

Asymmetrische dipolare Kopplungen aus Festkörper-NMR-Messungen geben Einblick in die Bewegung von Seitenketten in Proteinen^{**}

Paul Schanda, Matthias Huber, Jérôme Boisbouvier, Beat H. Meier* und Matthias Ernst*

Die genaue Kenntnis der Flexibilität von Proteinen ist sehr wichtig für das Verständnis von Proteinfunktion, -faltung und Wechselwirkungen mit Proteinen und Liganden. Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist eine wichtige Methode für solche Untersuchungen in Lösung,^[1] und zunehmend auch im Festkörper,^[2] da sie atomaufgelöste Einblicke in die Dynamik gibt. Die experimentelle Charakterisierung aller Bewegungsmoden eines Proteins ist eine große Herausforderung, und vereinfachte Modelle sind notwendig. In NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Dynamik werden Bewegungsamplituden im Allgemeinen durch einen einzigen Ordnungsparameter beschrieben,^[3] während Details, etwa die Asymmetrie der Bewegung, vernachlässigt werden. Im Folgenden zeigen wir eine signifikante Erweiterung dieser Beschreibung durch die Messung der asymmetrischen Bewegungen der Seitenketten eines Proteins im Festkörper.

Dipolare Kopplungen sind besonders gut geeignet, um lokale molekulare Bewegungen zu quantifizieren. In Abwesenheit von Bewegung wird die dipolare Kopplung zwischen zwei Kernspins durch einen spurfreien symmetrischen Tensor zweiter Stufe beschrieben und kann durch einen einzigen Parameter – die Anisotropie $\delta_{D,\text{starr}}$ – beschrieben werden, die nur vom Abstand und Typ der beteiligten Kerne abhängt (siehe Definition in den Hintergrundinformationen). In Gegenwart von „schneller“ Dynamik, d. h. bei Prozessen, deren Korrelationszeit kürzer ist als $1/\delta_{D,\text{starr}}$ ($\approx 10\text{--}100\text{ }\mu\text{s}$), wird der Dipoltensor teilweise gemittelt. Im Fall einer Bewegung mit dreifacher (C_3) oder höherer Symmetrie, z. B. isotroper Bewegung in einem Kegel, bleibt der Tensor symmetrisch und wird durch die effektive Anisotropie δ_D beschrieben, die kleiner als jene im statischen Grenzfall ($\delta_{D,\text{starr}}$) ist. In diesem Fall kann die Bewegungsamplitude durch den Ordnungsparameter^[4] $S = \delta_D/\delta_{D,\text{starr}}$ beschrieben werden. Im allgemeinen Fall ist diese Beschreibung jedoch nicht ausreichend, da der

effektive Kopplungstensor asymmetrisch ist^[5], und ein weiterer Parameter, die Asymmetrie, wird zur vollständigen Beschreibung benötigt (siehe Definition in den Hintergrundinformationen). Die Asymmetrie η_D variiert zwischen null (symmetrischer Tensor) und eins.^[5a]

Durch Lösungs-NMR-Spektroskopie können dipolare Kopplungen nur in anisotropen Medien als dipolare Restkopplungen (RDCs) gemessen werden. Die Analyse von Bewegungsamplituden aus solchen RDCs ist schwierig, weil RDCs auch von dem *a priori* unbekannten Grad der molekularen Ausrichtung im Medium und der Orientierung eines gegebenen Vektors relativ zum Ausrichtungstensor abhängen, und Daten von mehreren verschiedenen anisotropen Medien müssen kombiniert werden.^[6] In der Festkörper-NMR-Spektroskopie ist die Situation stark vereinfacht, da nur die lokale, aber nicht die globale Molekülbewegung vorhanden ist. Das ermöglicht die direkte Messung von dipolaren Kopplungen, die ausschließlich von der Distanz und der Dynamik abhängen. Im Fall von Kopplung zwischen direkt gebundenen Kernen (C-H, N-H oder C-N) ist der dipolare Kopplungstensor im statischen Grenzfall bekannt aus der Bindungslänge, und die Messung des dipolaren Tensors gibt daher einen direkten Einblick in die Dynamik des betrachteten Bindungsvektors. In Untersuchungen zur Dynamik wurden bisher dennoch die Kopplungstensoren durch einen einzigen Ordnungsparameter S beschrieben, was darauf zurückzuführen ist, dass die Präzision bisheriger Messmethoden ungenügend war. Hier zeigen wir zum ersten Mal die direkte Messung von asymmetrischen dipolaren Kopplungen durch Festkörper-NMR-Spektroskopie mit Rotation am magischen Winkel (MAS). Mit einer Methode, die spezifische Isotopenmarkierung mit empfindlichen Messmethoden verbindet, untersuchen wir die Dynamik der Seitenketten in mikrokristallinem Ubiquitin, und finden, dass die Asymmetrie η_D der Dipolkopplungstensoren einiger Methyl-C-H-Gruppen klar von Null verschieden ist, was Einblicke in die Details der zugrundeliegenden Bewegung liefert.

