige Signale zugeordnet werden konnten.

7.3 Struktur von Chrysospermin C in Bizellen

Zur Gewinnung von Strukturinformationen wurden isotopeneditierte und -gefilterte NOESY-Experimente eingesetzt. Die Besonderheit bei der Strukturbestimmung in dem vorliegenden Fall

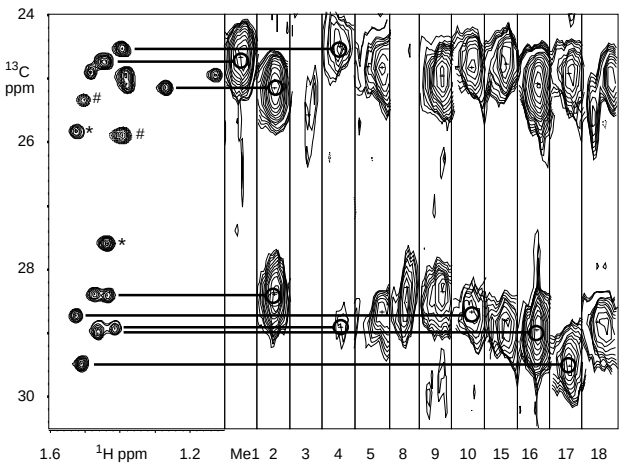

Abbildung 7.5:
Sequentielle Streifen aus dem 3D CBCACONH-Spektrum (rechts) von CSC in Bizellen zur Zuordnung der $^{13}C^{\beta}$-Kohlenstoffresonanzen im ct-*(^{13}C,^{1}H)-HSQC (links). Vom CBCACONH-Spektrum ist nur der Ausschnitt in der $^{13}C^{\beta}$-Region gezeigt – die $^{13}C^{\alpha}$-Resonanzen wurden auch beobachtet, sind hier aber nicht mit dargestellt. Einige Zuordnungen sind exemplarisch mit eingezeichnet.*

Mit $*$ markierte Resonanzen im (^{13}C,^{1}H)-HSQC-Spektrum (Aib13) wurden im CBCACONH nicht zugeordnet, da das Signal auf dem nachfolgenden Pro14, welches kein H^N besitzt, nicht detektiert wurde. Mit # markierte Resonanzen sind gefaltet (Ala11,12).

ist, daß mehrere Peptidmoleküle in einer Bizelle vorliegen und von vornherein davon ausgegangen werden muß, daß sich Peptid-Aggregate ausbilden. Daher kann die Struktur eines Monomers nicht, wie im Falle von Mizellen, in denen jeweils nur ein Molekül vorliegt, separat untersucht werden – die Auswertung aller Spektren muß immer in Hinsicht auf das Gesamtsystem erfolgen. So beobachtet man in allen NOE-Spektren grundsätzlich Signale, die sowohl von *intra*- als auch von *inter*molekularen Wechselwirkungen herrühren. Um dennoch zunächst die Struktur eines Monomers innerhalb solcher Aggregate bestimmen zu können, müssen die *inter*- von den *intra*molekularen NOE-Signalen differenziert werden. Dies kann durch Aufnahme geeigneter ^{13}C- bzw. ^{13}C, ^{15}N-isotopengefilterter NOE-Spektren geschehen (Zwahlen *et al.*, 1997). Liegt ein Gemisch aus isotopenmarkierten und unmarkierten Molekülen vor, so kann man selektiv NOE-Signale von ^{12}C-gebundenen Protonen zu ^{13}C-gebundenen Protonen beobachten. Hierzu wird zunächst die Magnetisierung der an ^{13}C gekoppelten Protonen selektiv vernichtet, woran sich ein NOESY-HSQC anschließt, in dem nur an ^{13}C gekoppelte ^{1}H-Resonanzen beobachtet werden. Somit wird sichergestellt, daß weder von den markierten noch von den unmarkierten Molekülen *intra*molekulare Signale auftreten und nur die *inter*molekularen Wechselwirkungen im Spektrum beobachtet werden.

Es wurden zuerst alle NOE-Spektren an ^{15}N- bzw. ^{13}C, ^{15}N-isotopenmarkierten Proben aufgenommen, die sowohl *intra*- als auch *inter*molekulare NOE-Wechselwirkungen beinhalten: Ein 3D (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-HSQC, ein 3D (^{1}H-^{1}H-^{13}C)-NOESY-HSQC mit vollständiger spektraler Breite sowie ein auf den $^{13}C^{\beta}$-Bereich beschränktes, hochaufgelöstes 3D *ct*-(^{1}H-^{1}H-^{13}C)-NOESY-HSQC-Spektrum. Letzteres Spektrum wurde aufgenommen, um die im ^{13}C-NOESY-HSQC mit vollständiger spektraler Weite in ^{13}C nicht aufgelösten 16 Methylresonanzen der Aib-Reste getrennt beobachten zu können. Bei diesem Experiment findet die ^{13}C-Evolutionszeit innerhalb einer festen Zeitspanne $1/2J_{CC}$ statt, um die $^{13}C^{\alpha}$-$^{13}C^{\beta}$ -Kopplung zu refokussieren, die bei der hier verwendeten extremen Auflösung eine Linienaufspaltung zur Folge hätte. Die Auflösung beträgt 32 Inkremente für 6.6 ppm statt der 30 Inkremente für 73

ppm im vollständigen (^{1}H-^{1}H-^{13}C)-NOESY-HSQC. Obwohl dieses Spektrum sehr viele NOEs enthielt, konnten fast keine Aib-Aib oder Aib-Ala H$^\beta$-zu-H$^\beta$-NOEs zugeordnet werden, da diese in beiden Protonendimensionen praktisch identische chemische Verschiebungen aufweisen. Auf diese Information muß also im folgenden verzichtet werden.

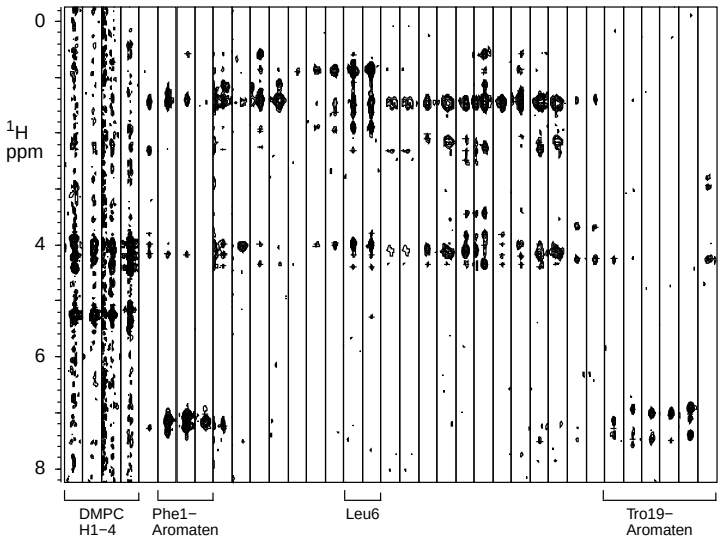

Abbildung 7.6:
3D ^{13}C-F1-gefiltertes, ^{13}C-F3- separiertes NOESY-HSQC-Spektrum von 3:8 markiertem:unmarkiertem CSC in Bizellen. Die stärksten NOEs stammen vor allem von den Aromaten von Phe1 und Tro19 sowie von der Seitenkette von Leu6. Die Signale der nicht deuterierten Wasserstoffkerne H1-4 von DMPC sind in den Streifen ganz links dargestellt.

Um die *inter*molekularen, isotopengefilterten NOESY-Experimente durchzuführen, wurde zur ^{13}C, ^{15}N doppelt markierten CSC-Probe im Verhältnis 3:8 (markiert:unmarkiert) unmarkiertes CSC hinzugegeben und das ursprüngliche Peptid:Lipid-Verhältnis durch Addition derselben relativen Menge an deuteriertem 0.7:1 DMPC:DHPC-Gemisch wiederhergestellt. Ein 2D (^{15}N,^{1}H)-HSQC-Kontrollexperiment zeigte keine Veränderungen des markierten Chrysospermins (Spektrum nicht gezeigt). Es wurde ein 3D ^{13}C-F1-gefiltertes, ^{13}C-F3-separiertes NOESY-HSQC mit der vollen spektralen Breite in ^{13}C der Probe in D_2O (Abb. 7.6) sowie ein (aufgrund der nötigen Unterdrückung des Wassersignals wesentlich insensitiveres) 2D ^{13}C/^{15}N-F1-gefiltertes NOESY-HSQC (Zwahlen *et al.*, 1997) der Probe in H_2O aufgenommen. In letzterem Spektrum waren keine Amidprotonensignale zu sehen, bis auf drei NOE-Signale des Seitenketten-H$^\varepsilon$ von Tro20 (Spektrum nicht gezeigt). Die Amidprotonen scheinen also nicht wesentlich an *inter*molekularen Wechselwirkungen beteiligt zu sein.

Anhand der aus den isotopengefilterten NOE-Spektren gewonnenen *inter*molekularen NOEs wurden die ^{13}C- und ^{15}N-editierten NOE-Spektren korrigiert, um die rein *intra*molekularen NOEs für die Berechnung einer Monomerstruktur zu gewinnen. Einige Signale wurden aus den *intra*molekularen Signallisten komplett gestrichen, sobald ein mittelgroßes oder großes Signal im isotopengefilterten Spektrum auftrat. Beim Auftreten eines schwachen *inter*molekularen NOEs wurden starke *intra*molekulare NOEs herunterskaliert, schwache gestrichen. Im Zweifelsfalle wurde immer zu ungunsten des *intra*molekularen NOEs entschieden, da ein falsches Signal mehr Einfluß auf die Struktur haben kann als ein nicht berücksichtigtes Signal.

7.3.1 Struktur eines Chrysospermin C-Monomers

Es wurden 461 NOEs, davon 300 strukturrelevante, zugeordnet und dem Programm DYANA zur Strukturrechnung im Torsionswinkelraum übergeben. Nachdem die α-helikale Struktur gefestigt war, wurden auf Basis der ^{2}H-Austauschmessungen zusätzlich 3 Wasserstoffbrücken für Tro19–Aib15, Aib17–Aib13 und Aib16–Ala12, in die Strukturrechnung eingeführt, da diese Amidprotonen stark vom Austausch mit Wasser geschützt sind. Diese waren bereits während der vorhergehenden Strukturrechnung konsistent aufgetreten.

