

Skalare Kopplungen – ihre Analyse und ihre Verwendung zur Strukturaufklärung

Matthias Eberstadt, Gerd Gemmecker, Dale F. Mierke und Horst Kessler*

Richard R. Ernst gewidmet

Die skalaren Kopplungskonstanten stehen seit ihrer Entdeckung in den frühen fünfziger Jahren im Zentrum des Interesses der NMR-Spektroskopiker. Ihre Bedeutung für die Strukturaufklärung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie beruht auf der Erkenntnis, daß die Größe einer Kopplungskonstante mit der Molekülkonformation in einem einfachen Zusammenhang steht. Für viele Substanzklassen stehen heute parametrisierte Karplus-Gleichungen zur Verfügung, die die Abhängigkeit der vicinalen (d. h. Dreibindungs-) Kopplungskonstanten vom Diederwinkel bezüglich der zentralen Bindung charakterisieren. Neben der Verwendung von Proton-Proton-Abständen aus NOE-Experimenten ist daher der Einsatz von Kopplungskon-

stanten in der modernen Konformationsanalyse heute nicht mehr wegzudenken. Mit steigender Molekülgröße der zu untersuchenden Substanzen werden jedoch immer trickreichere Experimente notwendig, um die störenden Einflüsse von Überlagerungen und wachsender Breite der Signale auszuschalten. Eine große Zahl experimenteller Techniken zur Bestimmung von Kopplungskonstanten wurde bis heute entwickelt, wobei je nach Problemstellung die richtige Methode sorgfältig ausgewählt werden muß, damit sich die Kopplungskonstanten möglichst exakt ermitteln lassen und dabei die Meßzeit effizient genutzt wird. Auch in der Computer-gestützten Strukturbestimmung können Kopplungskonstanten

heute – wie Abstände aus NOE-Daten bereits seit längerem – verwendet werden. Dadurch wird nicht nur die Qualität der berechneten Strukturen verbessert, sondern es können auch Moleküleigenschaften wie die interne Dynamik besser beschrieben werden. Dieser Artikel soll eine Übersicht über die heute existierenden Techniken liefern und damit auch dem Nichtexperten als Entscheidungshilfe für die richtige Wahl des Experiments dienen. Daneben wird das Verwenden von Kopplungskonstanten in Computersimulationen diskutiert.

Stichworte: NMR-Spektroskopie
Strukturaufklärung

1. Einleitung

Die indirekte, skalare Spin-Spin-Kopplung (*J*-Kopplung) ist seit ihrer Entdeckung in der Frühzeit der NMR-Spektroskopie durch Gutowsky et al.^[1, 2] sowie, unabhängig davon, durch Hahn und Maxwell^[3, 4] ein wichtiger Strukturparameter. Da sie durch die Bindungselektronen vermittelt wird, liefert sie mit der Konnektivität der koppelnden Kerne die wichtigste Information über die Konstitution der Moleküle. Die Größe einer Kopplungskonstante hängt dabei nicht nur von der Zahl der die koppelnden Kerne trennenden Bindungen ab, sondern auch von der Elektronenkonfiguration und räumlichen Anordnung der Kerne^[5, 6]. Gerade letzteres läßt sich zur Ermittlung der Stereo-

chemie (Konfiguration und Konformation) nutzen, und dies soll der Schwerpunkt dieser Übersicht sein.

Viele *J*-Kopplungen zeigen eine deutliche Abhängigkeit von Diederwinkeln und können daher Informationen über diese wichtigen Konformationsparameter liefern. Besonders ausgeprägt ist dieser Zusammenhang bei ³*J*-Kopplungen, die über Karplus-Beziehungen mit den entsprechenden Diederwinkeln korreliert sind, z.B. die ³*J*_{H_N, H_α}-Kopplung in Aminosäuren mit dem Konformationswinkel ϕ (vgl. Abb. 1 a). Solche *J*-Kopplungen wurden schon frühzeitig als Konformationsparameter eingesetzt, hatten aber in der letzten Dekade wegen der dominierenden Rolle der NOE-Werte als Abstandsparameter vorübergehend an Bedeutung verloren^[7–9]. In jüngster Zeit beobachtet man jedoch eine Renaissance der Nutzung von *J*-Kopplungen. Dies liegt zum einen daran, daß es eine ganze Reihe neuer Methoden gibt, mit denen die Kopplungskonstanten immer genauer bestimmt werden können^[10–13], und daß früher nicht zugängliche Kopplungskonstanten mit Hilfe mehrdimensionaler Methoden auch bei sehr großen Molekülen gemessen werden können^[14–16]; zum anderen wurden neue Wege gefunden, die gemessenen *J*-Werte in Strukturberechnungen einzusetzen^[17–20]. Dadurch steht ein größerer Datensatz zur Verfü-

[*] Prof. Dr. H. Kessler, Dr. M. Eberstadt, Dr. G. Gemmecker
Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Telefax: Int. + 89/3209-3210
Prof. Dr. D. F. Mierke
Gustaf H. Carlson School of Chemistry
Clark University
950 Main Street, Worcester, MA 01610 (USA)

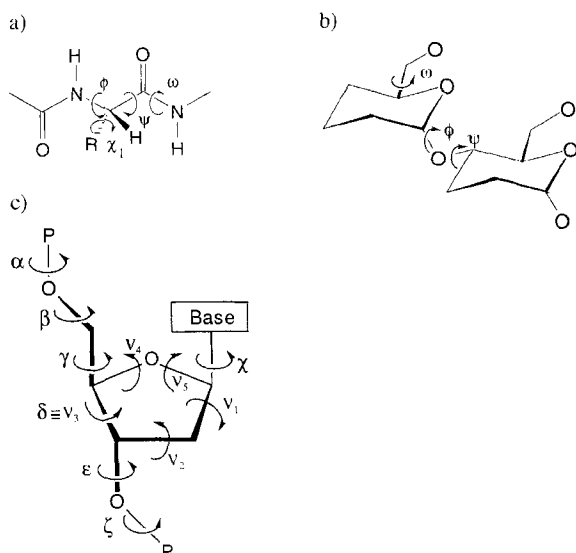


Abb. 1. Diederwinkel in Peptiden, Glycosiden und Nucleinsäuren. a) Peptidfragment (L-Aminosäure) mit den relevanten Diederwinkeln für das Peptidrückgrat und die Seitenketten nach der IUPAC-IUB-Nomenklatur. b) Diederwinkel ϕ , ψ und ω in Oligosacchariden: $\phi = \text{H1-C1-O1-C}_x$, $\psi = \text{C1-O1-C}_x\text{-H}_x$, $\omega = \text{C1-O1-C6-C5}$. c) Torsionswinkel des Zuckerphosphat-Gerüsts sowie der glycosidische Winkel χ bei Nucleinsäuren.

gung, so daß man nicht nur die Zuverlässigkeit der NMR-spektroskopisch ermittelten Strukturen erhöhen kann, sondern auch Informationen über Teilflexibilität und interne Moleküldyna-

mik erhält^[21, 22]. Beides spielt für das Verständnis der Wechselwirkung von Molekülen miteinander („molekulare Erkennung“) eine nicht zu unterschätzende Rolle.

An dieser Stelle möchten wir auf die IUPAC-IUB-Bezeichnungen der Diederwinkel für die wichtigsten Biopolymere hinweisen (Abb. 1), da später öfter darauf Bezug genommen wird^[23]. Konformation und Dynamik dieser Verbindungen stehen heute im Zentrum des Interesses in der bioorganischen Chemie, und wir werden hier vor allem auf die speziellen Probleme bei der Messung von *J*-Kopplungen solcher Moleküle eingehen. Anhand dieser Kopplungen (homo- und heteronuclear) lassen sich die meisten Torsionswinkel charakterisieren.

Im folgenden sollen zunächst die Grundlagen der verschiedenen Methoden zur Bestimmung von Kopplungskonstanten erläutert werden. Welche im konkreten Fall jeweils ausgewählt wird, hängt davon ab, wie groß die Moleküle sind, welche Kopplungen mit welcher Genauigkeit bestimmt werden sollen und ob eine isotonenangereicherte Substanz vorliegt.

Vor allem in den letzten Jahren wurden zahlreiche neue mehrdimensionale Techniken entwickelt, deren Vielfalt selbst dem NMR-Experten oft die Wahl des für die spezifische Fragestellung optimalen Experiments erschwert. Es ist unser Anliegen, mit dieser Übersicht hier eine Literaturlücke zu schließen. Dabei werden die Methoden nach der Art der Bestimmung in Abschnitte zusammengefaßt, was eine Übersicht über die Vielzahl der bereits existierenden Verfahren erleichtern soll. Zum Schluß wird die Verwendung von *J*-Werten in Distanz-Geometrie- und Moleküldynamik-Rechnungen besprochen.

Horst Kessler, geboren 1940 in Suhl, Thüringen, studierte Chemie in Leipzig und Tübingen und promovierte 1966 bei Eugen Müller über ein präparativ-organisches Thema. Er habilitierte sich 1969 über den Nachweis innermolekularer Beweglichkeit durch NMR-Spektroskopie und wurde 1971 C4-Professor für Organische Chemie an der Frankfurter Universität. 1989 nahm er einen Ruf an die Technische Universität München an. 1986 erhielt er den Otto-Bayer-Preis und 1988 die Max-Bergmann-Medaille für Peptidchemie. Gastprofessuren führten ihn nach Halifax, Tokio, Madison und Haifa. Seine Arbeitsgebiete umfassen das rationale Moleküldesign auf der Basis der Konformation, die Synthese und Struktur von Peptiden und Peptidmimetika und die Entwicklung und Anwendung von NMR-Techniken und Rechenverfahren zur Bestimmung von Molekülstrukturen.

Dale F. Mierke, geboren 1961 in Sacramento, Kalifornien, erhielt 1984 den Bachelor of Sciences in den beiden Fächern Physikalische Chemie und Biologie an der University of California, Irvine. Unter Anleitung von Murray Goodman promovierte er an der University of California, San Diego, über die strukturellen Eigenschaften von Peptiden. 1990 verbrachte er als Fulbright-Stipendiat in der Gruppe von Horst Kessler, in der er dann bis 1993 blieb. Inzwischen arbeitet er an der Gustav H. Carlson School of Chemistry und dem Pharmacology Department der Clark University sowie am Medical Center der University of Massachusetts in Worcester, Massachusetts.

Gerd Gemmecker, geboren 1961 in Hanau am Main, studierte von 1981 bis 1986 Chemie in Frankfurt und promovierte 1989 bei Horst Kessler über NMR-Untersuchungen an cyclischen Peptiden. 1990/1991 arbeitete er als Postdoc bei S. W. Fesik (Abbott Labs., USA) an der NMR-spektroskopischen Strukturauflösung der Komplexe Cyclophilin/Cyclosporin A und FKBP/Ascomycin mit. Von 1991 bis 1993 untersuchte er als Liebig-Stipendiat an der TU München Proteinstrukturen mit NMR-Methoden und seit 1994 beschäftigt er sich dort im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 369 „Grundlagen des Sekundärstoffwechsels“ auch mit NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Protein-Nucleinsäure-Komplexen.

Matthias Eberstadt, geboren 1967 in Hof, Bayern, studierte von 1986 bis 1991 Chemie an der Technischen Universität München und schloß mit einer Diplomarbeit über die Bestimmung von Kopplungskonstanten bei Horst Kessler ab. Von 1992 bis 1995 arbeitete er in dessen Arbeitsgruppe an seiner Promotion. Seine Interessen gelten den experimentellen und theoretischen Untersuchungen zur Struktur von Proteinen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie.

2. Die Bestimmung von Kopplungskonstanten

Allgemeines

Die skalare Kopplung von Kernen A mit Kernen X bewirkt eine Aufspaltung des Signals von A, die aus der unterschiedlichen Orientierung der Kernspins der Kopplungspartner X im Magnetfeld resultiert. Spin- $1/2$ -Kerne sind bezüglich des äußeren B_0 -Feldes in zwei Zustände, α und β , polarisiert, d. h. bei 50 % der in der Probe vorhandenen Moleküle liegt der X-Kern im α -Kernspinzustand vor (X^α), bei den anderen 50 % im β -Spinzustand (X^β). X^α und X^β führen zu unterschiedlichen lokalen Magnetfeldern am Ort von Kern A und daher zu zwei Signalen im Spektrum, die um den Wert der Kopplungskonstante $J_{A,X}$ separiert sind. Die Größe der Kopplungskonstante ist im Gegensatz zur chemischen Verschiebung unabhängig vom äußeren Magnetfeld. Wir werden uns im folgenden nur mit schwach gekoppelten Spinsystemen befassen. Das bedeutet, daß die Kopplungskonstante J klein im Vergleich zur Differenz der chemischen Verschiebung, $\Delta\nu$, der koppelnden Kerne ist. Zur Analyse der vor allem bei niedrigen Feldstärken häufig auftretenden starken Kopplungen (Spinsysteme höherer Ordnung) möchten wir auf die zahlreichen Lehrbücher verweisen^[24–29].

Bei Spinsystemen erster Ordnung (d. h. mit schwacher Kopplung) sind im einfachsten Fall die Multiplettlinien gut separiert, und der J -Wert kann direkt aus dem eindimensionalen (1 D) Spektrum abgelesen werden (siehe Abb. 2 oben). Bei Signalüberlagerung im 1 D-Spektrum hilft oft die Aufnahme eines zweidimensionalen (2 D) Spektrums, da die Kreuzsignale in ihrer Feinstruktur in der Regel die gleichen Multiplizitäten enthalten wie die entsprechenden 1 D-Signale. Man kann also bei wohl separierten Multiplettlinien Kopplungskonstanten einfach aus dem Querschnitt eines Kreuzsignals ablesen (in der Regel in der direkt detektierten Dimension, in der eine ausreichende digitale Auflösung einfach zu erreichen ist). Allerdings gibt es einige 2 D-Techniken, deren Kreuzsignale normalerweise keine sauberen Phasen aufweisen, z. B. das häufig verwendete TOCSY-Experiment. In solchen Fällen hilft das Einfügen eines z-Filters^[30, 31] vor der Detektion oder die Verwendung selektiver Pulse^[32]. Auf die Verwendung modifizierter 1 D-Techniken zur Bestimmung von Kopplungskonstanten (selektive 1 D-Äquivalente^[33, 34], chemical shift selective filters (CSSF)^[35, 36]) sei hier nur am Rande verwiesen.

Bei mehrdimensionalen Spektren unterscheiden wir *aktive* und *passive* Kopplungen. Koppeln zwei Kerne A und X miteinander, so ermöglicht die Kopplungskonstante $J_{A,X}$ einen Kohärenztransfer zwischen diesen aktiven Kernen und führt zu einem entsprechenden Kreuzsignal (A, X). Die Kopplungskonstante $J_{A,X}$ wird daher als aktive Kopplung bezeichnet. Alle weiteren Kopplungen, beispielsweise $J_{A,M}$ oder $J_{M,X}$ zu einem dritten Kern M, werden als passive Kopplungen bezeichnet. Die chemische Verschiebung eines passiven Kerns taucht nicht im (A,X)-Kreuzsignal auf. Je nach der Größe des Spinsystems sind auch mehrere passive Kopplungen möglich. Aktive und passive Kopplungen können sich im Spektrum in der Phasenlage unterscheiden: Im 2 D-COSY-Experiment z. B. befindet sich die aktive Kopplung in Antiphasse und die passiven Kopplungen in Phase; im 2 D-TOCSY-Experiment dagegen befinden sich alle Kopplungen in Phase^[25]. Beispiele für In-Phase- und Antiphasse-Signale finden sich in Abbildung 2.

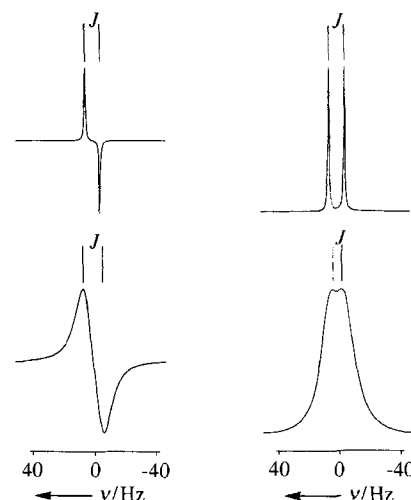


Abb. 2. Vergleich von Antiphasse- (links) und In-Phase-Dubletts (rechts) mit einer Kopplungskonstante J von 10.0 Hz bei verschiedenen Signalbreiten: Halbwertsbreite 1 Hz (obere Reihe), 15 Hz (untere Reihe). Während oben die vollkommene Trennung der beiden Signalkomponenten in beiden Fällen denselben (richtigen) Wert für die Kopplungskonstante liefert, ist im unteren Fall die gemessene Antiphasse-Kopplung zu groß und die gemessene In-Phase-Kopplung zu klein.

Im weiteren Verlauf unseres Beitrags soll dieser einfachste Fall (vollständig separierte Multiplettlinien) nicht weiter berücksichtigt werden, vielmehr sollen Techniken vorgestellt werden, die die zuverlässige Extraktion von Kopplungskonstanten auch aus Signalen mit nicht aufgelöster Feinstruktur ermöglichen.

Kopplungskonstanten sind oft von der gleichen Größenordnung wie die natürliche Signalbreite. Diese hängt vor allem vom Molekulargewicht der Substanz ab: kleine Moleküle, die sich in Lösung schnell umorientieren, liefern relativ schmale Signale (1 Hz oder weniger), wohingegen die Spektren großer Moleküle breitere Signale aufweisen (z. B. 20–30 Hz bei mittelgroßen Proteinen). Wenn nun die Signalbreiten nicht mehr vernachlässigbar klein gegenüber den Kopplungskonstanten sind, dann sind die einzelnen Multiplettlinien nicht mehr basisliniengetrennt, und der Signalabstand (d. h. der Abstand der Signalmaxima) entspricht nicht mehr exakt der Kopplungskonstante. Wie aus Abbildung 2 zu entnehmen ist, wird mit steigender Signalbreite die Kopplungskonstante im Fall von Antiphasse-Signalen überschätzt^[37] und im Fall von In-Phase-Signalen unterschätzt. Bei der Wahl der Meßtechnik zur Bestimmung der gewünschten Kopplungskonstante ist daher sehr darauf zu achten, daß die Signalbreite berücksichtigt wird; dies gilt natürlich besonders bei großen Molekülen, spielt aber auch bei kleineren Molekülen eine Rolle, wenn man an sehr kleinen Kopplungskonstanten interessiert ist oder wenn bei tiefen Temperaturen oder in viskosen Lösungsmitteln gemessen wird.

Übersicht über die Techniken zur Bestimmung von Kopplungskonstanten

Zunächst werden wir Verfahren besprechen, die die Kopplungskonstante aus der Signalform in ein- oder mehrdimensionalen Spektren entnehmen oder Referenzspektren in die Analyse mit einbeziehen. Als nächstes folgen mehrdimensionale Methoden, die ein E.COSY-Muster erzeugen, aus dem die passive

Tabelle 1. Die Bestimmung von Kopplungskonstanten aus der Signalform.

| Name | Kurzbeschreibung | Anmerkungen [a] | Literatur |
|--|---|--|--------------|
| <i>homonucleare Kopplungen</i> | | | |
| A) Kopplungen aus 1 D-Spektren | | | |
| a) z-gefilterte Spektren | reine Phasen, z.B. bei 2D-TOCSY | V.: 1 D und 2 D möglich N.: wegen z-Filter zeitaufwendig | [30, 31] |
| b) selektive Entkopplung [b] | selektive Entkopplung und Spektrensimulation | V.: genaue Methode N.: auf kleine Moleküle beschränkt, selektive Entkopplung nötig | [45] |
| c) J-Verdopplung [b] | rechnerische Manipulation von Meßdaten | V.: auch multidimensional möglich, genaue Methode N.: auf kleine Moleküle beschränkt | [41, 42] |
| B) Kopplungen aus Antiphase-Multipletts | | | |
| a) AX-Kopplungen aus COSY [b] | Auswertung mit einem dispersiv und einem absorptiv gerechneten Spektrum | V.: einfach durchführbar, auch für mittelgroße Moleküle geeignet N.: gutes Signal-Rausch-Verhältnis notwendig, nur für AX-Spinsysteme | [38] |
| b) DISCO [b] | Kombination von Antiphase-Signalen [c] mit anderen In-Phase- [d] oder Antiphase-Signalen [c] | V.: auch bei komplizierten Signalmustern und Überlagerungen geeignet N.: richtige Skalierung interaktiv zu ermitteln, bei komplexen Multipletts schwierig | [11, 39, 40] |
| c) Konvolution komplementärer Multipletts [b] | ähnlich DISCO-Verfahren, aber mit computer-unterstützter Auswertung | V.: genauer als DISCO | [43] |
| C) Kopplungen aus In-Phase-Multipletts | | | |
| a) Analyse von In-Phase-Multipletts nach inverser FT [b] | rechnerische Manipulation der Meßdaten von In-Phase-Multipletts | V.: aus NOESY oder HSQC, auch für große Moleküle geeignet N.: nur für AX-Spinsysteme | [15] |
| b) HMQC mit „Purge“-Puls | aus ^{15}N -HMQC-Spektrum | V.: empfindlich N.: große Linienbreite problematisch, ^{15}N -Anreicherung nötig | [164, 165] |
| <i>Heteronucleare Kopplungen</i> | | | |
| a) 2D-J-Spektroskopie | heteronucleare Kopplung wird in F_1 aus Multiplett abgelesen | N.: nur für kleine Moleküle geeignet, direkte Detektion (unempfindlich), keine rein absorptiven Signale | [166–168] |
| b) selektives INEPT | wie a) | V.: empfindlicher als 2D-J N.: Protonen müssen freiliegen, nur für kleine Moleküle, direkte Detektion (unempfindlich) | [169] |
| c) DEPT-J-Spektroskopie | wie a) | V.: Multiplizitäts-Editierung möglich N.: wie bei 2D-J | [170, 171] |
| d) HMBC mit homonuclearem Referenzspektrum [b] | Konvolution von hetero- und homonuclearen Multipletts; Kopplung ist das Ergebnis einer Anpassung | V.: Kopplungen auch zu quartären Kohlenstoffatomen meßbar, viele Kopplungen pro Spektrum, empfindlich, da invers detektiert N.: gutes Signal-Rausch-Verhältnis notwendig, hoher Meßzeitbedarf | [12, 48, 51] |
| e) FIDS-HSQC | heteronucleare Kopplungen, z. B. $^3J(\text{C}, \text{P})$, $^3J(\text{H}, \text{P})$ in Nucleotiden | V.: empfindliche Methode N.: erfordert gutes Signal-Rausch-Verhältnis | [76] |

[a] V. = Vorteil(e), N. = Nachteil(e). Die Bewertungen entsprechen unserer persönlichen Erfahrung, können sich aber bei speziellen Problemstellungen durchaus verschieben.
[b] Genauere Beschreibung im Text. [c] Beispielsweise aus COSY, P.COSY, E.COSY, P.E.COSY. [d] Aus 1 D-Signalen oder refokussierten COSY-Spektren mit z-Filter oder TOCSY-Spektren mit z-Filter.

Kopplungskonstante bestimmt wird. Zum Schluß werden wir Verfahren vorstellen, bei denen die Kopplungskonstante aus der Signalintensität in korrelierten Spektren bestimmt wird.

Da in der nun folgenden Besprechung von Techniken zur Bestimmung von Kopplungskonstanten nicht auf alle publizierten Verfahren eingegangen werden kann, möchten wir mit den Tabellen 1–3 einen Überblick verschaffen. In ihnen sind die wichtigsten der heute genutzten Experimente zur Bestimmung von Kopplungskonstanten zusammengefaßt. Wir möchten an dieser Stelle auch darauf hinweisen, daß einige der vorgestellten Techniken durch die Verwendung von gepulsten Feldgradienten durchaus verbessert werden können (siehe z.B. Abschnitt 2.3.4), wollen uns hier jedoch auf die Originalliteratur beschränken und nicht auf alle Varianten eingehen. In den Abschnitten 2.1–2.3 werden daher nur die wichtigsten Experimente exemplarisch im Detail erläutert.

2.1. Die Bestimmung von Kopplungskonstanten aus der Signalform

In diesem Abschnitt werden Verfahren angeführt, die in der Hauptsache bei kleineren Molekülen angewendet werden und zur Bestimmung homo- und heteronuclearer Kopplungskonstanten geeignet sind. Für die heteronuclearen Techniken ist dabei vor allem wünschenswert, daß sie an Molekülen mit natürlicher Isotopenverteilung durchgeführt werden können und daher möglichst empfindlich sind.