Um dipolare ^1H - ^{13}C -Kopplungen ausreichend präzise messen zu können, erweitern wir eine kürzlich vorgestellte Methode mit deutlich verbesserter Genauigkeit.^[7] Diese besteht aus 1) der selektiven Einführung von isolierten ^1H - ^{13}C -Spinpaaren in ein deuteriertes Protein durch Verwendung von spezifisch protonierten Biosynthesevorstufen, und 2) einer REDOR-basierten Wiedereinführung der Kopplung unter MAS (im Folgenden „Recoupling“ genannt). REDOR hat eine inhärente Normalisierung,^[8] sodass Recoupling-Daten unabhängig von der Peakintensität oder Kohärenzverlusten sind und nur von den Parametern δ_D (oder S) und η_D abhängen.^[7]

[*] Dr. P. Schanda, M. Huber, Prof. Dr. B. H. Meier, Prof. Dr. M. Ernst
Physikalische Chemie, ETH Zürich
Wolfgang-Pauly-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: beme@ethz.ch
maer@ethz.ch
Homepage: <http://www.ssnmr.ethz.ch>

Dr. P. Schanda, Dr. J. Boisbouvier
Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CEA/CNRS/UJF
41, rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex (Frankreich)

[**] Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds (SNSF) und von der ETH Zürich. Wir danken Isabel Ayala und Carlos Amero für Unterstützung bei der Probenvorbereitung und dem Institut de Biologie Structurale in Grenoble für Zugang zur PSB/IBS-Isotopenmarkierungsplattform.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201103944> zu finden.

Wir haben zwei perdeuterierte Ubiquitinproben mit ^1H - ^{13}C -Paaren an entweder Ile oder Val ($\gamma 1$ oder $\gamma 2$) und Leu ($\delta 1$ oder $\delta 2$) hergestellt, und untersuchen die Seitenkettendynamik anhand der C-H-Kopplung der Methylgruppe. Die Isotopenmarkierung basiert auf etablierten Protokollen^[9] (siehe die Hintergrundinformationen). Die geringe Dichte von ^1H in solchen Proben eliminiert weitgehend die ^1H - ^1H -Kopplungen sowie Kopplungen des ^{13}C zu entfernten ^1H -Kernen, was eine potenzielle Quelle systematischer Fehler in Kopplungsmessungen weitgehend ausschließt. Weiterhin gelingt durch die geringe Protonendichte die Aufnahme hochaufgelöster Korrelationsspektren mit empfindlicher ^1H -Detektion.^[10] In Kombination mit schnellem MAS sind Kohärenzen in solchen Proben langlebig,^[11] was die Empfindlichkeit und damit die Präzision zusätzlich erhöht. Die verbesserte Präzision, Unterdrückung von Artefakten und die Normalisierung der REDOR-Kurven sind essenziell für die Messung der Tensorasymmetrie, die sich in etwas veränderten REDOR-Kurven widerspiegelt (Abbildung 1).

Abbildung 2 a zeigt experimentelle REDOR-Kurven für einige repräsentative Methylgruppen in Ubiquitin, gemessen mit der Pulssequenz von Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen. Der volle Satz von experimentellen Daten und zweidimensionale Spektren sind in Abbildung S2 und S3 gezeigt. Das Ergebnis einer Zwei-Parameter-Anpassung (Anisotropie δ_D und Asymmetrie η_D , rote Kurven in Abbildung 2 a) sind in Abbildung 3 dargestellt und in Tabelle S1 aufgelistet. Oberflächen des reduzierten Chi-Quadrats (χ^2_{red}) sind in Abbildung 2 b dargestellt.

