

Diss. ETH Nr. 7040

Zweidimensionale Kernresonanz-Spektroskopie von Polypeptiden
und Proteinen. Anwendung für Konformationsstudien von an
volldeuterierte Lipid-Micellen gebundenem Glucagon.

ABHANDLUNG

zur Erlangung des
Titels eines Doktors der Naturwissenschaften der
EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZUERICH

vorgelegt von

GERHARD WIDER

Dipl. Phys. ETH, Zürich
geboren am 19. März 1952
von Zürich

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. K. Wüthrich, Referent
Prof. Dr. R.R. Ernst, Korreferent

1982

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. K. Wüthrich, danke ich für seine Unterstützung und das grosse Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, sowie für die vielen fruchtbaren Diskussionen.

Besonderen Dank schulde ich Dr. Kuniaki Nagayama, der mich zu Beginn meiner Arbeit mit Rat und Tat unterstützte.

Im weiteren möchte ich danken: Dr. Adela Whitten-Chrzeszczyk für die Deuterierung der von mir verwendeten Detergentien; Dr. Kong Hung Lee für die Reinigung der Detergentien und seine Mitarbeit im "Glucagon-Projekt"; Dr. Werner Braun für seine Berechnungen mit dem Distanz-Geometrie-Algorithmus.

Danken möchte ich auch allen meinen Kolleginnen und Kollegen, die in unserer Gruppe arbeiten oder arbeiteten, insbesondere Dr. Regula Keller, Dr. Anil Kumar, Dr. Slobodan Macura, Dr. Gerhard Wagner, Dr. Larry R. Brown, Dr. Ramakrishna V. Hosur, Dr. Petr Strop, Martin Billeter und Hans Senn für die interessanten Diskussionen und Anregungen.

Frau Yvonne Hunziker bin ich für ihre Hilfe beim Zeichnen und Fotografieren der Figuren zu grossem Dank verpflichtet.

Herrn Rudolf Baumann und Herrn Albert Eugster gehört mein Dank für ihre kompetente und zuverlässige Betreuung der benützten Apparaturen.

Und nicht zuletzt danke ich meiner Frau Marianne für ihre wertvolle Hilfe beim Schreiben dieses Manuskripts.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1	Einführung	1
1.2	Die magnetische Kernresonanz-Spektroskopie	4
1.2.1	Die physikalischen Grundlagen des NMR-Experiments	4
1.2.2	Die chemische Verschiebung	5
1.2.3	Die Spin-Spin-Kopplung	5
1.2.4	Relaxationseffekte in der magnetischen Kernresonanz	7
1.3	Der Kern-Overhauser-Effekt (NOE)	9
1.3.1	Der NOE im Zweispin-Modell	9
1.3.2	Der NOE im Mehrspin-Modell	10
1.4	Magnetische Kernresonanz und Proteinkonformation	13
1.5	Glucagon	17
1.5.1	Glucagon: Struktur und Funktion	17
1.5.2	Auf Micellen gebundenes Glucagon	19

2. DIE ZWEIDIMENSIONALE MAGNETISCHE KERNRESONANZ-SPEKTROSKOPIE

2.1	Einführende Betrachtungen	20
2.1.1	Die Realisierung des zweidimensionalen Fouriertransform-NMR-Experiments	20
2.1.2	Die Anwendung von 2D Methoden auf die NMR-Spektroskopie von Polypeptiden und Proteinen	23

2.2	Die zweidimensionale J-aufgelöste Spektroskopie	26
2.2.1	Die 2DJ-Spektroskopie mit Ausnützung der Echobildung	26
2.2.2	Die 2DJ-Spektroskopie ohne Ausnützung der Echobildung	29
2.3	Die zweidimensionale korrelierte Spektroskopie	34
2.3.1	Die 2D korrelierte Spektroskopie ohne Ausnützung der Echobildung (COSY)	34
2.3.2	Die 2D Spin-Echo korrelierte Spektroskopie (SECSY)	38
2.3.3	Unterschiede zwischen dem COSY- und dem SECSY-Experiment	44
2.4	Das zweidimensionale NOE-Experimente (NOESY)	47
2.5	Die Datenverarbeitung in der 2D NMR-Spektroskopie	54
2.5.1	Die Aufnahme von 2D Daten	54
2.5.2	Die zweidimensionale Fouriertransformation	60
2.5.3	Auswertung von 2D Spektren	63
2.5.4	Die faltungskorrigierte Spektroskopie (FOCSY)	65

3. STUDIEN DER MANIFESTATION VON STARKEN SPIN-SPIN-KOPPLUNGEN IN DEN 2DJ-SPEKTREN DER 20 AMINOSÄUREN

3.1	Material und Methoden	69
3.2	Starke Kopplung in 2DJ-Spektren von Aminosäuren	72
3.2.1	Starke und schwache Kopplung im 2DJ-Spektrum von Histidin	72
3.2.2	ABX-Spinsysteme im 2DJ-Spektrum	74
3.2.3	Starke Kopplungseigenschaften in den 360 MHz 2DJ-Spektren der gewöhnlichen Aminosäuren	82

3.3	Durch zurückgefaltete Resonanzen verursachte Artefakte im 2DJ-Spektrum	86
3.4	Diskussion des Einflusses starker Kopplung auf 2DJ-Spektren von Proteinen	89
4.	RESONANZZUORDNUNGEN IM ^1H NMR-SPEKTRUM VON AUF MICELLEN GEBUNDENEM GLUCAGON MITTELS 2D NMR	
<hr/>		
4.1	Allgemeine Strategie für die sequenzielle Zuordnung von Polypeptid-Resonanzen mittels 2D ^1H NMR-Spektroskopie	91
4.2	Experimentelle Einzelheiten	94
4.3	Resonanzzuordnung im Spektrum von auf Micellen gebundenem Glucagon	97
4.3.1	Identifikation der Aminosäure-Seitenketten-Spinsysteme	97
4.3.2	Vorgehen um das ^1H NMR-Spektrum von auf Micellen gebundenem Glucagon zuzuordnen	104
4.3.3	Sequenzielle Zuordnungen mittels d_1 -, d_2 - und d_3 -Verbindungen in Glucagon 18 - 29	107
4.3.4	Individuelle Zuordnungen im Glucagonsegment 1 - 18	117
4.4	Diskussion der Zuordnungen im Glucagon-Spektrum	123
5.	UNTERSUCHUNG DER DREIDIMENSIONALEN STRUKTUR VON AUF MICELLEN GEBUNDENEM GLUCAGON MITTELS 2D NOE-MESSUNGEN	
<hr/>		
5.1	Dreidimensionale Strukturbestimmung mittels NMR-Experimenten	125
5.1.1	Grundlagen der Strukturbestimmung aus NMR-Daten	125

5.1.2	Der Einfluss der Flexibilität auf NOE-Messungen	127
5.2	Abschätzungen von Proton-Proton-Distanzen in auf Micellen gebundenem Glucagon mittels 2D NOE-Messungen	130
5.2.1	Beschreibung der durchgeführten Experimente	130
5.2.2	Die Interpretation von NOESY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten τ_m	131
5.3	Berechnungen mit dem Distanz-Geometrie-Algorithmus	145
5.4	Diskussion der Strukturstudien von an Micellen gebundenem Glucagon	152

ANHANG

A1.	DAS PROGRAMM "FOCSY" ZUR BERECHNUNG FALTUNGSKORRIGIERTER SPEKTREN	155
A2.	NOESY-SPEKTREN DES AUF MICELLEN GEBUNDENEN GLUCAGONS	167
	LITERATURVERZEICHNIS	183
	KURZFASSUNG	
	SUMMARY	
	LEBENS LAUF	

ABKÜRZUNGEN

NMR	magnetische Kernresonanz (<u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance)
NOE	<u>n</u> uklearer <u>O</u> verhauser- <u>E</u> ffekt
J	skalare Spin-Spin-Kopplungskonstante
δ	chemische Verschiebung
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
2DJ	zweidimensional J-aufgelöst
COSY	2D korrelierte Spektroskopie (2D <u>c</u> orrelated <u>s</u> pectroscopy)
SECSY	2D Spin-Echo korrelierte Spektroskopie (2D <u>s</u> pin <u>e</u> cho <u>c</u> orrelated <u>s</u> pectroscopy)
FOCSY	2D faltungskorrigierte Spektroskopie (2D <u>f</u> oldover <u>c</u> orrected <u>s</u> pectroscopy)
NOESY	2D NOE-Spektroskopie (2D <u>N</u> OE <u>s</u> pectroscopy)

1. EINLEITUNG

1.1 Einführung

Im lebenden Organismus spielen Polypeptide und Proteine eine entscheidende Rolle. Obwohl sie nur aus zwanzig verschiedenen Grundelementen, den Aminosäuren, aufgebaut sind, erfüllen sie bei allen Arten von Lebensvorgängen wichtige Funktionen, die sie sehr spezifisch und effizient ausführen. Will man die Funktion einer Zelle im Detail verstehen, muss man die Proteine charakterisieren und Zusammenhänge zwischen ihrer dreidimensionalen Struktur und ihrer Funktion finden. Die Struktur der gefalteten Polypeptidkette stellt den Ausgangspunkt dar zum tieferen Verständnis der molekularen Vorgänge, die in den komplexen biochemischen Reaktionen ablaufen.

Seit Jahren ist die Röntgenstrukturanalyse (Blundell und Johnson, 1976) die einzige Methode, welche die Bestimmung von detaillierten, dreidimensionalen Proteinstrukturen ermöglicht. Einige Nachteile dieser Methode können sich in Proteinstudien störend auswirken. Wenn Proteine überhaupt Kristalle bilden, geschieht dies oft nur unter unphysiologischen Bedingungen. Der Kristall selbst stellt zumindest für kleine Proteine und Polypeptide eine unphysiologische Umgebung dar, durch die eine "falsche" Konformation induziert werden kann. Die Röntgenstrukturanalyse liefert nur sehr wenig Information über die Dynamik eines Proteins, die für dessen Funktion sehr wichtig sein kann, obwohl mit Messungen bei verschiedenen Temperaturen versucht wird, dynamische Aspekte zu untersuchen. Aus diesen Gründen sind komplementäre Techniken wichtig, welche detaillierte Strukturstudien in Lösung und anderen nicht kristallinen Umgebungen ermöglichen.

Die einzige andere Messtechnik, die im Prinzip die nötige Informations-

dichte besitzt, um dreidimensionale Strukturen zu bestimmen, ist die magnetische Kernresonanz-Spektroskopie (NMR: nuclear magnetic resonance). Die Anwendungen von NMR in den letzten zehn bis fünfzehn Jahren beweisen, dass dies eine der fruchtbarsten Methoden ist zur Untersuchung von Makromolekülen in Lösung (z.B. Govil und Hosur, 1982; Wüthrich, 1976). Von den Kernen, die in Proteinen am häufigsten auftreten (H, C, N, O), nimmt das Proton bei Proteinstudien mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eine Vorzugsstellung ein. Diese basiert auf der grossen Häufigkeit des Protons und seiner hohen Empfindlichkeit für NMR-Messungen. In dieser Arbeit werden ausschliesslich ^1H NMR-Methoden verwendet. Die offensichtlichste Information im NMR-Spektrum liegt in der Resonanzposition der einzelnen Protonen, die von der Konformation abhängt. Die Zusammenhänge sind jedoch zu komplex, so dass sich diese Information nicht mit einer möglichen Struktur verknüpfen lässt. Andere Methoden, vor allem der Kern-Overhauser-Effekt (NOE: nuclear overhauser effect), der Auskunft über räumlich nahe Kerne gibt, erlauben einen viel direkteren Zugang zu Daten über die dreidimensionale Struktur. Um den Informationsgehalt eines Proteinspektrums voll ausnutzen zu können, müssen hunderte von Resonanzen individuell einzelnen Protonen in der chemischen Struktur des Makromoleküls zugeordnet werden, was bis heute ein limitierender Faktor war in der Anwendung der NMR-Technik.

Einen entscheidenden Fortschritt in der magnetischen Kernresonanz-Spektroskopie von Proteinen brachte die Anwendung von zweidimensionalen (2D) ^1H NMR-Methoden. Die Kombination zweier 2D Techniken ermöglicht es, Spektren von Polypeptiden und kleineren Proteinen vollständig zuzuordnen (Kap. 4). Damit ist die Information, die ein NMR-Spektrum enthält, voll zugänglich und lässt sich zur Untersuchung der Konformation (Wüthrich et al., 1982) oder dynamischer Aspekte nutzen. Durch die Anwendung zweidimensionaler Techniken ist die Kern-Resonanz-Spektroskopie den Möglichkeiten, welche die Röntgenstrukturanalyse für Studien der Konformation bietet, einen entscheidenden Schritt näher gekommen.

In dieser Arbeit wird das Polypeptidhormon Glucagon (ein Antagonist von Insulin) untersucht, welches auf vollständig deuterierten Dodecylphosphocholin-Micellen gebunden ist. Dieses Modellsystem wurde gewählt, weil Lipide eine fundamentale Rolle bei der Bindung und Funktion von Glucagon besitzen und weil der Rezeptor noch nicht isoliert werden konnte. Durch die Verwendung von 2D NMR-Methoden gelang eine beinahe vollständige Resonanzzuordnung im ^1H NMR-Spektrum von auf Micellen gebundenem Glucagon (Kap. 4). Diese Daten bilden die Grundlage für eine Strukturbestimmung, die auf Abschätzungen von Proton-Proton-Distanzen beruht, welche aus NOE-Daten gewonnen wurden (Kap. 5).

Zusätzlich zu den Untersuchungen des Glucagon-Micellen-Komplexes bildete die allgemeine Anwendung von 2D NMR-Methoden auf Polypeptide und Proteine einen weiteren Schwerpunkt meiner Arbeit (Kap. 2, Kap. 3).

1.2 Die magnetische Kernresonanz-Spektroskopie

In diesem Kapitel möchte ich (für in der NMR-Spektroskopie ungeübte Leser) die Grundprinzipien der magnetischen Kernresonanz (NMR) beschreiben, soweit sie für das Verständnis dieser Arbeit notwendig sind. Für eine detaillierte, theoretische Beschreibung sei auf Abragam (1962), Bovey (1969) und Slichter (1978), für eine Darstellung von hochauflösender NMR-Spektroskopie in der biologischen Forschung auf Wüthrich (1976) verwiesen.

1.2.1 Die physikalischen Grundlagen des NMR-Experiments

Die magnetischen Eigenschaften der Atomkerne bilden die Grundlage der Kernresonanz-Spektroskopie. Die Atomphysik lehrt, dass Kerne einen Spin I besitzen, der zu $2I+1$ Energiezuständen führt, die verschiedene magnetische Quantenzahlen $m_I = -I, -I+1, \dots, 0, \dots, I-1, I$ aufweisen. Diese Energiezustände sind im allgemeinen entartet. Sie werden erst in einem äusseren, statischen Magnetfeld energetisch unterschiedlich durch die Wechselwirkung zwischen diesem Magnetfeld und dem magnetischen Kernmoment, welches eng mit dem Kernspin ("Drehimpuls") verknüpft ist. Im folgenden sollen nur Kerne mit Spin $1/2$ betrachtet werden (z.B. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P). Die Energiedifferenz ΔE der zwei Zustände in einem statischen, homogenen, äusseren Magnetfeld H_0 beträgt

$$\Delta E = h\nu_0 = \gamma h H_0 / 2\pi \quad (1.1)$$

wobei h die Planck'sche Konstante, ν_0 die Kernresonanzfrequenz und γ das gyromagnetische Verhältnis bedeuten. Strahlt man mit Radiowellen der Frequenz ν_0 ein, können Uebergänge zwischen den Energiezuständen induziert werden, wobei Energie aus dem elektromagnetischen Feld absorbiert wird. Typische Resonanzfrequenzen ν_0 liegen für Protonen zwischen 60 und 500 MHz.

1.2.2 Die chemische Verschiebung

Die Bedeutung der magnetischen Kernresonanz für die Chemie und Molekularbiologie beruht vor allem auf der Abhängigkeit der Resonanzfrequenz der einzelnen Kerne von der chemischen und räumlichen Struktur der Umgebung. Diesen Effekt nennt man chemische Verschiebung δ . Das äussere Magnetfeld H_0 induziert in der Elektronenwolke magnetische Momente, die dem Erregerfeld entgegenwirken. Am Ort des Atomkerns herrscht damit eine geringere Feldstärke H_{lokal} mit

$$H_{\text{lokal}} = H_0 (1 - \sigma) \quad (1.2)$$

wo σ die Abschirmkonstante bedeutet, die im allgemeinen, anisotropen Fall einen Tensor darstellt. Die Stärke der Abschirmung, die chemische Verschiebung δ , misst man in der Einheit $H_0 / 10^6 = \text{ppm}$ (parts per million), um einen von der Feldstärke unabhängigen Messwert zu bekommen. Die Messung erfolgt relativ zu einer Standardsubstanz, deren ppm-Wert z.B. als Null definiert wird.

Durch unterschiedliche Abschirmeffekte verteilen sich die Resonanzen in einem Protonenspektrum eines diamagnetischen Proteins auf etwa 10 ppm. Die Abschirmeffekte lassen sich verschiedenen Ursachen zuordnen (Abragam, 1962), die einen groben qualitativen Eindruck ergeben, wo die Resonanzfrequenz eines bestimmten Protons im Spektrum liegt. Für die Anwendung der ^1H NMR-Methode auf Proteine sind vor allem experimentell gefundene Standardwert für die chemische Verschiebung δ von Bedeutung, die in kleinen Peptiden gemessen wurden (Bundi und Wüthrich, 1979a).

1.2.3 Die Spin-Spin-Kopplung

Spin-Spin-Kopplung nennt man die magnetische Wechselwirkung zwischen Kernen, die nicht über den Raum sondern indirekt durch die Elektronen

der chemischen Bindungen vermittelt wird. Diese skalare Kopplung ist über drei bis vier chemische Bindungen wirksam und verursacht die Aufspaltung einer Resonanz in ein Multiplett. Kerne zwischen denen eine Spin-Spin-Kopplung besteht, nennt man Spinsysteme. In Proteinen bilden einzelne Aminosäurereste solche Spinsysteme, da Kopplungen zwischen Protonen nur innerhalb dieser Reste auftreten. Mit verschiedenen Methoden lassen sich gekoppelte Kerne im Spektrum auffinden, was zur eindeutigen Identifikation einzelner Aminosäurereste dienen kann (Kap. 4).

Die vicinale Kopplungskonstante 3J hängt vom Torsionswinkel θ ab. Der Zusammenhang lässt sich wie folgt formulieren (Karplus, 1959 und 1963)

$$^3J = A - B \cos\theta + C \cos^2\theta \quad (1.3)$$

wobei die Konstanten A, B, C an bekannten Konformationen geeicht werden müssen (DeMarco et al., 1978a+b). Eine Messung der Kopplungskonstanten ergibt damit Information über die Struktur der untersuchten Substanz.

Die Differenz der chemischen Verschiebung zweier gekoppelten Resonanzen sei $\Delta\delta$ und J ihre Kopplungskonstante; gilt $\Delta\delta \gg J$, spricht man von schwach gekoppelten Kernen und sonst von stark gekoppelten Kernen. In einer Kurznotation charakterisiert man Spinsysteme mit Grossbuchstaben. Für stark gekoppelte Kerne verwendet man im Alphabet benachbarte Buchstaben und für schwach gekoppelte Spinsysteme solche, die weiter entfernt liegen (Pople et al., 1959). Kerne mit gleicher chemischer Verschiebung bezeichnet man mit demselben Grossbuchstaben, wobei man für magnetisch nichtäquivalente Kerne gestrichene Buchstaben benützt. Ein $ABMX_3$ -System bedeutet also, dass von sechs Spin drei magnetisch äquivalent und zwei stark gekoppelt sind. $AA'BB'C$ bezeichnet z.B. das Spinsystem der aromatischen Protonen in Phenylalanin.

1.2.4 Relaxationseffekte in der magnetischen Kernresonanz

Die makroskopische Magnetisierung \vec{M} , welche die Kernspins in einem statischen, homogenen Magnetfeld \vec{H}_0 verursachen, liegt parallel zu \vec{H}_0 . Legt man für eine sehr kurze Zeit t_p ein zu \vec{H}_0 senkrechtes, zirkular polarisiertes Magnetfeld an, lässt sich \vec{M} durch die richtige Wahl von t_p invertieren. Man spricht in diesem Fall von einem 180° -Puls. Schaltet man das Zusatzfeld schon nach der Zeit $t_p/2$ aus (90° -Puls), präzessiert \vec{M} senkrecht zu \vec{H}_0 und induziert damit in einer die Kerne umgebenden Spule eine Spannung. Durch die Messung und nachfolgende Fouriertransformation dieser Spannung erhält man das NMR-Spektrum. Die Magnetisierung \vec{M} erreicht nach einer gewissen Zeit wieder ihre Gleichgewichtslage \vec{M}_0 parallel zu \vec{H}_0 , weil die Spins mit ihrer Umgebung, dem sogenannten Gitter, wechselwirken und dabei Energie verlieren. Diesen Vorgang nennt man freien Induktionszerfall (FID: free induction decay). Die Relaxation der z-Komponente von \vec{M} , die parallel dem äusseren Feld \vec{H}_0 sei, gehorcht einem Zeitgesetz erster Ordnung

$$dM_z / dt = (M_0 - M_z) / T_1 \quad (1.4)$$

T_1 nennt man sinngemäss longitudinale oder Spin-Gitter Relaxationszeit.

Die x,y-Komponente von \vec{M} , die sogenannte transversale Magnetisierung M_{xy} , kann reduziert werden, ohne dass gleichzeitig die longitudinale Komponente (M_z) anwächst. Der Betrag von M_{xy} hängt davon ab, ob die einzelnen Kernmomente in Phase präzessieren. Geht die Phasenkohärenz verloren, z.B. infolge benachbarter, magnetischer Dipole oder infolge der Feldinhomogenität, strebt der Betrag von M_{xy} gegen Null. Die Relaxation der transversalen Magnetisierung wird ebenfalls mit einem Zeitgesetz erster Ordnung beschrieben

$$dM_{xy} / dt = -M_{xy} / T_2 \quad (1.5)$$

T_2 nennt man transversale oder Spin-Spin-Relaxationszeit.

Zur Relaxation der Spins können nur zeitlich fluktuierende Wechselwirkungen beitragen, die Frequenzkomponenten aufweisen, welche gleich der Larmorfrequenz sind (Abragam, 1962). Der dominierende Relaxationsmechanismus bei der Anwendung von ^1H NMR auf Lösungen von Proteinen ist die Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Diese verursacht fluktuierende Magnetfelder $\vec{H}_F(t)$, welche die Phasenkohärenz der Spins zerstören und damit T_2 beeinflussen. Die Komponenten von $\vec{H}_F(t)$, die in der x,y -Ebene liegen, üben ein Drehmoment auf die x,y -Magnetisierung M_{xy} aus und ändern dadurch M_z , was eine longitudinale Relaxation bedeutet.

1.3 Der Kern-Overhauser-Effekt (NOE)

1.3.1 Der NOE im Zweispin-Modell

Der Kern-Overhauser-Effekt (NOE: nuclear overhauser effect) ist eng mit der T_1 -Relaxation verknüpft. Solomon (1955) berechnet für ein System von zwei Spin $1/2$ I und S, das zeitliche Verhalten der z-Komponenten der Magnetisierungen, die parallel zum äusseren Magnetfeld liegen

$$d\langle I_z \rangle / dt = - \rho_I (\langle I_z \rangle - I_0) - \sigma (\langle S_z \rangle - S_0) \quad (1.6)$$

$$d\langle S_z \rangle / dt = - \rho_S (\langle S_z \rangle - S_0) - \sigma (\langle I_z \rangle - I_0) \quad (1.7)$$

I_0 und S_0 bedeuten die Gleichgewichtsmagnetisierungen und es gilt $\rho_I = \rho_S = \rho$, wenn die Spins I und S zum gleichen Isotop gehören. Das gekoppelte Differentialgleichungssystem zeigt, dass eine Störung der Spins S sich auf die Spins I auswirkt und umgekehrt. Dieses Phänomen nennt man den Kern-Overhauser-Effekt. Bei einer NOE-Messung verändert man den Zustand der Spins S durch selektives Einstrahlen und beobachtet, wie sich dies auf die Spins I auswirkt. Zur Grösse σ , welche die Stärke der Kopplung beschreibt, können nur Relaxationsprozesse beitragen, die die Spins I und S miteinander koppeln, d.h. die Dipol-Dipol-Wechselwirkung und die skalare Spin-Spin-Kopplung. Es tragen nur zeitliche Fluktuationen dieser Wechselwirkungen zur Relaxation bei, deren Autokorrelationsfunktion einen spektralen Anteil der Larmorfrequenz besitzt und es hat sich gezeigt, dass in guter Näherung die skalare Spin-Spin-Kopplung vernachlässigt und ausschliesslich die Dipol-Dipol-Wechselwirkung betrachtet werden kann (Noggle und Schirmer, 1971). Unter der Annahme isotroper Fluktuationen und eines konstanten Abstands $|\vec{r}|$ zwischen zwei Protonen berechnet sich σ zu (Solomon, 1955)

$$\sigma = \frac{\gamma^4 h^2}{40\pi^2 r^6} \left(\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} - \tau_c \right) \quad (1.8)$$

wobei γ das gyromagnetische Verhältnis, h das Planck'sche Wirkungsquantum und ω die Larmorfrequenz bedeuten. Die Korrelationszeit τ_c beschreibt den Abfall der Autokorrelationsfunktion der Fluktuationen der Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Mit denselben Annahmen gilt für die Grösse ρ

$$\rho = \bar{\rho} + \frac{\gamma^4 h^2}{40\pi r^6} \left(\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (1.9)$$

In $\bar{\rho}$ sind alle anderen Relaxationsmechanismen zusammengefasst, welche die Spins I und S voneinander unabhängig relaxieren lassen.

Die für diese Arbeit wichtige Methode den NOE zu messen, besteht in der Anwendung eines 180° -Pulses mit der Resonanzfrequenz der Spins S zur Zeit $t = 0$ und der Beobachtung der Spins I. Mit diesen Anfangsbedingungen berechnete Solomon (1955) die zeitliche Entwicklung der Spins I zu

$$(\langle I_z \rangle - I_0) / S_0 = \exp(-(\rho - \sigma) t) - \exp(-(\rho + \sigma) t) \quad (1.10)$$

Für kleine Zeiten t gilt in erster Näherung

$$(\langle I_z \rangle - I_0) / S_0 = 2 \sigma t \quad (1.11)$$

Die Aufbaukurve des NOE ist für kleine Zeiten t direkt proportional zu σ und damit zur inversen sechsten Potenz des Abstands der zwei Kerne (Gleichung (1.8)). Die extreme Abhängigkeit von der sechsten Potenz des Abstandes ermöglicht es, nichtgebundene, räumlich sehr nahe Kerne festzustellen, wenn sie im NMR-Spektrum einen NOE zeigen.

1.3.2 Der NOE im Mehrspin-Modell

Ein Protein enthält viele Protonen, die durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen untereinander verbunden sind. Eine Verallgemeinerung der Gleichung

chungen (1.6) und (1.7) ist darum unumgänglich (Kalk und Berendsen, 1976)

$$d\langle I_{zi} \rangle / dt = \rho_i (\langle I_{zi} \rangle - I_{oi}) - \sum_{i \neq j} \sigma_{ij} (\langle I_{zj} \rangle - I_{oj}) \quad (1.12)$$

Aus diesem gekoppelten Differentialgleichungssystem ist ersichtlich, dass eine Störung, die nur den Spin j aus dem Gleichgewicht bringt, sich allmählich auf alle Spins im System auswirkt. Dieses Phänomen nennt man Spin-Diffusion.

Invertiert man in diesem Multispinsystem z.B. den Spin j, führt dies zu folgenden Anfangsbedingungen

$$(\langle I_{zj} \rangle - I_{oj}) \Big|_{t=0} = -2I_{oj} \quad (1.13)$$

$$(\langle I_{zi} \rangle - I_{oi}) \Big|_{t=0} = 0 \quad \forall i \neq j \quad (1.14)$$

Damit berechnet sich aus dem Differentialgleichungssystem (1.12)

$$d\langle I_{zi} \rangle / dt \Big|_{t=0} = 2 \sigma_{ij} I_{oj} \quad (1.15)$$

Die Steigung der NOE-Aufbaukurve bei $t = 0$ ist proportional zu σ_{ij} oder anders ausgedrückt, es gilt in erster Näherung für kleine Zeiten t wie im Zweispin-Modell

$$(\langle I_{zi} \rangle - I_{oi}) / I_{oj} = 2 \sigma_{ij} t \quad (1.16)$$

Diese Näherung gilt nur, falls sich zwischen den zwei betrachteten Spins kein dritter befindet, durch den die Magnetisierung weitergegeben wird (Spin-Diffusion).

In einem starren Protein, das isotrope Bewegungen ausführt, wäre die Korrelationszeit der Fluktuationen der Dipol-Dipol-Wechselwirkung für alle Protonenpaare gleich und gleich der Rotationskorrelationszeit τ_R

des Moleküls, die sich für eine Kugel mit Radius R wie folgt berechnet

$$\tau_R = 4\pi\eta R^3 / 3kT \quad (1.17)$$

mit der Viskosität der Lösung η , der Boltzmannkonstanten k und der absoluten Temperatur T . Für die Werte von σ_{ij} gilt in dieser Näherung die verallgemeinerte Formel (1.8)

$$\sigma_{ij} = \frac{\gamma^4 h^2}{40\pi r_{ij}^6} \left(\frac{6\tau_R}{1 + 4\omega^2 \tau_R^2} - \tau_R \right) \quad (1.18)$$

Die extreme Abhängigkeit der NOE-Aufbaukurve von der sechsten Potenz des Abstandes zweier Protonen (r_{ij}^{-6}) bleibt im Multispinsystem erhalten und damit die Möglichkeit durch NOE-Messungen räumlich nahe Protonen in der dreidimensionalen Struktur von Proteinen zu bestimmen.

Die Annahme eines starren Proteins bedeutet eine zu grosse Vereinfachung, in einer realistischeren Näherung müssen die intramolekularen Bewegungen berücksichtigt werden, welche zu Änderungen der interatomaren Vektoren relativ zum äusseren Magnetfeld führen und auch die Proton-Proton-Distanzen r_{ij} ändern. Die Theorie für diesen verallgemeinerten Fall ist noch nicht weit entwickelt (Noggle und Schirmer, 1971; Kalk und Berendsen, 1976; Olejniczak et al., 1981). Braun et al. (1981) berechneten eine Abschätzung des Kern-Overhauser-Effekts für zwei Protonen, deren Abstand sich innerhalb gewisser Grenzen einheitlich ändert. Dieses Modell wird in Kapitel 5 ausführlich diskutiert.

1.4 Magnetische Kernresonanz und Proteinkonformation

Die vielen Arbeiten der letzten Jahre, welche die magnetische Kernresonanz in der biologischen Forschung anwenden (siehe Referenzen in Wüthrich (1976) und in Govil und Hosur (1982)), beweisen, dass sich die magnetische Kernresonanz neben der Röntgenstrukturanalyse zur zweiten wichtigen Messmethode entwickelt, die detaillierte Konformationsstudien erlaubt. Bis heute beruht der Erfolg vor allem auf lokalen Untersuchungen in Proteinen. Die volle Information des ^1H NMR-Spektrums liess sich meistens nicht ausnutzen, weil die notwendigen Zuordnungen von Resonanzen zu einzelnen Protonen im Makromolekül fehlten. Dieses Problem konnte nun für Polypeptide und kleinere Proteine weitgehend gelöst werden. Einen wesentlichen Fortschritt brachte die Anwendung zweidimensionaler NMR-Methoden (Kap. 4), mit denen durch sequenzielles Vorgehen entlang dem Polypeptidrückgrat eine vollständige Zuordnung des NMR-Spektrums möglich ist. Diese Methode erlaubt nun die Informationsfülle von Proteinspektren bedeutend besser auszunützen und auf das Studium struktureller und dynamischer Eigenschaften von Proteinen in Lösung und in anderen nicht-kristallinen Umgebungen anzuwenden.

Betrachtet man die NMR-Spektren verschiedener Moleküle, erscheint es offensichtlich, dass sich die Konformation einer Substanz auf ihr Spektrum auswirkt. Das Problem besteht in der Unterscheidung der verschiedenen Ursachen. Der Zusammenhang der chemischen Verschiebung und der Relaxationsparameter mit der dreidimensionalen Struktur ist sehr komplex und es lassen sich daher nicht die umfassenden Daten gewinnen, die eine vollständige Bestimmung der Konformation eines Makromoleküls erlauben. Das heisst nun nicht, dass diese Parameter nutzlos sind, für lokale Studien und allgemeine Aussagen können sie durchaus die nötigen experimentellen Daten ergeben (Wüthrich, 1976).

Ein direkter, aber mehrdeutiger Zusammenhang besteht zwischen den Dihedralwinkeln und den vicinalen (^3J) Proton-Proton-Kopplungskonstanten,

die damit Information über die Struktur ergeben. Empirische Funktionen beschreiben die Beziehungen zwischen den 3J -Kopplungskonstanten und den Dihedralwinkeln ϕ und χ , die in Figur 1.1 definiert sind. Karplus (1959 und 1963) berechnete allgemeine Funktionen, die experimentell geeicht wurden (DeMarco et al., 1978a+b)

$$^3J(\phi) = 2.2 - 1.3 \cos\phi + 5.4 \cos^2\phi \quad (1.19)$$

$$^3J(\chi) = 1.8 - 1.6 \cos\chi + 9.5 \cos^2\chi \quad (1.20)$$

Für eine systematische Strukturuntersuchung sind vor allem die Winkel ϕ und ψ entlang dem Polypeptid-Rückgrat interessant. Da für jedes C^α -Atom zwei Dihedralwinkel bestimmt werden müssen, genügen die Proton-Proton-Kopplungskonstanten alleine nicht zur Strukturbestimmung. Zusätzlich kann die Fehlersummation entlang der Polypeptid-Kette für entferntere Kerne zu falschen Positionen führen.

Weitere Information über die dreidimensionale Struktur gibt der Kern-Overhauser-Effekt (NOE), der eng mit dem T_1 -Relaxationsprozess verknüpft ist und der Auskunft über räumlich nahe Protonen gibt. Ursprünglich wurde der Gleichgewichtszustand des NOE gemessen. Auf Makromoleküle im hohen Magnetfeld lässt sich diese Methode jedoch nicht anwenden, weil die Spin-Diffusion eine wesentliche Rolle spielt (Kalk und Berendsen, 1976; Stoesz et al., 1978). Dabei überträgt sich der NOE von einem Spin auf den nächsten und von dort auf weitere Spins, so dass nicht mehr zwischen nächsten Nachbarn unterschieden werden kann. Wie aber bereits die Theorie von Solomon (1955) und weitere Arbeiten (Kalk und Berendsen, 1976; Noggle und Schirmer, 1971; Wagner und Wüthrich, 1979) zeigen, ist die Anfangssteigung der NOE-Aufbaukurve von der inversen sechsten Potenz des Abstandes zweier benachbarter Protonen abhängig (Kap. 1.3). Mit einer passenden Wahl der experimentellen Bedingungen kann man damit den störenden Einfluss der Spin-Diffusion verkleinern und den Kern-Overhauser-Effekt auch erfolgreich auf Studien in Makromolekülen anwenden (Gordon und Wüthrich, 1978; Olejniczak et al., 1981).

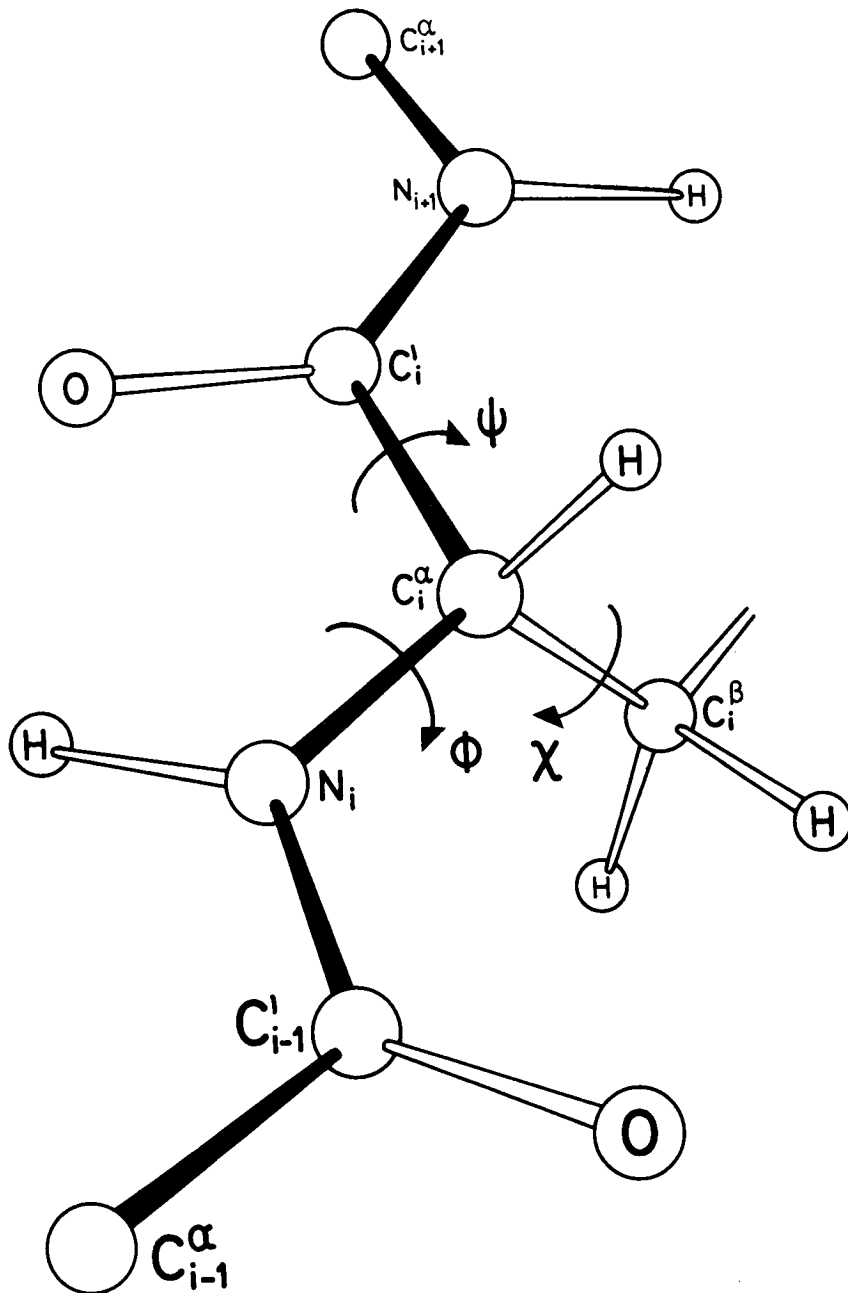


Fig. 1.1

Primärstruktur eines Peptidsegmentes. Die einzigen Bewegungen, die leicht möglich sind, sind die Rotationen um die $N-C^\alpha$ -, $C^\alpha-C'$ - und die $C^\alpha-C^\beta$ -Einfachbindungen. Die Drehungen werden durch die Dihedralwinkel ϕ , ψ und χ angegeben; letzterer beschreibt die räumliche Anordnung der Aminosäure-Seitenkette. Die Bindungen des Peptidrückgrates sind schwarz eingezeichnet.

Der NOE stellt die direkteste Verbindung her zwischen Distanzen in der dreidimensionalen Struktur eines Makromoleküls und einem NMR-Parameter. Mit einer zweidimensionalen NOE-Messung (Kap. 2.4) lassen sich im Prinzip alle räumlich nahen Protonen finden, die zusammen mit den chemischen Bindungen eine Konformation weitgehend bestimmen. Dies gibt die Möglichkeit, systematische Strukturuntersuchungen durchzuführen, die nur auf NMR-Daten beruhen (Kap. 5). Diese Untersuchungen werden wesentlich durch einen Distanzalgorithmus (Crippen, 1979) unterstützt, der aus oberen und unteren Grenzen für die Distanzen von n Punkten eine mögliche dreidimensionale Anordnung für diese n Punkte berechnet (Braun et al., 1981).

1.5 Glucagon

1.5.1 Glucagon: Struktur und Funktion

Glucagon gehört zu den Polypeptidhormonen und besteht aus 29 Aminosäuren (Fig. 1.2A) mit einem Molekulargewicht von 3485. Es wird in den α -Zellen der Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse gebildet. Das hauptsächliche Zielorgan von Glucagon ist die Leber. Dort verursacht es eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels durch Stimulierung der Bildung von Glucose aus Lactat und durch die Aktivierung der Adenylat-Zyklase, welche den Abbau von Glykogen zu Glucose bewirkt. Der erste Schritt in diesem Prozess besteht in der Erkennung eines Membranrezeptors, der die Aktivierung der Adenylat-Zyklase auf der Innenseite der Membran vermittelt. Bei der Bindung und Funktion von Glucagon spielen die den Rezeptor umgebenden Lipide eine wesentliche Rolle (Levey, 1973; Rodbell et al., 1971; Rubalcava und Rodbell 1973). Studien mit Teilsequenzen von Glucagon zeigten, dass das aminoternale Ende mit His 1 zur Aktivität gebraucht wird und dass die carboxylterminale Region wesentlich zur Bindung beiträgt (Frandsen et al., 1981 und dort angegebene Referenzen).

Glucagon besitzt keine definierte Konformation wie etwa globuläre Proteine, sondern es nimmt eine seiner Umgebung angepasste Konformation ein. Um mehr über die Struktur und Funktion von Glucagon zu erfahren, wurden darum Strukturuntersuchungen in verschiedenen Modellsystemen unternommen; der Rezeptor selbst konnte biochemisch noch nicht charakterisiert werden. Im Kristall bildet Glucagon Trimere mit hohem α -Helix-Gehalt und ungeordnetem Aminoende (Sasaki et al., 1975). In verdünnter wässriger Lösung hingegen ist Glucagon weitgehend flexibel mit einer lokalen Struktur am Carboxylende (Bösch et al., 1978; Panijpan und Gratzner, 1974). Bei erhöhter Konzentration tritt eine Selbstaggregation auf, bei der Trimere gebildet werden (Gratzner et al., 1972), die eine helikale Konformation induzieren. In einem Gemisch von hydrophoben und

hydrophilen Lösungsmitteln (Contaxis und Epanand, 1973) oder bei der Wechselwirkung von Glucagon mit Detergentien und Lipiden wird ebenfalls eine Konformationsinduktion beobachtet, die nach optischen Studien in einer Zunahme des α -Helix-Gehalts resultiert (Epanand, 1978 und dort angegebene Referenzen).

1.5.2 Auf Micellen gebundenes Glucagon

Glucagon tritt für seine Funktion mit einem noch unbekanntem Rezeptor und den umgebenden Lipiden in Wechselwirkung. Will man detaillierte Konformationsstudien betreiben, stellt sich die Frage nach einem geeigneten Modellsystem, welches eine dem Rezeptor ähnliche Umgebung simuliert. Für NMR-Studien boten sich deuterierte Micellen an. Obwohl Micellen eine starke Abstraktion von den natürlichen Membranen darstellen, bleibt ein wesentliches Charakteristikum der Membranen erhalten: die Bildung einer hydrophoben-hydrophilen Grenzfläche. Oberhalb einer bestimmten Konzentration, der sogenannten kritischen Micellenkonzentration (CMC), bilden Detergentienlösungen die gewünschten Micellen. Das für die Studien mit Glucagon verwendete Detergens Dodecylphosphocholin ist in Fig. 1.2B dargestellt (CMC = 1.2 mM in 50 mM Phosphatpuffer, pH = 7, T = 24°C).

Die Micellenkomplexe aus Glucagon und Dodecylphosphocholin wurden mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden charakterisiert (Bösch et al., 1980; Brown et al., 1981). Für Glucagonkonzentrationen von 0.001 bis 0.006 M und einen 50-fachen Ueberschuss an Detergensmolekülen fanden Bösch et al. (1980) einheitliche Komplexe, die sich aus einem Glucagonmolekül und etwa 40 Detergensmolekülen aufbauen und ein Molekulargewicht von rund 17'000 aufweisen. Die Komplexe besitzen einen Durchmesser von etwa 56 Å (Hydrathülle eingeschlossen). Untersuchungen mit eingeführten Fettsäureradikalen zeigen, dass das Glucagonrückgrat etwa parallel zur Micellenoberfläche verläuft und zwar in einer Tiefe, die ungefähr der Länge einer Seitenkette entspricht (Brown et al., 1981).

2. DIE ZWEIDIMENSIONALE MAGNETISCHE KERNRESONANZ - SPEKTROSKOPIE

2.1 Einführende Betrachtungen

2.1.1 Die Realisierung des zweidimensionalen Fouriertransform-NMR- Experiments

In einem gewöhnlichen NMR-Experiment misst man heutzutage meistens den freien Induktionszerfall (FID) (Kap. 1.2.4). Durch eine Fouriertransformation dieses Signals erhält man das NMR-Spektrum. Ein zweidimensionales Experiment erfordert die Messung des Signals in Funktion von zwei unabhängigen Zeitvariablen; durch eine zweidimensionale (2D) Fouriertransformation wird daraus ein 2D Spektrum berechnet. Eine zweite Zeitvariable lässt sich nur durch eine Unterteilung der Zeitachse einführen. Während einer gewissen Zeit t_1 werden die Spins gezwungen irgendwelche, vorgeschriebenen Bewegungen auszuführen. Der Empfänger bleibt während der ganzen Zeit t_1 ausgeschaltet. Erst anschliessend an t_1 wird das Signal als Funktion der Zeitvariablen t_2 gemessen. Die Phase und die Amplitude des gemessenen Signals hängen davon ab, was während der Zeit t_1 mit den Spins geschah. Inkrementiert man nun t_1 systematisch über einen bestimmten Wertebereich und misst für jedes t_1 das zugehörige Signal, erhält man eine FID-Datenmatrix $S(t_1, t_2)$.

Aus dem Datensatz $S(t_1, t_2)$ erhält man durch eine zweidimensionale Fouriertransformation Information über das Verhalten der Spins nicht nur während t_2 , sondern auch während t_1 . Das Resultat ist ein zweidimensionales (2D) Spektrum $S(\omega_1, \omega_2)$ mit zwei zueinander senkrechten Frequenzachsen und einer dreidimensionalen Oberfläche. Eine Resonanz in diesem

Spektrum verbindet das Verhalten eines bestimmten Signals während t_1 mit seinem Verhalten während t_2 .

Ein allgemeines 2D Experiment lässt sich in vier Zeitabschnitte unterteilen, die entsprechend ihrer physikalischen Bedeutung benannt sind (Fig. 2.1):

$t < 0$: Vorbereitungsperiode. Ausgehend von einem relaxierten System wird ein passender Anfangszustand präpariert.

$0 < t < t_1$: Entwicklungsperiode. Während dieser Zeit entwickelt sich das System und befindet sich am Ende der Periode in einem bestimmten Zustand, der unter anderem von t_1 abhängt, das von einer Messung zur anderen systematisch inkrementiert wird.

$t_1 < t < t_1 + \tau_m$: Mischzeit. In diesem Zeitabschnitt mischen sich die Magnetisierungskomponenten während der festen Zeit τ_m . Diese Periode tritt nicht in allen 2D Experimenten auf.

$t_1 + \tau_m < t$: Detektionsperiode. Die transverse Magnetisierung wird als Funktion der Zeitvariablen t_2 gemessen. Nur während dieser Zeit ist der Empfänger eingeschaltet.

Ein 2D Spektrum (Fig. 2.1) enthält im allgemeinen drei verschiedene Typen von Signalen (Aue et al., 1976):

Axiale Resonanz: Sie liegt auf der ω_2 -Achse und enthält keine 2D Information. Diese Resonanz wird durch Magnetisierung erzeugt, die in der Zeitperiode vor dem Detektionspuls relaxiert ist. Normalerweise wird sie durch Phasenänderungen der Pulse unterdrückt.

Diagonale Resonanz: Diese Linie liegt auf oder nahe der Diagonalen $-\omega_1 = \omega_2$. Sie wird verursacht durch Magnetisierung, die während t_1 und t_2 dieselbe Resonanzfrequenz besitzt oder die innerhalb desselben Spinmultipletts auf eine andere Resonanz übertragen wird.

Crosspeak: Diese Resonanz ist im allgemeinen am interessantesten, sie liegt in einiger Entfernung von der Diagonalen und bedeutet eine Verbindung zwischen zwei Resonanzfrequenzen von Kernen, die sich

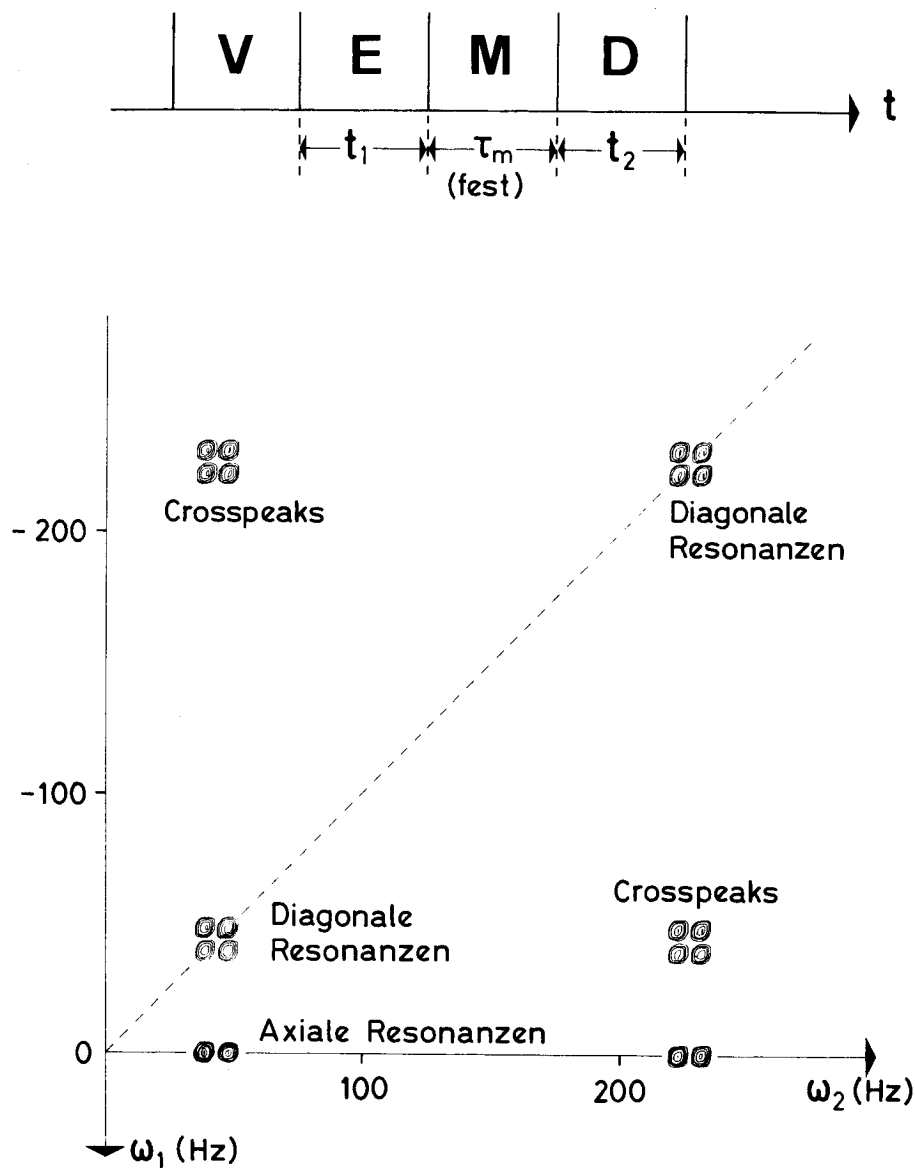


Fig. 2.1

Das Schema oben veranschaulicht die Segmentierung der Zeitachse in einem 2D Experiment; V: Vorbereitungsperiode, E: Entwicklungsperiode, M: Mischzeit, D: Detektionsperiode. Das 2D Spektrum zeigt die gebräuchlichen Definitionen der drei auftretenden Resonanztypen: axiale und diagonale Resonanzen und Crosspeaks. Warum alle Resonanzen bei negativen ω_1 -Werten liegen, wird in Kapitel 2.3.1 diskutiert. Die Figur stellt ein 2D korreliertes Betragsspektrum (Kap. 2.3.1) des AX-Spinsystems von 2,3,4-Trichlorphenol dar. ($T = 37^\circ\text{C}$).

auf irgendwelche Art gegenseitig beeinflussen.

