

## Strukturaufklärung

# Biomolekulare NMR-Spektroskopie auf der Überholspur\*\*

Bernd Simon und Michael Sattler\*

### Stichwörter:

GFT-NMR-Spektroskopie · Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie · Proteine · Strukturaufklärung

Die NMR-Spektroskopie ist eine bewährte Methode zur Charakterisierung der dreidimensionalen Struktur, der Dynamik und der molekularen Wechselwirkungen von Biomakromolekülen. Etwa 20 % der Strukturen in der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org/pdb>) wurden NMR-spektroskopisch bestimmt. Internationale Strukturgenomik-Projekte verwenden sowohl Röntgenbeugung als auch NMR-Spektroskopie zur Bestimmung von Proteinstrukturen.<sup>[1]</sup> Die Effizienz der biomolekularen NMR-Spektroskopie ist durch die Messzeiten limitiert, die benötigt werden, um einen kompletten Datensatz aus mehrdimensionalen NMR-Experimenten zur Strukturbestimmung zu erhalten. Lange Messzeiten waren bisher erforderlich für die Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses in den Spektren sowie für ausreichende spektrale Auflösung in den indirekt detektierten Dimensionen eines mehrdimensionalen NMR-Experiments.

Kontinuierliche Verbesserungen der NMR-Geräte, etwa durch die Einführung von Magneten sehr hoher Feldstärken und von Kryoprobenköpfen, haben die Empfindlichkeit erheblich verbessert. Daher könnte die Messzeit oft signifikant verkürzt werden, wenn es gelänge, die Auflösung in den indirekten Dimensionen mehrdimensiona-

ler NMR-Experimente zu optimieren. Kim und Szyperski haben nun ein generelles Verfahren für die Aufnahme von NMR-Spektren vorgestellt, bei dem die Dimensionalität von mehrdimensionalen NMR-Experimenten reduziert wird.<sup>[2]</sup> Diese GFT-NMR-Spektroskopie genannte Methode führt zu einer drastischen Reduktion der Messzeiten, ohne die Auflösung in den indirekten Dimensionen zu limitieren. Sie kann immer dann angewendet werden, wenn die Messzeit für ein NMR-Experiment nicht durch Empfindlichkeit, sondern durch spektrale Auflösung limitiert ist.

### Mehrdimensionale NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopische Strukturbestimmung umfasst zwei Schritte: Im ersten werden alle chemischen Verschiebungen sequentiell zugeordnet, im zweiten werden Strukturinformationen aus Kern-Overhauser-Effekten („nuclear Overhauser effects“, NOEs) sowie skalaren und residualen dipolaren Kopplungen abgeleitet.<sup>[3,4]</sup> Die Zuordnung von chemischen Verschiebungen und NOEs wird durch Überlagerungen der mit dem Molekulargewicht wachsenden Zahl an Signalen erschwert. Vor etwa 15 Jahren wurden effiziente Verfahren zur vollständigen Isotopenmarkierung von Proteinen mit <sup>13</sup>C und <sup>15</sup>N eingeführt. Dies ermöglicht es, heteronukleare Korrelationsexperimente zu verwenden, um Signalüberlagerungen in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren zu umgehen.<sup>[5]</sup> Dabei wird die Magnetisierung eines Protons *I* auf einen direkt gebundenen Heterokern *S*, (<sup>13</sup>C oder <sup>15</sup>N) durch große <sup>1</sup>J-Kopplungen übertragen.

Im einfachsten Fall erhält man ein zweidimensionales Spektrum,<sup>[6]</sup> in dem die chemischen Verschiebungen von Protonen und direkt gebundenen Heterokernen miteinander korreliert werden. Seit der Einführung von mehrdimensionalen, d.h. drei-<sup>[7–9]</sup> oder vierdimensionalen<sup>[10]</sup> Experimenten wurde eine Vielzahl an NMR-Pulssequenzen entwickelt,<sup>[11]</sup> die es ermöglichen, die <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-NMR-Signale eines Proteins über direkte <sup>1</sup>J-Kopplungen miteinander zu korrelieren.<sup>[12]</sup>

