

Neue Ansätze zur Empfindlichkeitssteigerung in der biomolekularen NMR-Spektroskopie

Jan-Henrik Ardenkjær-Larsen, Gregory S. Boebinger, Arnaud Comment, Simon Duckett, Arthur S. Edison, Frank Engelke, Christian Griesinger, Robert G. Griffin, Christian Hilty, Hidaeki Maeda, Giacomo Parigi, Thomas Prisner, Enrico Ravera, Jan van Bentum, Shimon Vega, Andrew Webb, Claudio Luchinat,* Harald Schwalbe* und Lucio Frydman*

Stichwörter:

NMR-Spektroskopie · NMR-Probenköpfe ·

Kernhyperpolarisation ·

Empfindlichkeitsverbesserung ·

Ultrahohe Magnetfelder

**NMR-Empfindlichkeit
Magnete, Tricks, Spins**



Im Frühling 2013 versammelten sich NMR-Spektroskopiker am Weizmann-Institut in Israel, um neue Ansätze zur Verbesserung der Empfindlichkeit von NMR-Experimenten zu diskutieren, besonders im Hinblick auf Experimente an biomolekularen Systemen. Der vorliegende Aufsatz ist von vielen Autoren mit unterschiedlichem fachlichem Hintergrund verfasst worden; er beschreibt den Stand der Forschung auf diesem Gebiet, wie er im Rahmen des Treffens diskutiert wurde. Es werden Ansätze für Ultra-Hochfeld-NMR-Spektroskopie, für neuartige Techniken der NMR-Detektion, für Prinzipien und Methoden der Kernhyperpolarisation, aber auch für neue Probenpräparationsmethoden diskutiert. Diese Ansätze verbessern die Empfindlichkeit von NMR-Experimenten im Festkörper und in Lösung, sind voneinander unabhängig und können sich in ihren Auswirkungen multiplizieren. Auch wenn in allen genannten Bereichen bereits substanzliche Verbesserungen erzielt wurden, ist doch noch eine weite Strecke zu überwinden, um an die Empfindlichkeiten von optischen und elektronischen Spektroskopien heranzureichen. Diese Probleme und erste Lösungsansätze werden ebenfalls diskutiert.

Aus dem Inhalt

1. Notwendigkeit der Empfindlichkeitssteigerung	9293
2. Optimierung von Proben und Pulssequenzen	9295
3. Optimierung von NMR-Probenköpfen und -Spulen	9297
4. Verbesserung der Empfindlichkeit durch höhere magnetische Felder	9300
5. Steigerung der Empfindlichkeit durch Strategien zum Transfer der Spinausrichtung: DNP, PHIP, optische Pumpexperimente	9302
6. Biomolekulare NMR-Spektroskopie: Perspektiven für Empfindlichkeitssteigerungen	9311

1. Notwendigkeit der Empfindlichkeitssteigerung

Die NMR-Spektroskopie verfügt über einen privilegierten Blickwinkel auf die Materie. Sie und die verwandten In-vivo-Techniken der magnetischen Resonanzspektroskopie (MRS) und Kernspintomographie (MRI) sind in einzigartiger Weise in der Lage, eine Vielzahl von Kernspins und deren chemische Umgebung mit atomarer Auflösung zu betrachten, und dies in fast allen Zuständen der Materie und unter allen Probenbedingungen. Diese Eigenschaften und andere Qua-

litäten haben die NMR-Spektroskopie zu einer unabdingbaren Methode für anspruchsvolle Untersuchungen in der Physik, dem Ingenieurwesen, der Chemie, der Biochemie, der Biologie und der Medizin reifen lassen. So reichen die NMR-spektroskopisch untersuchten Systeme vom Festkörper in kondensierter Phase bis hin zu Biomaterialien, von niedermolekularen Verbindungen (so genannten „kleinen Molekü-

[*] Prof. Dr. J.-H. Ardenkjær-Larsen

GE Healthcare, Broendby, Denmark; Department of Electrical Engineering, Technical University of Denmark, Danish Research Centre for Magnetic Resonance
Copenhagen University Hospital Hvidovre (Dänemark)

Prof. Dr. G. S. Boebinger
U.S. National High Magnetic Field Lab
Florida State University (USA)

Prof. Dr. A. Comment
Institute of Physics of Biological Systems
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (Schweiz)

Prof. Dr. S. Duckett
Department of Chemistry
University of York (Vereinigtes Königreich)

Prof. Dr. A. S. Edison
Department of Biochemistry & Molecular Biology
University of Florida, Gainesville (USA)

Dr. F. Engelke
Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten (Deutschland)

Prof. Dr. C. Griesinger
MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen (Deutschland)

Prof. Dr. R. G. Griffin
Department of Chemistry and Francis Bitter Magnet Lab
MIT, Cambridge (USA)

Prof. Dr. C. Hilty

Department of Chemistry, Texas A&M University
College Station (USA)

Prof. Dr. H. Maeda
Riken Center for Life Science Technologies
Yokohama, Kanagawa (Japan)

Prof. Dr. G. Parigi, Dr. E. Ravera, Prof. Dr. C. Luchinat
CERM and Department of Chemistry
University of Florence, Sesto Fiorentino (Italien)
E-Mail: claudioluchinat@erm.unifi.it

Prof. Dr. T. Prisner, Prof. Dr. H. Schwalbe
Zentrum für biomolekulare magnetische Resonanzspektroskopie (BMRZ)
Goethe-Universität Frankfurt
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)

E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de

Prof. Dr. J. van Bentum
Radboud University, Nijmegen (Niederlande)

Prof. Dr. S. Vega, Prof. Dr. L. Frydman
Chemical Physics Department
Weizmann Institute of Science, Rehovot (Israel)

E-Mail: lucio.frydman@weizmann.ac.il

Prof. Dr. A. Webb
Department of Radiology, C. J. Gorter Center for High Field MRI,

Leiden University Medical Center (Niederlande)

len“) bis zu Polymeren mit einem Molekulargewicht von Megadaltons im Festkörper, von biologisch relevanten Molekülen inklusive Metaboliten, Nukleinsäuren und Proteinen im Probenrörchen bis zu komplexen Aggregaten in lebenden Zellen, von Zellen und Geweben bis zur in-vivo-spektroskopischen Bildgebung sowohl des ganzen Körpers als auch genau lokalisierter Bereiche im Körper. Dieser einzigartigen Aussagekraft und Anwendungsbreite der NMR-Spektroskopie steht allerdings die niedrige Empfindlichkeit von NMR-Experimenten entgegen. Sie ist eine intrinsische Eigenschaft der magnetischen Resonanz, die von den kleinen Wechselwirkungsenergien zwischen externem Magnetfeld und atomaren Spins herrührt. Während dies für klinische Anwendungen vorteilhaft ist – denn NMR-spektroskopische Studien lassen die untersuchten Objekte unverändert –, schränkt die niedrige Empfindlichkeit die Anwendungen der NMR-Spektroskopie ein. Gäbe es diese Einschränkung nicht, wäre das Anwendungspotenzial der NMR-Spektroskopie fast ohne Grenzen: Kerne wie ^{13}C , ^{15}N und ^{17}O könnten in natürlicher Isotopenhäufigkeit sowohl in komplexen als auch in verdünnten Proben beobachtet werden, Reaktionsintermediate auf katalytischen Oberflächen könnten charakterisiert werden, Biomoleküle könnten strukturell in einzelnen Zellen und in Zellkompartimenten untersucht werden, komplexe Reaktionen und biologische Prozesse könnten in Echtzeit verfolgt werden, der metabolische Status eines Menschen könnte nichtinvasiv jederzeit aufgenommen werden. Wahrlich phantastische Möglichkeiten würden sich ergeben, besonders in biophysikalischen und biomedizinischen Anwendungsbereichen, könnte nur das Signal/Rausch(S/R)-Verhältnis der NMR-Spektren erhöht werden. Nutzer wenden dementsprechend viel Mühe auf, um die Grenzen der NMR-Spektroskopie auszudehnen. Strategien zur Steigerung der Empfindlichkeit kann man in eine Reihe verschiedener, voneinander unabhängiger technischer Ansätze wie folgt unterscheiden:

- Verbesserung durch Optimieren von NMR-Experimenten ohne Änderungen am Gerät (an der „Gerätehardware“). Wenn man z. B. den Füllfaktor der Probe durch höhere Konzentration erhöht, dann wird das S/R-Verhältnis besser. Genauso hilft es, die Relaxationseigenschaften einer Probe zu „optimieren“, z. B. indem man länger lebende Kohärenzen anregt oder indem man einen schnellen Wiederaufbau longitudinaler Magnetisierung indu-

ziert. Auf diese Weise kann man das S/R-Verhältnis pro Einheit Messzeit erhöhen. Weitere Verbesserungen lassen sich durch bessere Pulssequenzen und Wahl des beobachteten Kernspins erreichen.

- Verbesserung der Kopplung der Spins in der Probe an den Radiofrequenzschwingkreis, z. B. indem man das Spulen-design optimiert oder Hintergrundrauschen vermindert. Dies führt zu höherem S/R-Verhältnis.
- Erhöhung des statischen Magnetfelds B_0 , das sowohl die Boltzmann-Verteilung der Populationsverteilung der Kernspinniveaus als auch die Larmor-Frequenz bestimmt. Dies kann das NMR-Signal gemäß B_0^α mit $\alpha > 1$ verstärken.
- Verstärkung der Populationsunterschiede mithilfe physikalischer Methoden, die zu einer Polarisation der Kernspins jenseits der Boltzmann-Verteilung führen. Solche Methoden umfassen den Transfer von Spinordnung ungepaarter Elektronen, die wegen ihres höheren magnetogyrischen Verhältnisses eine viel größere Polarisation als Kerne aufweisen, auf benachbarte Kerne oder auch den Transfer von Spinordnung aus speziellen Kernzuständen wie im *para*-Wasserstoff mithilfe chemischer Prozesse. Beide Methoden gehören zu den modernen S/R-Verstärkungsstrategien. Besonders die Methode der dynamischen Kernpolarisation (dynamic nuclear polarization, DNP), bei der Elektronenspinpolarisation auf Kernspins durch Mikrowelleneinstrahlung in der Nähe zur Elektronen-Larmor-Frequenz transferiert wird, findet immer häufiger Anwendung für die Signalverstärkung von NMR-Spektren in Lösung und im Festkörper.

Diese Themen wurden vor kurzem intensiv bei einem Treffen diskutiert,^[1] bei dem sich die Autoren dieses Aufsatzes zum Ideenaustausch zusammenfanden. Die folgenden Abschnitte beschreiben getrennt jede der genannten Strategien, allerdings mit dem Ziel, einen einheitlichen Ausblick zu liefern, wie die verschiedenen Strategien und ihre synergistischen Kombinationen neue Forschungsmöglichkeiten im Bereich der biomolekularen NMR-Spektroskopie eröffnen können.



Claudio Luchinat, 1952 in Florenz (Italien) geboren, promovierte 1976 in Chemie an der Universität Florenz. Im Anschluss war er Postdoktorand und Fakultätsmitglied an der Universität Florenz und nachfolgend Professor für Chemie an den Universitäten Bologna (1986–1996) und Florenz (1996 bis heute).



Harald Schwalbe promovierte 1990–1993 bei C. Griesinger in Frankfurt und absolvierte 1993–1995 ein Postdoktorat bei C. Dobson (University of Oxford, Großbritannien). 1999–2001 war er Professor für biologische Chemie am MIT (USA). Er ist seit 2001 an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt tätig, wo er NMR-spektroskopische Methoden entwickelt und anwendet, um die Strukturen und Dynamiken von Proteinen, DNA und RNA zu studieren.

2. Optimierung von Proben und Pulssequenzen

2.1. Probenoptimierung für NMR-spektroskopische Studien im Festkörper

Eine einfache Möglichkeit, die Signalintensität zu verstärken, ist die Erhöhung der Zahl der aktiven Kerne in der NMR-Detektionsspule, z.B. indem man die Probenmenge erhöht. Gegenüber der Lösungs-NMR-Spektroskopie, bei der die Konzentration von der Löslichkeit und die Probengröße von sehr hohen Anforderungen an die Feldhomogenität abhängen, ermöglicht die Festkörper-NMR-Spektroskopie eine größere Variabilität aufgrund der sehr unterschiedlichen Beschaffenheit der untersuchten Biomakromoleküle und wegen der Linienbreiten, die normalerweise breiter als in Lösung sind. Die Probenvorbereitung von biomolekularen Feststoffen ist deshalb von sehr großer Bedeutung, um Spektren mit guten Linienbreiten zu erzielen, bei denen Intensität und Auflösung der Signale optimiert sind. Die untersuchbaren Systeme umfassen, in einer ersten Einteilung, unlösliche und lösliche Biomakromoleküle; in die Klasse der unlöslichen Biomakromoleküle gehören auch Membranproteine^[1–3] sowie Fibrillenaggregate.^[4]

Lösliche Proteine können auf viele Arten präpariert werden, es stellt sich aber die grundlegende Frage, weshalb man sie überhaupt mit Festkörper-NMR-Spektroskopie untersuchen soll. Auch wenn lösliche Proteine mithilfe von NMR-Lösungs-Spektroskopie untersucht werden können,^[5] treten praktische Einschränkungen auf, je größer die untersuchten Proteine werden: Die Linienbreite der Signale erhöht sich proportional zur Rotationskorrelationszeit des gelösten Moleküls, und diese wiederum steigt linear proportional zur Molekülgröße: also je größer das Protein, umso breiter werden die NMR-Signale. Es wurden geniale Lösungen zur Überwindung dieses Problems erfunden, die den TROSY-Effekt nutzen^[6] oder besondere Isotopenmarkierungsschemata anwenden.^[7–11] Trotz all dieser Erfolge bleibt die Feststellung, dass es im Festkörper nicht zu einer solchen Skalierung der Linienbreite mit der Molekülgröße kommt; im Festkörper sind die Spektren prinzipiell unabhängig von der Proteingröße.^[12,13] Auf Grundlage dieser Überlegung wird ersichtlich, dass sehr große Proteine, die aus vielen identischen Untereinheiten aufgebaut sind, besser mit Festkörper- als mit Lösungs-NMR-Spektroskopie untersucht werden



Lucio Frydman erhielt seine B.Sc.- und PhD-Titel von der University of Buenos Aires und war im Anschluss Postdoktorand bei A. Pines in Berkeley (USA). 1992–2001 war er Fakultätsmitglied an der University of Illinois – Chicago. Er ist Professor am Weizmann-Institut in Israel und Chief Scientist für Chemie und Biologie im US National High Magnetic Field Laboratory in Tallahassee, Florida. Er ist Herausgeber des *Journal of Magnetic Resonance*, Vorsitzender des Organisationskomitees von Euromar und Direktor des Weizmann's Helen L. and Martin S. Kimmel Institute for Magnetic Resonance.

sollten.^[14,15] Bisher wurden drei Methoden zur Präparation von Feststoffproben aus löslichen Proteinen angewendet: Gefriertrocknung,^[16–18] Einfrieren^[19,20] und Kristallisation^[21,22] (Abbildung 1). Gefriertrocknung führt typischerweise zu heterogenen Proben mit geringer Auflösung.^[21,23] Einfrieren

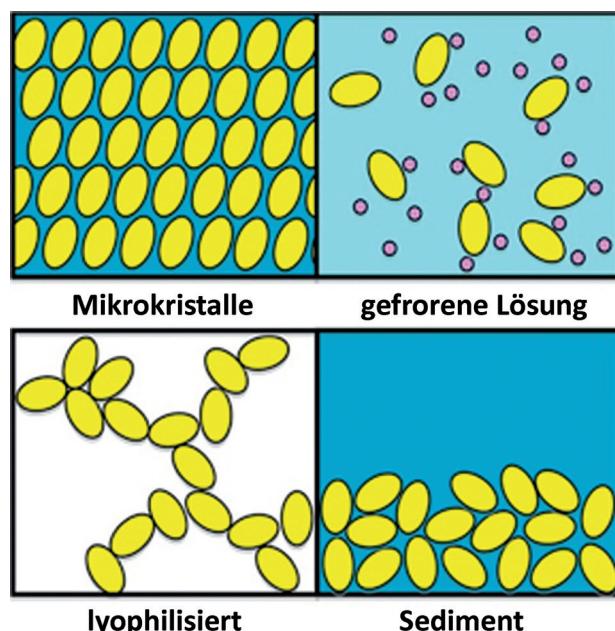


Abbildung 1. Verschiedene Methoden zur Probenpräparation für die Festkörper-NMR-Spektroskopie: Kristallisation, Einfrieren in Gegenwart von Gefrierschutzmitteln, Gefriertrocknung, Sedimentation.

ergibt ebenfalls schlechte Auflösung,^[18,24] auch wenn die Zugabe der richtigen Gefrierschutzadditive^[25,26] häufig brauchbare, gut aufgelöste Festkörper-NMR-Spektren von Proteinen in ihrem Glaszustand liefert.^[24] Wenn schließlich mikrokristalline Proteine hergestellt werden können, ist die Spektrenqualität häufig noch besser als in ihrem Glaszustand.^[21,27–30] Allerdings wirft dieser Ansatz erneut die Frage nach der Notwendigkeit auf: Wenn man Mikrokristalle eines Proteins herstellen kann, findet man fast immer auch passende Kristallisierungsbedingungen.^[31]

Vor diesem Hintergrund konzentrieren wir uns hier auf die Optimierung von nicht mikrokristallinen Proben. Eine vierte Präparationsmethode, deren Bedeutung vor einigen Jahren erkannt wurde, nutzt die Sedimentation eines Proteins durch Ultrazentrifugation.^[32,33] Man erhält das Sediment ausgehend von einer homogenen Lösung des Proteins, es ist also deutlich von einem Präzipitat unterschieden, das sich aus Partikeln bildet, die groß genug sind, um sich bei normaler Schwerkraft abzulagern. Es ist schon lange bekannt, dass Sedimentation eine sehr milde Methode zur Lösungsextraktion von Proteinen ist, die normalerweise nicht aufgrund von Gravitation präzipitieren.^[34] Festkörper-NMR-Experimente wurden an verschiedenen sedimentierten Proteinen durchgeführt, und es stellte sich heraus, dass die Spektrenqualität vergleichbar mit derjenigen von Spektren ist, die man bei mikrokristallinen Präparationen erhält.^[33,35–38] Um möglichst viel Sediment in den MAS-Rotor zu füllen, kann dieser Rotor

in einfach zu entwerfenden Behältern innerhalb einer Zentrifuge platziert werden, sodass das Proteinsediment direkt aus der Lösung entsteht und den Rotor umfanglich füllt.^[33,39] Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass die Qualität von Festkörper-NMR-Spektren von bestimmten gefriergetrockneten Proteinen durch partielle Rehydratisierung verbessert werden konnte. Eine solche Rehydratisierung führt zu einem physikalischen Zustand, der an ein Sediment erinnert oder sogar identisch dazu sein könnte.^[23,40–42] Die Effizienz der Sedimentation hängt vom Molekulargewicht des Proteins, seiner Konzentration und der angewendeten Zentrifugalkraft ab. Da sich die Sedimentation derzeit zu einer nützlichen Methode für die Probenpräparation von Festkörper-NMR-Proben entwickelt, werden Vorherseprogramme entwickelt, die bei der Suche nach den besten Sedimentationsstrategien helfen sollen.^[43]

Die Probenpräparation nichtlöslicher Proteine, inklusive derjenigen von Membranproteinen und Proteinaggregaten, kann noch schwieriger sein.^[44,45] Anscheinend müssen optimale Bedingungen bei dieser Klasse von Systemen für jeden einzelnen Fall optimiert werden. Die Untersuchung dieser weit verbreiteten Systeme ist jedoch von so großer Bedeutung, dass weltweit zahlreiche Versuche unternommen werden, diese schwierigen Systeme NMR-spektroskopisch zu studieren.

2.2. Optimierte NMR-Pulssequenzen

Es ist seit langem bekannt, dass die NMR-Spektroskopie eine äußerst flexible Technik ist, bei der Fortschritte im theoretischen Verständnis der dem Experiment zugrunde liegenden Spinphysik einhergehen mit Fortschritten in der Qualität der Information, die aus NMR-Experimenten gewonnen werden kann. Die biomolekulare NMR-Spektroskopie ist ein Paradebeispiel für diese enge Beziehung, und besonders in den letzten Jahren konnten substantielle Verbesserungen der Empfindlichkeit vieler Experimente sowie der Geschwindigkeit, mit der sich Informationen aus den Experimenten extrahieren lassen, erzielt werden. Tatsächlich sind diese beiden Aspekte korreliert, denn die Steigerung des S/R-Verhältnisses führt zu einer Reduktion der Messzeit ebenso wie kürzere Messzeiten das S/R-Verhältnis erhöhen.

