

# Die Basislinie der chemischen Verschiebung in Hochdruck-NMR-Spektren von Proteinen

Roland Frach, Patrick Kibies, Saraphina Böttcher, Tim Pongratz, Steven Strohfeldt, Simon Kurmann, Joerg Koehler, Martin Hofmann, Werner Kremer, Hans Robert Kalbitzer, Oliver Reiser, Dominik Horinek und Stefan M. Kast\*

**Abstract:** Die Hochdruck-NMR-Spektroskopie ist wichtig für die Detektion selten auftretender Proteinzustände mithilfe der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung. Für die Analyse dieser Verschiebungen muss allerdings der Ursprung der beobachteten Druckabhängigkeit verstanden werden. Es werden Hochdruck-NMR-Ergebnisse für <sup>15</sup>N-angereichertes N-Methylacetamid (NMA) in Wasser als Modell für Peptidbindungen vorgestellt. Diese werden mit quantenchemischen Berechnungen der zugehörigen magnetischen Parameter unter Verwendung eines druckempfindlichen Solvensmodells kombiniert. Die Analyse der theoretischen Ergebnisse für NMA und den experimentellen Standard DSS zeigt, dass ein wesentlicher Teil der Änderungen der chemischen Verschiebung auf die solvensinduzierte elektronische Polarisation des Rückgrats zurückgeht. Weiterhin zeigt die magnetische Abschirmung von DSS nur geringe Empfindlichkeit für Druckänderungen, weswegen der DSS-Standard ein zuverlässiger Sensor druckabhängiger solvensvermittelter Variationen des lokalen magnetischen Felds ist.

Die Hochdruck-NMR-Spektroskopie hat sich zu einer wichtigen Methode für die Untersuchung selten auftretender Proteinkonformationen entwickelt, deren Kenntnis notwendig ist, um die Funktionsweise von Proteinen zu verstehen<sup>[1]</sup> und um eine neue Klasse von Wirkstoffen zu entwickeln: die intrinsischen allosterischen Inhibitoren.<sup>[2]</sup> Um verschiedene Konformationszustände im thermischen Gleichgewicht zu

detektieren, wird im Kontext solcher Untersuchungen hauptsächlich die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Kerne des Proteintrückgrats analysiert. Die dabei beobachteten Änderungen der chemischen Verschiebungen sind sehr klein und erfordern die Verwendung eines internen Standards. Als Standardsubstanz unter Normaldruck und für polare Lösungsmittel wurde von der IUPAC 4,4-Dimethyl-4-silapantan-1-sulfonsäure (DSS) empfohlen.<sup>[3]</sup> Die Gegenwart eines polaren Lösungsmittels kann unter Hochdruck jedoch, infolge der Änderung seiner dielektrischen Eigenschaften und/oder der Lösungsmittelstruktur im Vergleich zu Normaldruck, die elektronische Struktur des Solvats beeinflussen und zu damit verbundenen Änderungen der chemischen Verschiebungen und möglicherweise auch der Kopplungskonstanten führen. Dementsprechend ist es notwendig, den Einfluss des reinen Lösungsmittels auf NMR-Parameter als Funktion des Drucks (*p*) aufzuklären, um eine Basislinie zu definieren und damit die konformativen von den inhärent solvensvermittelten Anteilen in beobachteten Spektren zu unterscheiden.