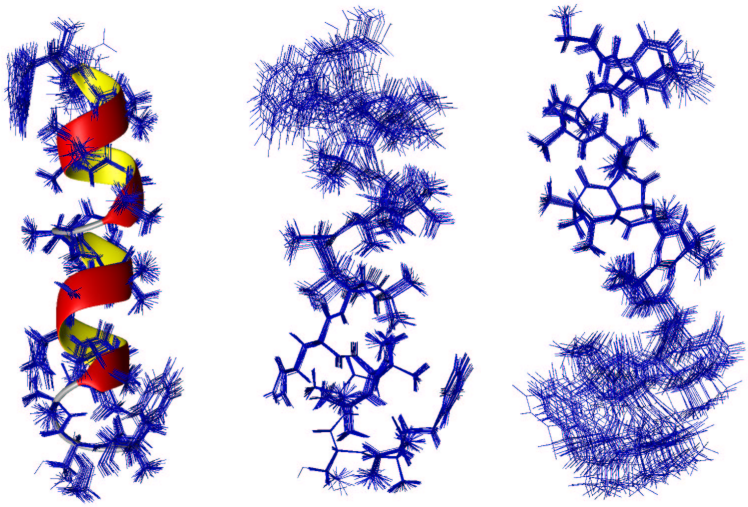

Abbildung 7.7:
Überlagerung der besten 20 von 100 Monomerstrukturen von Chrysospermin C in isotropen Bizellen. Links: Struktur mit Überlagerung aller Aminosäurereste von 1-19. Mitte: Überlagerung der N-terminalen Reste 1-11. Rechts: Überlagerung der C-terminalen Reste von 13-19. Diese und nachfolgende Abbildungen wurden mit dem Programm MOLMOL (Koradi et al.*, 1996) generiert.*

Die resultierende Struktur besteht aus zwei α-helikalen Bereichen, die durch eine leicht irreguläre Schlaufe miteinander verbunden sind (Abb. 7.7 links). Wie schon bei anderen Peptaibolen beobachtet (Kaduk *et al.*, 1997; Condamine *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 1994), induziert das an Aminosäureposition 14 gelegene Prolin eine Konformationsänderung in Richtung des N-Terminus – zwischen Aib10 und Aib13 erfährt die Helix einen leichten Knick. Die Anzahl der NOE-Distanzeinschränkungen in diesem Bereich ist allerdings deutlich geringer im Vergleich zur sehr gut definierten N-terminalen α-Helix. Eine Überlagerung der besten 20 von 100 Strukturen vor (Phe1–Ala11; Abb. 7.7 Mitte) bzw. nach dem Knick (Aib13–Tro19; Abb. 7.7 rechts), ergibt daher eine noch konsistentere Übereinstimmung der Strukturschar als bei Überlagerung der gesamten Struktur (Abb. 7.7 links). Es ist nicht völlig klar, ob mögliche NOEs tatsächlich nicht existieren oder ob sie hauptsächlich aus hier nicht aufgelösten H^{β}-zu-H^{β}-NOEs bestehen. Aus diesem Grund kann derzeit keine exakte Aussage über den Knickwinkel angegeben werden, da jede zusätzlich eingeführte Einschränkung einen bedeutenden Einfluß hierauf hätte.

Die in isotropen Bizellen bestimmte Struktur von CSC enspricht im wesentlichen der in DPC-Mizellen beobachteten Struktur (Anders *et al.*, 2000; hier nicht gezeigt). Die C-terminale Helix ist nahezu identisch, während sich im Knickbereich und auch in den 5 N-terminalen Aminosäuren einige Abweichungen ergeben. So beginnt bei CSC in Mizellen die α-Helix ab Phe1, in Bizellen hingegen erst ab Iva5.

Allgemeine Daten		rmsd zur mittleren Struktur		rmsd zur Mizellstruktur	
NOEs	461	Reste 1–19, RS:	0.32	Reste 1–19, RS:	1.86
Distanzeinschränkungen	300	Reste 1–19, AS:	0.58	Reste 1–19, AS:	2.95
Stereospezifische Zuordnungen geminaler Protonenpaare	10	Reste 1–11, RS:	0.22	Reste 1–11, RS:	0.77
Beste DYANA-Targetfunktion	0.22	Reste 1–11, AS:	0.45	Reste 1–11, AS:	1.68
Höchste DYANA-Targetfunktion für die besten 20 aus 100 Strukturen	0.23	Reste 13–19, RS:	0.12	Reste 13–19, RS:	0.37
Verletzte Distanzeinschränkungen	0	Reste 13–19, AS:	0.40	Reste 13–19, AS:	0.84

Tabelle 7.2:
Statistik der Strukturrechnung für ein CSC-Monomer in isotropen Bizellen und im Vergleich zur Mizellstruktur (Anders et al.*, 2000). RS = Rückgratschweratome, AS = Alle Schweratome.*

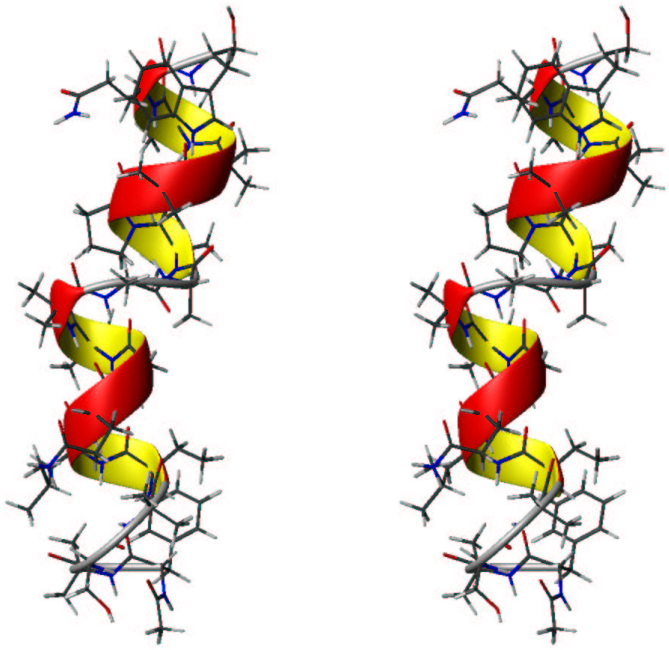

Abbildung 7.8:
Stereoabbildung der Monomerstruktur von Chrysospermin C in isotropen Bizellen mit der besten DYANA*-Zielfunktion. Der N-Terminus ist unten.*

7.3.2 NOEs zum Wasser und zum Lipid

Im ^{15}N-editierten NOESY-HSQC-Spektrum (Spektrum nicht gezeigt) konnten einige NOEs von Amidprotonen zum Wasser beobachtet werden (H^N von Phe1, Aib2, Ser3, Aib4, Tro19, $H^{\varepsilon 2}$8, $H^{\varepsilon 1}$20). Zusätzlich konnten im ^{13}C-isotopengefilterten Spektrum NOE-Kontakte vom Peptid (Phe1 H^{δ}, H^{ε}, Aib2 H^{β}, Leu6 H^{δ}, Aib13 H^{β}, Aib17 H^{β}) zur Lipidkopfgruppe (H1-4) beobachtet werden (siehe Abb. 7.6). Hieraus ist ersichtlich, daß sowohl der N- als auch der C-Terminus von CSC in Kontakt mit der Lipid/Wasser-Grenzfläche stehen müssen. Ob dies allerdings für jedes einzelne Monomer der Fall ist, läßt sich nicht bestimmen – die NOEs könnten ebenso von zwei Populationen von Peptidmolekülen stammen, von denen eine C-terminal und die andere N-terminal mit der Lipid/Wasser-Grenzfläche in Kontakt steht.

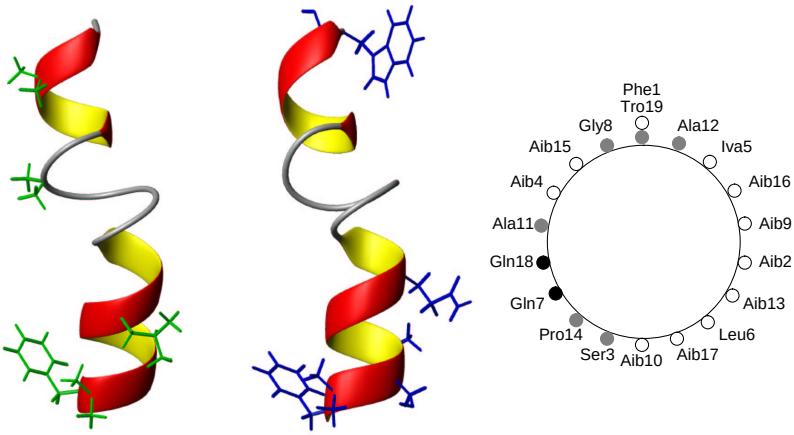

Abbildung 7.9:
NOEs zum Lipid (links) und zum Wasser (Mitte). Seitenketten der Aminosäuren, zu denen NOEs beobachtet wurden, sind herausgestellt. Rechts: „Helix-Rad“-Darstellung für CSC. Hydrophobe Aminosäuren sind als leere, neutrale als graue und hydrophile als schwarze Kreise dargestellt.

In Abbildung 7.9 sind alle Aminosäuren hervorgehoben, zu denen Lipid- und Wasser-NOEs beobachtet werden. Für den mittleren Bereich von CSC gibt es praktisch keine NOEs zum Lipid oder zum Wasser, und die NOEs zum Lipid sind auf eine Seite des Moleküls beschränkt, von welcher angenommen werden kann, daß sie die Außenseite eines Aggregates bildet. Dies wird unterstützt durch die Aufstellung eines „Helix-Rades“ (Schiffer & Edmundson, 1967), bei dem für α-helikale Peptide die hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren entlang eines Kreises eingezeichnet werden, der einer zweidimensionalen Projektion der Sequenz entlang der Helixachse entspricht. Der Drehwinkel zwischen zwei benachbarten Aminosäuren beträgt hier 100° und entspricht dem einer idealen α-Helix. Die Definition hydrophiler bzw. hydrophober Aminosäuren wird aus Messungen der Zugänglichkeit globulärer Proteinen gewonnen (Janin, 1979). Wie man anhand des Helix-Rades in Abb. 7.9 erkennen kann, befinden sich auf einer Hälfte des Rades – somit einer Seite der Helix – ausschließlich hydrophobe Aminosäuren. Dies korreliert direkt mit der Oberfläche, die Chrysospermin der DMPC-Lipidumgebung zuwendet, denn alle Aminosäuren, zu denen Lipid-NOEs beobachtet werden, befinden sich auf genau dieser hydrophoben Seite des Helix-Rades. Diese Beobachtungen stimmen mit den in Kapitel 6 gefundenen Ergebnissen überein, in denen für CSC eine transmembrane Orientierung vorhergesagt wurde.

Die in dieser Arbeit dargestellten Beobachtungen lassen mehrere Schlüsse zu: Einerseits konnte gezeigt werden, daß isotrope Bizellen ein zulässiges Modell für eine Lipidmembran darstellen. Zum anderen scheinen im Gegenzug auch DPC-Mizellen ein vergleichbar gutes Membranmodell darzustellen, da sich die Struktur von CSC im Monomer (Mizellen) von der im Oligomer (Bizellen) nicht grundlegend unterscheidet.