Die große Variabilität der durch Anpassung erhaltenen Anisotropien δ_D über einen Bereich von 4.9 bis 11.8 kHz,

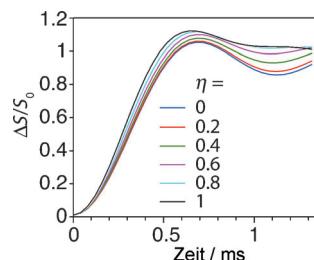


Abbildung 1. Simulierte REDOR-Recoupling-Kurven für $\delta_D = 7$ kHz und unterschiedliche Werte von η . Simulationsmethoden sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

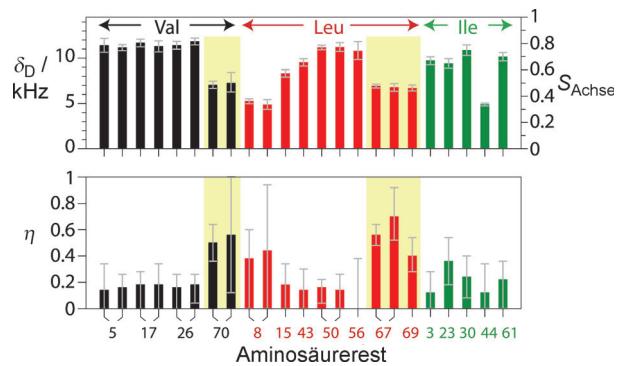


Abbildung 2. a) REDOR-Recoupling-Kurven für Methyl- ^1H - ^{13}C -Gruppen in kristallinem Ubiquitin. Jeder Datenpunkt wurde aus 2D-Recoupling- und Referenzspektren (95 Minuten Aufnahmezeit pro Spektrum) erhalten. Fehlerbalken wurden bestimmt basierend auf dem doppelten spekularen Rauschen. Die angepassten Kurven basieren auf folgenden Annahmen: symmetrischer Tensor (schwarz), asymmetrischer Tensor (rot), Überlagerung zweier asymmetrischer Tensoren (grün, nur Ile 13/36). b) Darstellung der reduzierten Chi-Quadrat (χ^2_{red}) für die Zwei-Parameter-Anpassung (rot in (a)) der REDOR-Kurven. Die Konturen entsprechen χ^2_{red} Werten von $\chi^2_{\text{red}} + 1$, $+ 2$ und $+ 3$. Die innerste Kurve entspricht daher dem Vertrauensintervall. Der gesamte Datensatz ist in den Hintergrundinformationen zu finden. S_{Achse} ist definiert als $\delta_D / \delta_{D,\text{starrAchse}} = \delta_D / 14.53$ kHz.

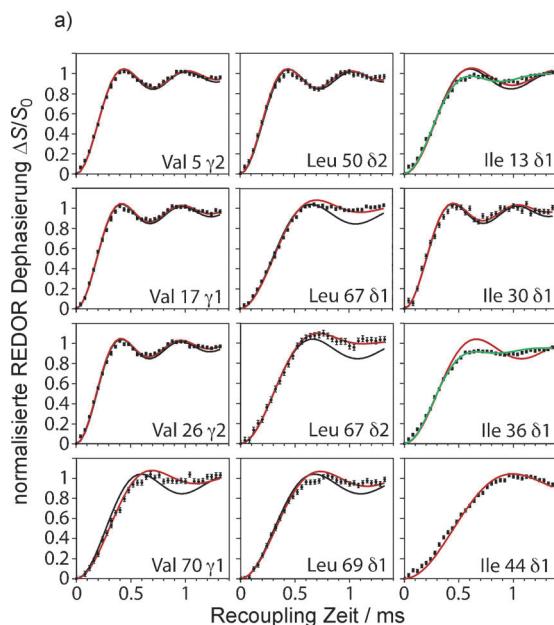
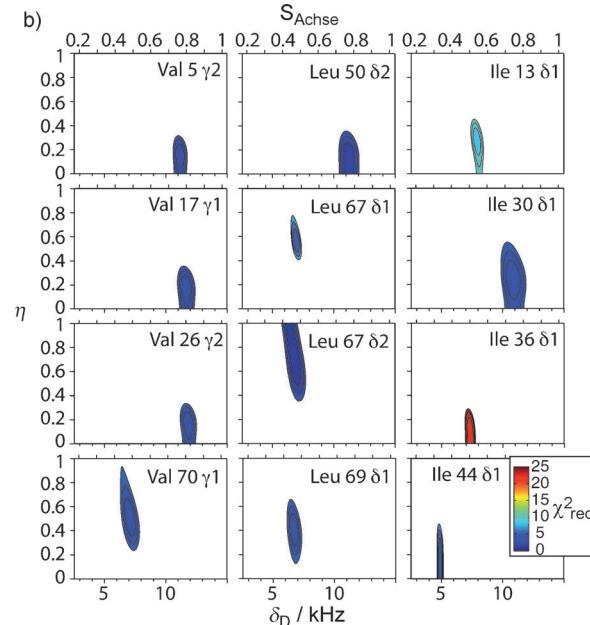


