

Erhöhung der Empfindlichkeit in der Transversal-Relaxations-optimierten Spektroskopie**

Guang Zhu,* Xiangming Kong, Xianzhong Yan und Konghong Sze

In den letzten zehn Jahren wurden bezüglich der NMR-spektroskopischen Untersuchung immer größerer, biologisch relevanter Proteine vielfältige Fortschritte gemacht; insbesondere wurden für ^{13}C - und ^{15}N -markierte Proteine mehrdimensionale Heterokern-Techniken entwickelt, durch die NMR-Untersuchungen über Struktur und Funktionen von Proteinen mit Molekulargewichten bis zu 30 kD wesentlich erleichtert wurden. Die Anwendbarkeit dieser Verfahren auf größere Proteine wird jedoch durch die abnehmende Geschwindigkeit der molekularen Taumelbewegung eingeschränkt.^[1] Dadurch verkürzt sich die transversale Relaxation des Proteins, was zu breiteren Linien im Spektrum und geringerer Empfindlichkeit bei diesen Experimenten führt. Bei hohem Magnetfeld sind Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und die Anisotropie der chemischen Verschiebung die entscheidenden Faktoren für die ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Relaxation. Man erkannte, daß diese beiden Relaxationsmechanismen signifikant miteinander interferieren können,^[2] was bei präziseren NMR-Messungen zur Dynamik von Proteinen berücksichtigt werden muß.^[3] Vor kurzem kam man bei der Untersuchung sehr großer Proteine (>30 kD) durch die Entdeckung, daß die Interferenz zwischen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und der Anisotropie der chemischen Verschiebung die transversale Relaxation von ^1H und ^{15}N beträchtlich verkürzen kann, einen großen Schritt voran. Damit wurden Untersuchungen an sehr großen Biomolekülen möglich.^[4] Die Verringerung der Linienbreite wird bei der TROSY-Spektroskopie (TROSY = transverse relaxation-optimized spectroscopy) genutzt, bei der von den vier Multiplets innerhalb einer $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ -Einheit ($\omega_{\text{N}} \pm \pi^1 J_{\text{NH}}$, $\omega_{\text{H}} \pm \pi^1 J_{\text{NH}}$) nur eine Komponente beobachtet wird ($\omega_{\text{N}} + \pi^1 J_{\text{NH}}$, $\omega_{\text{H}} - \pi^1 J_{\text{NH}}$). Theoretische Betrachtungen ergaben, daß eine fast vollständige Auslöschung der transversalen Relaxation dieser Komponente bei ca. 1 GHz erreicht werden kann. Die experimentellen Ergebnisse ergaben eine bemerkenswerte Verringerung der Linienbreite im TROSY- $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ -Spektrum im Vergleich zu einem HSQC-Spektrum, das bei 750 MHz aufgenommen worden war.^[4] Zwar ist die Gesamtintensität des Signals um 75 % geringer, da im 2D- $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ -TROSY-Spektrum nur eine Komponente der vier Multipletts beobachtet wird, doch die in beiden Dimensionen wesentlich

geringere Linienbreite macht dieses Experiment gegenüber dem traditionellen HSQC-Experiment für NMR-Untersuchungen größerer Biomoleküle besonders interessant.

Wir stellten fest, daß die Empfindlichkeit des TROSY-Experiments allein durch Modifizierung der Phasencyclen und der Datenverarbeitung um den Faktor $\sqrt{2}$ verbessert werden kann. Dieses Vorgehen ähnelt den Methoden, die bei den HSQC-, HMQC- und TOCSY-Experimenten mit erhöhter Empfindlichkeit angewendet werden.^[5] Die Pulssequenz des hier vorgestellten TROSY-Versuchs mit erhöhter Empfindlichkeit ist in Abbildung 1 wiedergegeben. Für jeden