Eine der wirkungsvollsten in der letzten Dekade entwickelten Strategien zur Empfindlichkeitssteigerung reduziert die Wartezeit zwischen zwei sukzessiven NMR-Experimenten. Diese Strategie fußt auf der Tatsache, dass ein NMR-Experiment aus einer zeitlich relativ kurzen Pulssequenz mit Pulsen, Transferzeiten, Wartezeiten und Messung des relevanten Signals der Spins sowie einer viel längeren Wiederaufbauzeit besteht, während derer nichts außer Spinrelaxation passiert. Die mit Pulsaktivität gefüllte Zeit dauert einige 10 ms, während die passive Wartezeit eine Sekunde oder länger ist und damit den größten Teil der NMR-Messzeit verbraucht. Eine wesentliche Steigerung der Empfindlichkeit pro Messzeiteinheit, in der das Signal gemittelt wird, kann also dadurch erzielt werden, dass die Wiederaufbauzeit des angeregten Kerns reduziert wird. Eine Möglichkeit hierfür ist die Zugabe eines geeigneten Relaxationsagens, das die lon-

gitudinale Relaxationszeit eines Spins verkürzt, ohne gleichzeitig in unerwünschter Weise die transversale Relaxationszeit zu verringern, was zu Linienverbreiterung führt. Dieser Ansatz ist lange bekannt und wird in der NMR-Spektroskopie von kleinen organischen Molekülen genutzt, bei denen z.B. die Zugabe von kleinen Mengen des paramagnetischen Agens $[\text{Cr}(\text{acac})_3]$ ($\text{acac} = \text{Acetylacetonat}$) eine geläufige Methode ist, um lange T_1 -Relaxationszeiten zu verkürzen. Die Übertragung solcher Strategien auf die biomolekulare NMR-Spektroskopie erfolgte bisher eher zögerlich, weil die Zugabe geladener paramagnetischer Komplexe zum einen zu Linienverbreiterungen führen und zum anderen die Struktur des untersuchten Biomakromoleküls verändern kann. Vom Einsatz einiger neutraler Relaxationsagentien wurde bereits berichtet.^[46] Alternative Ansätze, die einen direkten Kontakt des Relaxationsagens mit dem Biomakromolekül verhindern, nutzen Lanthanoidkomplexe, die sehr effiziente Relaxationsagentien für Wasser sind. Durch den Austausch der Wasserprotonen mit austauschlabilen NH- oder OH-Gruppen können die longitudinalen Relaxationseigenschaften des Biomakromoleküls moduliert werden.^[47,48] Ähnliche Ansätze wurden schon vor langem in der Festkörper-NMR-Spektroskopie verfolgt,^[49] aber der Nutzen blieb unklar, zum einen wegen der sehr starken, auf dipolarer Relaxation beruhenden Linienverbreiterung, zum anderen, weil die Anwendung von leistungsstarker Entkopplung bei sehr schneller Pulsfolge an die Grenzen der Hardware stößt. Ein Durchbruch auf diesem Gebiet konnte von Ishii et al. erzielt werden,^[50] die zeigen konnten, dass bei MAS-Rotationsraten von > 40 kHz eine geringere Leistung für heteronukleare Entkopplung notwendig ist. Damit werden Limitationen, die sowohl durch Probeneigenschaften (in puncto Erhitzung der Probe) als auch durch jene der elektronischen Bauteile bedingt sind, überwunden, was wiederum schnellere Pulsfolgen ermöglicht.^[51,52]

Eine erforderliche Methode, die Wartezeit zwischen zwei NMR-Experimenten zu verkürzen, ohne externe Agentien zuzufügen zu müssen, ergibt sich in der biomolekularen NMR-Spektroskopie dadurch, dass man 1) einzelne Spins selektiv anregt und 2) Flipwinkel für Anregungspulse nutzt, die von 90° verschieden sind und nach dem Rezept des Ernst-Winkels optimiert werden.^[53] Dass diese Vorgehensweise funktioniert, ist eine Konsequenz von Kreuzrelaxationsphänomenen, bei denen nichtangeregte, räumlich benachbarte Kerne als Quelle zum Polarisationsaustausch wirken können, mit dessen Hilfe sehr schnell Gleichgewichtsmagnetisierung aufgebaut werden kann, besonders für isolierte Amid- oder Methylgruppenprotonen. Diese Idee wird insbesondere in den BEST-^[54] und SOFAST-Experimenten^[55] in Lösung angewendet, die während der letzten Jahre Methoden der Wahl für die Aufnahme von HSQC- bzw. HMQC-Experimenten mit maximaler Empfindlichkeit geworden sind. Diese Kombination aus selektiver Anregung nur derjenigen Spins, die man messen will, mit optimierten Pulswinkeln führt zu Experimenten, die 50–100% empfindlicher sind als die traditionellen, breitbandigen Experimente mit 90°-Anregung. Auch wenn die Empfindlichkeitssteigerungen dann weniger stark ins Gewicht fallen, wenn die Komplexität der Pulssequenzen und/oder deren Dimensionalität steigen, gibt es nach

wie vor zahlreiche 3D- und 4D-Tripelresonanz(H/N/C)-Experimente, für die sich eine solche Optimierung lohnen wird.^[54,55]

Ein weitere empfindlichkeitssteigernde Klasse von Experimenten beruht auf der so genannten „Transverse-Relaxation-Optimized SpectroscopY (TROSY)“.^[56,57] Die TROSY-Methode basiert auf dem Umstand, dass nicht alle Komponenten eines Multiplettsignals, das sich aufgrund von *J*-Kopplung aufspaltet, die gleiche Linienbreite aufweisen. Dies liegt daran, dass die Linienbreite eines Kerns *S* durch die Summe aller schnell fluktuierenden Magnetfelder bestimmt wird. TROSY-Experimente beruhen auf dem Effekt, dass die fluktuierenden Felder unterschiedlicher Relaxationsmechanismen destruktiv interferieren können. Diese destruktive Interferenz führt zu langlebigen und damit schärferen Signalkomponenten, die mit höherer Empfindlichkeit beobachtet werden können. Dies ist z. B. für ¹⁵N-¹H-Amidgruppen in Proteinen mit hohem Molekulargewicht der Fall, in denen sich die Effekte der dipolaren Anisotropien und derjenigen der chemischen Verschiebungen für eine der beiden Dublettkomponenten in diesem Zweispinsystem verstärken, während sie sich für die zweite Dublettkomponente aufheben. Etwas Ähnliches passiert für die ¹³C-¹H-Spins in aromatischen Proteinseitenketten wie auch in den aromatischen Nukleobasen in Nukleinsäuren.^[58,59] Als Konsequenz dieser Relaxationsinterferenzen beobachtet man, dass man in dem Moment, wo man die gebräuchliche Entkopplung ausschaltet, nicht ein in zwei gleich intensive Multipletts aufgespaltetes Signal detektiert, sondern ein Multiplett, in dem eine der Komponenten eine erstaunlich kleine Linienbreite aufweist und damit einfacher zu detektieren wird. TROSY-Experimente nutzen genau diesen Effekt, indem sie nicht nur keine Entkopplungssequenzen anwenden, sondern darüber hinaus nur Korrelationen zwischen den langlebigen Multiplettkomponenten selektieren. Während die Feinadjustierung der destruktiven Interferenz der dipolaren Anisotropien sowie der Anisotropien der chemischen Verschiebungen in den Zweispinsystemen vom gewählten externen Magnetfeld abhängt, das das Ausmaß der Anisotropie der chemischen Verschiebung verändert und keinen Einfluss auf dipolare Relaxation hat, beobachtet man einen Magnetfeld-unabhängigen TROSY-Effekt bei Methylgruppen in Proteinen mit großem Molekulargewicht. Diese Beobachtung röhrt daher, dass die in diesem Fall langlebigen Spinzustände im gekoppelten Experiment aus destruktiver Interferenz der ¹H-¹H- und ¹H-¹³C-dipolaren Anisotropien resultieren.^[60] Durch Einbringen solcher empfindlichen und häufig strategisch positionierten Reportergruppen in die Proteinseitenketten vor einem anderweitig vollständig deuterierten Proteinhintergrund wird es auch möglich, molekulare Maschinen mit sehr hohem Molekulargewicht bei physiologischen Bedingungen in Lösung mit beispieloser Empfindlichkeit in NMR-Experimenten zu untersuchen.^[61]

Auch wenn diese Forschungsrichtung nicht direkt mit der Steigerung der Empfindlichkeit verknüpft ist, hat doch die Durchführung höherdimensionaler Experimente sehr von der Verbesserung der Rechenleistung und neuen Algorithmen profitiert.^[62,63] Tatsächlich gibt es eine Reihe von Publikationen über biomolekulare NMR-Spektroskopie, die sich mit

der Entwicklung von Experimenten befassen, die maximale Auflösung und minimale Mehrdeutigkeit bei geringstmöglicher Messzeit bieten. Ein derart optimiertes Design verdeutlicht die möglichen Vorteile der Erweiterung vom traditionellen Satz von 2D/3D-NMR-Zuordnungsexperimenten^[64] zu komplexeren 4D/5D/6D/7D-Experimenten. Für die Aufnahme solcher Spektren wäre es erforderlich, dass die angelegten Kohärenzen lange Lebenszeiten aufweisen und dass die Proben Spektren mit guten S/R-Verhältnissen liefern, um alle Kohärenztransferwege in den sehr hochdimensionalen (*n*D-)NMR-Experimenten zu ermöglichen; außerdem würde die Aufnahme in konventionellen, durch das Nyquist-Theorem definierten Akquisitionsschemata eine zu große Zahl von wiederholten Einzelexperimenten und eine astronomisch lange Akquisitionszeit erfordern. Angesichts dieser Überlegungen wurden Alternativen gesucht, um die Zeit für die Datenakquisition zu reduzieren. Diese Alternativen umfassen verschiedene Methoden der Projektionsspektroskopie, bei der unterschiedliche Wartezeiten gleichzeitig evolvieren,^[65-67] wie auch Digitalisierungsmethoden, die nicht in äquidistanten Zeitabständen die Evolutionszeiten digitalisieren und damit vom gewöhnlichen Fourier/Nyquist-Kriterium abweichen. Deshalb wird ein großer Anteil der sonst üblicherweise erfassten experimentellen Datenpunkte nicht aufgenommen.^[68-70] Anschließend müssen Algorithmen entwickelt werden, um die hyperdimensionale Verteilung von Signalen zu rekonstruieren, die die Daten der Zeitdomäne am besten repräsentieren, ohne dabei Information zu verlieren oder artifizielles Rauschen zu erzeugen. Diese Methodik hat neue NMR-spektroskopische Anwendungen in Lösung und im Festkörper eröffnet, und gleichzeitig werden in rascher Folge neue Digitalisierungsschemata entwickelt, die A-priori-Informationen oder anspruchsvollere mathematische Rekonstruktionsmethoden nutzen. Die Grenze der Beschleunigung der Datenaufnahme von mehrdimensionalen NMR-Spektren wird bei raumzeitlichen Codierungsmethoden erreicht, die im Prinzip in der Lage sind, unbeschränkt hochdimensionale Daten in einem einzigen Experiment zu produzieren.^[71] Allerdings muss das Problem des Empfindlichkeitsverlusts, der mit der gleichzeitigen Digitalisierung vieler Zeitdomänen einhergeht, für biomolekulare Anwendungen noch gelöst werden.^[72,73]

3. Optimierung von NMR-Probenköpfen und -Spulen

Zusätzlich zu Verbesserungen bei der Probenpräparation und der bei NMR-Experimenten angewendeten „Spingymnastik“ sind auch Fortschritte bei den elektronischen Bestandteilen eines NMR-Spektrometers sehr wichtig für eine höhere Signalintensität. Das bei NMR-Experimenten detektierbare Signal *S* röhrt von der induktiven Kopplung von Spins mit der detektierenden Spule gemäß Gleichung (1) nach Hoult und Richards her.^[214]

$$S \propto k_0 \frac{B_1}{T} V_S N \gamma \frac{\hbar^2}{4\pi^2} S(S+1) \frac{\omega_0^2}{3kT\sqrt{2}} \quad (1)$$

In dieser Gleichung steht V_s für das Probenvolumen, k_0 ist eine Konstante, in der räumliche Inhomogenitäten des B_1 -Felds zusammengefasst werden, k ist die Boltzmann-Konstante, S ist die Spindrehimpulsquantenzahl, γ ist das gyromagnetische Verhältnis, N ist die Spindichte (Zahl der Spins pro Volumenelement), h ist die Plancksche Konstante, T ist die absolute Temperatur (in Kelvin gemessen), und ω_0 ist die Larmor-Frequenz. Der Faktor B_1/I – das magnetische Feld pro Stromeinheit – wird als Spulenempfindlichkeit definiert; er ist invers proportional zum Spulendurchmesser. Das S/R-Verhältnis in der NMR-Spektroskopie erhält man, indem man durch die vom Rauschen verursachte Spannung V_{noise} teilt [Gl. (2)]; hier steht Δf für die Bandbreite des Empfängers. $T_{N,\text{probe}}$ und $T_{N,\text{preamp}}$ sind die beiden Rauschtemperaturen des Probenkopfs und des Vorverstärkers, die gemäß Gleichung (3) definiert sind. In dieser steht NF für den Rauschfaktor des Vorverstärkers, T_{coil} für die Spulentemperatur, T_{sample} für die Probentemperatur und R_{coil} bzw. R_{sample} für den effektiven Widerstand von Spule bzw. Probe.

$$V_{\text{noise}} \propto \sqrt{4k(\Delta f)(T_{N,\text{probe}} + T_{N,\text{preamp}})} \quad (2)$$

$$T_{N,\text{probe}} = \frac{T_{\text{coil}}R_{\text{coil}} + T_{\text{sample}}R_{\text{sample}}}{R_{\text{coil}} + R_{\text{sample}}} ; T_{N,\text{preamp}} = 290 \left(10^{\frac{NF}{10}-1}\right) \quad (3)$$

Gleichung (1) zeigt, dass sich die Empfindlichkeit eines NMR-Probenkopfs durch eine Verkleinerung der Spulengröße verbessern lässt, und Gleichung (2), dass das S/R-Verhältnis auch gesteigert werden kann, indem man die Probenkopftemperatur verringert. Die Effektivität dieses kryogenen Ansatzes hängt von den relativen Werten für Proben- und Spulenwiderständen ab. Eine Erhöhung des Probenfüllfaktors verringert die Vorteile; dies kann so weit reichen, dass der Proben- größer als der Spulenwiderstand wird. Der Probenfüllfaktor hängt auch stark vom Durchmesser des NMR-Probenröhrlchens ab: Probenröhrlchen mit kleinerem Durchmesser tolerieren mehr Salz als solche mit größerem Durchmesser. De Swiet konnte zeigen, dass rechteckige Probenröhrlchen mit der Längsachse entlang des B_1 -Felds in Kryo-Probenköpfen mit verlustreichen Proben, die dielektrische Substanzen wie Salze enthalten, ebenfalls das Signal verbessern.^[74] Gleichung (3) zeigt, dass eine zusätzliche Erhöhung des S/R-Verhältnisses durch Kühlen des Vorverstärkers erreicht werden kann. Vorverstärker mit entweder einem schmalbandigen Galliumarsenidtransistor (GaAs field effect transistor, GaAsFET) oder einem HEMT können so hergestellt werden, dass sie einen Rauschfaktor von ca. 0.3 dB erreichen, was einer Rauschtemperatur von etwa 20 K entspricht. Kühl man den Vorverstärker auf die Temperatur von flüssigem Stickstoff oder noch tiefer, kann man den Rauschfaktor des Vorverstärkers auf ca. 0.1 dB drücken, was einer Rauschtemperatur von ungefähr 10 K entspricht. Die Kühlung des Vorverstärkers ist also dann sinnvoll, wenn man die Spulen auf Temperaturen unterhalb der Siedetemperatur des flüssigen Stickstoffs bringt. Die oben zitierten, einfachen Gleichungen und Überlegungen bilden die Grundlage für derzeitige Fortschritte bei Probenkopfdesign und -technik; einige davon werden in der Folge diskutiert.

3.1. Neues Spulendesign für die biomolekulare NMR-Spektroskopie in Lösung

Auch wenn NMR-Probenköpfe mit kleinen Solenoidspulen zunächst für massenlimitierte Proben von Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht entwickelt wurden, werden sie seit kurzem auch in der Protein-NMR-Spektroskopie eingesetzt.^[75] Tatsächlich sind Solenoidspulen die am häufigsten genutzte Geometrie der bei der Magnetresonanzbildung genutzten „Mikrospulen“ (Abbildung 2 A). Die Massenempfindlichkeit von Mikrospulen mit einem Durchmesser von 1–1.5 mm ist vergleichbar mit der von 5-mm-Kryo-Probenköpfen, ohne dass man deshalb ein ganzes System aus Probenkopf und Vorverstärker unter kyrogenen Bedingungen installieren müsste. Aus diesem Grund sind auf kleine Volumina optimierte Probenköpfe mit solchen Spulen sinnvoll für Proben, die massen-, aber nicht konzentrationslimitiert sind.

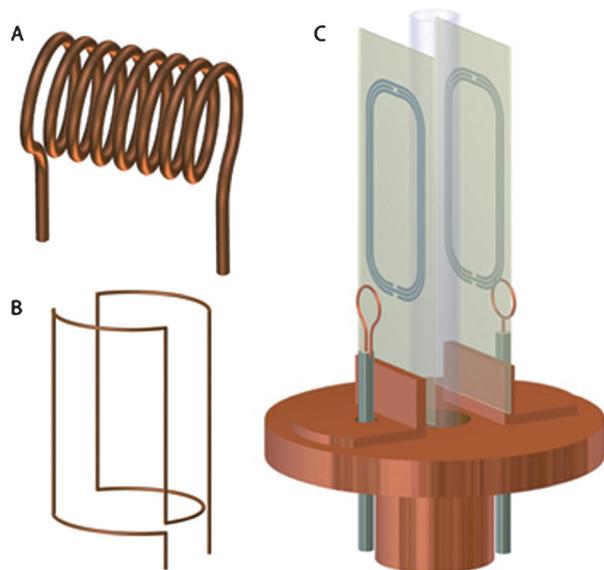


Abbildung 2. Gebräuchliche NMR-Spulengeometrien: A) Solenoid, B) Sattelspule, C) induktiv gekoppelte Hochtemperatur-supraleitende Spule (Zeichnungen von Jason Kitchen, NHMFL).

Trotz der anfangs befürchteten Komplexität von Kryo-Probenköpfen mit gekühlten Hochfrequenz(rf)-Spulen sind sie in den letzten Jahren weit verbreitet bei hochauflösenden NMR-Untersuchungen der Proteinstruktur und -dynamik eingesetzt worden. Die Probenköpfe werden auf Temperaturen zwischen 20 und 77 K gekühlt und haben meistens konventionelle Sattelspulen aus Kupfer (Abbildung 2B). Signifikante Verbesserungen des S/R-Verhältnisses, bis zu einem Faktor 4 für konventionelle Kupfer-basierte Sattelspulen, konnten bei Proteinstudien unter Verwendung der Kryotechnik erreicht werden; kommerzielle Kryo-Probenköpfe können für die meisten Probenkopfkonfigurationen gekauft werden. Dies umfasst auch Tripelresonanzprobenköpfe bei einer Feldstärke von bis zu 1000 MHz. Eine aus-

fürliche Übersicht mit Anwendungen dieser Plattform wurde 2005 publiziert.^[76]

Hochtemperatursupraleiter (high temperature superconductors, HTS) wie Yttrium-Barium-Kupferoxid (YBCO), das auf einem Substrat aus Saphir deponiert wird, können die Empfindlichkeit zusätzlich verbessern. Brey und Mitarbeiter haben die Techniken der kleinen Probengrößen, niedrigen Temperaturen und HTS-Spulen vereint, um einen 1-mm-Tripelresonanz-Kryo-Probenkopf (600 MHz) mit vier Paaren von HTS-Spulen aufzubauen.^[77] Dieser auf ¹H-Detektion optimierte Probenkopf kann abhängig von der Dicke der Glaswand eines Probenröhrtchens mit 1 mm Durchmesser maximal ein Probenvolumen zwischen 5 und 10 µL aufnehmen. Die Massenempfindlichkeit ist fast viermal größer als die eines 5-mm-Kryo-Probenkopfs, auch wenn das absolute Signal sehr viel geringer ausfällt. Es muss allerdings angemerkt werden, dass mit dem jetzigen HTS-Spulendesign (wie in Abbildung 2C) für einen Tripelresonanz-(¹H, ¹³C, ¹⁵N-und-²H-Lock)-HTS-basierten Probenkopf in einem Magneten mit Standardbohrung maximal ein Durchmesser von 1.7 mm erreicht werden kann. Für Proben mit größeren Volumina wird ein neues HTS-Spulendesign entwickelt werden müssen. Im National High Magnetic Field Laboratory (NHMFL) wurde vor kurzem auch ein auf ¹³C-Detektion optimierter 1.5-mm-Probenkopf mit HTS-Spulentechnologie entwickelt, der eine mehr als zweimal höhere Massenempfindlichkeit aufweist als kommerzielle ¹³C-optimierte Probenköpfe. Solche Probenköpfe sind ideal einsetzbar für ¹³C-basierte Metabolomikstudien und Experimente wie INADEQUATE.^[78] Diese Technik und die zugrunde liegende Optimierung von Mikrokryo-Probenköpfen, besonders für HTS-Spulen, sind vor kurzem in einem Übersichtsartikel zusammengefasst worden.^[79]

Ein alternativer Ansatz zur Entwicklung von Spulen bei sehr hohen Frequenzen besteht darin, Materialien mit hoher Permitivität zu nutzen. Da solche Materialien in Apparaturen mit hohen Q-Faktoren eingesetzt werden können, liegt es nahe, dass sie statt der traditionellen, auf Stromleitern basierenden, metallischen rf-Spulen insbesondere für Hochfrequenzanwendungen eingesetzt werden können. Vor einigen Jahren konnte, aufbauend auf Elektronenspinresonanz-(EPR)-spektroskopischen Arbeiten, diese Art von Materialien das erste Mal für die Magnetresonanzbildgebung eingesetzt werden.^[80] Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Resonatoren auch ihre Nischenanwendungen bei NMR-Frequenzen oberhalb von 1 GHz finden werden. Die Kerneigenschaften eines dielektrischen Resonators (DR) sind die Zeitinvariablen Muster des elektrischen und magnetischen Feldes, die sich in diesem Resonator bilden. Zylindrische DRs haben transversale elektrische (TE-) und transversale magnetische (TM-)Moden, aber auch hybride elektromagnetische (HEM-)Moden. Eine TE-Mode wird als eine Mode definiert, deren elektrischer Feldvektor senkrecht auf der Richtung der Ausbreitung des elektrischen Felds steht, also kein elektrisches Feld entlang der Propagationsrichtung aufweist. Eine TM-Mode stellt eine Mode dar, deren magnetischer Feldvektor senkrecht auf der Richtung der Ausbreitung des magnetischen Felds steht, also kein magnetisches Feld entlang der Propagationsrichtung aufweist, und eine HEM-

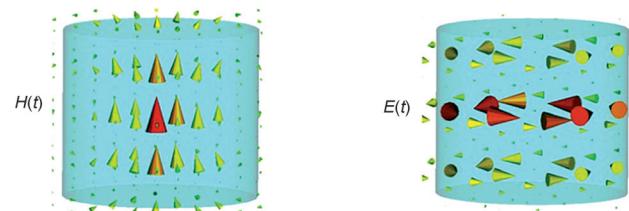


Abbildung 3. Verteilung der magnetischen ($H(t)$) und elektrischen Felder ($E(t)$) für die TE_{01} -Mode, die meistgenutzte Mode zylindrischer dielektrischer Resonatoren.