Ein zweidimensionales (2D) *I,S*-Korrelationsexperiment besteht aus einer Folge von Radiofrequenzpulsen und Delays, die den Transfer von Magnetisierung zwischen den Spins *I* und *S* bewirken. Die chemischen Verschiebungen der *S*-Kerne werden in einer indirekten (digitalisierten) Evolutionszeit *t*<sub>1</sub> aufgenommen. Dabei wird das Delay, in dem die Evolution der chemischen Verschiebungen der *S*-Kerns stattfindet, schrittweise inkrementiert. Dies führt während *t*<sub>1</sub> zu einer Modulation des NMR-Signals mit den Frequenzen der *S*-Kerne. Nach dem Magnetisierungstransfer wird die chemische Verschiebung der *I*-Kerne während *t*<sub>2</sub> direkt detektiert. Fourier-Transformation entlang beider Zeitachsen führt zu einem 2D-Spektrum mit den chemischen Verschiebungen der *S*- und *I*-Spins als Achsen.

Dieses Konzept lässt sich leicht durch die Einführung zusätzlicher indirekter Zeitdomänen auf mehr als zwei Dimensionen erweitern.<sup>[7–9]</sup> Ein dreidimensionales *I,S,T*-Korrelationsexperiment ergibt sich z.B. aus den Magnetisierungstransfers und den Evolutionen der chemischen Verschiebungen von drei unterschiedlichen Kernen *I*, *S* und

[\*] Dr. B. Simon, Dr. M. Sattler  
European Molecular Biology Laboratory  
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg  
(Deutschland)  
Fax: (+49) 6221-387-306  
E-mail: sattler@embl.de

[\*\*] Wir danken Christian Griesinger für hilfreiche Diskussionen und Gegenlesen des Manuskripts.

$T$  (Abbildung 1a). Für optimale Empfindlichkeit werden üblicherweise Protonenspins angeregt und detektiert.<sup>[6]</sup> Mit der Einführung zusätzlicher indirekter Zeitdimensionen nimmt die Gesamtzeit eines NMR-Experiments drastisch zu, da für die Messung von  $m$  Zeitpunkten in einer indirekten Dimension eines  $N$ -dimensionalen Experiments  $m$  ( $N-1$ )-dimensionale Spektren aufgenommen werden müssen. Die Gesamtzeit ist bestimmt durch die Zahl der pro indirekter Dimension aufgenommenen Zeitpunkte ( $m$ ), die Zahl der gemittelten Scans (Experimentwie-

derholungen) pro Messpunkt ( $N_s$ ) und die Dauer eines Scans, typischerweise etwa eine Sekunde. Mit  $N_s=1$  und 60 Punkten pro indirekter Dimension ergibt sich so eine minimale Messzeit von einer Minute ( $60 \times 1$  s) für ein 2D-, einer Stunde ( $60 \times 60 \times 1$  s) für ein 3D-, 2,5 Tagen für ein 4D- und knapp einem halben Jahr für ein 5D-Spektrum. Selbst mit diesen Minimalanforderungen sind 5D-Spektren also nicht praktikabel; daher werden üblicherweise nur Spektren mit bis zu vier Dimensionen aufgenommen.

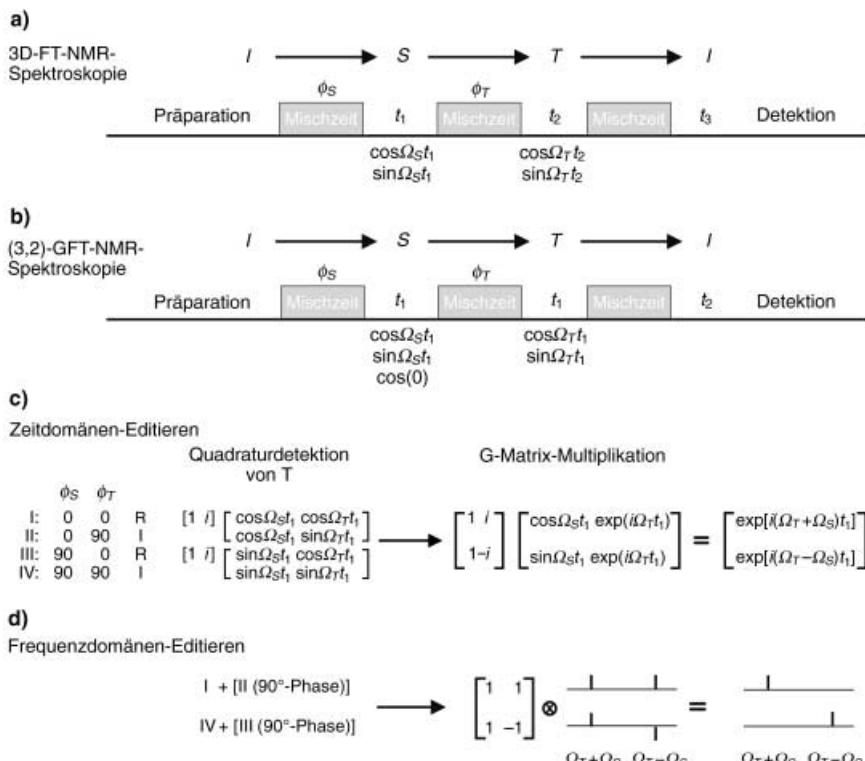
Die minimale Messzeit wird weiterhin durch das Signal/Rausch(S/R)-Ver-