Abbildung 2. a) REDOR-Recoupling-Kurven für Methyl- ^1H - ^{13}C -Gruppen in kristallinem Ubiquitin. Jeder Datenpunkt wurde aus 2D-Recoupling- und Referenzspektren (95 Minuten Aufnahmezeit pro Spektrum) erhalten. Fehlerbalken wurden bestimmt basierend auf dem doppelten spekularen Rauschen. Die angepassten Kurven basieren auf folgenden Annahmen: symmetrischer Tensor (schwarz), asymmetrischer Tensor (rot), Überlagerung zweier asymmetrischer Tensoren (grün, nur Ile 13/36). b) Darstellung der reduzierten Chi-Quadrat (χ^2_{red}) für die Zwei-Parameter-Anpassung (rot in (a)) der REDOR-Kurven. Die Konturen entsprechen χ^2_{red} Werten von $\chi^2_{\text{red}} + 1$, $+ 2$ und $+ 3$. Die innerste Kurve entspricht daher dem Vertrauensintervall. Der gesamte Datensatz ist in den Hintergrundinformationen zu finden. S_{Achse} ist definiert als $\delta_D / \delta_{D,\text{starrAchse}} = \delta_D / 14.53$ kHz.



zeigt, dass die Variationen in Bewegungsamplituden sich für verschiedene Aminosäurereste stark unterscheidet. Auch eine starke Variabilität der Asymmetrien η_D (0 bis 0.58) ist sichtbar. Basierend auf den Anpassungen unterteilen wir die Methylgruppen in drei Klassen: 1) Methylgruppen mit niedrigem χ^2_{red} und einer Asymmetrie, die sich nicht signifikant von Null unterscheidet, 2) Methylgruppen mit niedrigem χ^2_{red} , aber signifikant von Null verschiedenem η_D und 3) Methylgruppen, die mit dem Modell eines asymmetrischen Tensors nicht angepasst werden können (mit entsprechend hohem χ^2_{red}). Die Mehrheit der Methylgruppen (22 von 29) fällt in Klasse 1, etwa Val5, Val17, Val26, Leu50 (Abbildung 2), mit einem nahezu symmetrischen Dipol-Tensor, beschrieben durch eine Asymmetrie kleiner als 0.2. Diese Methylgruppen können durch das konventionelle Modell eines symmetrischen Tensors beschrieben werden. Eine signifikante Asymmetrie mit Werten von $\eta \geq 0.4$ (Klasse 2) wird beobachtet für Methylgruppen von Val70, Leu67 und Leu69 (5 von 29). Für zwei Methylgruppen kann das Modell eines asymmetrischen Tensors die Daten nicht zufriedenstellend beschreiben (Klasse 3, δ_1 von Ile13 und Ile36), was auf langsame Bewegung hinweist. Unsere Daten zeigen also eindeutig, dass die übliche Modell des symmetrischen Tensors für einige Methylgruppen nicht zulässig ist, und die asymmetrischen Tensoren geben Einblick in zugrundeliegende Bewegungen.

Die beobachteten Parameter δ_D und η_D der dipolaren Kopplung einer Methyl-C-H-Gruppe sind das Ergebnis mehrerer Mittelungsprozesse. Bei Raumtemperatur weisen Methylgruppen stets eine schnelle Rotation um die lokale dreifache Symmetriechse auf, mit Korrelationszeiten im Bereich von Pikosekunden. Diese Bewegung führt zu einem gemittelten achsensymmetrischen Tensor mit der Anisotropie $\delta_{D,\text{starr Achse}} = \delta_{D,\text{starr}}/3 \approx 14.53$ kHz (basierend auf dem kanonischen Tetraederwinkel $\theta_{HCC} = 109.47^\circ$ und einer C-H-Bindungslänge von 1.115 Å). Dieser Tensor wird weiter gemittelt durch Librationsbewegungen der Methylachse sowie durch Sprünge zwischen diskreten Rotamerzuständen, wobei die letztere Bewegung die größere Amplitude aufweist. Schnelle Rotamerübergänge (< 10–100 μs) mitteln die Tensoren, die den verschiedenen Orientierungen entsprechen, und der beobachtete Tensor ist der populationsgewichtete Mittelwert, und daher im Allgemeinen asymmetrisch, ausgedrückt durch seine Asymmetrie η und Anisotropie δ_D , oder auch Achsen-Ordnungsparameter $S_{\text{Achse}} = \delta_D/\delta_{D,\text{starr Achse}}$.