7.4 Strukturuntersuchungen zur Bildung des Ionenkanals von Chrysospermin C

Abschließend wurde untersucht, ob die beobachteten *inter*molekularen NOEs es erlauben, Aussagen über die Konformation des von CSC gebildeten Ionenkanals zu treffen. Es wurden insgesamt 95 *inter*molekulare NOEs zugeordnet: Methylresonanz der N-terminalen Acetylgruppe (3), Phe1 (10), Aib2 (3), Ser3 (1), Iva5 (8), Leu6 (19), Gln7 (9), Ala11 (7), Ala12 (7), Aib13 (4), Aib17 (2), Gln18 (2) und Tro19 (20). Eine genaue Zuordnung der NOEs zu den einzelnen Molekülen – also welches Molekül mit welchem benachbart ist – war aufgrund der nicht unterscheidbaren Monomere allerdings nicht zweifelsfrei möglich. Es wurde allerdings gefunden, daß – nimmt man ein Dimer als Grundlage für alle beobachteten *inter*molekularen NOEs – viele NOEs nicht erfüllbar sind, da sie sich zur jeweils abgewandten Seite der Nachbarhelix erstrecken. Daher wurden zunächst nur alle mittelstarken und starken NOEs berücksichtigt und ein Trimer als Grundeinheit für eine Strukturrechnung eines Hexamers benutzt – ein zentrales Molekül, von dem die NOEs ausgehen plus zwei Nachbarn. Hierdurch war es möglich, in einer freien Strukturrechnung alle mittelstarken und starken *inter*molekularen NOEs einzubeziehen (Abb. 7.10A).

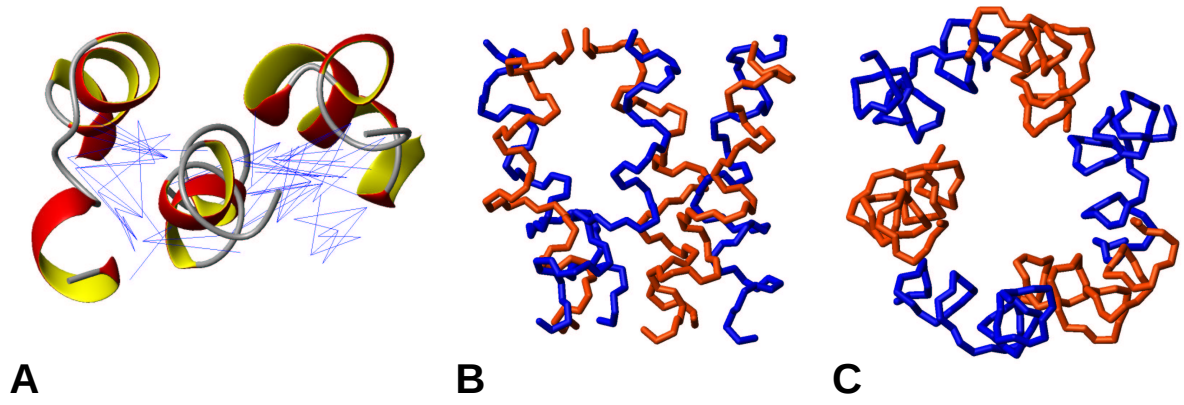

Abbildung 7.10:
Modell eines von CSC gebildeten Ionenkanals. (A) Trimer-Modell, welches zur Zuordnung der inter*molekularen NOEs zu den Nachbarmolekülen benutzt wurde. (B) Seitenansicht eines Hexamers, welches auf einer fixierten Monomerstruktur mit zusätzlich eingeführten* inter*molekularen NOEs basiert. (C) Aufsicht auf das Hexamer.*

Bei der freien Rechnung wurden alle *intra*- und *inter*molekularen NOEs gleichzeitig verwendet, wobei die *inter*molekularen NOEs mit einem Wichtungsfaktor von 0.2 belegt waren, um die Monomerstrukturen nicht zu sehr zu deformieren. Wie man deutlich sehen kann, stammen die meisten *inter*molekularen NOEs (blaue Linien) im wesentlichen von zwei abgewandten Seiten der Helix, mit drei Schwerpunkten zwischen den beiden Aromatenringen von Phe1 und Tro19 sowie zwischen den Seitenkettenresonanzen von Leu6. Alle *inter*molekularen NOEs deuten darauf hin, daß die Monomere hauptsächlich parallel angeordnet sein müssen. Es ist auch

zu erkennen, daß sich, von oben auf die Helices betrachtet, die drei Moleküle weder zu einem Dreieck noch entlang einer Linie arrangieren, sondern ein leicht gebogenes Aggregat bilden. Dies könnte bereits ein Indiz dafür sein, daß CSC Helixbündel mit nicht weniger als vier oder sechs Monomeren ausbildet.

Um ein Modell für solch ein Helixbündel zu generieren, wurden alle *inter*molekularen NOEs auf zwei weitere Monomere kopiert, so daß insgesamt sechs Monomere jeweils mit ihren linken und rechten „Nachbarn“ interagieren. Zur Darstellung in Abb. 7.10 wurden die in Abschnitt 7.3.1 berechnete Monomerstruktur in jedem der Moleküle mit Hilfe von Torsionswinkeleinschränkungen festgehalten, da die Monomerstrukturen unter einer freien Rechnung (alle *intra*- und *inter*molekulare Distanzeinschränkungen aktiv) noch recht stark deformiert werden. Man erkennt, daß sich die Monomere leicht gegeneinander verschränken, wie es bereits in vielen anderen Systemen beobachtet wurde (z. B. Subramaniam, 1999; Doyle *et al.*, 1998; Kovacs & Cross, 1997). In der Mitte des Bündels bildet sich eine Pore aus, die im Falle des abgebildeten Hexamers zumindest für ein Natrium-Ion genügend Durchlaßweite hätte.

Es ergab sich, daß mit der ermittelten Monomerstruktur ein Oligomermodell konstruiert werden kann, das einen Ionenkanal darstellt und die beobachtbaren NOEs erklärt. Aufgrund der nicht einzelnen Monomeren zuzuordnenden *inter*molekularen NOEs dürfen die hier dargestellten Ergebnisse über den von CSC gebildeten Ionenkanal zunächst nur als modellhaft bezeichnet werden. Diese Untersuchungen von CSC in Bizellen eröffnen jedoch ein Feld für neue Experimente und Untersuchungen, die letztlich Informationen über die Struktur dieses Peptidionenkanals liefern sollten.

Zusammenfassung

Detaillierte Informationen zu Größe und Orientierung chemischer Verschiebungstensoren (CS-Tensoren) sind von grundlegendem Interesse für die NMR-Spektroskopie. In der vorliegenden Arbeit wurden die CS-Tensoren von ^{15}N und ^{13}C für ein Aib-Aib-NH_2-Dipeptid untersucht (Aib = α-Aminoisobuttersäure).

Zur Erweiterung etablierter und auf der Auswertung statischer Pulverspektren basierender Methoden in Richtung mehrfach isotopenmarkierter Moleküle wurde die hochauflösende MAS-NMR-Spektroskopie im Festkörper als experimentelle Technik gewählt. Anhand des Modellmoleküls Acetanilid konnte gezeigt werden, daß es dabei vorteilhaft ist, die Winkel des chemischen Verschiebungstensors relativ zu *zwei* dipolaren Vektoren wie ^{15}N-^{1}H und ^{15}N-^{13}C zu bestimmen, um die Orientierung des Tensors möglichst genau innerhalb des Koordinatensystems des Moleküls zu definieren. Die Sensitivität von MAS-NMR-Experimenten wie REDOR und 1D „dipolar-shift“ auf die beteiligten Euler-Winkel des ^{15}N chemischen Verschiebungstensors wurde gezeigt.

Zur Bestimmung der Orientierung des CS-Tensors eines Carbonyl-Kohlenstoffkerns (^{13}C′), der kein direkt gebundenes Proton besitzt, wurde ein neues Experiment entwickelt. Dieses 2D-Experiment erzeugt eine über die ^{15}N-^{13}C-Bindung vermittelte Korrelation zwischen ^{13}C′-Tensor und der dipolaren ^{15}N-^{1}H-Wechselwirkung, um die Winkel zwischen ^{15}N-^{1}H-Bindung und ^{13}C′-Tensor zu bestimmen. Angewandt auf das Aib-Aib-NH_2-Dipeptid konnten damit Größe und Orientierung des CS-Tensors von ^{13}C′ relativ zur Peptidebene vollständig beschrieben werden.

Im Aib-Aib-NH_2-Dipeptid wurden ebenfalls Größe und Orientierung des ^{15}N-CS-Tensors bestimmt, wozu die anhand des Modellsystems Acetanilid erprobten MAS-NMR-Methoden angewandt wurden. Statt des 1D „dipolar-shift“-Experiments kam hier allerdings das auf die Euler-Winkel noch sensitivere 2D DIPSHIFT-Experiment zum Einsatz. Die Leistungsfähigkeit der hier vorgestellten MAS-NMR-Methoden wurde mit der Leistungsfähigkeit anderer Methoden zur Charakterisierung von CS-Tensoren verglichen. Hierzu wurden ^{15}N-^{13}C dipolar gekoppelte ^{15}N- und ^{13}C-Pulverspektren von Aib im Peptaibol Chrysospermin C aufgenommen, woraus die Größe der CS-Tensoren und deren Orientierung relativ zur ^{15}N-^{13}C-Bindungsachse bestimmt werden konnten. Die Bestimmung der Größe der ^{15}N-Tensoren und deren Orientierung relativ zur ^{15}N-^{1}H-Bindungsachse mittels Relaxationsmessungen an vollständig ^{15}N-markiertem Chrysospermin C in DPC-mizellarer Lösung erwies sich als zu ungenau, um verläßliche Daten gewinnen zu können.

Anhand der CS-Tensoren von ^{15}N und ^{13}C′, welche zuvor in Zusammenarbeit mit J. Leppert (Leppert, 2001) für die Nukleobase Uracil mittels MAS-NMR charakterisiert worden waren, wurde die Validität von *ab initio* quantenmechanischen Berechnungen der Größe und Orientierung von CS-Tensoren untersucht. Die, wenn auch geringe, Empfindlichkeit chemischer Verschiebungstensoren auf die Anwesenheit von Wasserstoffbrücken konnte hiermit ebenfalls

bestätigt werden. Die *ab initio*-Methode wurde anschließend erfolgreich zur Berechnung von CS-Tensoren in Dipeptiden und einem Hexapeptid eingesetzt, die alle Aib enthielten. Es zeigte sich, daß die Berechnung der Orientierung von CS-Tensoren deutlich robuster auf unterschiedliche Basissätze reagiert als die Berechnung der Hauptachsenwerte des CS-Tensors und die der isotropen chemischen Verschiebung.

Im Zuge der durchgeführten MAS-NMR-Experimente stellte sich heraus, daß dipolare Rückkopplungsexperimente sehr empfindlich auf die Homogenität des eingestrahlten HF-Feldes am Ort der Probe reagieren. Dies liegt vor allem an 180°-Pulsen mit nicht perfektem Anregungsprofil. Es konnte gezeigt werden, daß diese Inversionspulse unter MAS-Bedingungen erfolgreich durch adiabatische Pulse ersetzt werden können. Die Robustheit adiabatischer Inversionspulse im REDOR-Experiment zeigt sich in einer geringeren Empfindlichkeit des Experiments auf Fehleinstellungen der 180°-Pulslänge bzw. der verwendeten Leistungsniveaus des Verstärkers.