hältnis bestimmt. Für gewöhnlich werden  $N_s$  Wiederholungen pro Messpunkt einer gegebenen NMR-Pulssequenz aufaddiert. Die Signale erscheinen in allen  $N_s$  Wiederholungen an identischen Positionen, sodass die Signalhöhe  $N_s$  mal der Intensität im Einzelexperiment entspricht, wohingegen das Rauschen lediglich mit der Quadratwurzel der Zahl der Scans zunimmt. Daher nimmt das S/R-Verhältnis proportional mit  $\sqrt{N_s}$  zu.

### NMR-Spektroskopie mit reduzierter Dimensionalität

Bis vor kurzem erforderten 3D-Experiments wegen des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses Messzeiten von 2–3 Tagen. Die Gesamtzeit wurde durch das S/R-Verhältnis bestimmt (empfindlichkeitslimitiert), was die Aufnahme einer ausreichenden Zahl an Punkten in den indirekten Dimensionen ermöglichte. Erhebliche Verbesserungen der NMR-Instrumentierung über die letzten Jahre haben die intrinsische Empfindlichkeit um den Faktor 3–5 erhöht, sodass mit 9- bis 25fach kürzerer Messzeit ein vergleichbares S/R-Verhältnis erreicht wird und 3D-Experiments in weniger als einem Tag durchgeführt werden können. Um ausreichende spektrale Auflösung in den indirekten Dimensionen zu erzielen, sind längere Messzeiten dennoch erforderlich, daher werden diese Experimente als auflösungslimitiert bezeichnet. Neben verschiedenen Strategien zur optimierten Aufnahme der Messpunkte in indirekten Dimensionen, wie nichtlinearer Datenpunktsammlung<sup>[13,14]</sup> oder simultaner Aufnahme,<sup>[15–17]</sup> wurde auch die Reduzierung der Dimensionalität schon vor zehn Jahren vorgeschlagen.<sup>[18,19]</sup>

In Experimenten mit reduzierter Dimensionalität (RD) werden nach dem Prinzip der Akkordeon-Spektroskopie<sup>[6]</sup> zwei oder mehr<sup>[2,20,21]</sup> indirekte Zeitdimensionen gemeinsam aufgenommen, indem die entsprechenden Zeintervalle synchron inkrementiert werden (Abbildung 1b). Damit werden  $K$  indirekte Dimensionen des  $ND$ -Experiments auf  $N-K$  Dimensionen im RD-Experiment projiziert. Durch Quadraturdetektion (siehe folgenden Ab-