Figur 2.1 illustriert die verschiedenen Resonanztypen anhand des 2D korrelierten Spektrums (Kap. 2.3.1) eines AX-Spinsystems; wieso alle 2D Resonanzen mit negativem ω_1 erscheinen, wird in Kapitel 2.3.1 näher erläutert.

Das erste 2D Experiment schlug Jeener schon 1971 vor. Aue et al. (1976) berechneten diese Zweipulssequenz im Detail. Seit dieser Zeit wurden viele 2D Experimente entwickelt, zum Beispiel die zweidimensionale J-aufgelöste Spektroskopie (Aue et al., 1976b; Nagayama et al., 1977), die homonukleare und heteronukleare Korrelation von chemischen Verschiebungen (Bax und Freeman, 1981; Bodenhausen und Freeman, 1977; Maudsley et al., 1977; Nagayama et al., 1980), die indirekte Detektion von Mehrquantenübergängen (Vega und Pines, 1977; Wokaun und Ernst, 1977 und 1978), die Untersuchung des chemischen Austausches (Jeener et al., 1979; Macura et al., 1980) und des Magnetisierungsaustausches durch Dipol-Dipol-Relaxation, die zum Kern-Overhauser-Effekt (NOE) führt (Anil Kumar et al., 1980; Macura und Ernst, 1980). Nicht alle diese 2D Experimente wurden bisher in der NMR-Spektroskopie von Polypeptiden und Proteinen angewendet, weil sich die entsprechenden Spektren kaum interpretieren liessen oder weil die Sensitivität zu klein ist.

2.1.2 Die Anwendung von 2D Methoden auf die NMR-Spektroskopie von Polypeptiden und Proteinen

Die NMR-Spektren von Polypeptiden und Proteinen weisen eine hohe Resonanzdichte auf, was die Interpretation der eindimensionalen Spektren meistens auf gewisse Spektralbereiche beschränkt (Wüthrich, 1976) und damit eine volle Ausnützung der Möglichkeiten der NMR-Spektroskopie verunmöglicht. Die Anwendung von 2D NMR-Methoden kann die Lage wesentlich verbessern; bis heute wurden auf diesem Gebiet die drei nachfolgend auf-

gezählten, homonuklearen ^1H 2D Experimente angewendet. In Klammern stehen jeweils Referenzen, die diese 2D Methoden auf die Protein- und Polypeptidspektroskopie anwenden:

2DJ-Spektroskopie (Kap. 2.2): Die zweidimensionale J-aufgelöste (2DJ) Spektroskopie ergibt eine Auflösungsverbesserung und dient zur Bestimmung von Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen (Nagayama et al., 1977; Nagayama und Wüthrich, 1978a+b; Wider et al., 1981; Wüthrich et al., 1979).

COSY/SECSY (Kap. 2.3): Die 2D korrelierte Spektroskopie dient zur Bestimmung gekoppelter Kerne und führt damit zur Erkennung ganzer Spinsysteme von Aminosäuren. (COSY: 2D correlated spectroscopy; SECSY: spin echo correlated spectroscopy) (Nagayama et al., 1979 und 1980; Nagayama und Wüthrich, 1981a).

NOESY (Kap. 2.4): Im 2D NOE-Spektrum (NOESY: 2D NOE spectroscopy) lassen sich räumlich nahe Protonen bestimmen. Die Kombination von COSY- und NOESY-Daten, erlaubt die Spektren von Polypeptiden und Proteinen vollständig zuzuordnen (Kap. 4). Aus der Distanzinformation des NOESY-Spektrums lassen sich Molekülstrukturen berechnen, die nur auf NMR-Daten beruhen (Kap. 5). (Anil Kumar et al., 1980a+b und 1981; Arseniev et al., 1982; Bösch et al., 1981; Wagner et al., 1981; Wagner und Wüthrich, 1982; Wider et al., 1982).

Unter der Annahme schwacher Kopplung enthält das 2DJ-Spektrum genau gleich viele Resonanzen wie das entsprechende 1D Spektrum; weil die Spin-Spin-Kopplung von der chemischen Verschiebung getrennt in der zweiten Dimension erscheint, lässt sich damit eine Auflösungsverbesserung erreichen. 2D korrelierte und 2D NOE-Spektren ergeben keine Auflösungsverbesserung in diesem Sinne, denn sie enthalten viel mehr Resonanzen als die entsprechenden 1D Spektren und benötigen für Polypeptide und Proteine riesige Datenmatrizen, was die digitale Auflösung auf Grund der begrenzten Speichermöglichkeiten und wegen der Länge der Messzeit beschränkt. Die Vorteile dieser zwei Messmethoden liegen darin, dass man aus einem einzigen Spektrum alle gekoppelten oder räumlich nahen

Protonen bestimmen kann, ohne selektiv einstrahlen zu müssen wie in den entsprechenden 1D Spektren, die man aus Doppelresonanzexperimenten erhält. Da ein Polypeptid- oder Proteinspektrum eine grosse Resonanzdichte besitzt, lässt es sich wegen der begrenzten Selektivität bei der Einstrahlung nicht verhindern, dass auch benachbarte Resonanzen getroffen werden und damit die Interpretation des Spektrums erschwert wird. Weil die Doppelresonanzfrequenz in den 2D Experimenten nicht benützt wird, besteht die Möglichkeit durch selektives Einstrahlen die Lösungsmittelresonanz zu unterdrücken. Damit können 2D-Spektren auf einfache Art in H_2O gemessen werden, was die Beobachtung von Protonen erlaubt, die relativ schnell mit dem Lösungsmittel austauschen. Dies ist sehr wichtig, weil den Amidprotonen eine besondere Bedeutung zukommt bei der Anwendung von 2D Methoden.

Ein weiteres Problem der 1D Spektroskopie besteht in der Datenreduktion. Hunderte von einzelnen Experimenten müssen so zusammengefasst und dargestellt werden, dass eine optimale Interpretation möglich wird (Bösch, 1979; Bösch et al., 1980). Das 2D Experiment löst dieses Problem auf natürliche Weise, die ganze Information ist in einem einzigen Spektrum zusammengefasst.

2.2 Die zweidimensionale J-aufgelöste Spektroskopie

2.2.1 Die 2DJ-Spektroskopie mit Ausnützung der Echobildung

Die zweidimensionale J-aufgelöste (2DJ) Spektroskopie fand als erste 2D Methode Anwendung auf Polypeptide und Proteine (Nagayama et al., 1977). Es handelt sich um ein Experiment, das allein die spektrale Auflösung verbessert. Die Kopplungskonstante erscheint in der zweiten Dimension getrennt von der chemischen Verschiebung. Die Grundlage des Experiments bildet eine Spin-Echo-Pulssequenz (Fig. 2.2A; Aue et al., 1979b). Die Fig. 2.2A zeigt auch den Phasenzyklus für eine Zweikanalmessung, der auf der Phasensequenz (2.12) beruht (Hoult und Richards, 1975). Die chemische Verschiebung beeinflusst die Echoamplitude eines Spin-Echo-Experiments nicht, diese enthält nur Effekte der Spin-Spin-Kopplung, so lange die Kopplung schwach genug ist (Hahn und Maxwell, 1951; Carr und Purcell, 1954). Der freie Echozerfall während t_2 wird jedoch durch die vollständige Kernhamiltonfunktion beschrieben. Dies bedeutet, dass das entsprechende 2D Spektrum in ω_1 -Richtung nur Kopplungsinformation enthält, während in ω_2 -Richtung Kopplungen und chemische Verschiebungen auftreten. Das Resultat besteht in Multipletts, die in der ω_1, ω_2 -Ebene auf Linien mit 45° Neigung liegen (Fig. 2.2B), welche die Linie $\omega_1 = 0$ bei der chemischen Verschiebung des Multipletts schneiden ((ω_1, ω_2) -Darstellung). Man beachte, dass die positive ω_1 -Achse in der Fig. 2.2B nach unten zeigt. Die Echobildung bewirkt eine teilweise Korrektur der Feldinhomogenität, so dass in ω_1 -Richtung die natürlichen Linienbreiten erscheinen.

Um die Information über chemische Verschiebungen und Kopplungen vollständig voneinander zu trennen, projiziert man die einzelnen Multipletts auf Parallele zur ω_1 -Achse durch den Multiplettmittelpunkt. Bei dieser Gelegenheit werden die ω_1 - und ω_2 -Achse in J- und δ -Achse umbenannt (Fig. 2.2C). Die Projektion dieser (δ, J) -Darstellung parallel zur

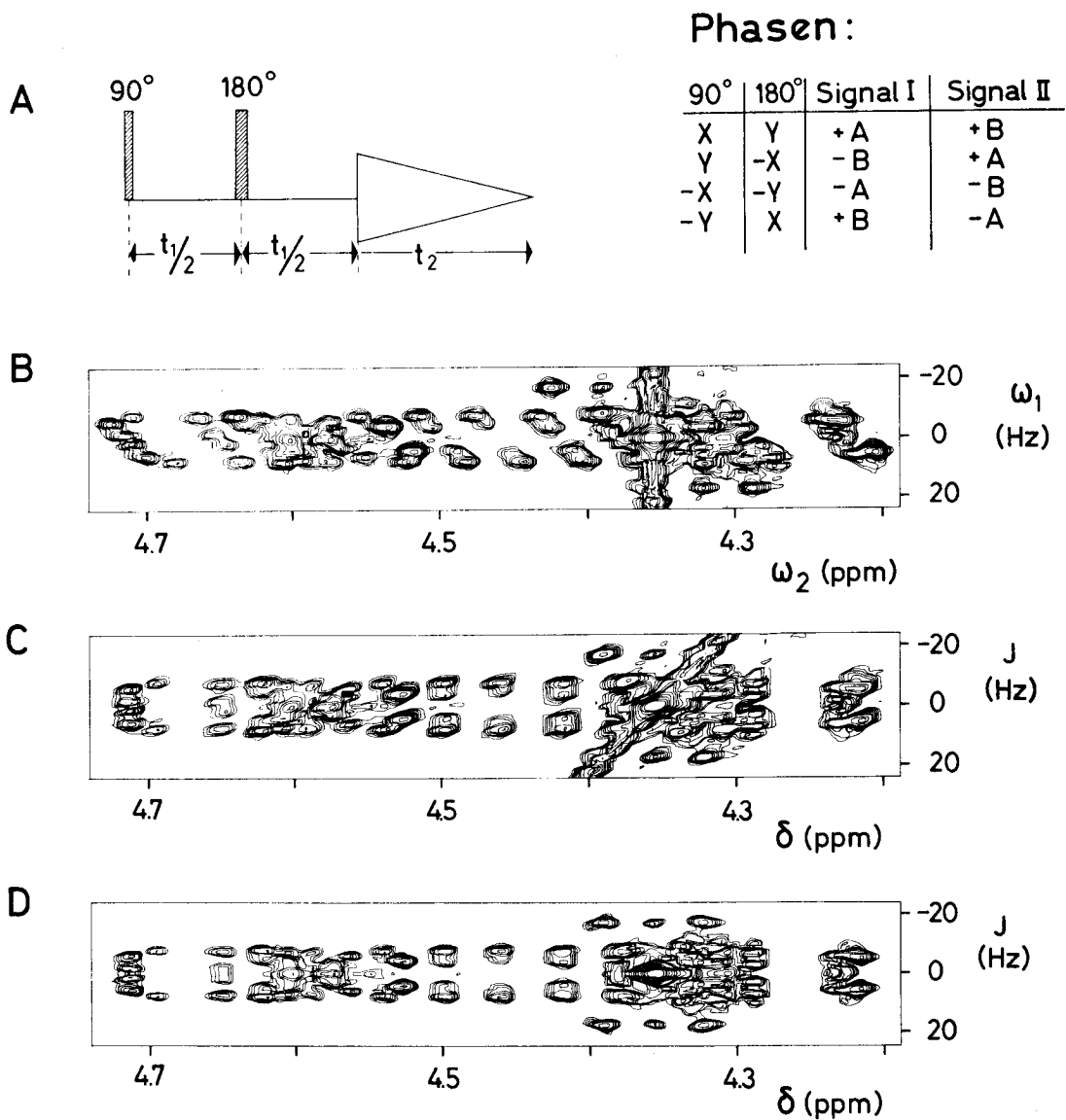


Fig. 2.2

(A) Pulssequenz für ein 2D J-aufgelöstes ^1H NMR-Experiment mit Ausnutzung der Echobildung. Rechts ist der Phasenzzyklus für eine Zweikanalmessung angegeben. (B) Ausschnitt aus der (ω_1, ω_2) -Darstellung eines 2DJ-Spektrums einer 0.02 M Lösung des basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitors (BPTI) in D_2O , $T = 68^\circ\text{C}$, $\text{pD} = 4.7$. Die Lösungsmittelresonanz (HDO) verursacht eine Störung bei 4.35 ppm. (C) Die durch Datenmanipulation erhaltene (δ, J) -Darstellung desselben Spektrums. (D) Die (δ, J) -Darstellung nach der Symmetrisierung, die Störung der HDO Resonanz ist unterdrückt.

J-Achse auf die δ -Achse liefert ein homonukleares, breitbandenkoppeltes Spektrum (Aue et al., 1976b), das sehr nützlich ist, um chemische Verschiebungen zu bestimmen. Bei diesen kann man einen Schnitt parallel zur J-Achse (Querschnitt) durchs Spektrum legen, um die Multiplettstruktur zu studieren. Die Interpretation von 2DJ-Spektren ist sehr einfach, so lange die Spin-Spin-Kopplung genügend schwach ist. Der Einfluss der starken Kopplung wird in Kap. 3 beschrieben, hier soll nur erwähnt sein, dass im Falle starker Kopplung die 2DJ-Spektren negative Linien enthalten können (Bodenhausen et al., 1978).

Im homonuklearen 2DJ-Experiment ist es nicht möglich, Absorption und Dispersion zu trennen (Bachmann et al., 1977), so dass eine 2DJ-Resonanz immer aus einer Ueberlappung von absorptiven und dispersiven Anteilen besteht (Nagayama et al., 1978). Aus diesem Grund werden meistens Betragsspektren benutzt, in denen die Kopplungskonstanten jedoch zu gross erscheinen können (Turner, 1980). Die einzelnen Multiplette sind symmetrisch bezüglich $\omega_1 = 0$, weil das Verhalten während der Entwicklungszeit t_1 abgesehen von Relaxationseffekten symmetrisch bezüglich des Mittelpunkts dieser Zeitperiode ist. Dies kann in der (δ, J) -Darstellung des 2DJ-Spektrums dazu ausgenützt werden, das Signal-zu-Rauschen Verhältnis zu verbessern und Artefakte zu unterdrücken, indem das Spektrum bezüglich $\omega_1 = 0$ symmetrisiert wird (Fig. 2.2D) Die Symmetrisierung kann in einer Mittelwertbildung bestehen oder im Vergleich zweier sich entsprechender Resonanzen und der Einführung der jeweils kleineren auf beiden Seiten, wie dies schon für 2D korrelierte und 2D NOE-Spektren beschrieben wurde (Baumann et al., 1981).

Da in ω_1 -Richtung nur die Kopplungen erscheinen, ist die maximale ω_1 -Frequenz natürlicherweise sehr klein, was bedeutet, dass der maximale t_1 -Wert ohne weiters mehr als eine Sekunde betragen kann. Dies gilt es zu beachten bei der Optimierung der Parameter für ein Proteinspektrum, das nach einer Sekunde schon stark relaxiert sein kann. Für das Echo-maximum $M(t_1)$ gilt

$$M(t_1) = M(0) \exp(-t_1/T_2) \quad (2.1)$$

Diese Formel zeigt, dass sich im Falle einer kurzen transversalen Relaxationszeit T_2 kein 2DJ-Spektrum mehr messen lässt. Die Gleichung (2.1) gilt nur, wenn sich jeder Kern während der ganzen Zeit t_1 in demselben statischen, homogenen Magnetfeld befindet. Da es in der Praxis immer Abweichungen in der Feldhomogenität gibt, kann ein Kern während t_1 durch Diffusion Gebiete anderer Feldstärke erreichen. Unter der Annahme axialer Symmetrie des Magnetfeldes H bezüglich der z -Achse berechnet sich die Echoamplitude wie folgt (Slichter, 1978)

$$M(t_1) = M(0) \exp\left(-\frac{t_1}{T_2} - \frac{\gamma^2}{12} \left(\frac{\partial H}{\partial z}\right)^2 D t_1^3\right) \quad (2.2)$$

wo D die Diffusionskonstante bedeutet.

Die Interpretation von zweidimensionalen J-aufgelösten Spektren wird in Kap. 3 ausführlich diskutiert. In diesem Kapitel wird auch der Einfluss der starken Spin-Spin-Kopplung genau untersucht.

2.2.2 Die 2DJ-Spektroskopie ohne Ausnützung der Echobildung

Die in Kap. 2.2.1 behandelte 2DJ-Spektroskopie ist sehr ähnlich zu der von Aue et al. (1976a+b) beschriebenen Zweipulssequenz. Die zwei Experimente unterscheiden sich nur durch die Definition der Zeitvariablen (Fig. 2.2A, Fig. 2.3A). Durch eine Substitution können daher die beiden Datensätze $S(t_1^{(E)}, t_2^{(E)})$ und $S(t_1^{(N)}, t_2^{(N)})$ aufeinander abgebildet werden

$$t_1^{(E)} = 2 t_1^{(N)} \quad (2.3)$$

$$t_2^{(E)} = t_2^{(N)} - t_1^{(N)} \quad (2.4)$$

(E) bzw. (N) bedeutet einen Parameter aus dem Experiment mit bzw. ohne Ausnützung der Echobildung. Durch eine Fouriertransformation des Daten-

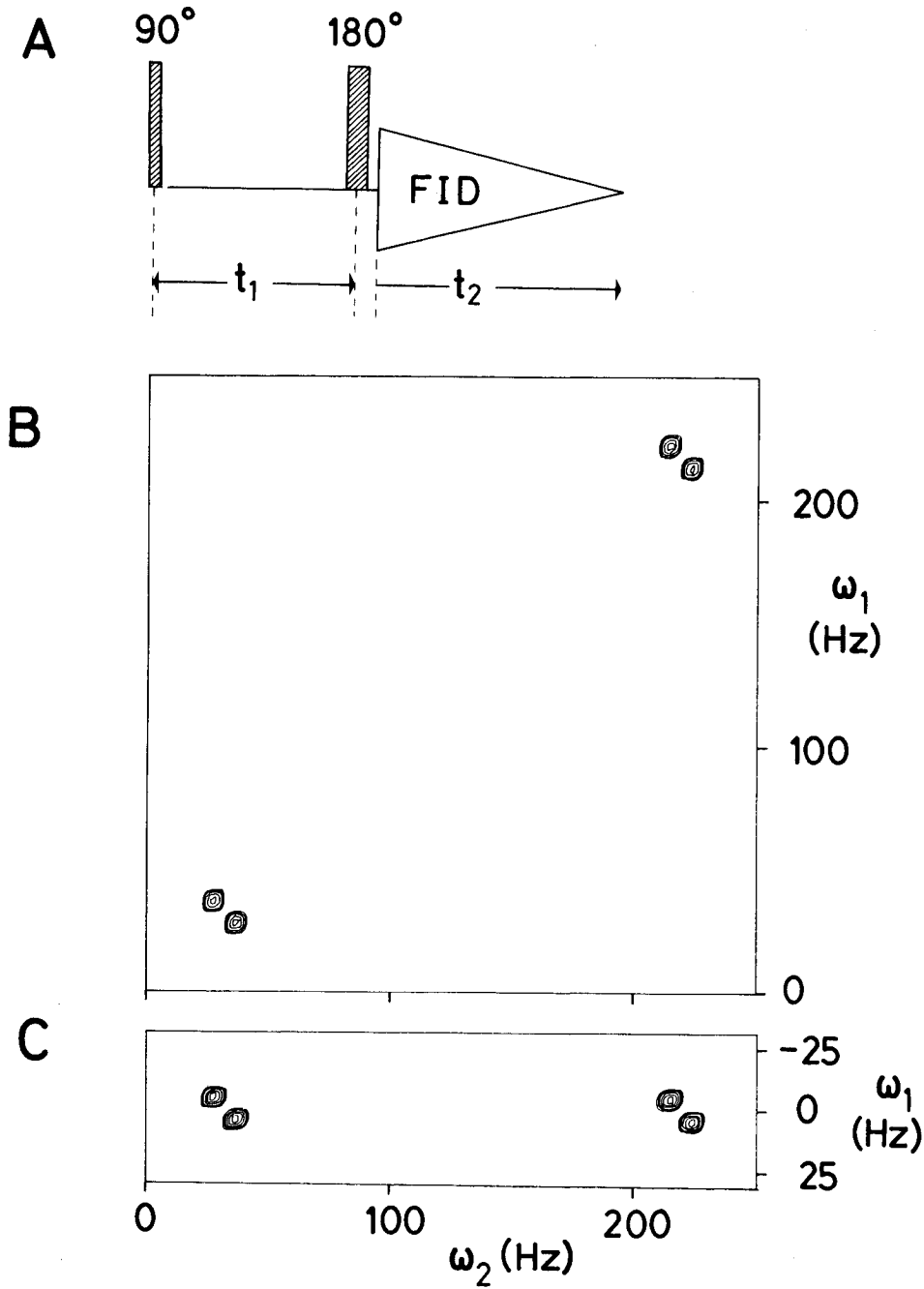


Fig. 2.3

(A) Pulssequenz eines 2D J-aufgelösten ^1H NMR-Experiments ohne Ausnützung der Echobildung. (B) 2DJ-Spektrum eines AX-Spinsystems, das mit der Pulssequenz in (A) gemessen wurde. (C) 2DJ-Spektrum desselben AX-Systems wie in (B) gemessen mit Ausnützung der Echobildung. Die Ersparnis von Messzeit (weniger t_1 -Werte) und Speicherplatz ist offensichtlich.

satzes $S(t_1^{(N)}, t_2^{(N)})$ erhält man das Spektrum $S(\omega_1^{(N)}, \omega_2^{(N)})$

$$S(\omega_1^{(N)}, \omega_2^{(N)}) = \iint_{-\infty}^{\infty} S(t_1^{(N)}, t_2^{(N)}) \exp(-i\omega_1^{(N)} t_1^{(N)}) \exp(-i\omega_2^{(N)} t_2^{(N)}) dt_1^{(N)} dt_2^{(N)} \quad (2.5)$$

Die Substitution von $t_1^{(N)}$ und $t_2^{(N)}$ gemäss den Gleichungen (2.3), (2.4) ergibt

$$S(\omega_1^{(E)}, \omega_2^{(E)}) = \frac{1}{2} \iint_{-\infty}^{\infty} S(t_1^{(E)}, t_2^{(E)}) \exp(-i\omega_1^{(N)} \frac{t_1^{(E)}}{2}) \exp(-i\omega_2^{(N)} t_2^{(E)} - i\omega_2^{(N)} \frac{t_1^{(E)}}{2}) dt_1^{(E)} dt_2^{(E)} \quad (2.6)$$

$$= \frac{1}{2} \iint_{-\infty}^{\infty} S(t_1^{(E)}, t_2^{(E)}) \exp(-i \frac{\omega_1^{(N)} + \omega_2^{(N)}}{2} t_1^{(E)}) \exp(-i\omega_2^{(N)} t_2^{(E)}) dt_1^{(E)} dt_2^{(E)}$$

Für die Beziehungen der Frequenzen gilt damit

$$\omega_1^{(E)} = (\omega_1^{(N)} + \omega_2^{(N)}) / 2 \quad (2.7)$$

$$\omega_2^{(E)} = \omega_2^{(N)} \quad (2.8)$$

Die Summe in Gleichung (2.7) bedeutet in 2DJ-Spektren eine Differenz, weil im 2DJ-Experiment immer eine der beiden Frequenzen ω_1 oder ω_2 negativ ist. Deshalb ist es möglich im "Echo-Experiment" mit kleineren ω_1 -Frequenzen zu arbeiten, was zu kleineren Datenmatrizen führt. Der Informationsgehalt in den beiden Spektren ist jedoch identisch. Zwischen den maximalen ω_1 -Frequenzen ($\omega_{1\max}$) in den zwei Experimenten gilt die folgende Beziehung

$$\omega_{1\max}^{(E)} = \omega_{1\max}^{(N)} / \epsilon \quad \text{mit } \epsilon > 1 \quad (2.9)$$

Der Wert ϵ hängt von den spektralen Eigenschaften der gemessenen Substanz und von der benutzten 2D Methoden ab, denn der in den Gleichungen

(2.3) bis (2.9) beschriebene Zusammenhang gilt auch für die beiden anderen noch zu beschreibenden 2D Methoden (Kap. 2.3, Kap. 2.4), die sich ebenfalls mit und ohne Ausnützung der Echobildung durchführen lassen. Setzt man in der Gleichung (2.7) Punkte der Diagonalen $-\omega_1^{(N)} = \omega_2^{(N)}$ ein (Fig. 2.3B), erhält man $\omega_1^{(E)} = 0$. Aus diesem Grund bezeichnet man die Linie $\omega_1^{(E)} = 0$ (Fig. 2.3C) oft ebenfalls als Diagonale.

In der 2DJ-Spektroskopie ist ϵ gleich dem Verhältnis aus dem Frequenzbereich des ganzen Spektrums zum Frequenzbereich des breitesten Multipletts. In einem Proteinspektrum bei 360 MHz nimmt ϵ also rund den Wert 100 an. Damit gilt auch $t_1^{(E)} \approx 100 t_1^{(N)}$, was jedoch nicht bedeutet, dass sich die zwei Experimente prinzipiell in der Sensitivität unterscheiden, weil man ja in der Wahl von ω_1 und der Anzahl t_1 -Werte frei ist. Ein kleines maximales ω_1 bringt zwei wesentliche Vorteile: es müssen weniger t_1 -Werte gemessen werden, um eine gute digitale Auflösung zu erreichen, was die Messzeit wesentlich verkürzt, und die Datenmatrizen werden kleiner. Die Figur 2.3 zeigt die 2DJ-Spektren eines AX-Spin-systems ohne und mit Ausnützung der Echobildung und macht die "Platzverschwendung" im ersten Fall deutlich, der auch eine viermal längere Messzeit benötigte als das "normale" 2DJ-Spektrum (Kap. 2.2.1). In einem Proteinspektrum müsste man sogar mit einer rund 60 mal längeren Messzeit rechnen. Eine Möglichkeit den ω_1 -Frequenzbereich möglichst klein zu halten, besteht in der Anwendung eines "Echo-Experimentes" (Kap. 2.2.1). Die gewünschte Ersparnis in der Messzeit und bei der Datenspeicherung kann bei geeigneter Versuchsanordnung auch mit der hier beschriebenen Pulssequenz erreicht werden (Kap. 2.5.4).

Die Linienformen in zwei sich entsprechenden Spektren, die mit bzw. ohne Ausnützung der Echobildung erhalten wurden, unterscheiden sich theoretisch, praktisch werden sie jedoch durch die angewendeten, starken, digitalen Filterfunktionen bestimmt (Kap. 2.5.2). Damit ist die Auflösung der einzelnen Komponenten innerhalb eines Multipletts mit beiden Methoden gleich. Die relative Lage der Multiplette unterscheidet sich in den zwei Spektren, was in der Praxis jedoch nur in Ausnahme-

fällen einen Einfluss auf die Auflösung hat. Grössere Bedeutung kann ein anderer Unterschied erlangen. Hohe intensive Resonanzen, z.B. des Lösungsmittels, besitzen Ausläufer ("Füsse"), die parallel zu den zwei Frequenzachsen ω_1 und ω_2 verlaufen. Das "Echo-Experiment" wird dadurch stärker gestört, weil alle Resonanzen nahe bei $\omega_1 = 0$ liegen.

2.3 Die zweidimensionale korrelierte Spektroskopie

2.3.1 Die 2D korrelierte Spektroskopie ohne Ausnützung der Echobildung (COSY)

Die zweidimensionale korrelierte Spektroskopie gibt Auskunft über gekoppelte Kerne. Das Experiment besteht aus einer Zweipulssequenz (Fig. 2.4) (Aue et al., 1976a; Bax und Freeman, 1981; Nagayama et al., 1980). Der erste Puls erzeugt transversale Magnetisierung. Während der Entwicklungsperiode t_1 präzessieren die einzelnen Magnetisierungskomponenten mit ihrer charakteristischen Frequenz. Der zweite 90° -Puls verursacht eine Mischung aller Magnetisierungskomponenten, die zu demselben gekoppelten Spinsystem gehören. Während der folgenden Zeit t_2 werden die neuen Präzessionsfrequenzen gemessen, wobei die Präzessionsfrequenzen während t_1 das gemessene Signal modulieren. Durch eine zweidimensionale Fouriertransformation entsteht das 2D korrelierte Spektrum, das im Gegensatz zum 2DJ-Experiment alle drei Resonanztypen eines 2D Spektrums enthält: axiale Resonanzen, diagonale Resonanzen und Cross-peaks.

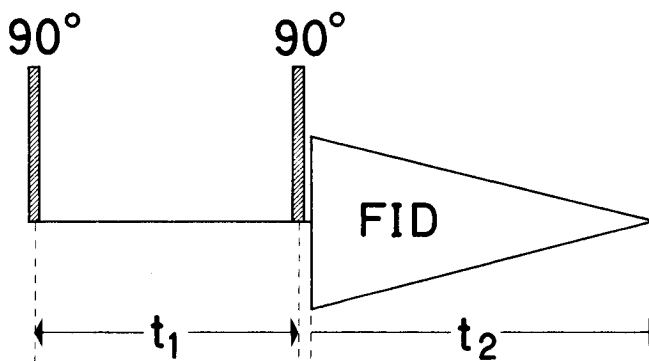


Fig. 2.4

Pulssequenz für ein 2D korreliertes ^1H NMR-Experiment ohne Ausnützung der Echobildung (COSY).

Die axialen Resonanzen, die keine 2D Information enthalten, unterdrückt man normalerweise durch eine spezielle Phasenwahl der 90^0 -Pulse (siehe unten). Sie entstehen aus Magnetisierung, die während t_1 relaxiert und die durch den zweiten Puls wieder in die x,y-Ebene gebracht wird. Die interessantesten Resonanzen stellen die Crosspeaks dar, sie geben Auskunft über gekoppelte Resonanzen. Fig. 2.5 zeigt das schematische COSY-Spektrum eines AMX-Spinsystems. Obwohl im allgemeinen mit Betragsspektren gearbeitet wird, ist für jede Resonanz die Phase angegeben, denn im Gegensatz zur homonuklearen 2DJ-Spektroskopie ist es möglich, reine Phasen zu erhalten. Im phasensensitiven Spektrum sind alle diagonalen Resonanzen dispersiv und die Crosspeaks haben eine positiv- oder negativ-absorptive Linienform. Zwei gekoppelte Resonanzen werden durch ein Crosspeak-Multiplett angedeutet, dessen Komponenten sich im Vorzeichen unterscheiden, so dass das Integral über das ganze Crosspeak-Multiplett gleich Null ist (Fig. 2.5). Dies hat die praktische Auswirkung, dass die einzelnen Komponenten eines Crosspeak-Multipletts die Tendenz besitzen, sich gegenseitig aufzuheben, wenn sie nicht genügend aufgelöst sind. Die Figur 2.5 zeigt, dass die für Proteinspektren wichtigen AMX-Spinsysteme Gruppen von Multiplett-Komponenten mit gleichen Vorzeichen enthalten, die sich bei ungenügender Auflösung weniger schnell aufheben. Dies bedeutet, dass beispielsweise die Crosspeaks zwischen zwei C^{β} -Methylenprotonen in einem 2D korrelierten Spektrum im allgemeinen intensivere Resonanzen ergeben als die $C^{\alpha}H-C^{\beta}H$ -Crosspeaks.

Die Figur 2.5 zeigt, dass das erwartete 2D Spektrum zweimal auftritt einmal mit positiven ω_1 -Frequenzen und symmetrisch dazu mit negativen ω_1 -Frequenzen. Sinngemäss nennt man die Resonanzen mit $\omega_1 > 0$ p-Resonanzen und diejenigen mit $\omega_1 < 0$ n-Resonanzen. Diese zwei Resonanztypen stellen keine Spiegelbilder dar, die entstehen, weil in ω_1 -Richtung die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Frequenzen nicht möglich wäre. Die n- und p-Spektren sind verschiedenen Ursprungs und zeigen klare Unterschiede in ihrem Verhalten. Der Spinecho-Effekt beeinflusst die p-Resonanzen nicht, sie erscheinen darum auch nicht im 2DJ-Spektrum, und sie sind oft breiter (falls $T_2^* < T_2$) als die n-Resonanzen, weil der

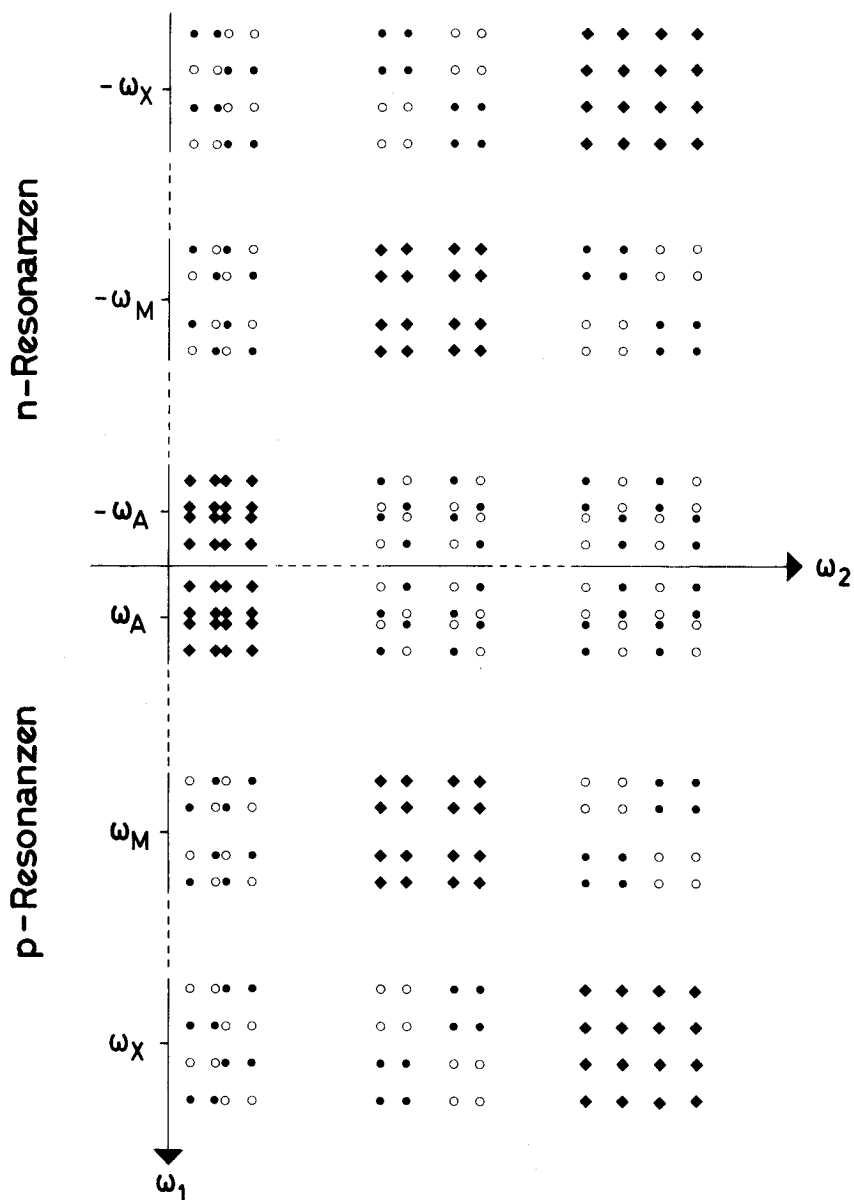


Fig. 2.5

Schematisches COSY-Spektrum eines AMX-Spinsystems mit den Kopplungskonstanten $J_{AM} = 5$ Hz, $J_{AX} = 7$ Hz und $J_{MX} = -14$ Hz, was den Werten im COSY-Spektrum von Fig. 2.9 entspricht. ● bedeutet eine positiv-absorptive, ○ eine negativ-absorptive und ◆ eine dispersive Resonanzlinie; die absoluten Beträge aller Intensitäten sind gleich. (Man beachte, dass die für Proteinspektren wichtigen AMX-Spinsysteme Gruppen von Crosspeaks mit gleichen Vorzeichen enthalten.)

Einfluss der Feldinhomogenität nicht korrigiert wird. In einem Proteinspektrum unterscheiden sich die Linienbreiten der zwei Resonanztypen praktisch nicht. Darum kann die Symmetrie zwischen dem n- und dem p-Spektrum wie die Symmetrie des Spektrums bezüglich der Diagonalen (Baumann et al., 1981) benützt werden, um das Signal-zu-Rauschen Verhältnis zu verbessern. Die Unterdrückung von Artefakten ist jedoch weniger effektiv, weil diese symmetrisch zu $\omega_1 = 0$ auftreten können (z.B. die Störungen parallel zur ω_1 -Achse ("t₁-Noise")).

Die p- und n-Resonanzen unterscheiden sich in ihrem Verhalten gegenüber einer 90°-Phasenänderung des zweiten Pulses (Nagayama et al., 1980): die Phasen der n-Resonanzen ändern sich um 180°, während die p-Resonanzen ihre Phase beibehalten. Dies gibt die Möglichkeit eine der zwei Resonanztypen zu unterdrücken, was beispielsweise bei voller Zweikanalmessung oder bei der Spin-Echo korrelierten Spektroskopie (Kap. 2.3.2) nötig ist. Der folgende Phasenzklus eliminiert die p-Resonanzen

$$\begin{array}{ccc} x & x & + \\ x & y & - \end{array} \quad (2.10)$$

x und y bedeuten die Phasen des ersten und zweiten Pulses; + und - bedeuten eine Addition beziehungsweise Subtraktion des gemessenen Signals. Mit Hilfe von Phasenänderungen lassen sich nicht nur die n- oder p-Spektren unterdrücken, sondern auch die störenden axialen Resonanzen. Diese wechseln ihre Vorzeichen, wenn die Phase des zweiten Pulses um 180° ändert

$$\begin{array}{ccc} x & x & + \\ x & -x & + \end{array} \quad (2.11)$$

Die Phasenzyklen (2.10) und (2.11) beziehen sich auf eine Einkanalmessung. Zur Verbesserung des Signal-zu-Rauschen Verhältnisses ist es angebracht eine Zweikanalmessung anzuwenden. Im allgemeinen wird dazu der

von Hoult und Richards (1975) vorgeschlagene Phasenzklus (CYCLOPS) benutzt, der Ungleichheiten der zwei Messkanäle korrigiert und systematische Störungen eliminiert

$$\begin{array}{rcl} x & + A & + B \\ y & - B & + A \\ - x & - B & - B \\ - y & + B & - A \end{array} \quad (2.12)$$

A und B bedeuten zwei getrennte Regionen im Kernspeicher eines Computers, wo die Signale der zwei Detektoren addiert bzw. subtrahiert werden. Die Kombination der Phasenzyklen (2.10), (2.11) und (2.12) ergibt einen 16-Phasenzklus (Tab. 2.1), der volle Zweikanalmessung erlaubt und axiale und p-Resonanzen unterdrückt. Den Phasenzklus (2.12) muss man bei der Kombination auf den Puls anwenden, der die transversale Magnetisierung erzeugt. Im COSY-Experiment ist dies der erste Puls. Die Anwendung der CYCLOPS-Sequenz (2.12) auf (2.11) ergibt die ersten acht Zeilen in Tabelle 2.1. Diesen 8-Phasenzklus muss man mit (2.10) kombinieren, wenn die p-Resonanzen eliminiert werden sollen. Dadurch entsteht der in Tabelle 2.1 beschriebene 16-Phasenzklus.

Die Auswertung von 2D korrelierten Spektren wird in Kapitel 4 im Zusammenhang mit der sequenziellen Resonanzzuordnung anhand von COSY-Spektren des auf volldeuterierte Micellen gebundenen Glucagons diskutiert. In Kapitel 4 sind auch schematische COSY-Spektren (Tab. 4.1) als Interpretationshilfe gezeigt.

2.3.2 Die 2D Spin-Echo korrelierte Spektroskopie (SECSY)

Ein SECSY-Experiment (Nagayama et al., 1979; Bain et al., 1981) ergibt dieselbe Information wie ein COSY-Experiment (Kap. 2.3.1). Die Darstellung der gekoppelten Kerne in den Spektren unterscheidet sich, weil man

Tabelle 2.1

16-Phasenzyklus für 2D korrelierte Spektroskopie (COSY/SECSY), der volle Zweikanalmessung erlaubt und axiale und p-Resonanzen unterdrückt. Dieser Zyklus beruht auf den Phasenzyklen (2.10), (2.11) und (2.12).

Phasen		Computerspeicher	
1. Puls	2. Puls	Signal I	Signal II
x	x	+ A	+ B
x	- x	+ A	+ B
y	y	- B	+ A
y	- y	- B	+ A
- x	- x	- A	- B
- x	x	- A	- B
- y	- y	+ B	- A
- y	y	+ B	- A
x	y	- A	- B
x	- y	- A	- B
y	- x	+ B	- A
y	x	+ B	- A
- x	- y	+ A	+ B
- x	y	+ A	+ B
- y	x	- B	+ A
- y	- x	- B	+ A

im COSY-Experiment das Signal direkt nach dem zweiten Puls misst, während man beim SECSY-Experiment zuerst die Echobildung abwartet (Hahn, 1950). Die SECSY-Pulssequenz ist in Fig. 2.8 angegeben. Der zweite 90° -Puls liegt in der Mitte der t_1 -Periode, so dass sich die ω_1 -Frequenz einer bestimmten Resonanz im SECSY-Spektrum aus der Präzessionsfrequenz der zugehörigen Magnetisierungskomponente vor (ω_{k1}) und nach (ω_{mn}) dem zweiten 90° -Puls zusammensetzt

$$\omega_1 = 1/2 (\pm|\omega_{k1}| + |\omega_{mn}|) \quad (2.13)$$

Zwischen den COSY- und den SECSY-Spektren gelten dieselben mathematischen Beziehungen, die in den Gleichungen (2.3)-(2.9) im Zusammenhang mit der 2DJ-Spektroskopie angegeben sind. Wie in Kap. 2.3.1 beschrieben, lassen sich die Summenfrequenzen in (2.13) (p-Resonanzen) unterdrücken, die verbleibenden Frequenzdifferenzen (n-Resonanzen) können wesentlich kleiner sein, als die volle Frequenzbreite des Spektrums in ω_2 -Richtung. Dies erlaubt eine Reduktion der Anzahl der t_1 -Experimente und der Anzahl der Datenpunkte in ω_1 -Richtung, was eine Verkürzung der Messzeit und kleinere Datenmatrizen bedeutet.

In der Figur 2.6 ist das schematische SECSY-Spektrum eines AMX-Spin-systems gezeichnet. Ein Vergleich dieser Figur mit dem entsprechenden COSY-Schema in Fig. 2.5 veranschaulicht, wie die Resonanzen, welche sich in den zwei Spektren entsprechen, in ω_1 -Richtung verschoben werden. Auf Linien im SECSY-Spektrum, für die $\omega_2 = \text{konstant}$ gilt, sind verglichen mit dem COSY-Spektrum alle ω_1 -Frequenzdifferenzen halbiert (Gleichungen (2.7) und (2.8)). Dies gilt es zu beachten, wenn die experimentelle, digitale Auflösung von COSY- und SECSY-Experimenten miteinander verglichen werden.

Die dreidimensionale Ansicht eines SECSY-Spektrums des basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitors (BPTI) in der Figur 2.7 sieht sehr beeindruckend aus, diese Darstellung eignet sich jedoch nicht zur Auswertung der Daten. In der Figur 2.8 ist dasselbe Spektrum als Höhen-

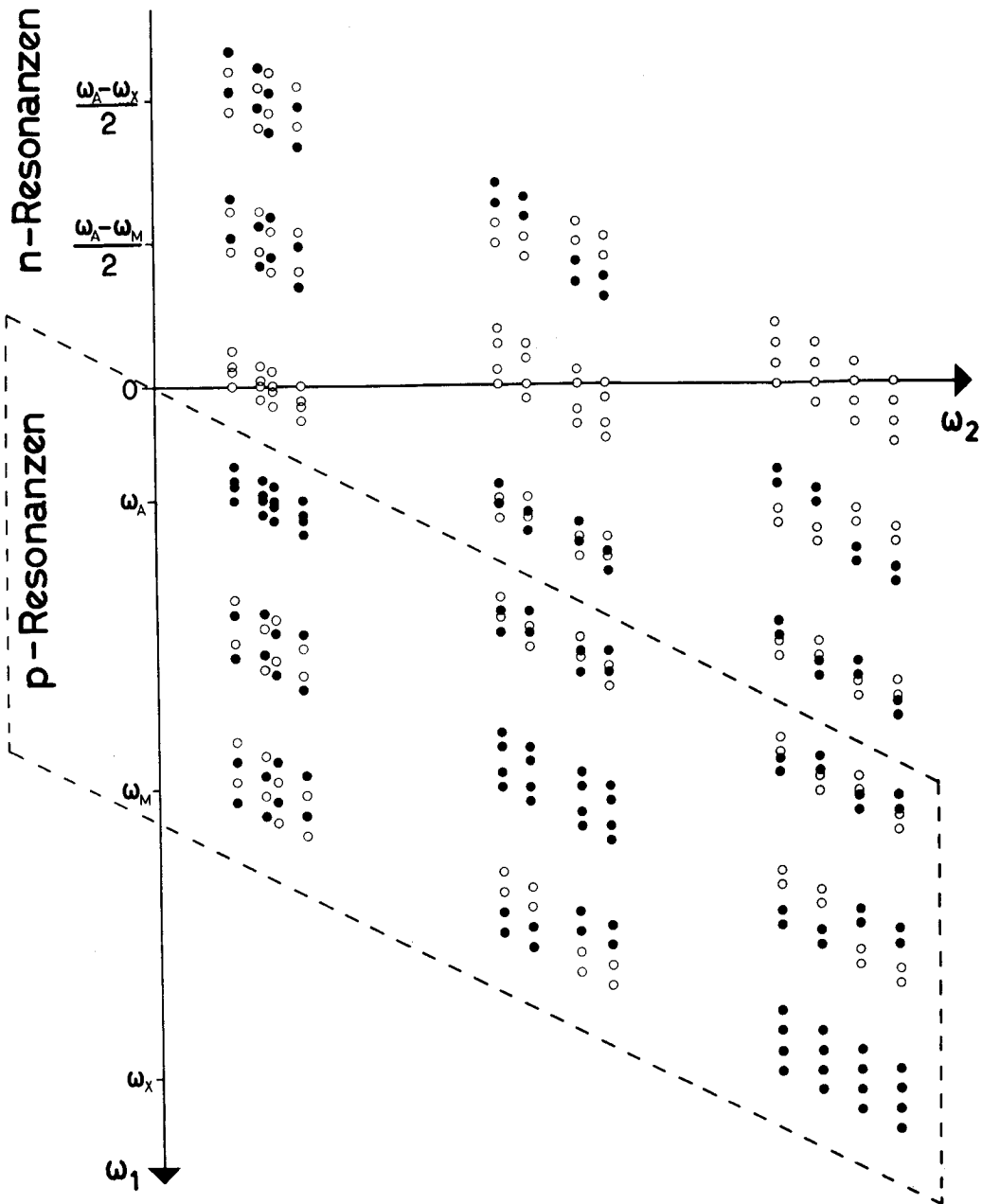


Fig. 2.6

Schematisches SECSY-Spektrum eines AMX-Spinsystems mit den Kopplungskonstanten $J_{AM} = 5$ Hz, $J_{AX} = 7$ Hz und $J_{MX} = -14$ Hz, was den Werten im SECSY-Spektrum von Fig. 2.9 entspricht. Positive Linienintensitäten sind mit \bullet und negative mit \circ bezeichnet; die absoluten Beträge aller Intensitäten sind gleich. Die Linienformen aller Resonanzen im SECSY-Spektrum bestehen aus einer Ueberlagerung von absorptiven und dispersiven Anteilen.

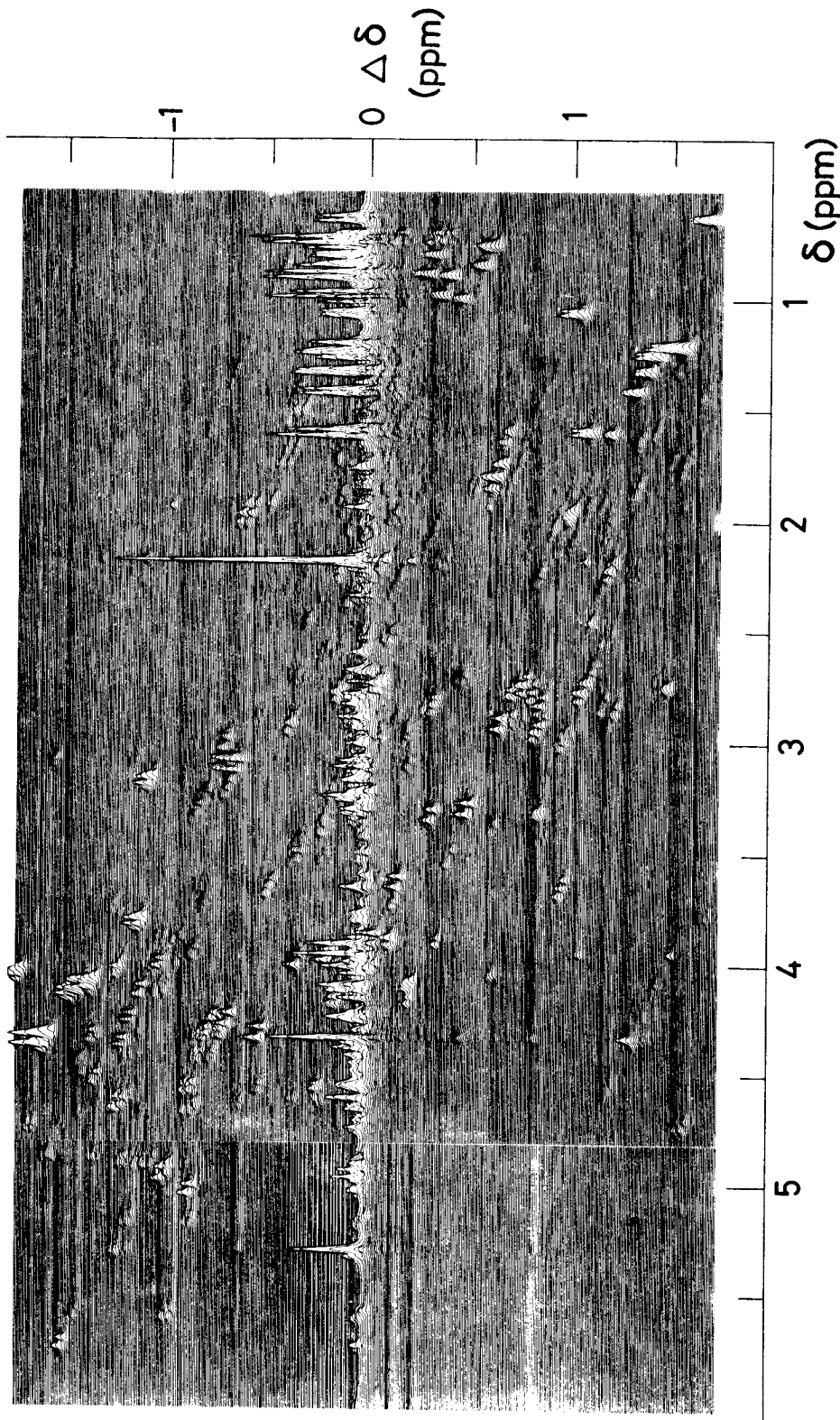


Fig. 2.7

Dreidimensionale Ansicht eines 360 MHz ^1H NMR SECSY-Spektrums einer 0.01 M Lösung des basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitors (BPTI) in D_2O , $\text{pD} = 7.0$, $T = 68^\circ\text{C}$. Aus praktischen Gründen ist die Figur bei 4.8 ppm aus zwei Teilen zusammengesetzt. (Bild aus Nagayama und Wüthrich, 1981a)

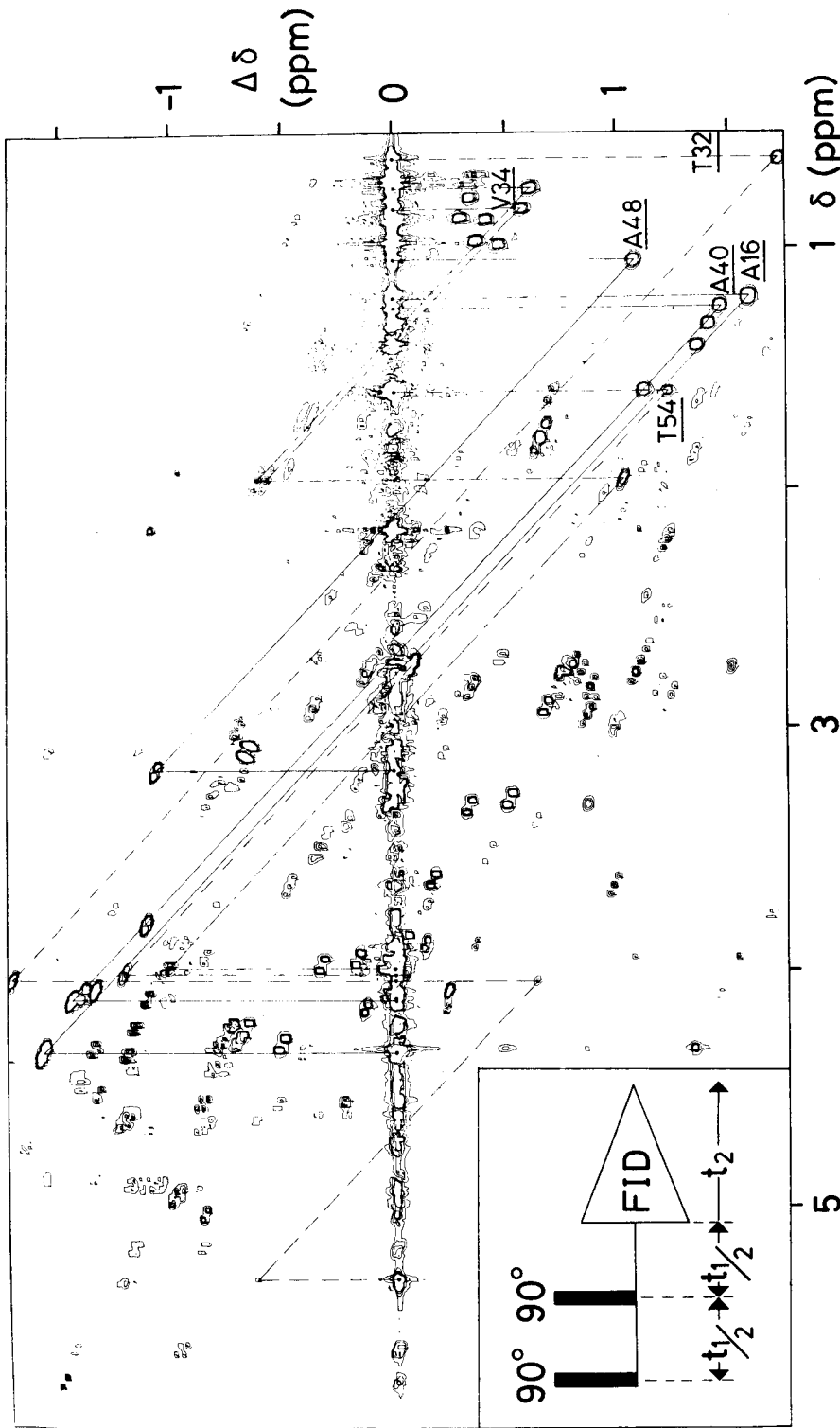


Fig. 2.8

Höhenlinienzeichnung des Spin-Echo korrelierten ^1H -NMR-Spektrums von Fig. 2.7. Zur Illustration sind die folgenden Spinsysteme eingezeichnet: Thr 32 (---), Ala 48 (-), Ala 16 (-), Ala 40 (-) und Thr 54 (---). Links unten ist die für das SECSY-Experiment benutzte Pulssequenz angegeben.