Rotamersprünge sollten daher einen messbaren Einfluss auf die Anisotropien und Asymmetrien haben, und die Information über Rotamersprünge und -gleichgewichte sollte in den Parametern der Dipoltensoren enthalten sein. Weiterhin sollten Rotamersprünge dazu führen, dass die Methylgruppen γ_1/γ_2 einer gegebenen Val- und die Methylgruppen δ_1/δ_2 einer gegebenen Leu-Seitenkette identische Tensoren haben, sofern Librationsbewegungen entweder vernachlässigbar oder gleich stark für beide Methylgruppen sind. Tatsächlich finden wir, dass die Tensorparameter verschiedener Methylgruppen derselben Seitenkette immer identisch sind (innerhalb der Fehlergrenzen).

Die signifikante Asymmetrie ($\eta \geq 0.4$), die für einige Val- und Leu-Reste beobachtet wird, kann man verstehen, wenn

man die möglichen Rotamersprünge der verschiedenen Aminosäuretypen betrachtet.

Die einfachste Situation liegt in Valinen vor, da nur ein Diederwinkel (χ_1) relevant ist. Drehungen um diesen Winkel um 120° führen *trans*-, *gauche(+)*- und *gauche(–)*-Rotamerzustände ineinander über^[12] (siehe Abbildung 4a). Unter der Annahme, dass die Methylachse ausschließlich Übergänge zwischen diesen Zuständen ausführt, d.h. unter Vernachlässigung weiterer Bewegungen, können die Tensorparameter in

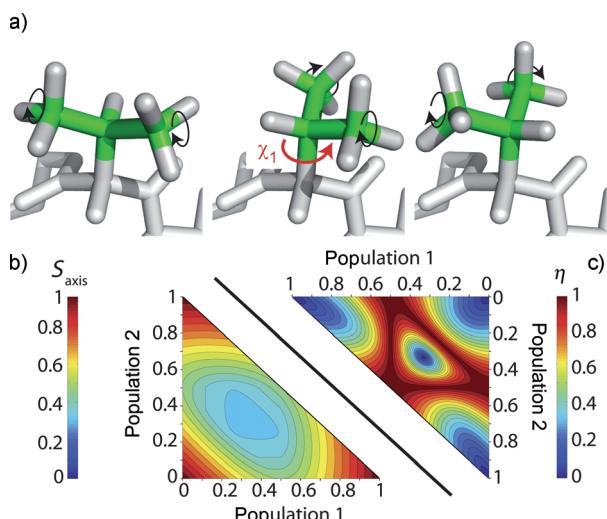


Abbildung 4: a) Rotamerübergänge in Valin Seitenketten. Schnelle Methylrotation (schwarze Pfeile) und Sprünge um χ_1 werden berücksichtigt. b) Berechnete Anisotropie der Methyl- ^1H - ^{13}C -Tensoren $\delta_D/\delta_{D,\text{starr Achse}}$ und c) Asymmetrie η für das Drei-Positionen-Sprungmodell der Methylachse um χ_1 , als Funktion der Populationen der drei Rotamerzustände p_1 , p_2 und $p_3 = 1 - p_1 - p_2$. Siehe Abbildung S4–S6 für Details.

Abhängigkeit der Populationen der Zustände einfach errechnet werden (siehe Abbildung 4b,c). Die Asymmetrie in diesem Modell ist Null, falls nur ein Zustand besetzt ist (d.h. im statischen Fall), oder wenn alle drei jeweils zu einem Drittel besetzt sind. Diese beiden Fälle können einfach unterschieden werden, da die Anisotropie im letzteren Fall nur ein Drittel beträgt (siehe auch die Abbildungen S5–S8 für anschauliche Beispiele und Simulationen).