Grundsätzlich beruhen alle diese Techniken darauf, daß man bei der Aufnahme der Spektren eine teilweise Überlagerung von Multiplettlinien in Kauf nimmt und den dadurch entstandenen Fehler nachträglich korrigiert, indem man entweder zusätzliche, von der Signalform abhängige Parameter zu Hilfe nimmt oder ein Modell an das experimentelle Signal anpaßt (evtl. unter Verwendung eines Referenzsignals). Diese Verfahren setzen jedoch voraus, daß die Signaltbreiten nicht deutlich größer als die Kopp-

Tabelle 2. Techniken, die E.COSY-Muster ergeben.

| Name | Anwendung | Anmerkungen [a] | Literatur |
|--|---|--|--|
| <i>homonucleare Kopplungskonstanten</i> | | | |
| A) aus homonuclearen Spektren | | | |
| E.COSY | passive Kopplungen aus Kombination von Multiquantenspektren | V.: homonuklear, gute Auflösung N.: mind. drei koppelnde Spins notwendig | [11, 54, 55] |
| P.E.COSY | Kombination von β -COSY mit Referenzspektrum | V.: einfacher und empfindlicher als E.COSY N.: Nicht so exakt wie E.COSY | [54, 59] |
| z-COSY | Pulssequenz wie NOESY, Pulse werden mit kleinem Flipwinkel durchgeführt | V.: Absorptive Diagonale N.: Gleichzeitiges Auftreten von NOE-Kreuzsignalen, weniger empfindlich als E.COSY und P.E.COSY | [172] |
| soft-COSY | Erzeugung von E.COSY-Signal durch Einsatz von selektiven Pulsen | V.: empfindliche Methode, nur für kleine Moleküle N.: selektive Pulse, für mehrere Kopplungen oft viele Spektren nötig | [173, 174] |
| PICSY | Einsatz selektiver Pulse bei TOCSY, E.COSY mit in-Phase Signalkomponenten | V.: In-Phase Multipletts N.: selektive Pulse, nur für kleine Moleküle | [44] |
| B) aus heteronuclearen Spektren | | | |
| I) Heterokerne in natürlicher Häufigkeit | | | |
| JHH-TOCSY | Erzeugung von E.COSY-Signalen mit Signalkomponenten in Phase oder in Antiphase zueinander funktioniert nicht bei XH_2 | V.: Nutzung der $^1J(\text{X},\text{H})$ -Kopplung, auch für ^{15}N -markierte Proteine geeignet N.: nur für XH-Gruppen geeignet, | [175] |
| XLOC | Verwendung selektiver Protonen-Pulse | V.: Kohärenztransfer nicht abhängig von $J(\text{H},\text{H})$, keine Einschränkungen bezüglich der X-Spin-Multiplizität | [176] |
| II) bei Isotopenanreicherung | | | |
| Tripelresonanz-Experimente | $^3J(\text{H}^{\text{N}},\text{H}^{\alpha})$ -Kopplung in Proteinen oder Peptiden | – erste Implementierung – Empfindlichkeitssteigerung – Verwendung von Gradienten und weitere Empfindlichkeitssteigerung | [13] [14] [177] |
| HCCH-E.COSY-Techniken | $^3J(\text{H},\text{H})$ -Kopplungen in Peptiden und Proteinen, z. B. $^3J(\text{H}^{\alpha},\text{H}^{\beta})$ | – mit β -Puls – mit selektivem Puls – Anwendung auf $^3J(\text{H}^{\alpha},\text{H}^{\beta})$ -Kopplungen in Proteinen – mit TOCSY für C,C-Transfer | [87] [86] [89, 181] [88, 178] |
| <i>heteronucleare Kopplungskonstanten</i> | | | |
| I) Heterokerne in natürlicher Häufigkeit | | | |
| soft-H, C-COSY | Einsatz von weichen Hetero-Pulsen zur Erzeugung des E.COSY-Musters | N.: unempfindlich, selektive Pulse | [179] |
| HSQC | heteronucleare Kopplungen, z.B. $^3J(\text{C},\text{P})$ und $^3J(\text{H},\text{P})$ in Nucleotiden | | [75] |
| HETLOC [b] | ω_1 -gefiltertes TOCSY-Spektrum | V.: einfache Pulssequenz, BIRD-Puls, ermöglicht schnelle Pulswiederholung N.: nur Kopplungen zu protonentragenden Heterokernen meßbar | |
| BIRD-3D-HSQC-TOCSY | $^3J(\text{H}^{\beta},\text{C}^{\beta})$ -Kopplung | V.: natürliche Häufigkeit oder „random labeling“ | [180] |
| II) bei Isotopenanreicherung [c] | | | |
| homonucleare Techniken | keine heteronucleare Entkopplung | V.: sehr einfache Methode N.: nur für isolierte Kerne (^{15}N) | [60, 61] |
| bandselektive Entkopplung von homonuclearen Spektren | selektive heteronucleare Entkopplung | V.: sehr einfache Methode N.: selektive Entkopplung | [181] |
| HYSEL-CH, REPAY-CH, CH_2 | heteronucleare $^3J(\text{C},\text{H})$ -Kopplungen | V.: Eliminierung der Diagonale, Editing möglich | [189] |
| Tripelresonanz-Experimente | zur Bestimmung der $^3J(\text{H}^{\text{N}},\text{C}^{\alpha})$ -, $^3J(\text{N}(\text{i}),\text{H}^{\alpha}(\text{i} - 1))$ - oder $^3J(\text{H}^{\text{N}},\text{C}^{\beta})$ -Kopplung in Peptiden | V.: auch für große Proteine geeignet | [4, 177, 183–188, 190, 194] |
| HCCH-E.COSY-Techniken | heteronucleare Kopplungen, z. B. $^3J(\text{H}^{\beta},\text{C}^{\alpha})$ in Peptiden | V.: genaue Methode, auch auf große Moleküle anwendbar N.: Markierung notwendig | [89, 182] |

[a] Siehe Fußnote von Tabelle 1. [b] Für eine genauere Beschreibung siehe die angegebene Literatur. [c] Bei hoher natürlicher Häufigkeit (z.B. ^{31}P) natürlich ohne Anreicherung möglich.

Tabelle 3. Die Bestimmung von Kopplungskonstanten aus der Signalintensität.

| Name | Kurzbeschreibung | Anmerkungen [a] | Literatur |
|--|--|--|-----------|
| COLOC | Constant-time-Experiment | V.: einfacher Zusammenhang zwischen Intensität und Kopplungskonstante N.: direkte Detektion, unempfindlich, meist nur zur qualitativen Abschätzung geeignet | [47] |
| HMBC | protonendetektiertes Experiment zur Bestimmung von Weitbereichskonnektivitäten | V.: empfindlich, da inverse Detektion N.: Berücksichtigung homonuclearer Kopplungen notwendig, meist nur zur qualitativen Abschätzung geeignet | [46] |
| selektives HMBC | wie HMBC, mit selektiven ^{13}C -Pulsen | V.: bessere Auflösung als bei HMBC N.: selektive Pulse nötig, sonst wie HMBC | [93] |
| ^{15}N , ^1H -COSY | ähnlich wie HSQC, für $^3\text{J}(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\text{P}})$ in Peptiden | V.: sehr genaue Methode N.: zeitaufwendig, ^{15}N -Anreicherung nötig | [94, 95] |
| LRCC | Hetero-hetero-Kopplungen, z.B. $^3\text{J}(\text{C}, \text{C})$ in Proteinen | V.: anders nur schwer zugängliche Kopplungen zu bestimmen N.: Isotopenmarkierung notwendig | [98] |
| LRCH | heteronucleare Kopplungen, z.B. $^3\text{J}(\text{H}^{\beta}, \text{C}^{\beta})$ und $^2\text{J}(\text{H}^{\gamma}, \text{C}^{\beta})$ | | [99] |
| CT-HSQC-Differenz | Constant-time-HSQC-gekoppelt und entkoppelt aufnehmen, z.B. $^2\text{J}(\text{C}, \text{N})$ | V.: empfindlich, anders nur schwer zugängliche Kopplungen zu bestimmen N.: evtl. Störung durch Relaxationseffekte | [104] |
| C-C-Korrelation | Constant-time-Experiment, Kopplung wird aus dem Verhältnis zweier Signale bestimmt, z.B. $^2\text{J}(\text{C}, \text{C})$ | V.: empfindlich, anders nur schwer zugängliche Kopplungen zu bestimmen N.: evtl. Störung durch Relaxationseffekte, ^{13}C -Anreicherung | [97] |
| $\text{H}_\text{N}\text{NH}_{\text{Aa}}$ -COSY | heteronucleare Kopplungen, z.B. $^3\text{J}(\text{H}^{\beta}, \text{N})$ | | [191] |
| HNHA | $^3\text{J}(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\text{P}})$ | V.: sehr empfindlich, ^{15}N -Markierung ausreichend N.: evtl. Störung durch Relaxationseffekte, nicht für sehr große Proteine geeignet | [16] |

[a] Siehe Fußnote von Tabelle 1.

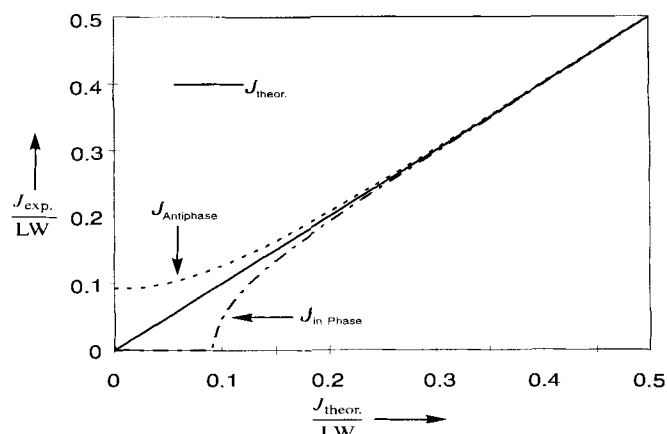


Abb. 3. Meßbare Aufspaltung $J_{\text{exp.}}/LW$ eines Dubletts aus Lorentz-Linien als Funktion der reduzierten wahren Kopplungskonstante $J_{\text{theor.}}/LW$ (LW = line width), Antiphase- und In-Phase-Signale sind getrennt dargestellt. Im Bereich von ca. 0.15–0.3 können die Abweichungen der gemessenen Werte sowohl für In-Phase- als auch für Antiphase-Dubletts noch durch Berücksichtigung der Signalförmigkeit korrigiert werden. Bei Werten <0.1 wird bei Antiphase-Signalen eine von $J_{\text{exp.}}$ weitgehend unabhängige Aufspaltung gemessen, während sie bei In-Phase-Signalen ganz verschwindet, so daß eine Korrektur der Meßwerte unmöglich wird.

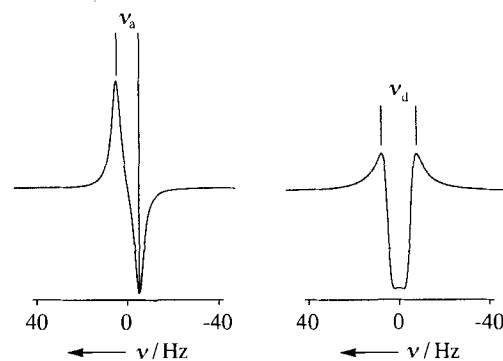


Abb. 4. Meßbare Trennung der Signalmaxima eines Antiphase-Dubletts für die absorptive (v_a) und disperse Komponente (v_d). Aus diesen beiden Parametern kann der wahre Wert von J durch Lösen der kubischen Gleichung (1) berechnet werden.

lungskonstanten sind und die Signale außerdem ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen, damit aus der experimentellen Signalform noch genügend Informationen für die Korrektur gewonnen werden kann.

2.1.1. A-X-Kopplungen aus COSY-Spektren

Wie bereits in Abbildung 2 gezeigt, kann aus einem Antiphase- (z.B. COSY-) Kreuzsignal nur eine scheinbare Kopplungskonstante abgelesen werden, die grundsätzlich wegen gegenseitiger Signalauslösung durch die Antiphase-Struktur zu groß ausfällt. Aus Simulationen kann man sich leicht eine Korrelation zwischen wahrer und experimentell meßbarer Kopplungskonstante erstellen, mit der sich bei Kenntnis von Signalform und -breite letztere korrigieren läßt (Abb. 3). Dies ist allerdings nur so lange möglich, wie die gemessene Kopplungskonstanten noch eindeutig von der wahren Kopplungskonstante abhängt.

Kim und Prestegard^[138] haben für die Bestimmung von Kopplungskonstanten aus AX-Spektren eine besonders einfache Methode angeführt, bei der die Signalbreite nicht explizit ermittelt werden muß. Statt dessen wird die Kopplungskonstante rechnerisch aus zwei leichter zu bestimmenden Parametern, v_a und v_d , bestimmt, die die Aufspaltung in einem Antiphase-Signal einmal in reiner Absorption und einmal in reiner Dispersion beschreiben (Abb. 4). Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß kein

zusätzliches Spektrum aufgenommen werden muß, da für gewöhnlich ein COSY-Spektrum zur Signalzuordnung ohnehin benötigt wird. Außerdem muß keine mathematische Nachbehandlung der Rohdaten durchgeführt werden.

Die Methode beruht auf der Annahme einer Lorentz-Form für die einzelnen Multipllettlinien. Zur vollständigen Beschreibung eines Dubletts genügen generell die beiden Parameter Halbwertsbreite $v_{1/2}$ und skalare Kopplung J , die man aus zwei unabhängigen, experimentell bestimmenden Parametern berechnen kann. Kim und Prestegard nutzen dazu zum einen die scheinbare Kopplung v_a (d. h. den Abstand der Maxima im absorptiven In-Phase-Dublett) und zum zweiten (anstelle der aus Dubletts nur schwer zugänglichen Signalbreite) den Abstand v_d der beiden äußeren Extrema im um 90° phasenverschobenen, d. h. dispersiven Dublett. Aus dem analytischen Ausdruck für ein Dublett aus Lorentz-Linien kann man dann Gleichung (1)

$$J^6 - v_d^2 J^4 - \left(\frac{9}{4} v_a^4 - \frac{3}{2} v_a^2 v_d^2 - \frac{3}{4} v_d^4 \right) J^2 + \frac{81}{64} v_a^6 - \frac{9}{16} v_a^4 v_d^2 - \frac{21}{32} v_a^2 v_d^4 - \frac{1}{16} v_d^6 + \frac{v_d^8}{64 v_a^2} = 0 \quad (1)$$

für J als Funktion von ν_a und ν_d erhalten. J kann nun aus der Quadratwurzel der einzigen reellen Wurzel dieser kubischen Gleichung berechnet werden.

Dieses Verfahren ist einfach durchzuführen und kann zur Auswertung von COSY-Signalen, z.B. den (H^N, H^α)-Kreuzsignalen eines Peptids oder eines Proteins, sehr empfohlen werden, insbesondere wenn Signale im 1D-Spektrum überlagert sind. Allerdings ist ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis für die akkurate Bestimmung von ν_d notwendig. Bei Signal-Rausch-Verhältnissen < 5 führen Ungenauigkeiten in ν_a und besonders in ν_d zu signifikanten Fehlern in den berechneten J -Werten. Bezüglich der Apodisierung ist man von der Theorie her auf die Exponentialfunktion beschränkt, da nur so die Signalform nach der Fourier-Transformation einer Lorentz-Funktion entspricht. Es hat sich jedoch gezeigt, daß andere Apodisierungsfunktionen keine allzu abweichenden Ergebnisse liefern.

2.1.2. Das DISCO-Verfahren

Die einzelnen Kreuzsignale eines Kerns in einem COSY-Spektrum unterscheiden sich dadurch, daß jeweils eine Kopplung (die aktive) in Antiphase ist und alle anderen Kopplungen in Phase erscheinen. Durch die Überlagerung von Signalkomponenten entsteht oft ein kompliziertes Multipllettmuster, aus dem sich keine Kopplungskonstanten mehr ablesen lassen. Für diesen Fall gibt es eine Reihe von Verfahren, die Antiphase-Aufspaltungen mit In-Phase-Aufspaltungen kombinieren, so daß sich die Zahl der Multipllettlinien verringert und die Kopplungskonstanten aus der dann einfacheren Feinstruktur abgelesen werden können. Die dazu benötigten Antiphase-Signale sind aus den COSY-Kreuzsignalen zugänglich (Abb. 5a). In-Phase-Signale erhält man prinzipiell aus den COSY-Diagonalsignalen oder aus einem 1D-Spektrum, bei überlagerten Signalen aber besser aus den Kreuzsignalen eines TOCSY-Experiments (wobei Phasenstörungen durch dispersive

Antiphase-Beiträge durch Verwendung eines z-Filters vermieden werden müssen, siehe Lit.^[30, 31]).

Durch Differenz- oder Summenbildung von Kreuzsignalen in COSY-Spektren (daher der Name DISCO)^[11, 39, 40] erhält man eine Halbierung der Zahl der Multipllettlinien (Abb. 5b). Aus den Spuren zweier Kreuzsignale wird durch Addition (mit in der Regel interaktiv zu ermittelnden Gewichten) ein Multipllett erhalten, das die Summe der beiden aktiven Kopplungskonstanten in Antiphase enthält. Häufig treten in solchen Additionen wegen der größeren Aufspaltung weniger Überlagerungen auf, so daß sich die Signalabstände präziser bestimmen lassen. Aus der Differenz (negativen Kombination) der beiden Spuren erhält man dagegen die Differenz der in den beiden Kreuzsignalen aktiven Kopplungen, die allerdings wegen der geringen Aufspaltung oft nur schwer auswertbar ist. Das DISCO-Verfahren ist in Abbildung 6 nochmals an einem praktischen Beispiel illustriert.

Eine Variante ist die „DISCO-Entkopplung“: Durch das Mischen von Antiphase- und In-Phase-Multipletts lassen sich Spektren bezüglich der aktiven Kopplung „entkoppeln“ (Abb. 5c). Die positive und die negative Kombination ergeben „entkoppelte“ Spektren, die um die halbe Kopplungskonstante nach links bzw. rechts verschoben sind. Es können jetzt auch Kopplungskonstanten aus Multipletts mit breiten Signalen bestimmt werden.

Problematisch an allen DISCO-Verfahren ist die Tatsache, daß der richtige Skalierungsfaktor für die Kombination der beiden Spektren nicht bekannt ist. Er muß somit interaktiv am Resultat der Kombination bestimmt werden, was die Auswertung komplizierter Spinsysteme schwierig macht.

2.1.3. Die J -Verdopplung

Dieses Verfahren^[41] beruht auf einer rein mathematischen Nachbehandlung der gemessenen Rohdaten. Unterscheiden muß man dabei zwischen In-Phase- und Antiphase-Signalen, wobei wir hier nur den Fall von In-Phase-Multipletts besprechen werden. Für die analoge Analyse von Antiphase-Signalen verweisen wir auf die Literatur^[42].

Für dieses Verfahren benötigt man den FID eines freiliegenden In-Phase-Dubletts, d.h. entweder den FID des 1D-Spektrums oder – bei Überlagerung – eine Reihe durch ein freiliegendes Kreuzsignal eines 2D-Spektrums, die durch inverse Fourier-Transformation (IFT) in einen Pseudo-FID umgewandelt werden kann. In der Zeitdomäne entspricht ein In-Phase-Dublett einer gedämpften harmonischen Schwingung, die mit $\cos(\pi J t)$ moduliert ist; dabei ist J die zu ermittelnde Kopplungskonstante. Multipliziert man diesen FID mit einer Funktion $\sin(\pi J_{\text{Test}} t)$, so erhält man nach der Fourier-Transformation eine zusätzliche Antiphaseaufspaltung der Größe J_{Test} . Von den insgesamt vier Linien fallen für $J = J_{\text{Test}}$ die mittleren beiden genau zusammen und löschen sich wegen des Antiphasecharakters vollkommen aus (Abb. 7). Man kann also die Kopplungskonstante J bestimmen, indem man den Parameter J_{Test} in der FID-Modulationsfunktion auf das Verschwinden dieser Multipllettlinien hinoptimiert. Dieses Optimierungskriterium ist auch einer automatisierten Auswertung recht gut zugänglich, z.B. indem das Integral über das gesamte Multipllett in Absolutwertdarstellung verfolgt wird^[42].

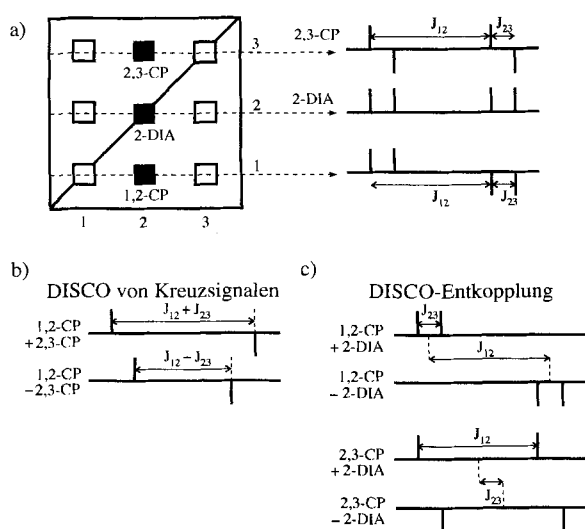


Abb. 5. a) DISCO-Experiment mit Kreuzsignalen für den Spin 2 eines Dreispinsystems. Links: schematisches COSY-Spektrum; rechts: Querschnitte der 1,2- und 2,3-Kreuzsignale (1,2-CP, 1,3-CP) sowie des Diagonalsignals 2-DIA in ω_2 . b) DISCO-Experiment durch Addition und Subtraktion der Kreuzsignale. c) DISCO-Entkopplung durch Addition und Subtraktion von Kreuzsignal und Diagonalsignal.

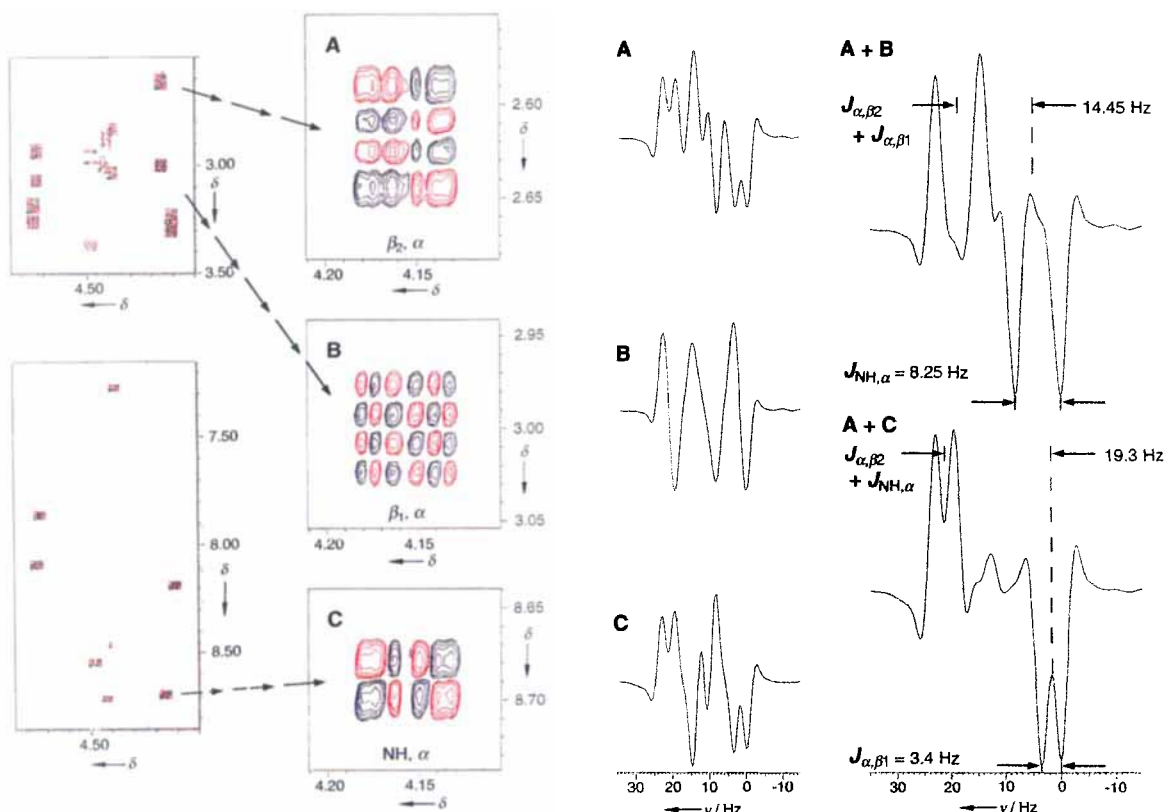


Abb. 6. Das DISCO-Verfahren, angewendet auf ein cyclisches Hexapeptid. Erste Spalte: (H^α, H^β)-Kreuzsignale (oben) und (H^α, H^N)-Kreuzsignal aus dem 2D-DQF-COSY-Spektrum. Zweite Spalte: Detaildarstellung der Kreuzsignale $H^\alpha-H^{\beta 2}$ (A), $H^\alpha-H^{\beta 1}$ (B) und $H^\alpha-H^N$ (C). Dritte Spalte: Querschnitte entlang F_2 durch die entsprechenden Kreuzsignale. Vierte Spalte: Aus der Summe der Querschnitte A + B (oben) und A + C (unten) können die Summen der Kopplungskonstanten ($^3J(H^\alpha, H^{\beta 2}) + ^3J(H^\alpha, H^{\beta 1})$) bzw. ($^3J(H^\alpha, H^{\beta 2}) + ^3J(H^\alpha, H^N)$) mit großer Genauigkeit abgelesen werden.