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung a) eines 3D-NMR-Experiments und b) eines entsprechenden (3,2)D-RD-NMR-Experiments mit reduzierter Dimensionalität (RD), in dem die Spins der Kerne  $I$ ,  $S$  und  $T$  korreliert werden. Während der Präparationsphase bildet sich die Gleichgewichtsmagnetisierung aus. Die chemischen Verschiebungen der  $S$ - und  $T$ -Kerne werden in indirekten Evolutionszeiten aufgenommen, die der  $I$ -Kerne werden direkt während der Akquisition detektiert. Im (3,2)D-RD-Experiment ist die Evolution der chemischen Verschiebung der  $S$ -Kerne projiziert, während die chemischen Verschiebungen der Kerne  $T$  und  $S$  simultan in  $t_1$  aufgenommen werden. Quadraturdetektion für  $S$  und  $T$  wird durch Anwendung der Mischsequenzen mit Phasen ( $\phi_S$  und  $\phi_T$ )  $0^\circ$  und  $90^\circ$  erreicht. Somit ergeben sich zwei Signalpaare mit Cosinus- und Sinusmodulation (Abbildung 1c). Im (3,2)D-GFT-Experiment wird das Zentralsignal in einem zusätzlichen Experiment ohne Verschiebungsevolution der  $S$ -Kerne während  $t_1$  detektiert. Dadurch ergibt sich ein Zentralsignal bei  $\Omega_T$  in  $\omega_1$ . c) Quadraturdetektion im (3,2)D-GT-Experiment erfordert Linearkombination von vier verschiedenen  $t_1$ -Signalen; R und I bezeichnen Real- bzw. Imaginärteil. Die  $90^\circ$ -Phasenverschiebung zwischen den Signalen I, IV gegenüber II, III ist zu beachten. Im ersten Schritt werden die cosinus- und sinusmodulierten Signale der  $T$ -Kerne zur Quadraturdetektion der  $T$ -Spinfrequenzen kombiniert. Danach werden die beiden so erhaltenen Zeitsignale mit einer G-Matrix (für  $K=1$ ) multipliziert und ergeben zwei phasenempfindliche Signale bei den Frequenzen  $\Omega_T \pm \Omega_S$ . Alternativ kann die Linearkombination in der Frequenzdomäne vorgenommen werden (d).

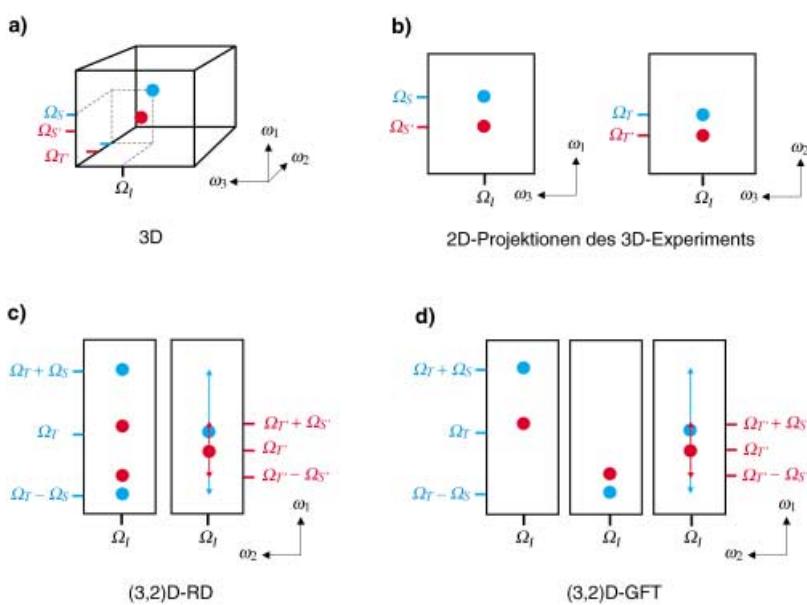
schnitt) der Experimente I und II (Abbildung 1c) lässt sich das Vorzeichen der Frequenz in einer der indirekten Zeitdomänen bestimmen ( $\Omega_T$  in Abbildung 1). Die  $K$  projizierten Dimensionen führen zu zusätzlichen cosinusmodulierten Signalen in der Zeitdomäne, die in den Spektren als Kreuzzsignale mit den Frequenzen  $\Omega_1 \pm \Omega_2 \pm \Omega_3 \dots \pm \Omega_{K+1}$  auftreten. Man erhält daher im Spektrum Signalverdopplungen an Positionen der Summen- und der Differenzfrequenzen der simultan inkrementierten indirekten Dimensionen. Ein 3D-Experiment mit einer Signalkoordinate bei  $(\Omega_S, \Omega_T, \Omega_I)$  in den drei Frequenzdimensionen  $\omega_1, \omega_2, \omega_3$  (Abbildung 2a) reduziert sich beispielsweise auf ein 2D-Experiment mit den beiden Signalkoordinaten  $(\Omega_T + \Omega_S, \Omega_I)$  und  $(\Omega_T - \Omega_S, \Omega_I)$  in  $(\omega_1, \omega_2)$  des RD-Experiments (Abbildung 2c). Das 2D-RD-Äquivalent eines 5D-Experiments ent-

hält acht Signale, die  $2 \times 2 \times 2$  Summen- und Differenzfrequenzen von drei simultan inkrementierten Dimensionen. Im Allgemeinen ergeben sich  $2^K$  Signale in der indirekten Dimension eines  $(N, N-K)$ -RD-Experiments mit  $K+1$  simultan aufgenommenen ( $K$  projizierten) Dimensionen im Vergleich zum konventionellen ND-Experiment.