Vier Valin-Reste sind in Ubiquitin zu finden, und nur einer (Val70) zeigt signifikante Asymmetrie, während die Asymmetrie für Val5, Val17 und Val26 nicht signifikant von Null verschieden ist (Abbildung 3 und Tabelle S1). Weiterhin ist der Ordnungsparameter etwa 0.5 für Val70, aber deutlich höher (0.8) für die anderen. Die kleine Asymmetrie und der hohe Ordnungsparameter für Val5, Val17 und Val26 können nur dadurch erklärt werden, dass diese Seitenketten hauptsächlich einen Rotamerzustand populieren. Rechnungen zeigen, dass ein Rotamer zumindest zu 80–90 % populiert ist (Tabelle 1). Dieser Populationsgrad ist als untere Grenze zu betrachten: Würde man annehmen, dass es zusätzlich Librationsbewegungen mit kleiner Amplitude gibt, die zur Senkung des Ordnungsparameters auf 0.8 beitragen, dann würde man noch einen höheren Wert für die Population des Haupt-Rotamerzustands erwarten. Im Fall von Val70 ist die Ten-

Tabelle 1: Rotamersprünge für Val/Leu-Seitenketten in Ubiquitin, aus Messungen der dipolaren Kopplungstensoren.

Seitenkette	Populationsbereich, bestimmt aus Dipolkopplungsmessungen [%] ^[b]			Populationen aus Lösungs-NMR-Messungen [%] ^[c]		
	P ₁	P ₂	P ₃	P ₁	P ₂	P ₃
Valine ^[a]						
5 (γ 2)	81–88	6–19	0–9	92 \pm 3 (g–)	6 \pm 2 (t)	2 \pm 2 (g+)
17 (γ 1)	83–87	6–17	0–8	96 \pm 3 (t)	4 \pm 3 (g–)	0 \pm 2 (g+)
26 (γ 2)	82–86	7–16	0–8	100 \pm 1 (g–)	0 \pm 1 (g+)	0 \pm 3 (t)
70 (γ 1)	58–63	20–29	9–18	59 \pm 10 (t)	36 \pm 11 (g–)	5 \pm 5 (g+)
Leucine	P ₁ ^[b,d]	P ₂ ^[b,d]		S_{Achse} , erwartet aus P ₁ /P ₂ ^[b]		S_{Achse} , experimentell beobachtet ^[b]
67 (δ 1)	68–74	26–32		0.6–0.67		0.46–0.49
67 (δ 2)	57–73	27–43		0.51–0.66		0.44–0.47
69 (δ 1)	80–83	17–20		0.74–0.77		0.44–0.49

[a] Daten für die beiden äquivalenten Methylgruppen derselben Seitenkette stimmen überein, und nur ein Wert wird gezeigt. [b] Der erlaubte Bereich der Populationen wurde aus dem Vertrauensintervall von η und S_{Achse} errechnet. [c] Daten aus Lit. [14]. t, g+ und g– bedeuten *trans*, *gauche+* bzw. *gauche–* Rotamere. [d] Populationen bestimmt nur von η -Werten, im Rahmen des Modells aus Abbildung 5.

sorasymmetrie deutlich von Null verschieden, und die berechneten Populationen der Rotamerzustände sind etwa 60, 25 und 15 % (siehe Tabelle 1), d. h. alle drei Rotamerzustände sind populiert.

Wir haben somit eine Valin-Seitenkette (Val70) identifiziert mit signifikanter Tensorasymmetrie, und haben diese erklärt durch Übergänge zwischen ungleich populierten Rotamerzuständen, sowie die relativen Populationen bestimmt. Es ist interessant, diese Resultate mit früheren Daten zu vergleichen. Skalare Kopplungen ($^3J_{CC\gamma}$ und $^3J_{NC\gamma}$) und dipolare Restkopplungen (RDCs) in flüssigkristallinen Medien geben auch Einblick in Populationen und Identität von Rotamerzuständen.^[13] Während die geringe Größe der skalaren Kopplungen (unter 3–4 Hz) derzeit die Messung im Festkörper sehr schwierig macht, wurden RDCs und skalare 3J -Kopplungen in Lösung verwendet, um Rotamersprünge zu untersuchen.^[14] Interessanterweise, und im Einklang mit unseren Daten, wurde damit gefunden, dass Val6, Val17 und Val26 hauptsächlich einen Rotamerzustand populieren, während Val70 alle drei Rotamerzustände populiert, wobei die relativen Populationen ähnlich sind zu den hier gefundenen (siehe Tabelle 1).