Ein weiterer Themenkomplex beinhaltete die Untersuchung des Peptaibols Chrysospermin C (CSC), welches in Lipidmembranen Ionenkanäle ausbildet. In magnetisch orientierten DMPC/DHPC-Bizellen wurde die Orientierung und Dynamik von CSC untersucht, wozu die zuvor bestimmte Größe und Orientierung des CS-Tensors von ^{15}N in Aib eingesetzt wurden. Es ergab sich, daß das α-helikale CSC mit seiner Helixachse im wesentlichen senkrecht zur Membranoberfläche orientiert ist. Eine getrennte Bestimmung des Neigungswinkels zwischen CSC-Helix und Lipidmembran und der maximalen Auslenkung von Reorientierungsbewegungen der Helix um ihre mittlere Position war allerdings nicht möglich. Liegt die maximale Auslenkung im sinnvollen Bereich von 10–30°, so läßt sich der mögliche Bereich für den Neigungswinkel zwischen 10 und 25° einschränken.

Die Struktur von CSC in Mizellen ist bereits bekannt (Anders *et al.*, 2000). Nicht bekannt ist jedoch der Aufbau des von CSC gebildeten oligomeren Ionenkanals. Um dies zu untersuchen, wurde CSC in Bizellen eingebracht, deren DMPC:DHPC-Mischungsverhältnis so eingestellt war, daß die gebildeten Bizellen sich nicht mehr im Magnetfeld orientieren, sondern isotrop rotieren. Diese enthalten aber noch immer, im Gegensatz zu den sphärischen Mizellen, einen flachen Lipiddoppelschicht-Anteil. In diesen wurden im Mittel 12 CSC-Moleküle pro Bizelle rekonstituiert und mittels hochauflösender NMR in Lösung untersucht. Die spektrale Überlappung und die Linienbreiten in diesem System von ca. 435 kDa schlossen die Verwendung konventioneller, homonuklearer NMR-Methoden aus. Daher wurde CSC in vollständig ^{15}N- bzw. ^{13}C,^{15}N-isotopenmarkierter Form hergestellt, was die Anwendung mehrdimensionaler, isotopeneditierter NMR-Experimente erlaubte. Unter Berücksichtigung sowohl *intra*- als auch *inter*molekularer NOE-Signale konnte die Monomerkonformation im Oligomer bestimmt werden. Auf Basis einer rationalen Zuordnung der *inter*molekularen NOE-Abstandseinschränkungen zu jeweils „linken“ und „rechten“ Nachbarmolekülen wurde für die bizell-gebundenen Oligomere ein präliminäres Modell eines Ionenkanals von CSC vorgeschlagen.

Literaturverzeichnis

Anders, R., Ohlenschläger, O., Šoškić, V., Wenschuh, H., Heise, B. & Brown, L. R. (2000). The NMR structure of the ion channel peptaibol chrysospermin C bound to dodecylphosphocholin micelles. *Eur. J. Biochem., 267*, 1784–1794.

Anders, R., Wenschuh, H., Šoškić, V., Fischer-Frühholz, S., Ohlenschläger, O., Dornberger, K. & Brown, L. R. (1998). A solution NMR study of the selectively ^{13}C, ^{15}N-labeled peptaibol chrysospermin C in methanol. *J. Pept. Res., 52*, 34–44.

Anderson-Altmann, K. L., Phung, C. G., Mavromoustakos, S., Zheng, Z., Facelli, J. C., Poulter, C. D. & Grant, D. M. (1995). ^{15}N chemical shift tensors of Uracil determined from ^{15}N powder pattern and ^{15}N-^{13}C dipolar NMR spectroscopy. *J. Phys. Chem., 99*, 10454–10458.

Antzutkin, O. N., Shekar, S. C. & Levitt, M. H. (1995). Two-Dimensional Sideband Separation in Magic-Angle-Spinning NMR. *J. Magn. Reson., 115*, 7–19.

Asakawa, N., Kameda, T., Kuroki, S., Kurosu, H., Ando, S., Ando, I. & Shoji, A. (1998). Structural Studies of Hydrogen-bonded Peptides and Polypeptides by Solid-state NMR. *Annu. Rep. NMR Spec., 35*, 55–137.

Aue, W. P., Ruben, D. J. & Griffin, R. G. (1981). Two-dimensional rotational spin-echo NMR in solids: Resolution of isotropic and anisotropic chemical shifts. *J. Magn. Reson., 43*, 472–477.

Bax, A. & Lerner, L. (1986). Two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science, 232*, 960–967.

Bax, A. & Tjandra, N. (1997). High-resolution heteronuclear NMR of human ubiquitin in an aqueous liquid crystalline medium. *J. Biomol. NMR, 10*, 289–92.

Becke, A. D. (1993). Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys., 98*, 5648–5652.

Benedetti, E., Bavoso, A., Blasio, B. D., Pavone, V., Pedone, C., Toniolo, C. & Bonora, G. M. (1982). Peptaibol antibiotics: a study on the helical structure of the 2-9 sequence of emerimicins III and IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79*, 7951–7954.

Bennett, A. E., Rienstra, C. M., Auger, M., Lakshmi, K. V. & Griffin, R. G. (1995). Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J. Chem. Phys., 103*, 6951.

Bloom, M., Davis, J. H. & MacKay, A. L. (1981). Direct determination of the oriented sample NMR spectrum from the powder spectrum for the systems with local axial symmetry. *Chem. Phys. Lett., 80*, 189–202.

Bower, P. V., Oyler, N., Mehta, M. A., Long, J. R., Stayton, P. S. & Drobny, G. P. (1999). Determination of Torsion Angles in Proteins and Peptides Using Solid State NMR. *J. Am. Chem. Soc., 121*, 8373–8375.

Brown, L. R. (1979). Use of fully deuterated micelles for conformational studies of membrane proteins by high resolution ^{1}H-NMR. *Biochim. Biophys. Acta, 557*, 135–148.

Brown, L. R., Braun, W., Kumar, A. & Wüthrich, K. (1982). High resolution nuclear magnetic resonance studies of the conformation and orientation of mellitin bound to a lipid-water interface. *Biophys. J., 37*, 319–328.

Cafiso, D. S. (1994). Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 23*, 141–165.

Carroll, P. J., Stewart, P. L. & Opella, S. J. (1990). Structures of Two Model Peptides: N-Acetyl-D,L-valine and N-Acetyl-L-valyl-L-leucine. *Acta Cryst., C46*, 243–246.

Cheeseman, J. R., Trucks, G. W., Keith, T. A. & Frisch, M. J. (1996). A comparison of models for calculating nuclear magnetic resonance shielding tensors. *J. Chem. Phys., 104*, 5497–5509.

Chesnut, D. B. (1996). *Reviews in Computational Chemistry*, volume 8, chapter The Ab Initio Computation of Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shielding, pages 245–297. New York: VCH Publishers, Inc.

Condamine, E., Rebuffat, S., Prigent, Y., Segalas, I., Bodo, B. & Davoust, D. (1998). Three-Dimensional Structure of the Ion-Channel Forming Peptide Trichorzianin TA VII Bound to Sodium Dodecyl Sulfate Micelles. *Biopolymers, 46*, 75–88.

Cross, T. A. (1994). Structural Biology of Peptides and Proteins in Synthetic Membrane Environments by Solid-state NMR Spectroscopy. *Annu. Rep. NMR Spec., 29*, 123–167.

Czernek, J., Fiala, R. & Sklenář, V. (2000). Hydrogen bonding effects on the ^{15}N and ^{1}H shielding tensors in nucleic acid base pairs. *J. Magn. Reson., 145*, 142–146.

Davis, J. H. & Auger, M. (1999). Static and magic angle spinning NMR of membrane peptides and proteins. *Prog. NMR Spec., 35*, 1–84.

de Groot, H. J. M., Smith, S. O., Kolbert, A. C., Courtin, J. M. L., Winkel, C., Lugtenburg, J., Herzfeld, J. & Griffin, R. G. (1991). Iterative fitting og magic-angle-spinning NMR spectra. *J. Magn. Reson., 91*, 30–38.

Dornberger, K., Ihn, W., Ritzau, M., Gräfe, U., Schlegel, B., Fleck, W. F. & Metzger, J. W. (1995). Chrysospermins, new peptaibol antibiotics from *Apiocrea chrysosperma* Ap101. *J. Antibiot.*, *48*, 977–989.

Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. & MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science*, *280*, 69–77.

Fleischer, U., van Wüllen, C. & Kutzelnigg, W. (1998). *Encyclopedia of Computational Chemistry*, volume 4, chapter NMR Chemical Shift Computation: *Ab initio*, pages 1827–1835. Chichester, England: John Wiley & Sons.

Franklin, J. C., Ellena, J. F., Jayasinghe, S., Kelsh, L. P. & Cafiso, D. S. (1994). Structure of micelle-associated alamethicin from ^{1}H NMR. Evidence for conformational heterogeneity in a voltage-gated peptide. *Biochemistry*, *33*, 4036–4045.

Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B. *et al.* (1998). Gaussian 98.

Fu, R. & Cross, T. (1999). Solid-state nuclear magnetic resonance investigation of protein and polypeptide structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, *28*, 235–268.

Fushman, D. & Cowburn, D. (1998b). Model-independent analysis of ^{15}N chemical shift anisotropy from NMR relaxation data. Ubiquitin as a test example. *J. Am. Chem. Soc.*, *120*, 7109–7110.

Fushman, D., Tjandra, N. & Cowburn, D. (1998b). Direct measurement of ^{15}N chemical shift anisotropy in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, *120*, 10947–10952.

Gauss, J. (1993). Effects of electron correlation in the calculation of nuclear magnetic resonance chemical shifts. *J. Chem. Phys.*, *99*, 3629–3643.

Geßmann, R., Kokkinidis, M., Currle, M. & Brückner, H. (1997). Unusual conformations adopted by standard amino acids in Aib-containing oligopeptides. *Z. Kristallogr.*, *212*, 819–825.

Ghose, R., Huang, K. & Prestegard, J. H. (1998). Measurement of Cross Correlation between Dipolar Coupling and Chemical Shift Anisotropy in the Spin Relaxation of ^{13}C, ^{15}N-Labeled Proteins. *J. Magn. Reson.*, *135*, 487–499.

Goetz, J. M. & Schaefer, J. (1997). Orientational information in solids from REDOR sidebands. *J. Magn. Reson.*, *129*(2), 222–223.

Görlach, M., Wittekind, M., Beckmann, R. A., Mueller, L. & l. Dreyfuss, G. (1992). Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA. *EMBO J.*, *11*, 3289–3295.

Grant, D. M. (1996). *Encylopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, volume 2, chapter Chemical Shift Tensors, pages 1298–1321. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.

Gregory, D. M., Mehta, M. A., Shiels, J. C. & Drobny, G. P. (1997). Determination of local structure in solid nucleic acids using double quantum nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, *107*, 28.

Griffin, R. (1998). Dipolar recoupling in MAS spectra of biological solids. *Nat. Struct. Biol.*, *5*, 508–512.

Grigoriev, P., Schlegel, R., Dornberger, K. & Gräfe, U. (1995). Formation of membrane channels by chrysospermins, new peptaibol antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta*, *1237*, 1–5.

Gullion, T. & Schaefer, J. (1989). Rotational echo double resonance NMR. *J. Magn. Reson.*, *81*, 196.