Linienzeichnung dargestellt, welche breite Anwendung in der Auswertung von 2D Spektren findet. Zur Illustration sind einige Spinsysteme eingezeichnet. Die Linie $\omega_1 = 0$ im SECSY-Spektrum bezeichnet man als Diagonale, weil sie der Diagonalen $-\omega_1 = \omega_2$ im COSY-Spektrum entspricht (Gleichung 2.7).

2.3.3 Unterschiede zwischen dem COSY- und dem SECSY-Experiment

Die COSY- und SECSY-Spektren sehen auf den ersten Blick sehr unterschiedlich aus (Fig. 2.9), sie sind jedoch theoretisch äquivalent. Der einzige Unterschied besteht in der Definition der Zeiten t_1 und t_2 (Fig. 2.4, Fig. 2.8). Mit der gleichen Substitution wie in Kap. 2.2.2 für 2DJ-Spektren, lassen sich SECSY und COSY ineinander umrechnen (Nagayama et al., 1980). Die beiden Experimente ergeben verschiedene Linienformen, in der Praxis sind diese jedoch zum grössten Teil von den angewendeten, starken, digitalen Filterfunktionen bestimmt (Kap. 2.5.2). In der Anwendung ergänzen sich die COSY- und SECSY-Spektren oft. Ein Grund dafür ist, dass der ω_1 -Frequenzbereich im SECSY im allgemeinen kleiner ist als im COSY, so dass mit gleichvielen t_1 -Experimenten im SECSY ein viel längeres, maximales t_1 resultiert. Dies bedeutet, dass das experimentelle SECSY-Spektrum die schmälere Linien und die bessere digitale Auflösung besitzt.

Die 2D NMR-Spektren von Proteinen sind im allgemeinen schlecht aufgelöst. In diesem Fall besteht ein sogenannter Crosspeak aus allen, nur teilweise aufgelösten, Komponenten eines Crosspeak-Multipletts (Fig. 2.9). Dies führt zu unterschiedlichen Formen sich entsprechender Crosspeaks im COSY- und SECSY-Spektrum, weil die Anordnung der Multiplett-Komponenten in den zwei Spektren verschieden ist (Fig. 2.5, Fig. 2.6). Zusätzlich sind die ω_1 -Frequenzdifferenzen im SECSY- verglichen zum COSY-Experiment nur halb so gross.

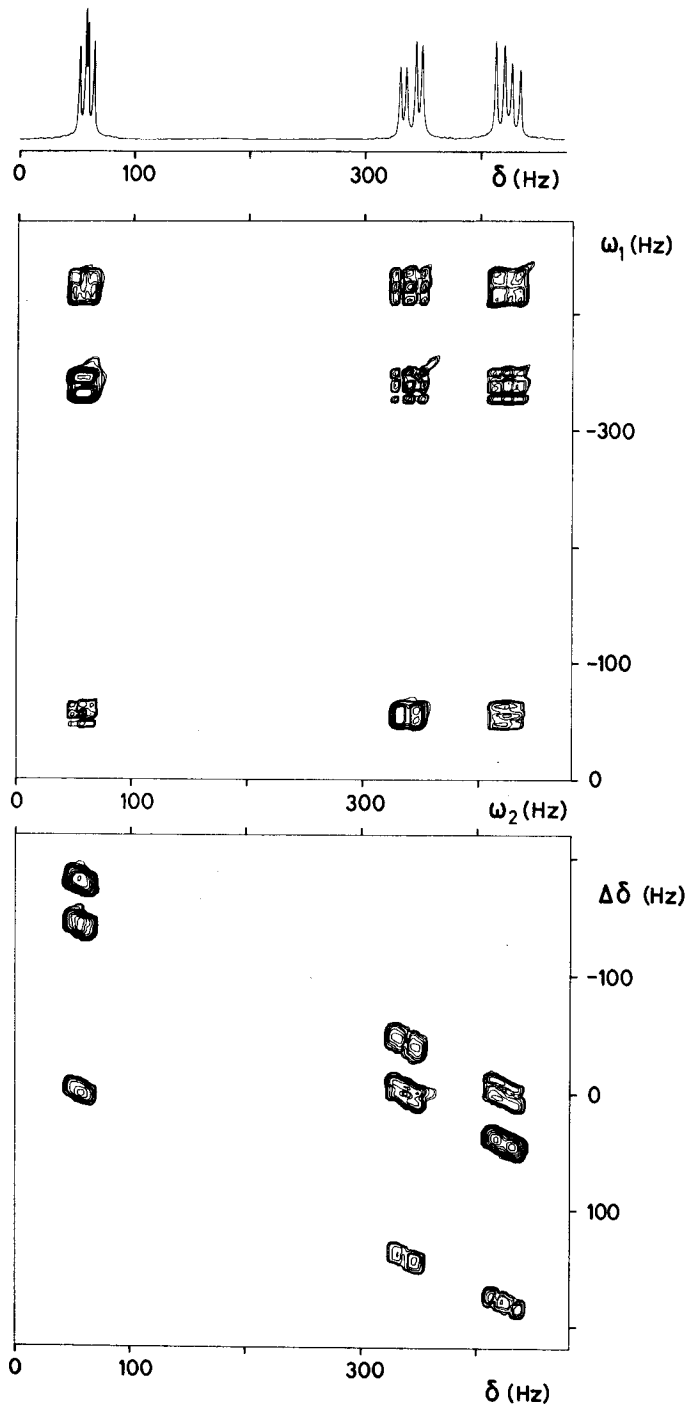


Fig. 2.9

Die Figur zeigt von oben nach unten ein eindimensionales, ein COSY- und ein SECSY-Spektrum des AMX-Spinsystems der C^αH - und C^βH -Protonen einer 0.4 M Tyrosinlösung in D_2O , $\text{pD} = 11.5$, $T = 25^\circ\text{C}$, digitale Auflösung 2.4 Hz/Punkt. Die Figuren 2.5 und 2.6 zeigen entsprechende, schematische COSY- und SECSY-Spektren.

Die Figur 2.9 zeigt die COSY- und SECSY-Spektren eines AMX-Spinsystems mit derselben, für ein Proteinspektrum typischen, digitalen Auflösung. Beide Spektren basieren auf demselben Datensatz, der mit einer COSY-Pulssequenz gemessen wurde. Der Anfang der FID-Daten für das SECSY-Spektrum wurde durch eine Datenumordnung jeweils auf das Echomaximum gelegt. Nicht nur die Linien, die zu einem Crosspeak im obigen Sinn überlappen, sind verschieden angeordnet, sondern auch solche Crosspeaks untereinander, was zu Auflösungsverbesserungen zu Gunsten der einen Darstellungsart führen kann. Ein Vergleich der experimentellen COSY- und SECSY-Spektren in Fig. 2.9 mit den entsprechenden Schemata in den Fig. 2.5 und 2.6 zeigt, wie die ungenügend aufgelösten Crosspeak-Multiplett-Komponenten in den einzelnen Fällen überlappen. Die Schemata (Fig. 2.5, Fig. 2.6) wurden mit den experimentellen Spin-Spin-Kopplungskonstanten aus der Fig. 2.9 berechnet, wobei zwischen den verschiedenen Kernen eine schwache Kopplung angenommen wurde.

Ausläufer ("Füße") von hohen, diagonalen Resonanzen verlaufen parallel zu den Frequenzachsen (vgl. z.B. Fig. 4.7). Dies bedeutet, dass sie im SECSY-Spektrum entlang $\omega_1 = 0$ verlaufen, wo die diagonalen Resonanzen liegen, während sie im COSY quer durchs Spektrum laufen, wo sie interessante Resonanzen überdecken können. Ein weiterer Unterschied zeigt sich nur in Absorptionsspektren. Im SECSY-Experiment lassen sich absorptive und dispersive Linienformen nicht trennen (Nagayama et al., 1980), während das COSY-Experiment eine Auftrennung in reine Phasen zulässt.

Durch eine geeignete Versuchsanordnung lassen sich die Vorteile von SECSY und COSY in einem Experiment vereinen. Dieses Experiment, genannt FOCYSY, wird in Kap. 2.5.4 näher erläutert.

2.4 Das zweidimensionale NOE-Experiment (NOESY)

Der nukleare Overhauser-Effekt (NOE) ist sehr nützlich, um räumliche Strukturen von Molekülen zu studieren, weil er stark von den Kernabständen abhängt (Kap. 1.3) und dadurch Rückschlüsse auf die Anordnung der Kerne im Raum zulässt. Eindimensionale NOE-Messungen finden daher breite Anwendung. Das hier zu besprechende 2D NOE (NOESY) Experiment besteht aus einer Sequenz von drei 90° -Pulsen (Fig. 2.10). Der erste Puls erzeugt transversale Magnetisierung. Während der folgenden Entwicklungszeit t_1 präzessieren die einzelnen Magnetisierungskomponenten mit ihrer jeweiligen Larmorfrequenz. Der zweite 90° -Puls bringt die y-Komponente der transversalen Magnetisierung in Richtung der z-Achse. In der nun folgenden festen Mischzeit τ_m können z-Magnetisierungskomponenten durch den Einfluss der Dipol-Dipol-Wechselwirkung austauschen. Der dritte 90° -Puls erzeugt wieder transversale Magnetisierung, die Auskunft über den Magnetisierungsaustausch während der Zeit τ_m gibt. Durch das Inkrementieren der Zeit t_1 erhält man einen zweidimensionalen Datensatz, der durch eine 2D Fouriertransformation das NOESY-Spektrum ergibt.

Nach dem zweiten 90° -Puls bleibt transversale Magnetisierung übrig, die mit dem später zu messenden Signal interferieren kann und darum beseitigt werden muss. Jeener et al. (1979) schlugen vor, für diesen Zweck während der Mischzeit einen Feldgradienten anzulegen. Ein solcher Gradient ist nicht bei jedem Spektrometer verfügbar und er kann das Lock-System beeinflussen. Deshalb kommt einer anderen Methode mehr Bedeutung zu. Bei dieser Methode werden zwei Experimente mit verschiedenen Phasen für die 90° -Pulse durchgeführt (Macura und Ernst, 1980). Ändert man die Phase des zweiten Pulses um 180° behält die transversale Magnetisierung dasselbe Vorzeichen, während dasjenige der erzeugten z-Magnetisierung wechselt. Eine Subtraktion der gemessenen Signale eliminiert daher die transversale Magnetisierung. Die Kurznotation dieses Phasenzklus schreibt sich wie folgt

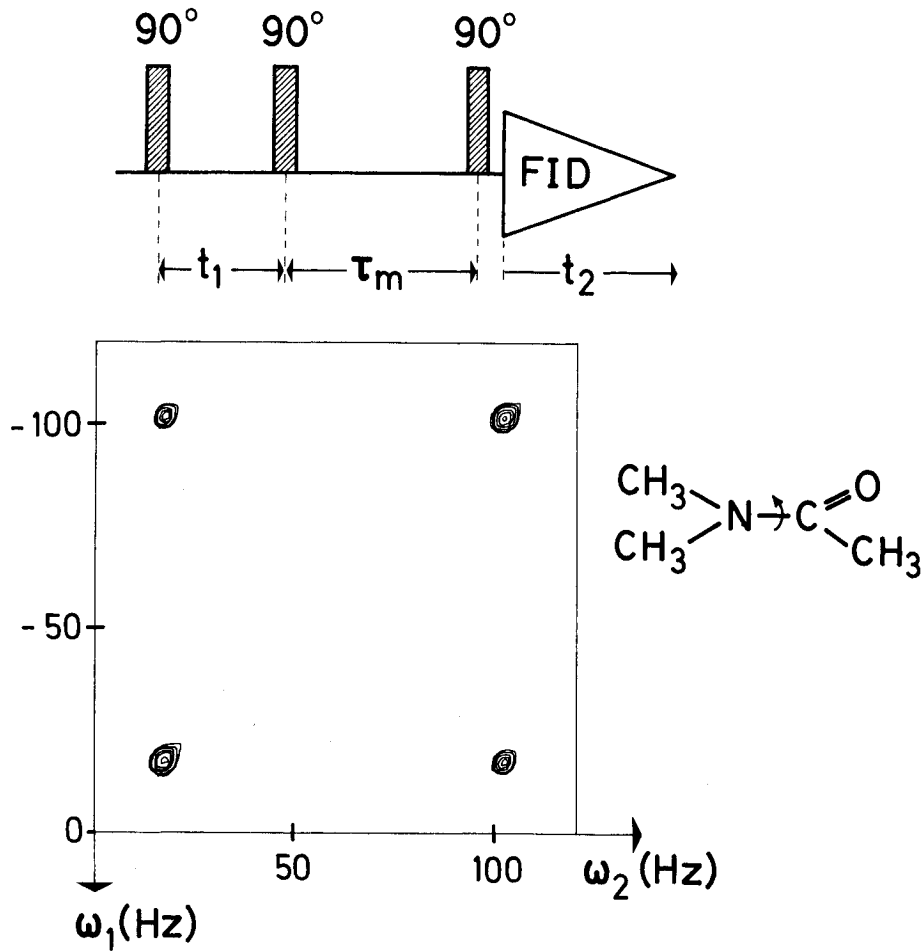


Fig. 2.10

Pulssequenz für ein 2D NOE-Experiment oder zur Untersuchung des chemischen Austausches (Jeener et al., 1979). Die Anwendung dieser Pulssequenz mit $\tau_m = 0.2$ sec auf eine Lösung von Dimethylacetamid (DMA) in deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO) ergibt bei $T = 50^\circ\text{C}$ das gezeigte 2D Spektrum, das sich auf die Spektralregion der zwei an den Stickstoff gebundenen Methylgruppen beschränkt. Bei erhöhter Temperatur drehen die zwei N-Methylgruppen um die C-N Bindung in DMA (\rightarrow). Dies gibt im gezeigten 2D Spektrum Anlass zu Crosspeaks, weil die Frequenzen einzelner Magnetisierungskomponenten wegen des chemischen Austausches während τ_m in den zwei Zeitperioden t_1 und t_2 unterschiedlich sein können. Das gezeigte Spektrum kann in 15 Minuten gemessen, fouriertransformiert und gezeichnet werden und erlaubt daher eine schnelle Ueberprüfung von Programm- und Spektrometerfunktion.

$$\begin{array}{cccc}
 x & x & x & + \\
 x & - x & x & -
 \end{array} \tag{2.14}$$

Der Zyklus (2.14) unterdrückt auch die axialen Resonanzen, da diese durch Magnetisierung verursacht werden, die während τ_m relaxiert ist.

Im NOESY-Experiment erscheinen p- und n-Resonanzen mit denselben Eigenschaften, wie sie im Kap. 2.3.1 im Zusammenhang mit dem COSY-Spektrum diskutiert wurden. Das schematische COSY-Spektrum in Fig. 2.5 veranschaulicht auch das NOESY-Spektrum eines AMX-Spinsystems. Allerdings muss man zwei Unterschiede beachten. Im phasensensitiven NOESY-Spektrum besitzen alle p- bzw. n-Resonanzen im Falle langer Korrelationszeiten τ_c unter sich die gleiche absorptive Phase (Macura und Ernst, 1980). Ferner besteht zwischen den diagonalen Resonanzen und den Crosspeaks ein Intensitätsunterschied, der von der Mischzeit τ_m abhängt. Für sehr kleine τ_m existieren nur diagonale Resonanzen. Mit der Zunahme von τ_m wird mehr und mehr Magnetisierung von den diagonalen Resonanzen auf die Crosspeaks "übertragen".

Das Auftreten von n- und p-Resonanzen verursacht Probleme, wenn man mit voller Zweikanal-Messung arbeiten will. Zur Unterdrückung der p-Resonanzen können wie im COSY-Experiment zwei Messungen mit verschiedenen Phasen durchgeführt werden

$$\begin{array}{cccc}
 x & x & x & + \\
 x & y & y & -
 \end{array} \tag{2.15}$$

Die Phasenzyklen (2.14) und (2.15) beziehen sich auf eine Einkanal-Messung. Für eine Zweikanal-Messung sollten sie mit der CYCLOPS-Sequenz (2.12) kombiniert werden. Der Zyklus (2.12) muss im NOESY-Experiment auf den dritten Puls angewendet werden, weil dieser die gemessene transversale Magnetisierung erzeugt. Aus der Kombination von (2.12) und (2.14) ergeben sich die ersten acht Zeilen in Tabelle 2.2. Dieser 8-Pha-

Tabelle 2.2

16-Phasenzyklus für 2D NOE-Spektroskopie (NOESY), der volle Zweikanal-messung erlaubt und transversale Magnetisierung, axiale und p-Resonanzen unterdrückt. Dieser Zyklus beruht auf den Phasenzyklen (2.12), (2.14) und (2.15).

Phasen			Computerspeicher	
1. Puls	2. Puls	3. Puls	Signal I	Signal II
x	x	x	+ A	+ B
x	- x	x	- A	- B
x	x	y	- B	+ A
x	- x	y	+ B	- A
x	x	- x	- A	- B
x	- x	- x	+ A	+ B
x	x	- y	+ B	- A
x	- x	- y	- B	+ A
x	y	y	- A	- B
x	- y	y	+ A	+ B
x	y	- x	+ B	- A
x	- y	- x	- B	+ A
x	y	- y	+ A	+ B
x	- y	- y	- A	- B
x	y	x	- B	+ A
x	- y	x	+ B	- A

senzyklus muss zur Unterdrückung der p-Resonanzen gemäss (2.15) erweitert werden. Dies ergibt den in Tabelle 2.2 beschriebenen 16-Phasenzzyklus.

Ein Paar von 90° -Pulsen erzeugt in einem gekoppelten Spinsystem auch Null-, Doppel- und Multiquantenübergänge (Aue et al., 1976a; Macura et al., 1981). Der Begriff Multiquantenübergang schliesst im Folgenden auch die Null-, Ein- und Doppelquantenübergänge ein. Ein dritter 90° -Puls transformiert die Multiquantenübergänge in beobachtbare transversale Magnetisierung, die im NOESY-Spektrum die sogenannten J-Crosspeaks erzeugt. Diese Resonanzen können fälschlicherweise als NOE-Crosspeaks interpretiert werden. Wenn die J-Crosspeaks im NOESY-Spektrum nicht aufgelöst sind, sondern mit NOE-Linien zusammenfallen, verändern sie deren Intensität. Aus diesen Gründen muss man diese störenden Resonanzen unterdrücken. Die Intensität der NOE-Crosspeaks ändert sich nur langsam mit der Länge der Mischzeit τ_m (Anil Kumar et al., 1981), die J-Crosspeak-Intensitäten dagegen sind rasch ändernde, oszillatorische Funktionen. Auf dieser Tatsache beruhen die Methoden zur Eliminierung dieser Linien (Macura et al., 1981 und 1982a+b). Bei zwei Methoden verändert man die Länge der Mischzeit τ_m , indem man sie entweder systematisch inkrementiert (simultan mit t_1) oder aber zufällig variiert, beides geschieht innerhalb gewisser Grenzen $\tau_m \dots \tau_m + \Delta\tau_m$. Auf beide Arten verschieben sich die Multiquantenfrequenzen in ω_1 -Richtung. Durch die Inkrementierung von τ_m erhalten sie eine neue, feste ω_1 -Frequenz (Macura et al., 1982a), d.h. die zurückbleibende Intensität wird ganz von NOE-Resonanzen verursacht. In einem Proteinspektrum besteht jedoch die Gefahr, dass die verschobenen J-Crosspeaks mit anderen NOE-Linien überlappen. Aus diesem Grund wird diese Methode nur selten angewendet. Durch die Variation der Mischzeit τ_m werden die J-Crosspeaks über den ganzen ω_1 -Frequenzbereich verteilt (Macura et al., 1981), weil sie bei jeder Teilmessung eine andere ω_1 -Frequenz besitzen. Dies kann zu einer Zunahme des "Rauschens" entlang der Linien ($\omega_1, \omega_2 = \omega_{2M}$) führen, wobei für ω_{2M} die ω_2 -Frequenzen der auftretenden Multiquantenübergänge eingesetzt werden müssen. Trotz dieses Nachteils wird meistens diese Methode bei NOESY-Experimenten von Makromolekülen angewendet.

Nach einer Mischzeit von 100 msec und mehr lassen sich die J-Crosspeaks im Proteinspektrum nicht mehr beobachten (Macura et al., 1982b). Sie müssen daher vor allem bei kurzen Mischzeiten τ_m unterdrückt werden. Die zwei oben erwähnten Methoden können in diesem Fall zu nicht tolerierbaren Veränderungen von τ_m führen, denn die NOE-Aufbaukurve besitzt für kleine τ_m einen steilen Anstieg (Anil Kumar et al., 1981). Eine Abwandlung dieser Methoden mit demselben Resultat hält die Mischzeit konstant (Macura et al., 1982b) und weist dafür in der Mitte der Mischzeit τ_m einen 180° -Puls auf, dessen Position man durch Inkrementierung (simultan mit t_1) in gewissen Grenzen $\tau_m/2 \dots \tau_m/2 + \Delta\tau_m^{\max}$ ändert. Dieses Vorgehen ergibt für die J-Crosspeaks wiederum eine verschobene, konstante ω_1 -Frequenz.

Für $\Delta\tau_m$ und $\Delta\tau_m^{\max}$ gilt dieselbe Abschätzung, man erhält sie aus der tiefsten Multiquanten-Übergangsfrequenz Ω die unterdrückt bzw. verschoben werden soll. Unter der Annahme der Mittelung einer Sinusfunktion über mindestens eine Periode erhält man

$$\Delta\tau_m, \Delta\tau_m^{\max} > 1 / \Omega \quad (2.16)$$

In einem Proteinspektrum mit seiner breiten Diagonalen, lassen sich Nullquantenübergänge mit einer Frequenzdifferenz von etwa 200 Hz noch auflösen, d.h. für $\Delta\tau_m = \Delta\tau_m^{\max}$ muss eine Zeit von mindestens 5 ms gewählt werden.

Die J-Crosspeaks lassen sich ausser mit den soeben beschriebenen Methoden auch durch eine geeignete Phasenwahl für die 90° -Pulse eliminieren (Macura et al., 1981). Dies gilt allerdings nicht für die Nullquantenübergänge. Der Phasenzklus (2.14) unterdrückt beispielsweise alle m -Quantenübergänge mit $m = 1, 3, 5, \dots$.

Das NOESY-Experiment lässt sich auch mit einer Pulssequenz durchführen, bei der die Mischzeit in der Mitte von t_1 liegt, d.h. nach dem letzten Puls wird mit der Messung noch für die Zeit $t_1/2$ zugewartet. Diese Me-

thode entspricht der Ausnützung der Echobildung in der 2DJ und 2D korrelierten Spektroskopie (Kap. 2.2, Kap. 2.3). In der Darstellung gleicht ein solches Spektrum stark der des SECSY-Experiments. Da im allgemeinen eine Resonanz bei tiefem Feld ohne weiteres NOE zu einer Resonanz bei hohem Feld zeigen kann, erhält man keine Reduzierung der ω_1 -Frequenz, wie dies für das SECSY-Experiment möglich ist. Für Proteine und Polypeptide ist erfahrungsgemäss die Sensitivität für NOESY kleiner als für 2D korrelierte Spektren, d.h. jede zusätzliche Relaxation des NOE sollte vermieden werden. Darum empfiehlt sich die Anwendung der NOESY-Pulssequenz, die in Fig. 2.10 angegeben ist.

Ein 2DJ-, SECSY- oder COSY-Experiment ergibt ein einzelnes Spektrum, das alle Information enthält, die aus dem gewählten Experiment gewonnen werden kann. Ein NOESY-Spektrum hingegen ändert sich in Funktion der Mischzeit τ_m . Information über die NOE-Aufbaukurven, welche die Abhängigkeit einzelner NOE's von τ_m beschreiben, lässt sich nur aus NOESY-Spektren mit verschiedenen τ_m -Werten gewinnen. Diese NOESY-Experimente müssen unter möglichst identischen Bedingungen durchgeführt werden. Dadurch ergeben sich Messerien, die ein Spektrometer für mehrere Tage blockieren können. Bodenhausen und Ernst (1981) schlugen ein Experiment vor, aus dem sich mit einer Messung die ganze NOE-Aufbaukurve ergibt. Dieses dreidimensionale NMR-Experiment, genannt Accordion, lässt sich leider nicht ohne weiteres auf ^1H NMR von Proteinen anwenden. Die meisten Protonen sind untereinander gekoppelt und diese Kopplungen sind im Crosspeak-Multiplett nur ungenügend aufgelöst, was die Analyse eines Accordion-Experimentes wesentlich erschwert.

Die Anwendung der 2D NOE-Spektroskopie auf Polypeptide und Proteine erwies sich als äusserst fruchtbar. Mit Hilfe von NOESY- und COSY-Spektren lassen sich die meisten Resonanzen sequenziell zuordnen (Kap. 4). Durch die Distanzinformation über benachbarte Kerne, die das NOESY-Spektrum enthält, liefert es auch den Grundstein zur Konformationsbestimmung von Polypeptiden und Proteinen (Kap. 5).

2.5 Die Datenverarbeitung in der 2D NMR-Spektroskopie

2.5.1 Die Aufnahme von 2D Daten

Die Messung von 2D Experimenten erfordert die Durchführung von Pulssequenzen mit verschiedenen, inkrementierbaren t_1 -Werten. Die Radiofrequenz-Pulse müssen (räumlich) homogen sein, weil sonst Artefakte im 2D Spektrum verursacht werden können. Kleinere Inhomogenitäten kann man durch spezielle, zusammengesetzte Pulse korrigieren (Freeman et al., 1980). Während der Sequenz muss ein exaktes "Timing" gewährleistet sein, d.h. Zeiten zwischen $1\mu\text{s}$ und mehreren Sekunden müssen auf mindestens $1\mu\text{s}$ genau sein. Computer-Programme zur Messung von 2D Spektren und damit die Elektronik, welche die Aufnahme steuert, sollten so flexibel sein, dass sie Pulssequenzen ermöglichen, die zwölf oder mehr Pulse mit beliebigen Phasen und Zeitintervallen enthalten. Mindestens eine Zeitvariable muss sich inkrementieren lassen, wobei das Inkrement frei wählbar sein soll. Weiter muss man jede gewünschte Anzahl von t_1 -Experimenten beliebig oft wiederholen können. Zur Unterdrückung von Multiquantenübergängen (Kap. 2.4) braucht man eine zweite inkrementierbare Zeitvariable oder ein Zeitintervall, das innerhalb gewisser, wählbarer Grenzen zufällig ändert. In jedem einzelnen Zeitintervall sollte einem die Benützung des Entkopplers frei gestellt sein.

Die Datenaufnahme in 2D Experimenten unterscheidet sich nicht prinzipiell von der Messung von 1D Spektren. Natürlich muss ein Speicher mit einer grossen Kapazität (Disk-System) vorhanden sein, der die anfallenden Daten aufnimmt. Die Datenmatrix eines Polypeptid- oder Proteinspektrums kann ohneweiteres eine Million Datenpunkte enthalten. Die Aufnahme dieser Datenpunkte bedingt eine lange Messzeit, was hohe Anforderungen an die Langzeitstabilität des Spektrometers stellt, d.h. das Feld-Frequenz-Lock-System und die Felddhomogenität müssen während der ganzen Messzeit stabil bleiben. Besonders die Messung aller t_1 -Werte

benötigt eine lange Zeitspanne, so dass sich Stabilitätsschwankungen vor allem bei diesem Parameter auswirken, was im Spektrum zu Störungen führen kann, die parallel zur ω_1 -Achse verlaufen (" t_1 -Noise"). Solche Störungen verursachen in Proteinspektren vor allem die Methylgruppen, die Lösungsmittelresonanz und einzelne Linien in der Aromatenregion.

Oft wirkt die lange Messzeit für ein 2D Experiment abschreckend. Betrachtet man die Messzeit im Zusammenhang mit dem Informationsinhalt des 2D Spektrums, erkennt man, dass es nicht möglich ist, dieselbe Information in derselben Zeit mit 1D Experimenten zu erhalten (Bösch et al., 1981). Der Grund liegt in der Sensitivität des 2D Experiments, (Aue et al., 1978), die wesentlich besser ist, als man auf Anhieb vermutet, weil jedes t_1 -Experiment seinen Teil zum Informationsgehalt des ganzen 2D Spektrums beiträgt.

In einem 2D Spektrum eines Polypeptids oder Proteins betragen die Crosspeakintensitäten oft nur wenige Prozent der Intensität der diagonalen Resonanzen. Aus diesem Grund wählt man bei einer Zweikanalmessung eines COSY- oder NOESY-Experiments die Trägerfrequenz oft am Rande des Spektrums, um die Faltung nicht vollständig eliminiertes, diagonales p-Resonanzen (Kap. 2.3.1) zum vornherein zu vermeiden. Dieses Vorgehen verhindert auch, dass nicht vollständig unterdrückt, axiale Resonanzen mitten im Spektrum erscheinen. In einem SECSY-Experiment werden die p-Resonanzen sowieso in den Bereich der n-Resonanzen gefaltet, so dass man die Trägerfrequenz in der Mitte des Spektrums wählen kann.

Zusätzlich zu den Parametern, die auch für ein 1D Experiment gebraucht werden, muss man im 2D Experiment den ω_1 -Frequenzbereich und die Anzahl X_1 der verschiedenen t_1 -Werte bestimmen. Während sich aus dem gewählten 2D Experiment der ω_1 -Frequenzbereich ergibt, ist man frei in der Wahl von X_1 . Da die totale Messzeit des 2D Experiments wesentlich von der Anzahl verschiedener t_1 -Experimente abhängt, sollte der Wert von X_1 optimal gewählt werden. Man muss einen Kompromiss finden zwischen kleinen Werten von X_1 , die im Spektrum breite Linien in der ω_1 -Richtung zur

Folge haben, und grossen X_1 -Werten, die eine lange Messzeit verursachen. Für grosse Werte von X_1 (d.h. für lange t_1) muss man zusätzlich beachten, dass das Signal stark relaxiert sein kann und im Extremfall nur noch Rauschen gemessen wird. Für ein 2DJ-Experiment gilt beispielsweise die Gleichung (2.1), welche die Abhängigkeit der Echoamplitude von t_1 und von der transversalen Relaxationszeit T_2 beschreibt. Dies bedeutet z.B. für globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 7'000, dass es sinnlos ist mit einem ω_1 -Frequenzbereich von ± 30 Hz mehr als 50 verschiedene t_1 -Werte zu messen.

In der Tabelle 2.3 sind Standardparameter angegeben, die als Anhaltspunkte dienen sollen, um 2D Spektren von Polypeptiden und Proteinen mit einem Molekulargewicht bis etwa 15'000 zu messen. Wenn die Konzentration einer Proteinlösung 10 mM oder mehr beträgt, lassen sich in 24 Stunden 2D Spektren messen, die ein gutes Signal-zu-Rauschen Verhältnis aufweisen. Der Wert von X_2 (Tab. 2.3) wird nur durch den Datenspeicherplatz beschränkt. Die zwischen den einzelnen Pulssequenzen ohnehin vorhandene Wartezeit kann benützt werden, um mehr X_2 -Werte zu messen. Aus der Tabelle 2.3 geht hervor, dass ein typisches FID-Datenfile eine Million Datenpunkte enthält. Dies bedeutet, dass für eine Langzeitspeicherung Magnetbänder benützt werden sollen, weil diese pro Speichereinheit wesentlich billiger sind als Magnetplatten (Disk). Ferner ist die Lagerung der Bänder unproblematisch, während für die Magnetplatten einige Vorsichtsmassnahmen zu beachten sind.

Bei der Anwendung der 2D Techniken auf Proteinstudien in wässriger Lösung spielen die Amidprotonen eine wesentliche Rolle (Kap. 4, Kap. 5). Da diese Protonen zum Teil rasch mit dem Lösungsmittel austauschen, müssen die Spektren oft in einer H_2O Lösung gemessen werden. Dies ist auf einfache Weise möglich, indem man die Lösungsmittelresonanz durch eine selektive, kontinuierliche Bestrahlung sättigt. Nur während der Datenaufnahme (t_2) bleibt die Zusatzfrequenz abgeschaltet. Durch dieses Vorgehen lässt sich die H_2O Resonanz sehr gut unterdrücken. Die Einstrahlung sättigt auch Resonanzen der untersuchten Substanz, die die-

Tabelle 2.3

Standardparameter[†] zur Durchführung von 2D Experimenten bei 500 MHz.
Die Angaben gelten für diamagnetische Proteine mit einem Molekulargewicht bis etwa 15'000.

2D Experiment	$\pm \omega_1$	ω_2	X1	X2	Hz/pt (ω_1)	Hz/pt (ω_2)
2DJ	20	4'000	50	4'096	0.8	2
SECSY	1'000	4'000	512	3'072	4	2.6
COSY	5'000	10'000	512	2'048	20	10
NOESY	5'000	10'000	512	2'048	20	10

$\pm \omega_1$: Frequenzbereich in ω_1 -Richtung

ω_2 : Frequenzbereich in ω_2 -Richtung

X1 : Anzahl verschiedener t_1 -Werte

X2 : Anzahl Datenpunkte in jedem FID

Hz/pt: Auflösung in Hz/Punkt für die ω_1 - bzw. ω_2 -Richtung;
diese Werte beinhalten noch kein "Zero-Filling" (Kap. 2.5.2).

[†]Die Messzeit für eine rund 10 - 15 mM Proteinlösung beträgt etwa 24 Stunden. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulssequenzen besteht eine Wartezeit (Relaxation) von etwa 1.5 Sekunden. Die angegebenen Parameter sind als Richtgrösse zu verstehen. Sie müssen den jeweiligen Randbedingungen angepasst werden.

selbe Frequenz wie das H_2O Signal besitzen. Dadurch verschwinden alle Crosspeaks mit diesen Resonanzpositionen aus dem Spektrum.

Die Figur 2.11 zeigt ein COSY- und ein NOESY-Spektrum, die in einer H_2O Lösung gemessen wurden. Bei einem Vergleich von Fig. 2.11A und Fig. 2.11B fällt auf, dass die Diagonale im NOESY-Spektrum eine Diskontinuität aufweist, die im COSY-Spektrum nicht auftritt. Die Verschiebungen der ω_1 -Frequenzen zeigen von der Einstrahlfrequenz weg. 2D Messungen mit verschiedenen Einstrahlstärken ergaben, dass die Verschiebungen mit den von Bloch und Siegert (1940) beschriebenen Effekt übereinstimmen. Wieso sich der Bloch-Siegert-Effekt im COSY-Spektrum nicht manifestiert, ist noch unklar; weitere Abklärungen sind im Gange. In diesem Zusammenhang sind NOESY-Experimente mit kurzen Mischzeiten τ_m interessant. In diesen Spektren zeigt sich eine Aufspaltung (Gabelung) der Diagonalen, die darauf hinweist, dass die m-Quantenübergangsfrequenzen (Kap. 2.4) (mindestens teilweise) nicht verschoben werden.

Das unterschiedliche Verhalten der COSY- und NOESY-Experimente auf eine selektive Einstrahlung während t_1 (Fig. 2.11) führt zwangsläufig zu Unstimmigkeiten, wenn man Daten aus den beiden Experimenten miteinander kombiniert. Dieses Problem lässt sich am einfachsten lösen, indem man auf eine selektive Einstrahlung während t_1 verzichtet; dadurch verschwinden die zusätzlichen Verschiebungen im NOESY-Spektrum.

Eine weitere Möglichkeit die H_2O Resonanzen zu unterdrücken, bietet die Redfield-Technik (Redfield et al., 1975). Cutnell (1982) verwendete diese Technik zum Studium des Amidprotonen-Austausches in H_2O . Er benutzte dazu ein zweidimensionales Austauschexperiment (Jeener et al., 1979), in welchem er den dritten Puls durch einen Redfield-Puls ersetzte. Durch dieses Vorgehen liess sich die H_2O Resonanz für diese spezielle Anwendung befriedigend unterdrücken. Ein wesentliches Problem dieses Experiments besteht in der transversalen H_2O Magnetisierung, die nach dem zweiten Puls noch vorhanden ist. Wie sich diese Magnetisierung in der Messung von wässrigen Proteinlösungen auswirkt, lässt sich nur

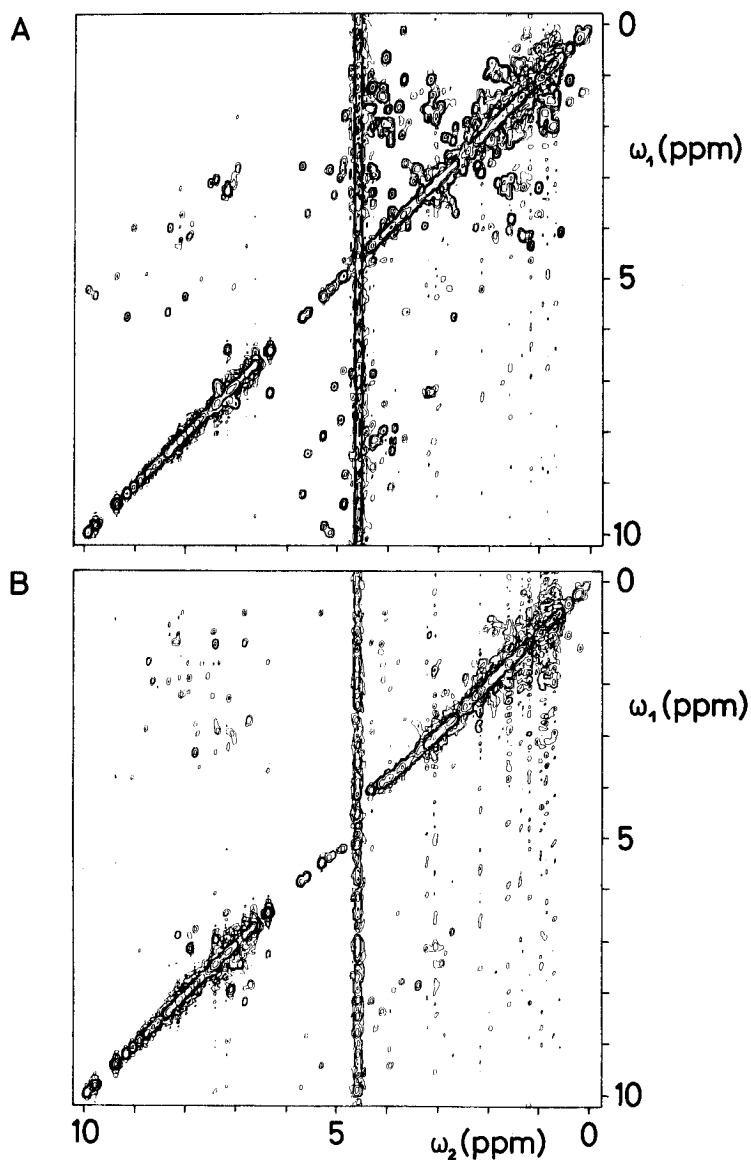


Fig. 2.11

(A) 360 MHz ^1H COSY-Spektrum einer 0.02 M Lösung des basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitors (BPTI) in H_2O , pH = 3.5, $T = 45^\circ\text{C}$. Ausser während der Datenaufnahme wurde auf die H_2O -Resonanz kontinuierlich eingestrahlt (0.07 W). (B) Unter identischen Bedingungen (vgl. A) aufgenommenes NOESY-Spektrum ($\tau_m = 100$ msec). Man beachte die Diskontinuität in der Diagonalen, die von der Einstrahlung während der Zeit t_1 herrührt und die in (A) nicht auftritt. Die Crosspeaks im NOESY-Spektrum sind um den gleichen Betrag verschoben wie die diagonalen Resonanzen mit demselben ω_1 -Wert (Bloch-Siegert-Effekt).

durch entsprechende Experimente abklären. Möglicherweise muss man während der Mischzeit τ_m einen "Homospoil-Puls" (Jeener et al., 1979) anwenden. Mit den Apparaturen in unserer Arbeitsgruppe bestand bis jetzt nicht die Möglichkeit, die Redfield-Technik auf 2D NMR Methoden anzuwenden. Deswegen fehlt die notwendige, experimentelle Erfahrung, um die Anwendung der Redfield-Technik auf 2D NMR-Messungen von wässrigen Proteinlösungen zu diskutieren.

2.5.2 Die zweidimensionale Fouriertransformation

Die Messung eines 2D Experiments ergibt einen Datensatz $S(t_1, t_2)$, den man optimal auswerten muss. Um die Messzeit in einer vernünftigen Größenordnung zu halten und wegen den Anforderungen an die Kapazität des Datenspeichers, weist ein 2D FID-Datensatz für ein Polypeptid oder Protein im allgemeinen eine sehr schlechte digitale Auflösung auf (Tab. 2.3). Vergrößert man die Datenmatrix in beiden Dimensionen durch das Auffüllen mit Nullen vor der Fouriertransformation, lässt sich die digitale Auflösung im 2D Spektrum verbessern (Bartholdi und Ernst, 1973; Ernst und Anderson, 1966). Die Erfahrung mit Proteinspektren zeigt, dass die Erweiterung von N Datenpunkten mit Nullen bis auf maximal 4N, noch eine Auflösungsverbesserung ergeben kann.

2D Spektren werden meistens als Betragsspektren dargestellt, aus diesem Grund muss man die von der Dispersion herrührenden, breiten Linien mit digitalen Filterfunktionen unterdrücken. Ohne die Anwendung starker digitaler Filterfunktionen lässt sich aus einem Proteindatensatz kein vernünftiges Spektrum berechnen (Fig. 2.12A). Die von uns meistens verwendeten Funktionen ergaben sich rein empirisch, und sie weichen von den theoretisch optimalen Filtern ab (Ernst, 1966), sie haben sich jedoch in Spektren von Polypeptiden und Proteinen bestens bewährt. Die Funktionen bestehen aus der ersten halben Periode einer phasenverschobenen Sinus- oder Sinusquadratfunktion:

$$\sin(\pi(t+t_0) / (t_s+t_0)) \quad (2.17)$$

$$\sin^2(\pi(t+t_0) / (t_s+t_0)) \quad (2.18)$$

t_s bedeutet die Länge der Filterfunktion in Datenpunkten ausgedrückt. Typische Phasenverschiebungen $t_0/(t_s+t_0)$ liegen zwischen 0 und 1/16. Diese Sinusfunktionen erfüllen die zwei wichtigsten Anforderungen: sie unterdrücken breite Linien und sie bringen das Signal am Ende jedes FID auf Null, damit problemlos mit Nullen aufgefüllt werden kann.

Den Einfluss, den verschiedene, digitale Filterfunktionen auf das Spektrum ausüben, illustriert die Fig. 2.12. Die drei Spektren in Fig. 2.12 wurden mit verschiedenen Filterfunktionen aus demselben Datensatz berechnet. Die Verwendung einer Kosinusfunktion, die eine sehr schwache Filterfunktion darstellt, führt zu einem unbrauchbaren Spektrum (Fig. 2.12A). Die Benützung einer Gaussfunktion (Fig. 2.12E) verbessert die Situation wesentlich (Fig. 2.12C); die Unterdrückung der breiten Linien befriedigt jedoch noch nicht. Die Anwendung einer Sinusquadratfunktion (Fig. 2.12D) eliminiert auch die breiten Komponenten (Fig. 2.12B) und ergibt ein Spektrum, das sich optimal auswerten lässt.

Aus der FID-Datenmatrix $\hat{S}(t_1, t_2)$, welche durch die oben beschriebenen Datenmanipulationen verändert wurde, lässt sich nun mittels einer zweidimensionalen Fouriertransformation das Spektrum $S(\omega_1, \omega_2)$ berechnen

$$S(\omega_1, \omega_2) = \iint_{-\infty}^{\infty} \hat{S}(t_1, t_2) \cdot \exp(-i\omega_1 t_1) \cdot \exp(-i\omega_2 t_2) dt_1 dt_2 \quad (2.19)$$

wobei meistens der Betrag $|S(\omega_1, \omega_2)|$ des Spektrums zur weiteren Auswertung verwendet wird. Eine Basislinienkorrektur vor der Fouriertransformation in t_1 -Richtung unterdrückt Frequenzen mit $\omega_1 = 0$, was im SECSY-Experiment die diagonalen und in COSY bzw. NOESY die axialen Resonanzen reduziert. Im 2DJ-Spektrum (Kap. 2.2.1) darf natürlich keine solche Basislinienkorrektur angewendet werden.

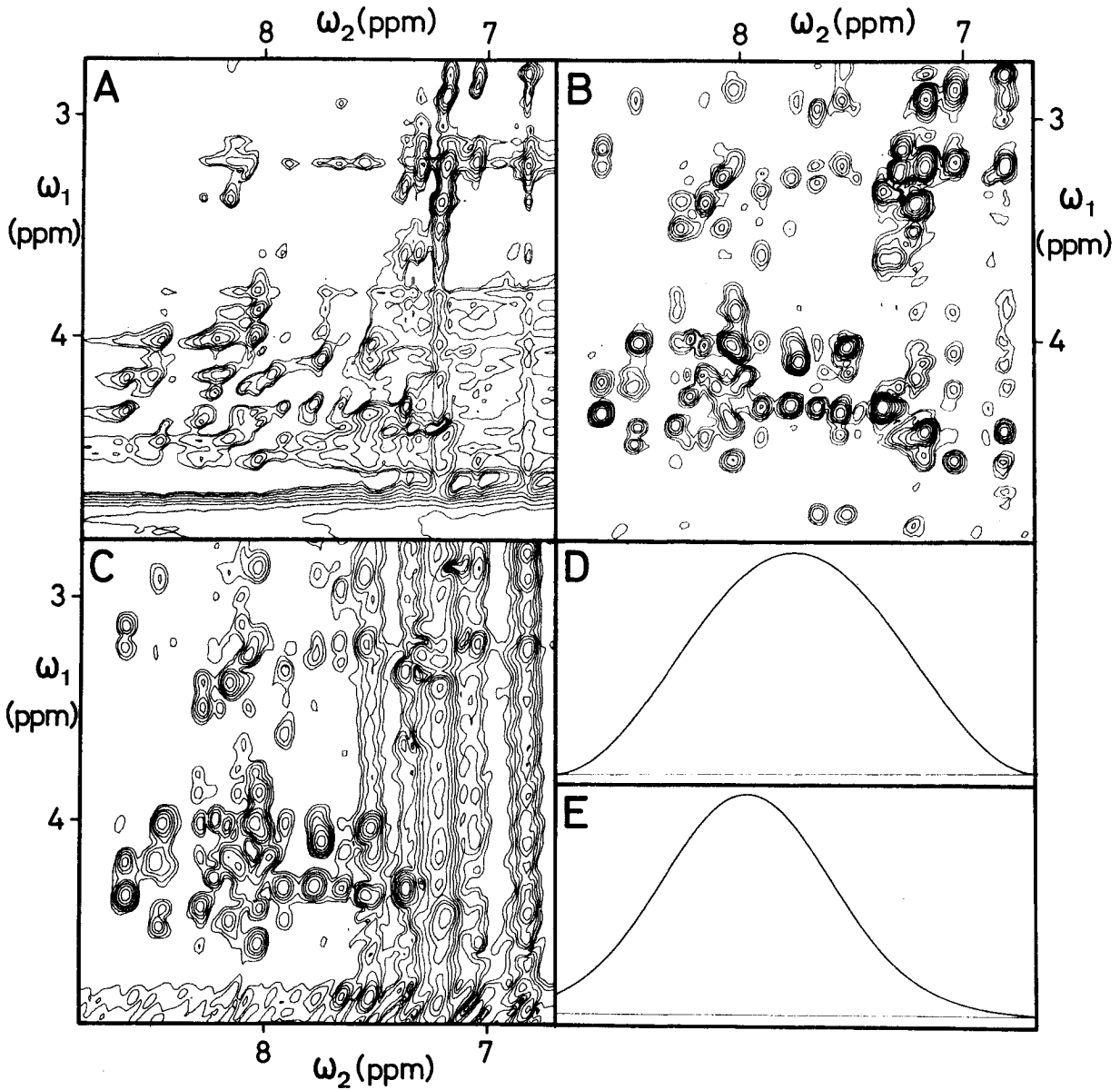


Fig. 2.12

(A) Ausschnitt aus einem 500 MHz ^1H NOESY-Spektrum ($\tau_m = 200$ msec) von auf Micellen gebundenem Glucagon in H_2O (Kap. 4.2), $T = 37^\circ\text{C}$. Die FID-Datenmatrix wurde in t_1 - und t_2 -Richtung mit einer Kosinusfunktion multipliziert; d.h. in der Gleichung (2.17) gilt $t_0/(t_s+t_0) = 1/2$. (B) Derselbe Datensatz wie in (A) wurde in t_1 - und t_2 -Richtung mit der in (D) dargestellten Sinusquadratfunktion multipliziert. (C) Derselbe Datensatz wie in (A) wurde in t_1 - und t_2 -Richtung mit der in (E) dargestellten Gaussfunktion multipliziert.