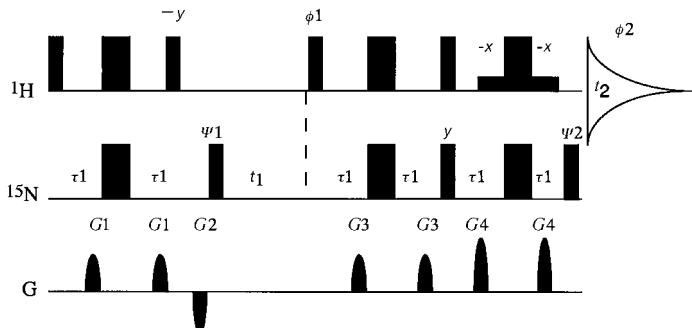


Abb. 1. Pulsschema des $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ -TROSY-Korrelationsexperiments mit erhöhter Empfindlichkeit. Die schmalen und breiten Balken stehen für unselektive 90° - bzw. 180° -Pulse. Sofern nicht anders angegeben, werden die Pulse in der x -Richtung angewendet. Da die Unterdrückung des Wassersignals durch Vorsättigung wegen der starken Strahlungsdämpfung bei hohem Magnetfeld nicht möglich ist, erfolgt die Lösungsmittelunterdrückung nach dem Watergate-Schema mit einem Rf-Puls von 2.1 ms bei 110 Hz. Die Verzögerung τ_1 entspricht $1/(4^1 J_{\text{NH}}) = 2.7$ ms. Alle Gradienten werden entlang der z -Achse angewendet. Die Werte von $G1 - G4$ betragen $12, 19, 14$ bzw. 21 G cm^{-1} bei einer Zeitspanne von 0.4, 1.0, 0.4 bzw. 0.5 ms. Für jedes Inkrement von t_1 werden zwei Transienten aufgenommen und getrennt gespeichert. Das endgültige Absorptionsspektrum ergibt sich nach dem im Text beschriebenen Verfahren. Der erste Transient wird mit dem Phasencyclus $\psi1 = y, x, -y, -x; \phi1 = y; \psi2 = x; \text{rec } \phi2 = x, -y, -x; \phi1 = -y; \psi2 = -x; \text{rec } \phi2 = x, y, -x, -y$ verwendet. Es ist zu beachten, daß die Hersteller der Spektrometer unterschiedliche Vorzeichenkonventionen für die Empfängerphase verwenden.^[8]

t_1 -Wert werden zwei Transienten mit unterschiedlichen Radiofrequenz(Rf)-Pulsen und Empfängerphasencyclen aufgenommen und einzeln gespeichert. Der Kohärenztransfer und die Evolution in der Pulssequenz können mit dem Produktoperator-Formalismus und den Basisoperatoren^[6] $S_{12}^\pm = \frac{1}{2}S^\pm + I_zS^\pm$ und $S_{34}^\pm = \frac{1}{2}S^\pm - I_zS^\pm$ für einen einfachen Übergang beschrieben werden. Der Relaxationsformalismus kann Lit. [4] entnommen werden. Im folgenden stellen wir eine kurze Analyse unseres Ansatzes zur Empfindlichkeitssteigerung vor.

Für den ersten Transienten im ersten Schritt des Phasencyclus (bei $\psi1 = y, \phi1 = y, \psi2 = x$ und $\text{rec } \phi2 = x$) kann die Magnetisierung σ_1 vor der Datenaufnahme durch Gleichung (a) ausgedrückt werden.

$$\begin{aligned} \sigma_1 = & \frac{1}{2}I^- [i\cos(\omega_s^{12}t_1) - \sin(\omega_s^{12}t_1)]\exp(-R_{12}t_1) \\ & + \frac{1}{2}I^- [i\cos(\omega_s^{34}t_1) + \sin(\omega_s^{34}t_1)]\exp(-R_{34}t_1) \\ & + I^- S_z [-i\cos(\omega_s^{12}t_1) + \sin(\omega_s^{12}t_1)]\exp(-R_{12}t_1) \\ & + I^- S_z [i\cos(\omega_s^{34}t_1) + \sin(\omega_s^{34}t_1)]\exp(-R_{34}t_1) \end{aligned} \quad (\text{a})$$

[*] Dr. G. Zhu, M.Sc. X. Kong, M.Sc. X. Yan, Dr. K. Sze

Department of Biochemistry

Hong Kong University of Science and Technology

Clear Water Bay, Kowloon (Hong Kong)

Fax: (+ 852)2358-1552

E-mail: gzhu@ust.hk

[**] Diese Arbeit wurde vom Research Grant Council of Hong Kong (HKUST 563/95M, 6197/97M, 6038/98M) gefördert. Die Autoren danken Dr. David Smith für hilfreiche Diskussionen und Dr. Mingjie Zhang für eine ^{15}N -markierte Calmodulin-Probe. Dem Hong Kong Biotechnology Research Institute danken wir für die Finanzierung des NMR-Spektrometers.