Gullion, T. & Schaefer, J. (1991). Elimination of Resonance Offset Effects in Rotational Echo, Double Resonance NMR. *J. Magn. Reson.*, *92*, 439–442.

Harbison, G. S., Jelinski, L. W., Stark, R. E., Torchia, D. A., Herzfeld, J. & Griffin, R. G. (1984). ^{15}N Chemical Shift and ^{15}N-^{13}C Dipolar Tensors for the Peptide Bond in [1-^{13}C]Glycyl[^{15}N]Glycine Hydrochloride Monohydrate. *J. Magn. Reson.*, *60*, 79–82.

Hartmann, S. R. & Hahn, E. L. (1962). Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame. *Phys. Rev.*, *128*, 2042–2053.

Hartzell, C. J., Pratum, T. K. & Drobny, G. (1987). Mutual orientation of three magnetic tensors in a polycristalline dipeptide by dipole-modulated ^{15}N chemical shift spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, *87*, 4324–4331.

Heise, B., Leppert, J., Wenschuh, H., Ohlenschläger, O., Görlach, M. & Ramachandran, R. (2001). 2D relayed anisotropy correlation NMR: characterization of the ^{13}C' chemical shift tensor orientation in the peptide plane of the dipeptide Aibaib. *J. Biomol. NMR*.

Henry, G. D. & Sykes, B. D. (1994). Methods to study membrane protein structure in solution. *Methods Enzymol.*, *239*, 515–535.

Herzfeld, J. & Berger, A. E. (1980). Sideband intensities in NMR spectra of samples spinning at the magic angle. *J. Chem. Phys.*, *73*, 6021–6028.

Hing, A. W., Vega, S. & Schaefer, J. (1992). Transferred-echo double-resonance NMR. *J. Magn. Reson.*, *96*, 205–209.

Hing, A. W., Vega, S. & Schaefer, J. (1993). Measurement of Heteronuclear Dipolar Coupling by Transferred-Echo Double-Resonance NMR. *J. Magn. Reson., A 103*, 151–162.

Hirsh, D. J., Hammer, J., Maloy, W. L., Blazyk, J. & Schaefer, J. (1996). Secondary structure and location of a magainin analogue in synthetic phospholipid bilayers. *Biochemistry*, *35*, 12733–12741.

Howard, K. P. & Prestegard, J. H. (1996). Conformation of sulfoquinovosyldiacylglycerol bound to a magnetically oriented membrane system. *Biophys. J.*, *71*, 2573–2582.

Hu, J. Z., Facelli, J. Z., Alderman, D. W., Pugmire, R. J. & Grant, D. M. (1998). ^{15}N chemical shift tensors in nucleic acid bases. *J. Am. Chem. Soc.*, *120*(38), 9863–9869.

Janin, J. (1979). Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature*, *277*, 491–492.

Jeener, J. (1971). *Ampere International Summer School, Basko Polje, Jugoslawien*.

Kaduk, C., Duclohier, H., Dathe, M., Wenschuh, H., Beyermann, M., Molle, G. & Bienert, M. (1997). Influence of Proline Position upon the Ion Channel Activity of Alamethicin. *Biophys. J.*, *72*, 2151–2159.

Kallick, D. A., Tessmer, M. R., Watts, C. R. & Li, C.-Y. (1995). The Use of Dodecylphosphocholine Micelles in Solution NMR. *J. Magn. Reson.*, *109*, 60–65.

Kay, L. E. (1995). Pulsed field gradient multi-dimensional NMR methods for the study of protein structure and dynamics in solution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, *63*, 277–299.

Keizer, G. J. (1997). *Encyclopedia of Fungi*. The Netherlands: Rebo Productions.

Ketchem, R. R., Hu, W. & Cross, T. A. (1993). High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science*, *261*, 1457–1460.

Koradi, R., Billeter, M. & Wüthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics*, *14*, 51–55.

Kovacs, F. & Cross, T. (1997). Transmembrane four-helix bundle of influenza A M2 protein channel Structural implications from helix tilt and orientation. *Biophys. J.*, *73*, 2511–2517.

Kroenke, C. D., Loria, J. P., Lee, L. K., Rance, M. & Palmer III, A. G. (1998). Longitudinal and Transverse ^{1}H-^{15}N Dipolar/^{15}N Chemical Shift Anisotropy Relaxation Interference: Unambiguous Determination of Rotational Diffusion Tensors and Chemical Exchange Effects in Biological Macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.*, *120*, 7905–7915.

Kupce, E. & Freeman, R. (1996). Optimized adiabatic pulses for wideband spin inversion. *J. Magn. Reson., A 118*, 299–303.

Leppert, J. (2001a). Charakterisierung des chemischen Verschiebungstensors mittels heteronuklearer Festkörper-Kernresonanzspektroskopie. *Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena*.

Leppert, J., Heise, B. & Ramachandran, R. (1999). Magic angle spinning NMR spectroscopy with composite RF pulses. *J. Magn. Reson.*, *139*, 382–388.

Leppert, J., Heise, B. & Ramachandran, R. (2000a). ^{15}N chemical shift tensor magnitude and orientation in the molecular frame of uracil determined via MAS NMR. *J. Magn. Reson.*, *145*, 307–314.

Leppert, J., Heise, B. & Ramachandran, R. (2000b). Redor in IS_1S_2 systems. *J. Biomol. NMR*, *18*, 153–164.

Leppert, J., Heise, B. & Ramachandran, R. (2001b). Orientational information from TEDOR spectral sidebands. *Solid State NMR*, im Druck.

Linder, M., Hohener, A. & Ernst, R. R. (1980). Orientation of tensorial interactions determined from two-dimensional NMR powder spectra. *J. Chem. Phys.*, *73*(10), 4959–4970.

Lumsden, M. D., Wasylishen, R. E., Eichele, K., Schindler, M., Penner, G. H., Power, W. P. & Curtis, R. D. (1994). Carbonyl Carbon and Nitrogen Chemical Shift Tensors of the Amide Fragment of Acetanilide and N-Methylacetanilide. *J. Am. Chem. Soc.*, *116*(4), 1403–1413.

Marassi, F. & Opella, S. (1998). NMR structural studies of membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, *8*(5), 640–648.

McDermott, A. E., Creuzet, F. J., Kolbert, A. C. & Griffin, R. G. (1992). High-Resolution Magic-Angle-Spinning NMR Spectra of Protons in Deuterated Solids. *J. Magn. Reson.*, *98*, 408–413.

Munowitz, M., Aue, W. P. & Griffin, R. G. (1982). Two-dimensional separation of dipolar and scaled isotropic chemical shift interactions in magic angle NMR spectra. *J. Chem. Phys.*, *77*, 1686.

Munowitz, M. & Griffin, R. G. (1983). Two-dimensional nuclear magnetic resonance in rotating solids: Time reversal effects in chemical shift-dipolar spectra. *J. Chem. Phys.*, *78*(2), 613.

Munowitz, M. G., Huang, T. H., Dobson, C. M. & Griffin, R. G. (1984). High-Resolution Dilute Spin Diploar NMR Spectroscopy in the Solid State. *J. Magn. Reson.*, *57*, 56–64.

North, C. L., Mathys, M. B. & Cafiso, D. S. (1995). Membrane orientation of the N-terminal segment of alamethicin determined by solid-state ^{15}N NMR. *Biophys. J.*, *69*(6), 2392–7.

Oas, T. G., Hartzell, C. J., Dahlquist, F. W. & Drobny, G. P. (1987a). The amide ^{15}N chemical tensors of four peptides determined from ^{13}C dipole-coupled chemical shift powder patterns. *J. Am. Chem. Soc.*, *109*(20), 5962–5966.

Oas, T. G., Hartzell, C. J., McMahon, T. J., Drobny, G. P. & W., D. F. (1987b). The Carbonyl ^{13}C Chemical Shift Tensors of Five Peptides Determined from ^{15}N Dipole-Coupled Chemical Shift Powder Patterns. *J. Am. Chem. Soc.*, *109*, 5956–5962.

Oldfield, E. (1995). Chemical shifts and three-dimensional protein structures. *J. Biomol. NMR*, *5*, 217–225.

Olejniczak, E. T., Vega, S. & Griffin, R. G. (1984). Multiple pulse NMR in rotating solids. *J. Chem. Phys.*, *81*(11), 4804–4817.

Opella, S. J., Marassi, F. M., Gesell, J. J., Valente, A. P., Kim, Y., Oblatt-Montal, M. & Montal, M. (1999). Structures of the M2 channel-lining segments from nicotinic acetylcholine and NMDA receptors by NMR spectroscopy. *Nature Struct. Biol.*, *6*, 374–379.

Opella, S. J. & Stewart, P. L. (1989). Solid-state nuclear magnetic resonance structural studies of proteins. *Methods Enzymol.*, *76*, 242–275.

Opella, S. J., Stewart, P. L. & Valentine, K. G. (1987). Protein structure by solid-state NMR spectroscopy. *Q. Rev. Biophys.*, *19*(1/2), 7–49.

Orendt, A. M. (1996). *Encylopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, volume 2, chapter Chemical Shift Tensor Measurement in Solids, pages 1282–1297. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd.

Palmas, P., Malveau, C., Tekely, P. & Canet, D. (1998). Magnitudes and mutual orientations of dipolar and shielding interaction tensors determined from the orientation dependence of spinning sidebands of slowly rotation powder samples. *Solid State NMR, 13*, 45–53.

Pan, Y., Gullion, T. & Schaefer, J. (1990). Determination of C-N internuclear distances by rotational-echo double resonance NMR of solids. *J. Magn. Reson., 90*, 330–340.

Parry, G. S. (1954). The Crystal Structure of Uracil. *Acta Cryst., 7*, 313–320.

Pervushin, V. P., Wider, G., Riek, R. & Wüthrich, K. (1999). The 3D NOESY-[^{1}H,^{15}N,^{1}H]-ZQ-TROSY NMR experiment with diagonal peak suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96*, 9607–9612.

Press, W. H., Teukolsky, S. A., Vetterling, W. T. & Flannery, B. P. (1992). *Numerical Recipies in C* (2nd Edition ed.). Cambridge: Cambridge University Press.

Prosser, R. S., Bryant, H., Bryant, R. G. & Vold, R. R. (1999). Lanthanide Chelates as Bilayer Alignment Tools in NMR Studies of Membrane-Associated Peptides. *J. Magn. Reson., 141*, 256–260.

Prosser, R. S., Hunt, S. A., DiNatale, J. A. & Vold, R. R. (1996). Magnetically Aligned Membrane Model Systems with Positive Order Parameter: Switching the Sign of S_{zz} with Paramagnetic Ions. *J. Am. Chem. Soc., 118*, 269–270.

Prosser, S., Hwang, J. S. & Vold, R. R. (1998). Magnetically Aligned Phospholipid Bilayers with Positive Ordering: A New Model Membrane System. *Biophys. J., 74*, 2405–2418.

Ramamoorthy, A., Wu, C. H. & Opella, S. J. (1997). Magnitudes and Orientations of the Principal Elements of the ^{1}H Chemical Shift, ^{1}H-^{15}N Dipolar Coupling, and ^{15}N Chemical Shift Interaction Tensors in ^{15}N$^{\varepsilon 1}$-Tryptophan and ^{15}N$^{\pi}$-Histidine Side Chains Determined by Three-Dimensional Solid-State NMR Spectroscopy of Polycrystalline Samples. *J. Am. Chem. Soc., 119*, 10479–10486.