In Leu-Seitenketten müssen Sprünge um zwei Diederwinkel (χ_1 , χ_2) berücksichtigt werden (Abbildung 5). Eine volle Beschreibung der komplexen Bewegung in einem sol-

chen System, basierend allein auf ^1H - ^{13}C -Kopplungstensoren der endständigen Methylgruppe ist schwierig und im allgemeinen nicht eindeutig. Dies würde die Messung mehrerer Kopplungstensoren entlang der Seitenkette erfordern. In Leu-Seitenketten sind jedoch Sprünge um χ_1 und χ_2 hochgradig korreliert, und Leu-Seitenketten populieren im Wesentlichen zwei Zustände.^[12,15] Wir haben daher versucht, die Dipolkopplungsparameter der beiden Leucine mit signifikanter Asymmetrie (Leu67, Leu69) durch solch ein einfaches Modell zu erklären (Abbildung 4). Aus den in Abbildung 4b gezeigten Zusammenhängen ergeben sich aus den Asymmetrien von Leu67 und

Leu69 relative Populationen der beiden Zustände in der Größenordnung von 70 und 30 % (Tabelle 1). Die berechneten Anisotropien, die man aus solchen Populationsverhältnissen errechnet, sind jedoch höher als die tatsächlich gemessenen. Wir vermuten, dass das hier verwendete Modell mit nur Übergängen zwischen zwei starren Zuständen zu vereinfachend ist, und dass zusätzliche Librationsbewegungen zur Verminderung der Anisotropie beitragen. Für diese Aminosäurereste sind keine Vergleichsdaten aus NMRspektroskopischen Studien in Lösung vorhanden.

Wie in Leu sind auch in Ile zwei Torsionswinkel (χ_1 , χ_2) notwendig zur Beschreibung der Bewegung, die die Methylgruppe δ 1 erfährt. Im Allgemeinen sind jedoch mehrere Kombinationen von χ_1 und χ_2 populiert,^[12,15,16] sodass mehr experimentelle Parameter erforderlich sind. Wir haben daher nicht versucht, Rotamergleichgewichte der Seitenkette anhand der Daten der Methylgruppe zu ermitteln. Die REDOR Kurven von zwei Seitenketten (δ 1-Methylgruppe von Ile13 und Ile36, Abbildung 2) konnten nicht zufriedenstellend durch einen einzigen Kopplungstensor beschrieben werden. Der minimale Wert von χ^2_{red} für diese beiden Methylgruppen ist 8 bzw. 22. Diese REDOR-Kurven können nur beschrieben werden, wenn man Bewegungen annimmt, die langsam auf der Zeitskala der dipolaren Kopplung sind. In diesem Fall muss die REDOR-Kurve durch eine gewichtete Überlagerung von mehreren REDOR-Kurven beschrieben werden, jede mit anderen Tensorparametern. Wir betrachten das einfachste mögliche Modell mit zwei austauschenden Zuständen, von denen jeder durch einen asymmetrischen Tensor beschrieben wird. Eine Anpassung mit diesem Modell beschreibt die Daten gut, mit χ^2_{red} -Werten von 2.6 und 3.1 für Ile13 bzw. Ile36 (grüne Linien in Abbildung 2a, siehe Tabelle S1 für Werte aus der Anpassung). Diese Verbesserung ist statistisch signifikant (F-Test).

Hier haben wir nur die Methylgruppen verwendet, um die Seitenkettenbewegung zu untersuchen. Sehr komplexe Bewegungen der Seitenkette können nicht beschrieben werden, wenn nur Daten der endständigen Methylgruppen verfügbar sind. Unsere Methode kann jedoch auf andere Kopplungen

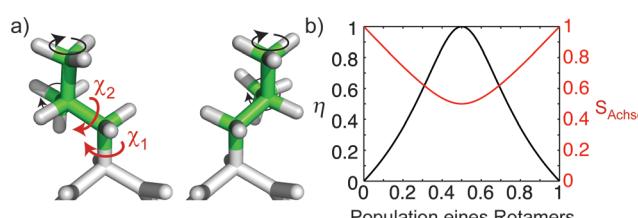


Abbildung 5: (a) Übergänge zwischen zwei Rotamerzuständen in Leu-Seitenketten, die aus gleichzeitiger Änderung von χ_1 und χ_2 resultieren. (b) Resultierende Tensorparameter für Methylgruppen als Funktion der Population der beiden Zustände. Mathematische Ausdrücke sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

ausgeweitet werden. Die Verfügbarkeit von mehr Daten über Kopplungstensoren entlang der Seitenkette oder des Rückgrats wird die Charakterisierung der Dynamik mit höherer Präzision und besserer Eindeutigkeit ermöglichen. Durch die Messung von Dipoltensoren an vielen Positionen, in Kombination mit selektiver oder spärlicher Reprotonierung,^[17] wird es auch gelingen, Librationsbewegungen kleiner Amplitude von Rotamersprünge zu trennen und ein genaueres Bild der Bewegung zu erhalten. Solche Daten, die die Dynamik über einen weiten Bereich von Zeitskalen beschreiben, können in einem einzigen NMR-Experiment erhalten werden, während bei Lösungs-NMR-Methoden^[18] im Allgemeinen mehrere Experimente und Bewegungsmodelle erforderlich sind.