Das Verfahren der J -Verdopplung kann in vielen Varianten durchgeführt werden. So erhält man dieselbe Auslöschung des zentralen Linienpaares, wenn man von einem Antiphase-Dublett ausgehend den FID mit $\cos(\pi J_{\text{Test}} t)$ moduliert (d. h. eine zusätzliche In-Phase-Aufspaltung um J_{Test} einführt). Mit komplizierten Modulationsfunktionen für den FID lassen sich komplexere Linienmuster erzeugen, die sich ebenfalls im Falle $J = J_{\text{Test}}$ durch Auslöschung drastisch vereinfachen. Schließlich ist das Verfahren nicht auf Dubletts beschränkt: Bei komplexeren Multipletts erhält man für mehrere J_{Test} -Werte Minima der Signalintensität, entsprechend den im Signal enthaltenen Kopplungskonstanten. Durch die Multiplikation des Signals mit der

Testkopplungskonstante werden allerdings mehr Linien erzeugt als ohne die Datenbehandlung, was sich wegen der möglichen Überlagerung einzelner Signale negativ auswirken kann.

2.1.4. Die Signalformsimulation mit Referenzsignalen

Die grundlegende Idee dieser Techniken ist die Simulation eines komplexen, nichtaufgelösten Multipletts ausgehend von mehreren experimentellen Multipletts. Wir wollen sie hier zunächst an zwei relativ einfachen, homonuclearen Fällen besprechen und dann eine sehr erfolgreiche Variante zur Bestimmung heteronuclearer Weitbereichskopplungen vorstellen.

Wie in Abschnitt 2.1.3 besprochen, kann man durch Multiplikation eines FID mit $\cos(\pi J_{\text{Test}} t)$ oder $\sin(\pi J_{\text{Test}} t)$ ein Signal mit einer zusätzlichen „künstlichen“ In-Phase- bzw. Antiphase-Aufspaltung J_{Test} versehen (Abb. 8). Dabei gelangt man ausgehend von einem gemessenen Antiphase- bzw. In-Phase-Multiplett zum gleichen Endergebnis, wenn der Parameter J_{Test} gerade der in den experimentellen Signalen in unterschiedlicher Phase enthaltenen Kopplungskonstante J entspricht: Beide Signale enthalten dann je eine In-Phase- und eine Antiphase-Aufspaltung der gleichen Größe $J = J_{\text{Test}}$ (Abb. 8, rechts). Optimierungskriterium ist also die Ähnlichkeit der auf beiden Wegen erhaltenen modulierten Multipletts, die sich z. B. anhand der Standardabweichung der beiden Signale^[43] oder über vektorielle Algorithmen ermitteln lässt^[44].

Eine andere Möglichkeit, die sich besonders zur Bestimmung homonuclearer In-Phase-Kopplungskonstanten eignet, ist die

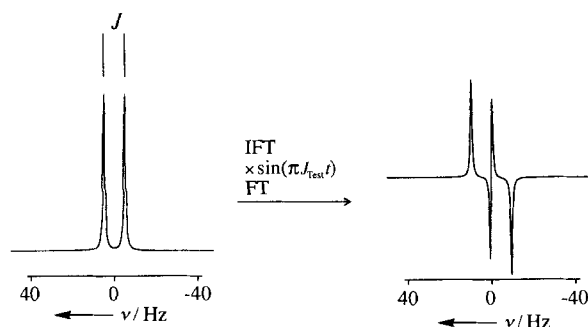


Abb. 7. J -Verdopplung eines In-Phase-Signals. Der FID aus der IFT des In-Phase-Dubletts wird mit der Funktion $\sin(\pi J_{\text{Test}} t)$ multipliziert. Dies entspricht einer Konvolution des Dubletts mit einer Antiphase-Kopplungskonstante J_{Test} . Bei Variation von J_{Test} verschwindet das innere Antiphase-Dublett, sobald $J_{\text{Test}} = J$ gilt.

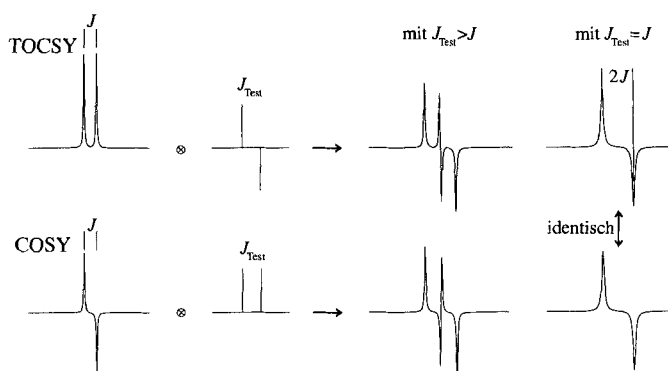


Abb. 8. Bestimmung homonuclearer Kopplungskonstanten aus COSY- (Anti-phase-) und TOCSY- (In-Phase-) Signalen durch Konvolution der Signale mit einem komplementären Multipllett, dessen Kopplungskonstante J_{Test} ist (vgl. Abb. 7). Für den Fall $J_{\text{Test}} = J$ werden beide Multiplletts nach der Konvolution identisch (ganz rechts), was als Konvergenzkriterium für die Bestimmung von J genutzt werden kann.

Konvolution selektiv entkoppelter Spektren^[45] mit einer zu optimierenden Testkopplungskonstante. Als Datensatz dienen zwei Spektren, zum einen das konventionelle 1D-Spektrum (oder Reihen durch entsprechende Kreuzsignale eines 2D-Experiments) und zum anderen ein Spektrum, aus dem die gesuchte $J_{B,D}$ -Kopplung durch Einstrahlen bei der Frequenz des Kernes H_D entfernt wurde (Abb. 9). Dieses Spektrum wird nun

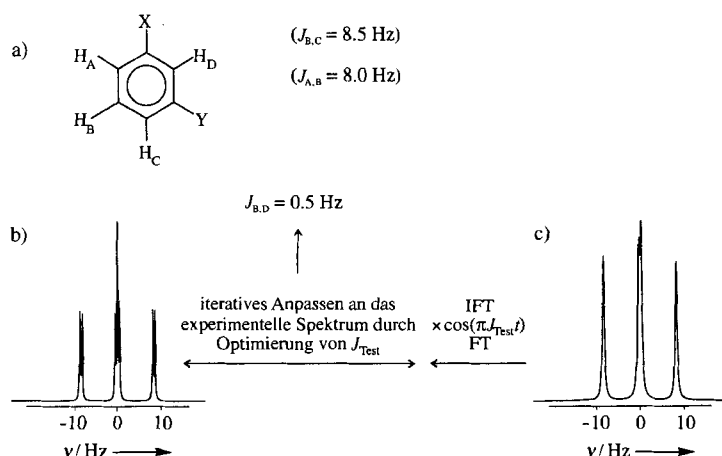


Abb. 9. Bestimmung der Kopplungskonstanten $J(H,H)$ in *meta*-disubstituiertem Benzol (a). Die Werte der starken 3J -Kopplungen ($J(A,B)$ und $J(B,C)$) können direkt aus dem 1D-Spektrum abgelesen werden (nicht gezeigt). b) Gekoppeltes und c) von H_D selektiv entkoppeltes experimentelles Multipllett von H_B . Das selektiv entkoppelte Multipllett kann nur dann durch Konvolution mit einer In-Phase-Kopplung J_{Test} exakt in das gekoppelte Spektrum überführt werden, wenn $J_{\text{Test}} = J$ gilt.

einer Konvolution unterworfen, d.h. der FID wird mit der Funktion $\cos(\pi J_{\text{Test}} t)$ multipliziert und so eine künstliche In-Phase-Kopplung der Größe J_{Test} erzeugt. Nun wird das Signal entweder in der Zeit- oder in der Frequenzdomäne mit dem gekoppelten Spektrum unter Variation von J_{Test} so lange verglichen, bis für $J = J_{\text{Test}}$ die Abweichung minimal wird (Nebenminima können jedoch bei Summen oder Differenzen der im Multipllett enthaltenen Kopplungskonstanten auftreten).

Eine solche selektive Entkopplung lässt sich besonders leicht durchführen, wenn es sich um die Kopplung zu einem Heterokern handelt. So lassen sich $^3J_{H,P}$ und $^3J_{C,P}$ in Nucleotiden aus

zwei 2D- 1H , ^{13}C -HSQC-Korrelationsspektren bestimmen, von denen eines unter ^{31}P -Entkopplung aufgenommen wurde (FIDS-HSQC^[76]). Die Signalbreiten in der 1H - und in der ^{13}C -Dimension unterscheiden sich in den beiden Spektren dann nur noch durch die Kopplung des Protons bzw. Kohlenstoffatoms zum Phosphoratom (Abb. 10).

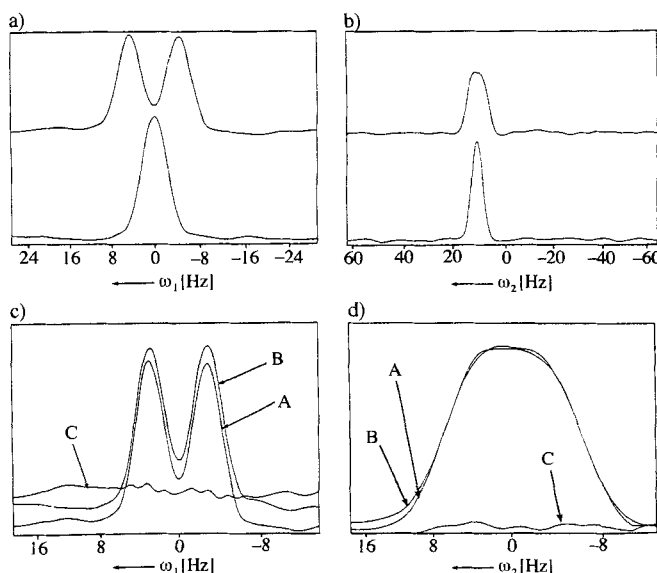


Abb. 10. FIDS-HSQC-Spektrum eines cyclischen Desoxyribose(methylphosphonats). a) Querschnitt entlang F_1 (d.h. der Kohlenstoffdimension) durch das ($H5',C5'$)-Kreuzsignal ohne (oben) und mit ^{31}P -Entkopplung (unten). b) Querschnitt entlang F_2 (d.h. der Protonendimension) durch das ($H3',C3'$)-Kreuzsignal ohne (oben) und mit ^{31}P -Entkopplung (unten). c) Ergebnis der Simulation des gekoppelten Multiplletts aus (a) aus dem entkoppelten Multipllett durch Hinzufügen einer Kopplung $^2J(C5',P)$. Eine optimale Übereinstimmung ergibt sich für $^2J(C5',P) = 8.9$ Hz. d) Analog zu (c) für das Multipllett aus (b). Hier ergibt sich $^3J(H3',P) = 4.5$ Hz. A = experimentelles, B = simuliertes Multipllett, C = Differenz (aus Lit. [76]).

Eine weitverbreitete Anwendung dieser Techniken besteht in der Bestimmung heteronuclearer Weitbereichkopplungskonstanten aus HMBC-Kreuzsignalen von *nicht* ^{13}C -angereicherten Molekülen^[46]. Hierbei ist besonders vorteilhaft, daß das HMBC-Experiment (*heteronuclear multi-bond correlation*) wegen der inversen Detektion relativ empfindlich ist (z.B. im Vergleich mit dem COLOC-Experiment^[47]) und die Identität der heteronuclearen Weitbereichkopplungen sich direkt aus der Zuordnung der 2D-Kreuzsignale ergibt^[12, 48]. Die Pulssequenz (einschließlich „low-pass J filter“^[49]) ist in Abbildung 11 angegeben^[12]; der 180° - 1H -Puls am Ende der Sequenz wird nur für die im folgenden beschriebenen Kopplungskonstantenbestimmung mit einem homonuclearen Referenzspektrum benötigt.

Beim HMBC-Experiment handelt es sich um eine Variante der inversen heteronuclearen Verschiebungskorrelation HMQC (*heteronuclear multi-quantum correlation*). Während des lan-



Abb. 11. Pulssequenz für ein HMBC-Experiment zur Bestimmung heteronuclearer Kopplungskonstanten. Das entstehende Spektrum korreliert Protonen über Weitbereichkopplungen (meist 2J und 3J) mit ^{13}C -Kernen. Der Delay Δ_1 ist für den Low-pass-J-Filter notwendig und beträgt $1/(2^2J(C,H))$, $\Delta_2 \approx 60-80$ ms.

gen Zeitraums Δ_2 entwickeln sich die kleinen heteronuclearen Weitbereichskopplungen ${}^nJ_{C,H}$ ($n = 2,3$) und ermöglichen so einen Kohärenztransfer auf ${}^{13}C$. Im resultierenden 2D-Spektrum erhält man daher Kreuzsignale zwischen allen Protonen und Kohlenstoffkernen, die durch nicht mehr als etwa drei Bindungen getrennt sind.

Prinzipiell könnte man nun die Weitbereichskopplungskonstanten direkt aus der Aufspaltung der Multipllettlinien in den Kreuzsignalen bestimmen (dazu eignet sich allerdings eine modifizierte Sequenz mit besseren Phaseneigenschaften besser^[50]). Heteronucleare Weitbereichskopplungskonstanten liegen jedoch oft in der gleichen Größenordnung wie homonucleare ${}^2J_{H,H'}$ und ${}^3J_{H,H'}$ -Kopplungskonstanten (ca. 1–10 Hz). Daher kann die kleine heteronucleare Antiphase-Kopplungskonstante ${}^nJ_{C,H}$ wegen der Überlagerung und gegenseitigen Auslöschung der zahlreichen Multipllettlinien meist nicht direkt abgelesen werden.

Keeler, Titman und Neuhaus entwickelten jedoch ein elegantes Verfahren, um auch in solchen Fällen die heteronuclearen Weitbereichskopplungskonstanten aus der Signalform exakt ableiten zu können^[48]. Durch die Aufnahmetechnik bedingt ist die Phase des Multiplikts eines HMBC-Kreuzsignals nämlich in F_2 wegen der Modulation durch H-H-Kopplungen und durch die Entwicklung der chemischen Verschiebung während der beiden Delays Δ_1 und Δ_2 nicht rein absorptiv, vielmehr enthält das Multipllett sämtliche homonuclearen Kopplungen des am Kreuzsignals beteiligten Protons (mit gemischten Phasen) und die das Kreuzsignal verursachende heteronucleare Weitbereichskopplung in Antiphase. Das Signal eines Protons in einem homonuclearen Spektrum wie einem 1D-Spektrum oder sein Kreuzsignal in der F_2 -Dimension in einem 2D-RELAY- oder -TOCSY-Spektrum enthält die gleichen H-H-Kopplungen wie das heteronucleare Spektrum. Die Unterschiede zum HMBC-Signal liegen in den Phaseneigenschaften dieser Kopplungen (hier in Phase) sowie im Fehlen der heteronuclearen Antiphase-Kopplung.

Um die Phaseneigenschaften des heteronuclearen Spektrums auch im 1H -Spektrum zu erhalten, kann das 1D-Spektrum mit der Sequenz „ $90^\circ({}^1H)$ -($\Delta_1 + \Delta_2$)-Akquisition“ aufgenommen werden. Dieses Verfahren ist jedoch nur auf freiliegende Signale anwendbar. Bei überlagerten Signalen kann statt dessen ein TOCSY-Spektrum aufgenommen werden, in dem zusätzliche Phasenstörungen durch die TOCSY-Mischsequenz vermieden werden müssen (z.B. mit einem z-Filter, siehe Abschnitt 2.1.1). Das Multipllett kann nun entlang der F_2 -Dimension herausgelesen werden, der Rest der Basislinie wird auf Null gesetzt und anschließend eine inverse Fourier-Transformation (IFT) durchgeführt. Der erhaltene Pseudo-FID ist das Signal dieses einzelnen Multiplikts in der Zeitdomäne. Der Effekt der Delays Δ_1 und Δ_2 läßt sich jetzt durch Verschieben des Startpunktes des FID um $(\Delta_1 + \Delta_2)$ erreichen, d. h. durch Verwerfen der ersten N Datenpunkte [$N = (\Delta_1 + \Delta_2)/\text{„dwell-time“}$]. Die fehlenden Punkte werden am Ende des FID durch Nullen ersetzt („zero-filling“), was keinen allzu großen Fehler verursacht, da der FID dort weitgehend abgeklungen ist (dwell-time = Zeit zwischen zwei Datenpunkten).

Das in diesem modifizierten FID enthaltene homonucleare Referenzmultipllett unterscheidet sich vom HMBC-Multipllett nur noch durch das Fehlen der heteronuclearen Antiphase-Kopplung (sowie in der Signalamplitude). Wie in Ab-

schnitt 2.1.3 beschrieben, kann eine Antiphase-Kopplung J_{Test} aber durch Multiplikation eines FID mit dem Term $\sin(\pi J_{\text{Test}} t)$ simuliert werden. In einer nichtlinearen Optimierung können Skalierungsfaktor und J_{Test} nun so lange variiert werden, bis die Abweichung der beiden Spektren voneinander minimal wird; dann sollte $J = J_{\text{Test}}$ sein. In Abbildung 12 ist dieses Verfahren an einem praktischen Beispiel gezeigt.

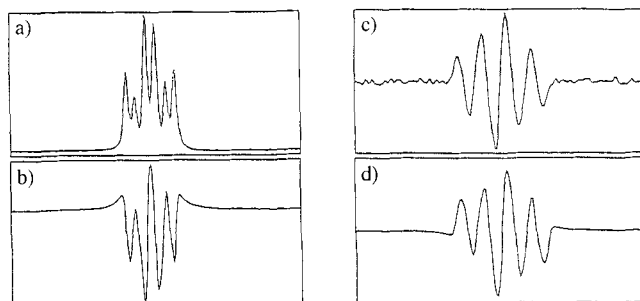


Abb. 12. Die Bestimmung heteronuclearer Weitbereichskopplungskonstanten aus HMBC-Spektren mit dem Keeler-Verfahren (siehe Text). a) Referenzmultipllett aus einem z-gefilterten TOCSY-Spektrum; b) dasselbe Multipllett nach Berücksichtigung der Phasenverschiebung des HMBC-Spektrums; c) experimentelles Multipllett aus dem HMBC-Kreuzsignal (dieses unterscheidet sich von (b) lediglich durch die gesuchte heteronucleare Weitbereichskopplung in Antiphase); d) Ergebnis der Simulation des HMBC-Signals (c) unter Verwendung des Referenzsignals (b).

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß für gewöhnlich in einem HMBC-Spektrum viele Weitbereichskorrelationen auftreten und somit auch entsprechend viele Kopplungskonstanten bestimmt werden können. Jedoch ist die Qualität des heteronuclearen Spektrums und dabei insbesondere das Signal-Rausch-Verhältnis für die Konvergenz des Optimiervorgangs von entscheidender Bedeutung (vgl. die ausführliche Fehlerbetrachtung zu dieser Methode in Lit.^[51]).

2.1.5. Die inverse Fourier-Transformation von In-Phase-Multiplikts

Diese Methode zur Bestimmung der ${}^3J_{HN,H'}$ -Kopplung ist auch für größere Moleküle geeignet und wird bevorzugt bei NOESY-Spektren angewendet, da diese ohnehin zur Strukturbestimmung aufgenommen werden müssen und daher keine zusätzliche Meßzeit benötigt wird^[15].

In einem NOESY-Spektrum weisen alle Kreuzsignale eines bestimmten Proteins in F_2 die gleiche In-Phase-Multipllettstruktur auf. Für das Amidproton von Aminosäuren in Peptiden (mit Ausnahme von Glycin) resultiert ein Dublett aufgrund der Kopplung zum α -Proton. Zur Auswertung sollte nicht das zum gleichen Aminosäurerest gehörende (H^N, H'')-Kreuzsignal herangezogen werden, da es durch Beiträge skalarer Kopplungen gestört sein kann^[52, 53]. In einem NOESY-Spektrum treten jedoch für ein H^N -Signal meist mehrere NOEs mit benachbarten Protonen auf, so daß man sich in der Regel ein anderes freiliegendes Signal aussuchen kann. Zur Bestimmung der Kopplungskonstante ${}^3J_{HN,H'}$ dient nun eine Spur entlang der F_2 -Dimension durch dieses Signal (um das Signal-Rauschverhältnis zu verbessern können, wie auch beim DISCO-Verfahren, mehrere Spuren aufaddiert werden). Durch eine IFT enthält man einen diesem Signal entsprechenden Pseudo-FID (Abb. 13) der wegen der in ihm enthaltenen In-Phase-Kopplung mit

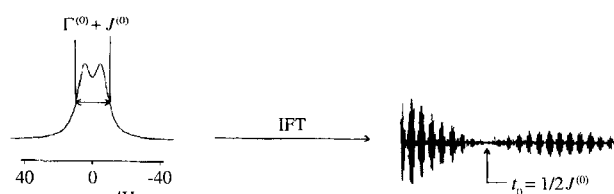


Abb. 13. Signal eines unvollständig aufgelösten Dubletts und korrespondierendes Signal in der Zeitdomäne (FID), das durch IFT erhalten wird. Die Startparameter für Kopplungskonstante und Signalbreite, $J^{(0)}$ bzw. $\Gamma^{(0)}$, können aus dem ersten Nulldurchgang der Einhüllenden des FID und der Halbwertsbreite des Signals bestimmt werden. Die genaue Ermittlung der Kopplungskonstante wird im Text erläutert.

$\cos(\pi^3 J_{\text{HN}, \text{H}\alpha} t)$ moduliert ist. Jetzt kann in erster Näherung aus dem Zeitpunkt t_0 des ersten Nulldurchgangs der FID-Einhüllenden der Wert $J^{(0)} = 1/2t_0$ für die $^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha}$ -Kopplungskonstante abgeschätzt werden. Die Signalbreite $\Gamma^{(0)}$ kann der Halbwertsbreite (natürlich unter Berücksichtigung von $J^{(0)}$) entnommen werden.

Mit diesen Startwerten ist es möglich, ein In-Phase-Dublett zu simulieren [Gl. (2)], wobei t_{aq} die experimentelle Akquisitions-

$$S(t) = \cos(\pi^3 J_{\text{HN}, \text{H}\alpha} t) e^{-\pi \Gamma t} \quad 0 \leq t \leq t_{\text{aq}} \quad (2)$$

zeit ist; die Signalbreite wird durch den exponentiellen Abfall repräsentiert. Dieses Signal $S(t)$ wird nun derselben Prozedur wie das experimentelle Signal unterworfen (gleiche Filterfunktionen, zero-filling etc.) und die Abweichung vom experimentellen FID in einer nichtlinearen Optimierung bezüglich $\Gamma^{(0)}$ und $J^{(0)}$ minimiert.

Das Verfahren kann generell auf In-Phase-Multipletts angewendet werden, so auch auf ein $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -Korrelationsspektrum, bei dem Amidprotonen detektiert werden. In Abschnitt 2.3.3 werden wir noch eine weitere Methode besprechen, mit der aus einem speziell modifizierten $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ -COSY-Experiment $^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha}$ -Kopplungskonstanten über Signalintensitäten bestimmt werden können. Ein großer Vorteil der hier beschriebenen Methode mit der inversen Fourier-Transformation liegt darin, daß nur ein Spektrum zur Auswertung benötigt wird, das ohnehin zur Strukturbestimmung aufgenommen werden muß (in der Regel ein NOESY-Spektrum). Das Verfahren ist relativ empfindlich und benötigt auch keine isotopenmarkierten Verbindungen.

2.2. Die Bestimmung von Kopplungskonstanten mit dem E.COSY-Prinzip

Viele Methoden zur Bestimmung von Kopplungskonstanten bedienen sich des E.COSY-Prinzips. Der Name E.COSY steht für *exclusive correlation spectroscopy* [10, 54, 55]. Das Resultat ist eine Vereinfachung des Kreuzsignalmultipletts, da nur die „verbundenen Übergänge“ (im Energieniveau-Schema des Spinsystems) angeregt werden. Die Kopplungskonstante kann aus der Verschiebung zweier Multiplett Komponenten abgelesen werden, die in der indirekt detektierten Dimension separiert sind und daher einander nicht stören. Im folgenden stellen wir einige Verfahren vor, mit denen sowohl homo- als auch heteronucleare Kopplungskonstanten aus Signalen vom E.COSY-Typ ermittelt werden können. Zuerst aber wird das E.COSY-Prinzip beschrieben, das all diesen Verfahren zugrunde liegt.