Hier berichten wir über die Druckempfindlichkeit der chemischen Verschiebungen eines charakteristischen Fragments des Proteintrückgrats, *N*-Methylacetamid (NMA), das einen Prototyp für experimentelle und computergestützte Untersuchungen darstellt. NMA hat eine einfache Molekülstruktur und ermöglicht somit die Unterscheidung von elektronischen und konformativen Effekten. Hierfür wurden die druckabhängigen NMR-Spektren der <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-Amidkerne von NMA bestimmt, wobei das <sup>15</sup>N-Isotop präparativ eingebaut werden musste. Da üblicherweise experimentelle Spektren in protischen Lösungsmitteln auf die Methylsilylgruppe des DSS-Anions bezogen werden, ist es wichtig, dass die intrinsische Druckabhängigkeit der DSS-Abschirmkonstante bekannt ist. Idealerweise sollte dieser Parameter drucktransparent sein, d.h., er sollte hauptsächlich auf die Variation des lokalen magnetischen Felds reagieren, die durch die Änderung der druckabhängigen magnetischen Suszeptibilität des Lösungsmittels und nicht durch die Änderung der Molekülstruktur bewirkt wird. Deswegen ist es wichtig, dass die Druckabhängigkeit der (isotropen) magnetischen Abschirmkonstante  $\sigma$  der relevanten DSS-Kerne bekannt ist. Dies ist von besonderer Bedeutung für die in der Literatur empfohlenen empirischen Skalierungsfaktoren,<sup>[3]</sup> mit denen man Nicht-Protonen indirekt über die <sup>1</sup>H-Resonanz der DSS-Methylgruppe referenzieren kann. Da diese Referenzierungsmethode für Normaldruck entwickelt wurde, ist zu zeigen, ob DSS ein sinnvoller Hochdruck-NMR-Standard in protischen Lösungsmitteln ist und ob die ursprünglich

[\*] Dr. R. Frach, P. Kibies, S. Böttcher, T. Pongratz, S. Strohfeldt, Prof. Dr. S. M. Kast  
Physikalische Chemie III  
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund  
Otto-Hahn-Straße 4a, 44227 Dortmund (Deutschland)  
E-Mail: stefan.kast@tu-dortmund.de  
S. Kurmann, Dr. J. Koehler, Prof. Dr. W. Kremer,  
Prof. Dr. H. R. Kalbitzer  
Institut für Biophysik und physikalische Biochemie  
Fakultät für Biologie und Vorklin. Medizin  
Universität Regensburg (Deutschland)  
M. Hofmann, Prof. Dr. O. Reiser  
Institut für Organische Chemie  
Fakultät für Chemie und Pharmazie  
Universität Regensburg (Deutschland)  
Prof. Dr. D. Horinek  
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie  
Fakultät für Chemie und Pharmazie  
Universität Regensburg (Deutschland)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter: <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201602054> zu finden.

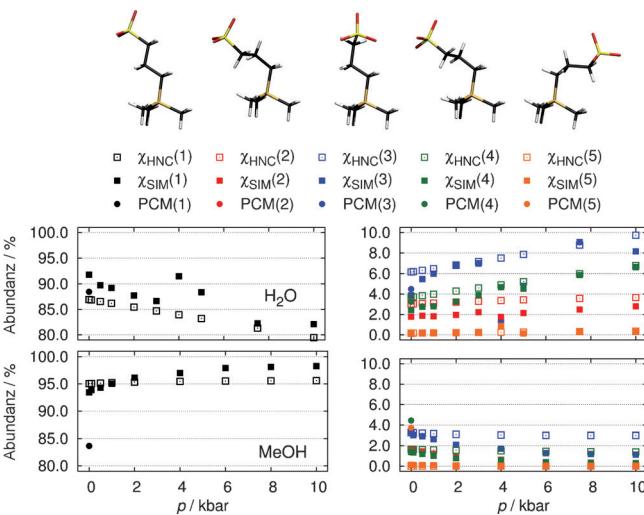
entwickelten Parameter übertragbar sind. Dies ist insbesondere wichtig für genaue Rechnungen mit dem Ziel, die experimentelle und theoretische Skala der chemischen Verschiebungen in Einklang zu bringen, oder – in anderen Worten – um zu verstehen, was genau unter extremen Bedingungen gemessen wird.