Dabei sind R_{12} und R_{34} die Relaxationszeiten der einzelnen Komponenten des S-Spins,^[4] ω_s^{12} und ω_s^{34} sind $\omega_N + \pi^1 J_{NH}$ bzw. $\omega_H - \pi^1 J_{NH}$. Im zweiten Schritt des Phasencyclus (bei $\psi_1 = x$, $\phi_1 = y$, $\psi_2 = x$ und $\text{rec } \phi_2 = -y$) ist die Magnetisierung σ_2 vor der Detektion durch Gleichung (b) gegeben.

$$\begin{aligned} \sigma_2 = & \frac{1}{2} I^- [-\cos(\omega_s^{12} t_1) - i \sin(\omega_s^{12} t_1)] \exp(-R_{12} t_1) \\ & + \frac{1}{2} I^- [\cos(\omega_s^{34} t_1) - i \sin(\omega_s^{34} t_1)] \exp(-R_{34} t_1) \\ & + I^- S_z [\cos(\omega_s^{12} t_1) + i \sin(\omega_s^{12} t_1)] \exp(-R_{12} t_1) \\ & + I^- S_z [\cos(\omega_s^{34} t_1) - i \sin(\omega_s^{34} t_1)] \exp(-R_{34} t_1) \end{aligned} \quad (b)$$

Die Magnetisierung des ersten Transienten in einem Phasencyclus mit vier Schritten folgt der Beziehung (c). Entsprechend kann die Magnetisierung des zweiten Transienten ausgedrückt werden [Gl. (d)].

$$\begin{aligned} M_1 = & 2[\sigma_1(d) - i\sigma_2(d)] \\ = & -2I^- (-i \cos \omega_s^{12} t_1 + \sin \omega_s^{12} t_1) \exp(-R_{12} t_1) \\ & + 4I^- S_z (-i \cos \omega_s^{12} t_1 + \sin \omega_s^{12} t_1) \exp(-R_{12} t_1) \end{aligned} \quad (c)$$

$$\begin{aligned} M_2 = & -2I^- (i \cos \omega_s^{12} t_1 + \sin \omega_s^{12} t_1) \exp(-R_{12} t_1) \\ & + 4I^- S_z (i \cos \omega_s^{12} t_1 + \sin \omega_s^{12} t_1) \exp(-R_{12} t_1) \end{aligned} \quad (d)$$

Während der Datenaufnahme wird keine Entkopplung angewendet, und die detektierbare Magnetisierung relaxiert in ähnlicher Weise wie ^{15}N in der t_1 -Domäne. Die detektierbare Magnetisierung lässt sich durch Gleichung (e) und (f) beschreiben.^[4] Dabei sind R_{13} und R_{24} die Relaxationszeiten der einzelnen Komponenten des I-Spins,^[4] ω_i^{13} und ω_i^{24} sind $\omega_H + \pi^1 J_{NH}$ bzw. $\omega_H - \pi^1 J_{NH}$. Die Signalintensitäten der detektierbaren Magnetisierung der beiden Transienten sind gegeben durch Gleichung (g) und (h).

$$I^- \rightarrow A (\exp[i\omega_i^{13} - R_{13}] t_2 + \exp[i\omega_i^{24} - R_{24}] t_2) \quad (e)$$

$$2I^- S_z \rightarrow A (\exp[i\omega_i^{13} - R_{13}] t_2 - \exp[i\omega_i^{24} - R_{24}] t_2) \quad (f)$$

$$M_1 = -4(-i \cos \omega_s^{12} t_1 + \sin \omega_s^{12} t_1) \exp(-R_{12} t_1) \exp(i\omega_i^{24} t_2 - R_{24} t_2) \quad (g)$$

$$M_2 = -4(i \cos \omega_s^{12} t_1 + \sin \omega_s^{12} t_1) \exp(-R_{12} t_1) \exp(i\omega_i^{24} t_2 - R_{24} t_2) \quad (h)$$

Nach der Datenerfassung werden die beiden Transienten für jeden t_1 -Wert addiert und subtrahiert; so ergeben sich entsprechende reale und imaginäre FIDs durch Addition einer 90° -Phasenumverschiebung zu beiden resultierenden FIDs. Das endgültige reine Absorptionsspektrum kann durch Datenverarbeitung nach der Methode von States erhalten werden.^[7]