Mode besteht aus nicht verschwindenden elektrischen und magnetischen Feldern in Ausbreitungsrichtung. Abbildung 3 zeigt die Verteilung der elektrischen und magnetischen Felder für die am häufigsten genutzte Mode zylindrischer DRs, die TE_{01} -Mode. In dieser Mode stehen elektrische und magnetische Felder tangential zueinander. Es ist hierbei entscheidend, dass das elektrische Feld im Zentrum des DR verschwindet und dass es sich nur innerhalb der Struktur des DR ausbreitet. In einem alternativen Ansatz können dielektrische Materialien auch in einen konventionellen Resonator eingebracht werden. Das Dielektrikum kann man als zirkulare Ummantelung in der rf-Spule nutzen, um die Empfindlichkeit zu erhöhen und/oder die Abschirmung der Probe vom herkömmlichen elektrischen Feld der rf-Spule zu verbessern. Eine solche Abschirmung ist wichtig, um das Heizen bei Experimenten, die Protonenentkopplungen mit starker Leistung erfordern, zu reduzieren. Diesen Fall beobachtet man häufig für biologische Proben im Festkörper mit starker Leitfähigkeit. Crum und Zilm^[81] konnten zeigen, dass Proben von der herkömmlichen Komponente des elektrischen Felds in einer Solenoidspule abgeschirmt werden können, ohne die B_1 -Feldverteilung oder -amplitude zu verändern, indem man eine zylindrische dielektrische Hülse zwischen Probe und Spule anbringt.

3.2. NMR-Probenköpfe: künftige Ziele und Aufgaben

Auf den allen Anwendungsgebieten der magnetischen Resonanz beobachtet man einen kontinuierlichen Trend zu höheren statischen Magnetfeldern. Kommerzielle hochauflösende NMR-Magnete haben eine Feldstärke von ca. 23.5 Tesla (1 GHz) erreicht, und Hybride Magnete, die eine Feldstärke von 1.2 GHz erzielen, werden entwickelt. MRI-Systeme für Untersuchungen an Tieren wenden eine Feldstärke von bis zu 21.1 Tesla (900 MHz) an, und Magnete für MRI am Menschen mit einer Feldstärke von 11.7 Tesla (500 MHz) befinden sich in der Entwicklung. In Bezug auf Radiofrequenzspulen sind sowohl die absolute Frequenz als auch das Produkt aus Frequenz und Durchmesser wichtige Kriterien für Design und Effizienz. Es ist interessant festzustellen, dass Resonatoren in mm-Größe für die Hochfrequenz-EPR-Spektroskopie, in cm-Größe für die Hochfrequenz-NMR-Spektroskopie sowie in einer Größe von 10–100 cm für die Hochfrequenz-MRI ein Frequenz-Durchmesser-Produkt in der gleichen Größenordnung aufweisen. Was die Eigenschaften der Probe angeht, vergrößern sich die di-

elektrischen Verluste wie auch die Konduktivität mit steigender Frequenz sowohl für wässrige Proben als auch für Gewebeproben. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Entwicklung dielektrischer Resonatoren nicht nur bei MRI-Spulen für Tiere und Menschen, sondern auch bei hochauflösenden NMR-Probenköpfen und kleinen Resonatoren für die Hochfrequenz-DNP eine Rolle spielen wird.

4. Verbesserung der Empfindlichkeit durch höhere magnetische Felder

4.1. Supraleitende NMR-Magnete

Aufgrund der Boltzmann-Polarisation und Aspekten der Faraday-Induktion verstärkt sich das von Spins emittierte Signal quadratisch mit steigendem Feld. Die spektrale Auflösung in n -dimensionalen NMR-Experimenten steigt sich mit der n -ten Potenz von B_0 , wodurch sich der Wunsch der NMR-Spektroskopiker nach immer höheren Magnetfeldstärken erklärt (Abbildung 4). Während die zurzeit ge-

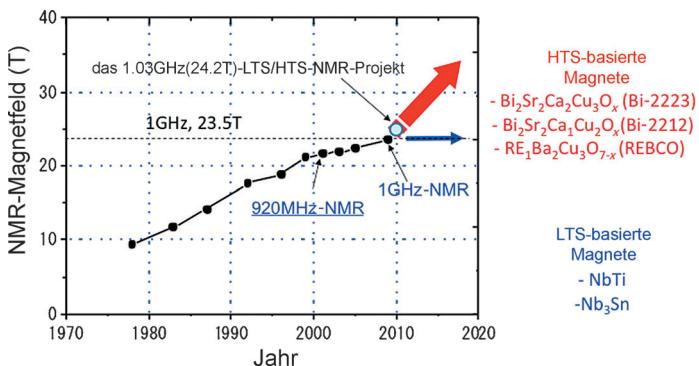


Abbildung 4: Steigerung der maximalen Stärke der Magnetfelder, die in den letzten 40 Jahren für die hochauflösende NMR-Spektroskopie verwendet wurden. Die Abbildung zeigt, wann die ersten kommerziell erhältlichen Geräte installiert wurden.

bräuchlichen Niedertemperatursupraleiter ein Feld von 23.5 T mit hervorragender Stabilität, Homogenität und dadurch bedingter hoher Auflösung ermöglichen, werden konventionelle NMR-Ansätze aller Wahrscheinlichkeit nach keine höheren Felder als 25.9 T (1.1 GHz) erreichen. Diese Tatsache beruht darauf, dass die kritische Stromdichte im Supraleiter oberhalb einer Feldstärke von 23 T rapide abnimmt (siehe Abbildung 5). Hochtemperatursupraleiter (high temperature superconductors, HTS) wie $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{Ca}_2\text{Cu}_3\text{O}_x$ (Bi-2223), $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{Ca}\text{Cu}_2\text{O}_x$ (Bi-2212) oder $\text{REBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-x}$ (REBCO; RE = Seltenerdmetall) können entsprechend hohe Stromdichten aushalten, die für Magnetfelder oberhalb 23 T notwendig sind, und ermöglichen so das Design eines NMR-Magneten mit einer Frequenz oberhalb von 1 GHz. So konnte tatsächlich eine Magnetfeldstärke von 34 T (was einer ^1H -NMR-Frequenz von 1.45 GHz entspricht) unter Nutzung einer kleinen eingefügten Bi-2212-Spule erreicht werden,^[82] während ein 35.4-T(1.5-GHz)-Feld mit einer kleinen REBCO-Spule, in ein 31-T-Hintergrundfeld eines wasserge-

kühlten resistiven Magneten eingefügt, erzielt wurde.^[83] Angetrieben durch diese Erfolge wird ein in allen Teilen supraleitender Magnet bei 32 T im NHMFL in den USA entwickelt, der mit einer konventionellen Spule aus Niedertemperatursupraleitern (LTS) bei 15 T zusammen mit einer inneren 17-T-REBCO-Spule betrieben wird.^[84] Es sollte also möglich sein, einen NMR-Magneten für den Betrieb bei >1 GHz zu entwickeln, indem man eine äußere LTS-Spule und eine innere Hochfeld-HTS-Spule, also einen „LTS/HTS-NMR-Magneten“ herstellt.

Hochfeldmagnete erzeugen enorme Wickelspannungen, wenn die Konduktoren geladen werden. Deshalb enthalten Magnete gebräuchlicher supraleitender Materialien oberhalb von ca. 17 T Verstärkungsmaterialien, z. B. auch Stahl, um die Supraleiter zu stützen, was wiederum Auswirkungen auf die Gesamtstromdichte des Magneten hat. Für lange Zeit war Bi-2223 das bevorzugte Material, um Feldstärken oberhalb 23 T zu erreichen. 2007 konnte die Firma SuperPower ein neues REBCO-Band produzieren, das Hastelloy-Substrat-Drücke von 450 MPa, also zweimal mehr als Bi-2223, aushält. Dieses Material wird seitdem weltweit für zahlreiche Hochfeld-

Demo-Spulen genutzt, die nur minimal zusätzlich verstärkt werden müssen. Zahlreiche Laboratorien konzentrieren sich jetzt auf REBCO als bevorzugtes Material für NMR-Magnete mit Magnetfeldfrequenzen bis zu 1.5 GHz (35 T). Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass der Einsatz der HTS-Konduktoren in NMR-Magneten entweder wegen des hohen Preises der HTS-Konduktoren oder wegen anderer technischer Probleme scheitern wird.

2007 startete Japan ein Projekt, ein NMR-Spektrometer bei einer Magnetfeldfrequenz von 1.02 GHz (24.2 T) mit einer inneren Hochfeld-Bi-2223-Spule innerhalb eines Niob-basierten LTS-NMR-Magneten zu entwickeln. Wegen der Schwierigkeiten bei der Herstellung eines verlässlichen supraleitenden Verbindungsstück ist es unwahrscheinlich, dass ein solcher LTS/HTS-NMR-Magnet einen persistenten Strom generieren kann, der ausreichend stabil für NMR-spektroskopische Messungen ist. Deshalb werden solche und ähnliche LTS/HTS-NMR-Magnete wahrscheinlich von einem externen Gleichspannungs-Leistungsgenerator betrieben werden, wie er auch für den ersten 14.1-T-Magneten in der NMR-Spektroskopie angewendet wurde.^[85] Ein internes ^2H -Feld-Frequenz-Lock-System reicht aus, um das magnetische Feld bei externen Fluktuationen für NMR-Messungen an Proteinen in Lösung zu stabilisieren. Zum Nachweis der Umsetzbarkeit dieses Prinzips wurde zuerst ein 500-MHz-NMR-Spektrometer mit LTS/Bi-2223-Magnet entwickelt, mit dem 2D-NOESY-, 3D-HNCO- und 3D-HNCACB-Spektren eines Proteins aufgenommen wurden;^[86] die Spektrenqualität war dabei vergleichbar mit jener von Spektren, die mit einem konventionellen LTS-500-MHz-NMR-Spektrometer erhalten wurden. Der nächste Schritt in diesem Projekt, der die Entwicklung eines 1.02-GHz-NMR-Spektrometers mit LTS/Bi-2223-Magnet vorsah, wurde 2015 abgeschlossen.^[87,216]

Ein weiteres Projekt in Japan zielt auf die Entwicklung eines LTS/REBCO-NMR-Spektrometers für den Betrieb bei Magnetfeldfrequenzen oberhalb 1 GHz ab. REBCO-Kon-

duktoren wurden erst 2009 kommerziell erhältlich, weshalb die Magnettechnologie von REBCO-Konduktoren bisher noch nicht weit entwickelt ist. Während dieses LTS/HTS-Projekts wurden signifikante technische Probleme bei REBCO-Spulen beobachtet: a) Verlust der supraleitenden Eigenschaften aufgrund mechanischer Probleme^[88] sowie b) große Effekte der durch Probenströme induzierten magnetischen Felder.^[89] Als Konsequenz dieser technischen Probleme wurde das REBCO-Spulenmaterial mit Paraffinwachs imprägniert, um Verluste der Spuleneigenschaften zu verhindern; damit konnte der LTS/REBCO-Magnet bei 400 MHz betrieben werden. Dennoch beobachtet man auch weiterhin drastische Unterschiede in der Auswirkung von Probenströmen zwischen LTS/REBCO-400-MHz- und LTS/BSCCO-500-MHz-NMR-Spektrometern infolge der vielschichtigen Bandstruktur der REBCO-Konduktoren. Weitere Verbesserungen der Feldhomogenität und -stabilität müssen deshalb erzielt werden, um diesen vorteilhaften Konduktor für NMR-Magnete anwendbar zu machen. Außerdem haben Experimente am NHMFL an multifilamentösen, runden Drähten aus Bi-2212 gezeigt, dass die kritische Stromdichte in Konduktoren nach Durchführung von Sauerstoffreaktionen bei hohem Druck (diese kritische Stromdichte J_E erreicht $500 \text{ A m}^{-1} \text{ m}^{-2}$ bei 30 T, ein höherer Wert als bei REBCO oder Bi-2223) signifikant gesteigert werden kann (Abbildung 5).^[90] Diese runden Drähte mit kleinerem Durchmesser können vielleicht Magnetfelder höherer Homogenität unter Verwendung geringerer Magnetisierungsströme als Magneten

aus supraleitenden Bändern wie REBCO oder Bi-2223 generieren. Solche Projekte werden auch an anderen Standorten in den USA und Japan verfolgt.

Es gibt zahlreiche Ansätze zur Entwicklung von LTS/HTS-NMR-Magneten für die hochauflösende NMR-Spektroskopie. Diese Ansätze auf Basis des Zwei-Konduktoren-Aufbaus könnten die NMR-Magnettechnologie revolutionieren, weil Magnete mit viel größeren Magnetfeldstärken als heute möglich werden. Die Erforschung und Entwicklung solcher Magnete laufen unter Hochdruck im akademischen und industriellen Bereich in Japan, in den USA und in Deutschland.

4.2. Resistive und Hybrid-NMR-Magnete

Institute in Europa und in den USA, die Zugang zu Höchstfeld-NMR-Magneten anbieten, beschäftigen sich auch mit NMR-Experimenten oberhalb 30 T (ca. 1.3 GHz) unter Verwendung ausschließlich resistiver Magnete. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass NMR-Experimente in gepulsten Höchstfeldmagneten durchgeführt werden können. Solche Systeme, die in Dresden und in Toulouse^[91,92] installiert sind, nutzen ausschließlich resistive Magnete, die durch Gleichstrom aus großen Stromversorgungsgeräten oder Kondensatorenbanken gespeist werden. In diesen Systemen können NMR-Spektren mit einem Magnetfeld im Bereich von 40–70 T aufgenommen werden. Die Magnete haben eine kom-

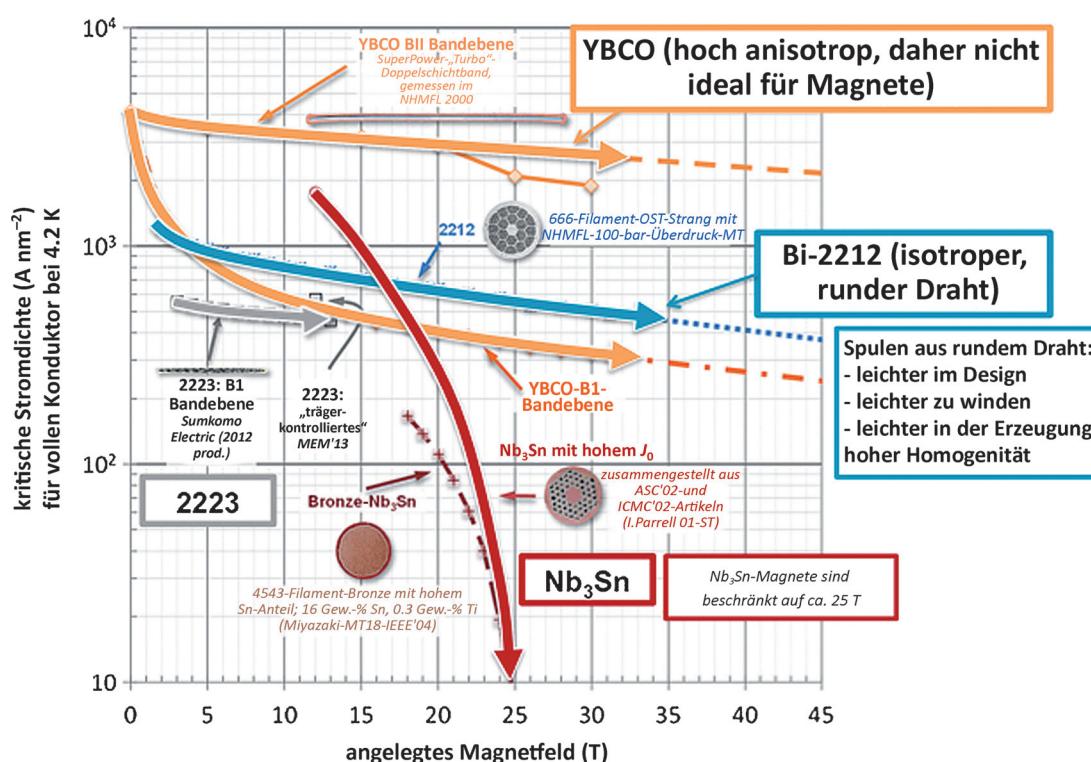


Abbildung 5. Kritische Stromdichte supraleitender Drähte als Funktion des angewendeten Magnetfelds. Gezeigt sind Daten für zurzeit verwendete, runde Nb₃Sn-Drähte (roter Pfeil), runde isotrope Bi-2212-Drähte (blau), anisotrope Bi-2223-Bänder (grün) und anisotrope YBCO(REBCO)-Bänder (gelb), für die der obere Pfeil das Magnetfeld innerhalb der Cu-O-Ebenen und der untere das zu den Cu-O-Ebenen orthogonale Magnetfeld markiert. Vor kurzem durchgeführte Experimente mit rundem Bi-2212-Draht haben gezeigt, dass die kritische Stromdichte substanzl. ansteigt, wenn das Material unter Sauerstoff-Hochdruckbedingungen gesintert wurde^[80] (Bild von Peter Lee, NHMFL).

pakte Struktur, deren Feldhomogenität und -stabilität für die Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie nicht ausreicht. Typische Feldvariationen im Zentrum des Magnetfelds belaufen sich auf 500 ppm in einem Volumen von 1 cm³, und die zeitliche Stabilität beträgt ca. 10 ppm bei ca. 1500 Hz aufgrund von Oszillationen in den Stromversorgungsgeräten und thermischer Drift im Kühlssystem. Solche Systeme kommen deshalb nicht als Alternativen für die biomolekulare NMR-Spektroskopie infrage, im Unterschied zu so genannten Hybrid-NMR-Magneten. Diese bestehen aus einem resistiven Magneten innerhalb einer supraleitenden Spule und sind in Serie geschaltet, um die höchstmöglichen kontinuierlichen Magnetfelder sowie eine verbesserte induktionsinduzierte Stabilität zu erreichen. Im NHMFL wird z.B. ein 36-T-Hybrid-NMR-Magnet gebaut, der eine 1-ppm-Feldhomogenität in einem Volumen von 1 cm³ erreichen soll. Nach Optimierung der Feldshims und der Stabilität könnte ein solches System auch für die hochauflösende NMR-Spektroskopie infrage kommen. Ein besonderes Merkmal des Magnetdesigns besteht darin, dass ein elektromagnetischer Einsatz in Serie mit einem supraleitenden LTS-Magneten mit sehr hoher Induktivität geschaltet ist, um eine Dämpfung im Hinblick auf die Fluktuationen des Stromversorgungsgeräts zu erzielen. Es bleibt aber eine anspruchsvolle Aufgabe, für jedes System mit einer inneren resistiven Magnetkomponente die Homogenität und Stabilität zu erreichen, die für hochauflösende NMR-Spektroskopie (selbst im Festkörper) notwendig sind. Alle Versuche in dieser Richtung erhöhen die Komplexität des Magnetdesigns, verringern die Leistungsfizienz und könnten den erreichbaren Raumtemperatur-Bohrungsdurchmesser verkleinern. In Projekten in Nijmegen, im NHMFL und in Japan wurden ferromagnetische und paramagnetische Shimsysteme als Alternative eingesetzt, die keine Änderungen am Magnetdesign oder am Stromversorgungsgerät nötig machten (Abbildung 6).^[93,94]

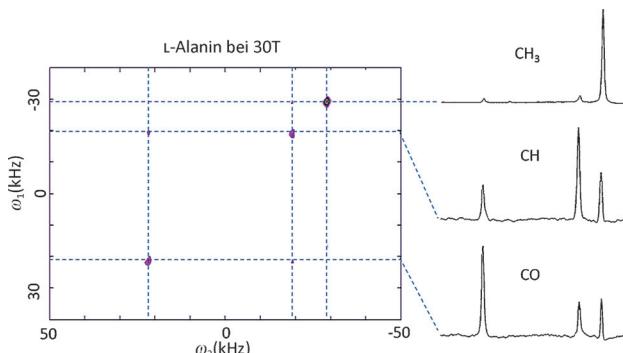


Abbildung 6. Homonukleares ¹³C-Kreuzkorrelationsspektrum, aufgenommen an einer Probe von L-Alanin bei einer Feldstärke von 30 T in einem Standard-33-T-Bitter-Magneten im Hochfeldmagnetlabor in Nijmegen. Dieser Magnet hat eine 32-mm-Raumtemperaturbohrung mit einem Ferro-Shim und ohne elektrische Shims. Ein 1D-digitaler Frequenz-Lock des ²H-Referenzsignals wurde genutzt, mittels Hardware-Steuerung Phaseninkremente in der indirekten Dimension einzuspeisen. Die MAS-Rotationsfrequenz betrug 45 kHz, und dipolare Kopplung wurde durch eine rotorsynchronisierte SR6-Sequenz rückgekoppelt. Die Messzeit betrug ungefähr 30 min.

Die Stabilitätsprobleme müssen durch eine geeignete schnelle, digitale Feldfrequenz-Lock-Einheit ausgeglichen werden. Im Prinzip können so die meisten 2D-NMR-Experimente ohne Änderungen in den Pulssequenzen durchgeführt werden, da alle durch die Feldänderungen induzierten Phasenfluktuationen, die die Evolutionsperioden der verschiedenen Kerne beeinflussen, durch Änderungen des Locks ausgeglichen werden.^[95] Eine zweite Lösung besteht in einem „Feld/Frequenz“-Lock mithilfe einer Rückkopplungsspule, die es ermöglicht, dass Signalmittelung und multidimensionale Experimente in resistiven Magneten in gleicher Weise durchgeführt werden können wie in supraleitenden NMR-Magneten.^[86] Zum Aufbau eines solchen Systems muss die Rückkopplung auf Feldfluktuationen innerhalb von Millisekunden bis Sekunden erfolgen. Um dies zu erreichen, wurden spezielle Feldmessungen wie Frequenzzählung und Phasenmessungen entwickelt. Dennoch muss festgehalten werden, dass der Betrieb von resistiven und hybriden NMR-Magneten sehr viel teurer ist als der kontinuierliche Betrieb supraleitender NMR-Magnete. Die Kosten allein für die Elektrizität, die resistive und hybride NMR-Magnete benötigen, belaufen sich auf mehrere Tausend Dollar pro Stunde. Insbesondere 2D- oder 3D-NMR-Experimente mit niedriger Empfindlichkeit, die recht lange Aufnahmezeiten erfordern, sind damit praktisch unmöglich. Deshalb liegt der Fokus bei der biomolekularen NMR-Spektroskopie auf dem LTS/HTS-Magnetdesign.

Zusammengefasst sollten die Höchstfeldmagneten, wie sie bereits mit nichtpersistenteren Magneten erreicht werden können, interessante Perspektiven für die NMR-Spektroskopie im Höchstfeld bieten. Auch wenn diese Systeme nicht in der Lage sein werden, die erforderliche Stabilität und Homogenität der traditionellen hochauflösenden NMR-Spektroskopie zu erreichen, ermöglichen sie es doch, Experimente bei 30–45 T zu testen, zehn oder zwanzig Jahre, bevor solche Felder in rein supraleitenden Magneten möglich sein werden. Die Bedeutung solcher Experimente für die biomolekulare NMR-Spektroskopie im Festkörper ist damit offensichtlich, nicht nur was Spin- $\frac{1}{2}$ -Kerne mit niedrigem gyromagnetischen Verhältnis angeht, sondern auch in Bezug auf andere Spezies, die nur geringe Auflösungen erlauben, wie ¹H-Kerne in einfachen Spinnetzwerken oder biologisch relevante quadrupolare Kerne wie ¹⁷O oder ⁶⁷Zn.