Die Theorie kann hierbei das Experiment unterstützen, sofern zwei Anforderungen erfüllt sind: 1) Eine quantenchemische (QC-)Methodik wird benötigt, die die Hochdruck-Lösungsmittelumgebung im Rahmen der elektronischen Schrödinger-Gleichung adäquat abbildet und mit der sinnvollen NMR-Parameter in Lösung erhalten werden. 2) Weiterhin muss ein alternativer Zugang zum indirekten empirischen Referenzierungsansatz gefunden werden (siehe unten). Zur Behandlung von Aspekt (1) wird das „Embedded Cluster Reference Interaction Site Model“ (EC-RISM) verwendet.<sup>[4]</sup> Dies ist ein auf Integralgleichungen basierender Ansatz, der QC-Methoden mit Flüssigphasentheorien koppelt, wodurch sich – wie in den vergangenen Jahren gezeigt wurde – signifikante Vorteile<sup>[5–7]</sup> gegenüber einfacher konstruierten Kontinuumsmethoden, z. B. dem „Polarizable Continuum Model“ (PCM),<sup>[8]</sup> ergeben. Kurz zusammengefasst liefert EC-RISM eine selbstkonsistente Lösung der elektronischen Struktur eines Solvatmoleküls sowie der Lösungsmittelstruktur unter Verwendung diskreter, von der Lösungsmittelverteilung abgeleiteter Punktladungen, die zu einer Polarisierung des elektronischen Hamilton-Operators führen. Aus der Lösung der Schrödinger-Gleichung folgt das durch das Solvens polarisierte elektrostatische Potential zwischen Solvat- und Solvens-Wechselwirkungszentren, das für die Berechnung der Lösungsmittelstruktur im Rahmen der dreidimensionalen (3D)-RISM-Integralgleichungstheorie benötigt wird.<sup>[9]</sup> Gleichzeitig ergibt sich die Population von Konformationen eines Teilchens in Lösung, da EC-RISM die Freie Energie jedes Konformers als Summe der elektronischen Energie und des analytisch berechenbaren chemischen Exzesspotentials zugänglich macht. Für die 3D-RISM-Rechnungen wird eine spezielle Lösungsmittel-eigenschaft, die so genannte Lösungsmittelsuszeptibilität  $\chi$ , benötigt, die die Dichteverteilung des Solvens durch Insertion eines Solvats widerspiegelt. Sie enthält die intra- und (druckabhängige) intermolekulare Lösungsmittelverteilungsfunktion und ermöglicht somit, den Druck als Variable in QC-Rechnungen einzubringen. Sie kann sowohl aus 1D-RISM-Rechnungen unter Verwendung von Approximationen (häufig dem so genannten „Hypernetted Chain“- oder HNC-Modell) als auch direkt aus Moleküldynamik (MD)-Simulationen<sup>[10]</sup> bestimmt werden, wobei hier beide Ansätze verfolgt werden.

EC-RISM wurde bereits zur Berechnung von chemischen Verschiebungen von NMA in Wasser unter Normaldruck<sup>[7]</sup> und auch für die Charakterisierung der druckabhängigen intramolekularen Polarisation von Trimethylamin-N-oxid (TMAO)<sup>[10]</sup> eingesetzt, woraus ein druckabhängiges Kraftfeld für TMAO/Wasser-Mischungen zum Einsatz in klassischen MD-Simulationen abgeleitet wurde. Dieses ist in der Lage, sowohl die Solvensstruktur im Vergleich mit Ab-initio-MD-Daten als auch die experimentellen Dichten im Bereich zwischen 1 bar und 10 kbar gut wiederzugeben. Hier werden nun Vorhersagen von Abschirmkonstanten und Verschie-

bungen von NMA relativ zu DSS mit Hochdruckbedingungen kombiniert und mit experimentellen Daten verglichen, um die Leistungsfähigkeit von EC-RISM für NMR-Parameter im Zusammenhang mit Hochdruck-induzierter Polarisation zu untersuchen. Sofern Theorie und Experiment ähnliche druckabhängige Trends der chemischen Verschiebungen ergeben, wird es möglich sein, Schlussfolgerungen bezüglich der Eignung von DSS als universellem Hochdruck-NMR-Standard zu treffen sowie die allein durch das Solvens induzierte Basislinie in der Protein-NMR-Spektroskopie zu definieren.

Zunächst wurden die Eigenschaften von DSS in zwei repräsentativen Lösungsmitteln, Wasser und Methanol, über einen großen Druckbereich untersucht. Ausgehend vom vollständigen Satz denkbbarer Konformationen und nachfolgenden Geometrieoptimierungen mit PCM (Standardeinstellungen für Wasser und Methanol im Rahmen von Gaussian 09),<sup>[11]</sup> dem 6-31 + G(d,p)-Basissatz und dem B3LYP-Funktional, was eine sinnvolle und effiziente Kombination für die NMR-Spektren-Vorhersage mit EC-RISM darstellt,<sup>[7]</sup> verbleiben fünf eindeutige relevante Konformationen (gemessen an den Freie-Energie-basierten Populationen; siehe Tabellen S2 und S3 der Hintergrundinformationen) für die weitere Verarbeitung (siehe Abbildung 1 für Wasser und Methanol). Die EC-RISM-Ergebnisse für HNC- und MD-Suszeptibilitäten sind gut vergleichbar mit PCM-Daten, die einem Druck von 1 bar entsprechen. Die vollständig gestreckte Konformation ist dabei sowohl in Methanol als auch in Wasser am stärksten populiert. Zusätzlich sei angemerkt, dass sich der Druck unterschiedlich auf die Populationen in beiden Lösungsmitteln auswirkt und sogar zu einem gegen-