## Reduzierte Dimensionalität mit voller Quadraturdetektion: GFT-NMR-Spektroskopie

Signifikante Nachteile dieser Implementierung von RD-Experimenten sind die Reduktion des S/R-Verhältnisses um  $\sqrt{2^K}$  im  $(N, N-K)$ -RD-Experiment sowie zusätzliche Signalüberlagerungen im Vergleich zum entsprechenden ND-Experiment. Diese resultieren aus der Cosinusmodulation einer projizierten

Zeitdomäne, die zu einer Signalverdopplung führt. Dadurch wird auch die Signalintensität um  $1/(2^K)$  in einem  $(N, N-K)$ -D-Experiment reduziert (Abbildung 2c). Wird jedoch ein zweites Spektrum mit Sinusmodulation aufgenommen und damit eine der Dublett-komponenten invertiert, dann werden durch Addition und Subtraktion der beiden cosinus- und sinusmodulierten Datensätze zwei Spektren mit jeweils nur einem Signal erhalten (Abbildung 1c). Da die ursprünglichen Dublett-komponenten aufaddiert werden, verbessert sich das S/R-Verhältnis um  $\sqrt{2}$  gegenüber dem RD-Experiment. Dieses Verfahren entspricht der Quadraturdetektion und wird routinemäßig für die Bestimmung der Vorzeichen der Frequenzen in den indirekten Dimensionen konventioneller NMR-Spektren verwendet.<sup>[6]</sup> Eine verbesserte Implementierung von RD-Experimenten verwendet daher Quadraturdetektion in allen simultan inkrementierten Zeitdomänen.<sup>[2, 21–23]</sup> Cosinus- und Sinusmodulation des Zeitsignals werden durch unabhängige 90°-Drehung der Phase der Radiofrequenzpulse vor jeder indirekten Evolutionszeit eingestellt (Experimente I bis IV in Abbildung 1c). In einem (3,2)-D-RD-Experiment (Abbildung 1b, 2c) wird für die T-Spins konventionelle Quadraturdetektion angewendet. Zur vollständigen Quadraturdetektion werden zwei weitere Datensätze mit sinusmodulierter Evolution der chemischen Verschiebung der S-Spins aufgenommen. Nach Fourier-Transformation ergeben sich Inphase- und Antiphase-Dubletts bei den Frequenzen  $\Omega_T \pm \Omega_S$ . Durch Linearkombination der beiden Datensätze erhält man zwei Spektren mit einem Signal bei  $\Omega_T + \Omega_S$  bzw.  $\Omega_T - \Omega_S$  (Abbildung 1c und d, 2d). Im  $(N, N-K)$ -D-RD-Experiment werden  $2^K$  Linearkombinationen gebildet. Die entsprechenden Transformationen können in Matrixform dargestellt werden und sind ein Teil der von Kim und Szyperski eingeführten G-Matrix. Eine  $2 \times 2$ -Matrix für die entsprechende Linearkombination der Signale in der Zeitdomäne eines (3,2)-D-RD-Experiments ist in Abbildung 1c gezeigt. Fourier-Transformation der so editierten Zeitsignale führt zu einem Satz von Basisspektren mit Singulett bei allen Summen- und Differenzfre-



**Abbildung 2.** Schematischer Vergleich der konventionellen und der RD-Implementierung eines 3D-Experiments für zwei Drei-Spin-Systeme (blau und rot), deren  $I$ -Kerne die gleiche Verschiebung haben, mit den Resonanzfrequenzen  $\Omega_T, \Omega_S, \Omega_I$ ,  $\Omega_T, \Omega_S$  und  $\Omega_I$ . a) Signal im konventionellen 3D-FT-NMR-Experiment. b) Die Frequenzen des 3D-Experiments können eindeutig aus zwei 2D-Projektionen abgeleitet werden, falls keine Signalüberlagerungen vorliegen. Andernfalls sind die Frequenzen in den verschiedenen Dimensionen nicht korrelierbar, und das partiell überlagerte Spinsystem kann nicht eindeutig zugeordnet werden. c) In einem RD-Experiment werden die Frequenzen der Spins der T- und S-Kerne als Summen und Differenzen der chemischen Verschiebungen gemessen (links). Die eindeutige Bestimmung der zugrunde liegenden Frequenzen wird auch im Fall von entarteten chemischen Verschiebungen durch die Aufnahme eines Zentralsignalspektrums (rechts) ermöglicht, in dem die chemische Verschiebung der S-Kerne während  $t_1$  nicht evolviert. d) Spektren eines (3,2)-D-GFT-Experiments. Nach Linearkombination (Multiplikation mit einer G-Matrix in der Zeitdomäne, siehe Abbildung 1c) ergeben sich zwei Signale bei der Summe und bei der Differenz der T- und S-Spinfrequenzen. Zur Extraktion der chemischen Verschiebungen im Fall von Entartungen wird das entsprechende Zentralsignalspektrum benötigt (rechte Spalte).