2.2.1. Das E.COSY-Prinzip

Der Vorteil des E.COSY-Experiments besteht darin, daß die Zahl der Multiplettlinien in einem Kreuzsignal durch die alleinige Anregung verbundener Übergänge (oder auch selektiv der nichtverbundenen Übergänge) reduziert wird. Dadurch entfallen oftmals die Signalüberlagerungen, so daß Kopplungskonstanten ohne Verfälschung direkt aus dem Abstand der Signalmaxima abgelesen werden können. Zur Erläuterung betrachten wir das Kreuzsignal eines Dreispinsystems AMX (Abb. 14), wobei es gleichgültig ist, auf welche Weise das Signal entsteht (z.B. COSY, TOCSY, NOESY).

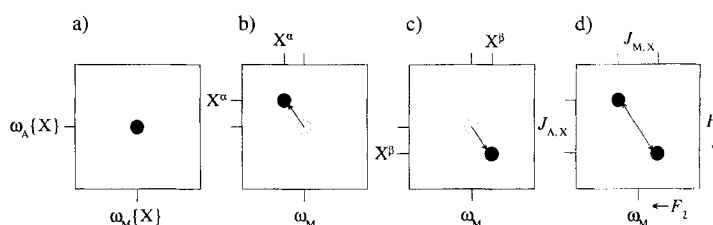


Abb. 14. Prinzip von E.COSY. a) Schematisches 2D-(A,M)-Kreuzsignal eines Spinsystems aus drei gleichzeitig koppelnden Kernen A, M und X unter X-Entkopplung. b) und c) Ohne Entkopplung wird das Signal in beiden Dimensionen durch das lokale Zusatzfeld des Nachbarkerns X verschoben, und zwar je nach Spineinstellung von X in unterschiedliche Richtungen: b) X-Spin in α -Zustand, c) X-Spin im β -Zustand. d) Bei einer realen Probe erhält man immer eine Überlagerung der Teilspektren (b) und (c). Die diagonale Aufspaltung des Signals in F_1 und F_2 entspricht den beiden passiven Kopplungskonstanten $J(A,X)$ bzw. $J(M,X)$.

Koppelt X zu A und M, so erhält man für das (A,M)-Kreuzsignal eine Verschiebung (wegen des unterschiedlichen Feldes am Kernort), wenn der X-Kern im α -Spinzustand vorliegt. Das ist für ziemlich genau die Hälfte der Moleküle in der Probe der Fall (Abb. 14b). In der anderen Hälfte liegen die X-Kerne im β -Spinzustand vor, was zu dem Signal in Abbildung 14c führt. Falls sich also in der Zeit, die für den Magnetisierungstransfer von A nach M benötigt wird, die Spineinstellung von X nicht ändert, erhält man das in Abbildung 14d gezeigte Signal: Signalintensität findet sich nur bei den Multiplettlinien, die einer Beibehaltung des Spinzustands von X entsprechen („verbundene Übergänge“, d. h. in Abbildung 14d dem linken oberen (α -Spin von X) und dem rechten unteren Signal (β -Spin von X)). Die prinzipiell zusätzlich vorhandenen anderen beiden Multiplettlinien haben die Intensität Null, das resultierende Kreuzsignal zeigt damit das typische „schräge“ Erscheinungsbild eines E.COSY-Signals. Um ein solches E.COSY-Muster zu erhalten, muß also eine Mischung der Spinzustände von X (z.B. durch einen 90° -Puls) vermieden werden.

In einem E.COSY-Kreuzsignal genügt es, daß die Aufspaltung in F_1 (A-X-Kopplung) größer als die Signalbreite ist, um die Teilsignale zu separieren und in der detektierten Dimension (F_2 in 2D-, F_3 in 3D-Experimenten) eine viel kleinere M-X-Kopplungskonstante mit hoher Genauigkeit als Verschiebung beider Signale messen zu können. Dies geschieht durch Bestimmung der Signalmaxima oder noch besser durch Messung der gegen-seitigen Versetzung der Linien (unter Berücksichtigung der gesamten Signalform). Neben dem Wert kann aus der Richtung der Verschiebung auch das Vorzeichen der Kopplungskonstanten bestimmt werden.

2.2.2. Homonucleare E.COSY-Techniken

Im eigentlichen homonuclearen E.COSY-Experiment wird der im vorigen Abschnitt skizzierte Effekt nicht durch ein Beibehalten der Spinzustände der passiven Spins erreicht, sondern durch eine geeignete Kombination von Multiquanten-Korrelationen. Dies ist z.B. in Lit.^[56] ausführlich erklärt und soll hier nicht wiederholt werden. Man erhält als Ergebnis das gleiche Multipllettmuster wie in Abbildung 14 d, allerdings sind alle Linien noch einmal in beiden Dimensionen durch die aktive Kopplung aufgespalten, da eine Entkopplung in homonuclearen Experimenten nicht durchführbar ist (Abb. 15). Jedoch muß an

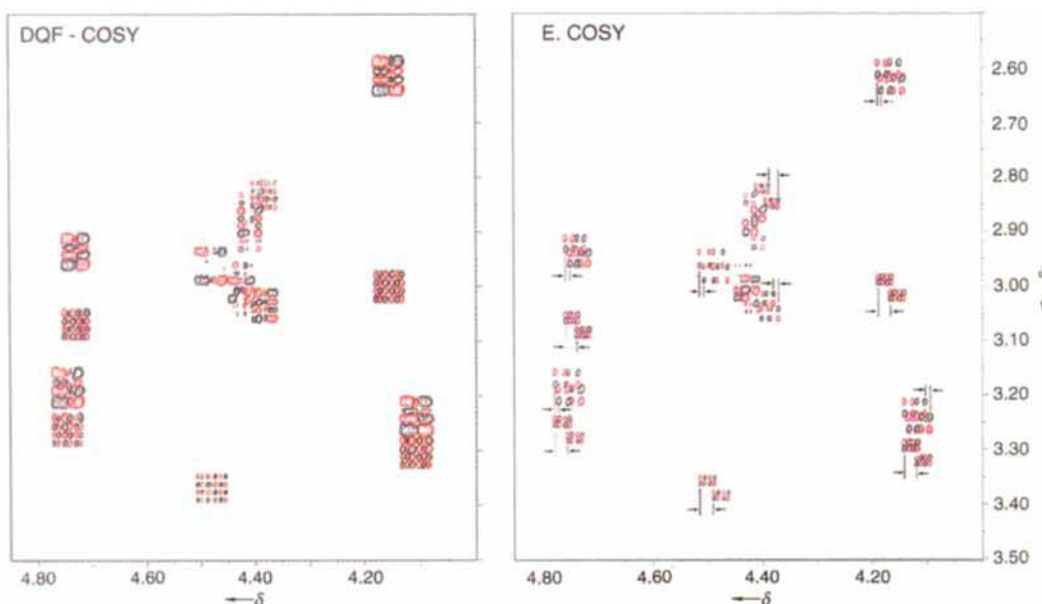


Abb. 15. Doppelquantengefiltertes COSY- (links) und E.COSY-Spektrum (rechts) eines cyclischen Hexapeptids; gezeigt sind jeweils die H^{α}, H^{β} -Regionen. Im E.COSY-Spektrum ist deutlich die Vereinfachung der Multipllettmuster zu erkennen; aus der relativen Verschiebung der verbliebenen Teilstrukturen (Pfeile) lassen sich die entsprechenden passiven Kopplungskonstanten mit großer Genauigkeit ablesen (vgl. Abb. 14).

dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß bei der Linearkombination von Multipllettkomponenten unterschiedliche transversale Relaxationszeiten der beteiligten In-Phase- und Antiphase-Terme die Bestimmung der Kopplungskonstante beeinflussen können^[57]. Außerdem haben wir bei dieser Betrachtung Effekte durch longitudinale Relaxation vernachlässigt, die ebenfalls zu einer Mischung von α - und β -Komponenten führen können^[58], was eine zu große scheinbare Kopplungskonstante ergibt.

Eine einfache Alternative zum E.COSY-Experiment ist das P.E.COSY-Experiment (von primitive E.COSY)^[59]. Es ist bekannt, daß in einem COSY-Spektrum mit einem kleinen Flipwinkel des Mischpulses $\beta' < 90^\circ$ (β -COSY) die Kreuzsignale bevorzugt Signalkomponenten verbundener Übergänge aufweisen und nichtverbundene Übergänge (d.h. solche mit einer Spinumkehr der passiven Kerne) abgeschwächt sind. Dies beruht darauf, daß nur ein 90° -Puls die Spinzustände der passiven Kerne vollkommen mischt; ein Puls mit sehr kleinem Flipwinkel β' hat nur einen vernachlässigbaren Einfluß auf die passiven Spins [Gl. (3)].

$$I^{\alpha} \xrightarrow{\beta'} I^{\alpha} \cos^2 \frac{\beta'}{2} + I^{\beta} \sin^2 \frac{\beta'}{2} \quad (3)$$

Das Verhältnis der Anregung nichtverbundener ($I^{\alpha} \rightarrow I^{\beta}$) zu der verbundener Übergänge ($I^{\alpha} \rightarrow I^{\alpha}$) ist daher proportional zu $\tan(2\beta'/2)$. Gleiches gilt für die Intensität der entsprechenden Multipllettlinien. Problematisch beim β -COSY-Experiment ist jedoch der Phasenunterschied von 90° zwischen Kreuz- und Diagonalsignal, der eine gleichzeitige Korrektur beider Signale wie beim normalen COSY-Spektrum zu rein absorptiven Signalen unmöglich macht. Die dispersiven Signalanteile der Diagonale lassen sich allerdings durch Subtraktion eines 2D-Referenzspektrums mit einem Mischpuls β' von 0° einfach entfernen (d.h. $90^\circ - t_1 - t_2$). Dieses 2D-Referenzspektrum kann aus einem einzigen FID rechnerisch erhalten werden, indem für jedes

t_1 -Inkrement ein Datenpunkt des ursprünglichen 1D-FID vorne abgeschnitten wird, so daß der zusätzliche Meßzeitbedarf lediglich dem für ein gutes 1D-Spektrum entspricht. Das P.E.COSY- bietet gegenüber dem E.COSY-Experiment außerdem noch den Vorteil höherer Empfindlichkeit, weil keine Spektren höherer Quantenordnung (Tripelquanten, Quadrupelquanten etc.) notwendig sind, die nur mit geringerer Effizienz erhalten werden können^[10, 54, 55]. Die beim E.COSY-Experiment angesprochenen Relaxationseffekte werden allerdings gleichermaßen auch beim P.E.COSY-Experiment wirksam sein.

2.2.3. Heteronucleare E.COSY-Techniken

In der heteronuclearen Spektroskopie lassen sich Multipllettmuster, die nur verbundene Übergänge enthalten (E.COSY-Muster), besonders leicht erreichen. Bleiben die Heteroatome während des Experiments unberührt, d.h. werden deren Zustände α und β nicht gemischt, so zeigt jede Kopplung eines Protons mit dem Heteroatom die typische E.COSY-Struktur. Dies läßt sich am einfachsten erreichen, indem ein beliebiges homonucleares 2D-Experiment (z.B. H,H-TOCSY oder -NOESY) ohne jegliche Pulse auf den Heterokern aufgenommen wird, d.h. ohne Heteroentkopplung in F_1 und F_2 sowie ohne jegliche Heterokern-Pulse zwischen F_1 und F_2 . Damit erhält man für jedes Kreuzsignal eine zusätzliche Aufspaltung in beiden Dimensionen durch die Kopplung des Protons zum Heterokern und bezüglich dieser Kopplung ein E.COSY-Muster. Dies gilt natürlich nur für Moleküle mit einem NMR-aktiven Isotop des Heterokerns, bei C und N als Heterokernen also nur für einen kleinen Teil der Moleküle, den Rest kann man aber durch Heterofilter eliminieren (siehe unten). Bei Heterokernen wie ^{31}P und ^{19}F dagegen (oder bei mit NMR-aktiven Isotopen angerei-

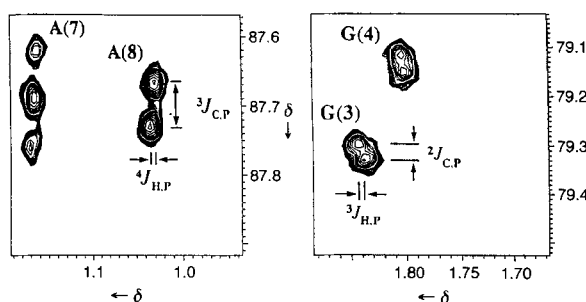


Abb. 16. ^1H , ^{13}C -HSQC-Spektrum eines Oligonucleotids. Da das Experiment ohne ^{31}P -Entkopplung in F_1 und F_2 durchgeführt wurde, entsteht durch die Kopplungen zu den Phosphorkernen das typische E.COSY-Muster (siehe Text).

cherten Verbindungen) kann dieses Phänomen ohne Probleme in jedem homonuclearen 2D-Korrelationsspektrum beobachtet werden (Abb. 16)^[75].

Besonders nützlich ist die Tatsache, daß vor allem die $^1J_{\text{H},\text{C}}$ -Kopplungen sehr groß sind (^{13}C : ca. 140 Hz, ^{15}N : ca. 90 Hz), so daß man auch in Molekülen mit sehr großen Signalbreiten kleine Kopplungskonstanten gut aus E.COSY-Signalen bestimmen kann, wenn man die 1J -Kopplungen in der anderen Dimension zum Trennen der Linien benutzt. Wenn das NMR-aktive Isotop des Heteroatoms nur in geringer natürlicher Häufigkeit auftritt, dann ist der Signalanteil mit E.COSY-Muster natürlich klein und kann vom normalen COSY-Signal überlagert werden, das von den Molekülen ohne dieses Isotop verursacht wird. Daher muß unterschieden werden zwischen Experimenten, die mit dem NMR-aktiven Isotop des Heterokerns in natürlicher Häufigkeit durchführbar sind und solchen, die eine weitgehende Anreicherung dieses Isotops erfordern.

Auf diesem Gebiet ist in letzter Zeit eine große Zahl von Experimenten entwickelt worden, die alle vom Prinzip her sehr ähnlich sind. Wir wollen deshalb nur einige grundlegende Experimente behandeln und verweisen auf Tabelle 2, in der für viele weitere Experimente Anwendungsgebiet, Meßtechnik sowie Vor- und Nachteile zusammengefaßt sind.

Grundsätzlich lassen sich mit heteronuclearen E.COSY-Techniken auch Kopplungskonstanten bei Molekülen mit großen Signalbreiten (z.B. Proteinen) akkurat bestimmen (siehe Abschnitte 2.2.3.3 und 2.2.3.4). Allerdings werden bei den heteronuclearen E.COSY-Techniken wegen der Kopplung zum Heteroatom die Signale in Dubletts aufgespalten, was natürlich die Wahrscheinlichkeit von Überlagerungen etwas erhöht. Zudem verteilt sich die Signalintensität bei heteronuclearen E.COSY-Spektren im Vergleich zu der bei entkoppelten HMQC- oder HSQC-Spektren auf zwei Signalkomponenten, was zu einer auf 50 % reduzierten Empfindlichkeit führt. Außerdem kann auch longitudinale Relaxation, die zu einer geringfügigen Mischung der α - und β -Zustände während der Pulssequenz führen kann, Fehler verursachen.

2.2.3.1. Heteronucleare ^{15}N - ^1H -Weitbereichskopplungskonstanten

Bereits sehr früh wurde gezeigt, daß in ^{15}N -markierten Proteinen heteronucleare $^3J_{\text{N,H}\beta}$ - und $^3J_{\text{H}\alpha(i)\text{N}(i+1)}$ - sowie $^3J_{\text{N,H}}$ -Kopplungskonstanten von ^{15}N -Kernen der Seitenketten aus einfachen homonuclearen Korrelationsspektren wie RELAY- und TOCSY- oder NOESY- und ROESY-Spektren extrahiert

werden können^[60, 61]. Die Kopplungskonstante wird dabei aus dem Kreuzsignal zweier Protonen ermittelt, von denen eines direkt an den ^{15}N -Kern gebunden ist, der mit dem anderen Proton über mehrere Bindungen koppelt. Die Kreuzsignale zwischen Amidproton und anderen Protonen zeigen mit der passiven heteronuclearen Kopplungskonstante in F_2 E.COSY-artige Multipllettstrukturen, da auf die ^{15}N -Kerne keine Pulse durchgeführt werden und somit nur verbundene Übergänge zum Signal beitragen (analog zu den HETLOC-Kreuzsignalen, vgl. Abb. 17). Entlang der indirekt detektierten Dimension (F_1 in 2D-Spektren) sind die Signale durch die $^1J_{\text{N,H}}$ -Kopplung (etwa 92 Hz) aufgespalten, entlang der direkt detektierten Dimension (F_2 in 2D-Spektren) dagegen durch die interessierende kleine heteronucleare Weitbereichskopplung. Aus den Kreuzsignalen zwischen Amidproton und den β -Protonen derselben Aminosäure läßt sich $^3J_{\text{N,H}\beta}$ -Kopplungskonstante, die den χ_1 -Winkel in Peptiden charakterisiert (vgl. Abb. 1), ermitteln. Das sequentielle ($\text{H}_i^{\alpha}, \text{H}_{i+1}^{\alpha}$)-Kreuzsignal in NOESY- oder ROESY-Spektren liefert die $^3J_{\text{H}\alpha(i)\text{N}(i+1)}$ -Kopplungskonstante, die vom ψ -Winkel des Peptidrückgrats abhängt.

2.2.3.2. ω_1 -Heterogefilterte Experimente zur Analyse heteronuclearer Weitbereichskopplungen

Diese Methoden eignen sich zur Bestimmung von weitreichenden Kopplungskonstanten von Protonen zu ^{13}C - oder ^{15}N -Kernen in natürlicher Häufigkeit, an die ein Proton direkt gebunden ist^[62–65]. Die Pulssequenz für das sogenannte HETLOC-Experiment ist in Abbildung 17 angegeben^[62, 63, 180].

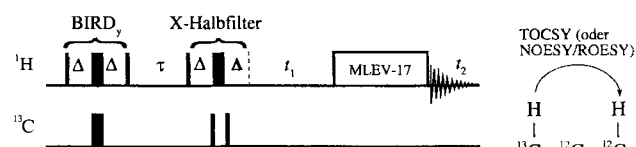


Abb. 17. Pulssequenz für ein ω_1 -gefiltertes TOCSY ohne heteronucleare Entkopplung (HETLOC). Der Delay Δ wird auf $1/(2^1J_{\text{C,H}})$ gesetzt. Im entsprechenden Spektrum werden an ^{13}C gebundene Protonen (während t_1) über die skalare Kopplung (von Bindungselektronen vermittelt, TOCSY) oder die direkt durch den Raum wirkende dipolare Kopplung (NOESY/ROESY) mit anderen Protonen (während t_2) korreliert, ohne daß dazwischen die Spinzustände der ^{13}C -Kerne gestört werden. Dadurch entsteht das gewünschte E.COSY-Muster (siehe Text). Die Parameter für den BIRD-Puls, d.h. der Relaxationsdelay τ und die Akquisitionszeit t_2 , müssen aufeinander abgestimmt und optimiert werden, um die Signale an ^{12}C gebundener Protonen während t_1 optimal zu unterdrücken [66]. Das Experiment läßt sich sehr einfach in ein 3D-Experiment verwandeln, indem zwischen die beiden ^{13}C -90°-Pulse eine ^{13}C -Evolutionszeit eingebaut wird [63].

Bevor das eigentliche Experiment beginnt, ist ein BIRD-Puls^[56, 66] angebracht, der effizient Signale von an ^{12}C oder ^{14}N gebundenen Protonen unterdrückt (dadurch läßt sich auch der Relaxationsdelay zwischen zwei aufeinanderfolgenden Scans – einschließlich der Akquisitionszeit – von normalerweise etwa $3 T_1$ auf ca. $1.3 T_1$ verkürzen, so daß sich die Meßzeit für das Experiment mehr als halbiert!). Durch die Verwendung eines heteronuclearen ω_1 -Halfilters (X-half filter)^[67] werden zu Beginn des Experiments (d.h. während t_1) nur Protonen ausgewählt, die direkt an das magnetisch aktive Heteroatom (^{13}C oder ^{15}N) gebunden sind. Während der Akquisition darf natürlich keine heteronucleare Entkopplung durchgeführt werden. Für den ω_1 -Halfilter ist der Delay Δ auf den Wert der heteronuclearen Kopplungskonstante justiert ($\Delta = 1/(2^1J_{\text{H},\text{C}})$), damit

am Ende des Filters wieder reine In-Phase-Protonenmagnetisierung vorliegt (von leichten Phasenstörungen durch H-H-Kopplungen abgesehen). Die nachfolgende TOCSY-Sequenz überträgt die Magnetisierung der ^{13}C -gebundenen Protonen auf das gesamte Protonen-Spinsystem. In ω_1 sind die Signale um den Wert von $^1J_{\text{C,H}}$ aufgespalten und in ω_2 um den Wert der heteronuclearen Weitbereichskopplungskonstante. Bei starken Überlagerungen in der Protonendimension kann das Experiment sehr leicht in ein 3D-HMQC-TOCSY-Experiment^[68] ohne Entkopplung erweitert werden. Dazu muß lediglich im heteronuclearen Haßfilter eine zusätzliche Evolutionszeit eingeführt werden. Auf diese Art konnten beispielsweise ca. 200 heteronucleare Weitbereichskopplungskonstanten im Immunsuppressivum FK506 mit einem einzigen 3D-Experiment bestimmt werden^[69].

Die Möglichkeiten des HETLOC-Experiments sind jedoch dahingehend limitiert, daß nur heteronucleare $^nJ_{\text{H,X}}$ -Kopplungskonstanten zu protonen tragenden Heteroatomen bestimmt werden können. Ein großer Vorteil ist allerdings, daß bei Heterokernen in natürlicher Häufigkeit und mit der Empfindlichkeit eines protonendetektierenden heteronuclearen Experiments sehr viele heteronucleare Kopplungskonstanten eines Moleküls mit einem einzigen Spektrum bestimmt werden können. In der Praxis reicht dazu für eine ca. 20 mM Probe etwa ein Tag Meßzeit an einem Hochfeldgerät aus. Als Beispiel zeigen wir das HETLOC-Spektrum eines cyclischen Hexapeptids (Abb. 18).

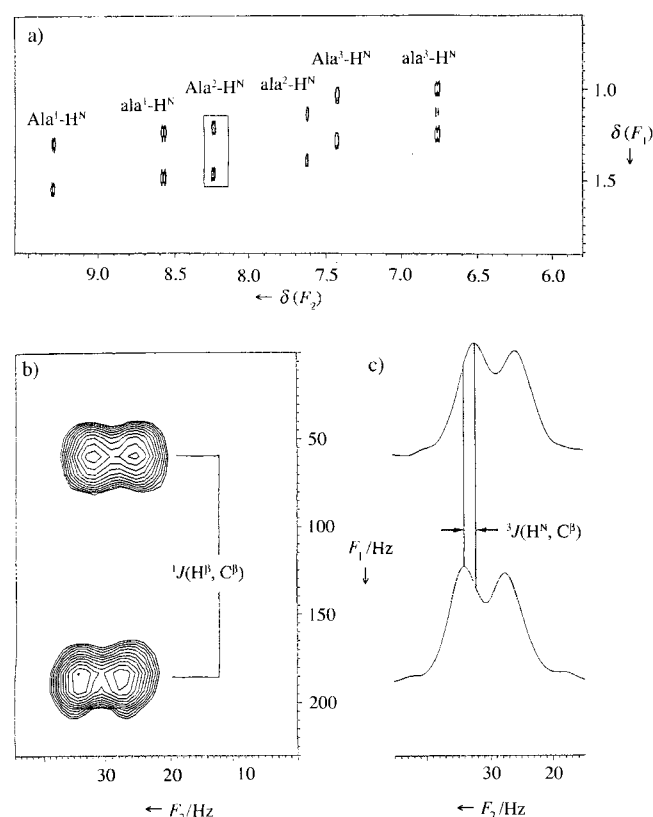


Abb. 18. HETLOC-Spektrum eines cyclischen Hexapeptids. a) Gezeigt ist der $\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\text{B}}$ -Bereich. Die Signale sind in F_1 durch die heteronucleare Kopplung aufgespalten. b) Vergrößerung des Signals Ala²-HN. In der Vergrößerung erkennt man, daß die Signalkomponenten in F_2 versetzt sind. c) Durch das Herauslesen von Reihen entlang F_2 läßt sich die heteronucleare Weitbereichskopplungskonstante bestimmen.