Zusammenfassend konnten wir hier zum ersten Mal zeigen, dass mithilfe von MAS-Festkörper-NMR-Spektroskopie die genaue Bestimmung der Dipoltensoren, d.h. sowohl ihrer Anisotropie als auch ihrer Asymmetrie, gelingt. Die bisher nie verwendete Information über Asymmetrien gibt neue Einblicke in Details der Bewegung, was wir hier anhand der Rotamerübergänge zeigen konnten. Solche Bewegungen mit großer Amplitude können auch entscheidend sein für die Funktion von Membranproteinen^[2d] und anderen Proteinen im Festkörper.

Eingegangen am 9. Juni 2011

Online veröffentlicht am 14. September 2011

Stichwörter: Asymmetrische dipolare Kopplungen · Festkörper-NMR-Spektroskopie · Isotopenmarkierung · Methylgruppen · Proteindynamik

-
- [1] a) T. I. Igumenova, K. K. Frederick, A. J. Wand, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1672; b) L. E. Kay, *J. Magn. Reson.* **2005**, *173*, 193; c) A. Palmer, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3623.
 - [2] a) V. Chevelkov, U. Fink, B. Reif, *J. Biomol. NMR* **2009**, *45*, 197; b) J. Lewandowski, L. Emsley, *Encycl. Magn. Reson.* **2010**, *1*; c) W. Franks, D. Zhou, B. Wylie, B. Money, D. Graesser, H.

Frericks, G. Sahota, C. Rienstra, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12291; d) F. Hu, W. Luo, M. Hong, *Science* **2010**, *330*, 505; e) J. Helmus, K. Surewicz, W. Surewicz, C. Jaroniec, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2393; f) P. Schanda, B. H. Meier, M. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15957.

- [3] G. Lipari, A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4546.
- [4] A. Saupe, *Z. Naturforsch. A* **1964**, *19*, 161.
- [5] a) B. H. Meier, F. Graf, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1982**, *76*, 767; b) J. Tritt-Goc, *J. Phys. Chem. Solids* **1995**, *56*, 935; c) J. Tritt-Goc, N. Pislekski, U. Häberlen, *Chem. Phys.* **1986**, *102*, 133.
- [6] a) L. Yao, B. Vogeli, D. Torchia, A. Bax, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6045; b) N. Lakomek, K. Walter, C. Fares, O. Lange, B. de Groot, H. Grubmüller, R. Bruschweiler, A. Munk, S. Becker, J. Meiler, C. Griesinger, *J. Biomol. NMR* **2008**, *41*, 139; c) J. Tolman, K. Ruan, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1720; d) L. Salmon, G. Bouvignies, P. Markwick, N. Lakomek, S. Showalter, D. Li, K. Walter, C. Griesinger, R. Bruschweiler, M. Blackledge, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4218; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4154.
- [7] P. Schanda, B. H. Meier, M. Ernst, *J. Magn. Reson.* **2011**, *210*, 246.
- [8] T. Gullion, J. Schaefer, *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 196.
- [9] N. Goto, K. Gardner, G. Mueller, R. Willis, L. Kay, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 369.
- [10] a) V. Agarwal, Y. Xue, B. Reif, N. R. Skrynnikov, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16611; b) M. Huber, S. Hiller, P. Schanda, M. Ernst, A. Böckmann, R. Verel, B. H. Meier, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 915.
- [11] P. Schanda, M. Huber, R. Verel, M. Ernst, B. H. Meier, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 9486; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9322.
- [12] S. Lovell, J. Word, J. Richardson, D. Richardson, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2000**, *40*, 389.
- [13] a) J. Chou, D. Case, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8959; b) A. Mittermaier, L. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6892.
- [14] Lit. [13a].
- [15] R. E. London, B. D. Wingad, G. A. Mueller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11097.
- [16] D. F. Hansen, P. Neudecker, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7589.
- [17] S. Asami, P. Schmieder, B. Reif, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15133.
- [18] S. Lienin, T. Bremi, B. Brutscher, R. Bruschweiler, R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9870.