5. Steigerung der Empfindlichkeit durch Strategien zum Transfer der Spinausrichtung: DNP, PHIP, optische Pumpexperimente

Die detektierten Signale eines Ensembles von Spins können verstärkt werden, indem die Spinpolarisation von Elektronen, die ein großes Magnetmoment aufweisen, auf Kerne übertragen wird. Nutzt man hierfür Mikrowellenstrahlung für die Elektron-Kern-Übergänge, spricht man von dynamischer Kernpolarisation (dynamic nuclear polarization, DNP). Innerhalb der letzten zehn Jahren wurden Mikrowellenquellen entwickelt, die DNP-Experimente bei Magnetfeldstärken ermöglichen, wie sie bei modernen NMR-Experimenten (5–20 T) eingesetzt werden. Deshalb ist DNP nun

ein integraler Bestandteil zahlreicher NMR-spektroskopischer Studien, darunter In-vivo-NMR-Spektroskopie, NMR-metabolische Untersuchungen und hochauflösende NMR-Experimente in Lösung und im Festkörper.^[96–98] Die physikalischen Grundlagen der DNP wurden bereits vor 60 Jahren von Overhauser beschrieben,^[99] und erste Experimente wurden kurz danach an Metallen durchgeführt.^[100] Die heutige Bedeutung der DNP für die Praxis beruht hauptsächlich auf ihrer Implementierung bei hohen Feldern in Festkörpern. Solche Experimente können bei Rotation um den magischen Winkel (magic angle spinning, MAS) an Feststoffen, die mit paramagnetischen Zentren dotiert wurden,^[101–103] aber auch in Lösung durchgeführt werden, indem an einem kryogen gekühlten Pellet zunächst DNP im Festkörper induziert und anschließend aufgelöst wird; dies führt zu großen Steigerungen der Empfindlichkeit.^[104] Dies sind die beiden vielversprechendsten Strategien zum Erzielen einer drastischen Empfindlichkeitssteigerung bei der biomakromolekularen NMR-Spektroskopie, und wir wollen hier ihre jüngsten Fortschritte diskutieren. Da sich außerdem die physikalischen Grundlagen der DNP unterscheiden, je nachdem, ob DNP-Transfer im Festkörper oder in Flüssigkeit induziert wird (unabhängig von der Frage, in welchem Zustand anschließend NMR-Experimente durchgeführt werden), unterteilen wir unsere Diskussion gemäß diesen beiden Szenarien.

5.1. Das physikalische Prinzip der DNP im Festkörper

Der Polarisationstransfer zwischen mit Mikrowelle angeregten Elektronen und den umgebenden Kernen ist im Festkörper am effizientesten (Abbildung 7), da man dann sowohl hohe Magnetfelder als auch niedrige Temperaturen nutzen kann. Dies kann die Empfindlichkeit um bis zu 4–5 Größenordnungen gegenüber der im Fall von Kernpolarisation bei Raumtemperatur verstärken. Die Steigerung beruht auf den großen Unterschieden der gyromagnetischen Verhältnisse der Elektronen und der Kerne ($\gamma_e/\gamma_{\text{nuc}} = 658$ für ^1H und $\gamma_e/\gamma_{\text{nuc}} = 2618$ für ^{13}C) sowie auf dem großen Unterschied in der auf der Boltzmann-Verteilung beruhenden Energiedifferenz, den man durch Temperatursprung erzielen kann (ca. 300 bei einem Sprung von 1 zu 300 K). Die hauptsächlich verantwortlichen physikalischen Mechanismen, die dem Hyperpolarisationsprozess im Festkörper zugrunde liegen, sind die folgenden: 1) „Solideffekt“ (SE-DNP),^[105] 2) „Kreuzeffekt“ (CE-DNP)^[106–108] und 3) thermische Mischung (TM-DNP),^[109–111] auch wenn kürzlich von Verstärkungen unter

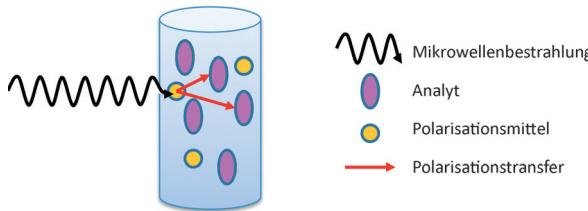


Abbildung 7. Schematische Abbildung eines DNP-Experiments: Mikrowellenstrahlung induziert elektronische Übergänge, die in der Folge das Ausmaß der Kernpolarisation verstärken.

Nutzung des Overhauser-Mechanismus im Festkörper berichtet wurde.^[112] SE-DNP induziert den Polarisationstransfer zum Kern von einem isolierten ungepaarten Elektron aus.^[108,111,113–115] CE-DNP beruht darauf, dass zwei Elektronen Polarisation in Resonanz zu einem Kern transferieren.^[116,117] Der TM-Mechanismus beschreibt den Prozess des Elektronen-Kern-Polarisationstransfers in großen Spinsystemen, die aus vielen dipolar gekoppelten Elektronen und Kernen bestehen, und wird typischerweise im Rahmen eines Spintemperatur-Formalismus beschrieben.^[118–120] Gemeinsames Merkmal all dieser Mechanismen ist, dass man für eine Maximierung der Kernpolarisation von der höchsten möglichen Elektronenpolarisation unter Nutzung eines großen Hochfeld/Temperatur-Quotienten ausgeht und durch Mikrowelleneinstrahlung in der Nähe oder bei der elektronischen Larmor-Frequenz das Polarisationsgleichgewicht stört. Meistens werden Festkörper-DNP-Experimente mit glasartigen Proben bei tiefer Temperatur und Dotieren mit Radikalen einer Konzentration von 5–40 mM durchgeführt; das Messen der Verstärkung der Kernpolarisation als Funktion der Mikrowelleneinstrahlfrequenz kann Aufschluss darüber geben, ob der SE- oder der CE-Mechanismus oder eine Kombination beider Mechanismen zur Verstärkung führt (Abbildung 8).^[117,121–123] In neueren Untersuchungen wurden die spezifischen Bedingungen für effiziente Signalverstärkung erneut abgeleitet und die Aufbauraten der Kernpolarisation sowie statische DNP-Experimente unter Frequenzmodulation simuliert.^[116,124] Während SE- und CE-DNP-Mechanismen zum Aufbau lokaler Polarisation führen, muss dennoch ihre Wirkung auf weit entfernte Kerne im Kontinuum berücksichtigt werden. Dieser Prozess beruht auf der dipolaren Wechselwirkung zwischen Kernen und kann als Spindiffusionsprozess beschrieben werden.^[113,115,125–127] Um diese Prozesse zu simulieren, muss man einen relaxationsartigen Mechanismus, der den Effekt fluktuierender Operatoren $I_i^+ I_j^- + I_i^- I_j^+$ zwischen Paaren von Kernen i und j beschreibt, berücksichtigen.^[128] Der Transfer der Polarisation entlang des Netzwerks dipolar gekoppelter Kerne hängt auch von der T_1 -Relaxation des Kernpools und den dipolaren Relaxationsgeschwindigkeiten ab. Auf diese Weise – und verstärkt durch die niedrige Temperatur, dank derer man mit langen DNP-Pumpzeiten arbeiten kann – lassen sich große Kernspinsysteme in Molekülen unter Nutzung des SE- (Abbildung 9) wie

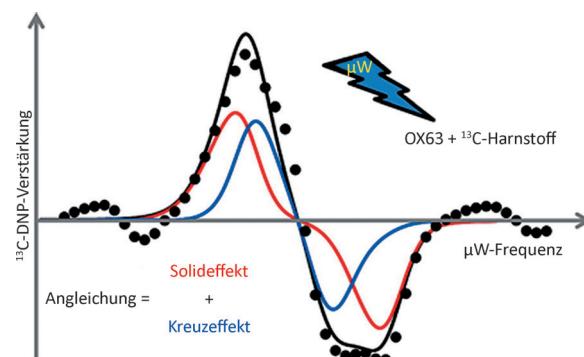


Abbildung 8. Synergistische Effekte aufgrund von Solid- und Kreuzefekt bei der ^{13}C -Festkörper-DNP.^[123]

auch des CE-DNP-Mechanismus polarisieren. Für große Systeme nähern sich die Aufbauzeiten denen der Kernrelaxationszeit an. Dann hängt die erzielbare Polarisation von der Relaxationszeit und der effektiven Größe des Spinsystems für jedes DNP-aktive Elektron ab.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen dem SE- und dem CE-Mechanismus beruht auf der Aufbaurate der Kernpolarisation in der Nähe des Elektrons oder der Elektronen. Im Fall des SE-Mechanismus, der verbotene Übergänge nutzt, ist die effektive Mikrowellenleistung, die für den Übergang zur Verfügung steht, klein; die Aufbauraten sind dann sehr viel geringer als nach dem CE-Mechanismus, bei dem Elektronen-getriebene Kerpolarisation erlaubt ist, weshalb die Effizienz des Übergangs direkt proportional zur μW -Leistung ist. Im Experiment ist es aber so, dass die Konzentration an Elektronenpaaren, die die sehr stringenten CE-DNP-Bedingungen erfüllen – nämlich dass zwei Elektronen räumlich so angeordnet sein müssen, dass die Differenz ihrer Resonanzfrequenz genau der Kern-Larmor-Frequenz entspricht – viel geringer ist als bei SE-DNP-Elektronen.^[116] Deshalb sind die beiden Arten von Signalverstärkung immer gleichzeitig aktiv; welche von ihnen überwiegt, hängt von Faktoren wie der Art des Radikals, der Konzentration und den Relaxationseigenschaften ab.

Auf Grundlage dieser Überlegungen ist klar, dass es für einen großen DNP-Effekt vorteilhaft ist, wenn entweder die EPR-Linie scharf und damit einfach zu sättigen ist (für SE-DNP) oder wenn es Paare gekoppelter Spins gibt (für CE-DNP). Unabhängig davon sollten die Radikale homogen über die Probe verteilt sein, weshalb man mit amorphen oder glasartigen Festkörpern arbeitet. In einigen Forschungsgruppen werden neue Moleküle für die Polarisation sowie Verfahren zur Probenpräparation entwickelt, die diese Anforderungen erfüllen.^[129,130] Kohlenstoff-zentrierte Radikale mit scharfen Linien wie das Tritylradikal^[131] und 1,3-Bisdiphenyl-2-phenylallyl (BDPA)^[132] werden häufig verwendet, um den SE-DNP-Effekt insbesondere bei kryogenen Temperaturen zu nutzen; aber auch 2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl (TEMPO)^[133] und sogar Metallionen mit niedrigem Spinmoment wurden als polarisierende Moleküle für SE-

DNP genutzt.^[134,135] Wegen der niedrigen Anforderungen an die eingestrahlte Leistung für einen effizienten CE-DNP-Effekt ist der Einsatz von Biradikalen sehr vielversprechend für Anwendungen an Biomolekülen und Materialien.^[136] Mit Biradikalen wie TOTAPOL^[136] und AMUPOL^[137] konnten gute Verstärkfaktoren bei 80 K erzielt werden. Für die DNP-Anwendung werden diese Radikale typischerweise in glasartigen Lösungsmitteln wie DMSO/Wasser oder Glycerin/Wasser gelöst, die beim Einfrieren zu einer amorphen Phase eine Segregation des Radikals/Biradikals von der flüssig-amorphen Phase verhindern.^[102] Bemerkenswerterweise können auch die Wechselwirkungen zwischen den Biomolekülen und den Radikalen, seien sie spezifisch oder unspezifisch, die Bildung von Körnern von Radikalen verhindern.^[138–141]

5.2. Apparative Aspekte der DNP-verbesserten MAS-NMR-Spektroskopie

Für die In-situ-Aufnahme einer Probe unter MAS-Bedingungen brauchen DNP-NMR-Experimente im Festkörper sowohl einen rf-Schwingkreis für die Akquisition der Kerninduktion als auch einen Mikrowellenschwingkreis, um Übergänge der Elektronen sättigen zu können. Zusätzlich muss die Probe kalt gehalten werden, um die Elektronen- und Kern-Relaxationszeiten zu verlängern. Dazu wird typischerweise Stickstoffgas, das auch für die Rotation der Probe gebraucht wird, bei 80 K verwendet. Unter diesen Bedingungen, bei denen die T_1 - und T_2 -Zeiten der Elektronen relativ kurz und die angewendeten Magnetfelder recht groß (≥ 9.4 T) sind, benötigt man für eine effiziente Sättigung des Elektronenspinsystems eine Mikrowellenquelle, die sowohl hochfrequent als auch leistungsstark ist. Griffin und Mitarbeiter am MIT haben Pionierarbeit bei der Verwendung von Cyclotronresonanzmasern (so genannten Gyrotrons) geleistet.^[101] Gyrotrons liefern sehr viel höhere Leistungen als die alternativen Gunn-Dioden oder Klystrone, und diese Leistung kann stabil für längere Experimente erzeugt werden. Eine Einschränkung für diese Quelle ist ihr vergleichsweise

geringer Abstimmungsbereich, was zur Folge hat, dass man das Feld und nicht die Frequenz dieser Quelle ändern muss, wenn man andere Radikale verwendet, z.B. BDPA statt TEMPO. Kürzlich konnte allerdings gezeigt werden, dass einige Gyrotrons auch abgestimmt werden können, wenn man verschiedene Kavitätsmoden auswählt.^[142] Allerdings bleibt abzuwarten, ob man mit diesen Neuerungen tatsächlich eine Abstimmbarkeit des Mikrowellensystems erreichen kann. Tycko et al. konnten zudem zeigen, dass die Anforderungen an die Mikrowellenleistung deutlich verringert werden können, wenn man unter stabiler Rotation bei 13–25 K die Relaxationszeiten verlängern kann.^[53,215]

Aus diesen Ausführungen wird klar, dass man für die biomolekulare Anwendung der DNP-MAS-NMR-Spektroskopie einen Pro-

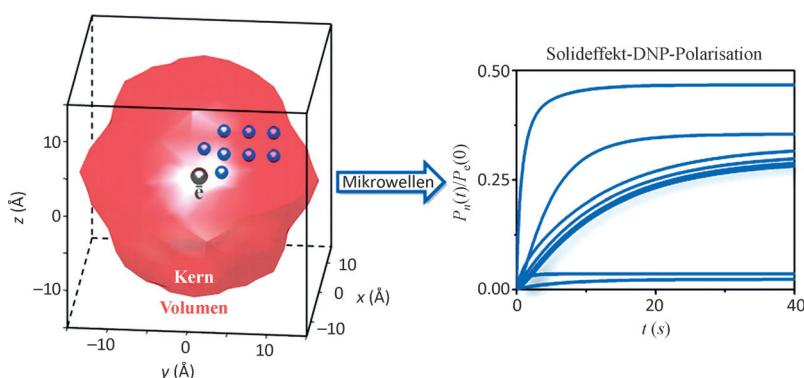


Abbildung 9. Solideffekt-DNP-Verstärkungsprofile, die für ein Modellsystem aus acht an ein einzelnes Elektron im Kernbereich gekoppelten Kernen (links im Bild) simuliert wurden. Die kleinen blauen Kugeln zeigen die relative Position der Spins an. Die Kurve auf der rechten Seite zeigt die Simulation der zeitlichen Progression der Polarisation durch Mikrowelleneinstrahlung.

benkopf braucht, in dem man gleichzeitig zwei bis drei Kernfrequenzen (z.B. ^1H , ^{13}C und ^{15}N) und zugleich auch die Elektronenspinresonanz des Radikals in der Probe anregen kann. Die zurzeit gebräuchlichen Probenkopftechnologien sehen vor, dass die Mikrowelle durch einen Wellenleiter mit geriffelten Wänden im Übermoden-Modus als Hybridmode vom Gryotron in den DNP-NMR-Probenkopf eingebracht wird.^[143] Der Wellenleiter endet in einer Apertur, die auf eine Öffnung im MAS-System gerichtet ist, sodass der Strahl radial auf die rf-Spule und den MAS-Rotor, der die zu untersuchende Probe enthält, auftrifft (Abbildung 10). Dreidimensionale Simulationen der Wellenverteilung des elektromagnetischen Feldes im Millimeterbereich^[144] ermöglichen es, die Elektroneneinstrahlung innerhalb des Rotors zu verstehen. Die an den Konturlinien annotierten Zahlen in Abbildung 11, links, geben die gemessenen Voltzahlen (in mV)

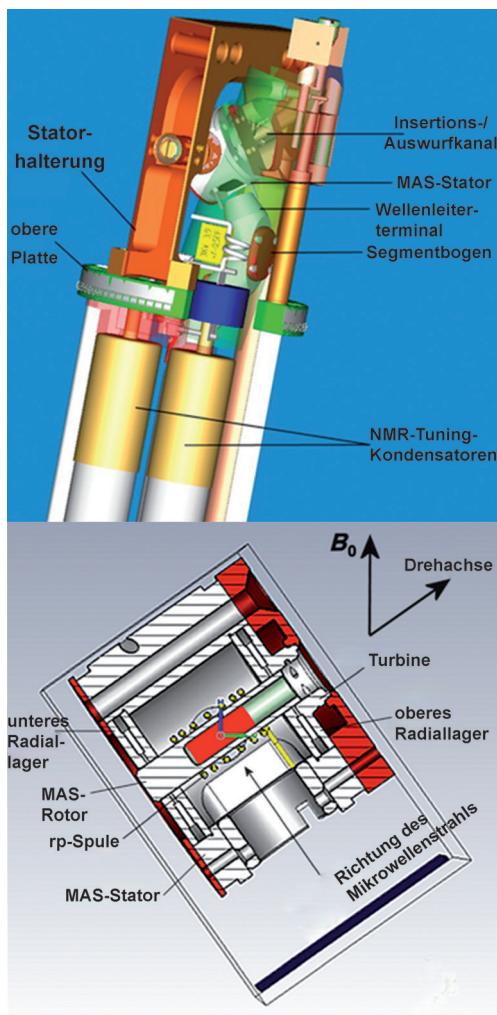


Abbildung 10. Oben: Computerzeichnung des Inneren eines DNP-MAS-Probenkopfs. Eingezeichnet sind das Ende des Wellenleiters sowie der MAS-Stator. Unten: Querschnitt durch einen MAS-Stator. Eingezeichnet sind die solenoidale NMR-Radiofrequenzspule, der MAS-Rotor und der Raum für die Probe. Im Koordinatensystem ist die y-Richtung parallel zum MAS-Rotor und der Spulenachse ausgerichtet, während die z-Richtung die Richtung für den einfallenden Millimeterwellenstrahl andeutet.

an, die gut mit den berechneten Werten übereinstimmen (Abbildung 11, rechts). Diese Simulationen zeigen, dass dielektrische Materialien wie Zirconoxid oder Saphir, die man als Materialien für MAS-Rotoren verwendet, den einfallenden Mikrowellenstrahl signifikant brechen. Sogar die dielektrischen Eigenschaften der DNP-NMR-Probe, die aus einer gefrorenen Glycerin/Wasser-Mischung besteht, können zu solchen Effekten führen. Dementsprechend ist klar, dass man noch viel lernen muss, um die Einbringung von Mikrowellen unter diesen Bedingungen zu optimieren.

5.3. Physikalisches Prinzip und Eigenschaften der Verdünnungs-ex-situ-DNP-NMR-Spektroskopie

DNP-NMR-Spektroskopie wird traditionell bei hohen Magnetfeldern unter kryogenen Bedingungen durchgeführt. Eine bahnbrechende Neuerung, die diese Art von DNP in den Bereich der hochauflösenden NMR-Spektroskopie in Lösung und in die In-vivo-MRI/MRS einführte, war die Entwicklung eines Verdünnungsprozesses, der eine gefrorene Probe mit sehr hoch polarisierten Kernspins in eine Lösung bei Raumtemperatur überführt, in der Kerne mit ausreichend langen longitudinalen Relaxationszeiten ihre enormen Polarisierungen behalten (Abbildung 12).^[104] Dieser Verdünnungsprozess ist irreversibel und läuft in der Art ab, dass man eine heiße Lösung, z.B. überhitztes Wasser, auf die gefrorene Probe gibt, um sie zu schmelzen. Die resultierende Lösung wird aus dem Polarisator unter Verwendung von Heliumgas unter hohem Druck herausgetrieben, aufgefangen und anschließend in ein NMR-Probenröhrchen, ein Tier oder einen Menschen injiziert. Diese „Verdünnungs-DNP“ wurde genutzt, um Kerne wie ^1H , ^6Li , ^7Li , ^{13}C , ^{15}N , ^{89}Y , ^{87}Rb sowie ^{107}Ag und ^{109}Ag zu polarisieren,^[104, 145–151] wobei die Kernpolarisation in Lösung um Faktoren zwischen 1000 und 50000 gegenüber der thermischen Polarisation bei Raumtemperatur, die in Standard-Magnetfeldern in der hochauflösenden NMR-, MRS- und MRI-Spektroskopie erzielbar ist, verstärkt werden konnte. Dementsprechend liegt die Anwendung dieser Technik, auch wenn man keine Signalmittelung durchführen kann, darin begründet, dass wegen der drastischen Empfindlichkeitssteigerung eine solche Signalmittelung gar nicht mehr nötig ist.