2.2.3.3. Tripelresonanz-Experimente

Unter Tripelresonanz-Experimenten^[9, 70–74] versteht man Pulssequenzen, die drei verschiedene Kernsorten involvieren. In Proteinen sind das ^{13}C , ^{15}N und ^1H , so daß hier viele homo- und heteronucleare Kopplungskonstanten bestimmt werden können. Bei Nucleinsäuren kommt prinzipiell noch ^{31}P als Heterokern in Frage, so daß sich z.B. $^3J_{\text{C,P}}$ - oder $^3J_{\text{H,P}}$ -Kopplungskonstanten bestimmen lassen^[75]. In der Regel setzen Tripelresonanz-Experimente eine Isotopenmarkierung der Proben mit ^{13}C bzw. ^{15}N voraus. Die Zuordnung der Signale im Peptidrückgrat erfolgt bei größeren Proteinen über einen Satz von Experimenten wie HNCA^[77], HN(CO)CA^[78], HCACO^[79], HNCO^[80], HN(CA)CO^[81], HN(CA)H^[82] und vielen weiteren (Abb. 19). Damit stehen zahlreiche Korrelationsspektren mit verschiedenen potentiellen passiven Kernen zur Verfügung, die für E.COSY-Multipletts herangezogen werden können.

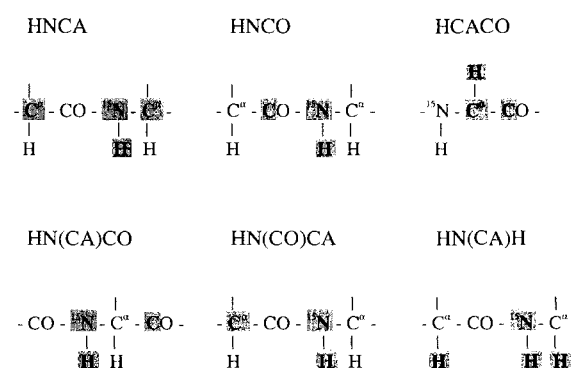


Abb. 19. Schematische Darstellung der wichtigsten 3D-Tripelresonanz-Experimente für die Zuordnung von Proteinrückgratsignalen. Die drei jeweils korrelierten Atome sind grau unterlegt (bei HNCA und HN(CA)H tauchen in der ^{13}C - bzw. ^1H -Dimension jeweils die Signale der eigenen und der in der Sequenz vorangehenden Aminosäure auf).

Im HNCA-Experiment werden beispielsweise Amidprotonen, Amidstickstoffkerne und die C^{α} -Kerne der eigenen und der in der Sequenz vorausgehenden Aminosäure $i-1$ korreliert. Passiv zum C^{α} -Kern koppelt z.B. das direkt gebundene α -Proton, so daß sich hier die Bestimmung von $^3J_{\text{HN,H}^{\alpha}}$ anbietet^[83]. Da es aber noch eine große Zahl weiterer Korrelationsmöglichkeiten in vollständig markierten Proben gibt, lassen sich über E.COSY-Techniken eine Vielzahl von homo- und heteronuclearen Kopplungskonstanten bestimmen. Wir können an dieser Stelle nur einen kleinen Ausschnitt der bereits existierenden Experimente präsentieren, um die Protein-NMR-Spektroskopie nicht übermäßig in den Vordergrund zu stellen, und verweisen auf die in Tabelle 2 angegebene Literatur. Exemplarisch werden hier zwei Techniken zur Bestimmung der $^3J_{\text{HN,H}^{\alpha}}$ - und – im nächsten Kapitel – ein Experiment für die Ermittlung der $^3J_{\text{H}^{\alpha},\text{H}^{\beta}}$ -Kopplungskonstante behandelt.

Noch bevor das HNCA-Experiment etabliert war, stellten Montelione und Wagner das $\text{H}^{\alpha}\text{-C}^{\alpha}(\omega_1)\text{-N-selektive-H}^{\text{N}}(\omega_2)$ -homonucleare RELAY-Experiment zur Bestimmung von $^3J_{\text{HN,H}^{\alpha}}$ vor. Es handelt sich um ein 2D-Experiment, das zuerst an einem nur ^{15}N -markierten Peptid durchgeführt wurde. Die Pulssequenz ist in Abbildung 20 angegeben^[13]. Das Experiment startet mit einer refokussierenden INEPT-Pulsfolge^[84] zum Transfer von Protonenmagnetisierung auf die $^{13}\text{C}^{\alpha}$ -Kerne. Während der Evolutionszeit entwickelt sich, ohne Kopplung zu

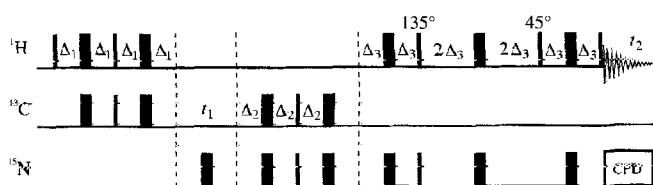


Abb. 20. Pulssequenz für ein $H^2-C^2-(\omega_1)$ -N-selektives- $H^2-(\omega_2)$ -heteronucleares RELAY-Experiment zur Bestimmung der $^3J(H^N, H^2)$ -Kopplungskonstante in Peptiden (siehe Text). Die Delays werden den entsprechenden Kopplungskonstanten angepaßt: $\Delta_1 = 1/(4^1J(C^2, H^2))$, $\Delta_2 = 1/(4^1J(N, C^2))$ und $\Delta_3 = 1/(4^1J(N, H))$.

^{15}N -Kernen, wohl aber mit Kopplung zu Protonen, $^{13}C^\alpha$ -chemische Verschiebung. Dadurch wird das Kreuzsignal in der ω_1 -Dimension um den Wert von $^1J_{C,H}$ (ca. 140 Hz) aufgespalten. Über die $^1J_{C^\alpha, N}$ -Kopplung mit etwa 11 Hz wird in den Δ_2 -Delays C^α -Magnetisierung auf den Amidstickstoffkern der Peptidbindung transferiert. Diese Magnetisierung defokussiert im weiteren bezüglich der Kopplung zum Amidproton und wird mit Hilfe eines TANGO-Pulses^[85] auf die H^N -Kerne übertragen. Der TANGO-Puls ist selektiv für Protonen, die direkt an ^{15}N gebunden sind und verändert die Spineinstellung der α -Protonen nicht. Antiphase-Protonenkohärenz wird refokussiert und in der t_2 -Zeit detektiert. Aus dem Kreuzsignal kann die Kopplungskonstante in der gewohnten Weise abgelesen werden. Durch die $^1J_{C,H}$ -Kopplung sind die Signalkomponenten so weit voneinander getrennt, daß die Kopplungskonstante unabhängig von der Signalbreite bestimmt werden kann. Die Pulssequenz von Montellione und Wagner ist die Basis für eine Vielzahl weiterer Experimente, die ebenfalls auf dem Magnetisierungstransfer über skalare 1J -Kopplungen beruhen.

Für Proteine mit besonders hohem Molekulargewicht müssen allerdings Pulssequenzen verwendet werden, die die Relaxationseigenschaften des Moleküls berücksichtigen. Ein Beispiel dafür ist mit dem HNCA-J-Experiment in Abbildung 21 ge-

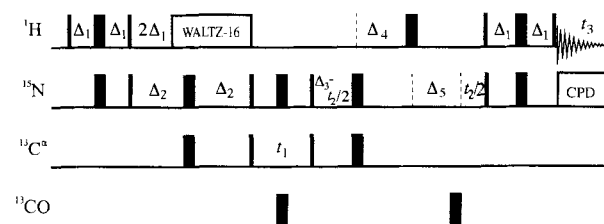


Abb. 21. Pulssequenz zur Bestimmung der $^3J(H^N, H^2)$ -Kopplungskonstante in großen Proteinen. Die Delays werden auf die folgenden Werte gesetzt: $\Delta_1 = 1/(4^1J(N, H))$, $\Delta_2 = 13$ ms, $\Delta_3 = 10$ ms, $\Delta_4 = 7.75$ ms und $\Delta_5 = 2.25$ ms.

zeigt^[14, 177]. Im wesentlichen entspricht das Experiment einem Constant-time-3D-HNCA-Experiment ohne Protonenkopplung in t_1 . C^α -Spins werden über H^N und ^{15}N angeregt und entwickeln sich in t_1 als Antiphase-Magnetisierung bezüglich ^{15}N , ohne daß die Protonen entkoppelt werden. Nach der Constant-time-Evolution der ^{15}N -Magnetisierung in t_2 wird diese auf die Protonen zur Detektion in t_3 zurücktransferiert. ^{15}N -Kerne werden durch einen 180° - 1H -Puls von den Amidprotonen entkoppelt, der ihre α - und β -Zustände vertauscht, aber nicht mischt. Das E.COSY-Muster wird durch die selektive Anregung der ^{15}N -gebundenen Protonen erzeugt. Die Spinzustände der α -Protonen müssen davon unberührt bleiben. In diesem Fall ist also die Wirkung des letzten INEPT-Schrittes von Be-

deutung: Die Stickstoffkerne koppeln während $2\Delta_1$ kaum mit den H^α -Kernen; daher wirken die letzten drei 1H -Pulse $90^\circ(x)$ - $180^\circ(x)$ - $90^\circ(-x)$ auf das in z -Richtung stehende α -Proton wie ein 180° -Puls. Zusammen mit dem zweiten 180° - 1H -Puls ergibt sich gerade ein 360° -Puls, also der Ausgangszustand nach t_1 . Der letzte Schritt wirkt daher wie ein 90° -BIRD-Puls selektiv auf die Amidprotonen und stört die Spinzustände der C^α -Protonen nicht.

2.2.3.4. HCCH-TOCSY-Experimente

Bei einem HCCH-TOCSY-Experiment wird der TOCSY-Transfer durch das ^{13}C -Gerüst durchgeführt. Daher erfordern solche Techniken eine hohe Anreicherung mit ^{13}C , die bisher hauptsächlich auf Proteine beschränkt ist. Bei sehr großen Signalbreiten oder Überlagerung der H^β -Signale kann das homonucleare E.COSY-Experiment zur Bestimmung der $^3J_{H^\alpha, H^\beta}$ -Kopplung nicht mehr verwendet werden, und es müssen Alternativen entwickelt werden, die die Multiplettkomponenten durch die heteronucleare $^1J_{C,H}$ -Kopplung entlang der indirekten Dimension auftrennen. Hierfür sind mehrere Experimente bekannt^[86–89], so daß an dieser Stelle nur auf eine Pulssequenz aus Lit.^[88] eingegangen werden soll (Abb. 22).

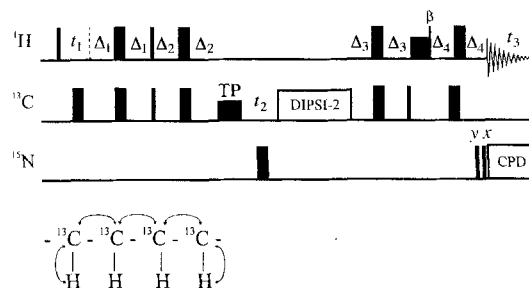


Abb. 22. Pulssequenz für ein HCCH-TOCSY-Experiment^[88] zur Bestimmung homonuclearer $J(H,H)$ -Kopplungskonstanten in ^{13}C -markierten Verbindungen. Mit diesem Verfahren werden die an Kohlenstoff gebundenen Protonen über den TOCSY-Transfer durch das ^{13}C -Gerüst korreliert. Die Delays werden auf die folgenden Werte gesetzt: $\Delta_1 = 1/(4^1J(C,H))$, $\Delta_2 = 1.3$ ms, $\Delta_3 = 0.55$ ms und $\Delta_4 = 1/(2^1J(C,H))$, $\beta \approx 35^\circ$.

Der refokussierende INEPT-Transfer zu Beginn der Pulssequenz enthält die Evolutionszeit für die Protonenmagnetisierung. Während t_2 entwickelt sich In-Phase- ^{13}C -Magnetisierung. Die TOCSY-Sequenz überträgt die Magnetisierung auf die benachbarten ^{13}C -Kerne, von denen sie in einer Umkehr-INEPT-Folge, die einen β -Puls mit kleinem Flipwinkel enthält, zurück auf die Protonen übertragen wird. Ein Vorteil dieser Pulssequenz im Gegensatz zu analogen Experimenten ist, daß keine selektiven Pulse benötigt werden, sondern das E.COSY-Muster durch einen Puls mit kleinem Flipwinkel erzielt wird. Probleme bei der Verwendung selektiver Pulse ergeben sich vor allem dann, wenn – gleichzeitig – die H^α -Kerne nicht und die H^β -Kerne möglichst vollständig angeregt werden sollen. In der Praxis ist dies nicht immer durchführbar, da die Signale von α - und β -Protonen überlagern können (z.B. in Threonin- und Serinresten). Außerdem werden die Signalintensitäten durch das frequenzabhängige Anregungsprofil der selektiven Pulse beeinflusst. Diese Probleme, insbesondere bei überlappenden H^α - und H^β -chemischer Verschiebung, werden durch Verwendung eines

Pulses mit kleinem Flipwinkel in der Umkehr-INEPT-Folge vermieden. In einem (H^{α}, H^{β})-Kreuzsignal sind die Multiplett-komponenten entlang ω_1 um die $^1J_{C,H}$ -Kopplung und entlang der direkten Dimension um die $^3J_{H^{\alpha}, H^{\beta}}$ -Kopplung getrennt. Mit einem Flipwinkel β von ca. 30° erreicht man einen brauchbaren Kompromiß zwischen der Anregung verbundener und der nichtverbundener Übergänge, wobei nichtverbundene Übergänge etwa um den Faktor 10 unterdrückt werden (vgl. P.E.COSY, Abschnitt 2.2.2).

2.3. Die Bestimmung von Kopplungskonstanten aus der Signalintensität

Kopplungskonstanten lassen sich aus Signalintensitäten über die Quantifizierung des Magnetisierungstransfers ableiten. Voraussetzung ist, daß die Signalintensität eine möglichst starke Abhängigkeit von der Kopplungskonstante aufweist. Der Vorteil ist, daß eine Kopplungskonstante in der Größenordnung von nur wenigen Hertz nicht aus der Multiplettaufspaltung abgelesen werden muß, sondern der leichter bestimmbaren Signalintensität entnommen wird.

Allgemein sind die Signalintensitäten in den meisten Spektren auf irgendeine Weise durch skalare Kopplungen moduliert, allerdings ist dies nur in wenigen Fällen einfach zu interpretieren (z.B. COLOC, HMBC, siehe unten). Deshalb gibt es spezielle Verfahren, bei denen die Intensitätsmodulation nur durch eine Kopplung erfolgt und so leichter ausgewertet werden kann. Im folgenden werden wir anhand von Beispielen mehrere Prinzipien vorstellen, um solche Intensitätsmodulationen auszuwerten: 1) durch einfaches Auswerten der Kreuzsignalintensitäten, 2) durch Anpassen der analytischen Abhängigkeit von J an eine Meßreihe und 3) durch Vergleich mit einem Referenzspektrum oder durch Vergleich der Intensitäten von Kreuz- und Diagonalsignalen im gleichen Spektrum.

2.3.1. Das COLOC-Experiment

Das COLOC-Experiment ist ein Beispiel für die Bestimmung der Kopplungskonstante direkt aus der Signalintensität. Die Pulssequenz ist in Abbildung 23 dargestellt^[47]. Chemische Verschiebung entwickelt sich, wenn ein Paar von π -Pulsen im Delay Δ_1 jeweils um ein Inkrement von 0 bis $\Delta_1/2$ verschoben wird. Wichtig hierbei ist die sorgfältige Optimierung der beiden Delays Δ_1 und Δ_2 , um eine Entwicklung der direkten Kopplung zu unterdrücken. Wegen der direkten Detektion der Heterokerne ist die Empfindlichkeit des COLOC-Experiments relativ gering.

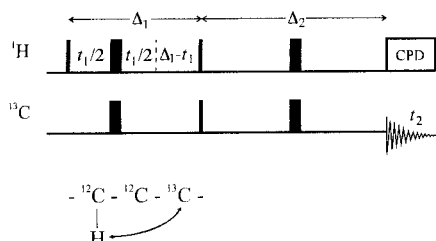


Abb. 23. Pulssequenz für das COLOC-Experiment zur Korrelation von 1H mit ^{13}C über heteronucleare Weitbereichskopplungen. Die Delays Δ_1 und Δ_2 müssen optimiert werden. Für Peptide haben sich $\Delta_1 = 25$ ms und $\Delta_2 = 30$ ms bewährt.

Das COLOC-Experiment war das erste, in dem Signalintensitäten zur Bestimmung von Kopplungskonstanten genutzt wurden^[90].

Für das Constant-time-Experiment sind die Transferamplituden leicht berechenbar. Die allgemeine Form für die Amplitude I_{ij} des Transfers eines COLOC-Signals von Proton i zum Kohlenstoffkern j ist in Gleichung (4) angegeben. k und l stehen für passive Protonenkerne, die zum aktiven H_i bzw. zum aktiven C_j koppeln. Gleichung (5) erhält man daraus für kurze $\Delta_1 \approx \Delta_2$.

$$I_{ij} = \sin(\pi J_{H_i, C_j} \Delta_1) \sin(\pi J_{H_i, C_j} \Delta_2) \prod_k \cos(\pi J_{H_i, H_k} \Delta_1) \prod_l \cos(\pi J_{H_i, C_l} \Delta_2) \quad (4)$$

$$I_{ij} \approx \sin^2(\pi J_{H_i, C_j} \Delta_2) \quad (5)$$

Wie man aus Gleichung (4) sieht, entwickelt sich die interessierende aktive Kopplung in den konstanten Delays Δ_1 und Δ_2 mit dem Sinus, die anderen relevanten Kopplungen mit dem Cosinus. Für kurze Delays sind die Intensitätsunterschiede vom Sinus-Term dominiert und können daher relative Kopplungskonstanten liefern. Modulationen durch homonucleare Protonenkopplungen in Δ_1 können bei bekannten $J_{H,H}$ -Werten berücksichtigt werden^[90].

Oft reicht schon eine qualitative Analyse von heteronuclearen Kopplungen aus, um z.B. die diastereotope Zuordnung von C^{β} -Protonen in Peptiden zu erreichen. Zusammen mit den (z.B. mit DISCO oder E.COSY, siehe Abschnitt 2.1.2 bzw. 2.2) relativ leicht zu bestimmenden homonuclearen 3J -Kopplungen zwischen H^{α} und $H^{\beta, pro-R}$ sowie $H^{\beta, pro-S}$ ermöglichen diese Werte dann eine eindeutige Analyse der χ_1 -Rotamere.

Natürlich eignet sich das COLOC-Experiment nicht nur für Kohlenstoff als Heterokern. Auch 1H - ^{15}N -Weitbereichskopplungskonstanten können so an Peptiden mit natürlicher Isotopenverteilung bestimmt werden, wenn auch die Empfindlichkeit dabei deutlich geringer ist^[91, 92].

2.3.2. Das HMBC-Experiment

Mittlerweile haben inverse Techniken die Methoden mit direkter Detektion des Heterokerns weitgehend verdrängt. Wie in Abschnitt 2.1.4 bereits angesprochen, enthält das HMBC-Spektrum heteronucleare Weitbereichskopplungen als Antiphase-Aufspaltung im Kreuzsignal. Sollen beispielsweise nur Kopplungen zu ausgewählten Kohlenstoffkernen analysiert werden, z.B. zu den Carbonyl-Kohlenstoffkernen eines Peptids, so bietet sich das HMBC-Experiment an. Um die Auflösung in der Kohlenstoffdimension zu erhöhen, empfiehlt es sich, entweder ein selektives HMBC-Experiment durchzuführen oder in der indirekten Dimension zu falten^[192, 193]. Zwei Pulssequenzen für ersteres sind in Abbildung 24 dargestellt^[93].

Die Intensitäten (Transferamplituden) der einzelnen Varianten in Abbildung 24 lassen sich leicht mit Hilfe des Produktoperator-Formalismus berechnen [Gl. (6a) und (6b)]. Dabei steht

$$I = \prod_{H_k} \cos(\pi J_{H_i, H_k} (\Delta + \tau + t_1 + t_2)) \cdot \sin\left(\pi J_{C, H_i} \left(\Delta + \frac{\tau}{2}\right)\right) \sin(\pi J_{C, H_i} t_2) \quad (6a)$$

$$I = \prod_{H_k} \cos(\pi J_{H_i, H_k} (\Delta + \tau + t_1 + t_2 + \Delta)) \sin\left(\pi J_{C, H_i} \left(\Delta + \frac{\tau}{2}\right)\right) \cdot \sin(\pi J_{C, H_i} \Delta) \sin(\pi J_{C, H_i} t_2) \quad (6b)$$

H_k für die passiven Protonen. In Gleichung (6b) (sie entspricht der Sequenz in Abb. 24b) ist der Einfluß der Kopplungskonstante auf die Intensität viel stärker als in Gleichung (6a) (Sequenz in Abb. 24a), da der zusätzliche Faktor $\sin(\pi J_{C,H} \Delta)$ die Abhängigkeit der Signalamplitude von der Kopplungskonstante erhöht. Große Kopplungskonstanten verursachen in beiden Spektren ein intensives Signal, während kleine mit der zweiten Sequenz ein deutlich schwächeres geben.

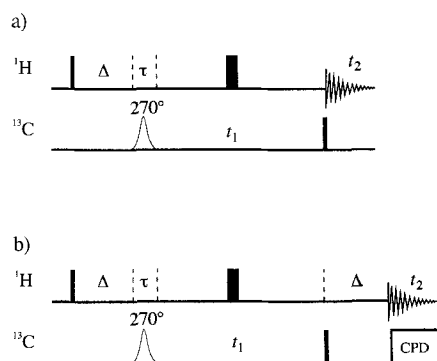


Abb. 24. Pulssequenzen für heteronucleare Weitbereichskorrelationen mit selektiven Pulsen (vgl. HMBC-Sequenz, Abb. 11). a) Selektives HMBC-Experiment zur Anregung einer bestimmten Region der Heterokerne; b) analog (a) mit Refokussierung und Entkopplung in t_2 . Der Delay Δ wird auf 60–80 ms gesetzt. τ ist die Länge des selektiven Pulses. Die Verwendung selbstrefokussierender 270° -Gauß-Pulse hat den Vorteil, daß man in t_1 phasensensitiv aufnehmen kann [93].

2.3.3. Das J -modulierte $[^{15}N, ^1H]$ -COSY-Experiment

Dieses Experiment kann zur Bestimmung der homonuclearen $^3J_{H^N, H^\alpha}$ -Kopplungskonstante verwendet werden und setzt eine ^{15}N -angereicherte Probe voraus^[94]. Die gewünschte Information über die Kopplungskonstante wird aus der zeitlichen Evolution der Protonen-Kohärenz am Ende eines Experiments zur heteronuclearen Korrelation erhalten. Das Verfahren ermöglicht die akkurate Bestimmung der Kopplungskonstante über einen großen Bereich von J -Werten, wobei die Kopplungskonstante aus den Kreuzsignalintensitäten mit Hilfe einer nichtlinearen Anpassung erhalten wird. Kürzlich wurde dafür eine verbesserte Version, das J -modulierte $[N, H]$ -COSY, vorgestellt^[95], die im folgenden kurz besprochen werden soll. Die Pulssequenz dazu ist in Abbildung 25 dargestellt und eignet sich auch für Proteine mit hohem Molekulargewicht.



Abb. 25. Pulssequenz für ein J -moduliertes $[^{15}N, ^1H]$ -COSY-Experiment zur Bestimmung der $^3J_{(H^N, H^\alpha)}$ -Kopplungskonstante in Peptiden. Die Pulssequenz korreliert ^{15}N -Kerne mit den direkt gebundenen Amidprotonen. Δ_1 wird auf $1/(2^1J_{(N, H)})$ gesetzt; Δ_2 ist der variable Delay, in dem sich die H^N - H^α -Kopplung entwickelt; $\Delta_3 = \Delta_2 - \Delta_1 - 180^\circ(^{15}N)$. Zur Bestimmung der Kopplungskonstante wird eine Serie von Spektren mit unterschiedlicher Länge des Delays Δ_2 aufgenommen und die Kreuzsignalvolumina an Gleichung (7) rechnerisch angepaßt (siehe Abb. 26).