Bei der digitalen Fouriertransformation werden die Daten so skaliert, dass die höchste Resonanz im Spektrum ein Computerwort füllt. Damit kann die Darstellung mit ganzen Zahlen ("Integer") optimal ausgenutzt werden. Für eine 2D Fouriertransformation gilt es, in t_1 - und t_2 -Richtung je einen solchen Skalierungsfaktor zu bestimmen. Dies lässt sich normalerweise nicht automatisch durchführen, weil man nicht weiss, welcher FID das grösste Signal enthält. In einem COSY-Experiment beispielsweise ist der erste FID klein. Ein aus diesem FID bestimmter Skalierungsfaktor kann bei einem FID mit grösserem t_1 -Wert zu "Overflow" führen. In der Praxis benutzt man für die zwei Skalierungsfaktoren Standardwerte. Diese führen in einzelnen Fällen auch zu "Overflow", was im 2D Spektrum hässliche Störungen in ω_1 -Richtung ergibt, die im Gegensatz zum " t_1 -Noise" (Kap. 2.5.1) eine scharfe Grenze besitzen.

Die Durchführung einer 2D Fouriertransformation mit Protein-Datenmatrizen verlangt ein leistungsfähiges Disk-System. Durch das Auffüllen der FID-Datenmatrizen mit Nullen kann ein Spektrum mehrere Millionen Datenpunkte enthalten. Die Berechnung dieser Daten benötigt eine lange Rechenzeit und bedingt viele Diskzugriffe, die ihrerseits viel Zeit brauchen. Die ganze Fouriertransformation sollte daher unbedingt im "Hintergrund" ablaufen, damit der Computer nicht über längere Zeiträume blockiert wird.

2.5.3 Auswertung von 2D Spektren

Die im 2D Spektrum enthaltene Information muss zur weiteren Auswertung graphisch dargestellt werden. Illustrationen zu den gebräuchlichsten Darstellungsarten zeigt beispielsweise das Kapitel 3. Eine erste Darstellungsart besteht im Hintereinanderzeichnen von vielen Schnitten parallel zu einer Frequenzachse. Dies ergibt eine dreidimensionale Ansicht, die beeindruckend aussieht, sich jedoch kaum zur Auswertung des Spektrums eignet (z.B. Fig. 2.7). Ein 2D Spektrum lässt sich am Besten anhand von Höhenlinienzeichnungen auswerten (z.B. Fig. 2.8), die für

detaillierte Studien durch einzelne Querschnitte (parallel zu ω_1) oder Längsschnitte (parallel zu ω_2) durch das Spektrum ergänzt werden können.

Die Darstellung der Spektren, d.h. das Zeichnen auf einem x-y-Schreiber, braucht für Makromoleküle sehr viel Zeit. Um die optimalen Plotparameter herauszufinden, muss man Spektren zeichnen, die sich später möglicherweise als nutzlos erweisen. Dieser Aufwand könnte durch die Verwendung eines Bildschirms, auf dem sich die Plots vorbereiten lassen, reduziert werden. Die grossen Datenmatrizen der Protein-Spektren verursachen lange Rechen- und Plotzeiten (z.B. für Höhenlinienzeichnungen). Damit man die Computerzeit besser ausnützen kann (z.B. nachts), sollte die Möglichkeit bestehen, verschiedene Spektren automatisch nacheinander zu zeichnen.

Die COSY- bzw. NOESY-Spektren und die (δ, J) -Darstellung des 2DJ-Spektrums sind theoretisch symmetrisch bezüglich der Diagonalen. Dies lässt sich im experimentellen Spektrum dazu benützen, durch einen Vergleich der beiden Seiten ein symmetrisiertes Spektrum zu berechnen. Damit kann man das Signal-zu-Rauschen Verhältnis verbessern und Artefakte unterdrücken (Baumann et al., 1981). Wenn das Spektrum aus experimentellen Gründen stark asymmetrisch ist, beispielsweise weil sich die digitalen Auflösungen in t_1 - und t_2 -Richtung unterscheiden oder in H_2O -Messungen, kann die Symmetrisierung ein verfälschtes Resultat ergeben. Es ist deshalb immer ratsam, mit einem unsymmetrisierten Spektrum zu vergleichen. Gilt $T_2^* \approx T_2$, was in Proteinspektren oft zutrifft, sind die NOESY- und COSY-Spektren symmetrisch bezüglich $\omega_1 = 0$, wenn die Trägerfrequenz am Rande des Spektrums gewählt wurde. Die p- und n-Resonanzen können damit ebenfalls zur Symmetrisierung verwendet werden (Kap. 2.3.1).

Das Kapitel 3 enthält Beispiele für die Auswertung von 2DJ-Spektren. In Kapitel 4 wird die Interpretation von COSY- und NOESY-Experimenten anhand von Spektren des auf Micellen gebundenen Glucagons diskutiert.

2.5.4 Die faltungskorrigierte Spektroskopie (FOCSY)

Die drei in den Kapiteln 2.2 - 2.4 besprochenen 2D Experimente lassen sich ohne und mit Ausnützung der Echobildung durchführen. Letztere Methode kann zu einer Verkleinerung des benötigten ω_1 -Frequenzbereichs führen, was eine Verkürzung der Messzeit und eine Verkleinerung der Datenmatrizen mit sich bringt. Nützt man die Echobildung nicht aus, lassen sich dieselben Vorteile durch eine Verletzung des Sampling Theorems (Champeney, 1973) in ω_1 -Richtung erzwingen. Liegen alle Resonanzen im 2D Spektrum innerhalb eines Bandes der Breite $2\omega_1^{\max}$ um die Diagonale (Fig. 2.13), lässt sich nach der 2D Fouriertransformation aus dem gefalteten Spektrum ein eindeutiges Spektrum berechnen (Müller, 1979). Der Wert ω_1^{\max} bedeutet den gewählten ω_1 -Frequenzbereich. Die schematische Darstellung in Fig. 2.13 illustriert diesen Vorgang: links sind zwei Quartette eines 2DJ-Spektrums angedeutet und rechts die Verbindungsmuster eines COSY- oder NOESY-Spektrums.

Die Berechnung eines faltungskorrigierten Spektrums $S'(\omega_1^k, \omega_2^k)$ aus einem gefalteten Spektrum $S(\omega_1, \omega_2)$ lässt sich wie folgt formulieren (Nagayama et al., 1980)

$$\begin{aligned}\omega_1^k &= (\omega_1 - \omega_2 + \omega_1^{\max}) \bmod 2\omega_1^{\max} - \omega_1^{\max} \\ \omega_2^k &= \omega_2\end{aligned}\quad (2.20)$$

Mit dieser Datenumordnung liegt ω_1^k innerhalb der Nyquistfrequenz $-\omega_1^{\max} < \omega_1^k < \omega_1^{\max}$. Die ω_1 -Frequenzdifferenzen zwischen Resonanzen, die symmetrisch zur Diagonalen $-\omega_1 = \omega_2$ liegen (Fig. 2.13A), werden durch die Datenmanipulation verdoppelt. Dies hat zur Folge, dass Verbindungslinien solcher Resonanzen im korrigierten Spektrum einen Winkel von 63.4° mit den zwei Achsen einschließen (Fig. 2.13C). Die FOCSY (foldover corrected spectroscopy) Methode lässt sich nur anwenden, wenn man die p-Resonanzen (Kap. 2.3.1) unterdrückt, wie dies auch die entsprechenden Experimente mit Ausnützung der Echobildung verlangen.

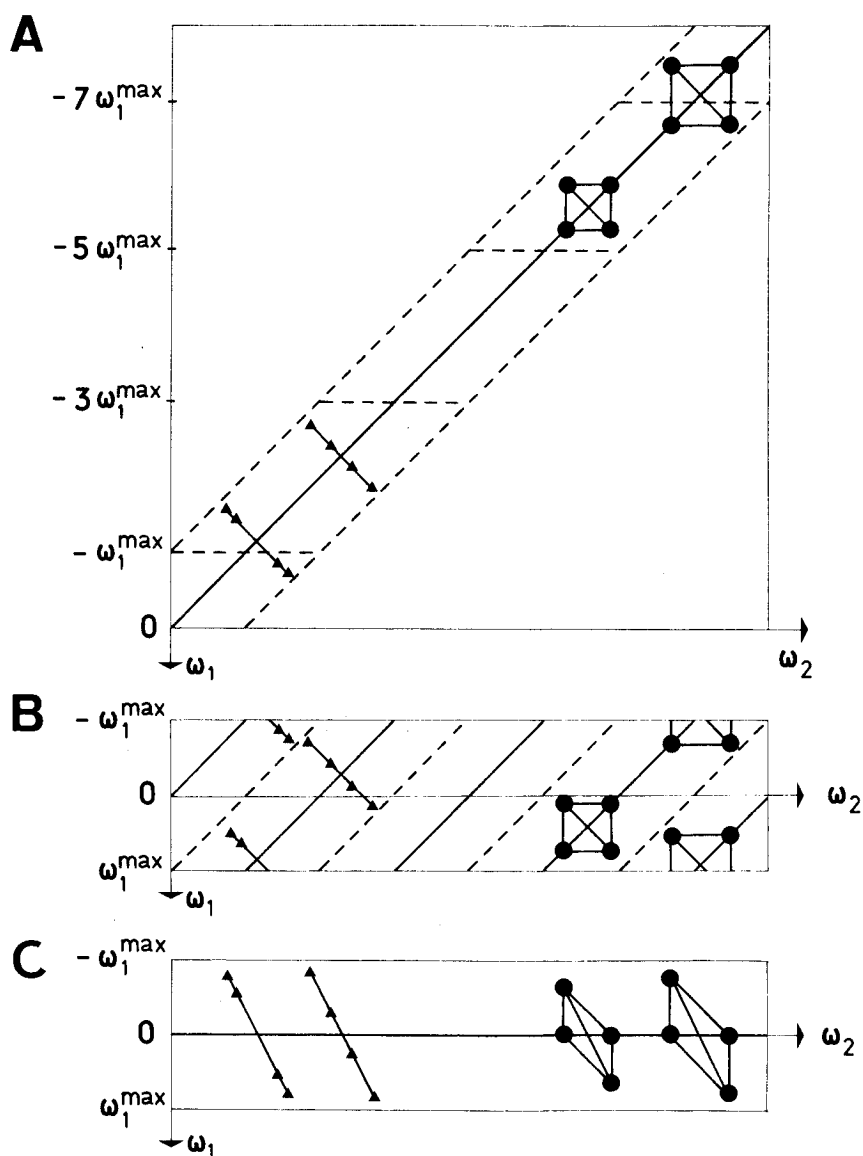


Fig. 2.13

Schematische Darstellung der Faltung eines 2D Spektrums (A) bei Verletzung des Sampling Theorems in ω_1 -Richtung (B), man beachte den Verlauf der ausgezogenen Diagonalen in den drei verschiedenen Spektren. Die Dreiecke (\blacktriangle) links sollen zwei Quartette eines 2DJ-Spektrums andeuten und die Punkte (\bullet) rechts Verbindungsmuster in einem COSY- oder NOESY-Spektrum; ein Punkt (\bullet) bedeutet also alle Verbindungen innerhalb desselben oder zwischen zwei Multipletten. Durch eine Verschiebung der Daten auf Linien, für die $\omega_2 = \text{konstant}$ gilt, lässt sich aus (B) das faltungskorrigierte Spektrum (C) berechnen (Gleichung (2.20)).

Die Anwendung der FOCYSY-Methode zeigt Fig. 2.14 anhand eines 2DJ-aufgelösten Spektrums des basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitors (BPTI). Sechs Linien lagen in ω_1 -Richtung knapp weiter als $\pm \omega_1^{\max}$ von der Diagonalen entfernt und konnten daher nicht richtig korrigiert werden. Sie erscheinen im Spektrum an falschen Positionen und werden schliesslich durch eine Symmetrisierung eliminiert. Das Spektrum in Fig. 2.14 entspricht dem in Fig. 2.2 gezeigten Spektrum, das mit Ausnützung der Echo-bildung gemessen wurde.

Die FOCYSY-Technik bietet alle Vorteile, die die Ausnützung des Echoeffekts mit sich bringt (Kap. 2.2.3, Kap. 2.3.3), ohne eine veränderte Pulssequenz zu verlangen. Zusätzlich lassen sich reine Phasen erhalten (ausser im 2DJ-Spektrum), was in den entsprechenden "Echo-Experimenten" nicht möglich ist (Nagayama et al., 1980). Dies ist der entscheidende Vorteil, der die Einführung der FOCYSY-Methode rechtfertigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Programm geschrieben, das die Berechnung des faltungskorrigierten Spektrums durchführt. Dieses Programm ist im Assembler-Code des Aspect 2000 geschrieben und es berücksichtigt die spezielle Struktur des Bruker-Spectrospin 2D Programms. Die Berechnung einer 512 x 512 Datenmatrix benötigt etwa 1 Minute. Diese Zeit wird vor allem durch die nötigen Datentransfers zwischen Disk und Kernspeicher des Computers bestimmt. Weitere Einzelheiten sind im Anhang A1 angegeben, wo auch ein "Listing" zu finden ist.

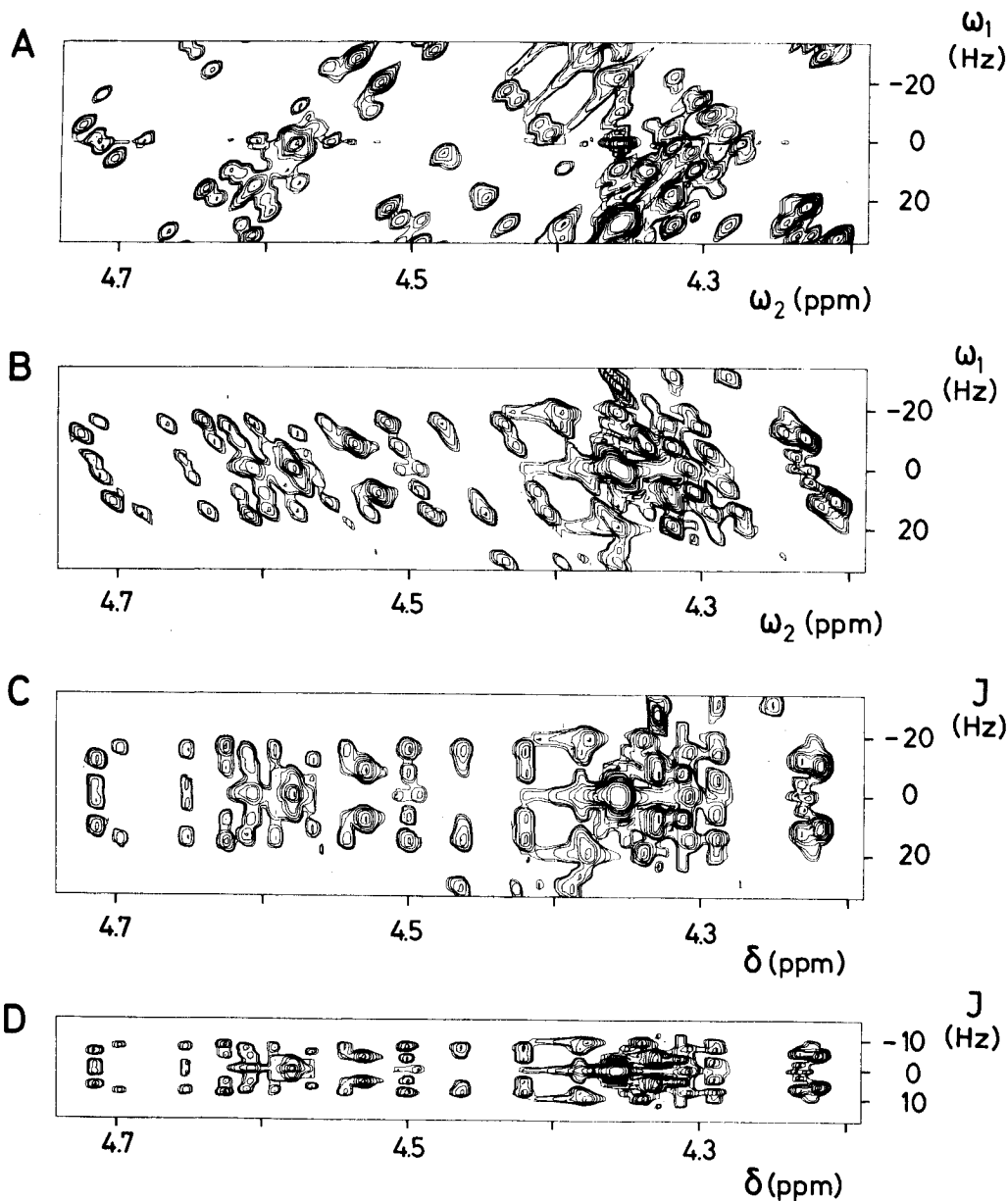


Fig. 2.14

(A) In ω_1 -Richtung gefaltetes 2DJ-Spektrum ohne Ausnützung der Echobil-
dung einer 0.02 M Lösung des basischen pankreatischen Trypsin-Inhibi-
tors (BPTI) in D_2O , $T = 68^\circ C$, $pD = 4.7$. (B) Spektrum (A) nach der Kor-
rektur der Faltung; die Kopplungskonstanten wurden durch die Datenmani-
pulation verdoppelt. Sechs Resonanzen zwischen 4.25 und 4.35 ppm sind
falsch korrigiert, weil sie in ω_1 -Richtung knapp ausserhalb $\pm \omega_1^{\max}$
lagen (Fig. 2.13). (C) (δ, J) -Darstellung (Kap. 2.2.1) von (B). (D) Sym-
metrisiertes Spektrum (C) nach der Halbierung der ω_1 -Frequenzen.

3. STUDIEN DER MANIFESTATION VON STARKEN SPIN-SPIN-KOPPLUNGEN IN DEN 2DJ-SPEKTREN DER 20 AMINOSÄUREN

Die im Kapitel 2.2 beschriebene zweidimensionale J-aufgelöste (2DJ) NMR-Spektroskopie verbessert die Auflösung in einem NMR-Spektrum wesentlich. Eine unkritische Anwendung kann aber zu Fehlinterpretationen führen, denn nur im Falle schwacher Spin-Spin-Kopplung gelten einfache Beziehungen zwischen den 2DJ-Spektren und den daraus zu bestimmenden NMR-Parametern. Dieses Kapitel behandelt Probleme, welche die starke Kopplung in 2DJ ^1H NMR-Spektren von Proteinen verursachen kann. Die 2DJ-Spektren von Histidin, Serin und Tyrosin dienen zur Illustration verschiedener Phänomene, für welche die starke Kopplung verantwortlich ist. Für alle Aminosäuren, die bei einer Resonanzfrequenz von 360 MHz stark gekoppelte Protonen-Spinsysteme enthalten, wurden schematische 2DJ-Spektren berechnet. Auf Grund dieser Daten werden praktische Aspekte des Gebrauchs von 2DJ ^1H NMR für Studien von Proteinspektren diskutiert.

3.1 Material und Methoden

Die für die Messung verwendeten 20 gewöhnlichen Aminosäuren bezogen wir von der Fluka AG. Wenn möglich stellten wir 0.1 M Aminosäurelösungen her und lyophilisierten mehrmals, um die Lösungsmittelresonanz möglichst klein zu halten. Wegen der begrenzten Löslichkeit liessen sich einige Aminosäurelösungen nicht so hoch konzentrieren. Mit DCl- oder NaOD-Lösungen wurde der pD auf 6.5 eingestellt, ohne den Isotopen-Effekt zu korrigieren (Bundi und Wüthrich, 1979a). In den bei 25°C gemessenen Lösungen diente Natrium-3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- D_4)-propio-

nat (TSP) als interne Referenz. Je nach Aminosäurekonzentration betrug die Messzeit für ein Spektrum eine bis sechs Stunden. In den meisten Experimenten wurden 64 FID's mit verschiedenen t_1 -Werten und je 2048 Datenpunkten gemessen. Die Multiplikation mit phasenverschobenen Sinusfunktionen in t_1 - wie in t_2 -Richtung ergaben eine bessere spektrale Auflösung (Kap. 2.5.2).

Simulierte 2DJ-Spektren für die gewöhnlichen Aminosäuren wurden mit dem von Aue et al. (1976a), Anil Kumar (1978) und Bodenhausen et al. (1978) beschriebenen Formalismus berechnet. Die Magnetisierungskomponente s_{abcd} einer Resonanz im 2DJ-Spektrum berechnet sich wie folgt

$$s_{abcd}(t_1, t_2) = Z_{abcd} \exp(i\omega_{ab} t_2) \exp(i(\omega_{ab} - \omega_{cd}) t/2) \quad (4.1)$$

mit

$$Z_{abcd} = (I_x)_{ab} (I_x)_{cd} (P)_{bc} (P)_{da} \quad (4.2)$$

und

$$P = 2^N \prod_{k=1}^N (I_x)_k \quad (4.3)$$

Das Produkt in (4.3) läuft über alle N Spins und a,b,c,d bedeuten Energiezustände des Spinsystems.

Das für die numerischen Berechnungen benützte, modifizierte LAOCOON III Programm stellte R. Freeman zur Verfügung. Die Frequenzen ω_{mn} und die Matrixelemente des Spinoperators $(I_x)_{ij}$ sind im LAOCOON III Programm verfügbar, so dass man nur den Mischoperator $(P)_{ij}$ zusätzlich berechnen muss. Wir verwendeten den numerischen Output, um 2DJ-Spektren zu simulieren (Fig. 3.7). Das Programm berechnet Spinsysteme mit bis zu sechs Spins $1/2$. Für Aminosäuren, die mehr als sechs Protonen enthalten, erhielten wir die Simulation wie folgt: Für Phenylalanin und Tyrosin behandelten wir die aromatischen Protonen getrennt vom ABX-System der C^α - und C^β -Protonen. Für Tryptophan berechneten wir die C^α - und C^β -Protonen zusammen mit dem C2-Proton des Indolrings, aber getrennt von den

verbleibenden vier Indolringprotonen. In Methionin betrachteten wir die C^{ϵ} -Methylprotonen losgelöst vom restlichen Spinsystem. In Valin, Leucin und Isoleucin ersetzten wir die Methylgruppen durch einzelne Protonen; zusätzliche Multiplett-Eigenschaften führten wir unter der Annahme ein, dass diese nur die vicinalen Protonen beeinflussen. Für Arginin berechneten wir zwei überlappende Systeme für die C^{α} -, C^{β} - und C^{γ} -Protonen bzw. die C^{β} -, C^{γ} - und C^{δ} -Protonen. Eine angenäherte Simulation des ganzen Spektrums erhielten wir, indem wir die C^{α} - und C^{β} -Resonanzen der ersten Berechnung mit den C^{γ} - und C^{δ} -Resonanzen der zweiten Berechnung kombinierten. Auf ähnliche Weise unterteilten wir die Spinsysteme von Lysin bzw. Prolin in sich überlappende Teilsysteme.

3.2 Starke Kopplung in 2DJ-Spektren von Aminosäuren

3.2.1 Starke und schwache Kopplung im 2DJ-Spektrum von Histidin

Am Beispiel des 2DJ-Spektrums von L-Histidin in D_2O (Fig. 3.1) soll der Einfluss der schwachen und starken Kopplung illustriert und erläutert werden. Der Teil des Histidinspektrums bei tiefem Feld enthält nur schwache Kopplungen. In der Projektion ergeben die zwei Imidazolringprotonen zwei etwas verbreiterte Linien (Fig. 3.1A). Im Querschnitt sind die Kopplungen der C2- und C4-Protonen gut aufgelöst und können einfach interpretiert werden (Fig. 3.1B). Die Duplett-Aufspaltung von 1.6 Hz des C2H bei 7.89 ppm wird verursacht durch die Kopplung mit dem C4H bei 7.10 ppm. Das C4H besitzt zusätzlich weitreichende Kopplungen zu beiden C^β -Methylenprotonen. Diese zwei Kopplungskonstanten sind zufälligerweise gleich und mit 0.9 Hz rund halb so gross wie die Kopplung zwischen dem C2H und dem C4H. Somit entsprechen die fünf Linien bei 7.10 ppm zwei Triplets, welche sich teilweise überlappen. Im Hochfeld-Teil des Spektrums konnten vier Multiplette zwischen 3.0 und 4.0 ppm aufgelöst werden. Die weitreichenden Kopplungen zwischen den Imidazolringprotonen und den C^β -Methylenprotonen treten in den drei Querschnitten zwischen 3.13 und 3.23 ppm auf. Hier zeigt sich klar starke Spin-Spin-Kopplung, denn die Projektion der C^β -Protonresonanzen enthält drei statt der zwei Linien, die man für ein homonukleares, breitbandentkoppeltes Spektrum erwartet (Kap. 2.2). Die starke Kopplung zwischen den zwei C^β -Methylenprotonen verursacht auch die schwache zentrale Linie im C^α -Protonmultiplett. Wie im Folgenden beschrieben wird, ist es angebracht, einzelne Querschnitte vorsichtig zu interpretieren, weil sie durch starke Kopplungseffekte beeinflusst sein können.

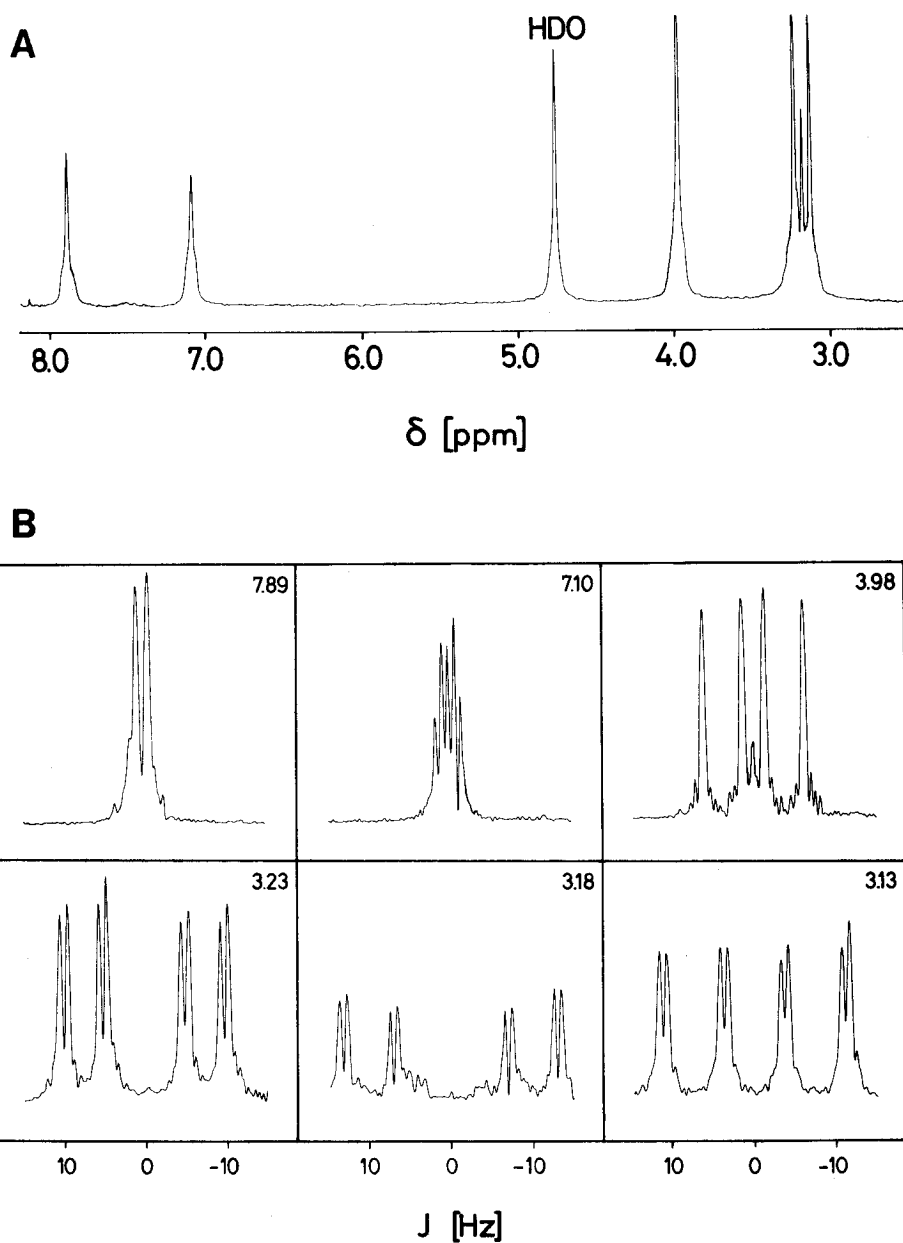


Fig. 3.1

2D ^1H NMR-Spektrum bei 360 MHz einer 0.1 M L-Histidin Lösung in D_2O ; $\text{pD} = 6.8$, $T = 25^\circ\text{C}$. (A) Projektion des (δ, J) -Spektrums parallel zur J -Achse auf die δ -Achse. (B) Querschnitte parallel zur J -Achse durch das (δ, J) -Spektrum. Die Zahl rechts oberhalb jedes Multipletts bedeutet die chemische Verschiebung des Linienmaximums in der Projektion, wo auch die Querschnitte durchgelegt wurden.

3.2.2 ABX-Spinsysteme im 2DJ-Spektrum

ABX-Subspinsysteme treten recht häufig in Proteinspektren auf (Wüthrich, 1976), die Untersuchung ihrer speziellen Eigenschaften ist daher wichtig, um 2DJ-Spektren von Proteinen richtig interpretieren zu können. Fig. 3.2 zeigt ein Schema des AB-Teils eines ABX-Spinsystems in der (ω_1, ω_2) -Darstellung eines 2DJ ^1H NMR-Spektrums (Kap. 2.2). Wie im schwach gekoppelten Fall liegen hier alle Resonanzen auf Linien mit einer Neigung von 45° . Die vier Resonanzen auf jeder der vier 45° -Linien stellen ein symmetrisches Dublett von Dubletts dar. Die Projektion des 2DJ-Spektrums in Richtung der ω_1 -Achse auf die ω_2 -Achse zeigt die Resonanzpositionen des entsprechenden 1D Spektrums. Die Projektion parallel zur ω_2 - auf die ω_1 -Achse ergibt die Resonanzpositionen eines J-Spektrums (Aue et al., 1976b). Zur Klarheit sind auf der linken Seite der Fig. 3.2 die Projektionen der zwei äusseren und der zwei inneren Multiplette des 2DJ-Spektrums auch einzeln gezeigt. Im Falle schwacher Kopplung besitzen nur die äusseren Multiplette eine von Null verschiedene Intensität. Mit stärker werdender Kopplung verlieren die äusseren Multiplette an Intensität, während die inneren an Intensität gewinnen. Für die Bestimmung der NMR-Parameter enthalten die inneren und die äusseren Linien sich entsprechende Information. Einige Eigenschaften von schwach und stark gekoppelten zweidimensionalen J-aufgelösten und ein-dimensionalen Spektren sind in Tabelle 3.1 verglichen.

Die verschiedenen Projektionen in der Fig. 3.2 erleichtern es, sich entsprechende Eigenschaften in 1D und 2DJ-Spektren zu vergleichen. Aus den Projektionen der zwei äusseren Multiplette lassen sich eine scheinbare chemische Verschiebung δ^* und eine scheinbare Kopplungskonstante J^* entnehmen, die als Anfangswerte für das 2DJ-Simulationsprogramm dienen. Betrachtet man nur die Resonanzpositionen und nicht deren Intensität, lassen sich aus diesen Projektionen die NMR-Parameter für das 2DJ-Spektrum auch mit Hilfe eines LAOCOON Programms für 1D Spektrensimulation berechnen.

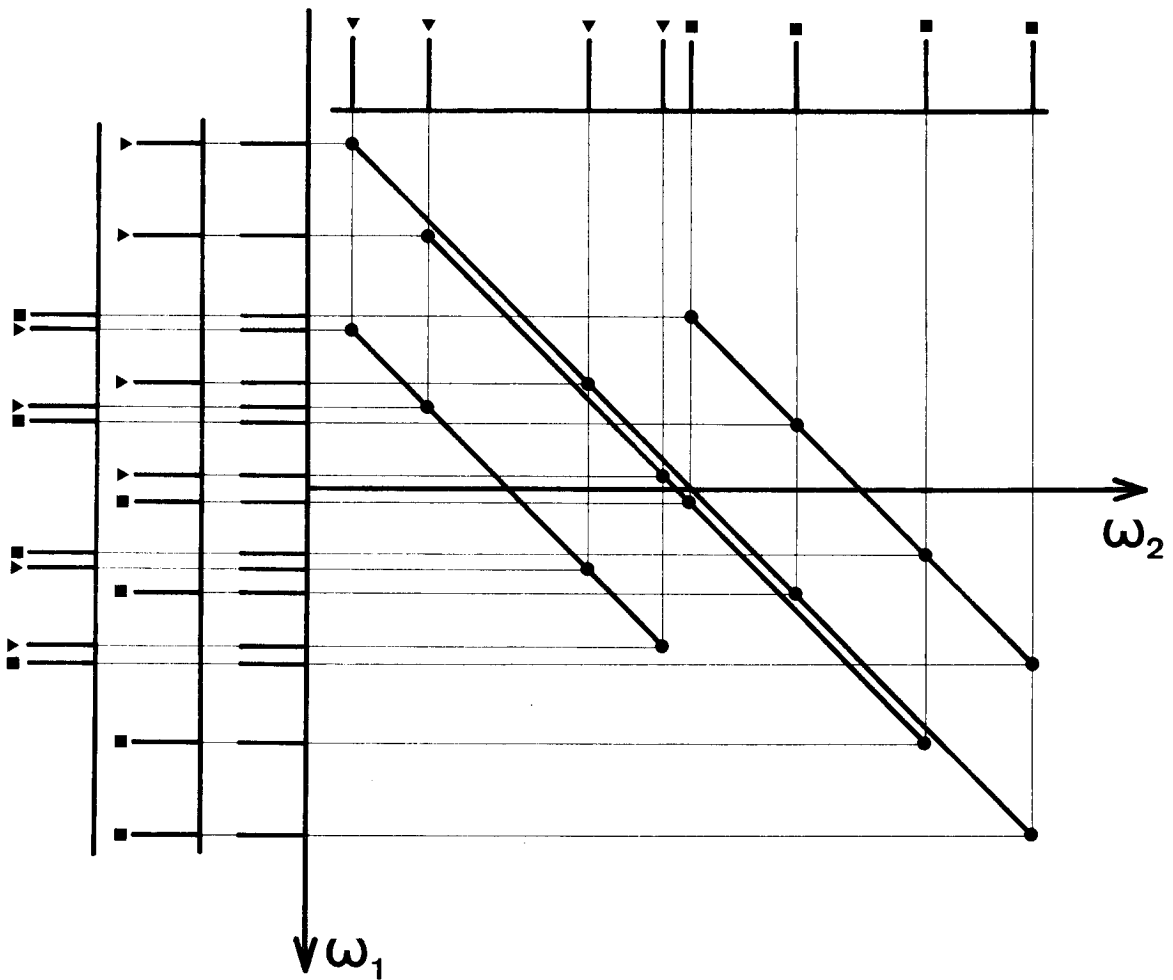


Fig. 3.2

Schema für den AB-Teil des 2DJ-Spektrums eines ABX-Spinsystems. Schwarze Punkte bedeuten Resonanzpositionen. Diese liegen auf vier parallelen Linien, die mit beiden Frequenzachsen einen 45° Winkel bilden. Projektionen der Resonanzpositionen auf die ω_1 - und die ω_2 -Achse sind ebenfalls angegeben, die Resonanzen von Kern A sind mit \blacksquare bezeichnet, die von Kern B mit \blacktriangledown . Die Projektionen auf die ω_1 -Achse sind für die inneren Multipletts, die äusseren Multipletts, sowie für die Summe der beiden gezeichnet (siehe Text). Für die Zeichnung wurden die Parameter von L-Serin, $^{\oplus}\text{D}_3\text{N-CH(-CH}_2\text{-OD)-COO}^{\ominus}$ benützt.

Tabelle 3.1

Vergleich grundlegender Eigenschaften von stark und schwach gekoppelten Spinsystemen in 2DJ-Spektren und in eindimensionalen Spektren.

schwache Kopplung	starke Kopplung
<p>Die (δ, J)-Darstellung ist symmetrisch bezüglich $J = 0$.</p> <p>Die Multiplette sind identisch zu denen im entsprechenden 1D Spektrum.</p> <p>Die Projektion der (δ, J)-Darstellung in J-Richtung auf die δ-Achse entspricht einem voll entkoppelten 1D Spektrum.</p> <p>Die Projektion der (ω_1, ω_2)-Darstellung parallel zur ω_1- auf die ω_2-Achse ergibt das entsprechende 1D Spektrum.</p>	<p>Die (δ, J)-Darstellung ist symmetrisch bezüglich $J = 0$.</p> <p>Multiplette mit identischen Linienpositionen aber verschiedenen Intensitäten verglichen mit dem entsprechenden 1D Spektrum. Zusätzlich erscheinen unerwartete Resonanzen.</p> <p>Die Projektion der (δ, J)-Darstellung in J-Richtung auf die δ-Achse entspricht nicht einem voll entkoppelten 1D Spektrum, weil zusätzliche durch die starke Kopplung verursachte Resonanzen erscheinen.</p> <p>Die Projektion der (ω_1, ω_2)-Darstellung parallel zur ω_1- auf die ω_2-Achse ergibt das entsprechende 1D Spektrum[†].</p>

[†]Die Projektion des Betrags des 2DJ-Spektrums ergibt nur die Linienpositionen aber nicht die Intensitäten des 1D Spektrums.

Die Figuren 3.3 bis 3.6 zeigen experimentelle ^1H NMR-Spektren von L-Serin, welche Vorzüge und Grenzen verschiedener Darstellungsarten von stark gekoppelten 2DJ-Spektren illustrieren. Die dreidimensionale Ansicht des 2DJ-Spektrums in Fig. 3.3C gibt einen Ueberblick über das ganze Spektrum, eine detaillierte Auswertung lässt sich in dieser Darstellung jedoch nicht durchführen. Die Resonanzen des C^α -Protons liegen bei 3.857 ppm und diejenigen der C^β -Methylenprotonen zwischen 3.95 und 4.01 ppm. Genaue Messungen der chemischen Verschiebungen und der Spin-Spin-Kopplungskonstanten erhält man aus der Projektion (Fig. 3.3B) bzw. den Querschnitten (Fig. 3.4). Der Vergleich mit Fig. 3.2 zeigt, dass die acht Linien im Querschnitt bei 3.979 ppm (Fig. 3.3C und 3.4) durch die Ueberlappung von zweimal vier Linien entstehen, dies vermögen die bis jetzt gezeigten Darstellungsarten jedoch nicht aufzulösen. Die besten Aussichten, diese kleinen Differenzen aufzulösen, bestehen in Höhenlinienzeichnungen. In der Höhenlinienzeichnung der (δ, J) -Darstellung des 2DJ-Spektrums (Fig. 3.5) kann man die verschiedenen chemischen Verschiebungen des inneren Teils der C^β -Protonresonanzen erkennen, vor allem wenn man das experimentelle mit dem simulierten Spektrum vergleicht.

Zusätzliche durch die starke Kopplung verursachte Resonanzen, die in Fig. 3.2 nicht gezeigt sind, erscheinen in der spektralen Region zwischen den C^α - und C^β -Protonresonanzen und im C^αH -Multipllett. Die starke Kopplung zwischen den C^α - und C^β -Protonen erzeugt die Linien um 3.92 ppm (Fig. 3.3C und 3.5). Die starke Kopplung zwischen den zwei C^β -Methylenprotonen verursacht die kleine Intensität der zwei inneren Linien im C^α -Protonmultipllett bei 3.857 ppm (Fig. 3.4) und die zwei zusätzlichen Resonanzen auf der $J = 0$ Linie (Fig. 3.5 und 3.6). Theoretisch enthält der X-Teil des 2DJ-Spektrums eines ABX-Spinsystems bis zu 18 Linien (Anil Kumar, 1978; Bodenhausen et al., 1978), in unseren Messungen konnten wir jedoch nie mehr als sechs beobachten. Dies ist nicht unerwartet, weil die Intensitäten der weiteren Resonanzen mindestens zwei Größenordnungen kleiner sind.

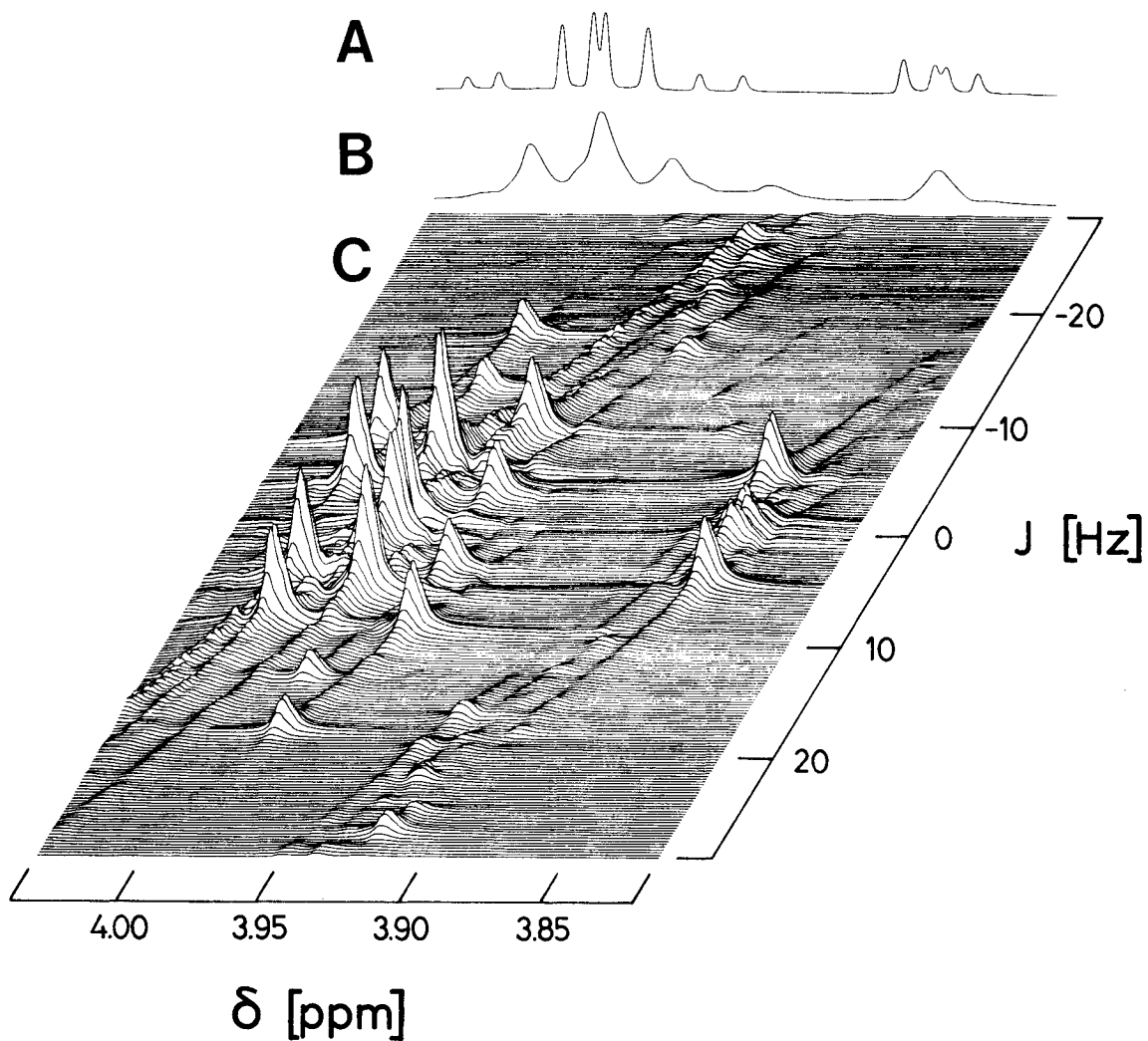


Fig. 3.3

2DJ ^1H NMR-Spektrum bei 360 MHz einer 0.1 M L-Serin Lösung in D_2O ; pD = 6.5, $T = 25^\circ\text{C}$. (A) 1D Spektrum. (B) Projektion der (δ, J) -Darstellung des 2DJ-Spektrums auf die δ -Achse. (C) Dreidimensionale Ansicht des 2DJ-Spektrums (dargestellt durch viele Längsschnitte).

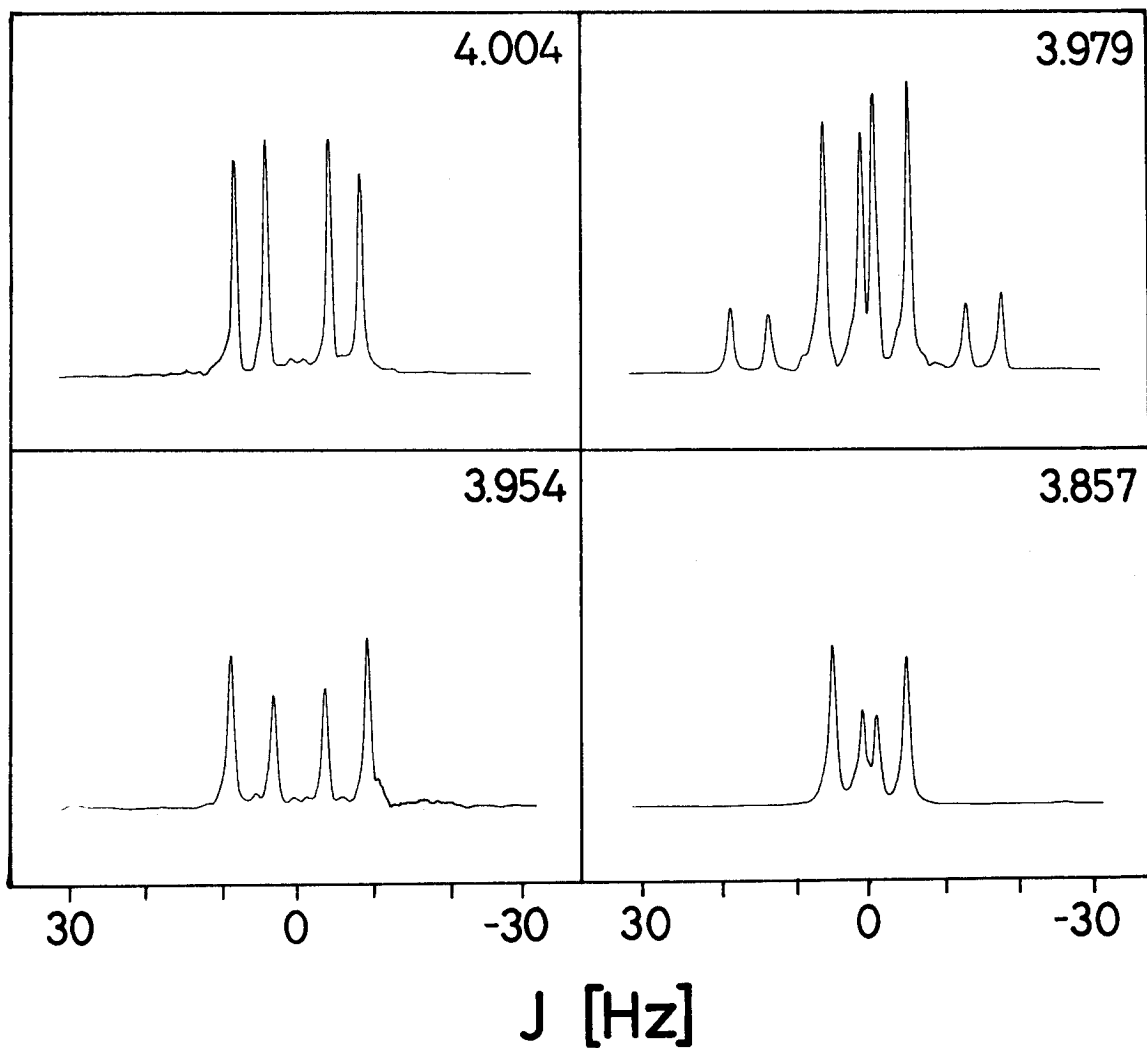


Fig. 3.4

Vier Querschnitte durch das $2DJ$ 1H NMR-Spektrum von L-Serin (siehe Fig. 3.3C). Die Zahl rechts oberhalb jedes Multipletts bedeutet die chemische Verschiebung δ des Querschnitts.

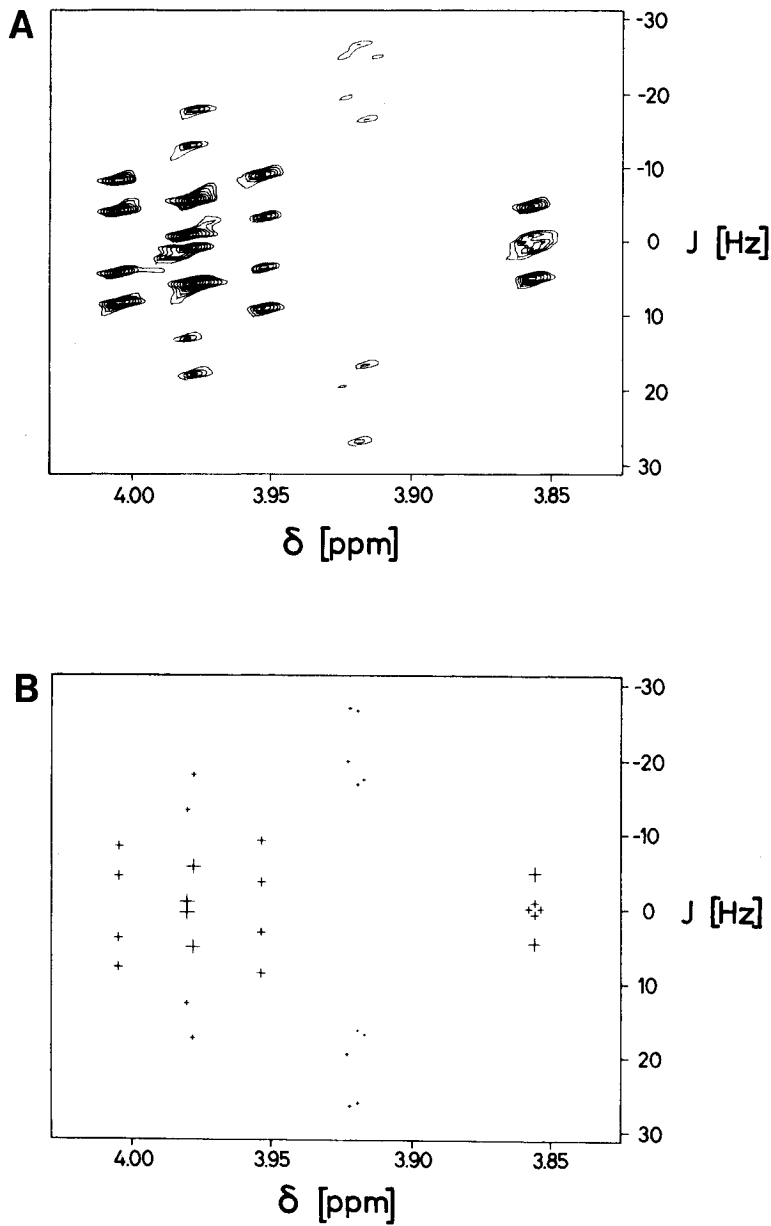


Fig. 3.5

(A) Höhenlinienzeichnung des 2DJ ^1H NMR-Spektrums von L-Serin (siehe Fig. 3.3C). (B) Simuliertes 2DJ-Spektrum von L-Serin. Jede Resonanz wird durch ein Kreuz angedeutet, dessen Grösse proportional zu Resonanzintensität ist.