Rhim, W.-K., Elleman, D. D. & Vaughan, R. W. (1973). Analysis of multiple pulse NMR in solids. *J. Chem. Phys., 59*, 3740–3749.

Riek, R., Wider, G., Pervushin, K. & Wüthrich, K. (1999). Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96*, 4918–4923.

Salvatore, B. A., Ghose, R. & Prestegard, J. H. (1996). NMR Studies of a ^{13}C, ^{15}N-Labeled G$_{\text{scriptsize M4}}$-Lactam Glycolipid at an Oriented Model-Membrane Interface. *J. Am. Chem. Soc., 118*.

Sanders, C. R. (1993). Solid state ^{13}C NMR of unlabeled phosphatidylcholine bilayers: spectral assignments and measurement of carbon-phosphorus dipolar couplings and ^{13}C chemical shift anisotropies. *Biophys. J., 64*(1), 171–81.

Sanders, C. R., Hare, B. J., Howard, K. P. & Prestegard, J. H. (1994). Magnetically-oriented phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules. *Prog. NMR Spec., 26*, 421–444.

Sanders, C. R. & Prestegard, J. H. (1990). Magnetically orientable phospholipid bilayers containing small amounts of a bile salt analogue, CHAPSO. *Biophys. J., 58*, 447–460.

Sanders, C. R. & Schwonek, J. P. (1992). Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. *Biochemistry, 31*(37), 8898–905.

Sansom, M. S. (1993a). Structure and function of channel-forming peptaibols. *Q. Rev. Biophys., 26*, 365–421.

Sansom, M. S. (1993b). Alamethicin and related peptaibols–model ion channels. *Eur. Biophys. J., 22*, 105–124.

Saupe, A. (1964). Kernresonanzen in kristallinen Flüssigkeiten und in kristallinflüssigen Lösungen. Teil I. *Z. Naturforschg., 19*, 161–171.

Schmidt-Rohr, K. & Spiess, H. W. (1994). *Multidimensional Solid State NMR and Polymers*. London: Academic Press.

Seelig, J. (1977). Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Q. Rev. Biophys., 10*, 353–418.

Seelig, J. (1978). ^{31}P nuclear magnetic resonance and the head group structure of phospholipids in membranes. *Biochim. Biophys. Acta, 515*, 105–140.

Shen, L., Bassolino, D. & Stouch, T. (1997). Transmembrane helix structure, dynamics, and interactions Multi-nanosecond molecular dynamics simulations. *Biophys. J., 73*(1), 3–20.

Smith, S., Aschheim, K. & Groesbeek, M. (1996). Magic angle spinning NMR spectroscopy of membrane proteins. *Q. Rev. Biophys., 29*(4), 395–449.

Sternin, E., Nizza, D. & Gawrisch, K. (2000). Complex structural organization of bicelles revealed by NMR and numerical analysis. *Poster at the XIX International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, Florence, Italy*.

Stewart, R. F. (1967). Redetermination of the crystal structure of uracil. *Acta Cryst., 23*, 1102–1105.

Struppe, J., Komives, E. A., Taylor, S. S. & Vold, R. R. (1998). ^{2}H NMR studies of a myristoylated peptide in neutral and acidic phospholipid bicelles. *Biochemistry, 37*, 15523–15527.

Subramaniam, S. (1999). The structure of bacteriorhodopsin: and emerging consensus. *Curr. Opin. Struct. Biol., 9*, 462–468.

Takeda, N., Kuroki, S., Kurosu, H. & Ando, I. (1999). C-13-NMR chemical shift tensor and hydrogen-bonded structure of glycine-containing peptides in a single crystal. *Biopolymers, 50*(1), 61–69.

Tannus, A. & Garwood, M. (1996). Improved performance of frequency-swept pulses using offset-independent adiabaticity. *J. Magn. Reson., A 120*, 133–137.

Teng, Q. & Cross, T. A. (1989). The in Situ Determination of the ^{15}N Chemical Shift Tensor Orientation in a Polypeptide. *J. Magn. Reson., 85*, 439–447.

Teng, Q., Iqbal, M. & Cross, T. A. (1992). Determination of the ^{13}C Chemical Shift and ^{14}N Electric Field Gradient Tensor Orientations with Respect to the Molecular Frame in a Polypeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, *114*, 5312–5321.

Ternovsky, V. I., Grigoriev, P. A., Berestovsky, G. N., Schlegel, R., Dornberger, K. & Gräfe, U. (1997). Effective diameters of ion channels formed by homologs of the antibiotic chrysospermin. *Membr. Cell Biol.*, *11*, 497–505.

Tjandra, N. & Bax, A. (1997a). Large Variations in $^{13}C^{\alpha}$ Chemical Shift Anisotropy in Proteins Correlate with Secondary Structure. *J. Am. Chem. Soc.*, *119*, 9576–9577.

Tjandra, N. & Bax, A. (1997b). Solution NMR measurement of amide proton chemical shift anisotropy in ^{15}N-enriched proteins. Correlation with hydrogen bond length. *J. Am. Chem. Soc.*, *119*(34), 8076–8082.

Tjandra, N., Szabo, A. & Bax, A. (1996). Protein backbone dynamics and ^{15}N chemical shift anisotropy from quantitative measurement of relaxation interference effects. *J. Am. Chem. Soc.*, *118*, 6986–6991.

Veeman, W. S. (1984). Carbon-13 Chemical Shift Anisotropy. *Prog. NMR Spec.*, *16*, 193–235.

Vinogradova, O., Sönnichsen, F. & Sanders, C. R. . (1998). On choosing a detergent for solution NMR studies of membrane proteins. *J. Biomol. NMR*, *11*, 381–386.

Vold, R. R. & Prosser, R. S. (1996). Magnetically Oriented Phospholipid Bilayered Micelles for Structural Studies of Polypeptides: Does the Ideal Bicelle exist? *J. Magn. Reson., B 113*, 267–271.

Vold, R. R., Prosser, R. S. & Deese, A. J. (1997). Isotropic solutions of phospholipid bicelles: A new membrane mimetic for high-resolution NMR studies of polypeptides. *J. Biomol. NMR*, *9*, 329–335.

von Ragué Schleyer, P. (1998). *Encyclopedia of Computational Chemistry*. Chichester, England: John Wiley & Sons.

Walling, A. E., Pargas, R. E. & de Dios, A. C. (1997). Chemical Shift Tensors in Peptides: A Quantum Chemical Study. *J. Phys. Chem. A*, *101*(39), 7299–7303.

Waugh, J. S. (1976). Uncoupling of local field spectra in nuclear magnetic resonance: Determination of atomic positions in solids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *73*, 1394–1397.

Wu, C. H., Ramamoorthy, A., Gierasch, L. M. & Opella, S. J. (1995). Simultaneous characterization of the amide ^{1}H chemical Shift, ^{1}H-^{15}N dipolar, and ^{15}N chemical shift interaction tensors in a peptide bond by three-dimensional solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, *117*(22), 6148–6149.

Yang, D. & Kay, L. E. (1998). Determination of the protein backbone dihedral angle y from a combination of NMR-derived cross-correlation spin relaxation. *J. Am. Chem. Soc.*, *120*, 9880–9887.

Yang, D., Konrat, R. & Kay, L. E. (1997). A multidimensional NMR experiment for measurement of the protein dihedral angle y based on cross-correlated relaxation between $^{1}H^{\alpha}$-$^{13}C^{\alpha}$ dipolar and ^{13}C' (carbonyl) chemical shift anisotropy mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.*, *119*, 11938–11940.

Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S. J. F., Greenblatt, J., Konrat, R. & Kay, L. E. (1997). Methods for measurement of intermolecular NOEs by multinuclear NMR spectroscopy: application to a bacteriphage 1 N-peptide/*boxB* RNA complex. *J. Am. Chem. Soc.*, *119*, 6711–6721.

Anhang A

Relaxationsraten von Chrysospermin C in mizellarer Lösung

γB_0 [MHz]	R_2 [Hz]									
	Phe1	Aib2	Ser3	Aib4	Iva5	Leu6	Gln7	Gly8	Aib9	Aib10
500	4.8	6.2	4.9	6.6	6.8	5.9	5.8	5.3	7.0	6.5
600	5.2	6.4	4.6	6.9	6.9	6.5	6.3	4.7	7.5	7.0
750	5.7	7.1	5.7	7.6	8.5	7.1	7.0	6.1	8.1	7.5
	η [Hz]									
500	3.2	3.9	3.5	4.6	4.1	3.8	4.0	4.0	4.7	4.3
600	3.6	4.4	4.1	5.1	4.7	4.4	4.4	4.3	5.4	4.8
750	4.4	5.4	4.9	5.9	5.7	5.6	5.6	5.4	6.6	5.9

γB_0 [MHz]	R_2 [Hz]									
	Ala11	Ala12	Aib13	Pro14	Aib15	Aib16	Aib17	Gln18	Tro19	Tro19ε
500	6.1	5.8	6.5	–	6.0	7.7	6.0	5.4	5.2	2.4
600	6.6	6.3	6.9	–	6.4	8.7	6.3	5.9	5.3	2.4
750	7.5	7.0	7.4	–	7.4	10.6	6.8	6.3	5.8	2.3
	η [Hz]									
500	4.0	4.0	4.2	–	4.0	4.3	3.6	3.6	3.2	0.9
600	4.4	4.4	4.9	–	4.4	4.9	4.1	3.9	3.6	1.0
750	5.8	5.6	6.3	–	5.3	6.1	5.1	4.9	4.3	1.2

Tabelle A.1: ^{15}N-Relaxationsraten von U-^{15}N CSC in Lösung bei 500, 600 & 750 MHz.

[a] *Der Exponentialfunktion in T_2 war eine Oszillation überlagert, was eine genaue Bestimmung von R_2 verhinderte; die Anpassung von η war ebenfalls unbefriedigend.*

[b] *Die Anpassung der Exponentialfunktion in T_2 war unzureichend, eine genaue Bestimmung von R_2 daher nicht möglich.*

[c] *Die Signale von Gln7 und Ala12 überlappen im 2D (^{15}N,^{1}H)-HSQC.*

[d] *Obwohl die Anpassungen von R_2 und η sehr gut waren, war es in der linearen Regression (Gl. 4.4) praktisch unmöglich, eine Gerade durch die 3 Punkte zu legen.*

Anhang B

Quantenchemische Berechnungen

B.1 Referenzmoleküle

	B3LYP			MP2		B3LYP/MP2	
Referenz-molekül	kl/kl[a] [ppm]	kl/gr [ppm]	gr/gr [ppm]	kl/kl [ppm]	gr/gr [ppm]	kl/kl [ppm]	kl/gr [ppm]
^{15}N: NH_3	255.0	258.5	259.7	278.5	276.2	278.0	274.5
^{13}C: TMS	189.7	183.4	184.0	200.5	198.4		198.0

Tabelle B.1: Chemische Abschirmung von NH_3 und TMS im Vakuum.