quenzen der indirekten Zeitdomänen (Abbildung 2d, links und Mitte). Wird die volle Quadraturdetektion verwendet, dann erhält man im  $(N,N-K)D$ -RD-Experiment das gleiche Signal/Rausch-Verhältnis wie im entsprechenden konventionellen ND-Experiment, da dort ebenfalls Quadraturdetektion in allen indirekten Dimensionen verwendet wird.

Im RD-Experiment geht jedoch Information verloren, wenn die Resonanzfrequenzen in allen  $(N-K-1)$  konventionell aufgenommenen Dimensionen überlagern, da nur Summen- und Differenzfrequenzen gemessen werden und nicht die einzelnen Frequenzen in separaten Dimensionen wie im ND-Experiment. In solchen Fällen erkennt man im RD-Experiment zwar zwei Signale mit teilweiser Frequenzentartung – die zugrunde liegenden Frequenzen können aber nicht extrahiert werden, es sei denn, die zueinander gehörigen Dublettkomponenten können in den Basispektronen eindeutig identifiziert werden. Zur Lösung dieses Problems sind zusätzliche Experimente erforderlich – Zentralsignaldetektionen, bei denen für jede projizierte Dimension ein Signal in der Mitte des entsprechenden cosinus- oder sinusmodulierten Dubletts aufgenommen wird ( $\Omega_T$  in Abbildung 2c und d rechts). Bei mehreren projizierten Dimensionen müssen zusätzliche Signale in der Mitte der Zentralsignale erster Ordnung aufgenommen werden etc. (Abbildung 2, 3 in Lit. [2]). In einem  $(N,N-K)D$ -RD-Experiment müssen  $2^K$  Basispektren und  $2^{K-1}$  Zentralsignalpektren aufgenommen werden, also für ein  $(3,2)D$ -RD-Experiment ein Zentralsignalpektron, für ein  $(5,2)D$ -RD-Experiment vier Zentralsignalpektren erster Ordnung, zwei zweiter und eines dritter Ordnung. Durch Addition und Subtraktion aller  $2^{K+1}-1$  Zeitsignale (d.h. 15 Signale im  $(5,2)D$ -RD-Experiment) erhält man  $2^{K+1}-1$  Spektren mit Signalen bei den  $K+1$  beteiligten Frequenzen ( $\Omega_1, \Omega_2, \Omega_3, \Omega_4$ ). Die richtige Kombination der  $2^{K+1}-1$  Zeitsignale (aus  $2^K$  Basis- und  $2^{K-1}$  Zentralsignalpektren) wird durch die vollständige Transformationsmatrix beschrieben. Da die Datenverarbeitung eine Multiplikation mit der G-Matrix und anschließende Fourier-Transformation umfasst, haben Kim

und Szyperski den Namen „GFT-NMR“ für diese Implementierung von RD-Experimenten eingeführt.

Bei gleicher Gesamtzeit ist das Signal/Rausch-Verhältnis der GFT-NMR-Basispektren gegenüber einem entsprechenden ND-Experiment um bis zu  $1/\sqrt{2}$  reduziert, da  $2^{K+1}-1$  anstelle von  $2^K$  Experimenten aufgenommen werden müssen und sich die Signallintensitäten nur in den Basispektronen aufaddieren. Abhängig von  $K$  wird fast die halbe Messzeit zur Aufnahme der Zentralsignale benötigt und trägt somit nicht zur Verbesserung des S/R-Verhältnisses in den Basispektronen bei.