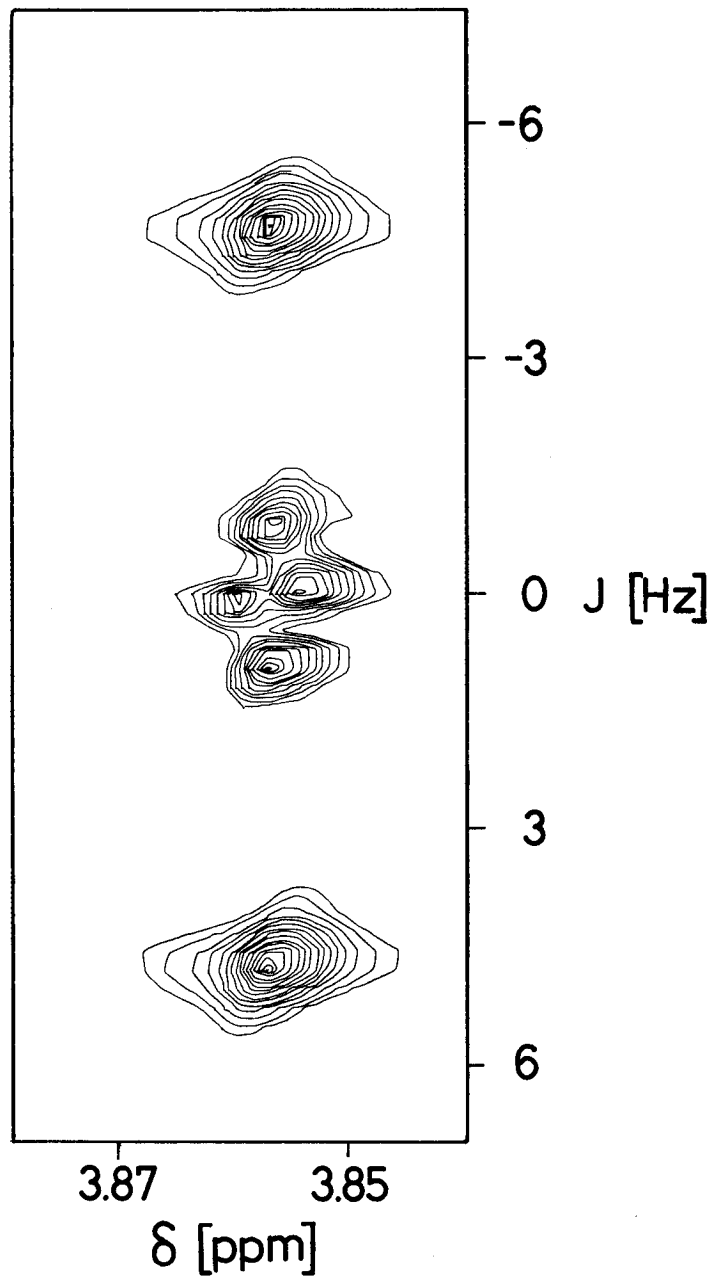


Fig. 3.6

Höhenliniendruckung des C^α-Proton-Multiplletts im L-Serin ¹H NMR-Spektrum von Fig. 3.3C.

3.2.3 Starke Kopplungseigenschaften in den 360 MHz 2DJ-Spektren der gewöhnlichen Aminosäuren

Um eine Basis für die Analyse von Proteinspektren zu erhalten, haben wir die 2DJ ^1H NMR-Spektren der 20 gewöhnlichen Aminosäuren gemessen. Aus praktischen Gründen verwendeten wir freie Aminosäuren. Im Hinblick auf Studien von Peptiden und Proteinen wären die Spektren von nicht endständigen Aminosäureresten vorzuziehen (Roberts und Jardetzky, 1970; Wüthrich, 1976). Wir berechneten darum auch 2DJ-Spektren mit den Parametern, die für Aminosäuren in linearen Tetrapeptiden gefunden wurden (Bundi und Wüthrich, 1979a). Die für Prolin benützten Parameter sind der Publikation von Pogliani und Mitarbeitern (1975) entnommen. Die qualitativen Eigenschaften dieser berechneten Spektren und der experimentellen Spektren der freien Aminosäuren unterscheiden sich nicht. Fig. 3.7 zeigt die Spektren von 16 Aminosäuren; Gly, Ala, Thr und Val erscheinen nicht in Fig. 3.7, weil diese Aminosäuren keine stark gekoppelten Protonen enthalten.

Beim genaueren Betrachten von Fig. 3.7 fällt auf, dass die typischen Eigenschaften eines ABX-Systems (Fig. 3.2 - 3.6) auch in komplizierteren Spektren auftreten. Ganz allgemein beobachtet man für jedes Paar stark gekoppelter Protonen ein 2DJ-Spektrum, das dem AB-Teil eines ABX-Spektrums ähnlich ist. Wie im ABX-System gibt es zwei äussere Multiplette, jedoch treten im allgemeinen mehr als zwei innere Multiplette auf. Diese lassen sich im experimentellen Spektrum gewöhnlich nicht auflösen. Ausser für das AA'BB'C Spinsystem der aromatischen Protonen von Phenylalanin enthalten die Aminosäuren im allgemeinen nur Paare stark gekoppelter Protonen. Die beim Studium des ABX-Spinsystems gewonnenen Einsichten helfen daher, auch kompliziertere Spektren zu interpretieren.

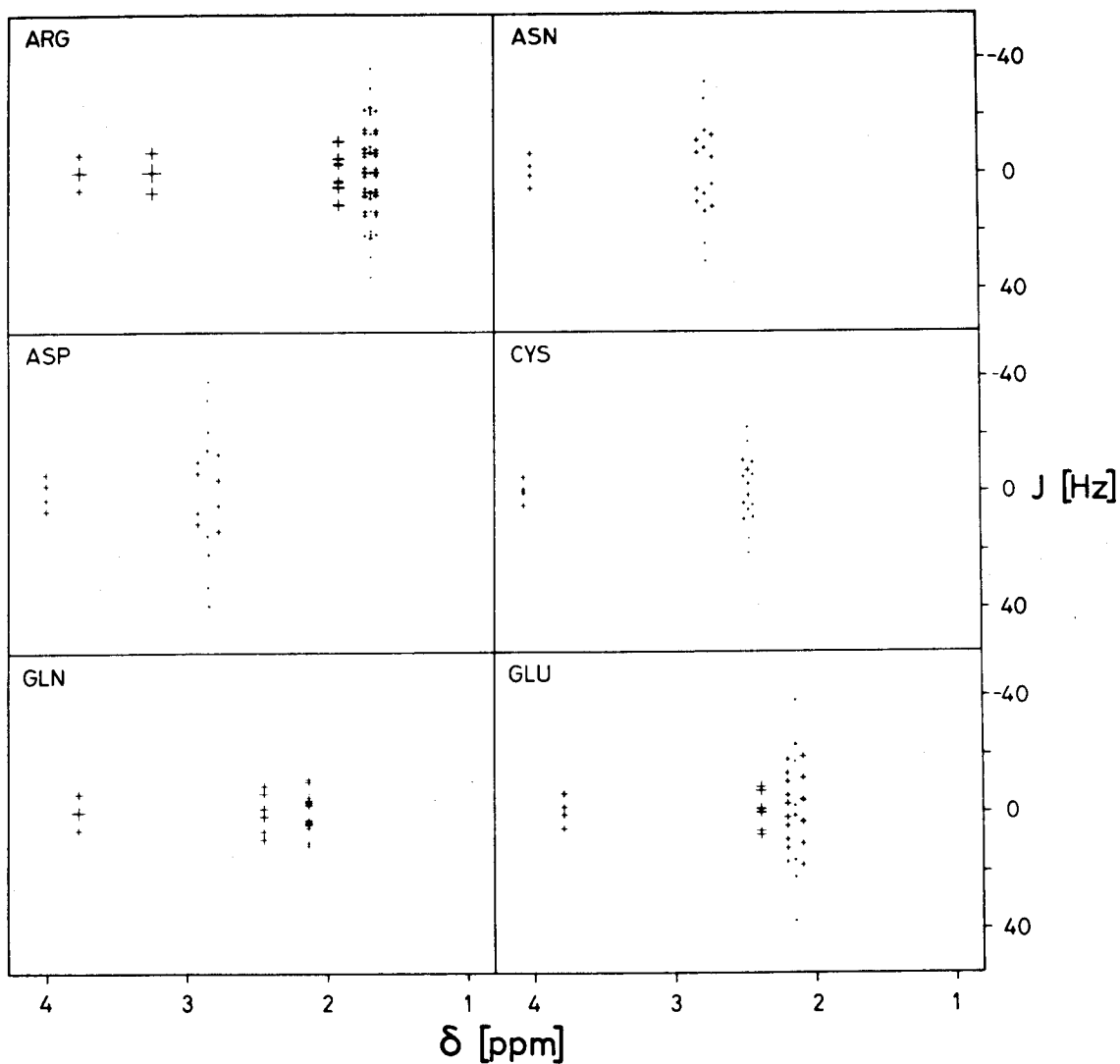


Fig. 3.7A

(A), (B), (C) Schematische Darstellungen der 360 MHz 2DJ ^1H NMR-Spektren der 16 gewöhnlichen Aminosäuren mit starker Kopplung. Gly, Ala, Thr und Val sind nicht gezeigt. Die Zeichnungen entsprechen derjenigen von Fig. 3.5B; d.h. jede Resonanz wird durch ein Kreuz dargestellt, dessen Grösse proportional zur Resonanzintensität ist.

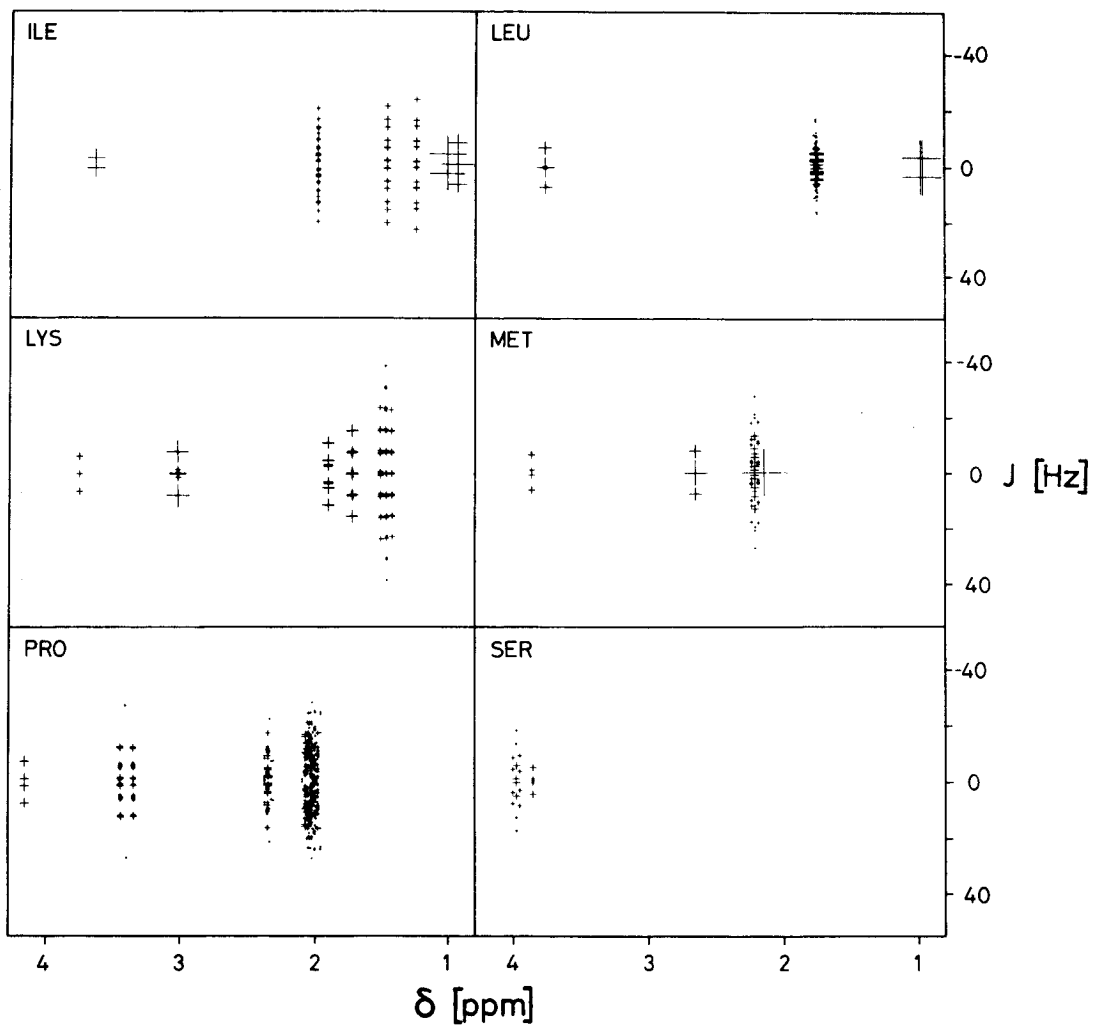


Fig. 3.7B

Legende siehe Fig. 3.7A.

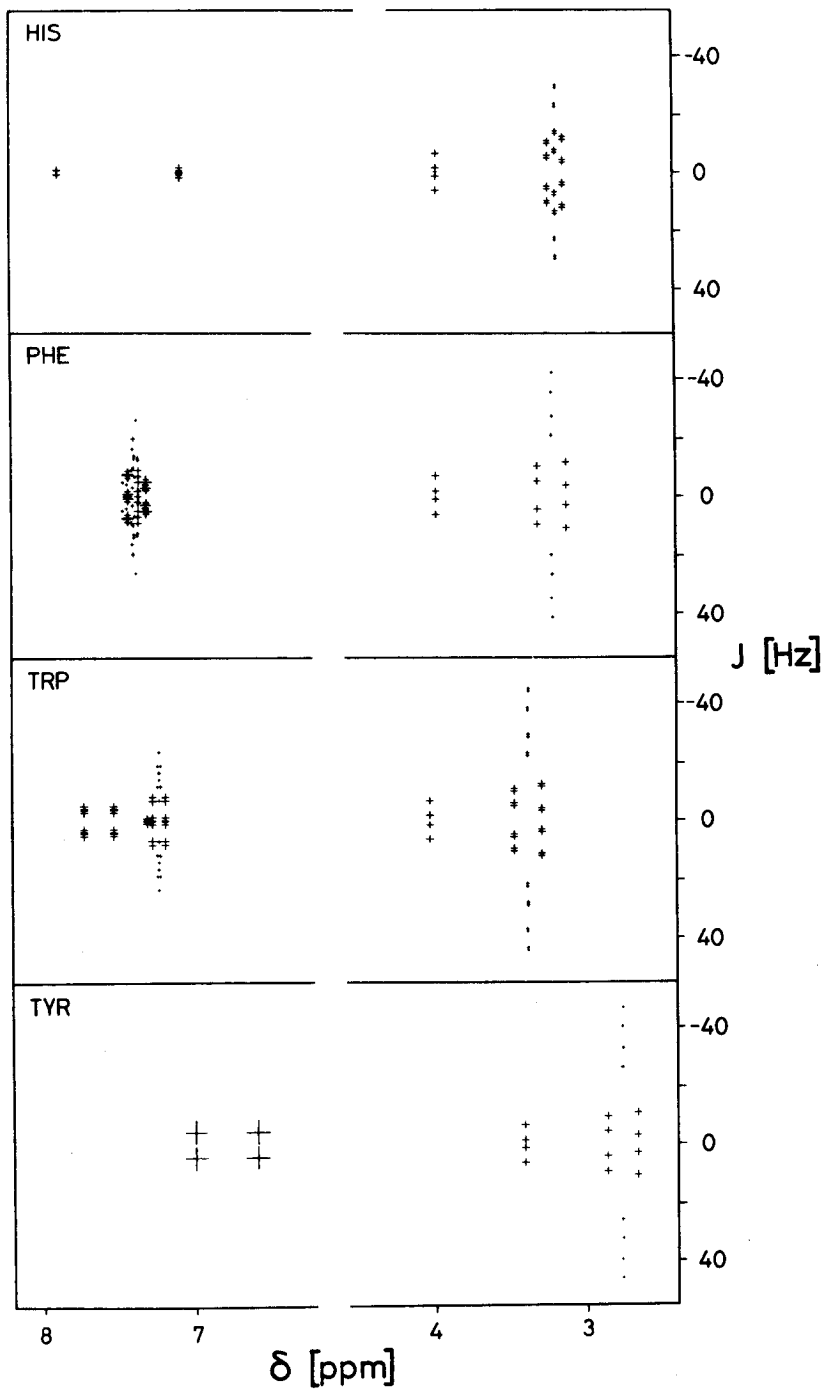


Fig. 3.7C

Legende siehe Fig. 3.7A.

3.3 Durch zurückgefaltete Resonanzen verursachte Artefakte im 2DJ-Spektrum

Die durch starke Kopplung verursachten Multiplette in 2DJ ^1H NMR-Spektren können entlang der J-Achse einen viel breiteren Frequenzbereich bedecken, als man unter der Annahme schwacher Kopplung erwartet (Fig. 3.7). Dies illustriert die Fig. 3.8A anhand der C^β -Methylenprotonen von L-Tyrosin. Misst man dasselbe Spektrum mit einem kleineren Frequenzbereich in ω_1 -Richtung, werden die äussersten Linien in den zentralen Teil zurückgefaltet. In der (δ, J) -Darstellung des Spektrums ergibt dies Artefakte, die auf den ersten Blick an unerwarteten Orten erscheinen (Fig. 3.8B).

Figur 3.9 zeigt schematische 2DJ-Spektren gefalteter Multiplette in der (ω_1, ω_2) - und der (δ, J) -Darstellung. Anhand eines Multipletts, das sechs Komponenten enthält, werden verschiedene Möglichkeiten der Faltung illustriert. In einem Fall liegen alle Resonanzen ausserhalb der Nyquistfrequenz (Fig. 3.9A,B,C), in den anderen zwei Fällen liegen in ω_2 - bzw. in ω_1 -Richtung jeweils vier Resonanzen ausserhalb des gewählten Frequenzbereichs (Fig. 3.9D,E,F bzw. Fig. 3.9G,H,I).

Bei der Bestimmung des optimalen ω_1 -Frequenzbereiches muss man entscheiden, ob man stark gekoppelte Multiplette berücksichtigen will (Fig. 3.7), was grosse ω_1 -Frequenzen bedeutet. In diesem Fall muss man mit einer schlechten digitalen Auflösung arbeiten oder grosse Datenmatrizen aufnehmen. Letzteres führt in Proteinspektren zu einer langen Messzeit. Wählt man hingegen einen kleinen ω_1 -Frequenzbereich, der den Multipletten erster Ordnung angepasst ist, kann die Interpretation der Spektren durch zurückgefaltete Resonanzen erschwert werden. Durch Symmetrisieren der 2DJ-Spektren können solche Artefakte jedoch eliminiert werden (Kap. 2.2.1).

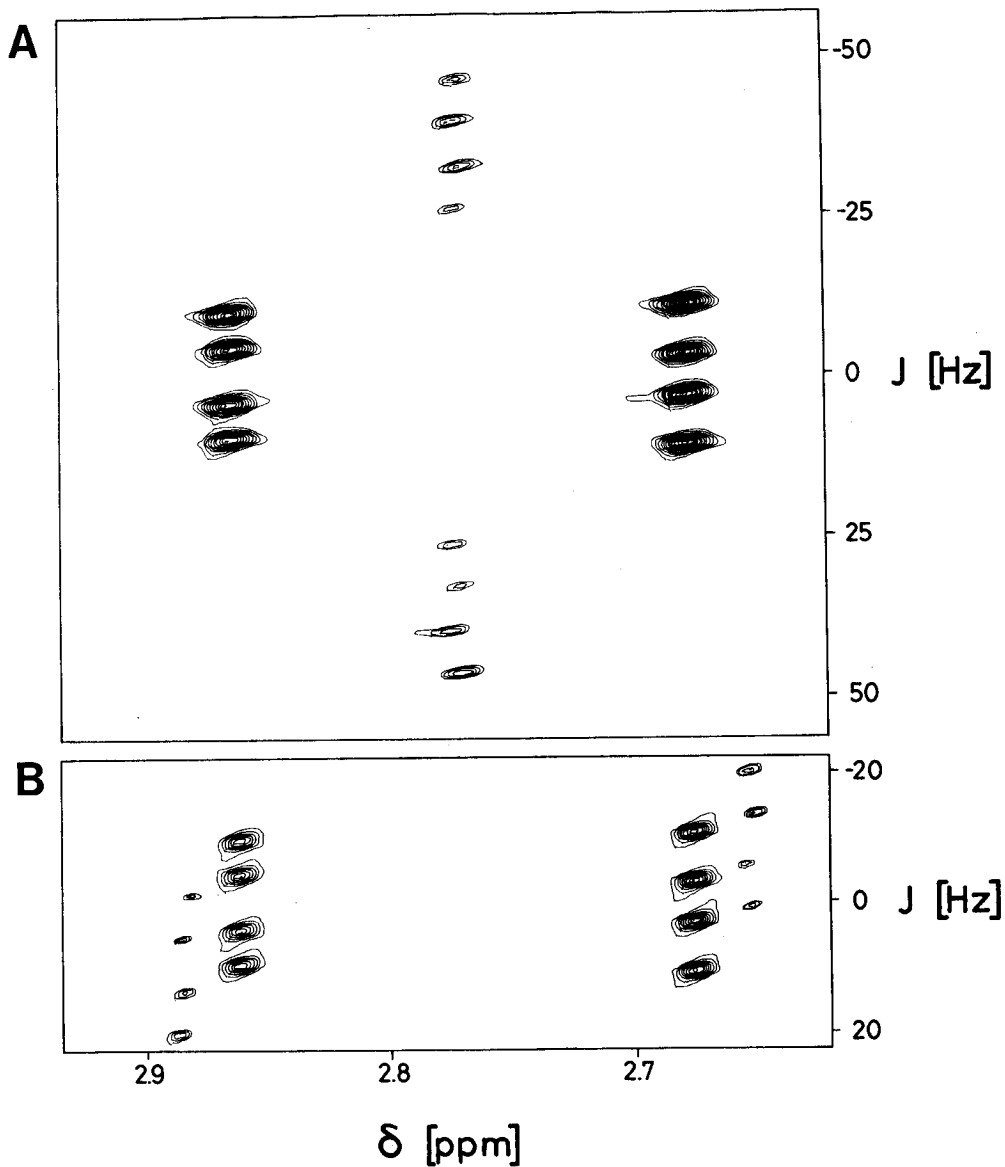


Fig. 3.8

Höhenlinienzeichnung des stark gekoppelten 360 MHz $2J$ ^1H NMR-Spektrums der C^β -Methylenprotonen einer 0.25 M Tyrosinlösung in D_2O , $\text{pD} = 11.6$, $T = 35^\circ\text{C}$. (A) Dieses Spektrum wurde mit einem Frequenzbereich von ± 56.2 Hz in ω_1 -Richtung aufgenommen. (B) In diesem Spektrum betrug der Frequenzbereich in der ω_1 -Richtung nur ± 22.5 Hz. Die Resonanzen bei 2.77 ppm in (A) sind hier in Positionen bei 2.65 ppm und 2.89 ppm gefaltet.

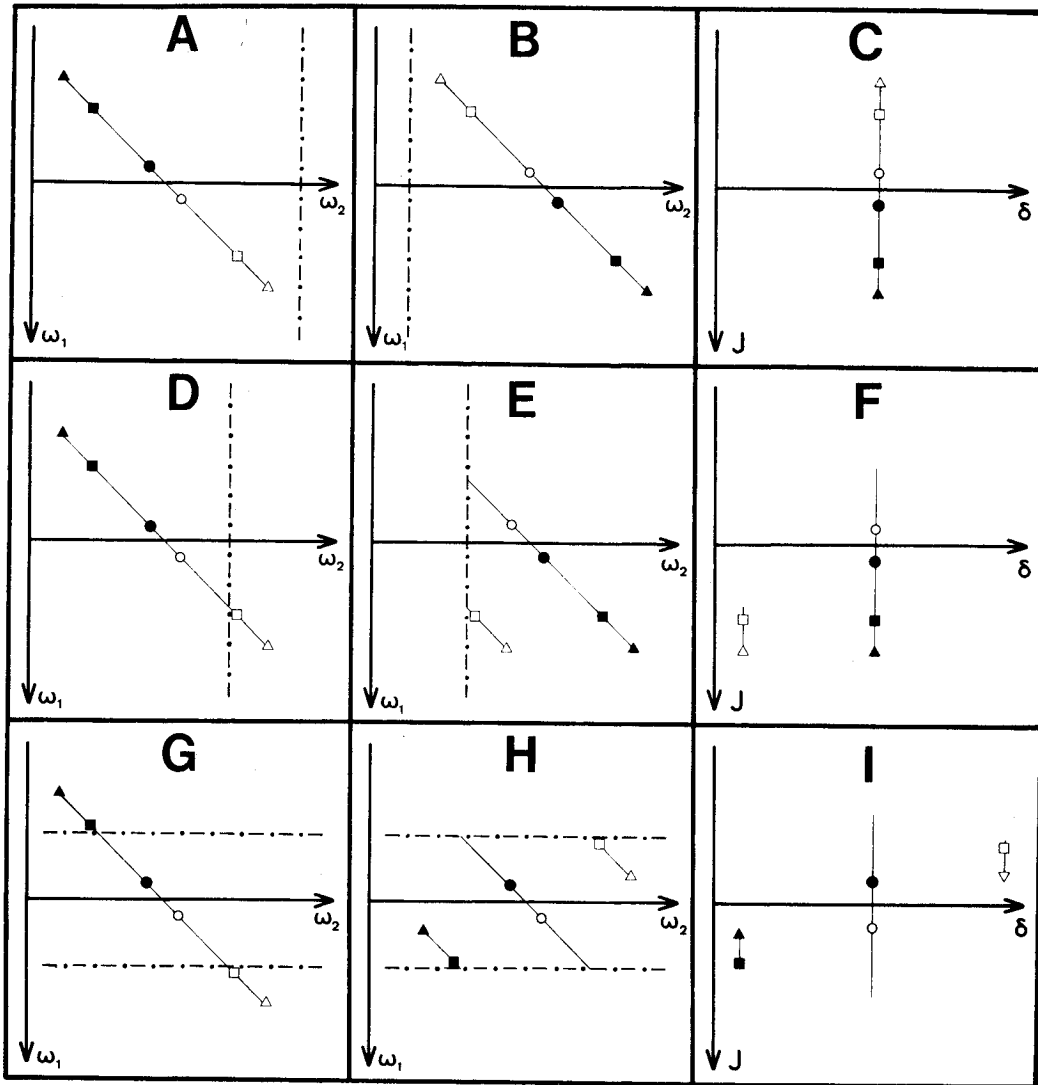


Fig. 3.9

Schematische Darstellung gefalteter 2DJ-Spektren anhand eines Multipletts mit sechs Komponenten ▲, ■, ●, ○, □ und △ (A). Die oberste Reihe zeigt die Faltung entlang ω_2 um eine Frequenz die ausserhalb des ω_2 -Frequenzbereichs des Multipletts liegt (--- in A). (B) (ω_1, ω_2) -Darstellung und (C) (δ, J) -Darstellung des gefalteten Spektrums. Die mittlere Reihe zeigt Faltung entlang ω_2 um eine Frequenz innerhalb des ω_2 -Frequenzbereichs des Multipletts (D bis F). Die unterste Reihe zeigt Faltung bezüglich ω_1 um eine Frequenz innerhalb des ω_1 -Frequenzbereichs des Multipletts (G bis I).

3.4 Diskussion des Einflusses starker Kopplung auf 2DJ-Spektren von Proteinen

Grundlegende Erscheinungen, welche die starke Kopplung in 2DJ-Spektren verursacht, wurden schon früher diskutiert (Aue et al., 1976a; Anil Kumar, 1978; Bodenhausen et al., 1978). Hier sind wir in erster Linie an praktischen Auswirkungen für die Interpretation von 2DJ-Spektren von Proteinen interessiert. Wenn die 2DJ ^1H NMR-Spektroskopie auf Studien von Proteinspektren mit grosser Resonanzdichte angewendet wird, besteht ein Hauptvorteil gegenüber den normalen 1D Experimenten darin, dass man für schwach gekoppelte Spinsysteme gut aufgelöste Multiplette und damit genaue Werte für die Spin-Spin-Kopplungskonstanten erhält (Nagayama et al., 1978; Freeman und Morris, 1979). Die in diesem Kapitel gezeigten Daten der einzelnen Aminosäuren machen deutlich, dass in der Gegenwart starker Kopplung in den 2DJ-Spektren komplizierte Resonanzmuster erscheinen, die manchmal schwierig aufzulösen sind und die spezielle Sorgfalt bei der Interpretation von Proteinspektren erfordern. Dies zeigt klar, dass man die spektrale Auflösung nur optimieren kann, wenn die 2DJ-Spektroskopie bei hohem Feld angewendet wird. Auf alle Fälle kann die 2D J-aufgelöste Spektroskopie die Verwendung eines hohen Magnetfeldes nicht ersetzen.

Das ^1H NMR-Spektrum einer Aminosäure, die sich im Inneren eines globulären Proteins befindet, kann durch lokale magnetische Felder benachbarter Gruppen (Roberts und Jardetzky, 1970; Wüthrich, 1976) stark beeinflusst werden. Es ist darum möglich, dass ein Aminosäurerest, der in einem Random-Coil-Peptid ein stark gekoppeltes Spektrum ergibt, in einem Protein Multiplette erster Ordnung zeigt und umgekehrt. Die Spektren der freien Aminosäuren (Fig. 3.7) geben also nur eine grobe Richtlinie der spektralen Eigenschaften im Protein. Dies genügt jedoch, um zwischen spektralen Regionen mit vorwiegend starker und solchen mit vorwiegend schwacher Kopplung zu unterscheiden. In einem Protonenspektrum bei 360 MHz erwartet man schwache Kopplung für die Methylresonanzen

(und mögliche andere hochfeldverschobene Linien) bei hohem Feld beginnend bei etwa 1.6 ppm und für die $C^{\alpha}H$ -Resonanzen zwischen etwa 3.5 und 6.0 ppm (Wüthrich, 1976). Starke und schwache Kopplung zeigen die Methylengruppen zwischen ca. 1.5 und 3.5 ppm und die Aromatenregion (Fig. 3.7).

Die stark gekoppelten Multiplette beanspruchen oft einen grösseren ω_1 -Frequenzbereich als Multiplette erster Ordnung (Fig. 3.7). Dies kann zur Faltung von Resonanzen in ω_1 -Richtung führen, was sich in der (δ, J) -Darstellung der 2DJ-Spektren in unerwarteten Resonanzen äussert, die nicht symmetrisch zu $\omega_1 = 0$ sind. Durch eine Symmetrisierung des 2DJ-Spektrums können diese Artefakte unterdrückt werden (Kap. 2.2.1).

4. RESONANZZUORDNUNG IM ^1H NMR-SPEKTRUM VON AUF MICELLEN GEBUNDENEM GLUCAGON MITTELS 2D NMR

4.1 Allgemeine Strategie für die sequenzielle Zuordnung von Polypeptid-Resonanzen mittels 2D ^1H NMR-Spektroskopie

Um die Möglichkeiten, die die ^1H NMR-Spektroskopie in der Erforschung von Proteinen bietet, voll ausnutzen zu können, müssen hunderte von Resonanzen individuell einzelnen Protonen in der Aminosäuresequenz zugeordnet werden. Bis jetzt beruhten Resonanzzuordnungen meistens auf einer chemischen Veränderung des Proteins, einer Veränderung der Umgebung des Proteins oder einem Vergleich mit der Kristallstruktur. Diese Methoden eignen sich jedoch nicht, um alle Resonanzen eines Proteinspektrums effektiv und nur gestützt auf NMR-Daten zuzuordnen.

In einem Proteinspektrum bietet sich eine schrittweise Identifikation der einzelnen Aminosäurereste entlang dem Polypeptidrückgrat an, welches unverzweigt durch das ganze Protein verläuft. Llinás et al. (1977) und Okhanov et al. (1980) wendeten diese Methode an, indem sie mittels homo- und heteronuklearer Kopplungen zwischen den Kernen ^1H , ^{13}C und ^{15}N die einzelnen Resonanzen identifizierten. Obwohl die Resonanzzuordnung mittels J-Kopplungen entlang dem Polypeptidrückgrat sehr attraktiv ist, erscheinen diese Experimente im Moment jedoch zu aufwendig, um eine breite praktische Anwendung für Proteine zu finden. Für Studien von Polypeptiden verwendet man oft homonukleare ^1H NMR-Experimente, bei denen Proton-Proton-Kopplungen jedoch nur innerhalb einzelner Aminosäurereste auftreten. Eine sequenzielle Resonanzzuordnung lässt sich in diesem Fall verwirklichen, indem man die Verbindung zwischen benachbarten Aminosäureresten mittels NOE's von Amidprotonen herstellt. Weil alle

Kopplungen innerhalb eines Spinsystems und alle NOE's von einem Amidproton zu Protonen benachbarter Aminosäuren gebraucht werden, bieten sich 2D NMR Methoden an: 2D korrelierte Spektroskopie (COSY bzw. SECSY, vgl. Kap. 2.3) und 2D NOE-Spektroskopie (NOESY, vgl. Kap. 2.4). Diese 2D Experimente lassen sich auf einfache Weise auch in H_2O Lösungen von Proteinen durchführen. Dies ist wichtig, weil einige oder sogar alle (vgl. auf Micellen gebundenes Glucagon, Kap. 4.2) der wichtigen Amidprotonen zu rasch mit dem Lösungsmittel austauschen, um in D_2O beobachtbar zu sein (Wüthrich, 1976).

Aus dem 2D korrelierten Spektrum lassen sich die Kopplungen zwischen den Amid-, den C^α - und den Seitenketten-Protonen der einzelnen Aminosäuren bestimmen, während sich im 2D NOE-Spektrum mit passendem τ_m -Wert die Verbindungen zwischen benachbarten Aminosäureresten herstellen lassen. Die Zuverlässigkeit der auf Grund dieser NOE-Verbindungen getroffenen Zuordnungen liegt zwischen 70% und 99%, je nachdem ob eine oder zwei der Distanzen d_1 (vom NH_{i+1} zum $C^\alpha H_i$), d_2 (vom NH_{i+1} zum NH_{i+2} oder NH_i) oder d_3 (vom NH_{i+1} zum $C^\beta H_i$) kleiner oder gleich 3\AA sind (Billeter et al., 1982). Die Definitionen der Distanzen d_1 , d_2 und d_3 lassen sich anhand der Fig. 1.1 veranschaulichen.

Das folgende Vorgehen bewährte sich bei der Anwendung der sequenziellen Resonanzzuordnung:

- a) Zuerst identifiziert man möglichst viele vollständige Spinsysteme von Aminosäure-Seitenketten in einem in D_2O gemessenen COSY- und/oder SECSY-Spektrum. Die komplexen Spinsysteme der langen Seitenketten sind im allgemeinen schwierig zu identifizieren, oft erhält man davon nur Bruchstücke. Nach der sequenziellen Resonanzzuordnung, wenn die C^α - und C^β -Protonen bekannt sind, bestehen bessere Voraussetzungen dieses Seitenkettenprotonen zu identifizieren.
- b) Mit Hilfe eines in H_2O gemessenen COSY-Spektrums, ordnet man jedem C^α -Proton das zugehörige Amidproton zu. Besitzt das Protein langsam austauschende Amidprotonen, kann im Fall von Mehrdeutigkeiten

zusätzlich ein in D_2O gemessenes COSY-Spektrum nützlich sein, indem die NH-Protonen teilweise ausgetauscht sind.

- c) Mit Hilfe eines in H_2O gemessenen NOESY-Spektrums bestimmt man nun die Verbindungen d_1 , d_2 oder d_3 der Amidprotonen zu in der Sequenz benachbarten Aminosäuren. Die Analyse von Aminosäuresequenzen (Dayhoff, 1972) zeigt, dass die Identifizierung eines Peptidsegments von zwei bis vier Resten im allgemeinen genügt, um es in der Sequenz zu lokalisieren. An dieses Segment anschließende sequenzielle Zuordnungen lassen sich nun, mit den schon bestimmten Spinsystemen überprüfen. Dies ist besonders nützlich bei Mehrdeutigkeiten, d.h. bei gleichen NH und/oder $C^\alpha H$ chemischen Verschiebungen. Aus einer gefundenen Verbindung d_1 , d_2 oder d_3 lassen sich die Positionen der anderen zwei im Spektrum bestimmen und damit auf eine schnelle Art überprüfen. Im Fall von Mehrdeutigkeiten kann ein in D_2O gemessenes NOESY-Spektrum weiterhelfen, indem die Amidprotonen zum Teil ausgetauscht sind.
- d) Sobald alle ausser einer Aminosäure eines bestimmten Types zugeordnet sind, genügt die Identifikation des Seitenketten-Spinsystems, um diesen verbleibenden Aminosäurerest zuzuordnen. Am Ende der sequenziellen Zuordnung sollte jede Resonanz in der $NH_i - C^\alpha H_i$ Region des in H_2O gemessenen COSY-Spektrum genau einmal zugeordnet sein.

Im Zusammenhang mit der sequenziellen Resonanzzuordnung müssen sechs Aminosäuren besonders betrachtet werden. Val, Ile, Thr und Ala besitzen in der C^β -Position keine Methylengruppe, was sich auf die d_3 -Verbindung auswirkt (Billeter et al., 1982). Gly hat gar kein C^β -Proton dafür aber zwei C^α -Protonen, so dass man immer eine d_1 -Verbindung zu Gly beobachten sollte (Billeter et al., 1982). Ein sehr spezieller Fall ist Prolin, das kein Amidproton besitzt. Die Funktion des Amidprotons in der sequenziellen Resonanzzuordnung kann in diesem Fall von einem C^δ -Proton übernommen werden (Arseniev et al., 1982; Wagner et al., 1982).

4.2 Experimentelle Einzelheiten

Für die Messung, welche wir mit auf Micellen gebundenem Glucagon durchführten, stellten wir zwei Lösungen her: eine in D_2O und die andere in einem Gemisch von 90% H_2O und 10% D_2O . Glucagon (Rind) bezogen wir von SERVA Heidelberg und wir verwendeten es ohne weitere Reinigung. Dr. Adela Chrzyszczuk und Dr. Kong Hung Lee synthetisierten das volldeuterierte (D_{38})-Dodecylphosphocholin, wie es von Brown (1979) beschrieben wurde. Die Lösungen enthielten 0.015 M Glucagon, 0.7 M (D_{38})-Dodecylphosphocholin, 0.05 M Phosphatpuffer, pD = 6.0 bzw. pH = 6.0. In der D_2O Lösung benützten wir die pH-Meter Anzeige, ohne den Isotopeneffekt zu korrigieren (Kalinichenko, 1976; Bundi und Wüthrich, 1979a) und die Lösungsmittelresonanz wurde durch mehrfaches Lyophilisieren minimalisiert. Beide Lösungen entgasten wir sorgfältig und schmolzen die NMR-Röhrchen unter Stickstoffatmosphäre zu. Chemische Verschiebungen sind relativ zu externem Natrium-3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- D_4)-propionat (TSP) angegeben, wobei wir die C^E -Methylprotonenresonanz von Met 27 bei 2.04 ppm (bei 37°C) als interne Referenz benützten.

Gemischte Micellen aus Glucagon und Dodecylphosphocholin wurden mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden charakterisiert (Bösch et al., 1980; Brown et al., 1981). Für Glucagonkonzentrationen zwischen 0.001 und 0.006 M und einem fünfzigfachen Ueberschuss an Detergensmolekülen, wurde eine homogene Population von Micellen gefunden, die ein Glucagonmolekül und etwa 40 Detergensmoleküle enthielten; das Molekulargewicht dieses Komplexes beträgt etwa 17'000. Für die 2D Experimente erhöhten wir die Glucagonkonzentration auf 0.015 M unter Beibehaltung des fünfzigfachen Ueberschusses an Detergensmolekülen. Für die Lösungen mit 0.004 und 0.015 M Glucagon erhielten wir identische NMR-Spektren. Bei diesen hohen Konzentrationen können andere Methoden, wie z.B. die Lichtstreuung oder die analytische Untrazentrifuge, nicht zuverlässig angewendet werden. Wir schlossen darum aus den NMR-Daten, dass ähnliche gemischte Micellen geformt werden wie bei tieferen Konzentrationen.

In den Spektren von auf Micellen gebundenem Glucagon beobachteten wir weder eine Ueberlagerung von verschiedenen Spektren noch eine Linienverbreiterung, welche sich nicht durch die Grösse des Komplexes ($M = 17'000$) erklärt. Daraus lässt sich schliessen, dass ein möglicher Austausch zwischen mehreren Konformationen des gebundenen Glucagons schnell erfolgt ($< 10^{-3}$ sec) verglichen zur NMR-Zeitskala. In Anbetracht der benützten Konzentrationen und der extrem schlechten Löslichkeit von Glucagon unter den angegebenen Bedingungen kann auch mit Sicherheit angenommen werden, dass nur Spuren ($\ll 10^{-4}$ M) sich frei in Lösung befinden können, während das Gleichgewicht stark auf der Seite der komplexbildenden Form liegen muss.

Für die sequenzielle Resonanzzuordnung benützten wir Spektren, die wir alle mit den zwei oben beschriebenen Glucagonlösungen bei 37°C aufnahmen: ein COSY-Spektrum (Kap. 2.3.1) und ein SECSY-Spektrum (Kap. 2.3.2) in D_2O , ein COSY-Spektrum und ein NOESY-Spektrum (Kap. 2.4) mit $\tau_m = 100$ ms beide in H_2O . Den τ_m -Wert im NOESY-Spektrum, das zur sequenziellen Resonanzzuordnung gebraucht wird, sollte man so kurz wählen, dass der NOE zwischen Rückgratprotonen, welche etwa 3 \AA voneinander entfernt liegen (Billeter et al., 1982), mit einem vernünftigen Signal-zu-Rauschen Verhältnis zu beobachten ist. Studien von NOE-Aufbauzeiten in BPTI (Anil Kumar et al., 1981; Dubs et al., 1979; Wagner und Wüthrich, 1979b) und in auf Micellen gebundenem Glucagon zeigten, dass bei 360 MHz ein τ_m -Wert von 100 ms angemessen ist. Die Amidprotonen in auf Micellen gebundenem Glucagon tauschen ziemlich rasch aus, so dass alle sequenziellen Zuordnungen auf Messungen in der H_2O Lösung beruhen. Die Spinsysteme der einzelnen Aminosäure-Seitenketten identifizierten wir im D_2O COSY-Spektrum. In einigen Fällen lösten wir Zweideutigkeiten, indem wir mit einem D_2O SECSY-Spektrum verglichen.

Die 2D ^1H NMR-Spektren, die wir in diesem Kapitel benützen, haben wir auf einem 360 MHz Bruker HX-360-Spektrometer gemessen. Die Spektren erhielten wir aus 256 Messungen mit t_1 -Werten von 0 bis 40 msec. Um die einzelnen freien Induktionszerfälle (FID) zu messen, benützen wir eine

Zweikanalmessung mit der Trägerfrequenz am Tieffeldende des Spektrums (Kap. 2.5.1). Wir verwendeten für jeden t_1 -Wert zyklische Gruppen von 16 verschiedenen Phasen für die jeweilige Pulssequenz (Kap. 2), um experimentelle Artefakte zu eliminieren. Spezielle Vorsicht benötigte die Unterdrückung der H_2O Resonanz, die viel breiter war als beispielsweise in einer verdünnten Proteinlösung. Ein befriedigendes Resultat erzielten wir mit selektiver, kontinuierlicher Einstrahlung auf die H_2O Linie; nur während der Datenaufnahme war die Einstrahlung für rund 0.1 Sekunden unterbrochen. In den verschiedenen Experimenten summierten wir für jeden t_1 -Wert zwischen 192 und 256 einzelne FID, was einer totalen Messzeit von rund 20 Stunden entspricht. Für jeden t_1 -Wert wurden 1024 Datenpunkte gespeichert. Vor der Fouriertransformation wurde die FID-Datenmatrix mit einer geeigneten Filterfunktion multipliziert (Kap. 2.5). Um ein Spektrum mit 512×512 Punkten zu erhalten, was einer digitalen Auflösung von 5.8 Hz/Punkt in D_2O und 6.3 Hz/Punkt in H_2O Spektren entspricht, ergänzten wir die FID-Matrix in t_1 -Richtung bis 1024 Punkte und in t_2 -Richtung bis 2048 Punkte mit Nullen. Alle Spektren sind als Betragsspektren gezeigt.

4.3 Resonanzzuordnung im Spektrum von auf Micellen gebundenem Glucagon

4.3.1 Identifikation der Aminosäure-Seitenketten-Spinsysteme

Der Komplex, den Glucagon mit volldeuterten Dodecylphosphocholin-Micellen bildet, wurde schon mit eindimensionalen NMR-Experimenten untersucht. Dies führte zur Zuordnung der vollständigen Spinsysteme der nicht-austauschenden Protonen von Ala 19, Val 23 und Trp 25 (Bösch et al., 1980). Zusätzlich wurden die Imidazolresonanzen von His 1, die C^δ -Methylresonanzen der zwei Leucine in den Positionen 14 und 26, die C^ϵ -Methyllinie von Met 27 und eines der drei Thr $C^\beta H-C^\gamma H_3$ -Fragmente bestimmt. Dieses Kapitel beschreibt, wie wir die vollständigen Spinsysteme der meisten der 29 Aminosäurereste in einem in D_2O aufgenommenen COSY-Spektrum (Kap. 2.3) identifizierten (Fig. 4.1).

Im COSY-Spektrum in Fig. 4.1 liegen Linien, die Resonanzpositionen im eindimensionalen Spektrum entsprechen, auf der Diagonalen, die von der oberen rechten zur unteren linken Ecke verläuft. Die Resonanzen, die in einiger Entfernung von der Diagonalen liegen, bezeichnet man als Crosspeaks. Sie bedeuten, dass zwischen bestimmten diagonalen Resonanzen eine Spin-Spin-Kopplung besteht (Kap. 2.3). Fig. 4.1 zeigt zwei Regionen von 0.5 bis 5.0 ppm und von 6.5 bis 7.5 ppm, welche nicht durch J-Kopplungen verbunden sind. Die Tieffeldregion enthält die Resonanzen der aromatischen Ringe und die Hochfeldregion diejenigen aller anderen Protonen. Im unteren rechten Dreieck in Fig. 4.1 sind die J-gekoppelten Resonanzen von sieben aliphatischen Spinsystemen und von den aromatischen Ringe von Trp und den beiden Tyr angegeben.

Tabelle 4.1 zeigt die schematischen COSY-Spektren für die in Glucagon auftretenden Aminosäurereste. Sie entsprechen einer anderen Darstellung

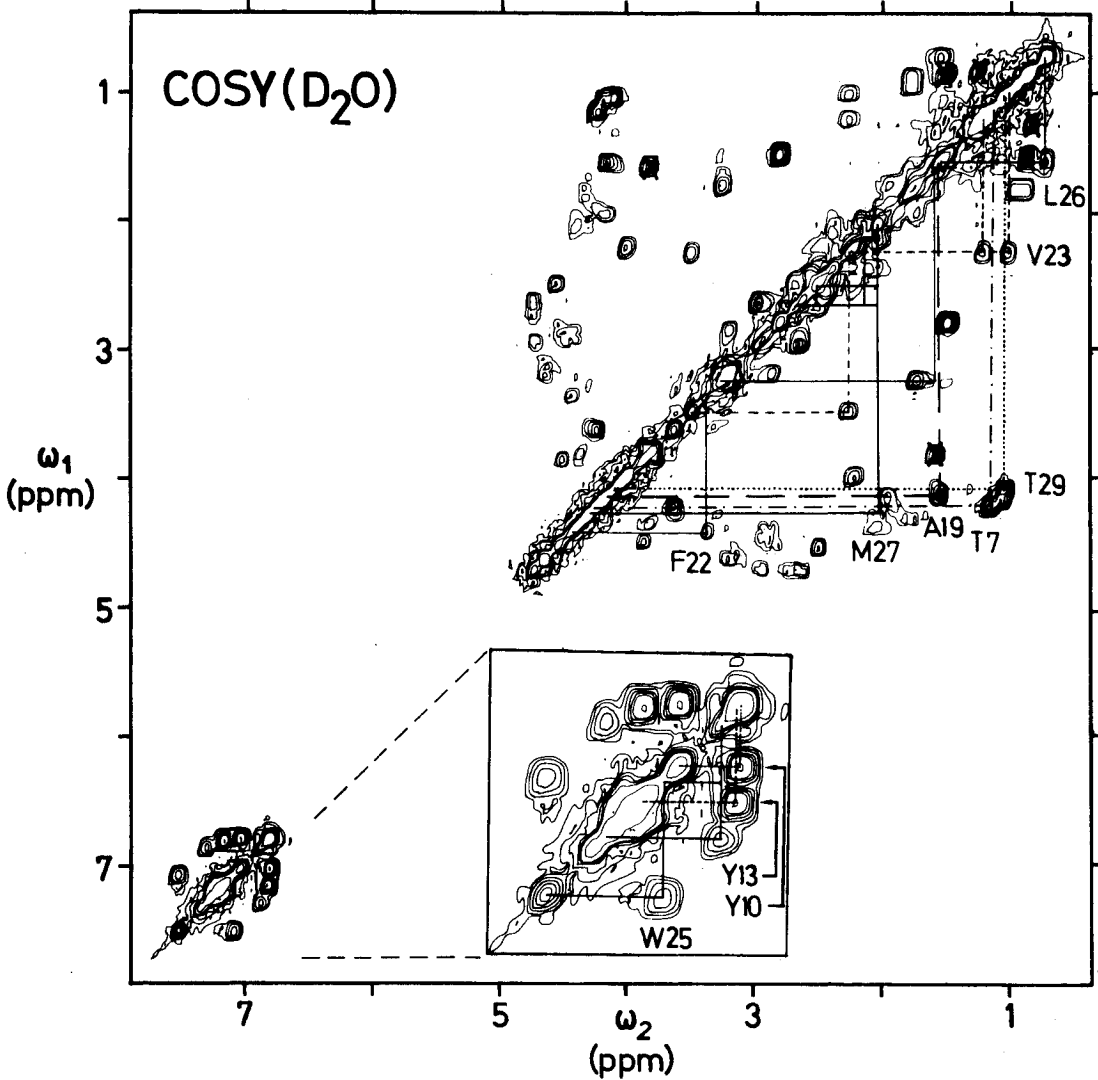
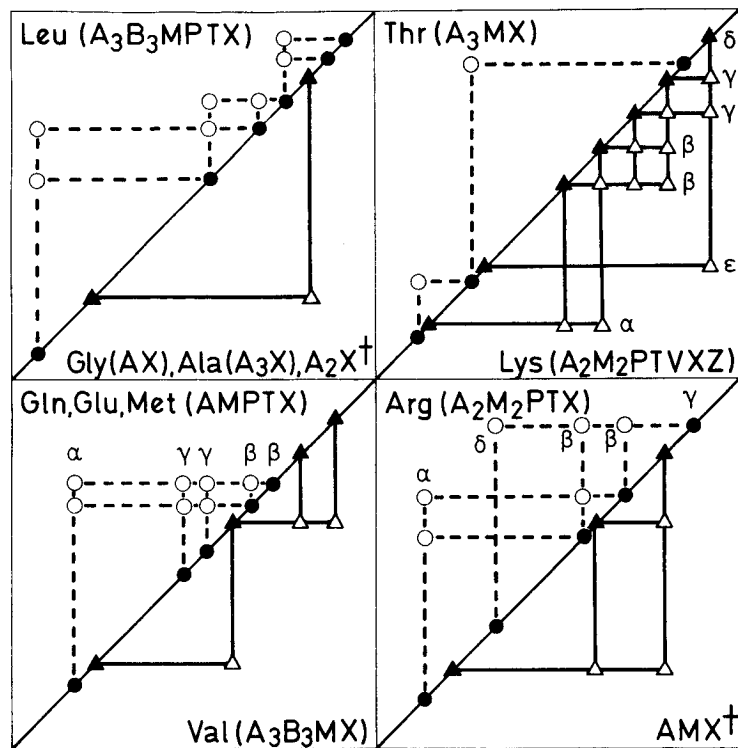


Fig. 4.1

Höhenlinienzeichnung eines 360 MHz ^1H COSY-Spektrums von auf Micellen gebundenem Glucagon in D_2O , $\text{pD} = 6.0$, $T = 37^\circ\text{C}$ (Kap. 4.2). Die Aromatenregion dieses symmetrisierten Betragsspektrums (Kap. 2.5) ist auch vergrößert dargestellt. Die Spinsysteme folgender Aminosäurereste sind eingezeichnet: Thr 7 (----), Ala 19 (— —), Phe 22 (—), Val 23 (---), Leu 26 (—), Met 27 (—), Thr 29 (····) und die aromatischen Ringe von Tyr 10 (····), Tyr 13 (---) und Trp 25 (—). Um die Figur nicht zu überladen, sind die Verbindungen vom C^αH nur zu dem C^βH bei tieferem Feld gezeichnet (Tabelle 4.2). Crosspeaks, die von Protonenspuren im deuterierten Phosphocholin herrühren, sind mit einem Kreuz bezeichnet (X).

Tabelle 4.1

Schemata der COSY-Verbindungsdiagramme für schwach gekoppelte Spinsysteme der nicht-austauschenden, aliphatischen Protonen in den gewöhnlichen Aminosäureresten.[¶]



[†] A_2X - oder AMX -Spinsysteme können von Asn, Asp, Cys, His, Phe, Ser, Trp und Tyr stammen.