Wir konnten die Effektivität des empfindlichkeitsverbesserten TROSY-Experiments (en-TROSY) durch $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ -Korrelations-Spektroskopie an einer ^{15}N -markierten Calmodulin-Probe demonstrieren. Die Messungen wurden bei 15°C mit einem Varian-Inova-500-MHz-Spektrometer durchgeführt; die Proteinkonzentration betrug 1 mm in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9/1) bei pH 6.8. In Abbildung 2 ist ein kleiner Ausschnitt der $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ -Korrelationspektronen von Calmodulin wiedergegeben. Abbildung 2a zeigt das konventionelle HSQC-Spektrum, das ohne Entkopplung während der t_1 - und t_2 -Perioden erhalten wurde. Bemerkenswerterweise weisen die vier Multipletts bereits bei 500 MHz deutlich unterschiedliche Linienbreiten auf. In den Abbildungen 2b und 2c sind Ausschnitte aus den Spektren dargestellt, die durch ein herkömmliches bzw. das empfindlichkeitsverbesserte TROSY-Experiment erhalten wurden. Ein Vergleich der Abbildungen 2b und 2c (und aller anderen, hier nicht dargestellten Korrelationspeaks) macht

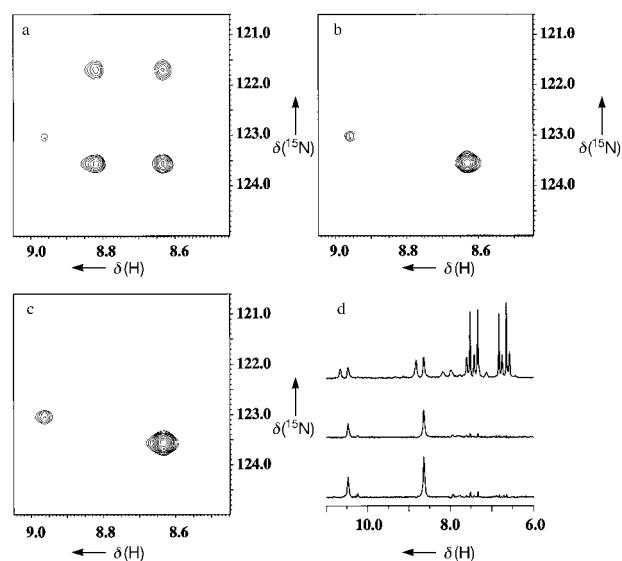


Abb. 2. Konturdiagramme der $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ -Korrelationsspektren von ^{15}N -markiertem Calmodulin. a) Konventionelles HSQC-Spektrum, aufgenommen ohne Entkopplung in der t_1 - und der t_2 -Periode. b) Spektrum, das in einem herkömmlichen TROSY-Experiment aufgenommen wurde.^[4] c) Spektrum, das in einem TROSY-Experiment mit erhöhter Empfindlichkeit aufgenommen wurde (siehe Text). d) 1D-Schnitte der Spektren a–c (von oben nach unten) bei $\delta(^{15}\text{N}) = 123.6$. Die Peaks zwischen 6 und 8 ppm im HSQC-Querschnitt entsprechen den Kreuzpeak-Multipletts bei der ^{15}N -Frequenz ($\omega_N - \pi^1 J_{NH}$), die im TROSY-Versuch nicht beobachtet werden. Die Spektren b und c, die mit den gleichen Parametern aufgenommen und verarbeitet wurden, sind auf gleiches Grundrauschen skaliert. Der Abstandsfaktor zwischen zwei aufeinander folgenden Konturlinien beträgt 1.2.

deutlich, daß für alle Peaks eine Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor $\sqrt{2}$ erreicht wurde, ohne daß dadurch Artefakte entstanden.

Die NMR-Spektroskopie wird durch die Einführung des TROSY-Experiments zu einer vielversprechenden Methode bei Struktur- und Funktionsuntersuchungen an größeren Biomolekülen. Wir konnten die Empfindlichkeit des herkömmlichen 2D-TROSY-Experiments durch Verwendung veränderter Phasencyclen und Datenverarbeitungsprogramme um den Faktor $\sqrt{2}$ steigern. Diese Verbesserung wird in Hochfeld-NMR-Untersuchungen an großen Proteinen zweifellos weitverbreitet Anwendung finden.