Im Unterschied zur DNP-MAS-NMR-Spektroskopie im Festkörper ist die Verdünnungs-DNP inhärent eine Ex-situ-Methode. Die Feldstärke wie auch die Temperatur, bei der der DNP-Prozess stattfindet, können deshalb unabhängig von den Parametern gewählt werden, die man für die NMR-Messungen nach der Verdünnung benötigt. Diese Flexibilität ermöglicht es, unterschiedliche Kombinationen von Temperaturen und Magnetfeldern zu wählen, um die höchste Polarisation für einen speziellen Zeitbereich zu erzielen. Typische Parameter sind z.B. ein Feld zwischen 3 und 7 T und eine Temperatur von 1–2 K.^[62–67] Unter diesen Bedingungen ist die Elektronenpolarisation nahezu 1, und Kernpolarisationen von 0.1–0.5 kann man innerhalb einiger Stunden erzeugen. Der Ex-situ-Ansatz führt natürlich auch dazu, dass die NMR-Geräte eine sekundäre Rolle für den Polarisationsprozess spielen und dass nur sehr einfache Spulen zur Verfolgung des

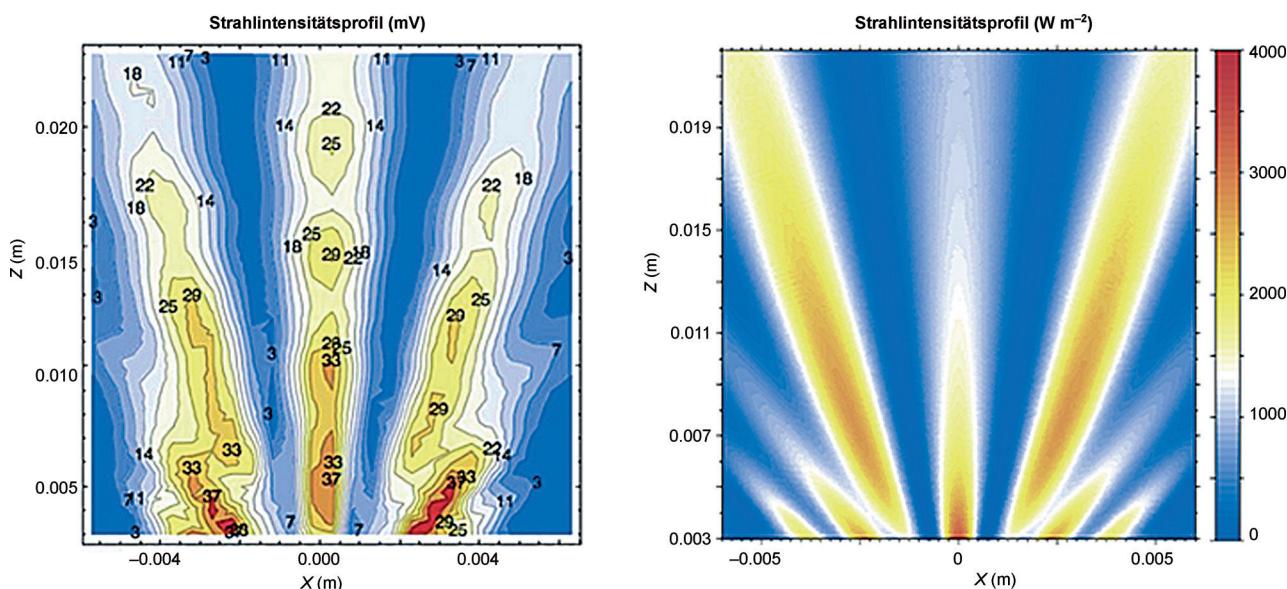


Abbildung 11. Vorwärtsstreuung eines Millimeterwellenstrahls (unter Annahme einer Gauß-Intensitätsverteilung, der Hybridmode HE11, und eines linear polarisierten Strahls) in einem MAS-Rotor mit einem Außendurchmesser von 3.2 mm. Der MAS-Rotor ist aus Zirconkeramik, und die Welle hat eine Frequenz von 263 GHz, was einer Wellenlänge von 1.13 mm entspricht. Gezeigt ist die Streuung in der Ebene des einfallenden Strahls, orthogonal zur Rotorenachse. Der Rotor befindet sich außerhalb des Sichtfeldes (unterhalb der unteren Kante der dargestellten Feldebene), und die Welle propagiert vom unten nach oben entlang der z-Achse. Links: experimentell bestimmter Absolutwert des elektrischen Felds. Rechts: simulierte Feldverteilung (Absolutwert des „Poynting“-Vektorfeldes). Die Messung und die COMSOL-Simulationen wurden von E. de Rijk (EPFL) durchgeführt und mit der Software SWISSto12 berechnet.

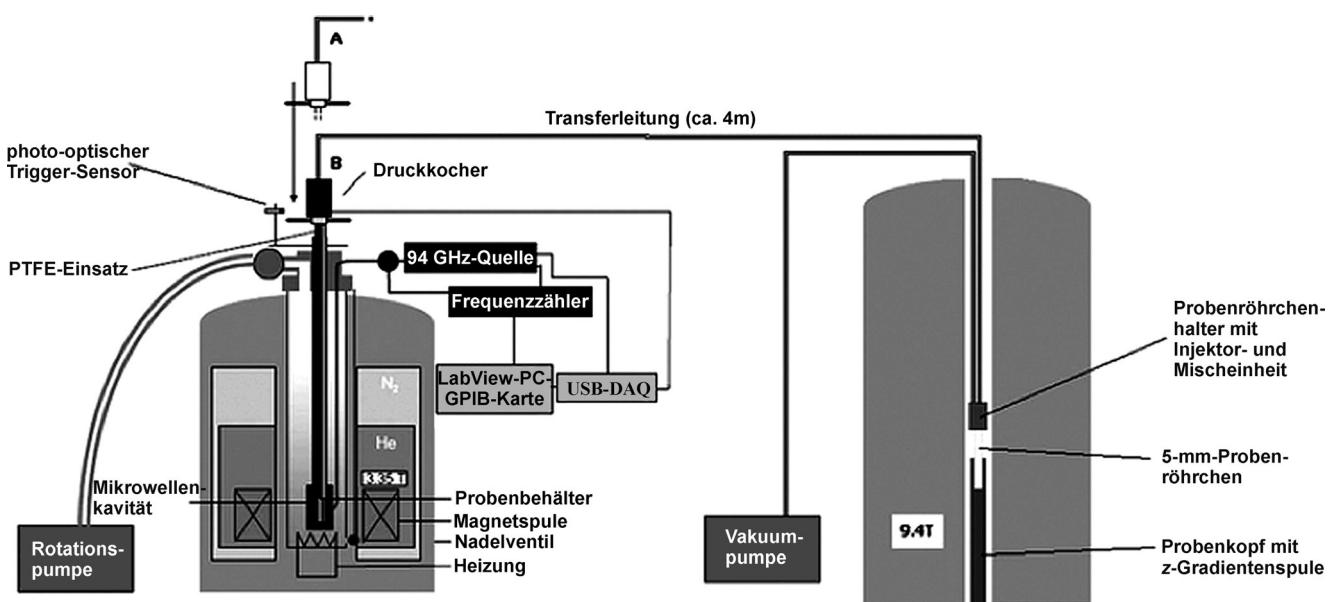


Abbildung 12. DNP-System mit Transferleitung, installiert an einem 400-MHz-NMR-Spektrometer. Die Position des Verdünnungsstäbels ist vor (A) und nach Verdünnung (B) eingezeichnet. Die gefrorene Lösung wird in einem Magneten bei 3.35 T bestrahlt und so schnell wie möglich nach Aufbau des DNP-Effekts bei tiefer Temperatur in das Hochfeldsystem für NMR-Messungen (rechts) mittels heißem Lösungsmittel und Heliumgas zum Druckaufbau transferiert. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [165].

Aufbaus der Polarisation mittels Kleinwinkelanregung notwendig sind. Eine Ausnahme sind Anwendungen, bei denen der Aufbau von ^{13}C -Polarisation durch ^1H - ^{13}C -Kreuzpolarisationsschemata erzielt werden soll.^[152] Hier werden Schwingkreise mit hoher Leistung, die auf zwei Frequenzen abgestimmt werden können, benötigt werden.^[153, 154] Die niedrigen Temperaturen, bei denen das DNP-Experiment

durchgeführt wird, verringern ebenfalls signifikant die Anforderungen an die Mikrowellenleistung; in den meisten Fällen genügen typischerweise ca. 100 μW anstelle der mehreren zehn Watt, wie sie von Gyrotrons geliefert werden.^[155]

Der Fest-nach-flüssig-Phasenübergang und der damit verbundene Transfer der polarisierten Flüssigkeit aus der Polarisationsapparatur in das NMR-Spektrometer schränkt

die möglichen Vorteile der Verdünnungs-DNP-Spektroskopie auf solche Kernspins ein, die relative lange Polarisationslebenszeiten mit T_1 -Zeiten im Bereich mehrerer Sekunden aufweisen. Zu bedenken sind dabei die magnetischen Felder, die während des Transfers von der Polarisationsapparatur in das NMR-Spektrometer herrschen, wie auch die vorherrschenden Magnetfelder im NMR-Spektrometer, während die Probe ins Probenröhren eingefüllt wird, oder auch im Kernspintomographen, während ein polarisierter Metabolit in ein Gewebe perfundiert und dort im untersuchten Organ metabolisiert wird. Nach der Verdünnung der Probe und während der weiteren Probentransferschritte zerfällt die Hyperpolarisation der Kern zurück zum Gleichgewichtszustand. Wie lange diese Hyperpolarisation ausreichend groß ist, um mit der normalen akkumulierten Akquisition zu konkurrieren, ist abhängig von den Eigenschaften der untersuchten funktionalen Gruppe, vom Molekulargewicht der Probe, von deren globaler und interner Dynamik sowie vom Magnetfeld und von der Temperatur. Die auf Relaxation basierenden Verluste sind besonders stark bei ^1H mit hoher Spindichte und für große Moleküle, wie Polypeptide, Nukleinsäuren und Polymere. Solche Systeme sind typischerweise ungeeignet für eine Verstärkung der Polarisierung mittels Verdünnungs-DNP. Die Erhöhung der Temperatur verlängert typischerweise die Relaxationszeiten kleiner Moleküle, allerdings ist dies bei biomolekularen und In-vivo-Studien nicht immer möglich. Eine Verbesserung auf Grundlage einer kleinen chemischen Änderung beruht auf einer Deuterierung der Probe, wodurch die dipolare Kernrelaxation verringert wird. Die Abtrennung oder Neutralisierung der polarisierenden Radikale führt manchmal ebenfalls zu einer Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit und vermindert dadurch die durch den Probentransfer induzierten Verluste.^[132, 156–158] Man kann auch die Signale von Kernspins mit kurzen longitudinalen T_1 -Zeiten verstärken oder beobachten, indem man einen Polarisationstransfer von hyperpolarisierten Kernspins mit langen longitudinalen T_1 -Zeiten herbeiführt.^[150, 159, 160] Solche Methoden können möglicherweise die Empfindlichkeit und Auflösung sogar *in vivo* verbessern.^[161] Weitere Verbesserungen könnten darauf aufbauen, dass man langlebige, Singulett-artige Spinzustände nutzt,^[162] deren T_1 -Zeiten deutlich länger sind als die der Einzelspin- T_1 -Zeiten. Für chemische oder biomolekulare Anwendungen an schnell relaxierenden Molekülen sollte die Entwicklung supraleitender Magnete, die für Verdünnungs-DNP-Spektroskopie ausgelegt sind, die beste Lösung sein. Solche supraleitenden Magnete müssten zwei homogene Feldzentren aufweisen, eines für DNP und ein weiteres für die NMR-Spektroskopie. Dann kann der Probentransfer innerhalb von wenigen hundert Millisekunden zwischen diesen beiden Zentren stattfinden, was eine breite Palette von bahnbrechenden Experimenten ermöglichen sollte.^[163] Allerdings muss man dabei stets mögliche Probleme bezüglich der Proben bedenken, wie Kältedenaturierung von biomolekularen Proben sowie Löslichkeits- oder Präzipitationsprobleme. Diese treten speziell dann auf, wenn man mit hochkonzentrierten Lösungen (100–1000 mM) arbeitet, wie sie normalerweise für die Ex-situ-Hyperpolarisation verwendet werden.

Eine weitere allgemeine Eigenschaft des irreversiblen Zerfalls der hart erarbeiteten DNP-Hyperpolarisation ist, dass man nur Einzeltransient-NMR-Spektren oder wenige NMR-Experimente mit Anregung mit einem kleinen Flipwinkel mit Verdünnungs-DNP verbinden kann. Dies macht es sehr schwierig, hyperpolarisierte 2D-NMR-Akquisition durchzuführen, wie sie typischerweise bei der biomolekularen NMR-Spektroskopie angewendet wird. Ein vielversprechender Ansatz liegt in der Verwendung der so genannten Ein-Experiment-„ultrafast“-2D-NMR-Spektroskopie von hyperpolarisierten Verbindungen; 2D-Spektren von hyperpolarisierten flüssigen Proben bei Konzentrationen unterhalb des μM Bereichs können dann innerhalb von 0.1 s aufgenommen werden.^[145, 164, 165] Auch mit anderen Methoden kann man Korrelationsinformation indirekt erhalten, z.B. durch 1D-Akquisition unter Anwendung von Entkopplungen außerhalb der Resonanz (off-resonance decoupling);^[166] diese Methoden sind einfach aufzusetzen, haben aber nicht die Vorteile der 2D-Spektroskopie. Auf dem jetzigen Stand der Entwicklung scheint sich abzuzeichnen, dass Verdünnungs-DNP nicht in der Lage sein wird, die komplexesten Sequenzen aus dem Methodenrepertoire der mehrdimensionalen modernen NMR-Spektroskopie zugänglich zu machen. Deshalb sollte man Verdünnungs-DNP nicht als Konkurrenz zu bestehenden Methoden betrachten, sondern als synergistische Komponente für konventionelle hochauflösende NMR-Methoden zur biomolekularen Charakterisierung.

5.4. Anwendungen der Verdünnungs-DNP in der Chemie, Biochemie und Medizin

Der Hauptanwendungsbereich der Verdünnungs-DNP liegt zurzeit in der Präparation von hyperpolarisierten Substraten für die Durchführung metabolischer NMR-spektroskopischer Studien *in vivo* sowohl beim Magnetresonanztomography (MRI) als auch bei der Magnetresonanzspektroskopie (MRS). Der kurzen Lebensdauer der hyperpolarisierten Spinzustände zum Trotz ist die Anwendung dieser Technik als diagnostisches Hilfsmittel, z.B. zum Verfolgen des Ansprechens auf therapeutische Maßnahmen in der Krebsforschung und Kardiologie, gut in präklinischen Studien dokumentiert worden.^[167, 168] In den letzten Jahren wurde Verdünnungs-DNP erstmals auch in Studien am Patienten eingesetzt.^[169] Diese beeindruckende Entwicklung ist durch einen multidisziplinären Ansatz bezüglich der Ausrichtung und Durchführung charakterisiert; sie umfasst zahlreiche Pulssequenzentwicklungen^[170–174] und führte zu biologischen Erkenntnissen, die zu zahlreich sind, um sie in diesem biomolekularen fokussierten Aufsatz aufzählen zu können.

Die Verdünnungs-DNP ermöglicht auch wichtige Anwendungen auf dem Gebiet der hochauflösenden NMR-Spektroskopie. Sie ist sehr gut geeignet, transient auftretende Moleküle in chemischen oder biochemischen Reaktionen, die weit entfernt vom Gleichgewicht ablaufen, zu charakterisieren. Um die Polarisationsverluste bei der Beobachtung transienter Zustände zu minimieren, nutzt ein Ansatz schnelle Probeninjektionsapparaturen, mit denen man unter Verwendung der Verdünnungs-DNP-Apparaturen auch Kern-

spins mit T_1 -Zeiten unterhalb von Sekunden beobachten kann.^[175] Ein solcher Ansatz könnte z.B. für die Untersuchung neuer Wirkstoffe, die schnell zu Proteintargets injiziert werden, nützlich sein. Eine Reihe von Untersuchungen hat deshalb die Hyperpolarisation möglicher Liganden mittels Verdünnungs-DNP genutzt, um Bindung oder sogar Bindungskonstanten durch die Änderung der Relaxations- und Kreuzrelaxationsparameter zu detektieren.^[176,177] Von einem technischen Standpunkt aus mögen solche Studien geradezu ideal für die Verdünnungs-DNP sein, denn hier stellen weder die notwendige Verdünnung der Probe noch der Einzelexperimentcharakter der Methode signifikante Einschränkungen dar. Ähnliche Vorteile könnten sich auch bei der Bestimmung der Kinetik chemischer und biochemischer Reaktionen ergeben, z.B. bei der Protein- und RNA-Faltung. Die Aufnahme eines Zeitverlaufs einer Enzym-katalysierten Reaktion konnte mit Verdünnungs-DNP an einer einzigen hyperpolarisierten Probe durchgeführt werden,^[178] was eine Unterscheidung zwischen Ausgangsverbindungen und Produkten auf Basis ihrer unterschiedlichen chemischen Verschiebungen erlaubte. Die Verfügbarkeit von maßgeschneiderten Verdünnungsapparaturen ermöglichte sogar substanzelle Hyperpolarisationen und die Detektion transienter Proteinsignale. Diese Proteine können z.B. im entfalteten Zustand hyperpolarisiert und anschließend in eine NMR-Messzelle im Spektrometer injiziert werden, um so Rückfaltung, z.B. durch pH-Sprung, zu induzieren.^[179,180]

5.5. In-situ-DNP-NMR-Spektroskopie in Lösung

Flüssigkeiten können auch direkt polarisiert werden, und nicht nur durch Anwendung der Verdünnungs-DNP. Dies ermöglicht die Signalmittelung durch schnelle Wiederholung der Aufnahme, da die Probe ja in ihrem ursprünglichen Zustand verbleibt. Im Unterschied zu den DNP-Mechanismen im Festkörper wird DNP in Lösung durch Kreuzrelaxationsprozesse zwischen Elektronen und Kernen getrieben, ähnlich wie in Metallen, in denen der Prozess zuerst theoretisch vorhergesagt^[181] und experimentell beobachtet wurde.^[100] In Analogie zum NOE nennt man diesen Mechanismus in Lösung auch Overhauser-DNP. In den meisten Fällen wird die Kreuzrelaxationsgeschwindigkeit zwischen dem DNP-Radikal und dem untersuchten Molekül von der magnetischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen dem Elektron und dem Kernspin dominiert. Um effiziente Polarisationstransfergeschwindigkeiten zu erreichen, muss diese Wechselwirkung auf einer Zeitskala moduliert werden, die der Larmor-Frequenz der Elektronenspins entspricht.^[182] Für kleine, in Wasser gelöste organische Radikale liegen die Rotations- und Diffusionskorrelationszeiten bei Raumtemperatur bei einigen zehn Pikosekunden; dies führt zu einem starken Einbruch der spektralen Leistungsdichten und somit der DNP-Effizienz bei Larmor-Frequenzen der Elektronenspins von ungefähr 34 GHz, was einer Feldstärke von ungefähr 1 T entspricht. Overhauser-DNP wurde deshalb bei Magnetfeldern ≤ 0.5 T be-

obachtet und in biologischen Untersuchungen genutzt, um die lokale Hydratationsdynamik innerhalb komplexer molekularer Systeme und um diese herum zu untersuchen: Durch die Quantifizierung der beobachteten Hyperpolarisation des Wassers kann man mit guter Genauigkeit und Empfindlichkeit auf die Translationszeitkonstanten des hydratisierten Wassers an den Orten der Spinsonden schließen.^[183,184] Dennoch glaubte man lange Zeit, dass DNP in Lösung bei Magnetfeldern oberhalb 1.5 T zu vernachlässigbaren Verstärkungen führt. In den letzten Jahren konnte aber eine Reihe von Gruppen zeigen, dass man substanzelle Overhauser-DNP-Verstärkungen auch bei Magnetfeldern zwischen 3.4^[185–188] und 9.2 T beobachten kann.^[189–191] Mit einem TEMPOL-Nitroxidradikal konnten in flüssigem Wasser Protonpolarisationsverstärkungen von -165 bei 3.4 T mit einer Radikalkonzentration im Bereich von 20–100 mm (Abbildung 13 A,B)^[188] sowie von -83 bei 9.2 T mit einer Radikalkonzentration im Bereich von 20–1000 mm^[191] (Abbildung 13 C) erzielt werden. Diese Verstärkungen wurden am Siedepunkt der Lösung oder oberhalb davon infolge des Anstiegs der Temperatur durch die Mikrowellenerwärmung erzielt.

Um den zugrunde liegenden Mechanismus quantitativ verstehen zu können, wurde eine detaillierte Analyse durchgeführt, um alle für den Prozess relevanten Parameter zu erfassen. Einer dieser Parameter ist das Ausmaß der Sättigung des Elektronenübergangs, der von der Elektronenrelaxationsrate und der Heisenbergaustauschrate abhängt.^[187,188,192] Annino et al. konnten eine vollständige Sättigung bei Leistungen von ungefähr 100 μW bei 95 GHz in einem neuen nichtstrahlenden Resonator erreichen (Abbildung 14).^[193] Neugebauer et al. nutzten die beobachtete Auflösung der chemischen Verschiebung, die man bei 9.2 T erzielen kann, um die Unterdrückung der paramagnetischen ^1H -NMR-chemischen Verschiebung nach Mikrowelleneinstrahlung zu messen.^[191] Die relevanten Korrelationszeiten

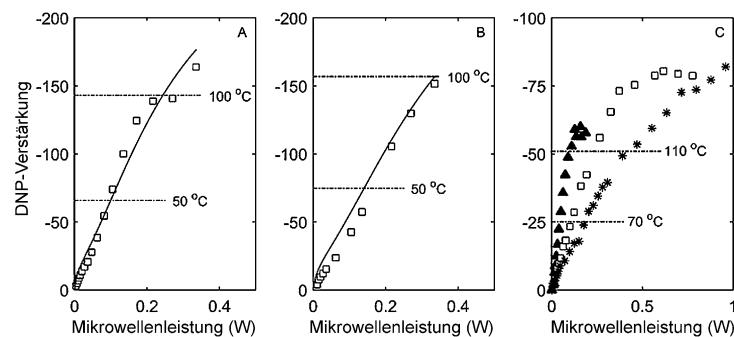


Abbildung 13. DNP-Verstärkung bei 3.4 T als Funktion der eingestrahlten Mikrowellenleistung (94 GHz, Leistung in W) für Wasser und TEMPOL in einer Konzentration von 20 mm (A) bzw. 100 mm (B). Die durchgezogene Linie entspricht den theoretischen Vorhersagen auf der Basis von Parametern, die unabhängig mittels EPR und Relaxometriemessung bestimmt wurden (siehe van Bentum et al.^[188]). C) DNP-Verstärkung bei 9.2 T als Funktion der eingestrahlten Mikrowellenleistung für eine 1 m Lösung von ^{14}N -TEMPOL in Wasser für drei unterschiedliche Kapillargrößen: 50 (\blacktriangle), 30 (\square) und 20 μm (\star) Innendurchmesser. Die Temperaturzunahme wird durch die gestrichelten horizontalen Linien ange deutet, die die Kurven bei den angegebenen Temperaturen kreuzen. Adaptiert aus Lit. [191].