[¶]In jedem der vier Quadrate sind zwei Verbindungsdiagramme gezeigt. Für das Diagramm in der oberen linken Hälfte jedes Quadrates sind diagonale Linien mit gefüllten Kreisen, Crosspeaks mit offenen Kreisen und Verbindungen mit gestrichelten Linien angegeben. In der unteren rechten Hälfte sind gefüllte und offene Dreiecke und ausgezogene Linien benutzt. Bei jedem Diagramm ist auch der Aminosäuretyp und das zugehörige Spinsystem angegeben. Zum besseren Verständnis sind die diagonalen Resonanzen des $AMPTX$ -Systems, sowie von Arg und Lys angeschrieben. Ile und Pro, die in Glucagon nicht auftreten, sind nicht gezeigt.

der Kopplungsmuster, die in einem SECSY-Experiment erhalten werden (Nagayama und Wüthrich, 1981). Einmalige Spinsysteme, die direkt eine Aminosäure bestimmen, besitzen Val, Ile (nicht in Tabelle 4.1), Ser, Pro (nicht in Tabelle 4.1), Thr, Lys und Arg. Für die restlichen gewöhnlichen Aminosäuren erlauben die COSY-Spektren nur eine Klassifizierung in Gruppen von mehreren Resten, und es braucht zusätzliche Information, um diese einzelnen Aminosäuren zuordnen zu können. Zum Beispiel unterscheiden sich Gly, A₂X-Spinsysteme und Ala durch die Resonanzintensitäten und die chemischen Verschiebungen, die C^αH-C^βH₂-Fragmente der aromatischen Seitenketten unterscheiden sich von anderen AMX- oder A₂X-Systemen auf Grund der NOE-Verbindungen mit den aromatischen Ringen (siehe unten). Weiter kann die Kombination von COSY-Verbindungen mit Resultaten der sequenziellen Zuordnung der Polypeptidrückgrat-Resonanzen benützt werden, um einzelne Aminosäuretypen zu identifizieren.

Um die Interpretation eines COSY-Spektrums zu illustrieren, betrachten wir das Spinsystem von Valin in Fig. 4.1. Von der diagonalen Resonanz bei 3.49 ppm führt eine horizontale, gestrichelte Linie zum C^αH-C^βH-Crosspeak bei ($\omega_1 = 3.49$ ppm, $\omega_2 = 2.26$ ppm). Von dort stellt eine vertikale Linie die Verbindung zur diagonalen Resonanz vom C^βH bei 2.26 ppm her. Eine horizontale Linie führt zu den zwei Crosspeaks mit den C^γH₃-Resonanzen bei ($\omega_1 = 2.26$ ppm, $\omega_2 = 1.21$ ppm) und ($\omega_1 = 2.26$ ppm, $\omega_2 = 1.02$ ppm). Zwei vertikale Linien zeigen schliesslich die Verbindungen zu den diagonalen Resonanzen der zwei C^γ-Methylgruppen. In gleicher Weise sind die Verbindungen der anderen 28 Aminosäurereste in den Fig. 4.1 - 4.3 eingezeichnet. Vergleicht man diese Figuren mit Tabelle 4.1, muss man berücksichtigen, dass immer nur die Verbindung zwischen dem C^αH und dem C^βH bei tieferem Feld angegeben ist, um die Figuren nicht zu überladen.

Für die aromatischen Seitenketten ergibt das COSY-Spektrum zwei getrennte Spinsysteme für das C^αH-C^βH-Fragment (Fig. 4.1 - 4.3) und die Ringprotonen (Fig. 4.1). Ausser für His konnten die Verbindungen mit den Ringprotonen mittels NOE-Messung gefunden werden, wie dies gemäss theo-

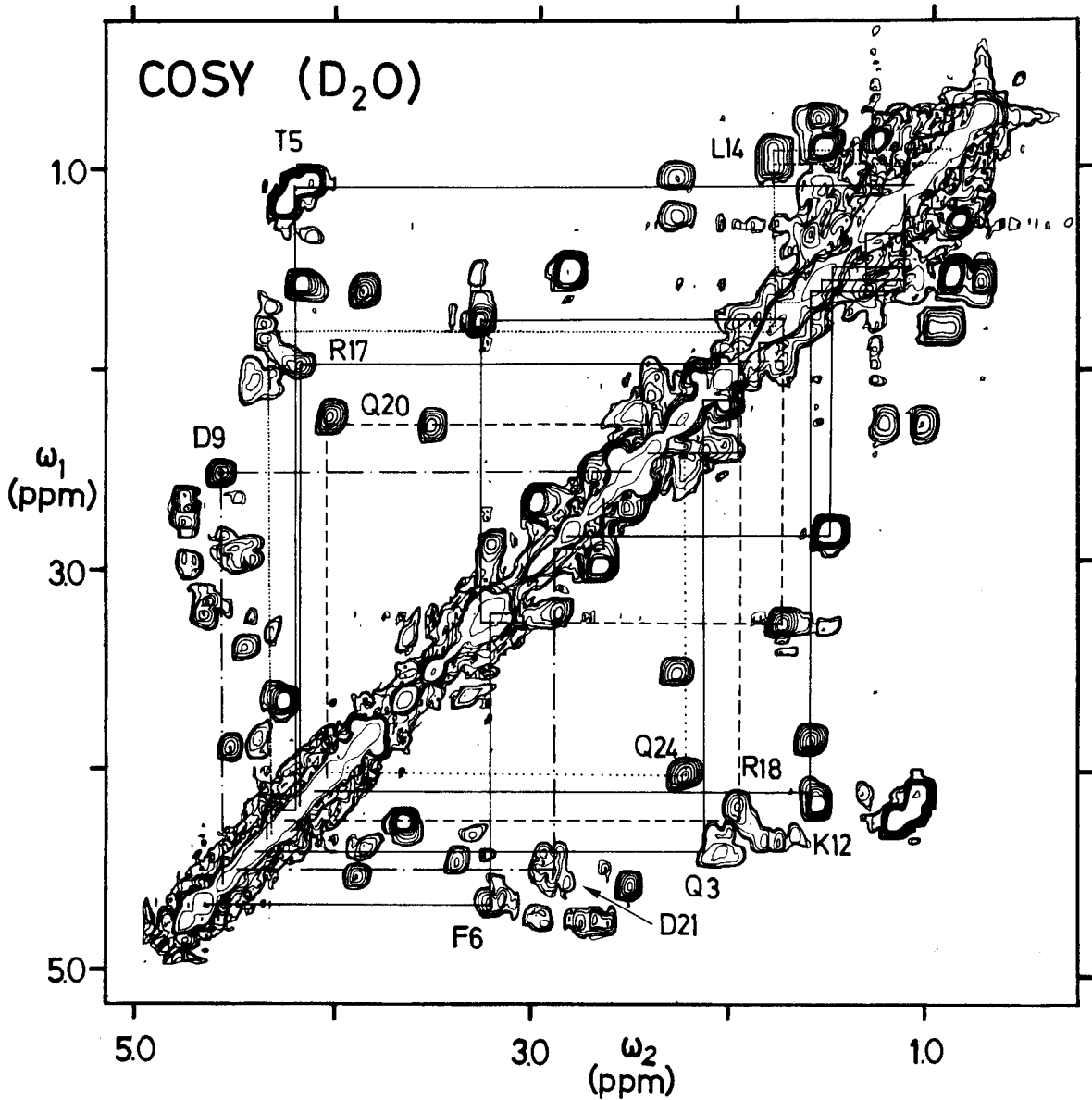


Fig. 4.2

Ausschnitt aus Fig. 4.1. Die Kopplungen in den folgenden Aminosäurere-
 sten sind im oberen linken Dreieck angegeben: Thr 5 (—), Asp 9 (· · · · ·),
 Leu 14 (· · · · ·), Arg 17 (—), Gln 20 (— — —). Im unteren rechten Dreieck
 liegen Gln 3 (—), Phe 6 (—), Lys 12 (—), Arg 18 (— — —), Asp 21 (— — —),
 Gln 24 (· · · · ·). Die Verbindungen vom $C^{\alpha}H$ sind jeweils nur zum $C^{\beta}H$ bei
 tieferem Feld gezeichnet (Tabelle 4.2).

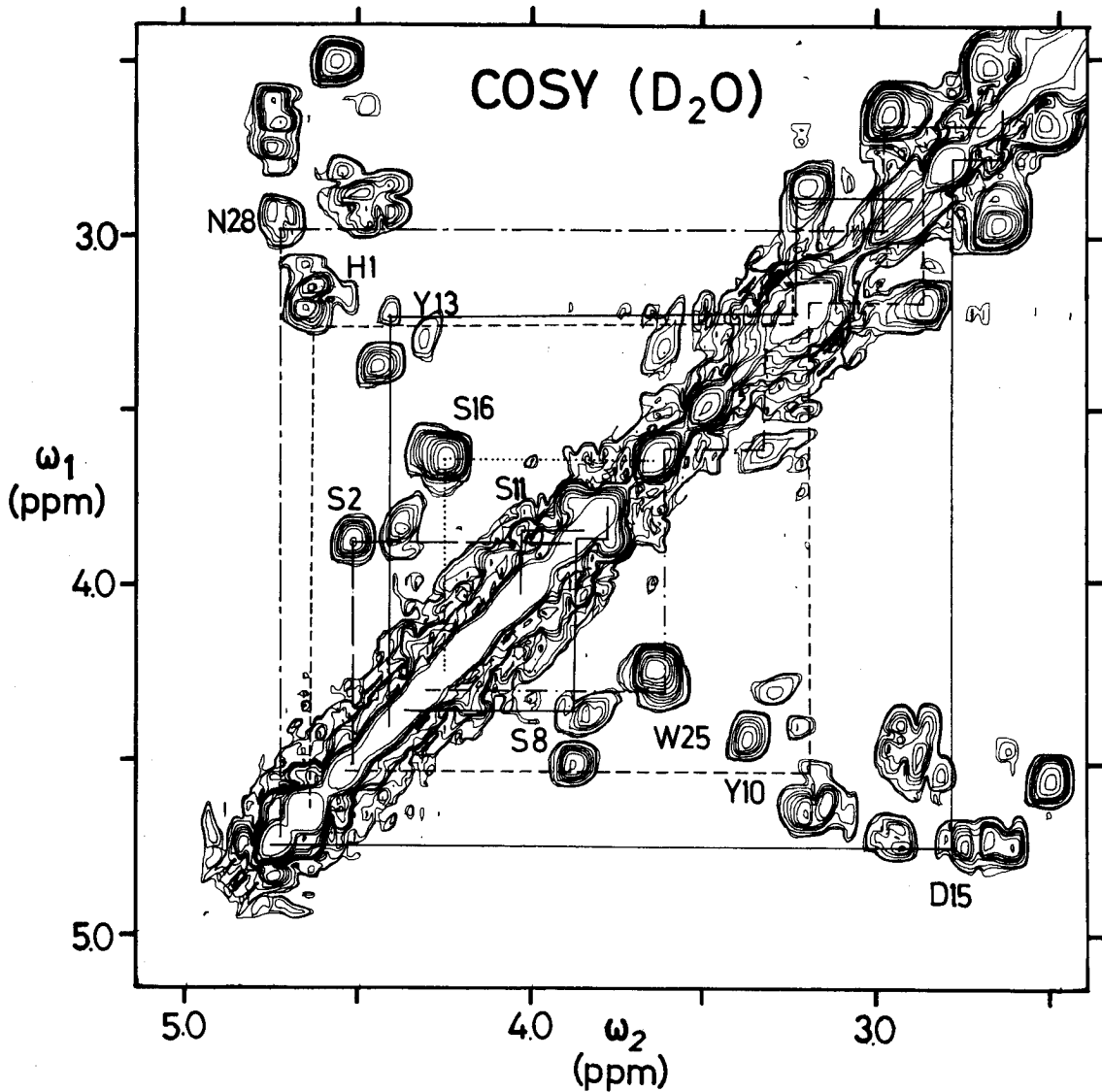


Fig. 4.3

Ausschnitt aus Fig. 4.1. Die Kopplungen in den folgenden Aminosäureresten sind im oberen linken Dreieck angegeben: His 1 (---), Ser 2 (— —), Ser 11 (—), Tyr 13 (—), Ser 16 (····), Asn 28 (---). Im unteren rechten Dreieck liegen Ser 8 (—), Tyr 10 (---), Asp 15 (—), Trp 25 (----). Die Verbindungen vom $C^{\alpha}H$ sind jeweils nur zum $C^{\beta}H$ bei tieferem Feld gezeichnet (Tabelle 4.2).

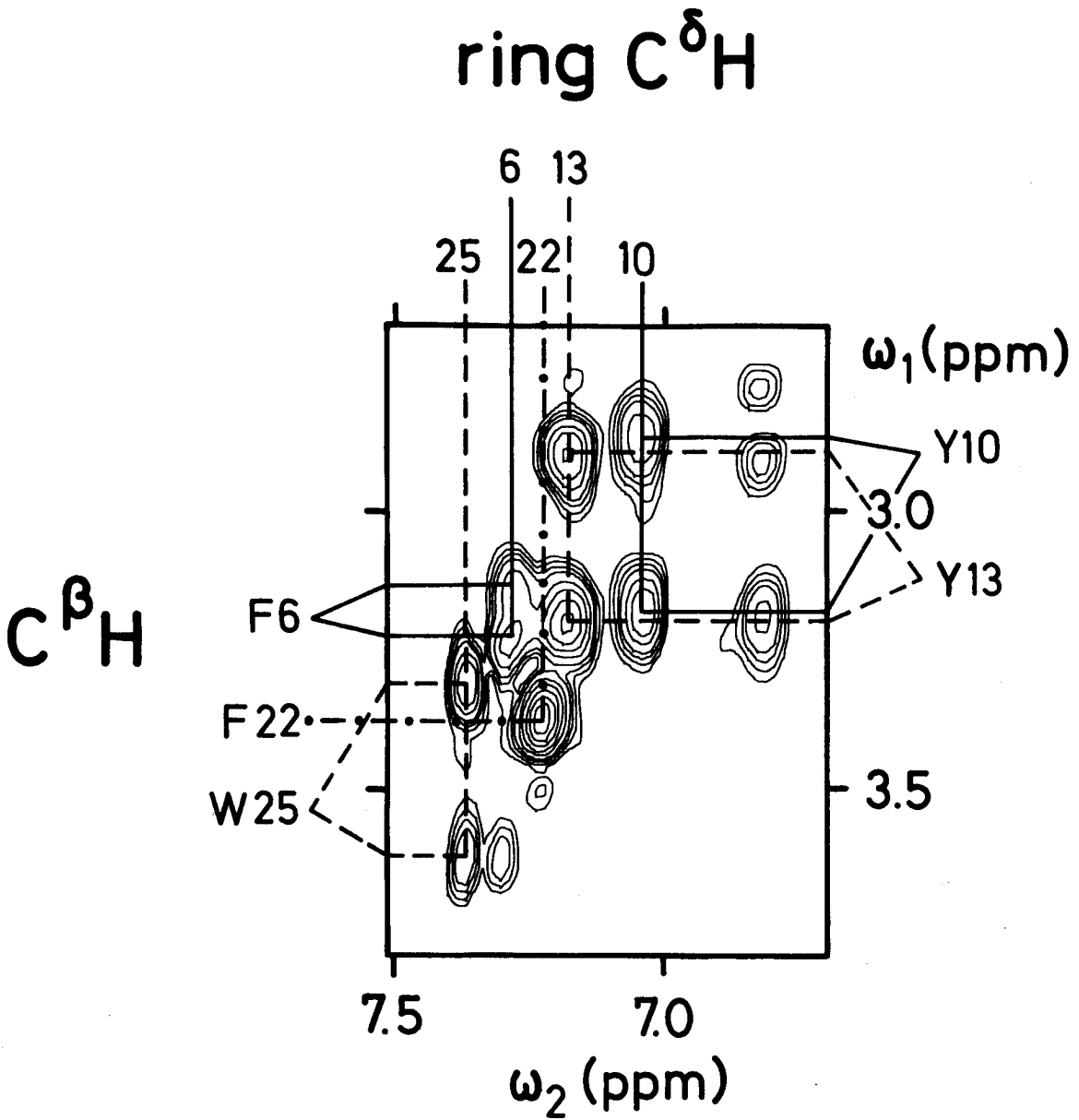


Fig. 4.4

Ausschnitt aus einem 360 MHz ¹H NOESY-Spektrum ($\tau_m = 200$ ms) von auf Micellen gebundenem Glucagon in D₂O. Die digitale Auflösung beträgt 5.8 Hz/Punkt. Die NOE-Verbindungen zwischen den C^βH₂ und den C^δ-Ringprotonen der aromatischen Seitenketten sind wie folgt angegeben: Phe 6 (—), Phe 22 (···), Tyr 10 (—), Tyr 13 (---), Trp 25 (---).

retischen Betrachtungen erwartet wird (Billeter et al., 1982). Diese Resultate illustriert die Fig. 4.4, welche ein NOESY-Spektrum zeigt, das mit derselben D_2O Lösung von auf Micellen gebundenem Glucagon aufgenommen wurde wie das COSY-Spektrum in Fig. 4.1. Ein NOESY-Spektrum (Anil Kumar et al., 1980a) zeigt eine ähnliche Erscheinung wie ein COSY-Spektrum (Fig. 4.1), aber ein Crosspeak bedeutet eine NOE-Verbindung durch den Raum zwischen zwei Resonanzen auf der Diagonalen (Kap. 2.4). Fig. 4.4 zeigt nur eine kleine spektrale Region, die jedoch alle Crosspeaks zwischen den $C^{\beta}H_2$ und den C^{δ} -Ringprotonen innerhalb einer aromatischen Seitenkette enthält.

Mit Blick auf die sequenzielle Resonanzzuordnung ist es wichtig, dass wir schon am Anfang auf 23 vollständig identifizierte Seitenketten-Spinsysteme abstützen können. Die Spinsysteme von Gly 4, einem Tyr, einem Leu und drei der vier Fünfspinsysteme von Gln und Met konnten wir erst nach der vollständigen sequenziellen Zuordnung identifizieren. Mit Ausnahme der Aminosäuretypen, die nur einmal in der Sequenz von Glucagon auftreten und einmalige COSY-Muster ergeben (Tabelle 4.1, Fig. 4.6), d.h. Lys 12, Ala 19, Val 23 und Trp 25, erhielten wir die Zuordnung zu bestimmten Sequenzpositionen (Fig. 4.1 - 4.5) natürlich erst nach Beendigung der sequenziellen Resonanzzuordnung (siehe unten).

4.3.2 Vorgehen um das 1H NMR-Spektrum von auf Micellen gebundenem Glucagon zuzuordnen

Verglichen mit der Resonanzzuordnung im basischen pankreatischen Trypsin-Inhibitor (BPTI) (Wagner et al., 1981; Wagner und Wüthrich, 1982), mussten wir für Glucagon eine etwas verschiedene Strategie anwenden. Die labilen Protonen von auf Micellen gebundenem Glucagon tauschen in einer D_2O Lösung zu rasch mit dem Lösungsmittel aus, so dass sie im 1H NMR-Spektrum nicht lange genug beobachtet werden können (Bösch et al., 1980), um eine 2D Messung durchzuführen. Daher mussten wir alle sequenziellen

Zuordnungen in Spektren machen, die wir in der H_2O Lösung gemessen hatten. Weiter spielten die sequenziellen Zuordnungen mittels NOE zwischen NH_{i+1} und $C^\beta H_i$ (d_3) eine viel wichtigere Rolle als im BPTI. Im übrigen war das grundsätzliche Vorgehen sehr ähnlich. Aminosäurereste, die in der Sequenz benachbart sind, bestimmten wir mittels einer oder zwei der NOE-Verbindungen d_1 (vom NH_{i+1} zum $C^\alpha H_i$), d_2 (vom NH_{i+1} entweder zum NH_{i+2} oder zum NH_i) oder d_3 (vom NH_{i+1} zum $C^\beta H_i$) (Billeter et al., 1980). Die J-Verbindungen mit den labilen Protonen erhielten wir aus einem COSY-Spektrum, das wir in H_2O aufgenommen hatten. So weit wie möglich überprüften wir die sequenziellen Zuordnungen mit der Aminosäuresequenz.

Fig. 4.5 zeigt die Region des COSY-Spektrums in H_2O , die alle $NH_i - C^\alpha H_i$ -Crosspeaks von auf Micellen gebundenem Glucagon enthält. Jeder Aminosäurerest in Glucagon sollte eine solche Resonanz ergeben ausser Gly 4, das zwei Resonanzen ergeben könnte und den N-terminalen Resten His 1 und Ser 2, welche möglicherweise nicht beobachtbar sind, weil die labilen Rückgrat-Protonen zu schnell austauschen (Bundi und Wüthrich, 1979b). Die Resonanzidentifikation in den Fig. 4.1 - 4.3 zeigt, dass die Crosspeaks mit den C^α -Protonen bei 4.66 und 4.64 ppm, die zu zwei AMX-Spinsystemen gehören, aus experimentellen Gründen nicht gesehen werden können, weil sie bei $37^\circ C$ mit der Wasserlinie zusammenfallen und damit durch die Wassereinstrahlung gesättigt werden. Fig. 4.5 enthält alle erwarteten Crosspeaks und liefert daher ein charakteristisches Abbild der Polypeptidkette.

Fig. 4.5 zeigt ein Beispiel der verbesserten Auflösung, die man erreichen kann, wenn man 2D NMR-Methoden benützt anstelle von 1D NMR-Experimenten. Wegen der natürlicherweise breiten Linien und der schmalen Verteilung der $C^\alpha H$ und der NH chemischen Verschiebungen bleiben einige Ueberlappungen in den COSY- und NOESY-Spektren erhalten, welche manchmal die Analyse der Crosspeaks zwischen den $C^\alpha H$ und den Amidprotonen begrenzte. Deshalb und wegen der besseren spektralen Auflösung in der $C^\beta H$ -Region spielten d_3 -Verbindungen zwischen NH_{i+1} und $C^\beta H_i$ eine wichtige Rolle in den sequenziellen Zuordnungen (siehe Fig. 4.6 für einen

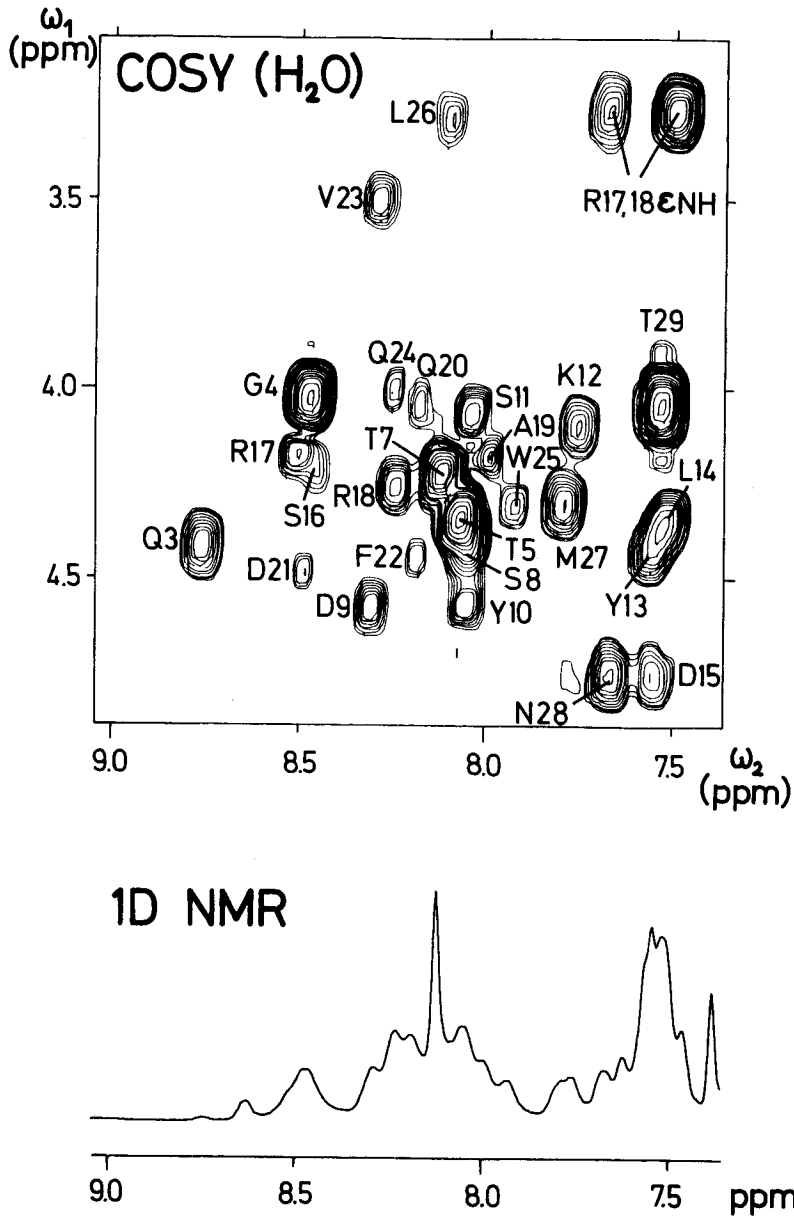


Fig. 4.5

Ausschnitt aus einem 360 MHz ^1H COSY-Spektrum von auf Micellen gebundenem Glucagon in 90% H_2O / 10% D_2O . Die Zuordnungen der $\text{C}^\alpha\text{H}_i\text{-NH}_i$ Cross-peaks für die Aminosäurereste 3 - 29 sind angegeben. Die Einstrahlung auf die H_2O -Linie führte zur Sättigung des C^αH von Phe 6, d.h. der Crosspeak $\text{C}^\alpha\text{H-NH}$ von Phe 6 fehlt. Zusätzlich sind die Crosspeaks zwischen den $\text{C}^\delta\text{H}_2$ und den Guanidiniumprotonen der zwei Argininreste angegeben. Zum Vergleich ist ein entsprechendes 1D Spektrum gezeigt, man beachtet auch die NH-Resonanz von Phe 6 bei 8.63 ppm.

Ueberblick der benützten Experimente), obwohl deren Zuverlässigkeit tiefer liegt als diejenige für die Verbindungen zwischen den Amidprotonen und den C^α-Protonen (Billeter et al., 1982). Um diesen praktisch wichtigen Aspekte zu illustrieren, sind im Folgenden alle drei Verbindungen mittels d₁, d₂ und d₃ für das Glucagon-Segment 18 - 29 aufgezeichnet (Fig. 4.8 - 4.11). Für die anderen Aminosäuren im auf Micellen gebundenem Glucagon ist nur eine Verbindung zwischen benachbarten Resten dokumentiert (Fig. 4.11 - 4.13).

Im COSY-Spektrum (Fig. 4.1 - 4.3) konnten wir alle Resonanzen von 23 einzelnen Spinsystemen identifizieren. Für Lys 12, Ala 19, Val 23 und Trp 25 bedeutete dies sogar die individuelle Zuordnung in der Aminosäuresequenz, weil Glucagon nur einen Rest von jedem dieser vier Typen enthält (Fig. 4.6). Diese vier Resten ergaben ideale Ausgangspunkte für die sequenzielle Resonanzzuordnung, die wir damit vom ersten Schritt an mit der Aminosäure-Sequenz überprüfen konnten.

4.3.3 Sequenzielle Zuordnungen mittels d₁-, d₂- und d₃-Verbindungen in Glucagon 18 - 29

Die sequenziellen Resonanzzuordnungen bestimmten wir aus einem NOESY- und einem COSY-Spektrum, die in der H₂O Lösung von auf Micellen gebundenem Glucagon (Kap. 4.2) bei 37°C gemessen wurden. Im NOESY-Spektrum (τ_m = 100 ms) (Fig. 4.7) benötigten wir nur die Region (ω₁ = 1.4 bis 9.0 ppm, ω₂ = 7.5 bis 9.0 ppm) für die sequenziellen Zuordnungen, so dass die Analyse nicht beeinträchtigt wurde durch die starken, vertikalen Störungen, die zwischen 1 und 5 ppm erscheinen und die von der Wassereinstrahlung und von den scharfen diagonalen Resonanzen der im deuterierten Lipid verbliebenen Protonen herrühren ("t₁-Noise"). In den folgenden Fig. 4.8 - 4.11 sind kleine Ausschnitte des NOESY-Spektrums gezeigt. Die chemischen Verschiebungen der zugeordneten Resonanzen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

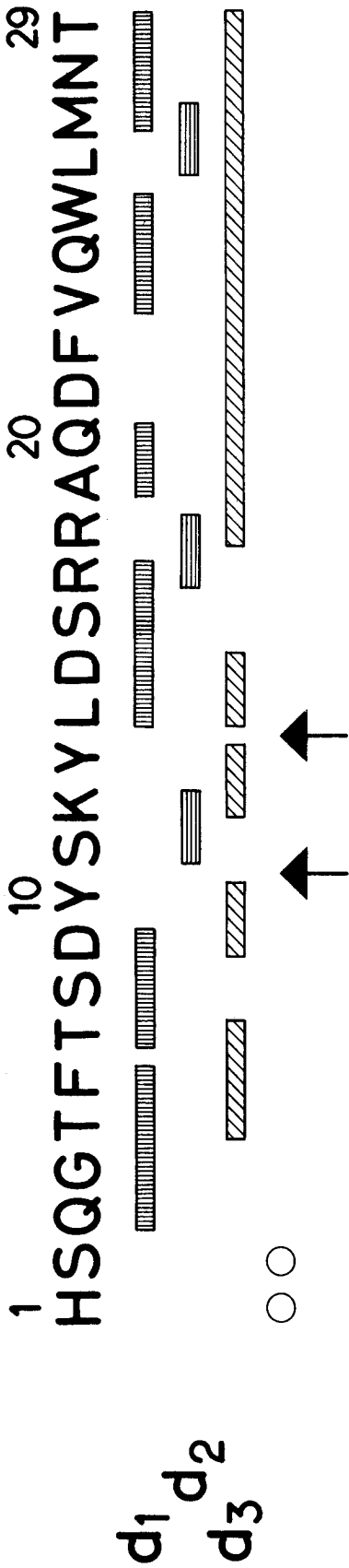
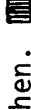

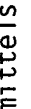


Fig. 4.6

Glucagonsequenz mit einer Zusammenfassung der Daten, auf denen die einzelnen Zuordnungen in dem auf Micellen gebundenen Polypeptid beruhen.  sequenzielle Zuordnung mittels d_1 (NOE von NH_{i+1} zu $C^{\alpha}H_i$);  sequenzielle Zuordnung mittels d_2 (NOE von NH_i zu NH_{i+1});  sequenzielle Zuordnung mittels d_3 (NOE von NH_{i+1} zu $C^{\beta}H_i$); \circ Zuordnung auf Grund der Identifikation des Spinsystems im COSY-Spektrum, die Amidprotonresonanz konnte nicht beobachtet werden. Die Pfeile geben Regionen an, wo alle Resonanzen zugeordnet wurden, die Verbindung zwischen benachbarten Aminosäureresten jedoch fehlt.

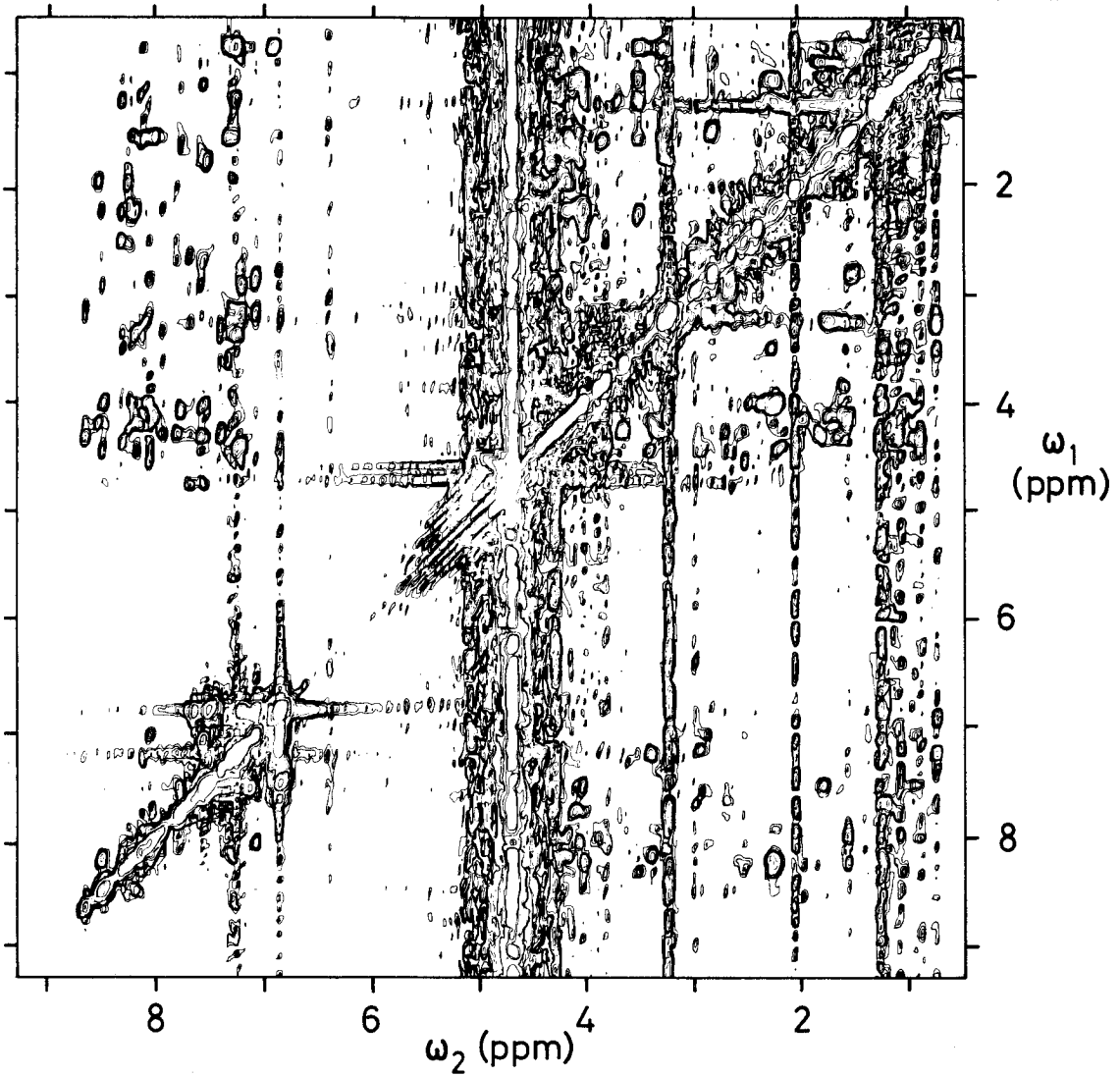


Fig. 4.7

360 MHz ^1H NOESY-Spektrum ($\tau_m = 100$ msec) von auf Micellen gebundenem Glucagon in 90% H_2O / 10% D_2O . Der τ_m -Wert wurde zufällig innerhalb ± 6 msec geändert (Macura et al., 1981). Die digitale Auflösung dieses Betragsspektrums beträgt 6.3 Hz/Punkt.

Für das Glucagonsegment 18 - 29 konnten wir eine durchgehende sequenzielle Resonanzzuordnung mittels d_3 -Verbindungen erhalten, wie dies in Fig. 4.6 angegeben ist. Fig. 4.8 zeigt diese Daten. Die sequenzielle Zuordnung beginnt in der unteren rechten Ecke bei der chemischen Verschiebung des Amidprotons von Thr 29. Eine senkrechte Linie durch diese Position geht nur durch das Zentrum einer Resonanz, die wir darum einem $C^\beta H$ von Asn 28 zuordneten (Billeter et al., 1982). Das Amidproton von Asn 28 identifizierten wir im D_2O bzw. H_2O COSY-Spektrum mittels J-Verbindungen im Fragment $C^\beta H_2 - C^\alpha H - NH$. Diese COSY-Verbindungen sind nicht gezeigt, an ihrer Stelle wurde der $NH_{29} - C^\beta H_{28}$ -Crosspeak im NOESY-Spektrum von Fig. 4.8 mit dem $C^\beta H_{28} - NH_{28}$ -Crosspeak verbunden. Diese Resonanz bedeutet eine Bestätigung der gemachten Zuordnung, sie muss aber nicht immer erscheinen. Eine vertikale Linie bei der chemischen Verschiebung des Amidprotons von Asn 28 führt wiederum nur durch das Zentrum einer Resonanz, die wir darum einem $C^\beta H$ von Met 27 zuordneten. Die horizontale Verbindung vom $NH_{28} - C^\beta H_{27}$ zum $C^\beta H_{27} - NH_{27}$ -Crosspeak basiert wieder auf der Identifizierung der chemischen Verschiebung des Amidprotons von Met 27 im D_2O bzw. H_2O COSY-Spektrum. Der nächste Schritt war nicht eindeutig, denn es liegen drei Crosspeaks auf der vertikalen Linie durch die Position der chemischen Verschiebung des Amidprotons von Met 27. Die richtige Zuordnung erhielten wir auf der Basis der Aminosäuresequenz und der identifizierten Seitenketten-Spinsysteme. Auf diese Art fortfahrend fanden wir die Zuordnungen von Thr 29 bis zu einem $C^\beta H$ von Arg 18.

Statistische Studien von Proteinkristallstrukturen zeigten, dass die Zuverlässigkeit der sequenziellen Zuordnung mittels d_3 bei etwa 75% liegt verglichen mit etwa 88% für d_1 oder d_2 und 92 - 99%, wenn zwei der Verbindungen gleichzeitig gefunden werden (Billeter et al., 1982). Darum suchten wir nach weiteren Verbindungen im Glucagonsegment 18 - 29. Durch die Resonanzzuordnungen in diesem Segment sind die chemischen Verschiebungen des Amid-, des C^α - und mindestens eines C^β -Protons von jedem Aminosäurerest bestimmt (Fig. 4.5 und 4.8). Aus diesen Daten lassen sich die genauen Positionen von Crosspeaks bestimmen, die von d_1 - und d_2 -Verbindungen herrühren. In den Fig. 4.9 - 4.11 sind die berechneten, sequen-

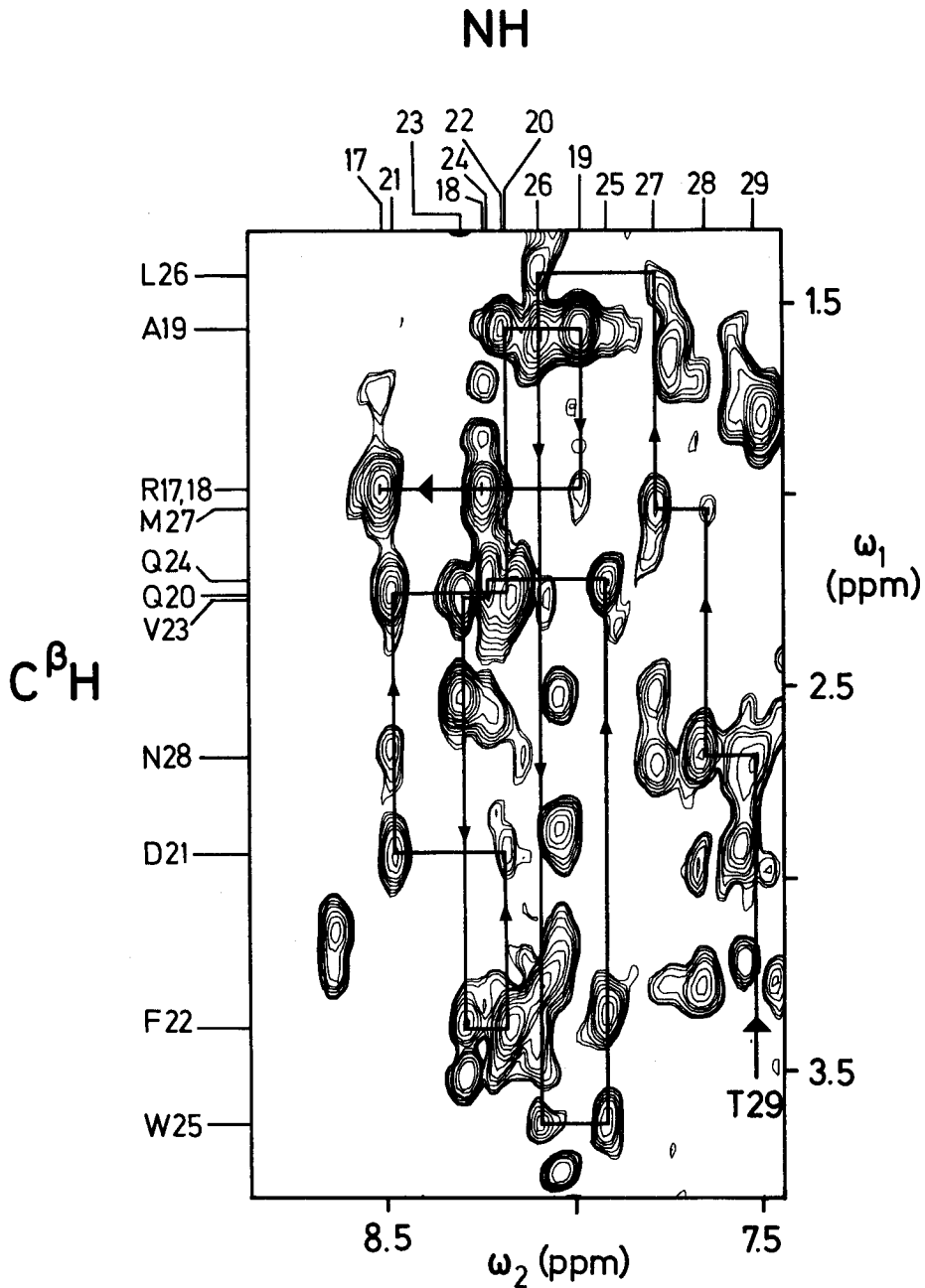


Fig. 4.8

Ausschnitt aus Fig. 4.7. Die ausgezogenen Linien mit den Pfeilen zeigen die sequenziellen Resonanzzuordnungen für das Polypeptidsegment 17 - 29, die mittels NOE zwischen Amidprotonen und den C β -Protonen des vorangehenden Aminosäurerestes erhalten wurden (d_3). Die Zahlen oben an der Figur geben die chemische Verschiebung der Amidprotonen an, während links jene der C β -Protonen stehen.

ziellen d_1 - und d_2 -Verbindungen in experimentelle Spektren eingezeichnet.

Die d_1 -Verbindungen zwischen NH_{i+1} und $\text{C}^\alpha\text{H}_i$ sind in einem kombinierten COSY-NOESY-Diagramm dargestellt (Wagner et al., 1981), das die NOE-Verbindung durch den Raum zwischen NH_{i+1} und $\text{C}^\alpha\text{H}_i$, als auch die J-Verbindung durch die Bindung zwischen $\text{C}^\alpha\text{H}_i$ und NH_i zeigt (Fig. 4.9). Eine Serie von sequenziellen Zuordnungen mittels d_1 ergibt dann ein Verbindungsmuster, das einer Spirale gleicht. In Fig. 4.9 wurden die spektralen Regionen, welche die C^αH -NH-Crosspeaks enthalten, so zusammengefügt, dass die Verbindungen im COSY-NOESY-Diagramm über eine virtuelle Diagonale laufen. Das Vorgehen ist dasselbe, wie wenn die ganzen Hälften der NOESY- und COSY-Spektren entlang der Diagonalen zusammengesetzt werden (Wagner et al., 1981). Der erste Schritt beginnt mit der COSY-Resonanz von Thr 29 (Fig. 4.9), von wo eine horizontale Linie zur virtuellen diagonalen Position des Amidprotons von Thr 29 läuft. Eine vertikale Linie führt weiter zur Position des NOESY-Crosspeaks mit dem C^αH von Asn 28, der vorausgesagt wurde auf Grund der NH und C^αH chemischen Verschiebungen, die von den gemachten Zuordnungen her bekannt sind (Fig. 4.8). Nun führt eine horizontale Linie weiter zur virtuellen, diagonalen Position des C^αH von Asn 28 und eine vertikale Linie zur COSY-Resonanz von Asn 28. Auf dieselbe Art kann man den d_1 -Verbindungen der Reste 29 - 23 in Fig. 4.9 und denen der Reste 23 - 17 in Fig. 4.10 folgen. Wenn man die vorausgesagten Crosspeak-Positionen mit dem wirklichen Spektrum vergleicht, findet man, dass das NOESY-Spektrum nur für die d_1 -Verbindungen der Reste 29 - 27, 25 - 23 und 20 - 19 eindeutige Zuordnungen zulässt. Die vorausgesagten Crosspeak-Positionen, welche die Reste 26 mit 25, 23 mit 22, 19 mit 18 und 18 mit 17 verbinden, fallen nicht mit einer Resonanz im Spektrum zusammen. Für die Verbindungen 27 mit 26, 22 mit 21 und 21 mit 20 konnten wir nicht eindeutig bestimmen, ob ein Crosspeak vorhanden ist oder nicht, weil sie in Gebiete mit Resonanzüberlappungen fallen.

Die d_2 -Verbindungen sind in Fig. 4.11 angegeben. Da d_2 symmetrisch ist

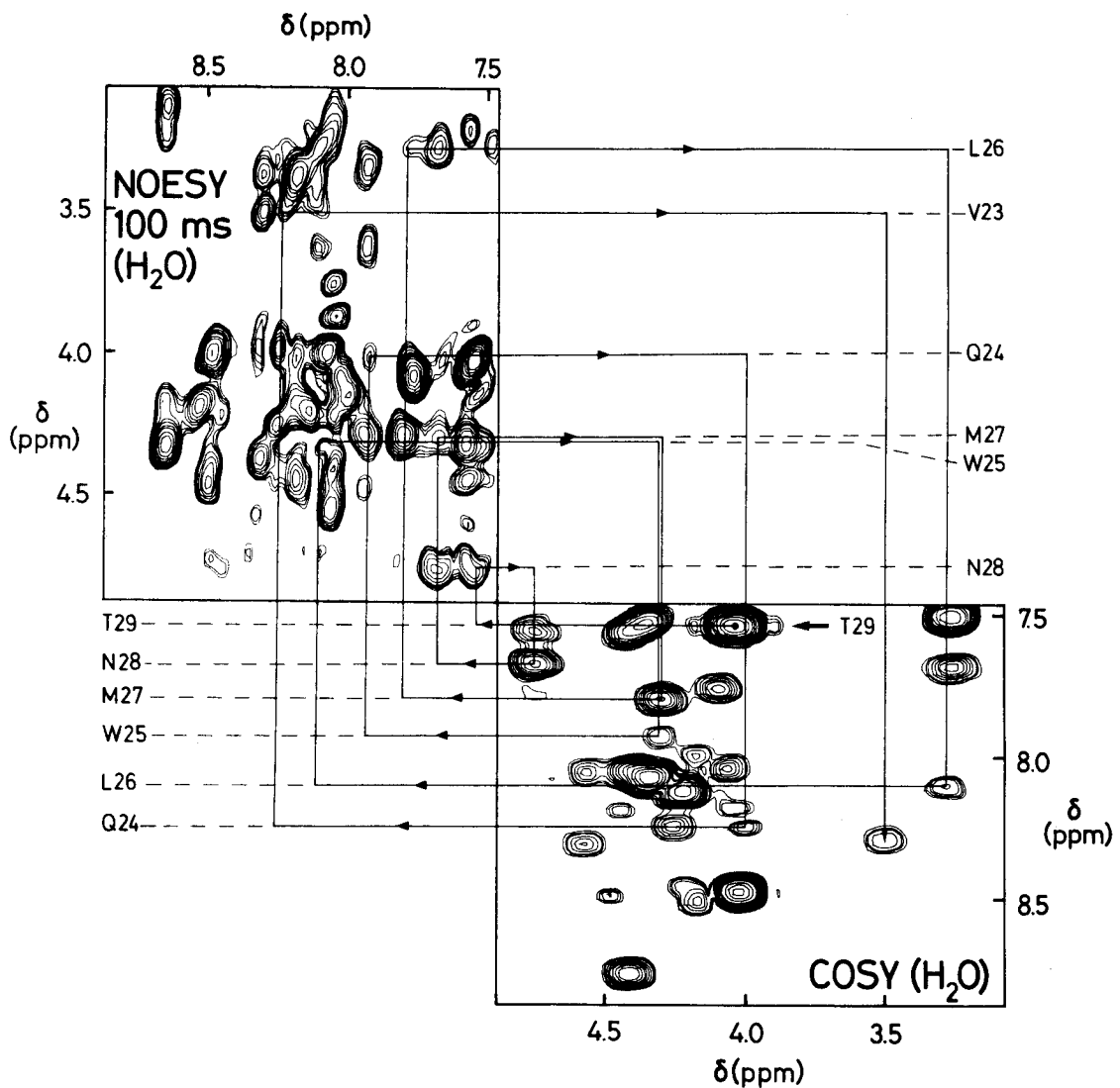


Fig. 4.9

COSY-NOESY-Diagramm zur Darstellung der sequenziellen Resonanzzuordnung mittels NOE zwischen Amidprotonen und den C^α -Protonen des vorangehenden Aminosäurerestes (d_1). Ein Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum von Fig. 4.7 ist mit dem entsprechenden Ausschnitt eines COSY-Spektrums kombiniert, das unter identischen Bedingungen aufgenommen wurde. Die d_1 -Verbindungen für das Polypeptidsegment 23 - 29 mit dem Startpunkt "+T29" sind angegeben.

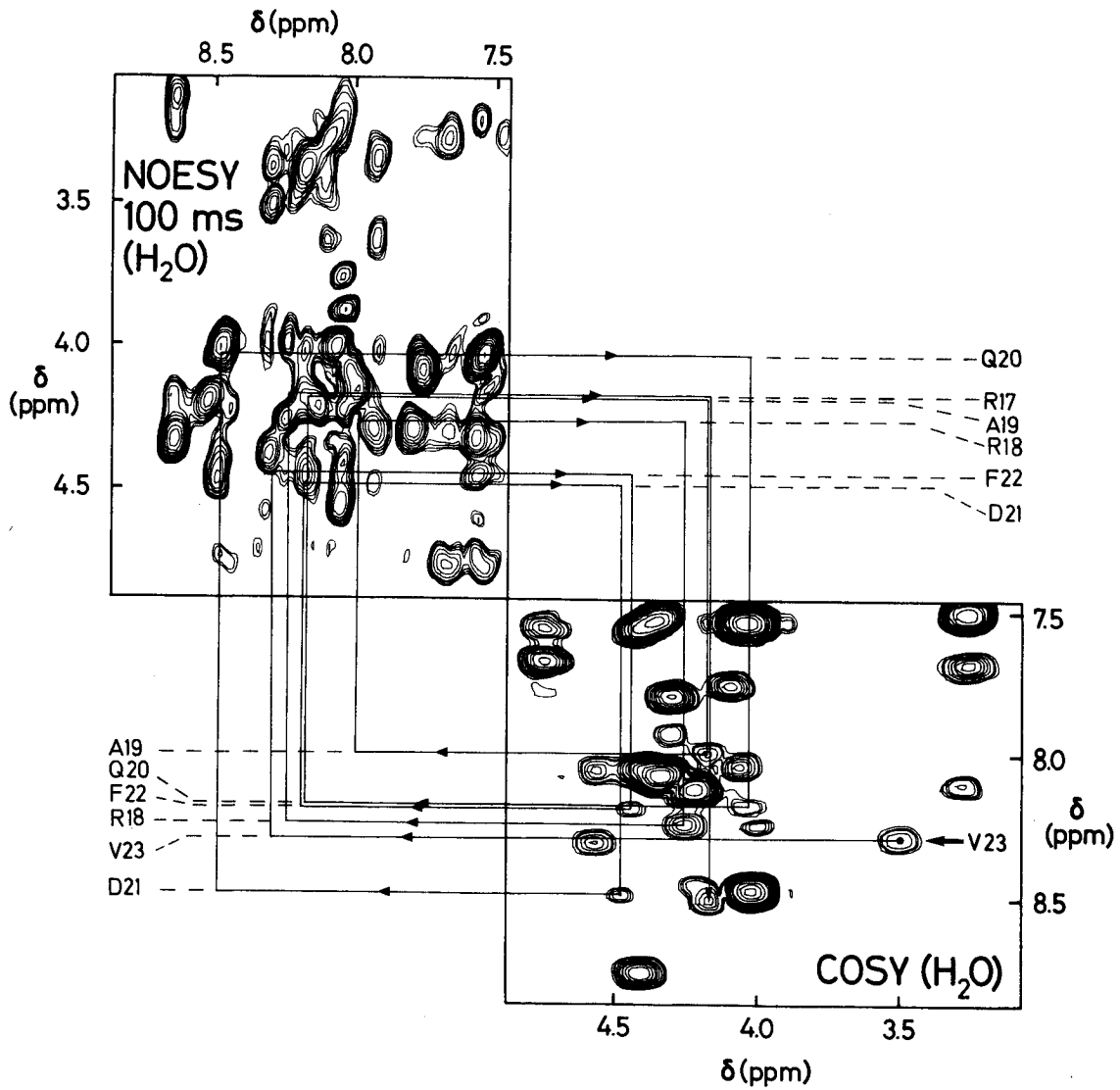


Fig. 4.10

COSY-NOESY-Diagramm zur Darstellung der sequenziellen Resonanzzuordnungen mittels NOE zwischen Amidprotonen und den C^α -Protonen des vorangehenden Aminosäurerestes (d_1). Die gleichen Spektren wie in Fig. 4.9 sind gezeigt. Die d_1 -Verbindungen für das Polypeptidsegment 17 - 23 mit dem Startpunkt " $\leftarrow V23$ " sind angegeben.