**Abbildung 1.** Druckabhängige Häufigkeiten der wichtigsten optimierten DSS-Konformationen (oben) in Wasser und Methanol; links: Hauptkonformer, rechts: andere, berechnet mit normierten Boltzmann-Faktoren unter Verwendung der Summe aus elektronischer Energie und dem chemischen Exzesspotential bei 298.15 K unter Vernachlässigung der Vibrations- und Rotationsentropie. B3LYP/6-31 + G(d,p)-Rechnungen wurden mit PCM (nur für 1 bar) und EC-RISM in Kombination mit Suszeptibilitäten  $\chi$  aus unterschiedlichen Quellen (MD-„SIM“ulation und HNC; die Zahlen in Klammern entsprechen dem Index des Konformers) durchgeführt. Gefüllte Kreise repräsentieren PCM-, gefüllte und offene Quadrate EC-RISM-Daten.

läufigen Trend führt, obwohl die Geometrien und deren energetische Sortierungen ähnlich sind. Ein wesentlicher Unterschied zwischen HNC- $\chi$ -Daten und simulierten (SIM)- $\chi$ -Daten ist die größere Steigung der Populationen bei kleineren Drücken. Weiterhin zeigen die SIM-Daten eine auffallende Unstetigkeit bei 4 kbar, die bereits im Rahmen von Untersuchungen des TMAO-Dipolmoments beobachtet werden konnte.<sup>[10]</sup> Alle weiteren hier aufgeführten NMR-Observablen wurden mittels Boltzmann-Gewichtung basierend auf EC-RISM-berechneten Freien Energien über die fünf dominanten DSS-Strukturen für die jeweiligen Lösungsmittel gewonnen.

Abbildung 2 sowie Tabellen S4 und S5 zeigen die Ergebnisse für druckabhängige isotrope Abschirmkonstanten aus „Gauge-Invariant Atomic Orbital“(GIAO)-EC-RISM/QC-Rechnungen in Wasser und Methanol. Die absolute Druckabhängigkeit der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Kerne ist durchgängig sehr klein und nahezu vernachlässigbar für Protonen ( $\Delta\delta = < 0.01$  ppm über den Bereich bis 10 kbar), wodurch ihre experimentelle Detektion sehr schwierig ist. Dies gibt jedoch einen ersten Hinweis, dass DSS tatsächlich ein sinnvoller NMR-Standard sein könnte, sofern der Hauptbeitrag zur druckabhängigen chemischen Verschiebung von der Zielspezies, in unserem Fall also von NMA, herrührt. Dies kann man untersuchen, indem im Hochdruck-NMR-Experiment NMA auf DSS bezogen (Tabelle S6) und das Ergebnis mit den entsprechenden theoretischen Ergebnissen (Tabelle S7) verglichen wird, wie in Abbildung 3 für wässrige NMA-Lösung dargestellt ist.

Das zuvor erwähnte Problem (2) der indirekten Referenzierung chemischer Verschiebungen hängt mit der Tatsache zusammen, dass QC-Rechnungen substanziell von der linearen Fehlerkompensation bei der Berechnung des Unterschieds der Abschirmkonstanten zwischen Ziel- und Referenzsubstanz profitieren, welche direkt über QC-Methoden zugänglich sind. Dieser Vorteil geht verloren, sobald Verhältnisse der NMR-Frequenzen (typischerweise bezeichnet mit dem Symbol  $\Xi$ )<sup>[3]</sup> des  $^1\text{H}$ -Kerns und eines anderen Kerns verwendet werden. Dieses Problem wird hier umgangen, indem das Experiment, mit dem der Faktor  $\Xi$  bestimmt worden ist,<sup>[3]</sup> computergestützt nachgestellt wird. Dies bedeutet, dass die Abschirmung des NMA-Amidkerns  $^{13}\text{C}$  für alle Drücke auf den  $^{13}\text{C}$ -Kern der DSS-Methylgruppe bei 1 bar bezogen