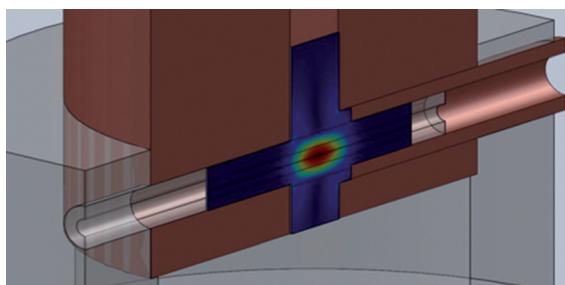


Abbildung 14. Doppelresonanzstruktur, wie sie von Annino et al. für In-situ-NMR- und DNP-Anwendungen unter Verwendung eines nicht-strahlenden Hochumwandlungsresonators genutzt wird.^[193]

sind ein weiterer wichtiger Parameter. Es wurde lange kontrovers diskutiert, ob die Relaxometriedaten, die man zur Charakterisierung solcher Dynamik auf mikroskopischem Niveau nutzt,^[191,192,194] mit den beobachteten DNP-Verstärkungen bei hohem Feld konsistent sind. Innerhalb des Overhauser-DNP-Mechanismus sollten die beiden unterschiedlichen Datensätze vom gleichen Relaxationsmechanismus abhängen. Die In-situ-DNP-Messungen bei 3.4 und 9.2 T an TEMPOL/Wasser-Mischungen konnten zeigen, dass beide Datensätze konsistent sind, wenn man bei der Analyse der ¹H-Relaxometriedaten, die bei Feldern zwischen 0.01 MHz Larmor-Frequenz der Protonen bis zu hohen Magnetfeldern gemessen wurden, den Effekt der Relaxation in Wasser-Radikal-Komplexen mitberücksichtigt.^[188,191] Das resultierende Modell kann die paramagnetische Relaxation und die DNP-Verstärkung des Wassers für unterschiedliche Radikalkonzentrationen und Temperaturen voraussagen. Der Haupteffekt, der die beobachteten DNP-Verstärkungen erklärt, liegt in der substanzialen Herabsetzung der Diffusionskorrelationszeit des Wassers von ungefähr 20–30 ps bei Raumtemperatur auf einige wenige Pikosekunden nahe dem Siedepunkt. Unter der Bedingung schneller Mobilität leistet Doppelquantenrelaxation, die für den Overhausereffekt verantwortlich ist, einen signifikanten Beitrag auch bei den recht hohen Magnetfeldern von 3.4 oder 9.2 T. Ähnliche Untersuchungen zeigen gleiche Effekte auch für andere Lösungsmittel. Selbst für Ethanol führt die verminderte Mobilität, die auf der Bildung eines gebundenen Komplexes beruht, zu Verstärkungen, wenn auch weniger stark als im Fall des Wassers. Messungen an unpolaren Lösungsmitteln zeigten, dass wahrscheinlich noch weitere dynamische Moden zusätzlich zur Translationsdiffusion zu den hohen DNP-Verstärkungen bei 9.2 T beitragen.^[195] Moleküldynamiksimulationen^[196,197] könnten weitere Einblicke in die spezifischen Dynamikmoden liefern, die für die Kreuzrelaxation bei hohen Frequenzen verantwortlich sind.

Ein Nachteil der In-situ-DNP-Experimente in Lösung bei hohen Magnetfeldern ist, dass sie auf kleine Probenvolumina beschränkt sind. Zwar kann eine beträchtliche Polarisation des Wassers bei hohen Magnetfeldern erreicht werden, jedoch sind die dielektrischen Verluste in Wasser sehr groß. Dies limitiert die Eindringtiefe der Mikrowelle, weshalb Polarisationen bei hohen Feldern nur an Probenvolumina im Nanoliterbereich innerhalb einer Resonanzkavität möglich sind, die die Absorption der elektrischen Feldkomponente

der Mikrowellenstrahlung umgeht. Dieses Prinzip kann auf der einen Seite für die NMR-Detektion bei mikrofluidischen Anwendungen genutzt werden, auf der anderen Seite limitiert es allerdings stärker biomolekulare Anwendungen. Ein weiterer Ansatz ist, die Probe bei niedrigerem Feld zu polarisieren, bei dem die Probengröße geringere Einschränkungen aufweist, um sie danach ins Hochfeld-NMR-Detektionsystem zu transferieren.^[194,198] Diese „Shuttle“-DNP-Implementierungen führen Overhauser-DNP-Verstärkungen bei einem niedrigen Feld (0.35 T) aus, bei dem es einfach ist, Radikale wie TEMPOL zu sättigen, die nachfolgend effizient ihre Magnetisierung auf benachbarte Protonen übertragen. Im Anschluss wird die Probe ins hohe Magnetfeld für die finale Detektion der NMR-Signale transferiert. Der Transport der Probe (das „Shutteln“) erfolgt über eine Pneumatik (Abbildung 15). Dabei muss der Abstand zwischen dem Ort mit hohem und mit niedrigem Feld minimiert werden, und das B_0 -Feld muss monoton zwischen den beiden Positionen ansteigen.^[199] Auch wenn dieses Vorgehen zu hohen Verstärkungen bei niedrigen Magnetfeldern führt, reduzieren sich die Gewinne abhängig vom Verhältnis der Stärken des Polarisations- und des Detektionsfelds und werden vermutlich weiter durch den Transportprozess verringert.^[186,194,200]

Dennoch kann man mit diesem Ansatz eine Multiexperimentmittlung durchführen, und DNP-Verstärkungen von –2.4 konnten für die Protonensignale der Aminosäure Tryptophan beobachtet werden (Abbildung 16A). Unter Einbeziehung der Gesamtzeit erhält man dann Verstärkungs-

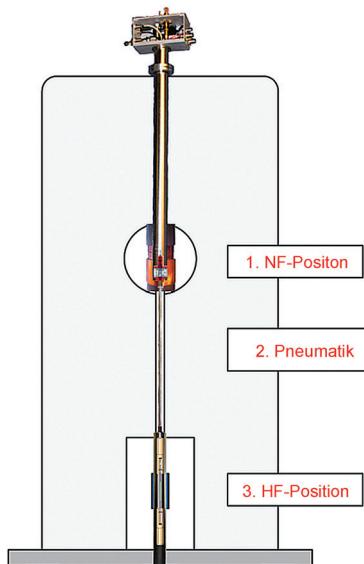


Abbildung 15. Transfer-DNP-Spekrometer, in dem eine Niedrigfeldposition (NF; 0.34 T) 47 cm oberhalb der Hochfeldposition (HF; 14.1 T) konstruiert ist. Am Ort des niedrigen Felds kann die Probe mit Mikrowellen bestrahlt werden, um den DNP-Effekt aufzubauen, während sich am Ort des höheren Felds die rf-Spule für die NMR-Detektion befindet. Die Probe wird innerhalb von 60 ms über eine Pneumatik zwischen diesen beiden Orten transferiert, wobei eine Genauigkeit der Probenpositionierung von 50 µm erreicht wird. Die Aufnahme der ¹H- und ¹³C-NMR-Signale unter Nutzung eines ²H-Lock-Systems geschieht am Hochfeldort, nachdem der Probenbehälter diese Position erreicht hat.

faktoren von -4 .^[201] Kürzlich wurde auch die ^{13}C -Verstärkung im DNP-Shuttle-Spektrometer an folgenden Proben untersucht: $^{[13\text{C}_11, 15\text{N}_2]}$ -Tryptophan sowie $[\text{D}_8, ^{13}\text{C}_{11}, ^{15}\text{N}_2]$ -Tryptophan (Abbildung 16B). Während im ersten Fall nur die Carbonylresonanzen des Tryptophans eine negative Verstärkung zeigen, wie man es für einen direkten Overhauser-Effekt durch Translations- und Rotationsdiffusion des Radikals relativ zum ^{13}C -Spin im Molekül erwartet, zeigen die anderen Kohlenstoffspins eine positive Verstärkung, die, wenn es sich um einen direkten Effekt handelte, auf einen skalaren Transfer zwischen Kohlenstoffkernen und Elektronen schließen ließe. Hierbei muss man sich allerdings vor Augen halten, dass auch die Protonen im Tryptophan polarisiert werden und dass die Kombination eines positiven $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Kern-Overhauser-Effekts (NOE) mit einem Elektron- ^1H -Overhauser-Effekt auch zu einer Verstärkung der ^{13}C -Magnetisierung mit gleichem Vorzeichen wie jenem der Boltzmann-Magnetisierung führen kann. Nach Austausch aller Protonen durch Deuteronen wird dieser dominante Magnetisierungstransferweg unterdrückt. Dann zeigen alle ^{13}C -NMR-Resonanzen negative Verstärkung (Abbildung 16B). Dies lässt stark darauf schließen, dass tatsächlich der durch den Raum vermittelte Overhauser-Effekt zwischen Elektronen und Kohlenstoffspins ausschlaggebend ist. Eine Analyse dieser Prozesse auch in Biomolekülen, die noch größer als Tryptophan sind, befindet sich in Planung.

5.6. Alternativen der Spinausrichtung: Kern-Hyperpolarisation mithilfe von *para*-Wasserstoff und optischem Pumpen

Ein Polarisationstransfer ausgehend von ungepaarten Elektronen ist nicht die einzige Möglichkeit, um eine Hyperpolarisation des Kerns zu erzielen – eine andere Quelle für Polarisation bietet H_2 . Bei Raumtemperatur kommt Wasserstoff in zwei isomeren Formen vor, dem *ortho*- und dem *para*-Wasserstoff, die im statistischen Verhältnis von 3:1 vorliegen.^[202] Diese beiden Formen unterscheiden sich in der Anordnung der beiden ^1H -Kerne im Molekül, was auf der Korrelation der Molekülform und der Protonenspinzustände unter dem Einfluss der Antisymmetrie der Molekülwellen-

funktion beruht. *ortho*- H_2 mit der symmetrischen Triplettausordnung im Kern ist assoziiert mit einer antisymmetrischen Rotationswellenfunktion, während *para*- H_2 mit der antisymmetrischen ($|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle$)/ $\sqrt{2}$ -Singulettanordnung im Kern in Molekülen mit symmetrischer Rotationswellenfunktion auftritt. Von den Wasserstoffrotationszuständen hat der symmetrische $J=0$ -Zustand die niedrigste Energie. Deshalb findet man bei tiefen Temperaturen die Singulett-Wellenfunktion von *para*- H_2 bevorzugt. Während *para*-Wasserstoff selbst keinen Spindrehimpuls aufweist und deshalb im NMR-Spektrum zu keinem Signal führt, kann es als chemisches Reagens genutzt werden, das nach einer Reaktion zu Reaktionsprodukten führt, die eine Nicht-Boltzmann-Verteilung der Kernspins mit einem hohen Ausmaß an Spinausrichtung aufweisen. Dies passiert immer dann, wenn die beiden Spins des unsichtbaren ($|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle$)/ $\sqrt{2}$ -Zustands plötzlich unterscheidbar werden, z. B., wenn die beiden Wasserstoffatome an zwei chemisch nicht äquivalente Positionen addiert werden. Auf diese Weise wird eine *para*-Wasserstoff-induzierte Polarisation (*para*-hydrogen induced polarization (PHIP)) erzeugt,^[203, 204] die zu Verstärkungen im 10 %-Bereich auf einfache, repetitive Art führt, was wiederum eine interessante Möglichkeit bietet, Kerne in geeigneten Zielmolekülen zu hyperpolarisieren. Mit dieser Methode konnte eine Reihe von organischen und biomolekularen Verbindungen durch Hydrierung hyperpolarisiert werden. Mehrere Übersichtsartikel zeigen die große Spannbreite der *para*-Wasserstoff-abgeleiteten Anwendungen auf.^[205–207]

Vor einiger Zeit konnte auch demonstriert werden, dass man *para*-Wasserstoff für die Hyperpolarisation einer wachsenden Anzahl organischer Substrate anwenden kann, indem man eine einfache und reversible Wechselwirkung an einem Metallzentrum nutzt. Bei diesem Prozess tauschen das Substratmolekül und der *para*-Wasserstoff in Lösung mit den Substratmolekülen und dem *para*-Wasserstoff, die im Komplex gebunden sind, aus, woraufhin sich die Konzentration an hyperpolarisiertem Produkt in Lösung erhöht. Diese Anwendung wurde Signalverstärkung durch reversiblen Austausch genannt (signal amplification by reversible exchange, SABRE),^[208] und sie kann typischerweise einen Polarisationstransfer in einem abgeschmolzenen NMR-Röhrchen

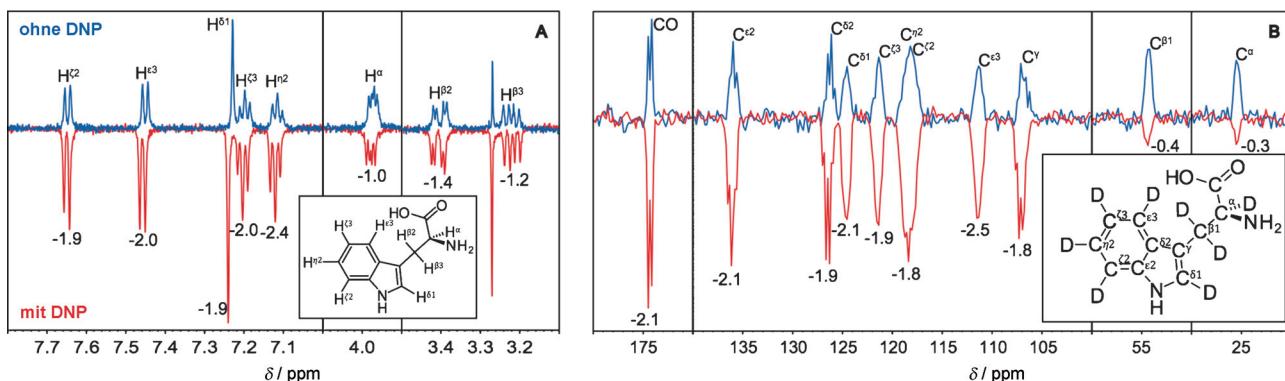


Abbildung 16. A) ^1H -Verstärkung von 10 mM Tryptophan in einer 10 mM $[\text{D}_{16}, ^{15}\text{N}]$ -TEMPONE-Lösung in 4.5 μL D_2O . Die Zeit zum Aufbau der Polarisation betrug 3 s ($T=52^\circ\text{C}$, 64 Experimente). B) ^{13}C -Verstärkung von 50 mM $[\text{D}_8, ^{13}\text{C}_{11}, ^{15}\text{N}_2]$ -Tryptophan in einer 10 mM $[\text{D}_{16}, ^{15}\text{N}]$ -TEMPONE-Lösung in 4.5 μL D_2O . Die Zeit zum Aufbau der Polarisation betrug 3 s ($T=52^\circ\text{C}$, 4096 Experimente). Alle Signale zeigen jetzt negative Verstärkung.

binnen 10–20 s erzielen. Schütteln des Probenröhrchens beschleunigt die Bildung des Dihydridkomplexes, der mit dem SABRE-Magnetisierungstransfer assoziiert ist; außerdem ist es wichtig, eine möglichst hohe effektive Konzentration des *para*-Wasserstoffs in Lösung während des Transfers durch schnellen Gasaustausch im Gasraum zu erreichen. Nach Schütteln wird die Probe schnell in das NMR-Spektrometer überführt, wo die NMR-spektroskopische Detektion erfolgt. Abbildung 17A zeigt die so aufgenommenen 1D-Spektren mit verbessertem S/R-Verhältnis. Multipulssequenzen, die Signalmittelung erfordern (wie 2D-COSY-NMR-Experimente), wurden ebenfalls mit der SABRE-Technik kombiniert (Abbildung 17B).

Eine letzte elegante Methode für die Hyperpolarisation besteht in der Bestrahlung von Proben mit sichtbarem Licht: Nutzt man zirkular polarisiertes Licht zur Erzeugung eines elektronisch angeregten Zustands, findet eine Selektion der Spinzustände statt. Diese Nichtgleichgewichtspolarisation induziert wie im Fall der DNP eine drastische Änderung der Kernspinpolarisation. Verstärkung der Kernpolarisation durch optisches Pumpen wurde zuerst und meistens für Alkalimetalle erreicht. In Alkalimetallen ist das äußere einzelne Valenzelektron stark an den Kernspin gekoppelt.^[209] Die

kohärente Polarisation dieses Elektrons durch eine geeignet polarisierte Lichtquelle kann dann auf den Kern übertragen werden. Die Elektronenspinpolarisation wird z.B. von Rubidium auf ein Edelgas wie ¹²⁹Xe übertragen, wobei die Hyperfeinwechselwirkung genutzt wird, die sich bei Kollision von ¹²⁹Xe-Atomen mit dem Alkalimetall aufbaut. Xenon ist ein interessantes Substrat, weil es typischerweise nicht in lebenden Organismen vorkommt, weil optisches Pumpen eine recht einfache Methode zur Erzeugung von Hyperpolarisation ist und weil es über einen breiten Bereich von chemischen Verschiebungen zur Resonanz kommt und damit ein genaues Reportersignal für die Änderungen in seiner Umgebung darstellt.^[210] Hyperpolarisiertes ¹²⁹Xe-Gas kann z.B. auch ohne Modifikation für die Bildgebung des Atmungsapparats genutzt werden, oder es kann als Biosensor eingesetzt werden, da Xenon sowohl in hydrophilen als auch in hydrophoben Lösungsmitteln gelöst werden kann.^[211] Es bleibt abzuwarten, wie viele dieser Möglichkeiten, die sich aus dem optischen Pumpen ergeben, tatsächlich Eingang in biomolekulare NMR-spektroskopische Studien finden werden.

6. Biomolekulare NMR-Spektroskopie: Perspektiven für Empfindlichkeitssteigerungen

Die NMR-Spektroskopie liefert Informationen über Strukturen und Dynamiken in einer herausragenden Zahl von Forschungsbereichen, die Einfluss auf vielfältige biochemische und biophysikalische Untersuchungen haben und in denen eine Vielzahl von Systemen studiert wird, darunter pharmazeutische Studien, die Profilierung metabolischer Prozesse sowie Untersuchungen von löslichen und unlöslichen Proteinen, Membranen und Nukleinsäuren, kristallinen und Membranproteinen sowie Proteinaggregaten und -fibrillen. Ungeachtet ihrer enormen Leistungsbilanz und der einzigartigen Möglichkeit, das Verhältnis von chemischer Struktur und biologischer Funktion zu beleuchten, steht die NMR-Spektroskopie vor zahlreichen Herausforderungen. Hier ist vor allem die niedrige Empfindlichkeit der NMR-Experimente zu nennen. Tatsächlich beruhen der nichtinvasive Charakter der NMR-Experimente und die außerordentliche atomare Auflösung auf den sehr geringen Energien bei dieser Magnet-basierten Spektroskopie. Diese sehr geringen Energien bilden auf der anderen Seite aber auch die Achillesferse der NMR-Spektroskopie, denn sie ist damit wesentlich weniger empfindlich als konkurrierende optische Methoden oder Methoden auf Grundlage elektrischer Felder. Es ist klar, dass diese Einschränkung einen Nachteil für die NMR-Spektroskopie im Wettbewerb mit anderen sich schnell entwickelnden spektroskopischen und mikroskopischen Methoden bedeuten wird, sollte es keine Fortschritte bei der Methodenentwicklung geben.

Die Gebiete, die man bei Verfügbarkeit höherer Empfindlichkeiten untersuchen könnte, lassen sich grob in zwei Szenarien unterteilen: Eines umfasst Proben, die im Prinzip langzeitstabil sind, deren intrinsische Empfindlichkeit aber eingeschränkt ist, entweder weil man Kerne mit kleinem gyromagnetischem Verhältnis untersucht oder weil die Löslichkeit eingeschränkt ist. Ein zweites umfasst Proben, die

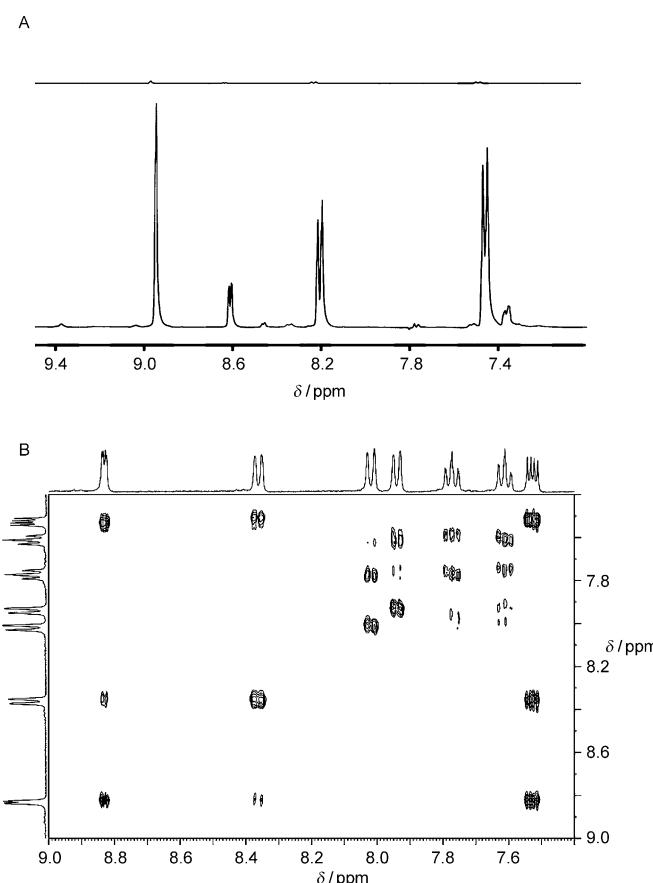


Abbildung 17. A) Unten: 1D-¹H-NMR-Spektrum von Nicotinamid, das mit der SABRE-Technik verstärkt wurde; oben: das entsprechende Spektrum mit normalen, auf Boltzmann-Verteilung beruhenden Signalen. B) 2D-¹H-COSY-NMR-Spektrum von mit SABRE hyperpolarisiertem Chinolon unter Verwendung des automatisierten Polarisationsagens, wie in Lit. [213] beschrieben.

sich im Laufe der Zeit ändern und in denen ein besseres S/R-Verhältnis einzigartige Informationen über transient populäre Zustände und deren dynamische Änderungen liefern könnte. Ein verbessertes S/R-Verhältnis könnte für beide Szenarien detaillierte, wertvolle Informationen liefern.