Das Experiment beginnt wie ein gewöhnliches $[^{15}N, ^1H]$ -HSQC-Experiment mit einem Spinlock-Puls zur Unterdrückung des Wassersignals. Zu Beginn des Delays Δ_2 wird transversale heteronucleare Zweispin-Kohärenz $2H_y N_y^H$ ausgewählt, in der sich die Kopplung zu H^α mit $\cos(\pi J \Delta_2)$ entwickelt. Das Kreuzsignalvolumen ist eine Funktion des Delays Δ_2 und kann mit Gleichung (7) berechnet werden. A ist dabei das Kreuz-

$$V(\Delta_2) = A \left(\cos(\pi J \Delta_1) \cos(\pi J \Delta_2) - \frac{1}{2} \sin(\pi J \Delta_1) \sin(\pi J \Delta_2) \right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta_2}{T_2'}\right) \quad (7)$$

signalvolumen bei $\Delta_2 = 0$, J ist $^3J_{H^N, H^\alpha}$ und T_2' ist die scheinbare transversale Relaxationszeit. Die Kopplungskonstante $^3J_{H^N, H^\alpha}$ ergibt sich durch Anpassen von Gleichung (7) an die experimentelle Abhängigkeit der Kreuzsignalvolumina von Δ_2 , wie beispielhaft in Abbildung 26 für einige Aminosäuren des PTS-Proteins IIB^{Glc}^[96] gezeigt ist.

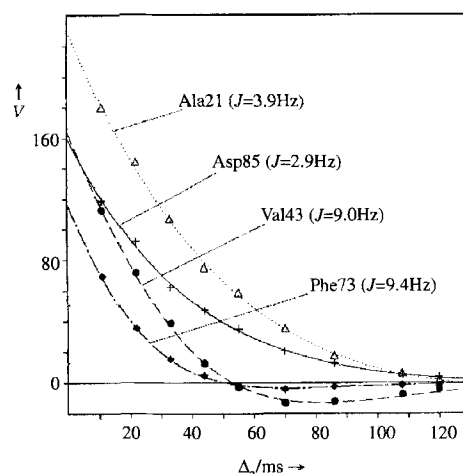


Abb. 26. Resultate der Anpassung von Gleichung (7) für vier verschiedene Aminosäuren (Ala21, Val43, Phe73 und Asp85) der IIB^{Glc}-Domäne des Phosphotransferase-Transportsystems von *E. coli*. Aufgetragen sind die Kreuzsignalvolumina V gegen die Länge des Delays Δ_2 . Die Linien repräsentieren die an den Meßwerten optimierte Funktion aus Gleichung (7), aus der die angegebenen Werte für $^3J_{(H^N, H^\alpha)}$ folgen.

Für dieses Verfahren müssen mehrere Spektren mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis aufgenommen werden, so daß der Meßzeitbedarf oft beträchtlich ist.

2.3.4. Das HNHA-Experiment

Auch mit dieser Pulssequenz (Abb. 27) läßt sich die $^3J_{H^N, H^\alpha}$ -Kopplungskonstante in ^{15}N -markierten Proteinen bestimmen. Ein Vorteil gegenüber E.COSY-Techniken, die auch sehr häufig für 3D-NMR-Spektren verwendet werden, ist, daß sich Signalintensitäten in dreidimensionalen Spektren mit schlechter digitaler Auflösung leichter bestimmen lassen als präzise Signalpositionen. Die $^3J_{H^N, H^\alpha}$ -Kopplungskonstante resultiert aus der quantitativen Analyse des Intensitätsverhältnisses von Diagonal- und Kreuzsignal^[16]. Das Experiment entspricht im wesentlichen einigen Verfahren, die zur Bestimmung von Kopplungskonstanten in isotoptenmarkierten Proteinen bereits in der

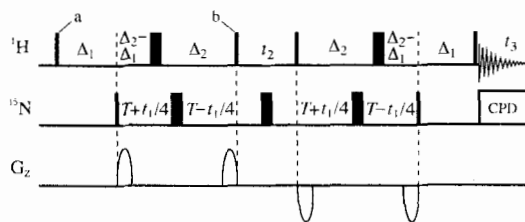


Abb. 27. Pulssequenz für das HNHA-Experiment. Die Delays Δ_1 und Δ_2 werden auf die Werte 4.5 bzw. 13.05 ms gesetzt. Die Pulssequenz wird im Text erläutert.

Literatur angegeben sind^[97–99]. Zusätzlich erhält man allerdings beim HNHA-Experiment die intraresiduale [^1H , ^1H]-Korrelation, so daß diese Technik außer zur Bestimmung von $^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\text{H}}}$ auch zur Zuordnung von ^1H -Signalen verwendet werden kann. Es handelt sich also eigentlich um ein ^{15}N -editiertes [^1H , ^1H]-COSY-Spektrum. Dementsprechend ist es auch für sehr große Proteine weniger geeignet, weil bei diesen die kurzen T_2 -Relaxationszeiten die Signalintensitäten zu stark reduzieren.

In der Pulssequenz für das HNHA-Experiment kommen auch gepulste z-Gradienten zur Anwendung. Sie sind zwar nicht essentiell notwendig, vermindern jedoch von Pulsungenauigkeiten herrührende Artefakte und lassen deshalb einen kürzeren Phasencyclus zu^[100]. Der erste 90° - ^1H -Puls erzeugt Protonenmagnetisierung, die während des Delays Δ_1 durch die $^1J_{\text{H}, \text{N}}$ -Kopplung dephasiert und sich zu Antiphase-Kohärenz bezüglich der ^{15}N -Kerne entwickelt. Der erste 90° - ^{15}N -Puls erzeugt nach dem Prinzip der HMQC-Technik Null- und Doppelquantenübergänge. Durch simultane Verschiebung des ersten und dritten 180° - ^{15}N -Pulses entwickelt sich in den Delays $4T$ ^{15}N -chemische Verschiebung nach Art eines Constant-time-Experiments. Zwischen den Zeitpunkten a und b (in Abb. 27 eingetragen) ist die $^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\text{H}}}$ -Kopplung aktiv, und es entwickelt sich Antiphase-Magnetisierung der Amidprotonen bezüglich der ^1H -Kerne, proportional zu $\sin(2\pi J_{\text{H}, \text{H}} \Delta_2)$. Dieser Antiphase-Term wird durch den zweiten 90° - ^1H -Puls in Antiphase-Magnetisierung der α -Protonen verwandelt; letztere wird nach einer kurzen t_2 -Zeit durch den dritten 90° - ^1H -Puls in Antiphase-Magnetisierung der Amidprotonen bezüglich der ^1H -Kerne zurückkonvertiert. In der t_2 -Zeit entwickelt sich ^1H -chemische Verschiebung. Die nachfolgende Periode $2\Delta_2$, während der die $^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\text{H}}}$ -Kopplung wieder aktiv ist, dient zur Rephasierung der Magnetisierung bezüglich der ^1H -Kerne. Der letzte 90° - ^{15}N -Puls erzeugt nunmehr ^1H -Magnetisierung, die in Antiphase bezüglich ^{15}N ist und während des zweiten Delays Δ_1 zu In-Phase-Magnetisierung der Amidprotonen rephasiert. Direkt vor der Akquisition dient ein 90° - ^1H -Puls zur Eliminierung von Antiphase-Termen, welche die absorptive Linienform stören würden. Das detektierte Signal läßt sich mit Gleichung (8) beschreiben, wobei Ω_{HN} , Ω_{N} und $\Omega_{\text{H}^{\text{H}}}$ die

$$I = A(\cos^2(2\pi J_{\text{H}, \text{H}} \Delta_2) \cos(\Omega_{\text{N}} t_1) \cos(\Omega_{\text{HN}} t_2) - \sin^2(2\pi J_{\text{H}, \text{H}} \Delta_2) \cos(\Omega_{\text{N}} t_1) \cos(\Omega_{\text{H}^{\text{H}} t_2)) \exp(i\Omega_{\text{HN}} t_3)) \quad (8)$$

chemischen Verschiebungen von Amidproton, Amidstickstoff bzw. α -Proton sind. A ist eine Konstante^[*]. Der erste Term

[*] An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die Verwendung gleicher Buchstaben für Konstanten oder Variablen in verschiedenen Gleichungen nicht bedeutet, daß es sich auch um die gleiche Größe handelt.

entspricht dem Diagonalsignal ($\Omega_{\text{HN}} t_2$, $\Omega_{\text{HN}} t_3$) und der zweite dem Kreuzsignal ($\Omega_{\text{H}^{\text{H}} t_2$, $\Omega_{\text{HN}} t_3$). Der Wert von $^3J_{\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\text{H}}}$ läßt sich nun leicht aus dem Intensitätsverhältnis von I_{Kreuz} zu I_{Diag} bestimmen [Gl. (9)].

$$\frac{I_{\text{Kreuz}}}{I_{\text{Diag}}} = -\tan^2(2\pi J_{\text{H}, \text{H}} \Delta_2) \quad (9)$$

In Gleichung (9) steckt die implizite Annahme, daß während der Re- und Dephasierungsdelays Δ_2 die Magnetisierungskomponenten, die zu Kreuz- und Diagonalsignal Anlaß geben, identisch relaxieren. Allerdings resultieren HNHA-Kreuzsignale aus Antiphase-Termen, wohingegen Diagonalsignale aus In-Phase-Termen entstehen. Von Antiphase-Termen ist eine schnellere Relaxation bekannt^[101–103], so daß die Kreuzsignale zusätzlich abgeschwächt sind. Deshalb wird der Wert der Kopplungskonstante als zu gering bestimmt. In der Praxis hat sich jedoch gezeigt, daß bei Proteinen eine Korrektur der berechneten Kopplungskonstante um +11% die Effekte der Relaxation im Rahmen der Meßgenauigkeit ausreichend berücksichtigt^[16].

2.3.5. $\{^{15}\text{N}\}$ -Spinecho-Differenz-CT-HSQC

Bei den bisher besprochenen Experimenten zur Bestimmung von Kopplungskonstanten aus J -korrelierten Spektren handelte es sich entweder nur um Kopplungskonstanten zwischen zwei Protonen oder um solche zwischen einem Proton und einem Heterokern. Hier möchten wir ein Experiment besprechen, das zur Untersuchung von ^{15}N - ^{13}C -Kopplungen geeignet ist^[104]; auf analoge Weise können aber auch Kopplungen zwischen anderen Heterokernen analysiert werden, z.B. ^{13}C - ^{13}C - und ^{13}C - ^{31}P -Kopplungen. Natürlich erfordert die Bestimmung der ^{15}N - ^{13}C -Kopplungskonstante eine doppelt markierte Probe. Über $^3J_{\text{N}, \text{C}}$ -Kopplungen ist bisher in der Literatur nur wenig berichtet worden^[105], daher sind weitere Untersuchungen in diese Richtung sicherlich interessant.

Die im folgenden kurz vorgestellte Methode^[104] ermöglicht die Analyse einer Vielzahl von ^{15}N - ^{13}C -Kopplungen in doppelt markierten Proteinen. In Kombination mit $^3J_{\text{C}, \text{C}}$ -Kopplungskonstanten, die sich ähnlich bestimmen lassen^[97], können $^3J_{\text{N}, \text{C}}$ -Kopplungskonstanten vom Amidstickstoff zu γ -Methyl-Kohlenstoffatomen beispielsweise für die Charakterisierung des χ_1 -Winkels von Valin, Isoleucin und Threonin herangezogen werden. Kopplungskonstanten zwischen zwei Heteroatomen sind in der Regel kleiner als Kopplungskonstanten zwischen Protonen und lassen sich daher nicht auflösen. Verfahren, die eine Quantifizierung des Kohärenztransfers nutzen, sind aus diesem Grunde hier besonders geeignet.

Bei der Pulssequenz in Abbildung 28 handelt es sich im Grunde um ein 2D-Differenzexperiment^[104]. Wird der 180° - ^{15}N -Puls an der Stelle A durchgeführt, so entspricht das Experiment einem gewöhnlichen Constant-time-HSQC-Experiment mit Entkopplung von ^{13}CO und ^{15}N in t_1 (Signalintensität S_a). Der Delay $2T$, der der Constant-time-Evolution entspricht, sollte auf $1/(^1J_{\text{C}, \text{C}})$ justiert werden, um Effekte durch ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen auszuschließen. In einem zweiten Experiment wird der 180° - ^{15}N -Puls an der Stelle B durchgeführt. Dadurch ist während der gesamten Zeit $2T$ die ^{15}N - ^{13}C -Kopplung aktiv – die

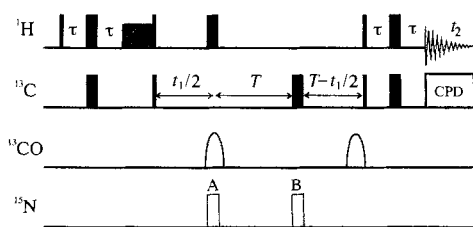


Abb. 28. Pulssequenz für das Constant-time-HSQC-Experiment, in dem Protonen mit dem direkt gebundenen ^{13}C -Kern korreliert werden. Die $180^\circ\text{-}^{15}\text{N}$ -Pulse werden in zwei getrennten Experimenten entweder an der Stelle A oder an der Stelle B durchgeführt. Die Delays τ und T werden auf 1.7 bzw. 28.6 ms gesetzt. Der zweite selektive ^{13}CO -Puls dient der Kompensation von Bloch-Siegert-Effekten auf die Nicht-Carbonyl-Kohlenstoffatome und der Vermeidung von Phasenfehlern.

Signalintensität wird somit um den Faktor $\cos(2\pi J_{\text{N,C}}T)$ abgeschwächt (Signalintensität S_b). Die ^{15}N - ^{13}C -Kopplungskonstante ergibt sich direkt aus den relativen Signalintensitäten [Gl. (10)].

$$\frac{S_a - S_b}{S_s} = 1 - \cos(2\pi J_{C,N}T) = 2\sin^2(\pi J_{C,N}T) \quad (10)$$

Fehlerquellen sind hauptsächlich Relaxationseffekte. Außerdem sind der ^{15}N -Anreicherungsgrad und die Effizienz des $180^\circ\text{-}^{15}\text{N}$ -Invertierungspulses für die Signalintensität entscheidend. Die Autoren tragen diesen Fehlerquellen durch Skalierung der berechneten Kopplungskonstante mit dem Faktor 1.075 Rechnung.

3. Kopplungskonstanten und Computersimulationen zur Bestimmung der Molekülstruktur

Dreidimensionale Strukturen von Molekülen werden aus einem NMR-Datensatz durch Computersimulationen erzeugt, in denen strukturrelevante Meßwerte berücksichtigt werden. Bisher haben dabei fast ausschließlich Abstandswerte aus NOESY- und ROESY-Experimenten eine Rolle gespielt^[106, 107]. Erst seit kurzem werden auch Kopplungskonstanten, die ebenso wie NOEs Informationen zur Konformation enthalten, in Rechenverfahren eingebunden^[17, 18], um die Qualität der erzeugten Strukturen zu verbessern und Aspekte von Dynamik und Flexibilität zu berücksichtigen. In diesem Abschnitt möchten wir die Verwendung von Kopplungskonstanten in Rechenverfahren zur Strukturverfeinerung bei Proteinen und Peptiden behandeln. Die Überlegungen lassen sich natürlich auf andere Substanzklassen übertragen. Zuvor sollen aber einige grundlegende Aspekte der Rechenverfahren selbst diskutiert werden.

3.1. Allgemeines über Rechenverfahren

Die gängigen Computersimulationen, die zur Verfeinerung von Strukturen aus NMR-Daten herangezogen werden, lassen sich in zwei Kategorien einteilen: Molekülmechanik- oder Moleküldynamik-Verfahren (MM bzw. MD)^[108–112] und Distanz-Geometrie-Rechnungen (DG)^[113–116]. Natürlich gibt es eine Vielzahl von Rechenprogrammen; sie alle sind jedoch in der Hauptsache eine Kombination beider Ansätze. Für unsere Zwecke ist diese generelle Unterteilung ausreichend. Die genauen Unter-

schiede und technischen Details der einzelnen Verfahren herauszuarbeiten würde einen eigenen Übersichtsartikel erfordern.

In MM- und MD-Rechnungen wird zur Beschreibung eines Moleküls ein Kraftfeld verwendet. Das Kraftfeld ist ein Satz von Gleichungen und Parametern, der mit den Koordinaten eines Moleküls dessen potentielle Energie liefert. Zur Minimierung der potentiellen Energie dienen unterschiedliche mathematische Ansätze. Ein gewöhnliches Kraftfeld enthält Potentialfunktionen für Bindungslängen, Bindungswinkel, Diederwinkel und Chiralitätszentren sowie Terme für nichtbindende Wechselwirkungen, z.B. Coulomb-Wechselwirkungen, und das Lennard-Jones-Potential für die anziehenden und abstoßenden Kräfte zwischen Atomen. Es gibt heute sehr viele verschiedene Kraftfelder^[117–122], die sich hauptsächlich darin unterscheiden, wie detailliert die Energie des Moleküls berechnet wird. Je genauer die Beschreibung der Energie ist, um so zeitintensiver ist die Rechnung und um so mehr Rechenzeit (CPU-Zeit) wird benötigt. Ziel der Berechnungen ist zunächst die Suche nach dem globalen Energieminimum des Moleküls. Dabei muß ein möglichst großer Konformationsraum abgesucht werden, da sehr viele lokale Energieminima existieren. Einige Verfahren verwenden dazu eine unterschiedliche Gewichtung der Terme des Kraftfeldes oder auch eine Skalierung der Temperatur während einzelner Schritte der Moleküldynamik-Simulation.

Damit in den Berechnungen experimentelle Randbedingungen („Restrains“), also z.B. Abstände aus NOE-Daten, berücksichtigt werden können, muß lediglich ein weiterer Term dem Kraftfeld hinzugefügt werden, eine Straf-Funktion („penalty function“). NOEs werden dazu am häufigsten verwendet; Kopplungskonstanten wurden lange Zeit als zu schwer interpretierbar angesehen. In der Straf-Funktion wird der Unterschied zwischen dem berechneten Wert der Meßgröße und dem experimentell beobachteten Wert minimiert. Dies läßt sich für Abstandswerte aus NOEs sehr einfach durch Gleichung (11) beschreiben, wobei K_{NOE} die Kraftkonstante, R_{exp} der experimentell bestimmte Abstand zweier Protonen und R_{calc} der aktuelle Abstand während der Simulation ist.

$$\text{Energieverletzung} = \frac{1}{2} \cdot K_{\text{NOE}} (R_{\text{exp}} - R_{\text{calc}})^2 \quad (11)$$

Die Kraftkonstante K_{NOE} kann so justiert werden, daß die relativen Gewichtungen der einzelnen experimentellen Abstände an die übrigen Kraftfeld-Terme angepaßt werden können.

Der andere allgemeine Ansatz, Distanz-Geometrie-Rechnungen, verwendet zur Beschreibung der Molekülstruktur ausschließlich Abstände^[113]. Bindungslängen, Valenzwinkel und Diederwinkel werden in Bereiche zulässiger Distanzen umgewandelt. Abstände, die in diese Bereiche fallen, werden zufällig ausgewählt, um eine Distanzmatrix aufzubauen. Durch Diagonalisierung dieser Matrix erhält man kartesische Koordinaten. Diese zufällige Auswahl von Abständen wird sehr oft wiederholt, damit der Konformationsraum besser abgesucht wird und viele Strukturen erhalten werden, die alle die Distanzmatrix erfüllen.

Das Hinzufügen von experimentellen Abständen zu DG-Rechnungen bewirkt folgendes: Die experimentellen Abstände werden mit den Distanzen verglichen, die durch die kovalente Struktur des Moleküls vorgegeben sind; falls der durch die experimentellen Abstandswerte erlaubte Distanzbereich kleiner ist als der durch alleinige Berücksichtigung der kovalenten Geome-

trie definierte, werden die experimentellen Werte verwendet. An dieser Stelle ist es wichtig festzustellen, daß Chiralität bisher nicht berücksichtigt wurde, da die Moleküle ausschließlich durch Abstände beschrieben wurden und diese in Enantiomeren natürlich identisch sind. Für gewöhnlich wird die Chiralität nach Erzeugung kartesischer Koordinaten durch Hinzufügen eines weiteren Energie-Strafterms berücksichtigt, der die Chiralität der jeweiligen Stereozentren enthält^[115].

3.2. Konformation und Kopplungskonstanten

Ebenso wie der NOE ist die Wechselwirkung der Kerne über skalare Kopplungen strukturabhängig; daher können über vicinale Kopplungskonstanten Diederwinkel bestimmt werden. Die Umrechnungen von Kopplungskonstanten in Diederwinkel erfolgt über Gleichung (12), die von Martin Karplus vorgeschlagen wurde^[15, 6].

$$^3J = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad (12)$$

KARPLUS-Gleichungen werden im allgemeinen über quantenmechanische Rechnungen erstellt, und die Koeffizienten werden mit Strukturparametern, z.B. aus Röntgenstrukturanalysen, geeicht^[123–125]. Die Gleichungen haben für alle Kopplungskonstanten die gleiche allgemeine Form, so daß für jede Kopplungskonstante eine Eichung der drei Koeffizienten A , B und C durchgeführt werden muß. Doch selbst bei gut bestimmten Koeffizienten hat man immer noch das Problem, daß Gleichung (12) mehrdeutig ist, d.h. selbst aus einer optimal geeichten Kurve ergeben sich bis zu vier Werte für den Diederwinkel (Abb. 29).

Wegen dieser Probleme war der Einsatz von Kopplungskonstanten als Konformationsparameter in Strukturrechnungen sehr limitiert. Standardmäßig wurden sie lediglich für eine zusätzliche Überprüfung der Struktur verwendet, nachdem eine Konformation mit Hilfe von NOE-Daten bestimmt worden

war. Die dabei auftretenden Diederwinkel wurden in die entsprechenden Kopplungskonstanten umgerechnet und mit den experimentellen J -Werten verglichen. Da Gleichung (12) große Bereiche von zulässigen Winkeln produziert, war die Übereinstimmung von Theorie und Experiment meist sehr gut. Um Mehrdeutigkeiten auszuschließen und die weiten Bereiche zulässiger Diederwinkel zu beschränken, müssen mehrere Kopplungskonstanten um eine Bindung bestimmt werden^[126, 127]. Anschließend wird nur der Diederwinkel weiter berücksichtigt, der mit allen Kopplungskonstanten in Einklang ist. In der Regel fallen die drei übrigen falschen Lösungen von Gleichung (12) weg. Allerdings diente die Kopplungskonstante häufig lediglich dazu, eine bereits bestehende Struktur zu bestätigen, und wurde nicht dazu verwendet, eine Konformation zu ermitteln.

3.3. Einschränkungen bei den Diederwinkeln

Zunächst wurden Kopplungskonstanten in Strukturverfeinerungen verwendet, um akzeptable Bereiche von Diederwinkeln aus Gleichung (12) zu entnehmen und den Torsionswinkel während der Simulation in diesem Bereich festzuhalten. Die Winkelinformation aus der Größe der Kopplungskonstante geht also direkt in die Rechnung mit ein. Natürlich ergibt sich dabei das Problem, daß man sich auf eine einzige konformative Einschränkung festlegt, obwohl Gleichung (12) mehrdeutig ist.

Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, besteht darin, nur Kopplungskonstanten mit extremen Werten zu verwenden^[128–130]. So werden für die $^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha}$ -Kopplungskonstante in Proteinen Werte von größer 8 Hz oder kleiner 6.5 Hz als extrem angesehen. Kopplungskonstanten, die zwischen diesen Werten liegen, werden nicht berücksichtigt, da man eine Mittelung durch rasche Konformationsänderungen nicht ausschließen kann. Für einen J -Wert von 8 Hz liefert die $^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha}$ -Kurve in Abbildung 29 vier mögliche Diederwinkel. Die beiden Lösungen mit positiven ϕ -Winkeln werden dabei für Proteine meist ignoriert – eine problematische Annahme (siehe letzten Absatz dieses Abschnitts). Dadurch bleiben für einen $^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha}$ -Wert von 8 Hz zwei Diederwinkel übrig, die um -120° zentriert sind. Typische Werte für erlaubte Bereiche wären -140° bis 100° für $^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha} > 9.0$ Hz, -160° bis -80° für $9.0 \text{ Hz} > ^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha} > 8.0$ Hz und -160° bis -40° für $^3J_{\text{HN}, \text{H}\alpha} < 6.0$ Hz.