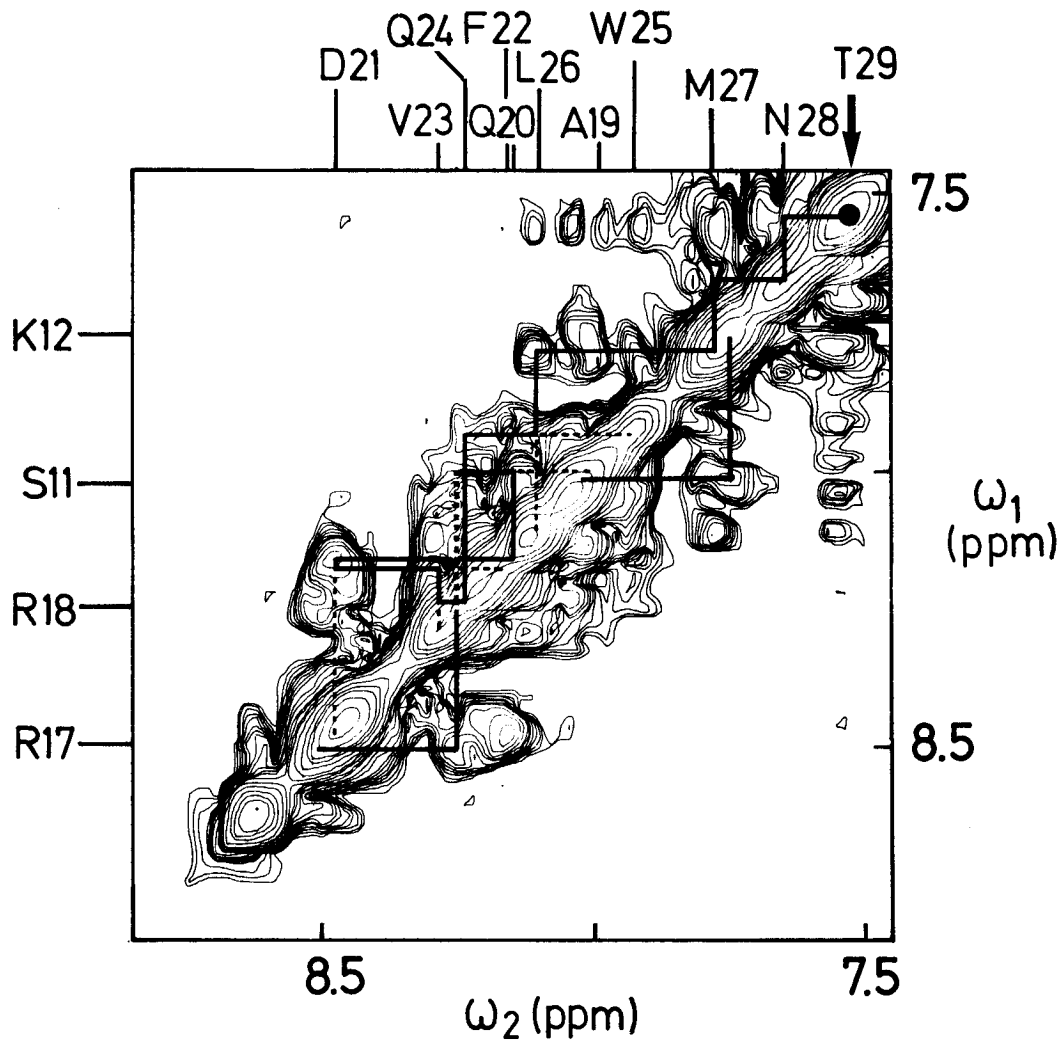


Fig. 4.11

Ausschnitt aus Fig. 4.7 (nach einer Symmetrisierung (Kap. 2.5)). Im oberen linken Dreieck sind die NOE's zwischen den Amidprotonen benachbarter Aminosäurereste (d_2) im Polypeptidsegment 18 - 29 eingezeichnet. Das untere rechte Dreieck zeigt die sequenziellen Zuordnungen für die Segmente 11 - 12 und 17 - 18.

bezüglich der Richtung der Polypeptidkette, kann ein nicht endständiger Aminosäurerest mit je einem NH-NH-Crosspeak mit dem vorhergehenden und dem nachfolgenden Rest in der Sequenz verbunden sein. Die Positionen für alle diese Crosspeaks, die von den Zuordnungen in Fig. 4.8 bekannt sind, wurden in Fig. 4.11 verbunden. Die ersten drei Schritte von Thr 29 bis Leu 26 sind einfach zu verfolgen, weil sie jeweils zu einer Position bei tieferem Feld führen. Von Leu 26 führt die Verbindung zu Trp 25 zu höherem Feld. In diesem etwas komplizierteren Fall sind die Verbindungen zu den diagonalen Resonanzen mit gestrichelten Linien angegeben. Fährt man weiter, enden die Verbindungen bei Arg 18. Vergleicht man die vorausgesagten mit den experimentellen Crosspeak-Positionen, findet man im Prinzip volle Übereinstimmung, denn keine der vorausgesagten Positionen fällt in eine leere Region des Spektrums. Wegen der kleinen Unterschieden zwischen den chemischen Verschiebungen der Amidprotonen der verschiedenen Reste liegen viele Crosspeak-Positionen so nah an der Diagonalen, dass kaum entschieden werden kann, ob sie wirklich vorhanden sind. Im Gesamten scheint es, als ob in diesem Spektrum im Glucagonsegment 18 - 29 nur die d_2 -Verbindung zwischen Met 27 und Leu 26 zweifelsfrei hätte gefunden werden können.

Der Vergleich der d_1 -, d_2 und d_3 -Verbindungen im Segment 18 - 29 ergänzt die theoretischen und statistischen Erwägungen über die Zuverlässigkeit der sequenziellen Zuordnungen auf Grund dieser Verbindungen (Billeter et al., 1982). Die spektralen Eigenschaften des untersuchten Proteins können die Benützung einer zuverlässigen Verbindung stark einschränken. Dies gilt im Glucagonpektrum beispielsweise für den NH-NH-NOE (d_2). Damit kann die theoretisch nicht sehr zuverlässige d_3 -Verbindung in vielen praktischen Fällen ein wertvoller Parameter werden.

4.3.4 Individuelle Zuordnungen im Glucagonsegment 1 - 18

In dieser Region erhielten wir den grössten Teil der sequenziellen Zuordnungen auf Grund von d_1 -Verbindungen; Fig. 4.6 zeigt eine Zusammenfassung des Vorgehens. Die Ergebnisse der Resonanzzuordnungen sind in den Fig. 4.11 - 4.13 in ähnlichen Diagrammen dargestellt, wie sie für Glucagon 18 - 29 gebraucht wurden. Anknüpfend an dieses schon zugeordnete Segment, fanden wir zuerst den NH-NH-NOE zwischen Arg 18 und Arg 17 (Fig. 4.11). Dann folgten d_1 -Verbindungen von Arg 17 bis Leu 14, die auch die Zweideutigkeit in der Zuordnung von Arg 17 und Arg 18 lösten (siehe Fig. 4.8). Das Tripeptid Tyr 13 - Lys 12 - Ser 11 ordneten wir mittels einer d_3 - (Fig. 4.13) und einer d_2 -Verbindung zu (Fig. 4.11). Eine d_3 -Verbindung von Tyr 10 zu Asp 9 (Fig. 4.13) wird gefolgt von d_1 -Verbindungen von Asp 9 bis Tyr 7 und von Phe 6 bis Gln 3 (Fig. 4.12) mit einer d_3 -Verbindung zwischen dem Aminosäurerest 7 und 6 (Fig. 4.13). Die zwei N-terminalen Reste ordneten wir schliesslich auf Grund der Identifikation der Spinsysteme (Fig. 4.3) und dem Vergleich mit den chemischen Verschiebungen dieser Reste im Random-Coil-Spektrum zu (Bundi und Wüthrich, 1979a). Die Imidazolring-Protonresonanzen von His 1 wurden unabhängig auf Grund ihrer chemischen Verschiebung gefunden (Bösch et al., 1980) (Tabelle 4.2).

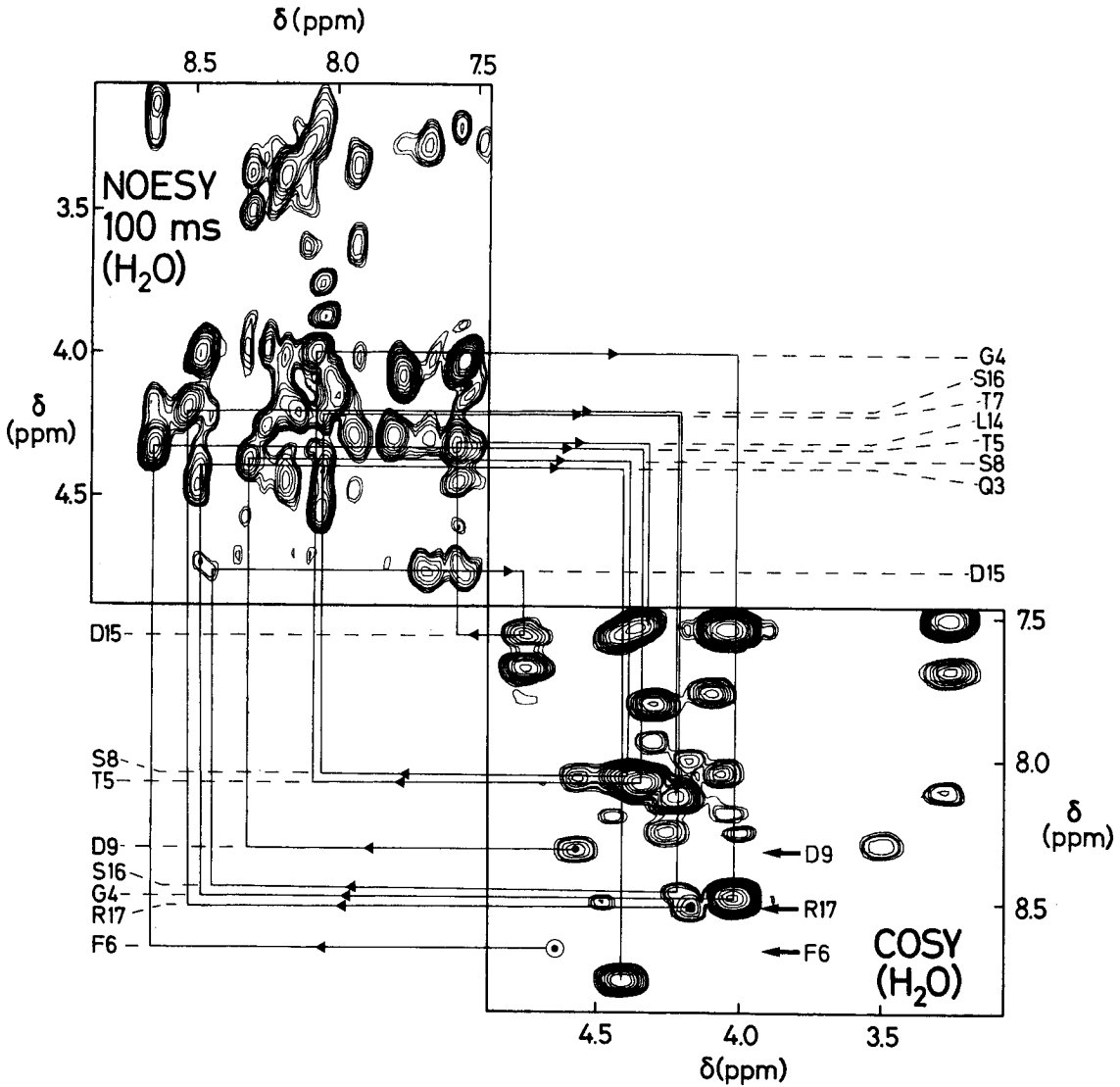


Fig. 4.12

COSY-NOESY-Diagramm zur Darstellung der sequenziellen Resonanzzuordnungen mittels NOE zwischen Amidprotonen und den C^α -Protonen des vorangehenden Aminosäurerestes (d_1). Die gleichen Spektren wie in Fig. 4.9 sind gezeigt. Die d_1 -Verbindungen für die Polypeptidsegmente 3 - 6, 7 - 9 und 14 - 17 sind angegeben. Die Einstrahlung auf die Wasserresonanz führte zur Sättigung des $C^\alpha H$ von Phe 6, darum kann der $C^\alpha H$ -NH Crosspeak nicht beobachtet werden. Seine Position (o) wurde aus den Daten in Fig. 4.2 und Fig. 4.13 berechnet.

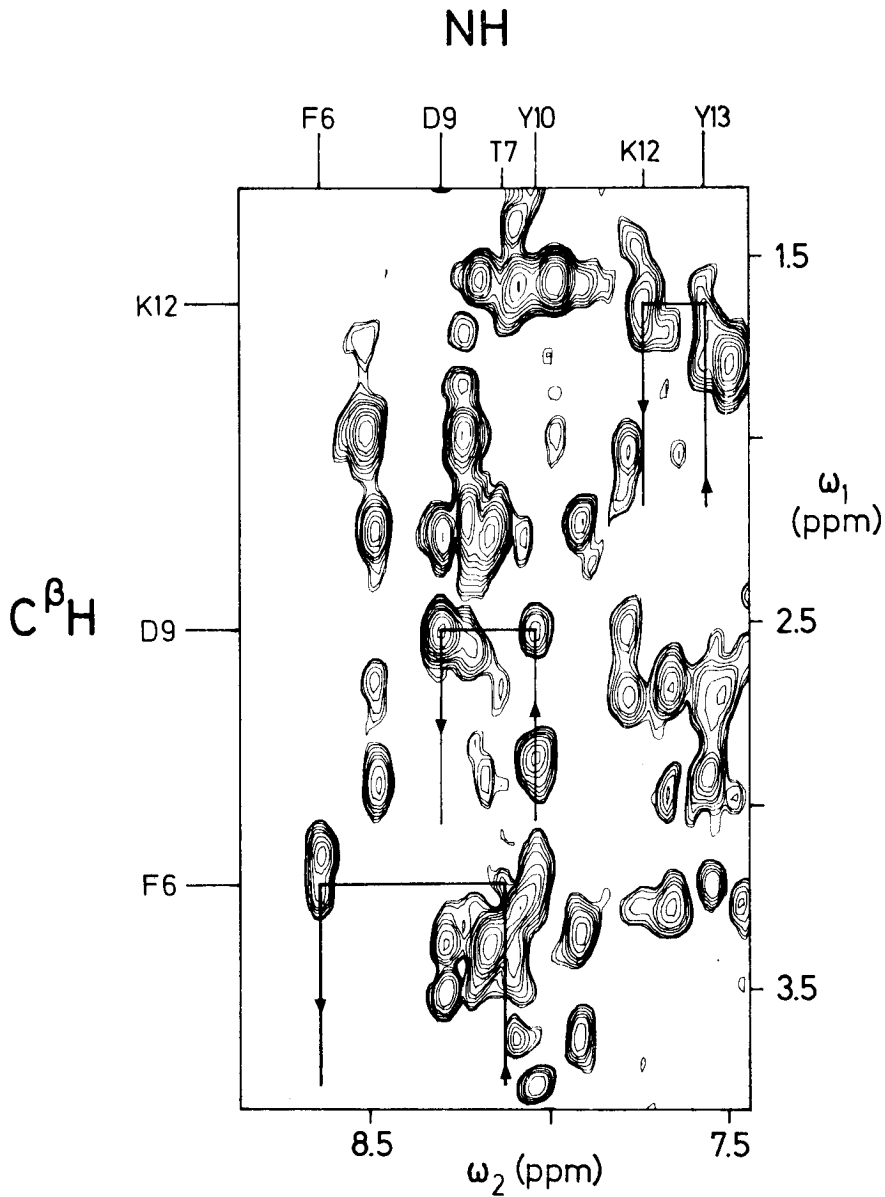


Fig. 4.13

Ausschnitt aus Fig. 4.7. Angegeben sind die sequenziellen Resonanzzuordnungen in den Polypeptidsegmenten 6 - 7, 9 - 10 und 12 - 13, die mittels NOE zwischen Amidprotonen und den C^β-Protonen des vorangehenden Aminosäurerestes (d₃) erhalten wurden. Oben an der Figur sind die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen, links diejenigen der C^β-Protonen angegeben.

Tabelle 4.2

Chemische Verschiebungen δ^{\dagger} der zugeordneten ^1H NMR-Resonanzen von auf volldeuterte Dodecylphosphocholin-Micellen gebundenem Glucagon, pH = 6.0, T = 37°C.

Aminosäure- rest	δ (± 0.01 ppm) †			
	NH	C $^{\alpha}$ H	C $^{\beta}$ H	sonstige
His 1 $^{\text{H}}$	n.o.	4.66	3.07, 3.21	C $^{\delta}$ H 7.22 C $^{\epsilon}$ H 8.11
Ser 2 $^{\text{H}}$	n.o.	4.51	3.86, 3.86	
Gln 3 $^{\text{S}}$	8.75	4.41	2.01, 2.17	C $^{\gamma}$ H $_2$ 2.38, 2.38
Gly 4	8.47	4.02 4.02		
Thr 5	8.06	4.34	4.19	C $^{\gamma}$ H $_3$ 1.07
Phe 6	8.63	4.64	3.13, 3.22	Ring 7.27
Thr 7	8.11	4.23	4.20	C $^{\gamma}$ H $_3$ 1.17
Ser 8	8.04	4.37	3.78 3.86	
Asp 9	8.30	4.57	2.52 2.52	
Tyr 10	8.05	4.56	2.85 3.18	C $^{\delta}$ H 7.06, 7.06 C $^{\epsilon}$ H 6.82, 6.82
Ser 11	8.03	4.06	3.96, 3.96	
Lys 12	7.75	4.09	1.13, 1.59	C $^{\gamma}$ H $_2$ 1.10, 1.52 C $^{\delta}$ H $_2$ 1.50, 1.50 C $^{\epsilon}$ H $_2$ 2.80, 2.80
Tyr 13	7.55	4.42	2.89, 3.23	C $^{\delta}$ H 7.19, 7.19 C $^{\epsilon}$ H 6.84, 6.84

Tabelle 4.2 (Fortsetzung)

Aminosäure- rest	δ (± 0.01 ppm) [†]			
	NH	C ^{α} H	C ^{β} H	sonstige
Leu 14	7.52	4.33	1.61, 1.81	C ^{γ} H 1.77 C ^{δ} H ₃ 0.88, 0.96
Asp 15	7.55	4.75	2.63, 2.76	
Ser 16	8.45	4.23	3.63, 3.63	
Arg 17*	8.50	4.17	1.96, 1.96	C ^{γ} H ₂ 1.73, 1.73 C ^{δ} H ₂ 3.25, 3.25
Arg 18*	8.24	4.25	1.86, 1.94	C ^{γ} H ₂ 1.71, 1.71 C ^{δ} H ₂ 3.27, 3.27
Ala 19	7.99	4.17	1.56	
Gln 20 ^{sII}	8.17	4.02	2.25	
Asp 21	8.48	4.47	2.62, 2.92	
Phe 22	8.18	4.44	3.38, 3.38	Ring 7.23
Val 23	8.28	3.49	2.26	C ^{γ} H ₃ 1.02, 1.21
Gln 24 ^{sII}	8.24	4.00	2.22	
Trp 25	7.92	4.30	3.33, 3.62	C ^{δ} H 7.37 N ^{ϵ} H 10.53 C ^{ϵ} H 7.33 C ^{ζ^2} H 7.54 C ^{ζ^3} H 6.89 C ^{η} H 7.11
Leu 26	8.09	3.27	1.41, 1.57	C ^{γ} H 1.56 C ^{δ} H ₃ 0.72, 0.72
Met 27	7.79	4.30	2.03, 2.13	C ^{γ} H ₂ 2.53, 2.70 C ^{ϵ} H ₃ 2.04

Tabelle 4.2 (Fortsetzung)

Aminosäure- rest	δ (± 0.01 ppm) [†]			
	NH	C ^{α} H	C ^{β} H	sonstige
Asn 28 [§]	7.66	4.74	2.68, 2.97	
Thr 29	7.53	4.04	4.11	C ^{γ} H ₃ 1.07

[†]Die chemischen Verschiebungen δ sind relativ zu externem Natrium-3-trimethylsilyl-(2,2,3,3-D₄)-propionat (TSP) angegeben. Die C ^{ϵ} H₃-Resonanz von Met 27 bei 2.04 ppm wurde als interne Referenz benützt.

[¶]Nach der sequenziellen Resonanzzuordnung für die Aminosäurereste 3 - 29 ordneten wir die übriggebliebenen Resonanzen His 1 und Ser 2 zu und zwar unter Berücksichtigung der entsprechenden Random-Coil-Werte (Bundi und Wüthrich, 1979a). Die Amidprotonen für diese zwei Reste wurden nicht beobachtet (n.o.).

[§]Im H₂O NOESY-Spektrum wurden drei Crosspeaks bei ($\omega_1 = 6.83$ ppm, $\omega_2 = 7.63$ ppm), (6.82 ppm, 7.50 ppm) und (6.77 ppm, 7.45 ppm) beobachtet, die zu den Amidgruppen der Seitenketten von Gln 3, Gln 20, Gln 24 und Asn 28 gehören müssen. Bis jetzt konnten wir sie nicht individuell zuordnen.

^{*}Zwei Crosspeaks zwischen Arg-C ^{δ} H₂ und -N ^{ϵ} H wurden bei ($\omega_1 = 3.26$ ppm, $\omega_2 = 7.67$ ppm) und (3.26 ppm, 7.49 ppm) im COSY-Spektrum beobachtet (Fig. 4.5). Weil die C ^{γ} H₂ und C ^{δ} H₂ für die zwei Arg-Reste dieselbe chemische Verschiebung haben, konnten die Resonanzen der Guanidiniumgruppen nicht individuell zugeordnet werden.

^{¶¶}Zwei Crosspeaks bei ($\omega_1 = 2.44$ ppm, $\omega_2 = 2.59$ ppm) und (2.46 ppm, 2.52 ppm) im D₂O COSY-Spektrum müssen von den C ^{γ} -Protonen von Gln 20 und Gln 24 herrühren. Für diese zwei Reste konnten die Verbindungen zwischen den zwei C ^{β} -Protonen und zwischen den C ^{β} -Protonen und C ^{γ} -Protonen nicht gefunden werden.

4.4 Diskussion der Zuordnungen im Glucagon-Spektrum

Das ^1H NMR-Spektrum des Polypeptid-Hormons Glucagon, das auf volldeuterierte Dodecylphosphocholin-Micellen gebunden ist, wurde beinahe vollständig zugeordnet (Tabelle 4.2). Die Resonanzen aller stabilen Protonen wurden gefunden und zugeordnet, wenn man von den C^γ -Protonen von Gln 20 und Gln 24 absieht. Diese zwei Reste besitzen fast identische C^αH und C^βH chemische Verschiebungen, was der Hauptgrund war für das Misslingen der $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ -Zuordnungen. Unter den labilen Protonen beobachteten wir diejenigen der zwei Arginin-Seitenketten (Fig. 4.5), konnten sie jedoch nicht einzeln zuordnen, weil die $\text{C}^\delta\text{H}_2$ -Resonanzen überlappen. Drei NH-NH NOE-Crosspeaks identifizierten wir als Seitenketten-Amidgruppen (Tabelle 4.2). Bis jetzt war es nicht möglich, diese Amidgruppen auf der Basis von NOE-Verbindungen mit den C^βH_2 - oder $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ -Gruppen in Asn bzw. Gln (Billeter et al., 1982) eindeutig zuzuordnen. Die labilen Rückgrat-Protonen von His 1 und Ser 2 und die labilen Seitenketten-Protonen von His 1, Lys 12 und von allen Serin- und Threonin-Resten wurden nicht beobachtet, wahrscheinlich tauschen sie zu schnell mit dem Lösungsmittel aus und lassen sich daher nicht als getrennte Linien auflösen (Bundi und Wüthrich, 1979a,b; Wüthrich, 1976).

Die Resonanzzuordnungen bilden die Grundlage für jede weitere Arbeit mit NMR-Spektren und können beispielsweise zur Bestimmung der räumlichen Struktur von Proteinen führen, die nur auf NMR-Daten beruhen. Mit NOE-Experimenten lassen sich intramolekulare Distanzeinschränkungen finden, die den Konformationsraum der Polypeptidkette einengen und die mit Hilfe eines Distanz-Geometrie-Algorithmus' (Braun et al., 1981) die Berechnung einer dreidimensionalen Struktur ermöglichen. Für auf Micellen gebundenes Glucagon benützten Braun et al. (1981) dieses Vorgehen, um die Konformation des Segmentes 19 - 27 zu bestimmen. Es standen jedoch nur wenige Distanzeinschränkungen zur Verfügung, weil die meisten Resonanzen im Spektrum nicht zugeordnet waren. Die neuen Zuordnungen, die soeben beschrieben wurden, bieten die Basis für eine

viel genauere Charakterisierung der Polypeptid-Konformation. Für eine neue Strukturbestimmung können im wesentlichen alle früher in D_2O Lösungen beobachteten NOE's (Bösch et al., 1981) und zusätzlich alle die NOE's mit den Rückgrat-Amidprotonen 3 - 29 verwendet werden, um Paare von räumlich nahen Protonen zu finden.

5. UNTERSUCHUNG DER DREIDIMENSIONALEN STRUKTUR VON AUF MICELLEN GEBUNDENEM GLUCAGON MITTELS 2D NOE-MESSUNGEN

5.1 Dreidimensionale Strukturbestimmung mittels NMR-Experimenten

5.1.1 Grundlagen der Strukturbestimmung aus NMR-Daten

Die räumliche Struktur eines Polypeptids oder Proteins stellt den Ausgangspunkt dar zum tieferen Verständnis seiner Funktion. Die Röntgenstrukturanalyse erlaubt eine detaillierte Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen in Kristallen (Blundell und Johnson, 1976). Dagegen fehlt eine komplementäre Methode, die entsprechende, umfassende Daten in Lösung und anderen nicht-kristallinen Umgebungen liefert. Mit der magnetischen Kernresonanz-Spektroskopie lassen sich im Prinzip die nötigen Daten erhalten. Die Anwendung von ^1H NMR auf Strukturstudien war bis jetzt jedoch beschränkt, weil Methoden fehlten, welche eine allgemein anwendbare und zuverlässige Resonanzzuordnung in Spektren von Polypeptidketten erlauben. Mit der in Kap. 4 beschriebenen, sequenziellen Resonanzzuordnung ist nun eine solche Methode verfügbar. Damit ist der Weg geebnet für systematische Strukturanalysen mit NMR-Experimenten. Schon in Kap. 1.4 wurde beschrieben, dass vor allem zwei NMR-Messungen Daten ergeben, die sich direkt mit der dreidimensionalen Struktur eines Moleküls verknüpfen lassen: die Messung der vicinalen Spin-Spin Kopplungskonstanten ^3J und NOE-Messungen. Da möglichst viele Kopplungen und NOE's bestimmt werden müssen, bieten sich 2D NMR-Messungen an: 2DJ-Spektroskopie (Kap. 2.2) und 2D NOE-Spektroskopie (Kap. 2.4).

Aus Proton-Proton-Kopplungskonstanten lassen sich im allgemeinen für jede Aminosäure zwei Dihedralwinkel bestimmen. Der eine Winkel (ϕ) beschreibt die Drehung um die N-C $^{\alpha}$ -Bindung und der andere (χ) charakterisiert die Stellung der Seitenkette (Fig. 1.1). Zur Strukturbestimmung ist zusätzlich der Winkel ψ nötig, der die Drehung um die C $^{\alpha}$ -C'-Bindung bestimmt. Den Winkel ψ erhält man nicht aus Proton-Proton-Kopplungskonstanten. Diese Kopplungskonstanten genügen darum nicht zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Polypeptids. Sie liefern aber wertvolle Information, die zusammen mit NOE-Messungen zur Bestimmung der Konformation verwendet werden kann.

NOE-Messungen ergeben einen vollständigeren und direkteren Zusammenhang mit der dreidimensionalen Struktur eines Moleküls als alle anderen ^1H NMR-Parameter. In einem starren Molekül, das sich isotrop bewegt, lassen sich die 2D NOE-Messungen für kurze τ_m -Werte direkt mit der inversen sechsten Potenz des interatomaren Abstandes zweier Protonen verknüpfen (Kap. 1.3). Zu diesem Zweck muss man die NOE-Intensität nur an einer bekannten Distanz eichen. Ein Protein darf jedoch nicht als starrer Körper behandelt werden. Die intramolekularen Bewegungen verursachen zeitliche Änderungen in der Orientierung und in der Länge der interatomaren Vektoren, was die gemessene NOE-Intensität beeinflusst (Kap. 5.1.2).

Ein Protein enthält hunderte von Protonen, welche die Grundlage für eine effektive Spindiffusion (Kap. 1.3.2) bilden. Durch die Wahl kurzer Mischzeiten τ_m kann man den Einfluss der Spindiffusion wesentlich reduzieren. Für die NOE-Messungen bedeutet dies jedoch einen Verlust an Sensitivität, weil die NOE-Intensitäten noch klein sind (Kap. 1.3). Zur Verbesserung des Signal-zu-Rauschen Verhältnisses muss man daher länger messen als für lange τ_m -Werte. Dies bedeutet in der Praxis, dass man einen Kompromiss finden muss, der die Spindiffusion möglichst reduziert und trotzdem eine genügende Sensitivität garantiert.

5.1.2 Der Einfluss der Flexibilität auf NOE-Messungen

Der grösste NOE-Effekt in einem starren Molekül wird zwischen zwei Methylenprotonen beobachtet. Der Abstand dieser zwei Protonen, R_0 , beträgt 1.75 \AA und ist damit kleiner als der van der Waals-Abstand zweier Protonen. Die Figur 5.1 zeigt die $1/R^6$ -Abhängigkeit des "Crosscorrelations"-Termes $\sigma(R_0)$ zweier Protonen (Kap. 1.3) mit dem Abstand R . In der Praxis bestimmt die Sensitivität des NOESY-Spektrums, welche Werte für $\sigma(R)$ noch gesehen werden können. Es erscheint unwahrscheinlich, dass in experimentellen Spektren Werte von $\sigma(R)$ beobachtet werden, die kleiner als 5% von $\sigma(R_0)$ sind (Braun et al., 1981). Dies bedeutet, dass in starren Makromolekülen ein NOE zwischen zwei Protonen als eine Distanz von 3 \AA oder weniger interpretiert werden darf (Fig. 5.1).

Bei der Interpretation von NOE-Messungen von Proteinen muss die Flexibilität der Struktur berücksichtigt werden. Braun et al. (1981) schätzten den NOE für zwei Protonen ab, deren Abstand zwischen einer minimalen Distanz r_m und einer maximalen Distanz R_m einheitlich ändert. Mit diesem Modell berechneten Braun et al. (1981) eine obere Grenze für die "Crossrelaxation" $\sigma^f(r_m, R_m)$ in Einheit von $\sigma(R_0)$

$$\frac{\sigma^f(r_m, R_m)}{\sigma(R_0)} \leq \frac{R_0^6}{5(R_m - r_m)} \left(\frac{1}{r_m^5} - \frac{1}{R_m^5} \right) \quad (5.1)$$

Diese Funktion ist in der Figur 5.1 für den van der Waals-Abstand $r_m = 2 \text{ \AA}$ in Funktion der Distanz $R_m (=R \text{ in der Fig. 5.1})$ angegeben. Das Gleichheitszeichen in Gleichung (5.1) gilt nur, wenn die intramolekularen Bewegungen Frequenzen aufweisen, die kleiner sind als die inverse Rotationskorrelationszeit des ganzen Moleküls.

Die Funktion $\sigma^f(r_m = 2 \text{ \AA}, R_m)$ ergibt den grösstmöglichen NOE in dem angenommenen Modell, denn $r_m = 2 \text{ \AA}$ ist der kürzeste Abstand von zwei ungebundenen Protonen. Unter der Annahme, dass 5% von $\sigma(R_0)$ beobachtbar sind,

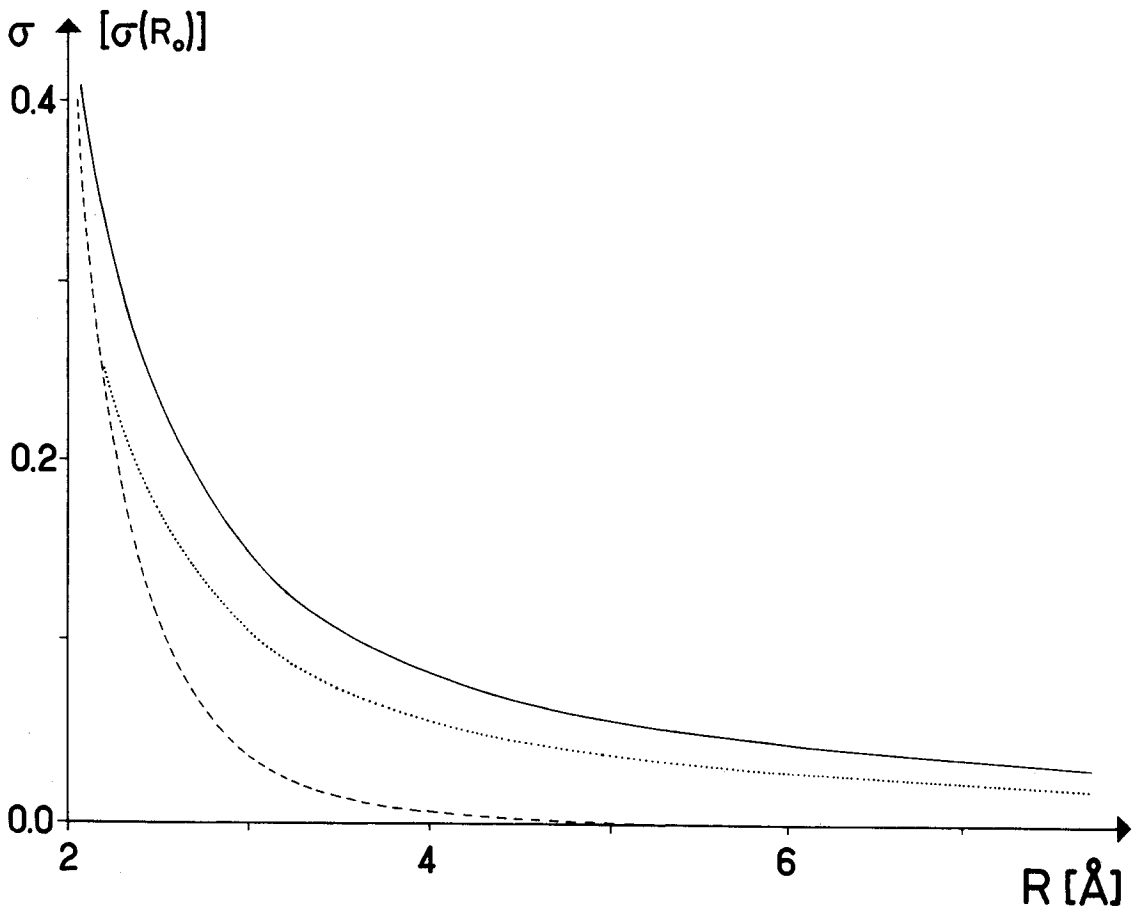


Fig. 5.1

Die Abbildung zeigt die Grösse des "Crossrelaxations"-Termes σ für zwei Protonen, deren Abstand zwischen einer minimalen Distanz r_m und einer maximalen Distanz R einheitlich ändert; σ ist in Funktion der oberen Grenze R dargestellt. Die untere Grenze ist fest, sie beträgt 2 \AA für die ausgezogene Kurve und 2.2 \AA für die punktierte Kurve. Die gestrichelte Linie gibt die $1/R^6$ -Abhängigkeit an, die für eine starre Struktur gilt (Kap. 1.3). Für die Ordinatenachse ist $\sigma(R_0)$ als Einheit gewählt (siehe Text).

ergibt sich für R_m ein Wert von rund 5 Å. Dies bedeutet, dass experimentelle NOE's zwischen zwei Protonen auf eine interatomare Distanz von 5 Å oder weniger hindeuten. Der Vergleich der Kurven in der Figur 5.1 zeigt, dass die Vernachlässigung der intramolekularen Bewegungen eine zu kleine Abschätzung der interatomaren Distanzen ergeben kann. Die Vergrößerung der unteren Grenze r_m in der Funktion $\sigma^f(r_m, R_m)$ reduziert die beobachtbare, obere Grenze R_m sehr stark (Gleichung (5.1)). Der Wert $r_m = 2.4$ Å ergibt beispielsweise $R_m = 3.7$ Å für eine Ordinate von $0.05 \times \sigma(R_0)$. Die punktierte Linie in der Figur 5.1 gilt für $\sigma^f(r_m = 2.2$ Å, $R_m)$ und verdeutlicht den starken Einfluss von r_m .

Der Abstand von zwei ungebundenen Protonen beträgt mindestens 2 Å. Wählt man $r_m = 2$ Å in der Gleichung (5.1) führt dies zu sehr konservativen Werten für die experimentell bestimmte obere Grenze R_m . Studien über mögliche Werte von r_m in Proteinen sind nicht verfügbar. Aus der Arbeit von Billeter et al. (1982) kann man jedoch entnehmen, dass sich die r_m -Werte für verschiedene Protonenpaare in Proteinen unterscheiden können. Aus den dort angegebenen Statistiken lässt sich beispielsweise entnehmen, dass die minimale Distanz zwischen zwei Amidprotonen ohne weiteres 2 Å betragen kann, auch wenn die zugehörigen Aminosäuren in der Sequenz nicht benachbart sind. Dagegen liegen die Distanzen zwischen Amid- und C^α -Proton praktisch nie unter 2.4 Å, wenn die Aminosäuren in der Primärstruktur nicht aufeinanderfolgen.

5.2 Abschätzungen von Proton-Proton-Distanzen in auf Micellen gebundenem Glucagon mittels 2D NOE-Messungen

5.2.1 Beschreibung der durchgeführten Experimente

Zum Studium der Konformation von auf volldeuterierte Micellen gebundenem Glucagon, benützten wir NOESY-Spektren, die wir mit den in Kap. 4.2 beschriebenen Glucagon-Lösungen in H_2O und D_2O gemessen haben. Für die Experimente verwendeten wir ein 500 MHz Bruker WM 500 Spektrometer, das eine bessere Sensitivität aufweist als unser 360 MHz Instrument und das mit einem Disksystem mit grosser Kapazität ausgerüstet ist. Dies ermöglichte es die Datenmatrixgrösse von 256×1024 Datenpunkten bei 360 MHz (Kap. 4.2) auf 400×2048 Punkte zu vergrössern und so die digitale Auflösung zu verbessern. Die 400 verschiedenen t_1 -Werte variierten von 0 bis 50 ms. Um die einzelnen freien Induktionszerfälle (FID) zu messen, benützten wir eine Zweikanalmessung mit der Trägerfrequenz am Tieffeldende des Spektrums (Kap. 2.5.1) und mit dem in Kap. 2.4 beschriebenen 16-Phasenzklus. Die H_2O Resonanz unterdrückten wir, wie es in Kap. 4.2 beschrieben ist. In den verschiedenen Experimenten summierten wir für jeden t_1 -Wert 128 einzelne FID, was einer totalen Messzeit von rund 22 Stunden entsprach.

Zur Untersuchung der dreidimensionalen Struktur benützten wir sechs Spektren: ein NOESY-Spektrum mit $\tau_m = 200$ ms in D_2O und fünf NOESY-Spektren mit verschiedenen, kurzen τ_m -Werten in H_2O . Für die fünf τ_m -Werte wählten wir 30 ms, 50 ms, 80 ms, 130 ms und 200 ms. Diese fünf Spektren haben wir nacheinander unter identischen Bedingungen gemessen. Die Lösung nahmen wir während der ganzen Messzeit (5 Tage) nie aus dem Magnetfeld. Die einzige Manipulation am Spektrometer, die wir während diesen fünf Messtagen von Zeit zu Zeit ausführten, bestand in einem leichten Nachhomogenisieren des Magnetfeldes. Ausschnitte der fünf NOESY-Spektren in H_2O sind im Anhang A2 gezeigt. Der Teil des NOESY-

Spektrums in D_2O , den wir für die Analyse brauchten, ist in der Figur 5.2 dargestellt.

Die Spektren mit einer Mischzeit τ_m von 100 ms oder weniger haben wir mit einer zufälligen Variation von τ_m innerhalb ± 5 ms gemessen, um die Multiquantenresonanzen zu unterdrücken (Kap. 2.4). Dieses Vorgehen führt zu einer Verteilung der Intensitäten der Multiquantenresonanzen über den ganzen ω_1 -Frequenzbereich (Macura et al., 1981). Diese Störungen in ω_1 -Richtung addieren sich zum " t_1 -Noise" (Kap. 2.5.1), welches ohnehin schon stark in Erscheinung tritt, weil NOESY-Spektren mit kurzer Mischzeit τ_m eine geringe Sensitivität aufweisen. Die Störungen in ω_1 -Richtung verhindern die Analyse von Spektren mit sehr kurzen τ_m in gewissen Spektralbereichen (siehe Figuren im Anhang A2).

Die im Zusammenhang mit der Strukturbestimmung wichtigen 2DJ-Spektren (Kap. 5.1.1) weisen für den Glucagon-Micellen-Komplex eine ungenügende Auflösung auf, so dass wir keine zuverlässigen Werte für die Proton-Proton-Kopplungskonstanten bestimmen konnten. Dies hängt mit der kurzen transversalen Relaxationszeit T_2 zusammen (Gleichung (2.1)), die für den Komplex mit einem Molekulargewicht von 17'000 resultiert. Für die Konformationsstudien am auf Micellen gebundenem Glucagon standen uns damit nur NOESY-Spektren zur Verfügung. Wie wir diese Spektren auswerten wird in Kap. 5.2.2 beschrieben.

5.2.2 Die Interpretation von NOESY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten τ_m

Eine wesentliche Voraussetzung zur Strukturbestimmung des auf volldeuterierte Micellen gebundenen Glucagons ist die Charakterisierung dieses Komplexes. Bösch et al. (1980) führten mit physikalisch-chemischen Methoden eine genaue Untersuchung durch. Diese Studien ergaben, dass der Komplex wohldefiniert ist und ein Glucagon und etwa 40 Detergensmoleküle

enthält. Wechselwirkungen zwischen zwei verschiedenen Polypeptidketten auf einer Micelle können vernachlässigt werden, was die Interpretation der NOE-Daten wesentlich erleichtert. Die Rotationskorrelationszeit τ_R des Komplexes ist so gross, dass im Glucagon (bei 500 MHz) maximale, negative NOE's von -1 erwartet werden, falls der interatomare Verbindungsvektor fest mit der Micelle verbunden ist. Durch die Deuterierung der Detergentien enthält der Micellen-Komplex nur einen Bruchteil der Protonen, die ein gleichgrosses Protein besitzen würde. Dies hat zur Folge, dass die Spindiffusion bei NOE-Messungen eingeschränkt wird.

Die Grundlage zur Auswertung der NOESY-Spektren bilden die in Kap. 4 erarbeiteten und in Tab. 4.2 zusammengefassten Resonanzzuordnungen im Spektrum von auf Micellen gebundenem Glucagon. Diese Zuordnungen erlauben es, die Crosspeaks in einem NOESY-Spektrum einzelnen Protonenpaaren zuzuordnen. Ein Crosspeak bedeutet, dass das zugehörige Protonenpaar in enger, räumlicher Nachbarschaft liegen muss. Aus den Ueberlegungen über den Einfluss der Flexibilität (Kap. 5.1.2) ergibt sich, dass diese Nachbarschaft in einer konservativen Abschätzung als maximaler Abstand von 5 Å interpretiert werden darf. Diese Distanzeinschränkungen können zusammen mit der chemischen Struktur des Moleküls den Konformationsraum einengen. Mit einem Distanz-Geometrie-Algorithmus (Crippen, 1979; Braun et al., 1981), der aus diesen Einschränkungen eine mögliche dreidimensionale Struktur berechnet, lassen sich die Daten optimal weiter verarbeiten (Brown et al., 1982).

Im Zusammenhang mit den Konformationsstudien am Glucagon versuchten wir eine genauere Klassifizierung der NOE-Daten anzuwenden. Diese Klassifizierung beruht auf den im Anhang A2 dokumentierten NOESY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten τ_m und auf der Messung der Intensitäten der einzelnen Crosspeaks. Als Mass für die Intensität verwendeten wir die Höhe der Resonanzen und nicht deren Volumen. Dies bedeutet, dass die gemessenen Intensitäten nicht sehr genau sind. Die Genauigkeit genügte jedoch für unsere empirische, grobe Einteilung der Crosspeak-Intensitäten. Die Interpretation der Spektren führten wir anhand von Höhenli-

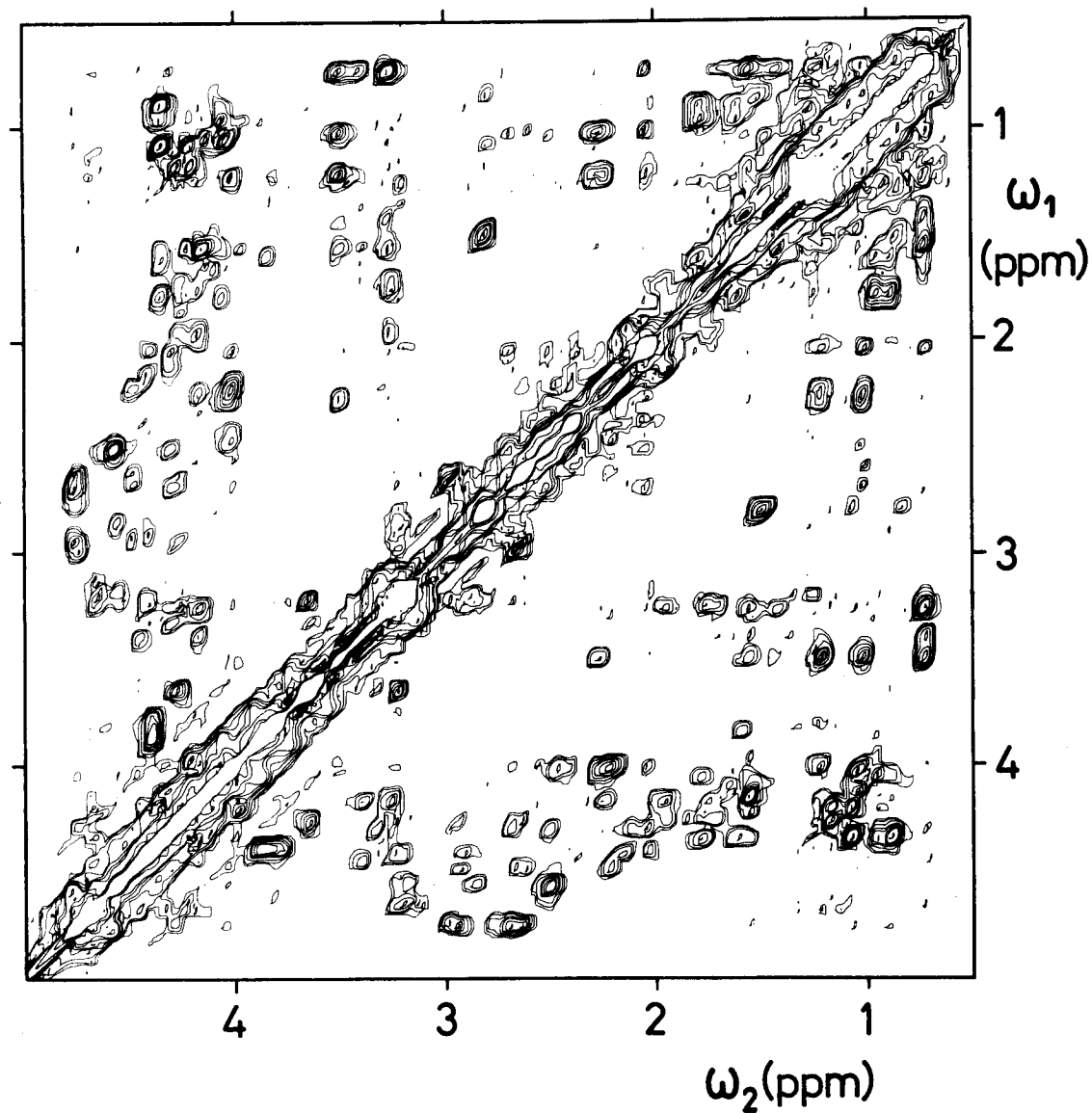


Fig. 5.2

Ausschnitt aus einem 500 MHz ^1H NOESY-Spektrum ($\tau_m = 200$ msec) von auf Micellen gebundenem Glucagon in D_2O (Kap. 4.2), $T = 37^\circ\text{C}$. Die Figur zeigt ein symmetrisiertes Betragsspektrum (Kap. 2.5.4).

nienzeichnungen durch, d.h. in der praktischen Arbeit bestimmten wir die Intensitäten durch Abzählen von Höhenlinien. Wir verwendeten vier Distanzklassen mit der einheitlichen unteren Grenze von 2 \AA (van der Waals-Abstand) und den oberen Grenzen 2.5 \AA , 3 \AA , 3.5 \AA und 5 \AA (siehe unten).

In einem ersten Schritt bestimmten wir alle NOE's, die in den in H_2O und D_2O gemessenen NOESY-Spektren mit $\tau_m = 200 \text{ ms}$ auftraten. Damit erhielten wir einen Ueberblick über alle Distanzeinschränkungen, die wir mit unseren Spektren bestimmen konnten. Für die Klassifizierung der NOE's zwischen aliphatischen Protonen mussten wir das NOESY-Spektrum mit der Mischzeit von 200 ms (Fig. 5.2) benutzen, weil dies das einzige in D_2O gemessene Spektrum war. Die in H_2O gemessenen Spektren mit verschiedenen Mischzeiten konnten wir in dieser spektralen Region nicht verwenden, weil die H_2O Unterdrückung Störungen verursachte, die eine Interpretation ausschlossen. Die in der Figur 5.2 auftretenden NOE's interpretierten wir mit einer maximalen Distanz von 5 \AA (Kap. 5.1.2), wenn die Resonanz mindestens drei Höhenlinien besass. Für sehr starke Crosspeaks, die mindestens die fünffache Intensität (7 Höhenlinien in Fig. 5.2) aufwiesen (Fig. 5.1), verwendeten wir eine obere Distanzgrenze von 3 \AA .

Die meisten Distanzeinschränkungen in auf Micellen gebundenem Glucagon erhielten wir aus NOE-Daten von Protonenpaaren, die mindestens ein Amidproton oder ein aromatisches Proton enthielten. Zur Klassifizierung dieser NOE's verwendeten wir ein differenzierteres Vorgehen als in der aliphatischen Spektralregion. Zuerst kalibrierten wir die NOE-Intensitäten in den Spektren. Dazu benützten wir die Crosspeaks, die einen NOE zwischen einem C^α -Proton und dem Amidproton derselben oder der nachfolgenden Aminosäure bedeuten. Der Abstand zwischen den Protonen $\text{C}^\alpha\text{H}_i$ und NH_{i+1} variiert von 2.2 \AA bis 3.5 \AA , derjenige zwischen $\text{C}^\alpha\text{H}_i$ und NH_i von 2.2 \AA bis 3 \AA (Billeter et al., 1981).

Betrachtet man nun NOESY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten τ_m , wird man ein bestimmtes τ_m finden, bei dem gerade noch nicht alle

$C^{\alpha}H_i-NH_{i+1}$ -NOE's beobachtbar sind, die in einem NOESY-Spektrum mit längerer Mischzeit τ_m auftreten. In den Glucagon-Spektren galt dies für $\tau_m = 50$ ms. In diesem Spektrum (Anhang A2) fehlten die NOE's zwischen Tyr 13-NH und Lys 12- $C^{\alpha}H$ sowie zwischen Arg 18-NH und Arg 17- $C^{\alpha}H$ (Tab. 4.2). Bei $\tau_m = 80$ ms treten diese zwei NOE's auf. Aus dem Fehlen der zwei $C^{\alpha}H_i-NH_{i+1}$ -NOE's schlossen wir, dass im NOESY-Spektrum mit $\tau_m = 50$ ms nur NOE's zwischen Protonen beobachtet werden, die näher als 3.5 \AA liegen. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Annahme, dass die Frequenzen der intramolekularen Bewegungen zwischen den Rückgratprotonen kleiner sind als die inverse Rotationskorrelationszeit des ganzen Moleküls. Diese Annahme dürfte für das Polypeptid-Rückgrat des auf Micellen gebundenen Glucagons gut erfüllt sein, wenn man von den entständigen Aminosäuren absieht.