Eingegangen am 19. Juni 1998 [Z 12014]

Stichwörter: NMR-Spektroskopie • Proteine

- [1] a) G. Wagner, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 375–385; b) D. Nietlispach, R. T. Clower, R. W. Broadhurst, Y. Ito, J. Keller, M. Kelly, J. Ashurst, H. Oschkinat, P. J. Domaille, E. D. Laue, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 407–415.
- [2] a) H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **1956**, *25*, 709–715; b) R. R. Vold, R. L. Vold, *Prog. NMR Spectrosc.* **1978**, *12*, 79–133; c) M. Goldman, *J. Magn. Reson.* **1984**, *60*, 437–452; d) S. Wimperis, G. Bodenhausen, *Mol. Phys.* **1989**, *66*, 897–919; e) J. Boyd, U. Hommel, I. D. Campbell, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *175*, 477–482.
- [3] a) L. E. Kay, L. K. Nicholson, F. Delaglio, A. Bax, D. A. Torchia, *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 359–375; b) A. G. Palmer, N. J. Skelton, W. J. Chazin, P. E. Wright, M. Rance, *Mol. Phys.* **1992**, *75*, 699–711; c) N. Tjandra, A. Szabo, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6986–6991.
- [4] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366–12371.

- [5] a) A. G. Palmer III, J. Cavanagh, P. E. Wright, M. Rance, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 151–170; b) J. Cavanagh, M. Rance, *J. Magn. Reson.* **1990**, *88*, 72–85; c) L. E. Kay, P. Keifer, T. Saarinen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10663–10665; d) J. Schleucher, M. Sattler, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1518–1521; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1489–1491.
- [6] a) R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *The Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon, Oxford, **1987**; b) O. W. Sorensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *Prog. NMR Spectrosc.* **1983**, *16*, 163–192.
- [7] D. I. States, R. A. Haberkorn, D. J. Buben, *J. Magn. Reson.* **1982**, *93*, 151.
- [8] Anmerkung bei der Korrektur (25. September 1998): Ein Gutachter wies uns darauf hin, daß die Spektrometer der Firmen Varian und Bruker diesbezüglich einer unterschiedlichen Vorzeichenkonvention folgen, weshalb die *y*-Achse der Empfängerphase sowie die Phase des *y*-Pulses invertiert werden müssen. In der in Abb. 1 gezeigten Pulsssequenz ist bei diesem Phasencyclus nur die Phase des zweiten 90° - ^1H -Pulses betroffen: Für eine optimale Empfindlichkeit sollte die Phase dieses Pulses – *y* bei Varian- und +*y* bei Bruker-Spektrometern sein. Wenn diese Phase invertiert wird, geht die "Gleichgewichts"-Verstärkung, die von Pervushin et al. (*J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6394–6400) nach dem Einreichen unseres Manuskripts beschrieben wurde, verloren. Die von uns hier vorgestellte Empfindlichkeitserhöhung hängt allerdings nicht von der Phase dieses Pulses ab, und eine Verstärkung um den Faktor $\sqrt{2}$ wird gegenüber dem entsprechenden TROSY-NMR-Experiment mit der gleichen Phase hinsichtlich dieses Pulses erzielt.

Effiziente Sialyltransferase-Inhibitoren auf der Basis von Übergangszustandsanaloga des Sialyldonors**

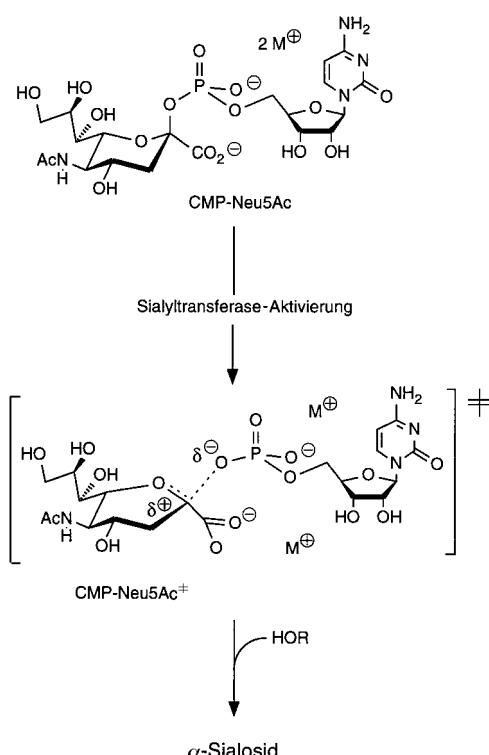
Bernd Müller, Christoph Schaub und Richard R. Schmidt*