Für jede dieser Kopplungskonstanten wird eine Straf-Funktion verwendet und dem Kraftfeld hinzugefügt. Die Straf-Funktion kann unterschiedliche Formen haben. Ein Ansatz beruht darauf, ein chirales Volumen zu berechnen, das sich aus dem Produkt von drei Vektoren der Atome ergibt, die den Diederwinkel definieren^[131]. Das chirale Volumen $\text{CH}_{\text{target}}$, das mit dem Bereich gültiger Diederwinkel übereinstimmt, wird berechnet und in Gleichung (13) analog den NOEs verwendet, wobei K_{CH} die Kraftkonstante und CH_{theo} das theoretische chirale

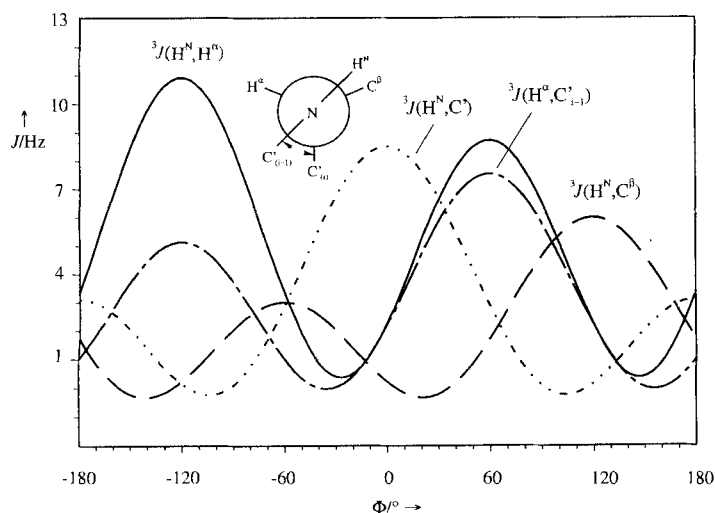


Abb. 29. Karplus-Kurve für vier Kopplungskonstanten, die den Winkel ϕ von L-Aminosäuren in Peptiden charakterisieren. Wegen des sinusförmigen Verlaufs ergeben sich pro Kopplungskonstante bis zu vier Möglichkeiten für den Diederwinkel. Die Kombination aller vier Kopplungskonstanten läßt dagegen in der Regel nur noch einen Diederwinkel zu.

Volumen für denentsprechenden Diederwinkel ist. Gleichung (13) wird nun mit den übrigen Termen des Kraftfeldes gemeinsam minimiert, um sicherzustellen, daß der ausgewählte Diederwinkel einen Wert annimmt, der mit den restlichen experimentellen Vorgaben konsistent ist. Diese Methode hat vor allem in

Distanz-Geometrie-Rechnungen breite Verwendung gefunden, in denen chirale Volumina zur Festlegung der Stereochemie genutzt werden.

Ein anderer Ansatz verwendet eine Straf-Funktion, die identisch zu der ist, die in MM- oder MD-Programmen eingesetzt wird. Für einen J -Wert über 8 Hz wird ein Minimum bei -120° angenommen, während für kleine Kopplungskonstanten ein Minimum zwischen -80 und -60° verwendet wird. Die in Gleichung (14) definierte Straf-Funktion hat sich in MD-Strukturverfeinerungen als vorteilhaft erwiesen^[128], wobei K_{DH} eine Kraft-

$$V = K_{\text{DH}} (1 + \cos(\theta - \delta)) \quad (14)$$

konstante, θ der Diederwinkel und δ eine Phase ist. Das Energie-minimum kann abhängig von der Art der Kopplungskonstante durch Veränderung der Phase δ justiert werden. Mit K_{DH} läßt sich der Bereich möglicher Torsionswinkel um das Minimum festlegen (für ein K_{DH} von 6.8 kJ mol^{-1} ergibt sich beispielsweise bei 300 K ein Bereich für gültige Diederwinkel von $\pm 11^\circ$).

Die Einschränkung bei den Diederwinkeln in Simulationen von Proteinstrukturen beruht auf der Annahme, daß einige der Lösungen von Gleichung (12) nicht gültig sind. Meistens werden positive ϕ -Winkel nicht verwendet. Das konnte bis vor kurzem damit begründet werden, daß es kaum experimentelle Belege für die Existenz von positiven ϕ -Winkeln in Peptiden und Proteinen gab. Erst als immer mehr Strukturen von Proteinen gelöst werden konnten, fand man auch für andere Aminosäuren als Glycin positive ϕ -Werte^[132–134]. Bei cyclischen Peptiden konnte man von vornherein nicht von einer generellen Gültigkeit des Ramachandran-Energieprofils^[135] ausgehen.

3.4. Die direkte Verwendung von Kopplungskonstanten

Eine noch direktere Verwendung von vicinalen Kopplungskonstanten in Strukturverfeinerungen wurde von Kim und Prestegard vorgeschlagen^[17]. Dabei wird eine Straf-Funktion verwendet [Gl. (15)], die ähnlich wie die bei NOEs ist

$$V_J = \frac{1}{2} K_J (J_{\text{exp}} - J_{\text{theo}})^2 \quad (15)$$

[vgl. Gl. (11)]. K_J ist die Kraftkonstante zur individuellen Gewichtung der jeweiligen Kopplungskonstante, J_{exp} der experimentelle Wert der Kopplungskonstante und J_{theo} die mit Gleichung (12) berechnete Kopplungskonstante. Der Unterschied zwischen J_{exp} und J_{theo} wird nun während der Simulation minimiert. Bei diesem Ansatz können sämtliche experimentell bestimmten Kopplungskonstanten in den Verfeinerungsrechnungen verwendet werden, ohne daß irgendwelche Annahmen bezüglich der erlaubten Bereiche gemacht werden müssen, wie es bei der Einschränkung von Diederwinkeln erforderlich ist. Bei der direkten Verwendung von Kopplungskonstanten sind alle Ergebnisse, die sich aus der Karplus-Gleichung ergeben, erlaubt, und in der Tat können auch falsche Diederwinkel herauskommen. Jedoch werden die falschen Lösungen bei gleichzeitiger Verwendung von NOEs und Kopplungskonstanten weitgehend eliminiert. Außerdem können gleichzeitig mehrere (also auch homo- und heteronucleare)

Kopplungskonstanten, die denselben Diederwinkel bestimmen, sehr leicht in der Rechnung verwendet werden^[137].

Gleichung (15) fand bereits bei der Analyse von Peptid- und Proteinkonformation Anwendung^[18, 19, 136]. In den Simulationen an kleinen, cyclischen Peptiden ergaben sich bei alleiniger Verwendung von Kopplungskonstanten Strukturen, die fast identisch mit den aus NOE-Daten erhaltenen sind. Bei dem größeren cyclischen Undecapeptid Cyclosporin A erbrachte die ausschließliche Verwendung von Kopplungskonstanten keine Übereinstimmung mit der aus NOEs abgeleiteten Struktur^[137]. Innerhalb der Peptidrückgrat-Konformation traten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Strukturen auf, wobei jedoch die Diederwinkel, die durch Kopplungskonstanten definiert sind, mit denen der NOE-Struktur übereinstimmen. Das Energie-Strafpotential für drei verschiedene Kopplungskonstanten, die den ϕ -Winkel an D-Ala⁸ in Cyclosporin A definieren, ist beispielhaft in Abbildung 30 gezeigt. Für sämtliche gemessenen Kopplungskonstanten liegt das globale Minimum der potentiellen Energie aus Gleichung (15) bei einem Winkel von $+80^\circ$ ^[138]. Dieser Winkel resultierte auch, wenn nur NOE-Werte verwendet wurden.

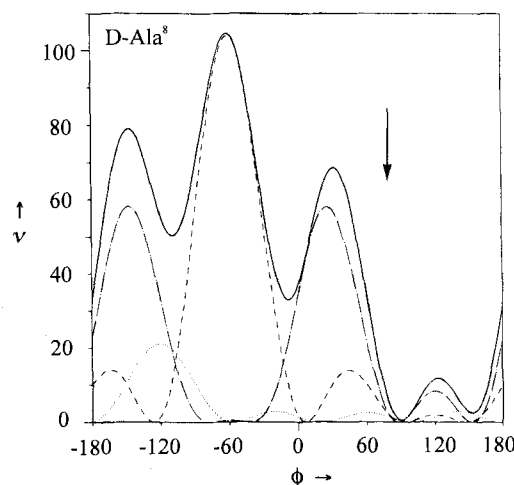


Abb. 30. Die potentielle Energie V [kJ mol^{-1}] des Straf-Terms der Kopplungskonstanten als eine Funktion des Diederwinkels ϕ der Aminosäure D-Ala⁸ in Cyclosporin A. Die „Energie“ wurde mit den Gleichungen (12) und (15) und einer Kraftkonstante K_J von $1.0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ Hz}^{-2}$ berechnet. Für die einzelnen Kopplungskonstanten müssen die Koeffizienten aus den jeweiligen Karplus-Gleichungen verwendet werden. Die Kurven entsprechen den gemessenen Kopplungskonstanten ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha})$ (— · — ·), ${}^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\beta})$ (· · · ·) und ${}^3J(\text{C}(i-1), \text{H}^{\alpha}(i))$ (---) sowie der Summe dieser Funktionen (—). Der Pfeil zeigt den ϕ -Wert, der aus den NOE-Daten folgt.

Die Populationen der Seitenkettenkonformationen sind alle identisch. Der Grund dafür, daß für Cyclosporin A keine Struktur unter alleiniger Verwendung von Kopplungskonstanten bestimmt werden kann, ist einerseits, daß sieben der elf Reste N-methyliert sind und damit nur vier ϕ -Winkel über die ${}^3J_{\text{HN}, \text{H}^{\alpha}}$ -Kopplungskonstante festgelegt werden können, und andererseits, daß die ψ -Winkel generell schlecht durch J -Werte definierbar sind. Da nur wenige Kopplungskonstanten zur Verfügung standen, konnten viele Konformationen die Randbedingungen erfüllen; die Strukturen konvergierten nicht. Es ist in diesem Fall aber sehr wichtig festzuhalten, daß die Struktur aus den NOE-Werten zu allen Kopplungskonstanten paßt.

Bei der Verwendung mehrerer Kopplungskonstanten ergibt sich die Frage nach der richtigen Gewichtung der einzelnen

Kopplungen. Der experimentelle Fehler in J ist stark von der Art der Kopplungskonstante abhängig. Als allgemeine Regel läßt sich festhalten, daß bei nichtmarkierten Molekülen homonucleare Kopplungskonstanten mit weit höherer Genauigkeit bestimmt werden können als heteronucleare. Außerdem muß noch viel Arbeit in die exakte Bestimmung der Koeffizienten in Gleichung (12) investiert werden, da bisher intensive Untersuchungen nur für die $^3J_{\text{HN},\text{H}\alpha}$ -Kopplung in Peptiden durchgeführt wurden. Generell sind vicinale heteronucleare Kopplungskonstanten auch stärker vom weiteren Substitutionsmuster abhängig, und Versuche, sie ähnlich genau wie $J_{\text{H},\text{H}}$ -Werte zu beschreiben, erwiesen sich als schwierig^[139]. Aussagen zur Strukturabhängigkeit der anderen Kopplungskonstanten des Peptidrückgrats beruhen entweder auf rein quantenmechanischen Rechnungen oder auf sehr wenigen experimentellen Daten.

3.5. Das Erkennen von Dynamik

Einer der interessantesten Aspekte bei der Verwendung von Gleichung (12) ist die Möglichkeit, konformative Dynamik zu erkennen, die schnell im Vergleich zur NMR-Zeitskala ist^[140, 141]. Ist der Konformationswechsel rasch, werden die NOEs als eine Funktion der sechsten Potenz des Abstandes R zwischen den beteiligten Protonen gemittelt, Kopplungskonstanten dagegen als eine Serie von Cosinus-Termen der Diederwinkel ($\cos^2\theta$ und $\cos\theta$). Daher kann sich bei flexiblen Molekülen aus den NOEs eine andere Struktur ergeben als aus den Kopplungskonstanten. Dies ist ein klarer Hinweis darauf, daß das Molekül schnelle Konformationsänderungen eingeht. Allgemein läßt sich folgendes anmerken: Ist das System unterbestimmt, können sich die Ergebnisse der Rechnungen mit J -Kopplungen und NOEs unterscheiden. Jedoch werden sich die Lösungen überlappen, wenn der Konformationsraum ausreichend abgesucht wird. Da das z. B. mit DGII der Fall ist, läßt sich bei zwei verschiedenen Lösungen ausgehend von J -Kopplungen und NOEs (ohne Überlappung) klar auf eine konformative Mittelung schließen. Der Grund dafür, daß die „NOE-Struktur“ und die Struktur aus Kopplungskonstanten nicht vereinbar sind, ist in der unterschiedlichen Mittelung von $(R^{-3})^2$ und $\cos^2\theta$ oder $\cos\theta$ zu suchen^[121]. Es ist sehr wichtig, diesen Fall vom Cyclosporin-A-Beispiel im vorigen Abschnitt zu unterscheiden, das im Fall der Kopplungskonstanten ein einfaches Multi-Minima-Problem darstellt.

Die Berücksichtigung dynamischer Aspekte bei der Bestimmung von Molekülkonformationen aus NMR-Daten ist, speziell bei kleinen Systemen wie Peptiden und vielen Naturstoffen wesentlich. Bei raschen Konformationswechseln sind die Abstände aus NOEs mit einer gemittelten Struktur konsistent, die in Lösung nicht vorliegen muß und möglicherweise physikalisch nicht sinnvoll ist^[142]. Nur durch die zusätzliche Verwendung von experimentellen Parametern, die eine andere zeitliche Mittelung erfahren, ist die Identifizierung von dynamischem Verhalten eindeutig möglich. Die Resultate der simultanen Anwendung von Kopplungskonstanten und NOEs, um ein derartiges Verhalten zu analysieren, wurden kürzlich veröffentlicht^[122]. Hat man mehrere Kopplungskonstanten, die einen einzigen Diederwinkel bestimmen, lassen sich Konformationsgleichgewichte auch daran erkennen, daß es keinen Winkel gibt, der

allen Meßdaten gerecht wird. Wegen der größeren Fehler bei der Verwendung heteronuclearer Kopplungskonstanten ist es besser, man nutzt in solchen Fällen einen Datensatz homonuclearer Kopplungskonstanten (beispielsweise beschreiben vier $J_{\text{H},\text{H}}$ -Werte den Winkel $\text{YCH}_2\text{—CH}_2\text{X}$).

3.6. Zeitlich veränderliche Restraints

Wie im vorigen Abschnitt bereits beschrieben, hat die konformative Mobilität einen großen Einfluß auf NMR-Observable (NOEs, Kopplungskonstanten, chemische Verschiebungen) und dadurch auch auf experimentelle Parameter (Abstände und Diederwinkel), die für Simulationsrechnungen verwendet werden. Eine Möglichkeit, dieser Situation gerecht zu werden, ist es, zeitlich veränderliche Restraints zu verwenden^[143, 144]. Diese Methode wurde zuerst für NOEs eingesetzt und wird inzwischen auch bei Kopplungskonstanten angewendet^[145, 146]. Dabei wird der jeweilige Wert der Kopplungskonstante (oder des NOE) nicht im gleichen Rechenschritt mit dem experimentellen Wert verglichen, sondern zuvor über einen gewissen Zeitraum gemittelt. Zur Berechnung der theoretischen Kopplungskonstante dient Gleichung (16), in der die Spitzklammern für die Mittelung über eine bestimmte Zeit stehen. Die Zeitspanne,

$$J_{\text{theo}} = A \langle \cos^2 \theta \rangle + B \langle \cos \theta \rangle + C \quad (16)$$

während der gemittelt wird, umfaßt dabei 10–40 ps, so daß genügend viele Perioden gerechnet werden können, um eine sinnvolle statistische Auswertung zu ermöglichen. Mit dieser Methode werden bei flexiblen Systemen bessere Ergebnisse erhalten als mit zeitlich konstanten Restraints. Ein Beispiel für die Verwendung zeitlich veränderlicher Restraints ist in Abbildung 31 gegeben. Dargestellt ist das Ergebnis zweier Simula-

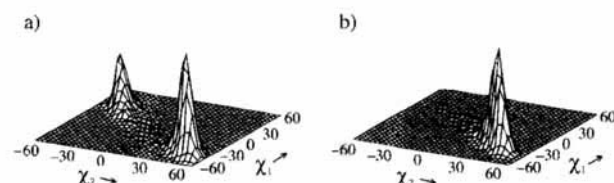


Abb. 31. Relative Populationen der Diederwinkel χ_1 und χ_2 von L-Pro2 in cyclo(L-Pro¹-L-Pro²-D-Pro³). a) Simulation über 1 ns, gerechnet mit zeitlich veränderlichen Restraints. Bereits nach 400 ps sind beide Konformationen deutlich zu erkennen und bleiben bis zum Ende der Simulation erhalten. b) Simulation über 500 ps mit zeitlich konstanten Restraints, wobei nur eine der beiden vorliegenden Konformationen erhalten wird.

tionen an dem cyclischen Tripeptid cyclo(L-Pro¹-L-Pro²-D-Pro³). Aus der Nichtübereinstimmung aller vicinalen $J_{\text{H},\text{H}}$ -Werte mit einer einzigen Konformation für Pro¹ und vor allem Pro² konnte schon früher auf Dynamik geschlossen werden^[147, 148], was mit den Ergebnissen von Relaxationszeitmessungen^[149] und einer Röntgenstrukturanalyse^[150] in Einklang war. Verwendet man die gemessenen Kopplungskonstanten als konstante Restraints, so wird z.B. der Pro²-Ring in eine einzige Konformation gezogen, die aber dann mit den gemessenen J -Werten nicht gut übereinstimmt. Rechnet man dagegen mit veränderlichen Restraints, findet man zwei Minima und eine hervorragende Übereinstimmung mit den Meßwerten.

3.7. Die Ensemble-Methode

Immer wenn an einem System eine Messung durchgeführt wird, ist der Meßwert eine gemittelte Größe, und zwar entweder das Zeitmittel über die Meßdauer oder das Ensemblemittel über eine sehr große Zahl von Molekülen. Natürlich müssen beide Mittelungen identische Ergebnisse liefern. Eine Mittelung über ein Molekülenensemble wurde mit gemessenen Abständen bereits durchgeführt^[151]. Kürzlich wurde dieses Verfahren in das Verfeinerungsprotokoll zu einer DG-Rechnung auch für J -Werte aufgenommen^[22, 152]. In DG-Rechnungen ist es Standard, die Rechnung vielfach zu wiederholen, um eine große Zahl N von Strukturen zu produzieren. In der Ensemble-Methode werden diese Strukturen dazu verwendet, das Ensemblemittel für die gemessene Kopplungskonstante zu bestimmen. Dieses Ensemblemittel [Gl. (17)] wird dann mit dem experimentellen Wert verglichen.

$$J_{\text{theo}} = \frac{1}{N} \sum J_N \quad (17)$$

Die theoretische Kopplungskonstante aus Gleichung (17) wird jetzt zur Berechnung des Fehlers in Gleichung (15) verwendet. Die einzelnen Kopplungskonstanten können über weite Bereiche variieren, doch solange das Mittel über das gesamte Ensemble mit der experimentellen Kopplungskonstante übereinstimmt, ist der Term für die Straf-Funktion Null.

Ein gutes Beispiel für Dynamik oder molekulare Bewegung ist die Rotation innerhalb von Seitenketten in Peptiden. Es ist klar, daß experimentelle Kopplungskonstanten bezüglich der Seitenketten gemittelten Werten entsprechen. Aus diesem Grund kann die $^3J_{\text{H}^\alpha, \text{H}^\beta}$ -Kopplungskonstante zur Konformationsermittlung nur bei extremen Werten verwendet werden (z.B. für $^3J_{\text{H}^\alpha, \text{H}^\beta} < 4.0$ Hz oder > 10 Hz). Bei der Verwendung mehrerer Kopplungskonstanten und zeitlich veränderlicher Restraints kann diese Information aber durchaus in direkter Form den Strukturrechnungen hinzugefügt werden.

3.8. Die Zuordnung der Signale diastereotoper Protonen

Die richtige Zuordnung von Signalen diastereotoper Protonen erhöht die Qualität der mit Abstands-Restraints simulierten Strukturen beträchtlich, da Verfahren wie die Pseudoatomnäherung^[153] nicht mehr angewendet werden müssen. Für die Zuordnung der diastereotopen β -Methylenprotonen von Aminosäuren wie Phenylalanin werden in der Regel $^3J_{\text{H}^\alpha, \text{H}^\beta}$ - und $^3J_{\text{C}^\alpha, \text{H}^\beta}$ - oder $^3J_{\text{N}, \text{H}^\beta}$ -Kopplungskonstanten herangezogen. Hat man nur homonucleare Kopplungen und genügend lokale NOEs zur Verfügung, so lassen sich meist auch diastereotope Protonen zuordnen, ohne heteronucleare Kopplungen hinzuzuziehen.

Bei weniger eindeutigen NOE-Daten hilft oft noch die „Floating-chirality“-Methode^[154–156]. Bei ihr wird der Energieterm im Kraftfeld, der für die relative räumliche Anordnung der beiden β -Protonen notwendig ist, entfernt, so daß die beiden Protonen ihre relativen Positionen (*pro-R* und *pro-S*) während der Simulation tauschen können. Diese Methode, die erstmals in DG-Rechnungen angewendet wurde^[154], funktioniert sehr gut bei Proteinen, bei denen in der Regel insgesamt genügend

NOEs vorhanden sind. Bei Peptiden stehen für gewöhnlich weniger NOE-Werte zur Verfügung. Daher wurde kürzlich die Möglichkeit untersucht, beide Parameter – NOEs und Kopplungskonstanten – einzusetzen und gleichzeitig den Potentialterm der Chiralität zu annullieren. Diese Methode war beispielsweise bei fünf von sechs β -Methylenprotonen eines Substanz-P-Analogous erfolgreich^[157]. Jedoch sollte eine warnende Anmerkung an dieser Stelle nicht fehlen: Die Methode produziert in jedem Fall ein Ergebnis, und zwar ohne die Zahl der Restraints zu berücksichtigen. Das kann dazu führen, daß man ein unterbestimmtes System mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem falschen Minimum fixiert. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Qualität der Restraints: Wenige Restraints aus verschiedenen Raumbereichen sind aussagekräftiger als viele NOEs aus derselben Richtung. Zur Überprüfung der Zuordnung diastereotoper Protonen schlagen wir vor, die Vertrauenswürdigkeit der NOEs anhand ihrer graphischen Darstellung zu untersuchen.

3.9. Die Auswertung anderer Kopplungskonstanten

Bisher haben wir uns auf die Verwendung vicinaler Kopplungskonstanten konzentriert, die am besten untersucht sind und deren Wert in einfachem Zusammenhang mit der Struktur steht. Seitdem jedoch isotoptenmarkierte Verbindungen immer häufiger zur Verfügung stehen, richtet sich mehr und mehr das Interesse auch auf andere Kopplungskonstanten, z.B. 1J - und 2J -Kopplungen, von denen ebenfalls ein Zusammenhang mit der Struktur bekannt ist. Beispielsweise unterscheidet sich $^1J_{\text{C}, \text{H}}$ in Glycosiden für axiale und äquatoriale Protonen um bis zu 10 Hz, d.h. Anomere können unterschieden werden^[158, 159]. Aber auch bei Peptiden wurden Zusammenhänge zwischen der $^1J_{\text{C}^\alpha, \text{H}^\alpha}$ -Kopplungskonstante und den Diederwinkeln ϕ und ψ entdeckt. Vor vielen Jahren erstellten Egli und von Philipsborn^[160] einen funktionalen Zusammenhang, der an Gleichung (12) erinnert [Gl. (18)]. Die $^1J_{\text{C}^\alpha, \text{H}^\alpha}$ -Kopplung hängt also

$$^1J = A + B \cos^2(\phi - 30^\circ) + C \cos^2(\psi - 30^\circ) \quad (18)$$

nicht nur vom Winkel ϕ , sondern gleichzeitig auch vom Winkel ψ des Peptidrückgrats ab. Die potentielle Straf-Energie kann ebenso wie in Abbildung 30, jetzt jedoch in Abhängigkeit von zwei Diederwinkeln, dargestellt werden (Abb. 32). Die Koeffizienten A , B und C in Gleichung (18) wurden erst kürzlich an einer Reihe Alaninhaltiger cyclischer Peptide zu 136.4, 13.7 bzw. -5.2 bestimmt und analog den 3J -Kopplungen in ein MD-Programm implementiert^[161], wobei als experimentell zugänglicher Parameter auch der Winkel ψ resultiert. Dabei zeigte sich, daß

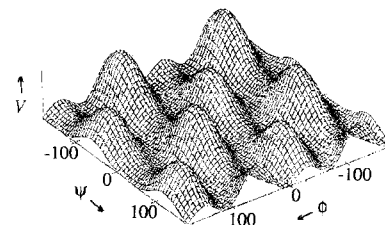


Abb. 32. Straf-Energie V als Funktion der Peptidrückgrat-Winkel ϕ und ψ bei einer gegebenen direkten Kopplungskonstante $^1J_{\text{C}^\alpha, \text{H}^\alpha}$ von 143.2 Hz. Die Energie wurde mit den Gleichungen (15) und (18) und einer Kraftkonstante K_j von $1.0 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ Hz}^{-2}$ berechnet.

mit vielen 3J -Kopplungen zur Charakterisierung des ϕ -Winkels und der gleichzeitigen Verwendung der 1J -Kopplung bei Peptidstrukturen auch für den ψ -Winkel sehr gute Ergebnisse erreicht werden konnten. Gleichung (18) wurde an mehreren Proteinen nochmals neu untersucht, und es ergab sich eine modifizierte Form, mit der allerdings sehr ähnliche Konformationsminima erhalten wurden^[162].