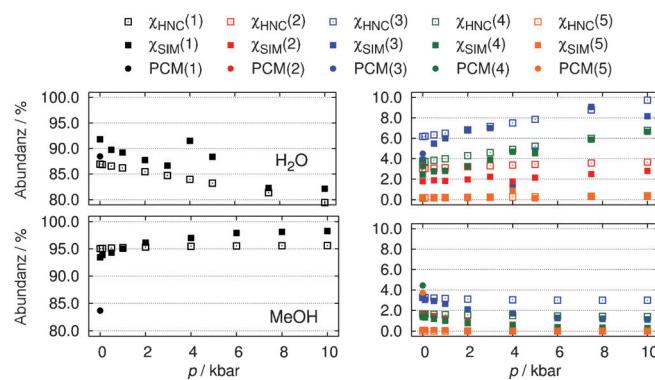


Abbildung 2. Druckabhängige Abschirmkonstanten des DSS-Anions, berechnet mittels GIAO/EC-RISM/B3LYP/6-31 + G(d,p) in Wasser (oben) und Methanol (unten) für  $^{13}\text{C}$  (links) und  $^1\text{H}$  (rechts) der DSS-Methylgruppen mit  $\chi$  aus MD-Simulationen (orange) und HNC (blau). Die Ergebnisse entsprechen arithmetischer Mittelung über äquivalente Kerne.

wird, d.h. auf  $\sigma_{\text{ref}}(1 \text{ bar})$ .<sup>[12]</sup> Für  $^{15}\text{N}$  wurde eine zweistufige Methode angewendet, bei der zuerst die Verschiebung relativ zu Ammoniak in wässriger Lösung,  $(\text{NH}_3)_{\text{aq}}$ , berechnet und anschließend eine Korrektur um die experimentell bekannte Verschiebung von  $(\text{NH}_3)_{\text{aq}}$  zu flüssigem  $\text{NH}_3$  von  $\Delta\delta = -19.4$  ppm durchgeführt wird.<sup>[12,13]</sup> Da DSS keinen Stickstoff enthält, gibt es hierfür keine Möglichkeit, einen druckabhängigen Standard,  $\sigma_{\text{ref}}(p)$ , zu definieren. Diese Vorgehensweise impliziert, dass eine Druckabhängigkeit des Standards