Neuraminsäure enthaltende Epitope sind an der Zelladhäsion, an Entzündungen und anderen wichtigen biologischen Prozessen beteiligt.^[1] So gibt es einen Zusammenhang zwischen der Sialylierung von Glykonjugaten und der Bösartigkeit von Tumorzellen.^[2] Außerdem unterscheiden sich Tumorzellen und normale Zellen in der Art der Sialylie rung:^[3, 4] Beispielsweise wurde *N*-Glycolylneuraminsäure auf der Oberfläche von normalen menschlichen Zellen bisher nicht nachgewiesen, während 30–50% von Tumorzellen unterschiedlicher Herkunft diese Verbindung in kleinen Mengen enthalten.^[3] Kürzlich wurde über eine medizinisch interessante Beziehung zwischen der $\alpha(2\text{-}6)$ -Sialylierung von *N*-Acetylglucosamin, der Aktivierung von B-Lymphozyten und der Funktion des Immunsystems berichtet.^[5] Um den Einfluß von Sialinsäureresten in biologischen Prozessen untersuchen zu können, ist die Entwicklung leistungsfähiger Inhibitoren für Sialyltransferasen äußerst wünschenswert.

[*] Prof. Dr. R. R. Schmidt, Dipl.-Chem. B. Müller, Dipl.-Chem. C. Schaub
Fakultät für Chemie der Universität, Fach M 725
D-78457 Konstanz
Fax: (+49) 7531-88-3135

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. C.S. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Stipendium. Dr. A. Geyer danken wir für seine Hilfe bei den Strukturaufklärungen durch NMR-Experimente.

Sialyltransferasen verwenden unabhängig von ihrem Ursprung und ihrer Acceptorspezifität als Sialyldonor Cytidin-monophosphat-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac, Schema 1).^[6] Die vom mutmaßlichen Reaktionsverlauf abgeleiteten Analoga des Übergangszustands (CMP-Neu5Ac⁺ in Schema 1)^[7, 8] könnten eine hohe Enzymaffinität aufweisen und



Schema 1. Mechanismus der Sialylierung.

daher besonders effiziente Inhibitoren sein. Bisher wurden nur wenige Donor- und Acceptoranaloga (= Substratanaloga) als Inhibitoren für Sialyltransferase beschrieben.^[7–13] Ihre Wirksamkeit liegt jedoch nur im mikromolaren Bereich und entspricht damit der des Substrats CMP-Neu5Ac, das an $\alpha(2\text{-}6)$ -Sialyltransferase aus Rattenleber (EC 2.4.99.1) mit $K_M = 46 \mu\text{M}$ bindet (Tabelle 1).^[7] Dies veranlaßte uns, Analoga des Übergangszustands als Inhibitoren zu synthetisieren.^[7, 14] Die Verbindungen **1** und **2** basieren auf dem Modell des

Tabelle 1. Affinität von CMP-Neu5Ac (K_M) zu $\alpha(2\text{-}6)$ -Sialyltransferase aus Rattenleber und Inhibierungskonstanten (K_i) der Übergangszustandsanaloga (*R*)-**2**, **3h,l**, **4h,l**, (*R*)-**6**, (*S*)-**6**, (*R*)-**7**, (*S*)-**7**, (*E*)-**8** und (*Z*)-**9**.^[a]

	$K_M [\mu\text{M}]$	$K_i [\mu\text{M}]$	Lit.
CMP-Neu5Ac	46 ± 7	–	[7]
(<i>R</i>)- 2	–	0.35 ± 0.05	[8]
3h	–	0.20 ± 0.05	–
3l	–	1.0 ± 0.2	–
4h	–	0.28 ± 0.06	–
4l	–	1.0 ± 0.3	–
(<i>R</i>)- 6	–	10 ± 2	–
(<i>S</i>)- 6	–	7 ± 2	–
(<i>R</i>)- 7	–	15 ± 3	–
(<i>S</i>)- 7	–	23 ± 5	–
(<i>E</i>)- 8	–	6.0 ± 0.5	[8]
(<i>Z</i>)- 9	–	0.04 ± 0.008	–

[a] Einzelheiten siehe Lit. [7a].