Neuere Untersuchungen an Proteinen haben ergeben, daß auch Kopplungskonstanten über mehr als drei Bindungen interessante Korrelationen mit der Konformation zeigen, so z.B. die $^4J_{H^N(i), H^N(i-1)}$ -Kopplungskonstante, die für gewöhnlich im Bereich von -0.5 bis $+0.5$ Hz liegt und kaum zu interpretieren ist. Bei ψ -Winkeln von etwa $+120^\circ$ und ϕ -Winkeln der nächsten Aminosäure von $+60^\circ$ nimmt diese Kopplungskonstante jedoch Werte von -0.8 bis -2.6 Hz an^[163].

4. Schlußbemerkungen

Wir haben hier die wichtigsten Methoden zur Bestimmung homo- und heteronuclearer Kopplungskonstanten für Heteroatome in natürlicher Häufigkeit, aber auch für isotoptenmarkierte Verbindungen vorgestellt. Im Text konnten wir nicht alle existierenden Verfahren behandeln und haben deshalb in den Tabellen 1–3 weitere wichtige Techniken angegeben. Mit dieser Übersicht sollte der Praktiker in die Lage versetzt werden, das seinen Anforderungen entsprechende Experiment auszuwählen, und sie soll ihm zugleich die nötige Literatur mitliefern. Weiterhin sind die heute üblichen Rechenverfahren zur Strukturaufklärung mit Hilfe von NMR-Daten, die seit kurzem auch die Verwendung von Kopplungskonstanten vorsehen, aufgeführt und kurz diskutiert. Eines unserer Anliegen ist es, die Notwendigkeit der Verwendung von Abstands- und Winkelwerten zu unterstreichen, da auf diese Weise dynamische Phänomene besser erkannt werden können.

Bei kleineren Molekülen hat man die Schwierigkeit, daß die Zahl der verfügbaren NOEs für eine zuverlässige Strukturbestimmung nicht ausreicht. Das liegt daran, daß das Verhältnis von Oberfläche zu Innerem größer ist als im Innern großer globulärer Strukturen. Die geringe Datenmenge verlangt geradezu nach der Mitverwendung von Kopplungskonstanten in Strukturberechnungen. Das gilt auch für Proteinoberflächen oder für die aktiven Regionen vieler Proteine, für die häufig nicht genügend NOE-Werten gemessen werden können. Für die Analyse des Rückgrats von Nucleinsäuren, deren NOE-Werte schwierig zu interpretieren sind, werden Kopplungskonstanten eine große Bedeutung erlangen.

Zum Abschluß möchten wir noch eine Bemerkung zur Struktur von Molekülen machen. Moderne Strukturbestimmungsmethoden nutzen (zumindest für die Verfeinerung) MD-Rechnungen. Über die Strukturkoordinaten der dabei erhaltenen Konformationen wird dann zeitlich gemittelt, um ein Bild der Struktur zu erhalten. Da nahezu alle Moleküle gewisse Flexibilität aufweisen, führt diese Mittelung zu verfälschten Abständen und Winkeln. Zur graphischen Darstellung wird die gemittelte Struktur dann nochmals energieminiert, wobei das nächstgelegene Energieminimum erreicht wird. Das Bild einer solchen Struktur entspricht damit nicht mehr unbedingt einer „reellen“ Struktur, kommt ihr aber meist sehr nahe. Bei der

Diskussion strukturbedingter Eigenschaften muß man sich dieser Tatsache aber dennoch stets bewußt sein.

Bei Strukturbestimmungen geht man in der Regel von der vereinfachenden Annahme aus, daß das Molekül eine einzige Konformation bevorzugt. Stimmen alle experimentellen Parameter mit dem Ergebnis der Strukturberechnungen überein, hat man ein Modell der Struktur. Die Zahl und Qualität der experimentellen Daten und das Kraftfeld bestimmen dann, ob weitere Modelle existieren (Stichworte: lokale Minima, unterbestimmte Struktur). Sind die experimentellen Parameter nicht mit der berechneten Struktur in Einklang, und das auch nach Ausschluß des trivialen Falles (der aber in der Realität sehr wohl eine sorgfältige Überprüfung verlangt) von falsch zugeordneten oder quantitativ falschen Werten, muß man interne Dynamik einbeziehen. Hierfür bieten sich MD-Simulationen, die ein großes Zeitintervall abdecken, die Verwendung von zeitlich veränderlichen Randbedingungen oder Ensemble-Methoden an.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie möchten wir für die langjährige umfassende Unterstützung danken. Viele Mitarbeiter haben über Jahre hinweg Beiträge zur Bestimmung und Auswertung von Kopplungskonstanten geliefert, von denen wir nur einige hervorheben möchten: U. Anders, J. Balbach, W. Bermel, S. Golic Grdadolnik, C. Griesinger, T. Huber, H. Oschkinat, P. Schmieder und S. Seip. Zahlreiche Anregungen erhielten wir durch Kooperationen und vielfältige Diskussionen mit Kollegen, von denen wir nur drei nennen möchten: R. R. Ernst (ETH Zürich), R. Freeman (Oxford) und W. F. van Gunsteren (ETH Zürich). Einige Abbildungen wurden uns dankenswerterweise von S. Golic Grdadolnik (Abb. 29, 32), P. Schmieder (Abb. 16, 18) und T. Huber (Abb. 31) zur Verfügung gestellt. Martin Bachelin gebührt schließlich unser Dank für das sorgfältige Korrekturlesen sowie einige kritische Anmerkungen.

Eingegangen am 25. Juni 1994,
veränderte Fassung am 23. Januar 1995 [A 70]

- [1] H. S. Gutowsky, D. W. McCall, *Phys. Rev.* **1951**, *82*, 748–749.
- [2] H. S. Gutowsky, D. W. McCall, P. Slichter, *Phys. Rev.* **1951**, *84*, 589–590.
- [3] E. L. Hahn, D. E. Maxwell, *Phys. Rev.* **1951**, *84*, 1246–1247.
- [4] E. L. Hahn, D. E. Maxwell, *Phys. Rev.* **1952**, *88*, 1070–1084.
- [5] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11–13.
- [6] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870–2871.
- [7] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [8] R. Kaptein, R. Boelens, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, *Biochemistry* **1988**, *27*, 5389–5395.
- [9] G. Wagner, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1990**, *22*, 101–139.
- [10] H. Kessler, A. Müller, H. Oschkinat, *Magn. Reson. Chem.* **1985**, *23*, 844–852.
- [11] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, *75*, 474–492.
- [12] J. J. Titman, D. Neuhaus, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 111–131.
- [13] G. T. Montelione, G. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5474–5475.
- [14] S. Seip, J. Balbach, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1656–1658, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1609–1611.
- [15] T. Szyperski, P. Güntert, G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1992**, *99*, 552–560.
- [16] G. W. Vuister, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7772–7777.
- [17] Y. Kim, J. H. Prestegard, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1990**, *8*, 377–382.
- [18] D. F. Mierke, H. Kessler, *Biopolymers* **1992**, *32*, 1277–1282.
- [19] M. Eberstadt, D. F. Mierke, M. Köck, H. Kessler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 2583–2592.
- [20] D. F. Mierke, S. Golic Grdadolnik, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8283–8284.
- [21] D. F. Mierke, H. Kessler, *Biopolymers* **1993**, *33*, 1003–1017.
- [22] D. F. Mierke, M. Kurz, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1042–1049.
- [23] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), *Eur. J. Biochem.* **1970**, *17*, 193–201.
- [24] J. D. Roberts, *An Introduction to the Analysis of Spin-Spin Splitting in High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra*, Benjamin, New York, **1962**.

- [25] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon, Oxford, 1987.
- [26] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, Thieme, Stuttgart, 1992.
- [27] J. W. Emsley, J. Feeney, L. H. Sutcliffe, *High Resolution NMR Spectroscopy*, Macmillan (Pergamon), New York, 1965, Kap. 8.
- [28] J. A. Pople, W. G. Schneider, H. J. Bernstein, *High Resolution NMR Spectroscopy*, McGraw Hill, New York, 1959, Kap. 6.
- [29] G. Hägele, M. Engelhardt, W. Boenigk, *Simulation und automatisierte Analyse von Kernresonanzspektren*, VCH, Weinheim, 1987.
- [30] O. W. Sørensen, M. Rance, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1984**, 56, 527–534.
- [31] M. Rance, *J. Magn. Reson.* **1987**, 74, 557–564.
- [32] S. J. F. Vincent, C. Zwaalen, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10989–10990.
- [33] H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* **1986**, 70, 106–133.
- [34] H. Kessler, S. Mronga, G. Gemmecker, *Magn. Reson. Chem.* **1991**, 29, 527–557.
- [35] a) L. D. Hall, T. J. Norwood, *J. Magn. Reson.* **1988**, 76, 325–330; b) *ibid.* **1988**, 78, 582–587.
- [36] K. E. Köver, D. Jiao, D. Uhrin, P. Forgo, V. J. Hruby, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, 106, 119–122.
- [37] D. Neuhaus, G. Wagner, M. Vasak, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *Eur. J. Biochem.* **1985**, 151, 257–273.
- [38] Y. Kim, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **1989**, 84, 9–13.
- [39] H. Oschkinat, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1984**, 60, 164–169.
- [40] H. Kessler, H. Oschkinat, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 689–690; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 690–692.
- [41] R. Freeman, L. McIntyre, *Isr. J. Chem.* **1992**, 32, 231–244.
- [42] L. McIntyre, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1992**, 96, 425–431.
- [43] J. J. Titman, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1990**, 89, 640–646.
- [44] P. Huber, C. Zwaalen, S. J. F. Vincent, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, 103, 118–121.
- [45] F. del R. Portilla, R. Freeman, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, 104, 358–362.
- [46] A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2093–2095.
- [47] H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock, H. R. Loosli, *J. Magn. Reson.* **1984**, 57, 331–336.
- [48] J. Keeler, D. Neuhaus, J. J. Titman, *Chem. Phys. Lett.* **1988**, 146, 545–548.
- [49] H. Kogler, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, 55, 157–163.
- [50] L. Poppe, H. van Halbeek, *J. Magn. Reson.* **1991**, 92, 636–641.
- [51] J. M. Richardson, J. J. Titman, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1991**, 93, 533–553.
- [52] S. Macura, Y. Huang, D. Suter, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1981**, 43, 259–281.
- [53] M. Rance, G. Bodenhausen, G. Wagner, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1985**, 62, 497–510.
- [54] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1986**, 64, 6837–6852.
- [55] C. Griesinger, O. S. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 6394–6396.
- [56] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 490–536.
- [57] T. J. Norwood, K. Jones, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, 104, 106–110.
- [58] S. Wimperis, G. Bodenhausen, *Mol. Phys.* **1989**, 66, 897–919.
- [59] L. Müller, *J. Magn. Reson.* **1987**, 72, 191–196.
- [60] G. T. Montelione, M. E. Winkler, P. Rauenbuehler, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* **1989**, 82, 198–204.
- [61] G. Wider, D. Neri, G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1989**, 85, 426–431.
- [62] M. Kurz, P. Schmieder, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1341–1342; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1330–1331.
- [63] P. Schmieder, M. Kurz, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1991**, 1, 403–420.
- [64] A. S. Edison, W. M. Westler, J. L. Markley, *J. Magn. Reson.* **1991**, 92, 434–438.
- [65] U. Wollborn, D. Leibfritz, *J. Magn. Reson.* **1992**, 98, 142–146.
- [66] A. Bax, S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* **1986**, 67, 565–569.
- [67] G. Otting, H. Senn, G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1986**, 70, 500–505.
- [68] S. Fesik, E. R. P. Zuiderweg, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 770–772.
- [69] D. F. Mierke, P. Schmieder, P. Karuso, H. Kessler, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 1027–1047.
- [70] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1991**, 23, 43–92.
- [71] M. Ikura, L. E. Kay, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, 86, 204–209.
- [72] E. R. P. Zuiderweg, L. P. McIntosh, F. W. Dahlquist, S. W. Fesik, *J. Magn. Reson.* **1991**, 86, 210–216.
- [73] L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, 89, 496–514.
- [74] H. Oschkinat, T. Müller, T. Diekmann, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 284–300; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 277–293.
- [75] P. Schmieder, J. H. Ippel, H. van Elst, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, C. Altona, H. Kessler, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 4747–4751.
- [76] H. Schwalbe, W. Samstag, J. W. Engels, W. Bermel, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **1993**, 3, 479–486.
- [77] B. T. Farmer, R. A. Venters, L. D. Spicer, M. G. Wittekind, L. Müller, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 195–202.
- [78] R. T. Clubb, V. Thanabal, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* **1992**, 97, 213–217.
- [79] R. Powers, A. M. Gronenborn, M. G. Clore, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1991**, 94, 209–213.
- [80] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1992**, 96, 432–440.
- [81] S. Seip, J. Balbach, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1993**, 3, 233–237.
- [82] S. Seip, J. Balbach, H. Kessler, *J. Magn. Reson.* **1992**, 100, 406–410.
- [83] O. W. Sørensen, *J. Magn. Reson.* **1990**, 90, 433–438.
- [84] G. A. Morris, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 760–762.
- [85] S. Wimperis, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1984**, 58, 348–353.
- [86] G. Gemmecker, S. W. Fesik, *J. Magn. Reson.* **1991**, 95, 208–213.
- [87] C. Griesinger, U. Eggenberger, *J. Magn. Reson.* **1992**, 97, 426–434.
- [88] S. D. Emerson, G. T. Montelione, *J. Magn. Reson.* **1992**, 99, 413–420.
- [89] Y. Karimi-Nejad, J. M. Schmidt, H. Rütershans, H. Schwalbe, C. Griesinger, *Biochemistry* **1994**, 33, 5481–5492.
- [90] U. Anders, G. Gemmecker, H. Kessler, C. Griesinger, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **1987**, 327, 72–73.
- [91] H. Kessler, C. Griesinger, K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6927–6933.
- [92] L. Emsley, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **1989**, 82, 211–221.
- [93] W. Bermel, K. Wagner, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* **1989**, 83, 223–232.
- [94] D. Neri, G. Otting, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3663–3665.
- [95] M. Billeter, D. Neri, G. Otting, Y. Q. Quian, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 257–274.
- [96] S. Golig Grdadolnik, M. Eberstadt, G. Gemmecker, H. Kessler, A. Buhr, B. Erni, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 219, 945–952.
- [97] A. Bax, D. Max, D. Zax, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 6923–6925.
- [98] S. Grzesiek, G. W. Vuister, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1993**, 3, 487–493.
- [99] G. W. Vuister, T. Yamazaki, D. Torchia, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1993**, 3, 297–306.
- [100] G. Bodenhausen, H. Kogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1984**, 56, 370–388.
- [101] A. Bax, M. Ikura, L. E. Kay, D. A. Torchia, R. Tschudin, *J. Magn. Reson.* **1990**, 86, 304–318.
- [102] R. E. London, *J. Magn. Reson.* **1990**, 86, 410–415.
- [103] L. E. Kay, L. K. Nicholson, F. Delaglio, A. Box, D. A. Torchia, *J. Magn. Reson.* **1992**, 97, 359–375.
- [104] G. W. Vuister, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5334–5335.
- [105] S. Berger, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 6757–6759.
- [106] R. Kaptein, E. R. P. Zuiderweg, R. Scheek, R. Boelens, W. F. van Gunsteren, *J. Mol. Biol.* **1985**, 182, 179–182.
- [107] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. T. Brünger, M. Karplus, *J. Mol. Biol.* **1985**, 186, 435–455.
- [108] M. P. Allen, D. J. Tildesley, *Computer Simulations of Liquids*, Wiley, New York, 1987.
- [109] J. A. McCammon, S. Harvey, *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.
- [110] C. L. Brooks III, M. Karplus, B. M. Pettitt, *Proteins: A Theoretical Perspective of Dynamics, Structure and Thermodynamics*, Wiley, New York, 1988.
- [111] J. M. Haile, *Molecular Dynamics Simulation*, Wiley, New York, 1992.
- [112] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 1020–1055; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 992–1023.
- [113] W. Braun, N. Go, *J. Mol. Biol.* **1985**, 186, 611–626.
- [114] W. Braun, *Q. Rev. Biophys.* **1987**, 19, 115–157.
- [115] G. M. Crippen, T. F. Havel, *Distance Geometry and Molecular Conformation*, Wiley, New York, 1988.
- [116] T. F. Havel, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1991**, 56, 33–56.
- [117] A. T. Hagler, E. Huler, S. Lifson, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 5319–5327.
- [118] F. A. Momany, R. F. McGuire, A. W. Burgess, H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.* **1975**, 79, 2361–2383.
- [119] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen, D. A. Case, *J. Comput. Chem.* **1986**, 7, 230–249.
- [120] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **1986**, 7, 591–608.
- [121] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Groningen Molecular Simulation (GROMOS) Library Manual*, Biomos, Groningen, Niederlande, 1987.
- [122] N. L. Allinger, Y. H. Huh, J.-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8551–8566; J.-H. Li, N. L. Allinger, *ibid.* **1989**, 111, 8566–8575, 8776–8582.
- [123] V. F. Bystrov, Y. D. Gavrilov, V. T. Ivanov, Y. A. Ovchinnikov, *Eur. J. Biochem.* **1977**, 78, 63–82.
- [124] A. DeMarco, M. Llinas, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1978**, 17, 2727–2742.
- [125] A. Pardi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1984**, 180, 741–751.
- [126] D. Cowburn, D. H. Live, A. J. Fischman, W. C. Agosta, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7435–7442.
- [127] P. Schmieder, H. Kessler, *Biopolymers* **1992**, 32, 435–440.
- [128] D. de Vlieg, R. Boelens, R. M. Scheek, R. Kaptein, W. F. van Gunsteren, *Isr. J. Chem.* **1986**, 27, 181–186.
- [129] A. D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1988**, 204, 675–694.

- [130] M. J. Moore, D. A. Case, W. J. Chazin, G. P. Gippert, T. F. Havel, R. Pows, P. E. Wright, *Science* **1988**, *240*, 314–317.
- [131] T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 281–294.
- [132] S. Ludvigsen, F. M. Poulsen, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 227–233.
- [133] H. Nicholson, E. Söderlind, D. E. Tronrud, B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **1989**, *210*, 181–193.
- [134] J. Overington, M. S. Johnson, A. Sali, T. L. Blundell, *Proc. R. Soc. London B* **1990**, *241*, 132–145.
- [135] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 95–99.
- [136] R. K. Konat, D. F. Mierke, H. Kessler, B. Kutscher, M. Bernd, R. Voegeli, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1649–1666.
- [137] D. F. Mierke, T. Huber, H. Kessler, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 29–40.
- [138] H.-R. Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H.-P. Weber, T. J. Petcher, A. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 682–704.
- [139] P. E. Hansen, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1983**, *14*, 175–296.
- [140] F. A. A. M. de Leeuw, C. Altona, H. Kessler, W. Bermel, A. Friedrich, G. Krack, W. E. Hull, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2237–2246.
- [141] H. Kessler, C. Griesinger, J. Lautz, A. Müller, W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3393–3396.
- [142] O. Jardetzki, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *621*, 227–232.
- [143] A. E. Torda, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *157*, 289.
- [144] A. E. Torda, R. M. Scheek, W. F. van Gunsteren, *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 223–235.
- [145] A. E. Torda, R. M. Brunner, T. Huber, H. Kessler, W. F. van Gunsteren, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 55–66.
- [146] D. A. Pearlman, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 279–299.
- [147] F. A. A. M. de Leeuw, C. Altona, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2237–2246.
- [148] Z. L. Mädi, C. Griesinger, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2908–2914.
- [149] R. Deslaurier, I. C. P. Smith, *Top. Carbon-13C NMR Spectrosc.* **1976**, *2*, 1–80.
- [150] H. Kessler, A. Friedrich, G. Krack, W. E. Hull, *Proc. Am. Pept. Symp. 7th* **1981**, 335–338.
- [151] J. Kenmick, C. P. M. van Mierlo, R. M. Scheek, T. E. Creighton, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 312–322.
- [152] D. F. Mierke, R. M. Scheek, H. Kessler, *Biopolymers* **1994**, *34*, 559–563.
- [153] K. Wüthrich, M. Billeter, W. Braun, *J. Mol. Biol.* **1983**, *169*, 949–961.
- [154] P. L. Weber, R. Morrison, D. Hare, *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 483–487.
- [155] T. A. Holak, D. Gondol, J. Otlewski, T. Wilusz, *J. Mol. Biol.* **1989**, *210*, 635–648.
- [156] N. A. J. van Nuland, J. Grutzinger, K. Dijkstra, R. M. Scheek, G. T. Robillard, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 881–891.
- [157] S. Golie Grdadolnik, D. F. Mierke, G. Byk, I. Zeltser, C. Gilon, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2145–2152.
- [158] K. Bock, C. Pedersen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1974**, 293–297.
- [159] S. Wolfe, B. M. Pinto, V. Varma, R. Y. N. Leung, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 1051–1062.
- [160] H. Egli, W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 976–988.
- [161] D. F. Mierke, S. Golie Grdadolnik, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8283–8284.
- [162] G. W. Vuister, F. Delaglio, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9674–9675.
- [163] G. W. Vuister, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 193–200.
- [164] L. E. Kay, B. Brooks, S. W. Sparks, D. A. Torchia, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5488–5490.
- [165] L. E. Kay, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, *86*, 110–126.
- [166] T. Jippo, O. Kamo, K. Nagayama, *J. Magn. Reson.* **1986**, *66*, 344–348.
- [167] D. Uhrin, T. Liptaj, M. Hricovini, P. Capek, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 137–140.
- [168] G. Bodenhausen, R. Freeman, G. A. Morris, D. L. Turner, *J. Magn. Reson.* **1978**, *21*, 75–95.
- [169] A. Bax, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1099–1100.
- [170] B. Coxon, *J. Magn. Reson.* **1986**, *66*, 230–239.
- [171] T. Parella, F. Sánchez-Ferrando, A. Virgili, *Magn. Reson. Chem.* **1994**, *32*, 343–347.
- [172] H. Oschkinat, A. Pastore, P. Pfändler, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **1986**, *69*, 559–566.
- [173] R. Brüschweiler, J. C. Madsen, C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, *73*, 380.
- [174] J. Cavanagh, J. P. Waltho, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1987**, *74*, 386–393.
- [175] W. Willker, D. Leibfritz, *J. Magn. Reson.* **1992**, *99*, 421–425.
- [176] M. D. Sørensen, S. M. Kristensen, J. J. Led, O. W. Sørensen, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *103*, 364–368.
- [177] R. Weismann, H. Rüterjans, H. Schwalbe, J. Schleucher, W. Bermel, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 231–240.
- [178] S. D. Emerson, G. T. Montelione, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 354–356.
- [179] H. Kessler, U. Anders, G. Gemmecker, *J. Magn. Reson.* **1988**, *78*, 382–388.
- [180] M. Sattler, H. Schwalbe, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1126–1127.
- [181] E. R. P. Zuiderweg, S. W. Fesik, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 653–658.
- [182] U. Eggenberger, Y. Karimi-Nejad, H. Thüning, H. Rüterjans, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 583–590.
- [183] G. Wagner, N. R. Nirmala, G. T. Montelione, S. Hyberts, *Frontiers of NMR in Molecular Biology*, Liss, New York, **1990**, S. 129–143.
- [184] P. Schmieder, V. Thanabal, L. P. McIntosh, F. W. Dahlquist, G. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6323–6324.
- [185] G. Wagner, P. Schmieder, V. Thanabal, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 436–440.
- [186] G. T. Montelione, S. D. Emerson, B. A. Lyons, *Biopolymers* **1992**, *32*, 327–334.
- [187] J. C. Madsen, O. W. Sørensen, P. Sørensen, F. M. Poulsen, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 239–244.
- [188] M. Görlach, M. Wittekind, B. T. Farmer, L. E. Kay, L. Mueller, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, *101*, 194–197.
- [189] W. Willker, U. Wollborn, D. Leibfritz, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, *101*, 83–86.
- [190] S. Seip, J. Balbach, H. Kessler, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1994**, *104*, 172–179.
- [191] K. V. R. Chary, G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 218–224.
- [192] P. Schmieder, S. Zimmer, H. Kessler, *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 375–380.
- [193] H. Kessler, P. Schmieder, M. Köck, M. Kurz, *J. Magn. Reson.* **1990**, *88*, 615–618.
- [194] F. Löhr, H. Rüterjans, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 25–36.