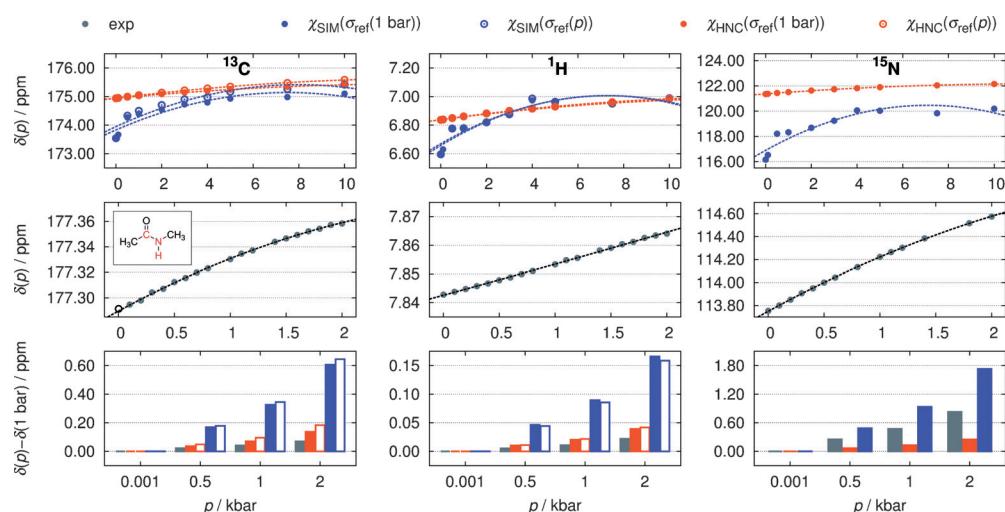


Abbildung 3. Druckabhängige chemische Verschiebungen der Amidkerne  $^{13}\text{C}$  (links),  $^1\text{H}$  (Mitte) und  $^{15}\text{N}$  (rechts) von NMA in Wasser aus Rechnungen (oben) und Experimenten (Mitte) sowie steigungskorrekte Abweichungen relativ zu den Werten bei 1 bar (unten). Die theoretischen Resultate auf Basis von GIAO/EC-RISM/B3LYP/6-31 + G(d,p) mit MD- $\chi$  (blau) und mit HNC- $\chi$  (orange) werden mit experimentellen Ergebnissen (grau), die direkt auf  $\sigma_{\text{ref}}(p, ^1\text{H})$  für  $^1\text{H}$  und indirekt auf  $\sigma_{\text{ref}}(1 \text{ bar}, ^1\text{H})$  für  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  bezogen wurden, verglichen. Das offene Symbol für  $^{13}\text{C}$  bei 1 bar stellt einen durch Regression ermittelten Wert dar, weil dieser wegen technischer Schwierigkeiten im Hochdrucksystem nicht gemessen werden konnte. Die gestrichelten Linien stellen an die Rohdaten angepasste Polynome zweiten Grades dar, deren Koeffizienten in den Tabellen 1 und S8 aufgeführt sind. Die gefüllten und offenen Symbole in den oberen und unteren Zeilen zeigen die Referenzierungsmethode zur Bestimmung der chemischen Verschiebung an, d.h. entweder Referenzwerte bei 1 bar für alle druckabhängigen chemischen Verschiebungen oder einander entsprechende Druckpaare, was für alle Kerne außer  $^{15}\text{N}$  möglich ist.

**Tabelle 1:** Linearer ( $B_1$ ) und quadratischer ( $B_2$ ) Koeffizient aus der Anpassung eines Polynoms zweiten Grades der Form  $\delta(p) = \delta(0) + B_1 p + B_2 p^2$  der experimentellen und theoretischen chemischen Verschiebungen von NMA (siehe Auftragungen in Abbildung 3). Der vollständige Datensatz ist in Tabelle S8 zu finden.

Kern	$B_1(^{13}\text{C})$ [a]	$B_2(^{13}\text{C})$ [b]	$B_1(^1\text{H})$ [a]	$B_2(^1\text{H})$ [b]	$B_1(^{15}\text{N})$ [a]	$B_2(^{15}\text{N})$ [b]
Exp.	0.048	-0.007	0.011	0.000	0.53(1)	-0.05(8)
$\chi_{\text{SIM}}(\sigma_{\text{ref}}(1 \text{ bar}))$	0.35(0)	-0.02(3)	0.1(0)	-0.00(7)	1.0(0)	-0.0(7)
$\chi_{\text{SIM}}(\sigma_{\text{ref}}(p))$	0.37(0)	-0.02(3)	0.0(9)	-0.00(6)	-	-
$\chi_{\text{HNC}}(\sigma_{\text{ref}}(1 \text{ bar}))$	0.07(4)	-0.003	0.021	-0.001	0.13(7)	-0.006
$\chi_{\text{HNC}}(\sigma_{\text{ref}}(p))$	0.09(9)	-0.004	0.023	-0.001	-	-

[a] In ppm kbar<sup>-1</sup>. [b] In ppm kbar<sup>-2</sup>.

a priori ausgeschlossen wird. Im Fall von  $^{13}\text{C}$  kann dies direkt getestet werden, denn hier ist ein Vergleich zwischen der (direkt) druckabhängigen Referenz und dem Standard bei 1 bar möglich. Analog kann die theoretische Verschiebung der NMA-Protonen relativ zu DSS sowohl in Hinblick auf die druckabhängige Referenz (wie im Experiment durchgeführt) als auch bezogen auf 1 bar untersucht werden. Dieser Vergleich (mittlere Spalte von Abbildung 3) zeigt deutlich, dass die inhärente Druckabhängigkeit der  $^1\text{H}$ -Abschirmkonstante vernachlässigbar ist, da beide Referenzierungsansätze praktisch die gleichen Ergebnisse (offene gegenüber gefüllten Symbolen) liefern. In diesem Sinne ist DSS wegen seiner Drucktransparenz tatsächlich ein sinnvoller Hochdruck-NMR-Standard.  $^{13}\text{C}$  scheint weniger geeignet zu sein, was jedoch in Anbetracht von Abbildung 2 nicht überrascht.