[a] *Es wurden die Basissätze 6-31G* („kl“) bzw. 6-311+G(d,p) („gr“) benutzt.*

B.2 Uracil

C2

Struktur	Atom Nr.[a]	Basissatz Opt/NMR[b]	σ_{iso} [ppm][c]	δ_a [ppm][c]	σ_{11} [ppm][c]	σ_{22} [ppm][c]	σ_{33} [ppm][c]	χ_{CN1} [°][d]	ψ_{CN1} [°][d]	χ_{CN3} [°][d]	ψ_{CN3} [°][d]
Monomer	C6	kl/kl	139	81	94	102	220	32	−90	145	−90
Monomer	C6	kl/gr	154	90	102	117	244	32	−90	145	−90
Monomer	C6	gr/gr	154	89	102	116	243	32	−90	145	−90
Paar	C6	kl/kl	138	82	95	100	221	30	−90	143	−90
Paar	C6	kl/gr	154	91	103	114	245	30	−90	144	−90
Paar	C6	gr/gr	153	90	103	114	244	30	−90	144	−90
Tripel	C6	kl/kl	138	84	94	98	222	32	−77	145	−77
Tripel	C6	kl/gr	154	92	103	112	246	32	−85	145	−85
Tripel	C6	gr/gr	153	92	103	111	245	32	−90	145	−90
Tripel	C18*	kl/kl	140	78	93	109	218	31	−87	144	−87
Tripel	C18*	kl/gr	156	85	102	124	241	31	−88	144	−88
Tripel	C18*	gr/gr	155	85	101	123	239	31	−90	144	−90
Tripel	C30*	kl/kl	143	73	93	119	216	34	−90	148	−90
Tripel	C30*	kl/gr	159	80	102	135	239	34	−89	148	−90
Tripel	C30*	gr/gr	158	80	101	134	238	34	−90	148	−90
Exp.[e]	–	–	153	77	95	135	230	33	−90	147	−90

Tabelle B.2: Chemischer Verschiebungstensor von ^{13}C2 in Uracil.

** Kern ist in eine C=O···HN-Wasserstoffbrücke eingebunden.*

[a] *In Abbildung 4.8.*

[b] *Es wurden die Basissätze 6-31G* („kl“) bzw. 6-311+G(d,p) („gr“) benutzt.*

[c] *Relativ zu TMS (Tab. B.1).*

[d] *$(180 - \chi_{NH})$, $(180 - \chi_{NC})$, $-\psi_{NH}$ und $-\psi_{NC}$ sind auch erlaubte Werte.*

[e] *Aus Leppert* et al.*, 2000a; Leppert* et al.*, 2000b.*

Struktur	Atom Nr.[a]	Basissatz Opt/NMR[b]	σ_{iso} [ppm][c]	δ_a [ppm][c]	σ_{11} [ppm][c]	σ_{22} [ppm][c]	σ_{33} [ppm][c]	χ_{NH} [°][d]	ψ_{NH} [°][d]	χ_{NC} [°][d]	ψ_{NC} [°][d]
N1											
Monomer	N5	kl/kl	127	70	81	102	196	13	−90	102	90
Monomer	N5	kl/gr	150	82	100	118	232	12	−89	103	90
Monomer	N5	gr/gr	150	82	100	118	232	12	−90	103	90
Paar	N5	kl/kl	130	72	83	105	202	12	−90	103	90
Paar	N5	kl/gr	153	83	101	121	236	11	−89	104	90
Paar	N5	gr/gr	153	82	103	121	235	11	−90	104	90
Tripel	N5	kl/kl	133	74	81	110	207	12	−90	103	88
Tripel	N5	kl/gr	158	86	102	127	243	11	−90	104	88
Tripel	N5	gr/gr	156	85	102	126	241	11	−90	104	89
Tripel	N17	kl/kl	129	58	81	149	202	12	−90	103	88
Tripel	N17	kl/gr	154	84	101	123	238	11	−88	104	86
Tripel	N17	gr/gr	152	83	100	122	235	11	−90	104	90
Tripel	N29*	kl/kl	132	74	65	126	206	15	−87	102	89
Tripel	N29*	kl/gr	158	85	83	149	243	15	−88	101	90
Tripel	N29*	gr/gr	157	84	84	146	241	15	−90	102	90
Exp.[e]	–	–	136	81	48	142	217	15	−80	92	100
Exp. Lit.[f]	–	–	135	83	51	135	217	18	–	–	–
Sim. Lit.[g]	–	–	89–108	74–96	16–48	72–94	173–196	13–17	–	–	–
N3											
Monomer	N7	kl/kl	157	60	123	130	217	9	90	124	90
Monomer	N7	kl/gr	183	68	149	149	251	8	0	124	0
Monomer	N7	gr/gr	183	67	148	150	250	8	0	124	0
Paar	N7*	kl/kl	158	63	98	155	221	12	90	129	90
Paar	N7*	kl/gr	185	69	121	181	254	12	90	128	90
Paar	N7*	gr/gr	187	68	124	181	255	11	90	128	90
Tripel	N7*	kl/kl	159	63	99	155	222	12	77	127	89
Tripel	N7*	kl/gr	187	69	123	182	256	11	77	127	89
Tripel	N7*	gr/gr	186	69	123	180	255	11	90	127	90
Tripel	N19*	kl/kl	159	63	100	154	222	12	71	128	88
Tripel	N19*	kl/gr	187	69	125	181	256	11	72	127	88
Tripel	N19*	gr/gr	187	69	125	179	256	11	90	127	90
Tripel	N31	kl/kl	158	62	126	128	220	8	84	124	87
Tripel	N31	kl/gr	185	69	148	153	254	8	1	123	3
Tripel	N31	gr/gr	183	69	146	152	252	8	0	123	0
Exp.[e]	–	–	158	66	94	155	224	15	90	132	88
Exp. Lit.[f]	–	–	157	63	100	152	221	9	–	–	–
Sim. Lit.[g]	–	–	128–146	67–84	66–90	109–134	202–222	7–12	–	–	–

Tabelle B.3: Chemische Verschiebungstensoren von ^{15}N1 und ^{15}N3 in Uracil.

** Kern ist in eine NH···C=O-Wasserstoffbrücke eingebunden.*

[a] *In Abbildung 4.8.*

[b] *Es wurden die Basissätze 6-31G* („kl“) bzw. 6-311+G(d,p) („gr“) benutzt.*

[c] *Relativ zu NH_3 (Tab. B.1).*

[d] *$(180 - \chi_{NH})$, $(180 - \chi_{NC})$, $-\psi_{NH}$ und $-\psi_{NC}$ sind auch erlaubte Werte.*

[e] *Aus Leppert* et al.*, 2000a; Leppert* et al.*, 2000b.*

[f] *Aus statischen Pulverspektren (Anderson-Altmann* et al.*, 1995), umgerechnet vom Referenzstandard NH_4NO_3 auf NH_3.*

[g] *Aus GIAO* ab initio*-Berechnungen von Uracil gebunden an zwei Formaldehyd-Moleküle unter Verwendung verschiedener Basissätze (Anderson-Altmann* et al.*, 1995), abs. Abschirmung relativ zu NH_3 = 255 ppm (Tab. B.1).*

B.3 Aib-Peptide

Carbonyl-^{13}C

Peptid	Atom Nr.[a]	Basissatz Opt/NMR[b]	σ_{iso} [ppm][c]	δ_a [ppm][c]	σ_{11} [ppm][c]	σ_{22} [ppm][c]	σ_{33} [ppm][c]	χ_{NH} [°][d]	ψ_{NH} [°][d]	χ_{CN} [°][d]	ψ_{CN} [°][d]
GU	C	kl/kl	161	73	86	162	233	72	88	42	89
AU	C	kl/kl	164	70	87	172	235	76	88	37	88
SU	C	kl/kl	162	71	88	166	234	72	88	41	89
FU	C	kl/kl	164	70	87	171	234	75	88	38	88
PU	C	kl/kl	165	69	86	174	234	75	87	38	88
UU	C	kl/kl	168	69	89	179	237	100	88	33	89
UUU	C4	kl/kl	168	70	90	177	238	97	83	30	89
UUU	C12	kl/kl	161	77	91	153	238	96	88	33	87
GUUAAU	C3*	kl/kl	164	70	88	169	234	102	84	36	88
GUUAAU	C10*	kl/kl	164	72	89	166	236	94	90	32	87
GUUAAU	C16*	kl/kl	164	75	82	165	236	87	86	34	88
GUUAAU	C22*	kl/kl	163	71	88	167	234	94	85	35	86
GUUAAU	C27	kl/kl	161	76	91	154	237	96	86	35	86
GUUAAU	C32	kl/kl	165	76	91	162	241	94	79	31	86
GU	C	gr/gr	178	81	94	182	259	72	88	41	89
AU	C	gr/gr	183	78	96	191	260	77	88	37	88
SU	C	gr/gr	177	86	98	171	263	77	87	37	87
FU	C	gr/gr	179	84	97	176	263	80	88	34	86
PU	C	gr/gr	182	80	96	189	262	78	89	35	87
UU	C	gr/gr	184	76	98	195	261	102	89	35	89
UUU	C4	kl/gr	185	79	97	194	264	97	83	30	89
UUU	C12	kl/gr	178	87	100	168	265	96	89	33	86
GUUAAU	C3*	kl/gr	180	79	95	187	260	102	84	36	88
GUUAAU	C10*	kl/gr	179	82	96	181	261	95	90	32	87
GUUAAU	C16*	kl/gr	181	81	99	182	262	87	86	34	88
GUUAAU	C22*	kl/gr	180	80	96	185	260	94	86	35	86
GUUAAU	C27	kl/gr	177	86	98	171	263	96	86	34	87
GUUAAU	C32	kl/gr	183	85	100	182	268	94	79	31	85
Experiment	–	–	174	66	92	190	240	90	80	34	88

Tabelle B.4: Chemischer Verschiebungstensor von Carbonyl-^{13}C in Aib-Peptiden.