Die Verbesserung der Detektionsgrenze der NMR-Spektroskopie hätte unmittelbare Konsequenzen für die Analyse eines größeren Anteils der biologischen und humangen Metaboliten im gesunden und kranken Körper. Sie würde neue Möglichkeiten der Strukturbestimmung im Bereich der Naturstoffchemie eröffnen uns würde die seltene Möglichkeit bieten, niedrig populierte, aber äußerst wichtige Zustände biologisch aktiver Makromoleküle zu charakterisieren. Die niedrige Häufigkeit pro Atom ist eines der Merkmale makromolekularer Komplexe und Membran-gebundener Proteine, wobei die niedrige Löslichkeit und das hohe Molekulargewicht die Hürden darstellen, die durch höhere Empfindlichkeiten genommen werden könnten. Höhere Empfindlichkeit würde auch die Detektion von Kernen mit niedrigem gyromagnetischem Verhältnis ermöglichen, wie man sie häufig in chemischen und biochemischen aktiven Zentren findet (^{33}S , ^{17}O , ^{15}N , diamagnetische Metallzentren). Diese Kerne haben oft eine geringe natürliche Häufigkeit und kommen bei sehr niedrigen Frequenzen zur Resonanz. Verbesserte Empfindlichkeit würde es der NMR-Spektroskopie auch ermöglichen, die Gegenwart, die Struktur und die Reaktivität von Intermediaten mit niedrig populierten, aber oft entscheidenden dynamischen Eigenschaften zu bestimmen. Im Bereich der dynamischen Biochemie würde eine Verbesserung der Empfindlichkeit die Grenzen erweitern, innerhalb derer verschiedene Prozesse und Molekülgrößen untersuchbar sind, während ein System in Echtzeit evolviert. Bei Anwendungen in der Zelle könnte man Einblicke in die Art und Dynamik posttranslationaler Modifikationen auf atomarer Ebene erhalten. Bei der Erforschung niedermolekularer Metaboliten könnte man bei höherer Empfindlichkeit die Konzentrationsveränderungen quantifizieren, um katabolische und metabolische Stoffwechselwege zu verstehen. Weitere Verbesserungen könnten zu neuen gekoppelten NMR-Spektroskopietechniken führen, die wesentliche Hilfsmittel für Struktur-Funktions-Untersuchungen darstellen und in viele Aspekte der „Omics-Wissenschaften“ integriert sind. Nimmt man all diese Aspekte zusammen, ist es offensichtlich, welch enorme wissenschaftliche Fortschritte sich ergeben würden, wenn die NMR-Spektroskopie mit optimaler Empfindlichkeit pro Einzelexperiment durchgeführt werden könnte.

Ebenso klar ist, dass eine Vielzahl von Techniken benötigt wird, um das S/R-Verhältnis in der NMR-Spektroskopie zu verbessern; und diese Techniken werden sich unterscheiden, je nachdem, welche NMR-spektroskopische Methode man anwenden will und welche Bedingungen man vorfindet. In diesem Aufsatz wurde deshalb versucht, die aktuellen Fortschritte in bestimmten Schlüsselbereichen zu beschreiben, die für eine Vielzahl von Anwendungen nützlich sein könnten, unabhängig vom letztlich durchgeföhrten NMR-Experiment. Eine traditionelle Lösung des Empfindlichkeitsproblems der NMR-Spektroskopie ist die Erhöhung der Magnetfeldstärke B_0 . Diese Erhöhung führt zu einem gleichzeitigen Anstieg

der Empfindlichkeit und Auflösung. Während des letzten Jahrzehnts hat sich aber gezeigt, dass die hochauflösende NMR-Magnettechnologie auf der Basis traditioneller, vollständig persistenter, Nb-basierter Niedertemperatur-Supraleiter an ihre Grenzen stößt. Diese Grenzen zeigen sich in den rapide ansteigenden Größen und Kosten eines vollständig Niedertemperatur-supraleitenden Systems, während gleichzeitig nur eine geringe Erhöhung der Magnetfeldstärke erzielt werden konnte. Vor dem Hintergrund dieser Situation wurde in diesem Aufsatz ein Forschungsbereich diskutiert, der sich dem Design und der Entwicklung alternativer Magnettechnologien widmet, mit denen die strengen Anforderungen an Homogenität und Stabilität der NMR-Spektroskopie erfüllt werden können und gleichzeitig ein Quantensprung bei den erreichbaren Magnetfeldstärken erzielt werden kann. Zwei Modelle sind hierbei reizvoll: eines, bei dem Nieder- und Hochtemperatur-supraleitende Drähte in Serie verwendet werden, und ein anderes, bei dem supraleitende und Elektromagnete in Serie angeordnet werden. Beide Modelle erfordern Änderungen im kanonischen Ansatz, nach dem NMR-Spektroskopie durchgeführt wird. Sie erfordern das Wiedereinführen einer Stabilisierung des aktiven Felds aufgrund der nichtpersistiven Weise, in der die Systeme bisher operieren. Beide Modelle würden zahlreiche neue Hindernisse mit sich bringen, wie hohe Kosten für den Bau und den Unterhalt dieser Magnete und Anforderungen an die Stabilität. Dennoch sollten die Vorteile solcher neuen Systeme, z.B. das Erreichen einer Feldstärke von 40 T und Verbesserungen, die auch im Niederfeld-NMR-Spektroskopie- und MRI-Bereich wichtig wären, die Kosten rechtfertigen.

Die Empfindlichkeit wurde auch durch die Entwicklung besserer Probenköpfe in den letzten zehn Jahren erhöht. Dies war besonders für strukturbiologische Experimente von Bedeutung, wo die Einführung von kryogenen gekühlten Spulen und Vorverstärkern für Experimente in Lösung und von Probenköpfen mit niedrigem elektrischen Feld für Festkörperexperimente essenziell waren, um zuvor nicht mögliche Versuche durchführen zu können. Diese Technologien sind mittlerweile ausgereift, was die Frage aufwirft, welche Fortschritte hier noch zu erwarten sein mögen. Unser Aufsatz hat einige Optionen für die Zukunft aufgezeigt, z.B. Mikrospulen für die Lösungs-NMR-Spektroskopie, deren Durchmesser für die Größe und Art der untersuchten Probe maßgeschneidert wird, sowie Spulen, die Hochtemperatur-Supraleiter mit noch niedrigerer Rauschfigur als kryogen gekühlte Kupferspulen enthalten. Manche dieser Verbesserungen könnten zwar auch für NMR-Experimente im Festkörper nützlich sein, jedoch werden viele Möglichkeiten durch sehr strenge Anforderungen aufgrund von schneller MAS und hohen Radiofrequenzleistungen beschränkt. Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass es zu substanzialen Verbesserungen auch für Festkörperexperimente kommen wird – besonders bei höheren Magnetfeldern und höheren Rotationsfrequenzen, wo die Anforderungen an die rf-Leistung geringer sind. Dies würde dann auch die Einführung von kryogenen gekühlten Spulen und Vorverstärkern rechtfertigen. Ebenso wichtig wird die Optimierung von Vorschriften zur Probenpräparation bei der Untersuchung von Feststoffen und Feststoff-artigen Systemen sein. Dies umfasst Sedimentation, Probenausrichtung und

neue Markierungsansätze, aber auch neue Pulssequenzen und Experimente mit höherer Empfindlichkeit. Insbesondere werden Methyl-TROSY-Experimente in Lösung, ^1H -Detektion bei sehr schnellem MAS und Experimente an Spezies mit niedrigem gyromagnetischem Verhältnis, wie ^{15}N und ^{17}O , bei denen interessante biochemische Reaktionen und Wechselwirkungen stattfinden, dank dieser neuen Entwicklungen wahrscheinlich häufiger durchgeführt werden.

Die Verbesserung der traditionellen Bestandteile eines NMR-Experiments – des Spektrometers, der Pulssequenz, des Probenkopfs und der Probe – ist ein wichtiger Forschungsschwerpunkt, aber darüber hinaus wurde im letzten Jahrzehnt auch das Potenzial von Hyperpolarisationsmethoden für die Standard-NMR-Spektroskopie wiederentdeckt. Entsprechende Arbeiten bauen auf der Überlegung auf, dass die Ausgangspolarisation P der Kerne vom normalen $P \approx 5 \times 10^{-5}$ im thermischen Gleichgewicht bei 300 K auf $P \approx 0.5$ erhöht werden könnte – in diesem Fall würden sich Empfindlichkeitsverbesserungen erzielen lassen, die alle anderen technischen Verbesserungen überbieten würden. Eine besondere Stellung genießt hier wegen ihrer allgemeinen Anwendbarkeit die DNP, eine Methode, die eigentlich nur erfordert, dass eine untersuchte Probe mit einer geringen Menge eines freien Radikals vermischt wird, dessen EPR-Signal mittels Mikrowellenstrahlung gesättigt werden kann. Dank einer Reihe beeindruckender technischer Fortschritte, zusammen mit einem sehr profunden Verständnis der zugrunde liegenden Spinphysik, ist die DNP eine zentrale Forschungsrichtung für Lösungs- wie auch Festkörper-NMR-Spektroskopie geworden. Wichtige Neuerungen in diesen Feldern ergaben sich wegen der Verfügbarkeit kommerzieller Systeme für Flüssig- und Festkörper-NMR-Experimente.

Bei der Lösungs-NMR-Spektroskopie erreicht man die Empfindlichkeitsverstärkung bei Bedingungen von gepumptem flüssigem Helium, was (wegen der gemeinsam genutzten Unterschiede im gyromagnetischen Verhältnis von Elektronen und Kernen sowie der Boltzmann-Spinausrichtung bei kryogener Temperatur im Unterschied zu Raumtemperatur) zu Empfindlichkeitsgewinnen von bis zu 10 000 führt. Bei der Festkörper-NMR-Spektroskopie wird die Messtemperatur durch die des kalten Stickstoffgases bestimmt, das besser für Hochleistungs-MAS-Experimente geeignet ist. Hier erreicht man prinzipiell bescheidenere, 100-fache Steigerungen, die hauptsächlich von den Unterschieden der gyromagnetischen Verhältnisse von Elektronen und Kernen herrühren.

Diese Empfindlichkeitssteigerungen – auch wenn sie beispiellos im Vergleich mit anderen technischen Fortschritten sein mögen – haben bisher noch nicht zu automatischen Verbesserungen in allen Bereichen geführt. Besonders bei Anwendungen in der Strukturbioologie gilt es noch eine Reihe von Hürden zu überwinden. Der Verdünnungs-DNP-Ansatz ist, zumindest in der jetzigen Form, nicht gut geeignet, um große biomolekulare Systeme zu untersuchen; Grund ist die schnelle Relaxation, die die Spins erfahren, wenn sie vom polarisierenden Magneten in den Beobachtungsmagneten transferiert werden. Apparate zur schnellen Injektion und zum Probentransport, bei denen die Probe den Bereich des Hochfeldmagneten nicht verlässt, werden zurzeit als mögliche Lösungsansätze für dieses Problem untersucht, ebenso

wie Ansätze, die einen In-situ-Overhauser-DNP-Effekt nutzen. Auch DNP-NMR-spektroskopische Untersuchungen im Festkörper sind anspruchsvoll für große Biomoleküle, besonders wegen des Einflusses der Linienverbreiterung bei niedrigen Temperaturen auf die ^{13}C - und ^{15}N -Resonanzen und der geringeren Verstärkungseffekte bei höheren Magnetfeldstärken.^[24, 212] Der Effekt der Linienverbreiterung beruht auf dem Ausfrieren dynamischer Mittelungseffekte von biologischen Festkörpern unterhalb ca. 230 K; er wirkt sich nicht auf die NMR-Spektren inhärent heterogener Systeme wie Proteinaggregate oder auf inhärent breite Linien wie die von Quadrupolkernen aus. Aber dennoch bildet er ein Hindernis für einen allgemeinen Einsatz der Festkörper-DNP-Spektroskopie zur Analyse einer Reihe von Proteinen, und Wege zur Erhöhung der Auflösung werden derzeit untersucht. Alternative Möglichkeiten, die eventuell die Notwendigkeit von Tieftemperaturmessungen umgehen, werden erörtert, darunter die Entwicklung neuer polarisierender Radikale oder einer Optik-basierten Komplementierung der traditionellen DNP-Experimente.

Fazit: Wegen des ausgereiften Zustands der modernen NMR-Spektroskopie mögen alle leicht zu pfückenden Früchte bereits geerntet sein, aber die unerreichte Erfolgsgeschichte dieser Technik lässt auf neue Forschungsmöglichkeiten hoffen, wenn erst einmal neue Verbesserungen in die biomolekulare Standard-NMR-Spektroskopie integriert worden sind.

Das Projekt wurde unterstützt von der EU (EC Contract Bio-NMR No. 261863). C.L., G.P. und E.R. bedanken sich für Unterstützung durch MIUR PRIN 2012SK7ASN und die EU im Projekt COST Action TD1103. A.C. wird durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (SNF) (grant PP00P2_133562) unterstützt. A.S.E. wird durch die NIH (R01EB009772) und A.S.E. sowie G.S.B. werden durch das National High Magnetic Field Laboratory, NSF (DMR-1157490) unterstützt. A.G.W. wurde durch die Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO) Grootschalige Onderzoeksfaciliteiten unterstützt. Die Projektkennzeichnung lautet 176.010.2005.030 sowie NWO TOPGO grant. J.v.B. wurde von der EU (Euro-MagNET II EU, Ultrasense NMR) sowie von der Provinz Gelderland in den Niederlanden unterstützt. L.F. wurde durch Projekte der Israel Science Foundation (795/13, 1775/12) im I-CORE Programm des Planungs- und Budgetkommittees sowie von einem ERC Advanced Grant (Nr. 246754) unterstützt. Das BMRZ (H.S.) wird vom Bundesland Hessen unterstützt.

Zitierweise: Angew. Chem. Int. Ed. **2015**, *54*, 9162–9185
Angew. Chem. **2015**, *127*, 9292–9317

- [1] Y. Ding, Y. Yao, F. M. Marassi, Acc. Chem. Res. **2013**, *46*, 2182–2190.
- [2] S. J. Opella, Acc. Chem. Res. **2013**, *46*, 2145–2153.
- [3] D. T. Murray, N. Das, T. A. Cross, Acc. Chem. Res. **2013**, *46*, 2172–2181.
- [4] R. Tycko, Annu. Rev. Phys. Chem. **2011**, *62*, 279–299.
- [5] M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich, J. Mol. Biol. **1985**, *182*, 295–315.

- [6] R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4918–4923.
- [7] N. K. Goto, L. E. Kay, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 585–592.
- [8] D. P. Frueh, Z. Y. Sun, D. A. Vosburg, C. T. Walsh, J. C. Hoch, G. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5757–5763.
- [9] J. Fiaux, E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **2004**, *29*, 289–297.
- [10] V. Tugarinov, V. Kanelis, L. E. Kay, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 749–754.
- [11] Y. Miyanoiri, M. Takeda, M. Kainosh, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2012**, *992*, 83–93.
- [12] F. M. Marassi, A. Ramamoorthy, S. J. Opella, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8551–8556.
- [13] G. Kervern, S. Steuernagel, F. Engelke, G. Pintacuda, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14118–14119.
- [14] M. Matzapetakis, P. Turano, E. C. Theil, I. Bertini, *J. Biomol. NMR* **2007**, *38*, 237–242.
- [15] P. Turano, D. Lalli, I. C. Felli, E. C. Theil, I. Bertini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 545–550.
- [16] T. H. Huang, W. W. Bachovchin, R. G. Griffin, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1984**, *23*, 5933–5937.
- [17] G. S. Harbison, S. O. Smith, J. A. Pardo, J. M. L. Courtin, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. A. Mathies, R. G. Griffin, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6955–6962.
- [18] M. Auger, A. E. McDermott, V. Robinson, A. L. Castelhano, R. J. Billedeau, D. H. Pliura, A. Krantz, R. G. Griffin, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3930–3934.
- [19] A. B. Siemer, A. E. McDermott, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17394–17399.
- [20] K.-N. Hu, W.-M. Yau, R. Tycko, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 24–25.
- [21] R. W. Martin, K. W. Zilm, *J. Magn. Reson.* **2003**, *165*, 162–174.
- [22] I. Bertini, A. Bhaumik, G. De Paepe, R. G. Griffin, M. Lelli, J. R. Lewandowski, C. Luchinat, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1032–1040.
- [23] J. Pauli, B. van Rossum, H. Forster, H. J. de Groot, H. Oschkinat, *J. Magn. Reson.* **2000**, *143*, 411–416.
- [24] A. B. Siemer, K.-Y. Huang, A. E. McDermott, *PLoS One* **2012**, *7*, e47242.
- [25] S. C. Keith, Jr., *Science* **1913**, *37*, 877–879.
- [26] C. Polge, A. U. Smith, A. S. Parkes, *Nature* **1949**, *164*, 666–676.
- [27] T. M. Rothgeb, E. Oldfield, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 1432–1446.
- [28] M. J. Knight, I. C. Felli, R. Pierattelli, L. Emsley, G. Pintacuda, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2108–2116.
- [29] A. Marchetti, S. Jehle, M. Felletti, M. J. Knight, Y. Wang, Z.-Q. Xu, A. Y. Park, G. Otting, A. Lesage, L. Emsley, N. E. Dixon, G. Pintacuda, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10914–10917.
- [30] D. H. Zhou, A. J. Nieuwkoop, D. A. Berthold, G. Comellas, L. J. Sperling, M. Tang, G. J. Shah, E. J. Brea, L. R. Lemkau, C. M. Rienstra, *J. Biomol. NMR* **2012**, *54*, 291–305.
- [31] M. Benvenuti, S. Mangani, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1633–1651.
- [32] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, B. Reif, P. Turano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10396–10399.
- [33] I. Bertini, F. Engelke, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, C. Rosa, P. Turano, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 439–447.
- [34] T. M. Laue, W. F. Stafford III, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 75–100.
- [35] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, E. Ravera, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2059–2069.
- [36] A. Mainz, B. Bardiaux, F. Kuppler, G. Multhaup, I. C. Felli, R. Pierattelli, B. Reif, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1128–1138.
- [37] A. J. Baldwin, P. Walsh, D. F. Hansen, G. R. Hilton, J. L. P. Benesch, S. Sharpe, L. E. Kay, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15343–15350.
- [38] C. Gardiennet, A. K. Schütz, A. Hunkeler, B. Kunert, L. Terradot, A. Böckmann, B. H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7855–7858; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7977–7980.
- [39] I. Bertini, F. Engelke, L. Gonnelli, B. Knott, C. Luchinat, D. Osen, E. Ravera, *J. Biomol. NMR* **2012**, *54*, 123–127.
- [40] S. D. Kennedy, R. G. Bryant, *Biopolymers* **1990**, *29*, 1801–1806.
- [41] R. B. Gregory, M. Gangoda, R. K. Gilpin, W. Su, *Biopolymers* **1993**, *33*, 1871–1876.
- [42] K. Seidel, M. Etzkorn, H. Heise, S. Becker, M. Baldus, *Chem-BioChem* **2005**, *6*, 1638–1647.
- [43] L. Ferella, C. Luchinat, E. Ravera, A. Rosato, *J. Biomol. NMR* **2013**, *57*, 319–326.
- [44] T. A. Cross, V. Ekanayake, J. Paulino, A. Wright, *J. Magn. Reson.* **2014**, *239*, 100–109.
- [45] S. J. Opella, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2013**, *6*, 305–328.
- [46] S. Cai, C. Seu, Z. Kovacs, A. D. Sherry, Y. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13474–13478.
- [47] S. Hiller, G. Wider, T. Etezady-Esfarjani, R. Horst, K. Wuthrich, *J. Biomol. NMR* **2005**, *32*, 61–70.
- [48] G. Otting, *J. Biomol. NMR* **2008**, *42*, 1–9.
- [49] S. Ganapathy, A. Naito, C. A. McDowell, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6011–6015.
- [50] N. P. Wickramasinghe, M. A. Shaibat, Y. Ishii, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9693–9696.
- [51] S. Parthasarathy, Y. Nishiyama, Y. Ishii, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2127–2135.
- [52] N. P. Wickramasinghe, S. Parthasarathy, C. R. Jones, C. Bhardwaj, F. Long, M. Kotetcha, S. Mehboob, L. W. M. Fung, J. Past, A. Samoson, Y. Ishii, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 215–218.
- [53] B. Brutscher, D. Marion, L. Frydman in *NMR of biomolecules—Towards mechanistic systems biology* (Hrsg.: I. Bertini, K. S. McGreevy, G. Parigi), Wiley-Blackwell, Chichester, **2012**, S. S. 445–465.
- [54] E. Lescop, P. Schanda, B. Brutscher, *J. Magn. Reson.* **2007**, *187*, 163–169.
- [55] P. Schanda, H. Van Melckebeke, B. Brutscher, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9042–9043.
- [56] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12366–12371.
- [57] J. E. Ollerenshaw, V. Tugarinov, L. E. Kay, *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 843–852.
- [58] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6394–6400.
- [59] R. Riek, K. Pervushin, C. Fernandez, M. Kainosh, K. Wuthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 658–664.
- [60] L. E. Kay, *J. Magn. Reson.* **2011**, *210*, 159–170.
- [61] R. Rosenzweig, L. E. Kay, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 291–315.
- [62] K. Kazimierczuk, J. Stanek, A. Zawadzka-Kazimierczuk, W. Kozminski, *Prog. NMR Spectrosc.* **2010**, *57*, 420–434.
- [63] V. Y. Orekhov, V. A. Jaravine, *Prog. NMR Spectrosc.* **2011**, *59*, 271–292.
- [64] M. Sattler, J. Schleucher, C. Griesinger, *Prog. NMR Spectrosc.* **1999**, *34*, 93–158.
- [65] S. Kim, T. Szyperski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1385–1393.
- [66] H. S. Atreya, T. Szyperski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9642–9647.
- [67] W. T. Franks, H. S. Atreya, T. Szyperski, C. M. Rienstra, *J. Biomol. NMR* **2010**, *48*, 213–223.
- [68] V. Motácková, J. Nováček, A. Zawadzka-Kazimierczuk, K. Kazimierczuk, L. Židek, H. Sanderová, L. Krásný, W. Kozminski, V. Sklenár, *J. Biomol. NMR* **2010**, *48*, 169–177.
- [69] W. Bermel, I. Bertini, L. Gonnelli, I. C. Felli, W. Kozminski, A. Piai, R. Pierattelli, J. Stanek, *J. Biomol. NMR* **2012**, *53*, 293–301.
- [70] S. Yan, C. L. Suiter, G. Hou, H. Zhang, T. Polenova, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2047–2058.