Die Messzeit für GFT-NMR- im Vergleich zu ND-FT-NMR-Experimenten ergibt sich gemäß Gleichung (1). Sie

minimale Messzeit FT/GFT =

$$2^K \prod_{j=0}^K (m_j) / (2^{K+1}-1) \sum_{j=0}^K (m_j) \quad (1)$$

wird insbesondere für höherdimensionale Experimente außerordentlich reduziert, z.B. auf 1/20 für  $(3,2)D$ -GFT-NMR- gegenüber 3D-NMR-Experimenten und auf 1/30000 für  $(5,2)D$ -GFT-NMR- gegenüber 5D-NMR-Experimenten – unter der Annahme, dass 60 Punkte in jeder Zeitdimension aufgenommen werden ( $m=60$ ).

Ein weiterer Vorteil des GFT-NMR-Ansatzes ergibt sich daraus, dass die Signalpositionen aus mehreren GFT-Spektronen durch Optimierung mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate extrahiert werden können. Dies führt zu einer genaueren Bestimmung der NMR-Frequenzen und erlaubt eine Fehleranalyse, da jede Frequenz zu den Signalen in allen  $2^{K+1}-1$  Spektren beiträgt. Im Gegensatz dazu kommen alle Frequenzen im ND-Experiment nur einmal vor. Zusätzlich ist die spektrale Auflösung in den indirekten Dimensionen geringer. Eine reduzierte Auflösung kann allerdings durch bessere Methoden der Datenverarbeitung, wie lineare Vorhersage und maximale Entropie, kompensiert werden.<sup>[14]</sup>

## Diskussion und Perspektiven

Die von Kim und Szyperski eingeführte generelle GFT-NMR-Methode

ist ein interessanter Ansatz zur Überwindung des Auflösungsproblems in mehrdimensionalen NMR-Experimenten – falls wirklich Auflösungslimitierung vorliegt, also die Gesamtzeit nicht durch Empfindlichkeitsanforderungen bestimmt wird. In diesen Fällen können RD-Experimente, die 3D-, 4D- oder sogar 5D-Experimenten entsprechen, mit akzeptabler Messzeit durchgeführt werden. Zusätzlich können die Resonanzfrequenzen mit höherer Präzision bestimmt werden als in konventionellen Experimenten. Die Auswertung der GFT-NMR-Daten entspricht nicht der von ND-NMR-Daten, da die chemischen Verschiebungen nur als Summen- und Differenzfrequenzen auftreten. Daher ist spezielle Software zur Datenauswertung erforderlich, die aber bereits in automatische Auswertungs-routinen eingebaut wurde.<sup>[24]</sup>

Eine interessante und einfache Alternative zur GFT-NMR-Spektroskopie ist die Aufnahme von Projektionen mit niedriger Dimensionalität aus ND-Spektronen. Die chemischen Verschiebungen ( $\Omega_1, \Omega_2, \Omega_3$ ) eines 3D-Experiments können zum Beispiel aus zwei 2D-Spektronen entnommen werden, in denen jeweils nur eine indirekte Dimension mit Signalen bei  $(\Omega_2, \Omega_3)$  und  $(\Omega_1, \Omega_3)$  aufgenommen wird (Abbildung 2b). Das S/R-Verhältnis dieser Experimente entspricht dem des zugehörigen 3D-Experiments, zusätzlich kann eine hohe spektrale Auflösung in den indirekten Dimensionen erreicht werden. Der Informationsgehalt dieser Experimente entspricht dem der GFT-NMR-Basispektren. Für ein  $(5,2)D$ -RD-Experiment müssen vier 2D-Projektionen aufgenommen werden. Überlagerungen von zwei Signalen werden dabei erkannt, sofern ihre Frequenzen in mindestens einer der fünf Dimensionen nicht entartet sind. Die chemische Verschiebung kann dann direkt aus den Spektren abgelesen werden, allerdings sind die Signale in den unterschiedlichen Projektionen nicht korreliert. In ungünstigen Fällen können daher entartete chemische Verschiebungen nicht separiert werden – anders als bei der GFT-NMR-Methode, bei der alle indirekten Dimensionen zum Signal beitragen und Entartung über die Zentralsignaldetektion aufgelöst werden kann (Abbildung 2).