** Kern ist in eine C=O···HN-Wasserstoffbrücke eingebunden.*

[a] *In Abbildung 4.9.*

[b] *Es wurden die Basissätze 6-31G* („kl“) bzw. 6-311+G(d,p) („gr“) benutzt.*

[c] *Relativ zu TMS (Tab. B.1).*

[d] *(180 − χ_{NH}), (180 − χ_{NC}), −ψ_{NH} und −ψ_{NC} sind auch erlaubte Werte.*

Amid-^{15}N

Peptid	Atom Nr.[a]	Basissatz Opt/NMR[b]	σ_{iso} [ppm][c]	δ_a [ppm][c]	σ_{11} [ppm][c]	σ_{22} [ppm][c]	σ_{33} [ppm][c]	χ_{NH} [°][d]	ψ_{NH} [°][d]	χ_{NC} [°][d]	ψ_{NC} [°][d]
GU	N	kl/kl	127	102	65	88	229	8	34	105	40
AU	N	kl/kl	126	96	64	91	222	8	37	105	40
SU	N	kl/kl	130	102	78	81	233	8	62	105	58
FU	N	kl/kl	126	96	63	92	222	8	36	105	37
PU	N	kl/kl	131	101	74	87	232	8	58	105	61
UU	N	kl/kl	128	97	66	92	225	9	31	104	42
UUU	N10	kl/kl	127	102	64	88	229	10	7	106	38
UUU	N15	kl/kl	117	95	48	91	212	11	17	106	8
GUUAAU	N8	kl/kl	129	108	65	85	237	11	4	106	40
GUUAAU	N13	kl/kl	123	97	55	94	220	13	13	104	8
GUUAAU	N19*	kl/kl	117	100	49	85	217	19	28	103	16
GUUAAU	N25*	kl/kl	120	106	52	82	226	17	26	104	20
GUUAAU	N30*	kl/kl	120	100	56	83	220	12	15	107	12
GU	N	gr/gr	154	111	86	110	265	7	32	106	44
AU	N	gr/gr	152	106	83	116	258	7	35	106	41
SU	N	gr/gr	152	119	87	98	271	8	10	107	21
FU	N	gr/gr	148	112	74	110	260	8	4	107	31
PU	N	gr/gr	158	112	93	110	270	8	45	105	57
UU	N	gr/gr	152	102	86	116	254	7	26	106	44
UUU	N10	kl/gr	153	112	83	110	265	10	9	107	40
UUU	N15	kl/gr	142	109	64	111	251	11	17	107	8
GUUAAU	N8	kl/gr	154	120	81	106	274	10	6	107	42
GUUAAU	N13	kl/gr	148	110	72	115	258	12	13	105	9
GUUAAU	N19*	kl/gr	142	113	67	105	255	18	25	103	15
GUUAAU	N25*	kl/gr	145	118	69	103	263	16	25	104	20
GUUAAU	N30*	kl/gr	146	112	75	105	258	11	15	108	11
Experiment	–	–	127	97	69	87	224	15	0	105	36

Tabelle B.5: Chemischer Verschiebungstensor von Amid-^{15}N in Aib-Peptiden.

** Kern ist in eine NH···O=C-Wasserstoffbrücke eingebunden.*

[a] *In Abbildung 4.9.*

[b] *Es wurden die Basissätze 6-31G* („kl“) bzw. 6-311+G(d,p) („gr“) benutzt.*

[c] *Relativ zu NH_3 (Tab. B.1).*

[d] *$(180 - \chi_{NH})$, $(180 - \chi_{NC})$, $-\psi_{NH}$ und $-\psi_{NC}$ sind auch erlaubte Werte.*

Anhang C

NMR von Chrysospermin C in isotropen Bizellen

#	H^N	N^H	H^α	C^α	H^β	C^β	C'	sonstige ^1H	sonstige $^{13}C/^{15}N$	Lipid-NOE[a]	Wasser-NOE[b]
	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[ppm]	[Rest]	
Ac	–	–	–	–	–	–	174.1	2.14 (Me)	24.8 (Me)	–	–
Phe1	8.72	129.1	4.16	61.4	3.01/3.20	39.8	172.2	7.22 (δ)	132.2 (δ)	H^δ, H^ε	$\surd$
								7.13 (ε)	130.8 (ε)		
								7.03 (ζ_2)	128.6 (ζ_2)		
Aib2	8.64	129.4	–	58.5	1.27/1.44	25.3/28.6	175.9	–	–	H_2^β	$\surd$
Ser3	7.47	109.6	4.03	62.1	3.84	63.2	172.8	–	–	–	$\surd$
Aib4	7.89	133.8	–	59.0	1.39/1.46	24.7/29.2	176.3	–	–	–	$\surd$
Iva5	8.05	121.3	–	60.9	1.13, 1.55/2.24	25.1, 27.6	177.1	–	–	–	–
Leu6	7.61	118.4	3.98	58.1	1.65/1.91	41.7	175.8	1.89 (γ)	27.3 (γ)	$H^\delta_{1,2}$	–
								0.85/0.91 (δ)	23.7/25.0 (δ)		
Gln7	8.01	118.4	4.08	58.5	2.10/2.15	28.5	175.9	2.33/2.51 (γ)	34.4 (γ)	–	$\surd$ (H^ε)
								6.68/7.23 (ε)	110.5 (ε)		
Gly8	8.23	108.0	3.47/3.80	47.7	–	–	170.2	–	–	–	–
Aib9	8.38	132.0	–	58.4	1.39/1.48	25.1/28.6	175.1	–	–	–	–
Aib10	7.86	126.6	–	58.6	1.44/1.52	24.9/28.9	177.1	–	–	–	–
Ala11	7.61	118.2	4.12	54.2	1.50	18.9	175.3	–	–	–	–
Ala12	7.85	117.7	4.34	52.4	1.39	19.4	173.0	–	–	–	–
Aib13	7.67	129.7	–	58.8	1.44/1.52	26.0/27.8	–	–	–	$H^\beta_{1,2}$	–
Pro14	–	–	4.22	66.9	1.73/2.36	31.1	174.7	1.91/(2.1)[c] (γ)	28.5 (γ)	–	–
Aib15	7.86	126.9	–	58.9	1.45/1.46	24.9/29.1	176.2	–	–	–	–
Aib16	7.90	126.0	–	58.7	1.38/1.42	25.3/29.1	175.9	–	–	–	–
Aib17	7.46	110.0	–	59.4	1.48/1.51	25.1/29.7	177.3	–	–	H_2^β	–
Gln18	7.81	114.7	4.15	56.8	1.96/2.16	29.0	173.0	2.31 (γ)	34.2 (γ)	–	–
Tro19	7.49	125.4	4.25	56.2	2.81/2.95, 3.68	29.3, 66.6	–	7.25 (δ)	126.0 (δ)	–	$\surd$
								10.21 (ε_1)	128.4 (ε_1)		(H^N, H^ε)
								7.46 (ε_3)	120.8 (ε_3)		
								7.38 (ζ_2)	114.2 (ζ_2)		
								6.90 (ζ_3)	120.8 (ζ_3)		
								7.00 (η_2)	123.5 (η_2)		

Tabelle C.1: Isotrope chemische Verschiebungen von Chrysospermin C in Bizellen.

[a] *Beobachtet im 3D ^{13}C-F1-gefilterten, ^{13}C-F3- separierten NOESY-HSQC-Spektrum.*

[b] *Beobachtet im 3D (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-HSQC-Spektrum.*

[c] *Pro $H^{\gamma 2}$ wurde aufgrund der Überlagerung mit Gln $H^{\beta 2}/H^{\beta 3}$ nicht eindeutig zugeordnet.*

Experiment	sw_1 [a] [ppm]	sw_2 [ppm]	sw_3 [ppm]	t_1 [b] [Pkt.]	t_2 [Pkt.]	t_3 [Pkt.]	n_1 [c] [Pkt.]	n_2 [Pkt.]	n_3 [Pkt.]	nt[d] [s]	d_1 [e] [ms]	mix[f] [ppm]	^{13}C[g]
U-^{15}N-CSC													
2D (^{15}N-^{1}H)-HSQC	13.3	14.9	–	1600	80	–	4096	512	–	4	1.2	–	–
2D (^{15}N-^{1}H)-HSQC (^{2}H-Austausch)	13.3	14.9	–	1792	24/48	–	4096	256	–	4/8	0.8	–	–
2D ^{15}N{^{1}H}-NOESY[i]	13.3	11.9	–	1408	64	–	1096	512	–	96	0[h]	3000	–
3D (^{1}H-^{1}H-^{15}N)-NOESY-HSQC	12.0	12.0	14.9	1408	176	32	1024	512	256	8	1.2	100	–
U-^{13}C,^{15}N-CSC													
2D (^{13}C-^{1}H)-HSQC	13.3	137.8	–	896	512	–	4096	2048	–	4	1	–	71.9
2D *ct*-(^{13}C-^{1}H)-HSQC (H$^{\beta}$)	10.0	6.6	–	896	64	–	4096	512	–	16	1	–	27.3
3D HNCO	12.5	8.6	14.7	768	32	20	4096	256	256	8	1.2	–	173.8
3D HNCA	11.6	16.6	14.6	1408	48	20	2048	256	128	48	1.2	–	54.8
3D CBCACONH	9.2	36.5	14.6	896	32	16	1024	256	128	176	1	–	41.4
3D (^{1}H-^{1}H-^{13}C)-NOESY-HSQC	11.7	11.7	72.9	960	128	30	2048	512	256	8	1.2	100	79.0
3D *ct*-(^{1}H-^{1}H-^{13}C)-NOESY- HSQC (H$^{\beta}$)	10.0	10.0	6.6	1088	200	32	4096	512	256	8	1.2	50	27.3
U-^{13}C,^{15}N-CSC + unmarkiertes CSC													
3D ^{13}C-F1-gefiltertes, ^{13}C-F3-separiertes NOESY-HSQC	10.0	10.0	33.3	768	80	24	2048	512	256	48	1	100	66.6
2D ^{13}C/^{15}N-F1-gefiltertes NOESY-HSQC	11.5	11.5	–	896	128	–	4096	1024	–	1024	1.2	100	66.6

Tabelle C.2: Akquisitions- und Prozessierungsparameter der NMR-Experimente.

[a] *Aufgenommene spektrale Weite, sw_1 ist hierbei die direkte Dimension.*

[b] *Anzahl komplexer Punkte bei der Datenaufnahme.*

[c] *Anzahl realer Punkte nach Fouriertransformation und Reduktion der spektralen Weite.*

[d] *Anzahl von Wiederholungsexperimenten für jedes Inkrement.*

[e] *Wiederholzeit zwischen den Inkrementen.*

[f] *Mischzeit bei NOESY-Experimenten.*

[g] *^{13}C-Trägerfrequenz. Die ^{15}N-Trägerfrequenz lag, wenn verwendet, immer bei 127.6 ppm.*

[h] *Zu Beginn des ^{2}H-Austausches wurden 24 Inkremente mit 4 Wiederholungen, ab 30 Minuten nach Beginn 48 Inkremente mit 8 Wiederholungen verwendet.*

[i] *Die NOE-Mischzeit von 3 s wird im Nullexperiment auch benutzt, allerdings ohne HF-Einstrahlung auf dem ^{1}H-Kanal. Eine zusätzliche Wiederholzeit war daher nicht nötig.*

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die geltende Promotionsordnung der Physikalisch-Astronomischen Fakultät ist mir bekannt.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, den 9.April 2001

Lebenslauf

	Bert Heise
06. 07. 1969	geboren in Dortmund
	ledig
1976 – 1980	Grundschule Westhofen
1980 – 1989	Ruhrtalgymnasium Schwerte
1989	Abitur
1989 – 1990	Wehrdienst
1990 – 1994	Studium der Physik, Universität Dortmund
1994 – 1996	Diplomarbeit „^{7}Li-Kernspinresonanz-Untersuchungen an Li_2S-GeS_2-Gläsern“
1996	Hochschulabschluß zum Diplom-Physiker
1996 – 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekulare Biotechnologie Jena
2001	Dissertation „NMR-Spektroskopie an Peptaibolen im Festkörper und in Lösung: Chemische Verschiebungstensoren in α-Aminoisobuttersäure und Strukturuntersuchungen an Chrysospermin C“, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Jena, den 9. April 2001