- [71] Y. Shrot, L. Frydman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11385–11396.
- [72] M. Gal, P. Schanda, B. Brutscher, L. Frydman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1372–1377.
- [73] M. K. Lee, M. Gal, L. Frydman, G. Varani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9192–9197.
- [74] T. M. de Swiet, *J. Magn. Reson.* **2005**, *174*, 331–334.
- [75] A. G. Webb, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2006**, *58*, 1–50.
- [76] H. Kovacs, D. Moskau, M. Spraul, *Prog. NMR Spectrosc.* **2005**, *46*, 131–155.
- [77] W. W. Brey, A. S. Edison, R. E. Nast, J. R. Rocca, S. Saha, R. S. Withers, *J. Magn. Reson.* **2006**, *179*, 290–293.
- [78] A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkel, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2102–2104.
- [79] V. Ramaswamy, J. W. Hooker, R. S. Withers, R. E. Nast, A. S. Edison, W. W. Brey in *Encyclopedia of NMR* (Hrsg.: R. K. Harris, R. E. Wasylishen), Wiley, New York, **2013**, 2, 215–228, DOI: 10.1002/9780470034590.emrstm1315.
- [80] A. G. Webb, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2011**, *38A*, 148–184.
- [81] L. A. Crum, K. W. Zilm, Resonator designs for decreasing sample heating in solid state NMR experiments. Experimental NMR conference, **2007**.
- [82] H. W. Weijers, U. P. Trociewitz, W. D. Markiewicz, J. Jiang, D. Myers, E. E. Hellstrom, A. Xu, J. Jaroszynski, P. Noyes, Y. Viouchkov, D. C. Larbalestier, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **2010**, *20*, 576–582.
- [83] U. P. Trociewitz, M. Dalban-Canassy, M. Hannion, D. K. Hilton, J. Jaroszynski, P. Noyes, Y. Viouchkov, H. W. Weijers, D. C. Larbalestier, *Appl. Phys. Lett.* **2011**, *99*, 202506.
- [84] W. D. Markiewicz, D. C. Larbalestier, H. W. Weijers, A. J. Voran, K. W. Pickard, W. R. Sheppard, J. Jaroszynski, A. Xu, R. P. Walsh, J. Lu, A. V. Gavrilin, P. D. Noyes, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **2012**, *22*, 4300704.
- [85] J. Dadok, *eMagRes.* **2007**, DOI: 10.1002/9780470034590.emrhp0041.
- [86] Y. Yanagisawa, K. Nakagome, K. Tennmei, M. Hamada, M. Yoshikawa, A. Otsuka, M. Hosono, T. Kiyoshi, M. Takahashi, T. Yamazaki, H. Maeda, *J. Magn. Reson.* **2010**, *203*, 274–282.
- [87] T. Kiyoshi, S. Choi, S. Matsumoto, K. Zaitsu, T. Hase, T. Miyazaki, M. Hamada, M. Hosono, Y. Yanagisawa, H. Nakagome, M. Takahashi, T. Yamazaki, H. Maeda, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **2010**, *20*, 714–717.
- [88] T. Takematsu, R. Hu, T. Takao, Y. Yanagisawa, H. Nakagome, T. Uglietti, T. Kiyoshi, M. Takahashi, H. Maeda, *Phys. C* **2010**, *470*, 674–677.
- [89] Y. Yanagisawa, H. Nakagome, D. Uglietti, T. Kiyoshi, R. Hu, T. Takematsu, T. Takao, M. Takahashi, H. Maeda, *IEEE Trans. Appl. Supercond.* **2010**, *20*, 744–747.
- [90] D. C. Larbalestier, J. Jiang, U. P. Trociewitz, F. Kametani, C. Scheuerlein, M. Dalban-Canassy, M. Matras, P. Chen, N. C. Craig, P. J. Lee, E. E. Hellstrom, *Nat. Mater.* **2014**, *13*, 375–381.
- [91] J. Wosnitza, A. D. Bianchi, J. Freudenberger, J. Haase, T. Herrmannsdorfer, N. Kozlova, L. Schultz, Y. Skourski, S. Zherlit syn, S. A. Zvyagin, *J. Magn. Magn. Mater.* **2007**, *310*, 2728–2730.
- [92] B. Meier, S. Greiser, J. Haase, T. Herrmannsdorfer, F. Wolff-Fabris, J. Wosnitza, *J. Magn. Reson.* **2011**, *210*, 1–6.
- [93] N. Ichijo, K. Takeda, K. Takegoshi, *J. Magn. Reson.* **2014**, *246*, 57–61.
- [94] P. J. M. van Bentum, J. C. Maan, J. W. M. van Os, A. P. M. Kentgens, *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *376*, 338–345.
- [95] Z. Gan, H.-T. Kwak, M. Bird, T. Cross, P. Gor'kov, W. Brey, K. Shetty, *J. Magn. Reson.* **2008**, *191*, 135–140.
- [96] T. F. Prisner, W. Köckenberger, *Appl. Magn. Reson.* **2008**, *34*, 213–218.
- [97] R. G. Griffin, T. F. Prisner, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5737–5740.
- [98] A. V. Atsarkin, W. Köckenberger, *Appl. Magn. Reson.* **2012**, *43*, 1–2.
- [99] A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *89*, 689.
- [100] T. R. Carver, C. P. Slichter, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 212–213.
- [101] L. R. Becerra, G. J. Gerfen, R. J. Temkin, D. J. Singel, R. G. Griffin, *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *71*, 3561–3564.
- [102] G. J. Gerfen, L. R. Becerra, D. A. Hall, D. J. Singel, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 9494–9497.
- [103] T. Maly, G. T. Debelouchina, V. S. Bajaj, K.-N. Hu, C.-G. Joo, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, P. C. A. Van der Wel, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052211.
- [104] J.-H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10158–10163.
- [105] J. D. Jeffries, *Phys. Rev.* **1957**, *106*, 164–165.
- [106] A. V. Kessenikh, V. I. Lushchikov, A. A. Manenkov, Y. V. Taran, *Sov. Phys. Solid State* **1963**, *5*, 321–329.
- [107] C. F. Hwang, D. A. Hill, *Phys. Rev. Lett.* **1967**, *18*, 110–112.
- [108] D. S. Wollan, *Phys. Rev. B* **1976**, *13*, 3671–3685.
- [109] M. Borghini, *Phys. Rev. Lett.* **1968**, *20*, 419–421.
- [110] V. A. Atsarkin, M. I. Rodak, *Sov. Phys. Usp.* **1972**, *15*, 251–265.
- [111] A. Abragam, M. Goldman, *Rep. Prog. Phys.* **1978**, *41*, 395–467.
- [112] T. V. Can, M. A. Caporini, F. Mentink-Vigier, B. Corzilius, J. J. Walish, M. Rosay, W. E. Maas, M. Baldus, S. Vega, T. M. Swager, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2014**, *141*, 064202.
- [113] O. S. Leifson, C. D. Jeffries, *Phys. Rev.* **1961**, *122*, 1781–1795.
- [114] T. J. Schmugge, C. D. Jeffries, *Phys. Rev.* **1965**, *138*, A1785–A1801.
- [115] G. R. Khutishvili, *Sov. Phys. Usp.* **1966**, *8*, 743–769.
- [116] Y. Hovav, A. Feintuch, S. Vega, *J. Magn. Reson.* **2012**, *214*, 29–41.
- [117] C. F. Hwang, D. A. Hill, *Phys. Rev. Lett.* **1967**, *19*, 1011–1014.
- [118] A. G. Redfield, *Phys. Rev.* **1955**, *98*, 1787–1809.
- [119] B. N. Provotorov, *Sov. Phys. JETP* **1962**, *14*, 1126–1131.
- [120] M. Goldman, *Spin temperature and nuclear magnetic resonance in solids*, Oxford University Press, Oxford, **1970**.
- [121] D. Shimon, Y. Hovav, A. Feintuch, D. Goldfarb, S. Vega, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 5729–5743.
- [122] K.-N. Hu, V. S. Bajaj, M. Rosay, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 044512.
- [123] D. Banerjee, D. Shimon, A. Feintuch, S. Vega, D. Goldfarb, *J. Magn. Reson.* **2013**, *230*, 212–219.
- [124] Y. Hovav, A. Feintuch, S. Vega, *J. Magn. Reson.* **2010**, *207*, 176–189.
- [125] N. Bloembergen, *Physica* **1949**, *15*, 386–426.
- [126] A. Abragam, *The Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, Oxford, **1961**.
- [127] C. Ramanathan, *Appl. Magn. Reson.* **2008**, *34*, 409–421.
- [128] Y. Hovav, A. Feintuch, S. Vega, *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 074509.
- [129] A. J. Rossini, A. Zagdoun, M. Lelli, A. Lesage, C. Coperet, L. Emsley, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1942–1951.
- [130] Q. Z. Ni, E. Daviso, T. V. Can, E. Markhasin, S. K. Jawla, T. M. Swager, R. J. Temkin, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1933–1941.
- [131] J.-H. Ardenkjær-Larsen, I. Laursen, I. Leunbach, G. Ehnholm, L.-G. Wistrand, J. S. Petersson, K. Golman, *J. Magn. Reson.* **1998**, *133*, 1–12.
- [132] L. Lumata, S. J. Ratnakar, A. Jindal, M. Merritt, A. Comment, C. Malloy, A. D. Sherry, Z. Kovacs, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10825–10827.
- [133] D. A. Hall, D. C. Maus, G. J. Gerfen, S. J. Inati, L. R. Becerra, F. W. Dahlquist, R. G. Griffin, *Science* **1997**, *276*, 930–932.

- [134] B. Corzilius, A. A. Smith, A. B. Barnes, C. Luchinat, I. Bertini, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5648–5651.
- [135] B. Corzilius, V. K. Michaelis, S. Penzel, E. Ravera, A. Smith, C. Luchinat, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11716–11727.
- [136] Y. Matsuki, T. Maly, O. Ouari, H. Karoui, F. Le Moigne, E. Rizzato, S. Lyubenova, J. Herzfeld, T. F. Prisner, P. Tordo, R. G. Griffin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4996–5000; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5096–5100.
- [137] C. Sauvée, M. Rosay, G. Casano, F. Aussenac, R. T. Weber, O. Ouari, P. Tordo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10858–10861; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 11058–11061.
- [138] H. Takahashi, D. Lee, L. Dubois, M. Bardet, S. Hediger, P. G. De, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11766–11769; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11936–11939.
- [139] H. Takahashi, S. Hediger, P. G. De, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9479–9481.
- [140] E. Ravera, B. Corzilius, V. K. Michaelis, C. Rosa, R. G. Griffin, C. Luchinat, I. Bertini, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1641–1644.
- [141] E. Ravera, B. Corzilius, V. K. Michaelis, C. Luchinat, R. G. Griffin, I. Bertini, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 2957–2965.
- [142] A. B. Barnes, E. A. Nanni, J. Herzfeld, R. G. Griffin, R. J. Temkin, *J. Magn. Reson.* **2012**, *221*, 147–153.
- [143] P. P. Woskov, V. S. Bajaj, M. K. Hornstein, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.* **2005**, *53*, 1863–1869.
- [144] E. A. Nanni, A. B. Barnes, Y. Matsuki, P. P. Woskov, B. Corzilius, R. G. Griffin, R. J. Temkin, *J. Magn. Reson.* **2011**, *210*, 16–23.
- [145] M. Mishkovsky, L. Frydman, *ChemPhysChem* **2008**, *9*, 2340–2348.
- [146] C. Gabellieri, S. Reynolds, A. Lavie, G. S. Payne, M. O. Leach, T. R. Ekykyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4598–4599.
- [147] F. A. Gallagher, M. I. Kettunen, K. M. Brindle, *Prog. NMR Spectrosc.* **2009**, *55*, 285–295.
- [148] L. Lumata, M. E. Merritt, Z. Hashami, S. J. Ratnakar, Z. Kovacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 525–527; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 540–542.
- [149] M. E. Merritt, C. Harrison, Z. Kovacs, P. Kshirsagar, C. R. Malloy, A. D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12942–12943.
- [150] R. Sarkar, A. Comment, P. R. Vasos, S. Jannin, R. Gruetter, G. Bodenhausen, H. Hall, D. Kirik, V. P. Denisov, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16014–16015.
- [151] R. B. van Heeswijk, K. Uffman, A. Comment, F. Kurdzesau, C. Perazzolo, C. Cudalbu, S. Jannin, J. A. Konter, P. Hautle, B. van den Brandt, G. Navon, J. J. van der Klink, R. Gruetter, *Magn. Reson. Med.* **2009**, *61*, 1489–1493.
- [152] A. Bornet, R. Melzi, A. J. P. Linde, P. Hautle, B. van den Brandt, S. Jannin, G. Bodenhausen, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 111–114.
- [153] S. R. Hartmann, E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042–2053.
- [154] A. Pines, M. G. Gibby, J. S. Waugh, *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 1776–1777.
- [155] S. Jannin, A. Comment, J. J. van der Klink, *Appl. Magn. Reson.* **2012**, *43*, 59–68.
- [156] T. Harris, C. Bretschneider, L. Frydman, *J. Magn. Reson.* **2011**, *211*, 96–100.
- [157] P. Miéville, P. Ahuja, R. Sarkar, S. Jannin, P. R. Vasos, S. Gerber-Lemaire, M. Mishkovsky, A. Comment, R. Gruetter, O. Ouari, P. Tordo, G. Bodenhausen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6182–6185; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6318–6321.
- [158] T. Cheng, M. Mishkovsky, J. A. M. Bastiaansen, O. Ouari, P. Hautle, P. Tordo, B. van den Brandt, A. Comment, *NMR Biomed.* **2013**, *26*, 1582–1588.
- [159] E. Y. Chekmenev, V. A. Norton, D. P. Weitekamp, P. Bhattacharya, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3164–3165.
- [160] M. Mishkovsky, T. Cheng, A. Comment, R. Gruetter, *Magn. Reson. Med.* **2012**, *68*, 349–352.
- [161] M. Mishkovsky, A. Comment, R. Gruetter, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2012**, *32*, 2108–2113.
- [162] P. R. Vasos, A. Comment, R. Sarkar, P. Ahuja, S. Jannin, J. P. Ansermet, J. A. Konter, P. Hautle, B. B. van den, G. Bodenhausen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18469–18473.
- [163] J. Leggett, R. Hunter, J. Granwehr, R. Panek, A. J. Perez-Linde, A. J. Horsewill, J. McMaster, G. Smith, W. Köckenberger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5883–5892.
- [164] L. Frydman, D. Blazina, *Nat. Phys.* **2007**, *3*, 415–419.
- [165] R. Panek, J. Granwehr, J. Leggett, W. Kockenberger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5771–5778.
- [166] G. Zhang, F. Schilling, S. J. Glaser, C. Hilty, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2875–2881.
- [167] J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, K. Brindle, E. Y. Chekmenev, A. Comment, C. H. Cunningham, R. J. DeBerardinis, G. G. Green, M. O. Leach, S. S. Rajan, R. R. Rizi, B. D. Ross, W. S. Warren, C. R. Malloy, *Neoplasia* **2011**, *13*, 81–97.
- [168] C. R. Malloy, M. E. Merritt, A. D. Sherry, *NMR Biomed.* **2011**, *24*, 973–979.
- [169] S. J. Nelson, J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, P. E. Larson, A. L. Harzstark, M. Ferrone, C. M. van, J. W. Chang, R. Bok, I. Park, G. Reed, L. Carvajal, E. J. Small, P. Munster, V. K. Weinberg, J. H. Ardenkjær-Larsen, A. P. Chen, R. E. Hurd, L. I. Odegaard-Stuen, F. J. Robb, J. Tropp, J. A. Murray, *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 198ra108.
- [170] P. E. Z. Larson, A. B. Kerr, A. P. Chen, M. S. Lustig, M. L. Zierhut, S. Hu, C. H. Cunningham, J. M. Pauly, J. Kurhanewicz, D. B. Vigneron, *J. Magn. Reson.* **2008**, *194*, 121–127.
- [171] A. Z. Lau, A. P. Chen, R. E. Hurd, C. H. Cunningham, *NMR Biomed.* **2011**, *24*, 988–996.
- [172] J. Leupold, S. Mansson, J. S. Petersson, J. Hennig, O. Wieben, *MAGMA* **2009**, *22*, 251–256.
- [173] M. S. Vinding, C. Laustsen, I. I. Maximov, L. V. Sogaard, J.-H. Ardenkjær-Larsen, N. C. Nielsen, *J. Magn. Reson.* **2013**, *227*, 57–61.
- [174] C. von Morze, G. Reed, P. Shin, P. E. Z. Larson, S. Hu, R. Bok, D. B. Vigneron, *J. Magn. Reson.* **2011**, *211*, 109–113.
- [175] S. Bowen, C. Hilty, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5766–5770.
- [176] R. Buratto, A. Bornet, J. Milani, D. Mammoli, B. Vuichoud, N. Salvi, M. Singh, A. Laguerre, S. Passemard, S. Gerber-Lemaire, S. Jannin, G. Bodenhausen, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2509–2515.
- [177] Y. Lee, H. Zeng, S. Ruedisser, A. D. Gossert, C. Hilty, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17448–17451.
- [178] S. Bowen, C. Hilty, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5235–5237; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5313–5315.
- [179] M. Ragavan, H. Y. Chen, G. Sekar, C. Hilty, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6054–6059.
- [180] H. Y. Chen, M. Ragavan, C. Hilty, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9192–9195; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 9362–9365.
- [181] A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 411–415.
- [182] K. H. Hausser, D. Stehlík, *Adv. Magn. Reson.* **1968**, *3*, 79–139.
- [183] J. M. Franck, A. Pavlova, J. A. Scott, S. Han, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *74*, 33–56.
- [184] S. Hussain, J. M. Franck, S. Han, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1953–1958; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2007–2012.
- [185] J. A. Villanueva-Garibay, G. Annino, G. J. M. van Bentum, A. P. M. Kentgens, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5846–5849.
- [186] P. Höfer, G. Parigi, C. Luchinat, P. Carl, G. Guthausen, M. Reese, T. Carlomagno, C. Griesinger, M. Bennati, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3254–3255.

- [187] M.-T. Türke, I. Tkach, M. Reese, P. Höfer, M. Bennati, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5893–5901.
- [188] P. J. M. van Bentum, G. H. A. van der Heijden, J. A. Villanueva-Garibay, A. P. M. Kentgens, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 17831–17840.
- [189] M. J. Prandolini, V. P. Denysenkov, M. Gafurov, B. Endeward, T. F. Prisner, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6090–6092.
- [190] V. Denysenkov, M. J. Prandolini, M. Gafurov, D. Sezer, B. Endeward, T. F. Prisner, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5786–5790.
- [191] P. Neugebauer, J. G. Krummenacker, V. P. Denysenkov, G. Parigi, C. Luchinat, T. F. Prisner, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 6049–6056.
- [192] M. Türke, G. Parigi, C. Luchinat, M. Bennati, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 502–510.
- [193] G. Annino, J. A. Villanueva-Garibay, P. J. M. van Bentum, A. A. K. Klaassen, A. P. M. Kentgens, *Appl. Magn. Reson.* **2010**, *37*, 851–864.
- [194] M. Reese, M.-T. Türke, I. Tkach, G. Parigi, C. Luchinat, T. Marquardsen, A. Tavernier, P. Höfer, F. Engelke, C. Griesinger, M. Bennati, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15086–15087.
- [195] P. Neugebauer, J. G. Krummenacker, V. P. Denysenkov, C. Helmling, C. Luchinat, G. Parigi, T. F. Prisner, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 18781–18787.
- [196] D. Sezer, M. J. Prandolini, T. F. Prisner, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 6626–6637.
- [197] D. Sezer, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 526–540.
- [198] H. C. Dorn, R. Gitti, K. H. Tsai, T. E. Glass, *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *155*, 227–232.
- [199] A. Krahn, P. Lottmann, T. Marquardsen, A. Tavernier, M.-T. Türke, M. Reese, A. Leonov, M. Bennati, P. Höfer, F. Engelke, C. Griesinger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5830–5840.
- [200] C. Griesinger, M. Bennati, H.-M. Vieth, C. Luchinat, G. Parigi, P. Höfer, F. Engelke, S. J. Glaser, V. Denysenkov, T. F. Prisner, *Prog. NMR Spectrosc.* **2012**, *64*, 4–28.
- [201] P. Lottmann, T. Marquardsen, A. Krahn, A. Tavernier, P. Höfer, M. Bennati, F. Engelke, C. Griesinger, *Appl. Magn. Reson.* **2012**, *43*, 207–221.
- [202] P. W. Atkins, J. C. De Paula, *Physical Chemistry*, 8. Aufl., Oxford University Press, Oxford, **2006**.
- [203] C. R. Bowers, D. P. Weitekamp, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *57*, 2645–2648.
- [204] T. C. Eisenschmid, R. U. Kirss, P. P. Deutsch, S. I. Hommeltoft, R. Eisenberg, J. Bargon, R. G. Lawler, A. L. Balch, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 8089–8091.
- [205] S. B. Duckett, C. J. Sleigh, *Prog. NMR Spectroscopy* **1999**, *34*, 71–92.
- [206] R. A. Green, R. W. Adams, S. B. Duckett, R. E. Mewis, D. C. Williamson, G. G. Green, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, *67*, 1–48.
- [207] J. Natterer, J. Bargon, *Prog. NMR Spectrosc.* **1997**, *31*, 293–315.
- [208] R. W. Adams, J. A. Aguilar, K. D. Atkinson, M. J. Cowley, P. I. P. Elliot, S. B. Duckett, C. G. R. Green, I. G. Khazal, J. López-Serrano, D. C. Williamson, *Science* **2009**, *323*, 1708–1711.
- [209] T. G. Walker, W. Happer, *Rev. Mod. Phys.* **1997**, *69*, 629–642.
- [210] G. Navon, Y. Q. Song, T. Room, S. Appelt, R. E. Taylor, A. Pines, *Science* **1996**, *271*, 1848–1851.
- [211] H. M. Rose, C. Witte, F. Rossella, S. Klippel, C. Freund, L. Schröder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 11697–11702.
- [212] A. H. Linden, W. T. Franks, Ü. Akbey, S. Lange, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 283–292.
- [213] M. J. Cowley, R. W. Adams, K. D. Atkinson, M. C. Cockett, S. B. Duckett, G. G. Green, J. A. Lohman, R. Kerssebaum, D. Kilgour, R. E. Mewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6134–6137.
- [214] D. J. Hoult, R. E. Richards, *J. Magn. Reson.* **1976**, *24*, 71–85.
- [215] K. R. Thurber, A. Potopov, W.-M. Yau, R. Tycko, *J. Magn. Reson.* **2013**, *226*, 100–106.
- [216] K. Hashi et al., *J. Magn. Reson.* **2015**, *256*, 30–33.

Eingegangen am 1. November 2014,
veränderte Fassung am 26. Januar 2015
Online veröffentlicht am 1. Juli 2015