Tabelle 1 (vollständiger Datensatz in Tabelle S8) zeigt die Regressionsparameter für alle experimentellen und berechneten Verschiebungen. Die chemischen Verschiebungen bei Normaldruck werden im Vergleich zu vollständig empirischen Methoden relativ gut vorhergesagt.<sup>[14]</sup> Die theoretischen Ergebnisse überschätzen meist (bis auf  $^{15}\text{N}$  mit  $\chi_{\text{HNC}}$ ) die Steigung der chemischen Verschiebung, was im Fall der  $\chi_{\text{SIM}}$ -Daten hauptsächlich aus dem Niedrigdruckbereich resultiert, in dem die für die  $\chi$ -Berechnung notwendigen Wasserverteilungen offenbar stärker vom Druck abhängen als experimentell erwartet. Mit dem HNC-Ansatz lassen sich qualitativ bessere Ergebnisse gewinnen, was vermutlich aus der Fehlerkompensation von zu schwach polarisierender Umgebung (siehe TMAO in Wasser)<sup>[10]</sup> und überpolarisierter elektronischer Wellenfunktion im Rahmen des verwendeten Theorieniveaus folgt. Die Weiterentwicklung von Approximationen für druckabhängige Solvatationseinflüsse in Kombination mit geeigneten QC-Modellen ist offenkundig notwendig, um quantitative Übereinstimmung zu erzielen. Insgesamt jedoch untermauern alle, analog zum Experiment positiv erhaltenen, Steigungen, dass der theoretische Ansatz die Physik der druckabhängigen Modulation der magnetischen Abschirmungen im Wesentlichen korrekt wiedergibt. Weiterhin zeigen die quadratischen Parameter (Tabelle 1), die in Proteinen hauptsächlich große Konformationsfluktuationen anzeigen, jedoch in Random-Coil-Peptiden unverstanden sind, sogar eine äußerst gute Übereinstimmung mit dem Experiment, da alle Ergebnisse negativ oder, wie für  $^1\text{H}$ , vernachlässigbar klein sind.

Zusammenfassend konnte durch die experimentell bestimmten und computergestützten Daten zur Druckabhän-

gigkeit der chemischen Verschiebung von NMA relativ zu DSS gezeigt werden, dass NMR-Spektren von Proteinrückgraten einen intrinsischen solvens-induzierten Basisanteil der chemischen Verschiebung enthalten, der aus elektronischer Polarisation resultiert und unabhängig von der Referenz DSS ist. DSS ist wegen seiner drucktransparenten magnetischen Eigenschaften ein geeigneter NMR-Standard für Hochdruckbedingungen. Bemerkenswerterweise sind die experimentellen  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Steigungen von NMA (0.011, 0.048 und 0.53 ppm kbar<sup>-1</sup>) in derselben Größenordnung wie gemittelte Daten für Random-Coil-Peptide (in ppm kbar<sup>-1</sup>), z. B. 0.038<sup>[15]</sup> und 0.052<sup>[16]</sup> für  $^1\text{H}$ , 0.062<sup>[17]</sup> für  $^{13}\text{C}$  sowie 0.29<sup>[16]</sup> für  $^{15}\text{N}$ , die jedoch abhängig von der Art der Aminosäure stark streuen. Weiterhin können Aminosäuren in Proteinen sehr unterschiedliche  $B_1$ - und  $B_2$ -Werte aufweisen, da diese von globalen Konformationsübergängen beeinflusst werden.<sup>[18]</sup> Die hier dargestellten Daten zeigen, dass die solvensinduzierte elektronische Polarisation ebenfalls signifikant zur Druckabhängigkeit der Abschirmkonstanten beträgt. Demzufolge wird es für die Interpretation von Konformationsänderungen von Proteinen mit Hochdruck-NMR-Spektroskopie notwendig sein, gekoppelte, d.h. sowohl vom Lösungsmittel als auch vom Protein selbst induzierte, Polarisationseffekte näher zu betrachten. Diese Problematik sowie die Entwicklung von quantitativ genauen QC-/Solvations-Modellen stellen in Zukunft eine substanzliche Herausforderung für spektrale Zuordnungen durch Kombination experimenteller und theoretischer Methoden dar.