In der GFT-NMR-Spektroskopie wird nach wie vor eine Fourier-Transformation zur Ableitung der Frequenzen aus den Zeitsignalen verwendet. Es gibt allerdings auch interessante neue Alternativen zur schnellen Aufnahme von NMR-Spektren im Auflösungslimit, die andere mathematische Verfahren wie Filterdiagonalisierung<sup>[25]</sup> und maximale Entropie verwenden,<sup>[14]</sup> für die nur wenige Punkte (gegebenenfalls auch nichtlinear) aufgenommen werden müssen. Eine andere hoch interessante Perspektive ergibt sich aus der Kombination von räumlicher und zeitlicher Detektion in einem einzigen Scan, die vor kurzem von Frydman et al. vorgeschlagen wurde.<sup>[26]</sup>

Ein genereller Vorbehalt gegenüber der Nutzung von NMR-Experimenten mit reduzierter Dimensionalität ist das Auftreten von Signalüberlagerungen, die sich bei höherer Dimensionalität eher vermeiden lassen. Nützliche Anwendungen von GFT-NMR-Experimenten sind daher auf relativ kleine Proteine (<10–15 kDa Molekulargewicht) beschränkt.

Es ist anzumerken, dass die Empfindlichkeit von mehrdimensionalen Experimenten noch immer ein wichtiges Kriterium für RD- und ND-Anwendungen ist. Üblicherweise erfordern diese Experimente mindestens  $N-1$  Magnetisierungstransferschritte, die eine Vielzahl von Radiofrequenzpulsen und Delays benötigen, sodass Relaxationseffekte das NMR-Signal abschwächen. Damit ist z. B. die Gesamtempfindlichkeit gegenüber einem einfachen 2D-Experi-

ment mit nur einem Transferschritt reduziert.

Es ist zu erwarten, dass die GFT-NMR-Methode und andere neue Strategien zur optimierten Signaldetektion die Messzeit für NMR-Experimente im Auflösungslimit signifikant verkürzen. In Verbindung mit besseren Verfahren zur automatischen Signalzuordnung und Strukturberechnung sollte dies die Dauer einer NMR-basierten Proteinstrukturbestimmung von einigen Monaten auf wenige Wochen reduzieren. Dies verspricht einen großen Impuls für die Anwendung der NMR-Spektroskopie in der Strukturobiologie und in Strukturgenomik-Projekten.

- 
- [1] I. D. Campbell, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 377.
  - [2] S. Kim, T. Szyperski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1385.
  - [3] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience, New York, **1986**.
  - [4] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 5891.
  - [5] S. W. Fesik, E. R. Zuiderweg, *Q. Rev. Biophys.* **1990**, *23*, 97.
  - [6] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions (International Series of Monographs on Chemistry, Vol. 14)*, Clarendon Press, Oxford, **1987**.
  - [7] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, *73*, 574.
  - [8] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 14.
  - [9] H. Oschkinat, C. Griesinger, P. J. Kraulis, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Nature* **1988**, *332*, 374.
  - [10] L. E. Kay, G. M. Clore, A. Bax, A. M. Gronenborn, *Science* **1990**, *249*, 411.
  - [11] M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659.
  - [12] M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 93.
  - [13] C. Cieslar, A. Ross, T. Zink, T. A. Holak, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, *101*, 97.
  - [14] J. C. Hoch, A. S. Stern, *NMR-Data Processing*, Wiley-Liss, New York, **1996**.
  - [15] S. M. Pascal, D. R. Muhandiram, T. Yamazaku, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1994**, *103*, 197.
  - [16] R. Boelens, M. Burgering, R. H. Fogh, R. Kaptein, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 201.
  - [17] M. Sattler, M. Maurer, J. Schleucher, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 97.
  - [18] T. Szyperski, G. Wider, J. H. Bushweller, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9307.
  - [19] B. Brutscher, J.-P. Simorre, M. S. Cafrey, D. Marion, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1994**, *105*, 77.
  - [20] K. Ding, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **2002**, *156*, 262.
  - [21] W. Kozminski, I. Zhukov, *J. Biomol. NMR* **2003**, *26*, 157.
  - [22] Y. Xia, C. H. Arrowsmith, T. Szyperski, *J. Biomol. NMR* **2002**, *24*, 41.
  - [23] B. Brutscher, N. Morelle, F. Cordier, D. Marion, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, *109*, 238.
  - [24] T. Szyperski, D. C. Yeh, D. K. Sukumar, H. N. Moseley, G. T. Montelione, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8009.
  - [25] H. Hu, A. A. De Angelis, V. A. Mandelstam, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **2000**, *144*, 357.
  - [26] L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15858.