## Experimentelles

Die NMR-Experimente wurden mit synthetischem,  $^{15}\text{N}$ -angereichertem NMA in wässriger Lösung bei 298 K durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen für Details). Reine Solvenssuszeptibilitäten von Wasser wurden früheren Arbeiten entnommen.<sup>[10]</sup> Die  $\chi$ -Funktion für ein MeOH-Kraftfeldmodell wurde analog zu dieser Methodik gewonnen.<sup>[19]</sup> Alle EC-RISM-Rechnungen an DSS und NMA wurden entsprechend der Strategie für Normaldruck durchgeführt.<sup>[7]</sup> Weitere Details sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

## Danksagung

Diese interdisziplinäre Arbeit wurde im Rahmen der Forschergruppe „Exploring the Dynamical Landscape of Biomolecular Systems by Pressure Perturbation“ (FOR 1979) durch die DFG unterstützt. Alle Rechnungen wurden mit Hilfe eigener Ressourcen sowie des LiDong-Clusters (ITMC TU Dortmund) und im Regensburg Computer Centre (Hardware unterstützt durch die DFG, INST 89/347-1 FUGG) durchgeführt.

**Stichwörter:** Computerchemie · Hochdruckchemie · Isotope · NMR-Spektroskopie · Proteine

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8757–8760  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 8900–8904

- 
- [1] *High Pressure Bioscience – Basic Concepts, Applications and Frontiers* (Hrsg.: K. Akasaka, H. Matsuki), Springer, Heidelberg, **2015**.
- [2] H. R. Kalbitzer, I. C. Rosnizeck, C. E. Munte, S. P. Narayanan, V. Kropf, M. Spoerner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14242–14246; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14492–14496.
- [3] J. L. Markley, A. Bax, Y. Arata, C. W. Hilbers, R. Kaptein, B. D. Sykes, P. E. Wright, K. Wüthrich, *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 117–142.
- [4] T. Kloss, J. Heil, S. M. Kast, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 4337–4343.
- [5] S. M. Kast, J. Heil, S. Güssregen, K. F. Schmidt, *J. Comput.-Aided-Mol. Des.* **2010**, *24*, 343–353.
- [6] W. M. F. Fabian in *Tautomerism: Methods and Theories* (Hrsg.: L. Antonov), Wiley-VCH, Weinheim, **2013**, S. 337–368.
- [7] R. Frach, S. M. Kast, *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 11620–11628.
- [8] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3093.
- [9] D. Beglov, B. Roux, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 7821–7826; A. Kovalenko, F. Hirata, *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *290*, 237–244.
- [10] C. Hörlz, P. Kibies, S. Imoto, R. Frach, S. Suladze, R. Winter, D. Marx, D. Horinek, S. M. Kast, *J. Chem. Phys.* **2016**, *144*, 144104.
- [11] Gaussian 09 (Revision A.02), M. J. Frisch et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2010**.
- [12] D. S. Wishart, C. G. Bigam, J. Gao, F. Abildgaard, H. J. Dyson, E. Oldfield, J. L. Markley, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 135–140.
- [13] W. A. Litchman, A. Mohammed, Jr., A. E. Florian, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6574–6579.
- [14] K. Baskaran, K. Brunner, C. E. Munte, H. R. Kalbitzer, *J. Biomol. NMR* **2010**, *48*, 71–83.
- [15] M. R. Arnold, W. Kremer, H.-D. Lüdemann, H. R. Kalbitzer, *Biophys. Chem.* **2002**, *96*, 129–140.
- [16] J. Koehler, M. Beck Erlach, E. Crusca, Jr., W. Kremer, C. E. Munte, H. R. Kalbitzer, *Materials* **2012**, *5*, 1774–1786.
- [17] M. B. Erlach, persönliche Mitteilung.
- [18] R. Kitahara, K. Hata, H. Li, M. P. Williamson, K. Akasaka, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *71*, 35–58.
- [19] S. Weerasinghe, P. E. Smith, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 15080–15086.

Eingegangen am 28. Februar 2016  
Online veröffentlicht am 10. Juni 2016

---