Ein entsprechendes Vorgehen wendeten wir für die $C^{\alpha}H_i-NH_i$ -NOE's an und fanden, dass sich die im NOESY-Spektrum mit $\tau_m = 30$ ms auftretenden NOE's mit einer Distanz von 3 \AA interpretieren lassen. In diesem Spektrum fehlen die NOE's zwischen dem $C^{\alpha}H_i$ und NH_i von Asp 9 und Arg 17 (Anhang A2). Die an den entsprechenden Crosspeak-Positionen vorhandene Intensität wird durch J-Crosspeaks (Kap. 2.4) verursacht, die nicht vollständig eliminiert wurden (Kap. 2.4). Dies lässt sich erkennen, wenn man das Verhalten der Resonanzen bei verschiedenen Mischzeiten studiert (Anhang A2).

Bei der Interpretation der NOE-Daten unterschieden wir zwei Gruppen von Protonenpaaren, deren NOE wir gemäss einem starren bzw. einem flexiblen Modell behandelten (Kap. 5.1.2; Fig. 5.1). NOE's zwischen Protonen des Polypeptidrückgrates (NH, $C^{\alpha}H$, $C^{\beta}H$) behandelten wir nach dem starren Modell, wenn sie zu demselben Aminosäurerest oder zu einem in der Sequenz benachbarten Rest gehörten. Dasselbe Modell benützten wir für NOE's zwischen Rückgratprotonen und C^{γ} - sowie C^{δ} -Protonen innerhalb derselben Aminosäure. Für alle anderen Protonen benützten wir das in Kap. 5.2.1 beschriebene flexible Modell. "Starr" und "flexibel" sind in diesem Zusammenhang nicht direkt mit der in der Figur 5.1 gestrichelten

bzw. ausgezogenen Kurve zu interpretieren. Diese Kurven stellen Extremfälle dar. "Starr" bedeutet hier einen Kurvenverlauf in der Nähe der gestrichelten Linie und "flexibel" etwa den Verlauf der punktierten Linie in Fig. 5.1.

NOE's, die wir nach dem starren Modell behandelten, interpretierten wir gemäss der oben angegebenen Kalibration. Den NOE's, die nach einer Mischzeit von 50 ms im Spektrum beobachtbar sind, ordneten wir eine maximale Distanz von 3.5 \AA zu und den NOE's, die schon nach 30 ms erscheinen, eine solche von 3 \AA . Zusätzlich benützten wir für sehr intensive Crosspeaks im Spektrum mit $\tau_m = 30 \text{ ms}$ eine Distanz von 2.5 \AA . "Sehr intensiv" definierten wir als vierfache Minimalintensität (Fig. 5.1) in diesem Spektrum, was 9 Höhenlinien entspricht (Anhang A2).

NOE's, die wir nach dem flexiblen Modell behandelten, interpretierten wir im 30 ms NOESY-Spektrum als eine maximale Distanz von 3 \AA , wenn sie mindestens die doppelte Minimalintensität des Spektrums aufwiesen (Fig. 5.1). Ein entsprechendes Vorgehen wählten wir für das Spektrum mit $\tau_m = 50 \text{ ms}$. Die doppelte Minimalintensität bedeutet in beiden Spektren jeweils vier Höhenlinien (Anhang A2). Alle NOE's die erst bei einer Mischzeit von 80 ms oder 130 ms beobachtbar waren, interpretierten wir einheitlich mit einer Distanz von 5 \AA .

Die Distanzeinschränkungen, die wir im auf Micellen gebundenen Glucagon auf Grund dieses Vorgehen fanden, sind in der Tab. 5.1 zusammengefasst. Aus technischen (Kap. 5.3) und spektroskopischen Gründen mussten wir zu einigen Distanzen Korrekturen addieren. Einzelheiten hierzu sind in der Fussnote der Tab. 5.1 angegeben.

Die Interpretation von NOESY-Spektren bei kurzen Mischzeiten kann durch nicht vollständig eliminierte Multiquantenresonanzen (Kap. 2.4) erschwert werden. Proton-Proton Kopplungen in Polypeptiden wirken sich jedoch nur über drei bis vier Bindungen aus, was die interatomare Distanz stark begrenzt. Mit unserer Einteilung der NOE's war es nur sehr selten möglich,

zwischen gekoppelten Kernen eine Distanzeinschränkung zu erhalten, die nicht ohnehin erfüllt war (Tab. 5.1). Der Einfluss der J-Crosspeaks (Kap. 2.4) auf die Analyse der Spektren war daher sehr gering.

Bei der Analyse der NOESY-Spektren stellten wir fest, dass am aminoterminalen Ende von Glucagon keine NOE's auftraten. Dies wurde schon früher mit Gleichgewichts-NOE-Messungen im Imidazolring von His 1 festgestellt (Bösch, 1979). Das Fehlen der NOE's kann durch eine erhöhte Flexibilität erklärt werden, denn der NOE hängt vom Produkt der Korrelationszeit τ_c mit der Resonanzfrequenz ω ab. Für den Wert $\omega\tau_c = 1.12$ verschwindet der NOE (Gleichung (1.18)). Weil wir für His 1 und Ser 2 keine Distanzeinschränkungen aus NOE-Daten bestimmen konnten, liessen wir diese zwei Aminosäuren bei den Berechnungen mit dem Distanz-Geometrie-Algorithmus weg (Kap. 5.3).

Das von uns gewählte empirische Vorgehen zur Klassifizierung der NOE-Daten stellt einen ersten Versuch dar, den Informationsgehalt von NOESY-Spektren besser auszuwerten. Unser Vorgehen soll eine Anregung geben zu weiteren Untersuchungen, die schliesslich zu einer optimalen Interpretation von NOESY-Spektren führen. In diesem Sinne bedeutet die aus den Distanzeinschränkungen der Tab. 5.1 berechnete Struktur (Kap. 5.3) nicht ein endgültiges Resultat. Die Arbeit an der Glucagonstruktur ist nicht abgeschlossen. Wir haben schon mit der Zusammenstellung eines zweiten, verfeinerten Datensatzes begonnen, der nach analogen Methoden vorbereitet wird.

Tabelle 5.1

Distanzeinschränkungen[†] aus NOE-Daten für auf Micellen gebundenes Glucagon (Resonanzzuordnungen Tab. 4.2).

Atom 1		Atom 2		Maximale Distanz
THR	5 HN	THR	5 HA	2.500
THR	5 HN	THR	5 MG2	4.500
THR	5 HA	THR	5 HB	3.000
THR	5 HA	THR	5 MG2	4.000
THR	5 HA	PHE	6 HN	2.500
THR	5 HB	PHE	6 HN	3.000
THR	5 HB	PHE	6 HD1	10.000
THR	5 HB	PHE	6 HD2	10.000
THR	5 HB	PHE	6 HE1	10.000
THR	5 HB	PHE	6 HE2	10.000
THR	5 HB	PHE	6 HZ	10.000
THR	5 MG2	PHE	6 HN	6.000
THR	5 MG2	PHE	6 HD1	11.000
THR	5 MG2	PHE	6 HD2	11.000
THR	5 MG2	PHE	6 HE1	11.000
THR	5 MG2	PHE	6 HE2	11.000
THR	5 MG2	PHE	6 HZ	11.000
PHE	6 HN	PHE	6 HB	3.000
PHE	6 HN	PHE	6 HB	3.500
PHE	6 HN	PHE	6 HD1	10.000
PHE	6 HN	PHE	6 HD2	10.000
PHE	6 HN	PHE	6 HE1	10.000
PHE	6 HN	PHE	6 HE2	10.000
PHE	6 HN	PHE	6 HZ	10.000
PHE	6 HA	TYR	10 HD1	9.200
PHE	6 HA	TYR	10 HD2	9.200
PHE	6 HD1	THR	7 HA	8.500
PHE	6 HD1	THR	7 MG2	9.500
PHE	6 HD2	THR	7 HA	8.500
PHE	6 HD2	THR	7 MG2	9.500
PHE	6 HE1	THR	7 HA	8.500
PHE	6 HE1	THR	7 MG2	9.500
PHE	6 HE2	THR	7 HA	8.500
PHE	6 HE2	THR	7 MG2	9.500
PHE	6 HZ	THR	7 HA	8.500
PHE	6 HZ	THR	7 MG2	9.500
THR	7 HN	THR	7 HB	3.500
THR	7 HN	THR	7 MG2	4.000
THR	7 HA	THR	7 MG2	4.000
THR	7 HA	SER	8 HN	3.000
THR	7 HA	TYR	10 HD1	9.200
THR	7 HA	TYR	10 HD2	9.200

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

Atom 1	Atom 2	Maximale Distanz
THR 7 MG2	SER 8 HN	6.000
THR 7 MG2	TYR 10 HD1	10.200
THR 7 MG2	TYR 10 HD2	10.200
SER 8 HN	SER 8 LB	4.000
SER 8 HA	ASP 9 HN	2.500
SER 8 LB	ASP 9 HN	6.000
ASP 9 HN	ASP 9 LB	3.500
ASP 9 LB	TYR 10 HN	4.500
ASP 9 LB	TYR 10 HD1	8.700
ASP 9 LB	TYR 10 HD2	8.700
ASP 9 LB	TYR 10 HE1	10.200
ASP 9 LB	TYR 10 HE2	10.200
TYR 10 HN	TYR 10 HB	3.000
TYR 10 HN	TYR 10 HB	3.500
TYR 10 HN	TYR 10 HD1	6.700
TYR 10 HN	TYR 10 HD2	6.700
TYR 10 HA	TYR 13 HB	5.000
TYR 10 HA	TYR 13 HD1	7.700
TYR 10 HA	TYR 13 HD2	7.700
TYR 10 HD1	SER 11 HA	7.700
TYR 10 HD1	LEU 14 MD1	10.200
TYR 10 HD1	LEU 14 MD2	8.700
TYR 10 HD2	SER 11 HA	7.700
TYR 10 HD2	LEU 14 MD1	10.200
TYR 10 HD2	LEU 14 MD2	8.700
TYR 10 HE1	LEU 14 MD2	10.200
TYR 10 HE2	LEU 14 MD2	10.200
SER 11 HN	SER 11 HA	2.500
SER 11 HN	LYS 12 HN	3.500
SER 11 HA	LEU 14 LB	8.500
SER 11 HA	LEU 14 HG	8.500
SER 11 HA	LEU 14 MD1	6.000
SER 11 HA	LEU 14 MD2	6.000
LYS 12 HN	LYS 12 LB	4.500
LYS 12 HN	LYS 12 LG	4.000
LYS 12 HN	TYR 13 HN	5.000
LYS 12 HN	TYR 13 HD1	9.200
LYS 12 HN	TYR 13 HD2	9.200
LYS 12 HA	TYR 13 HD1	9.200
LYS 12 HA	TYR 13 HD2	9.200
LYS 12 LB	TYR 13 HN	4.500
LYS 12 LB	TYR 13 HD1	10.200
LYS 12 LB	TYR 13 HD2	10.200
TYR 13 HN	TYR 13 HB	3.500
TYR 13 HN	TYR 13 HB	3.500
TYR 13 HD1	LEU 14 MD1	10.200
TYR 13 HD2	LEU 14 MD1	10.200
LEU 14 HN	LEU 14 MD1	6.000
LEU 14 HN	LEU 14 MD2	6.000

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

Atom 1	Atom 2	Maximale Distanz
LEU 14 HA	LEU 14 MD1	4.000
LEU 14 HA	LEU 14 MD2	6.000
LEU 14 HA	ASP 15 HN	3.000
LEU 14 MD1	ASP 15 HN	6.000
ASP 15 HN	ASP 15 LB	4.500
ARG 17 HN	ARG 17 LB	4.000
ARG 17 HN	ARG 18 HN	3.000
ARG 17 HA	GLU 20 LB	6.000
ARG 18 HN	ARG 18 HA	3.000
ARG 18 HN	ARG 18 LB	4.000
ARG 18 HN	ARG 18 LG	4.500
ARG 18 HN	ALA 19 HN	3.500
ALA 19 HN	ALA 19 MB	3.500
ALA 19 HA	PHE 22 HN	3.000
ALA 19 HA	PHE 22 HB	6.800
ALA 19 HA	PHE 22 HB	6.800
ALA 19 HA	PHE 22 HD1	10.000
ALA 19 HA	PHE 22 HD2	10.000
ALA 19 HA	PHE 22 HE1	10.000
ALA 19 HA	PHE 22 HE2	10.000
ALA 19 HA	PHE 22 HZ	10.000
ALA 19 HA	VAL 23 HN	5.000
ALA 19 HA	VAL 23 MG2	6.000
ALA 19 MB	GLN 20 HN	3.500
ALA 19 MB	PHE 22 HB	7.800
ALA 19 MB	PHE 22 HB	7.800
ALA 19 MB	PHE 22 HD1	11.000
ALA 19 MB	PHE 22 HD2	11.000
ALA 19 MB	PHE 22 HE1	11.000
ALA 19 MB	PHE 22 HE2	11.000
ALA 19 MB	PHE 22 HZ	11.000
GLN 20 HN	GLN 20 LB	4.000
GLN 20 HN	GLN 20 LG	6.000
GLN 20 HA	ASP 21 HN	3.000
GLN 20 HA	VAL 23 HN	3.500
GLN 20 HA	VAL 23 MG2	6.000
GLN 20 HA	VAL 23 MG1	6.000
GLN 20 LB	ASP 21 HN	4.000
ASP 21 HN	ASP 21 LB	4.000
ASP 21 HA	GLN 24 HN	5.000
ASP 21 HA	GLN 24 LB	6.000
ASP 21 LB	PHE 22 HN	4.500
PHE 22 HN	PHE 22 HB	4.200
PHE 22 HN	PHE 22 HB	4.200
PHE 22 HN	PHE 22 HD1	9.200
PHE 22 HN	PHE 22 HD2	9.200
PHE 22 HA	TRP 25 HN	5.000
PHE 22 HA	TRP 25 HB	6.800

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

Atom 1	Atom 2	Maximale Distanz
PHE 22 HA	TRP 25 HB	6.800
PHE 22 HA	TRP 25 HE3	3.500
PHE 22 HB	VAL 23 HN	4.800
PHE 22 HB	LEU 26 MD1	7.300
PHE 22 HB	LEU 26 MD2	7.300
PHE 22 HB	VAL 23 HN	4.800
PHE 22 HB	LEU 26 MD1	7.300
PHE 22 HB	LEU 26 MD2	7.300
PHE 22 HD1	VAL 23 HN	10.000
PHE 22 HD1	VAL 23 HA	10.000
PHE 22 HD1	VAL 23 MG2	9.500
PHE 22 HD1	VAL 23 MG1	11.000
PHE 22 HD1	TRP 25 HZ3	10.000
PHE 22 HD1	LEU 26 MD1	10.000
PHE 22 HD1	LEU 26 MD2	10.000
PHE 22 HD2	VAL 23 HN	10.000
PHE 22 HD2	VAL 23 HA	10.000
PHE 22 HD2	VAL 23 MG2	9.500
PHE 22 HD2	VAL 23 MG1	11.000
PHE 22 HD2	TRP 25 HZ3	10.000
PHE 22 HD2	LEU 26 MD1	10.000
PHE 22 HD2	LEU 26 MD2	10.000
PHE 22 HE1	VAL 23 HN	10.000
PHE 22 HE1	VAL 23 HA	10.000
PHE 22 HE1	VAL 23 MG2	9.500
PHE 22 HE1	VAL 23 MG1	11.000
PHE 22 HE1	TRP 25 HZ3	10.000
PHE 22 HE1	LEU 26 MD1	10.000
PHE 22 HE1	LEU 26 MD2	10.000
PHE 22 HE2	VAL 23 HN	10.000
PHE 22 HE2	VAL 23 HA	10.000
PHE 22 HE2	VAL 23 MG2	9.500
PHE 22 HE2	VAL 23 MG1	11.000
PHE 22 HE2	TRP 25 HZ3	10.000
PHE 22 HE2	LEU 26 MD1	10.000
PHE 22 HE2	LEU 26 MD2	10.000
PHE 22 HZ	VAL 23 HN	10.000
PHE 22 HZ	VAL 23 HA	10.000
PHE 22 HZ	VAL 23 MG2	9.500
PHE 22 HZ	VAL 23 MG1	11.000
PHE 22 HZ	TRP 25 HZ3	10.000
PHE 22 HZ	LEU 26 MD1	10.000
PHE 22 HZ	LEU 26 MD2	10.000
VAL 23 HN	VAL 23 HB	3.000
VAL 23 HN	VAL 23 MG2	3.500
VAL 23 HN	VAL 23 MG1	4.500
VAL 23 HA	VAL 23 HB	5.000
VAL 23 HA	VAL 23 MG2	4.000
VAL 23 HA	VAL 23 MG1	4.000

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

Atom 1	Atom 2	Maximale Distanz
VAL 23 HA	LEU 26 HN	3.000
VAL 23 HA	LEU 26 MD1	5.500
VAL 23 HA	LEU 26 MD2	5.500
VAL 23 HB	GLN 24 HN	5.000
VAL 23 MG2	GLN 24 HN	6.000
VAL 23 MG2	GLN 24 HA	6.000
VAL 23 MG1	GLN 24 HN	4.500
VAL 23 MG1	MET 27 HN	6.000
GLN 24 HN	GLN 24 LB	4.000
GLN 24 HN	GLN 24 LG	4.500
GLN 24 HN	TRP 25 HN	3.000
GLN 24 HA	GLN 24 LG	6.000
GLN 24 HA	MET 27 HN	3.000
GLN 24 HA	MET 27 LB	6.000
GLN 24 HA	ASN 28 HN	5.000
GLN 24 LB	TRP 25 HN	4.000
TRP 25 HN	TRP 25 HB	3.000
TRP 25 HN	TRP 25 HB	3.000
TRP 25 HN	TRP 25 HD1	5.000
TRP 25 HN	TRP 25 HE3	5.000
TRP 25 HN	LEU 26 HN	3.500
TRP 25 HA	TRP 25 HD1	3.000
TRP 25 HA	LEU 26 MD1	7.500
TRP 25 HA	LEU 26 MD2	7.500
TRP 25 HB	TRP 25 HD1	3.500
TRP 25 HB	TRP 25 HE3	3.500
TRP 25 HB	TRP 25 HD1	5.000
TRP 25 HB	TRP 25 HE3	3.000
TRP 25 HB	LEU 26 HN	3.500
TRP 25 HD1	LEU 26 MD1	7.500
TRP 25 HD1	LEU 26 MD2	7.500
TRP 25 HE3	LEU 26 HN	3.500
TRP 25 HE3	LEU 26 HA	5.000
TRP 25 HE3	LEU 26 LB	6.000
TRP 25 HE3	LEU 26 MD1	5.500
TRP 25 HE3	LEU 26 MD2	5.500
TRP 25 HZ3	LEU 26 HN	5.000
TRP 25 HZ3	LEU 26 HA	5.000
TRP 25 HZ3	LEU 26 LB	7.500
TRP 25 HZ3	LEU 26 HG	7.500
TRP 25 HZ3	LEU 26 MD1	5.000
TRP 25 HZ3	LEU 26 MD2	5.000
TRP 25 HZ2	LEU 26 MD1	7.500
TRP 25 HZ2	LEU 26 MD2	7.500
TRP 25 HH2	LEU 26 MD1	6.000
TRP 25 HH2	LEU 26 MD2	6.000
LEU 26 HN	LEU 26 LB	4.500
LEU 26 HN	LEU 26 HG	7.500
LEU 26 HN	LEU 26 MD1	6.000

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

Atom 1	Atom 2	Maximale Distanz
LEU 26 HN	LEU 26 MD2	6.000
LEU 26 HN	MET 27 HN	3.000
LEU 26 HA	LEU 26 HG	5.000
LEU 26 HA	LEU 26 MD1	5.500
LEU 26 HA	LEU 26 MD2	5.500
LEU 26 LB	MET 27 HN	4.000
LEU 26 MD1	MET 27 HN	7.500
LEU 26 MD1	MET 27 ME	8.500
LEU 26 MD2	MET 27 HN	7.500
LEU 26 MD2	MET 27 ME	8.500
MET 27 HN	MET 27 HA	2.500
MET 27 HN	MET 27 LB	4.000
MET 27 HN	MET 27 LG	4.000
MET 27 HA	ASN 28 HN	3.000
MET 27 LB	ASN 28 HN	6.000
MET 27 LG	ASN 28 HN	6.000
ASN 28 HN	ASN 28 LB	4.000
ASN 28 LB	THR 29 HN	4.000
THR 29 HN	THR 29 HA	2.500
THR 29 HN	THR 29 HB	3.500
THR 29 HN	THR 29 MG2	4.000
THR 29 HA	THR 29 MG2	4.000

†Die Distanzeinschränkungen wurden gemäss dem im Text beschriebenen Vorgehen bestimmt. Für alle Methyl- und die meisten Methylengruppen benützten wir Pseudoatome (Kap. 5.3), die in der Tabelle mit M bzw. L bezeichnet sind. Alle griechischen Buchstaben α , β , γ , δ , ϵ , ζ und η sind durch die lateinischen Buchstaben A, B, G, D, E, Z und H ersetzt.

Für die Tryptophan-Ringprotonen gelten damit beispielsweise die folgenden, äquivalenten Bezeichnungen:

Trp-Ringprotonen:	$C^{\delta}H$	HD1	C2H
	$N^{\epsilon}H$	HE1	N1H
	$C^{\epsilon}H$	HE3	C4H
	$C^{\zeta 2}H$	HZ2	C7H
	$C^{\zeta 3}H$	HZ3	C5H
	$C^{\eta}H$	HH2	C6H

Tabelle 5.1 (Fortsetzung)

Aus technischen (Kap. 5.3) und spektroskopischen Gründen nahmen wir folgende Distanzkorrekturen vor:

- + 1.0 Å: für Methyl (M)- und Methylen (L)-Pseudoatome.
- + 1.8 Å: für explizit definierte Methylengruppen, wenn die zwei Protonen im NMR-Spektrum nicht individuell zugeordnet werden konnten.
- + 2.5 Å: für die zwei C^δ-Methylgruppen von Leu 26, welche dieselbe chemische Verschiebung besitzen.
- + 4.2 Å: für die zwei C^δ-Protonen (bzw. C^εH) von Tyr, weil diese identische chemische Verschiebungen besitzen.
- + 5.0 Å: für alle Ringprotonen von Phe 6 bzw. Phe 22, weil die einzelnen Resonanzen im Spektrum nicht aufgelöst sind.

5.3 Berechnungen mit dem Distanz-Geometrie-Algorithmus

Zur weiteren Verarbeitung der aus NOE-Messungen erhaltenen Distanzeinschränkungen (Tab. 5.1) benützten wir einen Distanz-Geometrie-Algorithmus (Crippen, 1979). Ein solcher Algorithmus berechnet aus oberen und unteren Grenzen für Distanzen zwischen n Punkten eine mögliche dreidimensionale Anordnung dieser n Punkte. Der von uns benützte Distanz-Geometrie-Algorithmus wurde von Braun et al. (1981) genau beschrieben. Für die chemische Struktur verwendeten wir die Parameter aus der "ECEPP"-Datenbank (Momany et al., 1975). Methylgruppen ersetzten wir allerdings durch Pseudoatome, die wir am Ort der Kohlenstoffatome positionierten. Das Volumen des Pseudoatoms wählten wir gleich dem Volumen der Methylgruppe. Ein entsprechendes Vorgehen wendeten wir auch für die meisten Methylengruppen an; nur für die aromatischen Aminosäuren und für Gly ersetzten wir die Methylenprotonen nicht durch Pseudoatome. Die Distanz zwischen Pseudoatom und tatsächlicher Wasserstoffposition berücksichtigten wir, indem wir zu den entsprechenden Distanzeinschränkungen 1 \AA addierten (Tab. 5.1). Pseudoatome mussten wir einführen, um die Anzahl Atome zu reduzieren. Der Algorithmus behandelt nur maximal 150 Atome.

Trotz der Einführung von Pseudoatomen für die Methyl- und die meisten Methylengruppen konnte das Glucagonmolekül nicht als Ganzes behandelt werden. Wir unterteilten das Molekül in fünf sich überschneidende Teilsequenzen: 3 - 11, 5 - 15, 10 - 20, 15 - 25 und 19 - 29. Diese Aufteilung bedeutet für die Glucagonstruktur keine gravierende Massnahme, weil wir keine NOE's und damit keine Distanzeinschränkungen zwischen Protonen von Aminosäureresten fanden, die in der Sequenz mehr als vier Reste auseinanderlagen. Die Distanzeinschränkungen sind in der Tab. 5.1 angegeben. Aus den fünf Teilsequenzen lässt sich im Prinzip die Struktur des ganzen Glucagonmoleküls zusammensetzen. Das Fehlen weitreichender Distanzeinschränkungen verhindert jedoch eine genaue Bestimmung der tertiären Struktur.

Für jede Teilsequenz von Glucagon führten wir fünf verschiedene Berechnungen mit dem Distanz-Geometrie-Algorithmus durch. Die fünf Resultate geben einen Eindruck, wie gut die Daten von Tab. 5.1 die Struktur einer Teilsequenz bestimmen. In den Figuren 5.3, 5.5 und 5.6 sind die fünf berechneten Strukturen der Teilsequenzen 3 - 11, 10 - 20 und 19 - 29 zur Illustration jeweils übereinandergezeichnet. Alle gezeigten Strukturen stellen Lösungen dar, welche die Distanzeinschränkungen um nicht mehr als 0.1 \AA verletzen.

In den Regionen 3 - 10 und 19 - 29 zeigen die fünf Strukturen übereinstimmende, charakteristische Eigenschaften (Fig. 5.3, Fig. 5.6). Für diese zwei Teilsequenzen ist in der Fig. 5.4 und in der Fig. 5.7 eine der fünf Strukturen einzeln dargestellt. Die berechneten Lösungen für die Region 10 - 20 zeigen keine offensichtlichen Gemeinsamkeiten. Aus diesem Grund war es nicht möglich, aus den fünf Teilsequenzen 3 - 10, 5 - 15, 10 - 20, 15 - 25 und 19 - 29 das ganze Glucagonmolekül zusammenzusetzen, um einen Ueberblick über alle Sekundärstruktur-Elemente zu erhalten.

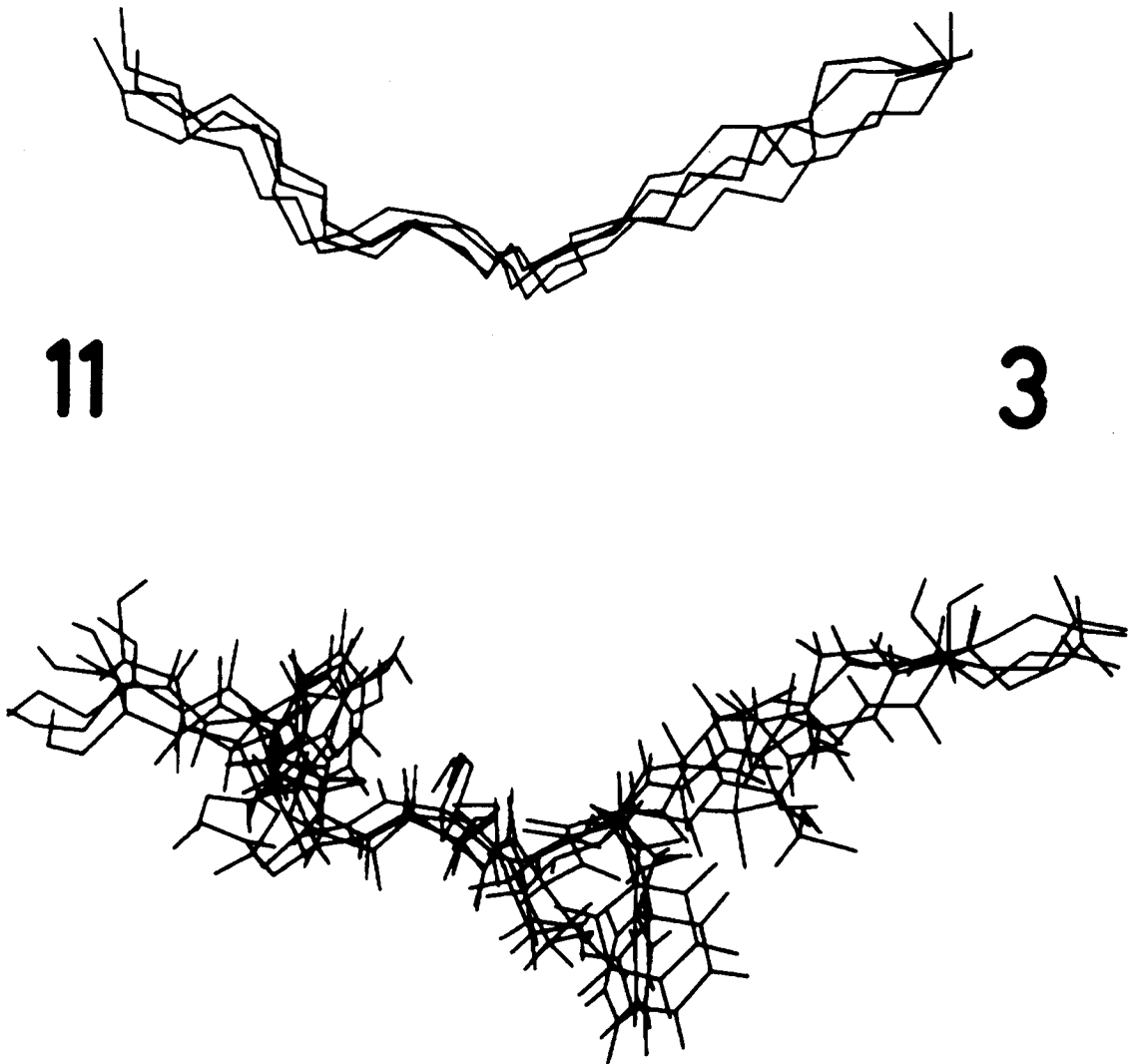


Fig. 5.3

Oben ist der Verlauf des Polypeptid-Rückgrates der Glucagon-Teilsequenz 3 - 11 (Fig. 1.2) für fünf Strukturen gezeigt, die aus fünf verschiedenen Berechnungen mit dem Distanz-Algorithmus aus den NOE-Daten (Tab. 5.1) erhalten wurden. Zwei Strukturen sind identisch. Unten sind dieselben Strukturen mit Seitenketten gezeigt.

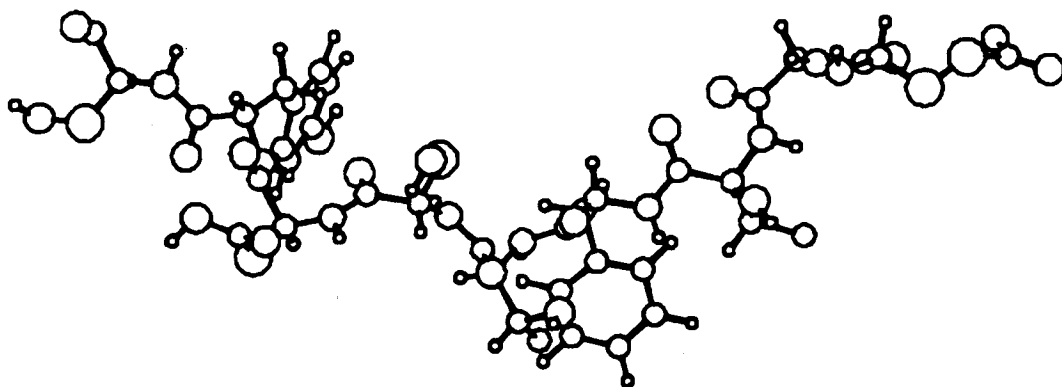
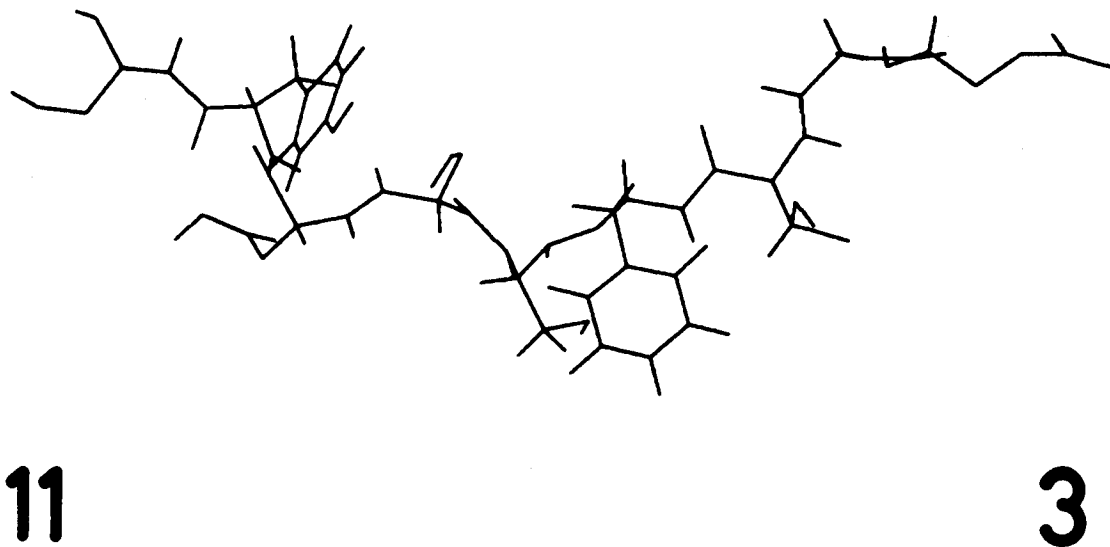
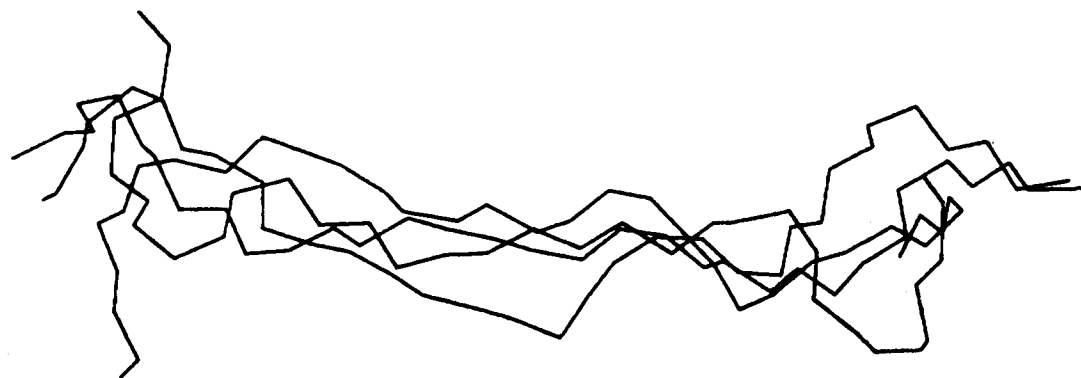


Fig. 5.4

Eine der fünf Strukturen aus Fig. 5.3: oben als Strichzeichnung, unten mit angedeuteten Atomen.



20

10

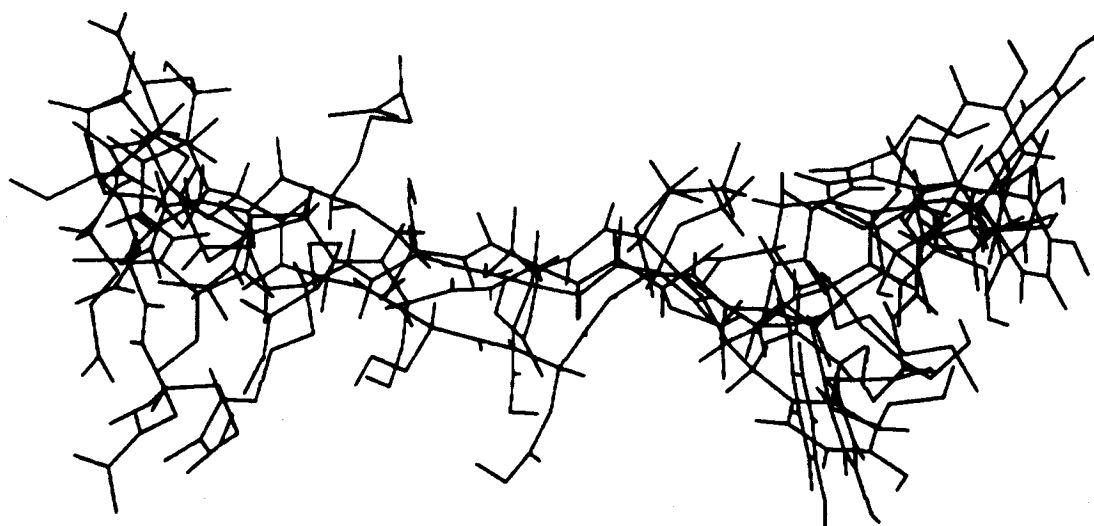
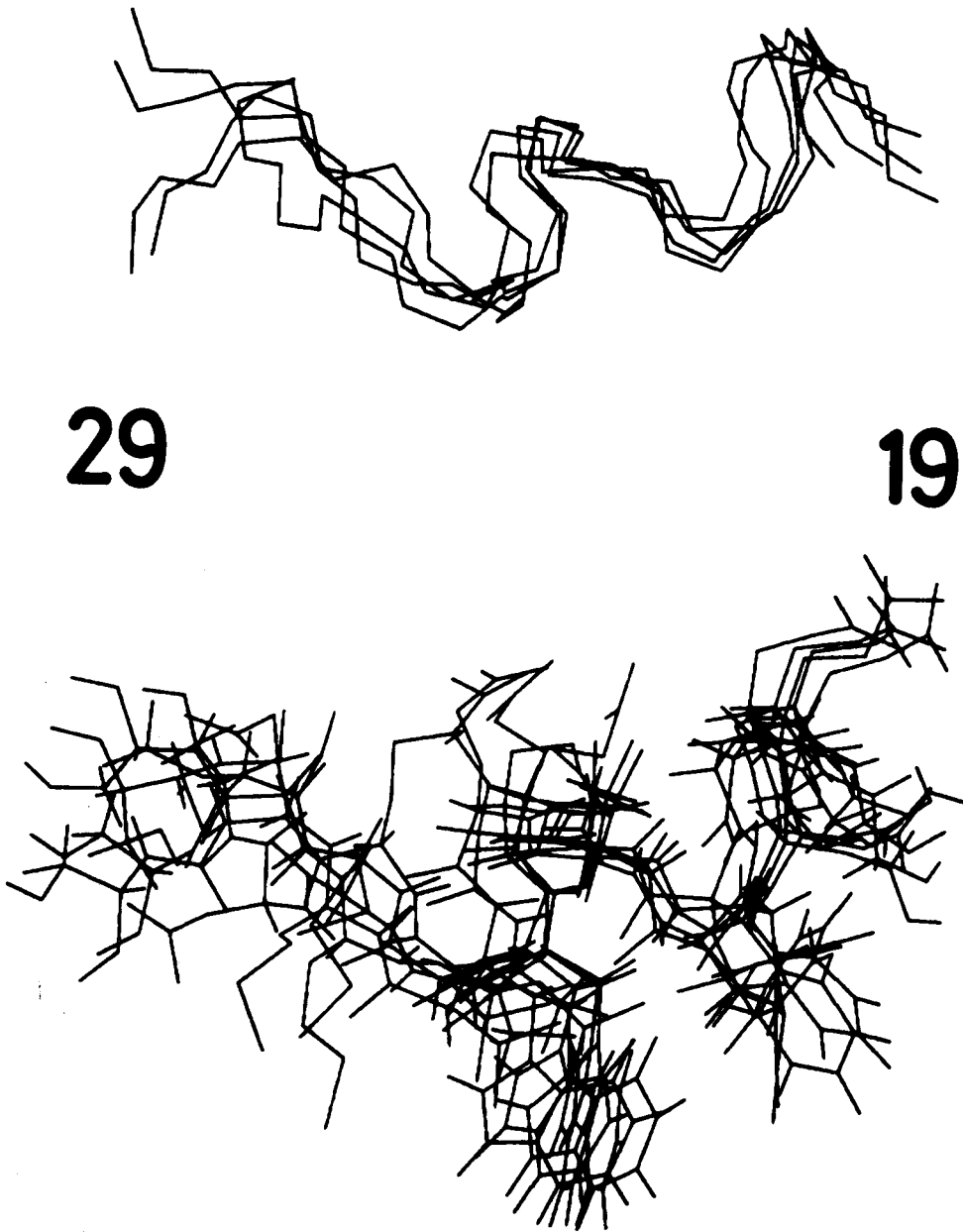


Fig. 5.5

Oben ist der Verlauf des Polypeptid-Rückgrates der Glucagon-Teilsequenz 10 - 20 (Fig. 1.2) für fünf Strukturen gezeigt, die aus fünf verschiedenen Berechnungen mit dem Distanz-Algorithmus aus den NOE-Daten (Tab. 5.1) erhalten wurden. Zwei Strukturen sind identisch. Unten sind dieselben Strukturen mit Seitenketten gezeigt.



29

19

Fig. 5.6

Oben ist der Verlauf des Polypeptid-Rückgrates der Glucagon-Teilsequenz 19 - 29 (Fig. 1.2) für fünf Strukturen gezeigt, die aus fünf verschiedenen Berechnungen mit dem Distanz-Algorithmus aus den NOE-Daten (Tab. 5.1) erhalten wurden. Unten sind dieselben Strukturen mit Seitenketten gezeigt.

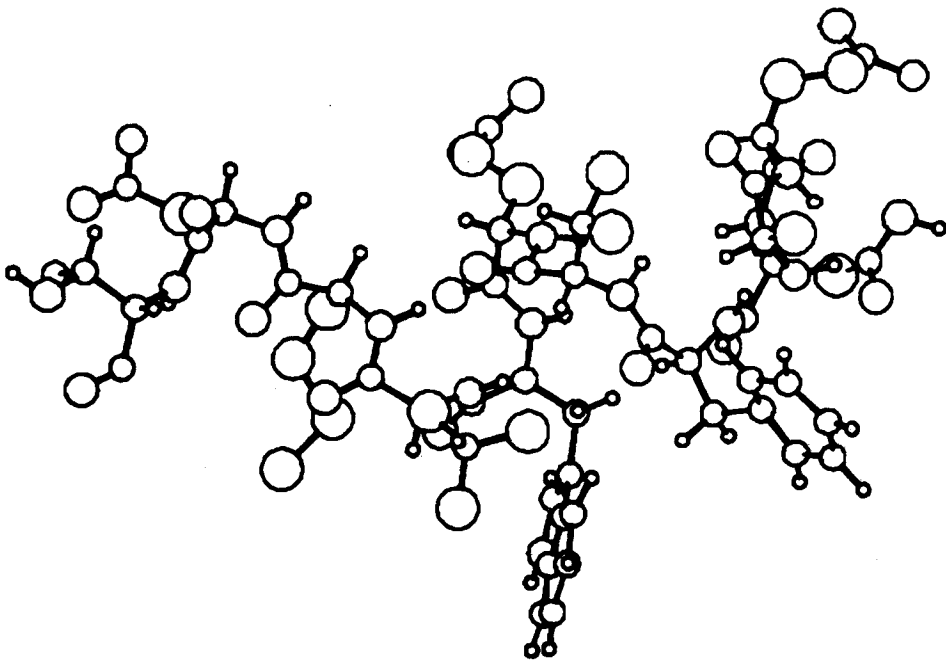
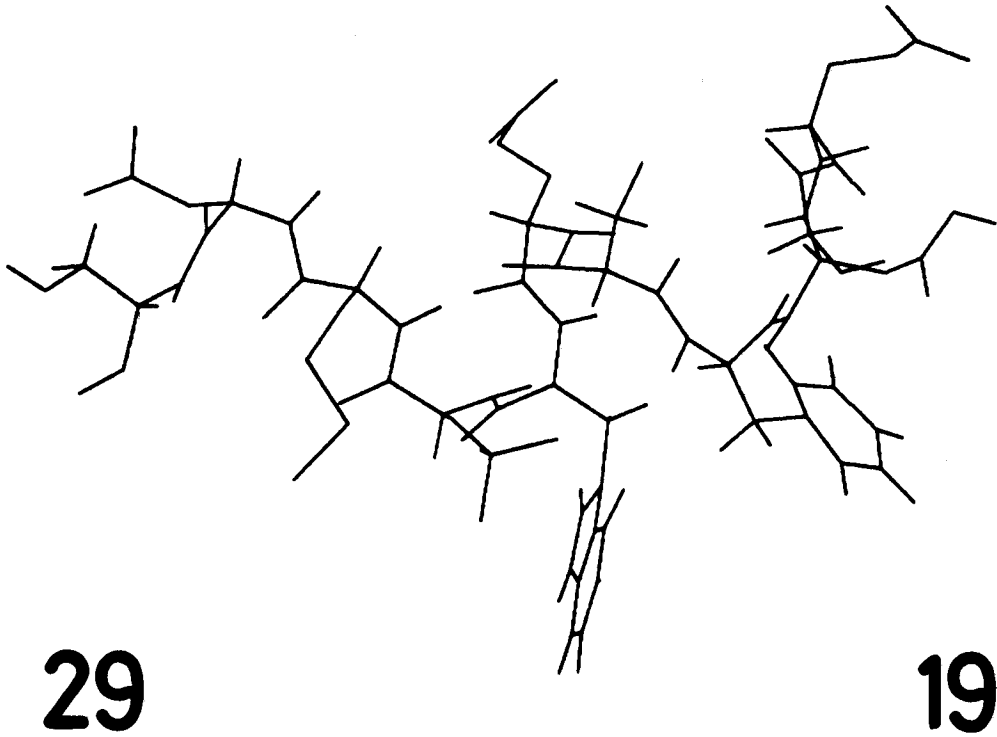


Fig. 5.7

Eine der fünf Strukturen aus Fig. 5.6: oben als Strichzeichnung, unten mit angedeuteten Atomen.

5.4 Diskussion der Strukturstudien von an Micellen gebundenem Glucagon

Die aus den Distanzeinschränkungen der Tab. 5.1 erhaltenen Strukturen der fünf Teilsequenzen von Glucagon (Kap. 5.3) stellen ein Zwischenresultat dar. Die Konformationsstudien an Glucagon sind nicht abgeschlossen. In den Teilsequenzen 3 - 11 bzw. 19 - 29 erhielten wir allerdings schon Strukturen, die gemeinsame, charakteristische Eigenschaften aufweisen. Die verbleibenden Unterschiede (Fig. 5.3, Fig. 5.6) deuten daraufhin, dass die Strukturen leicht unterbestimmt sind. Es lässt sich jedoch nicht ganz ausschliessen, dass die natürliche Flexibilität des Moleküls zu solchen Unterschieden führt. Der Konformationsraum der Teilsequenz 10 - 20 scheint nicht genügend eingeschränkt zu sein. Die fünf Strukturen (Fig. 5.5) zeigen noch grosse Unterschiede. In der Region 10 - 20 beobachteten wir nicht sehr viele NOE's (Tab. 5.1), was durch eine ausgestreckte, relativ flexible Struktur erklärt werden kann.

Die NOE's zwischen den einzelnen Protonenpaaren ergeben Distanzeinschränkungen von unterschiedlicher Qualität. Im Zusammenhang mit NOE-Messungen bedeutet eine gute Qualität einen grossen Abstand der betrachteten Protonen in der Aminosäuresequenz. Die unterschiedliche Qualität der Distanzeinschränkungen zeigt sich deutlich bei einem Vergleich der Teilsequenzen 3 - 11 und 10 - 20. In diesen zwei Regionen fanden wir etwa gleichviele NOE's, die jedoch den Konformationsraum für die zwei Teilsequenzen verschieden stark einschränkten (Fig. 5.3, Fig. 5.5). Wako und Scheraga (1981) veröffentlichten eine theoretische Studie über die Faltung von Proteinen mittels Distanzeinschränkungen. In dieser Arbeit untersuchten sie den Einfluss der Anzahl und Qualität von Distanzeinschränkungen auf die dreidimensionale Struktur, wobei sie auch untere Grenzen für die Distanzen betrachteten. Aus NOE-Daten lassen sich nicht ohne weiteres untere Grenzen bestimmen, weil der NOE z.B. wegen auftreten der Spindiffusion, wegen anderer Relaxationsmechanismen oder wegen des Einflusses der Flexibilität klein sein kann, ohne dass der inter-

atomare Abstand gross sein muss. Im Glucagonmolekül gilt dies beispielsweise für den NOE zwischen dem Amidproton und dem C^α-Proton von Gln 3, die einen maximalen Abstand von 3 Å aufweisen und trotzdem auch nach einer Mischzeit von 200 ms keinen NOE zeigen. Wir berücksichtigten darum in Tab. 5.1 keine untere Grenzen.

Während unserer Untersuchungen an der Glucagonstruktur verglichen wir NOE's, die durch die berechneten Strukturen vorausgesagt wurden, mit den experimentellen NOESY-Spektren. Nur wenige der entsprechenden Protonenpaare zeigten auch nach einer Mischzeit τ_m von 200 ms eindeutig keinen NOE. Für den interatomaren Abstand solcher Protonen verwendeten wir probeweise eine untere Grenze von 3 Å. Die Berechnungen mit dem Distanz-Geometrie-Algorithmus zeigten für die Teilsequenzen 3 - 11 und 19 - 29 keine wesentlichen Änderungen. Der Konformationsraum der Teilsequenz 10 - 20 hingegen wurde soweit eingeschränkt, dass auch in dieser Region die fünf berechneten Strukturen gemeinsame Merkmale aufwiesen. Aus oben erwähnten Gründen sind die unteren Grenzen jedoch in der Tab. 5.1 weggelassen.

Unsere Studien von an Micellen gebundenem Glucagon und frühere Arbeiten (Bösch, 1979; Bösch et al., 1980; Brown et al., 1981) zeigen, dass Glucagon keine globuläre sondern eine ausgestreckte Konformation aufweist. Dies verursacht bei den von uns durchgeführten Strukturstudien zwei wesentliche Nachteile. Erstens wird die Anzahl der NOE's reduziert, vor allem die Seitenketten zeigen wenig NOE's, und es fehlen die wertvollen NOE's zwischen Protonen, die in der chemischen Struktur weit entfernt sind. Letzteres erschwert die Bestimmung der tertiären Struktur wesentlich. Zweitens wird die Konformation kaum durch sterische Beschränkungen eingengt, die durch die dichte Packung der Aminosäuren in einem globulären Protein auftreten.

Das Zwischenresultat unserer Strukturuntersuchungen von an volldeuterte Micellen gebundenem Glucagon kann wie folgt zusammengefasst werden:

- fehlende NOE's am Aminoende deuten darauf hin, dass His 1 und Ser 2 flexibel sind.
- die Teilsequenz 3 - 10 ist ausgestreckt (Fig. 5.3, Fig. 5.4), besitzt aber eine definierte Struktur.
- die Region 10 - 20 scheint ausgestreckt zu sein (Fig. 5.5), eine eindeutige Struktur konnte (noch) nicht erhalten werden; die geringe Anzahl beobachtbarer NOE's deutet auf eine gewisse Flexibilität hin.
- in der Teilsequenz 19 - 29 treten viele NOE's auf; die Struktur ist α -helixähnlich und gut definiert (Fig. 5.6, Fig. 5.7).

Diese Resultate der Strukturuntersuchung sind verträglich mit den bekannten Eigenschaften von Glucagon (Kap. 1.5). Das für die Funktion wichtige Aminoende ist flexibel und ermöglicht damit eine optimale Wechselwirkung mit der aktiven Stelle des Rezeptors. Die Region 19 - 29, die wesentlich zur Bindung von Glucagon beiträgt, zeigt eine α -helixähnliche Struktur, die auf der einen Seite hydrophobe und auf der anderen Seite eine hydrophile Fläche bildet. Diese Faltung fördert damit die Bindung an einen hydrophoben Teil des Rezeptors. Die helikale Struktur der Teilsequenz 19 - 29 bedeutet auch, dass die Glucagon-Monomer-Konformationen in wässriger Lösung (Bösch et al., 1978) und auf Micellen verschieden sein müssen.

A N H A N G A 1

D A S P R O G R A M M " F O C S Y " Z U R B E R E C H N U N G F A L T U N G S K O R R I G I E R T E R S P E K T R E N

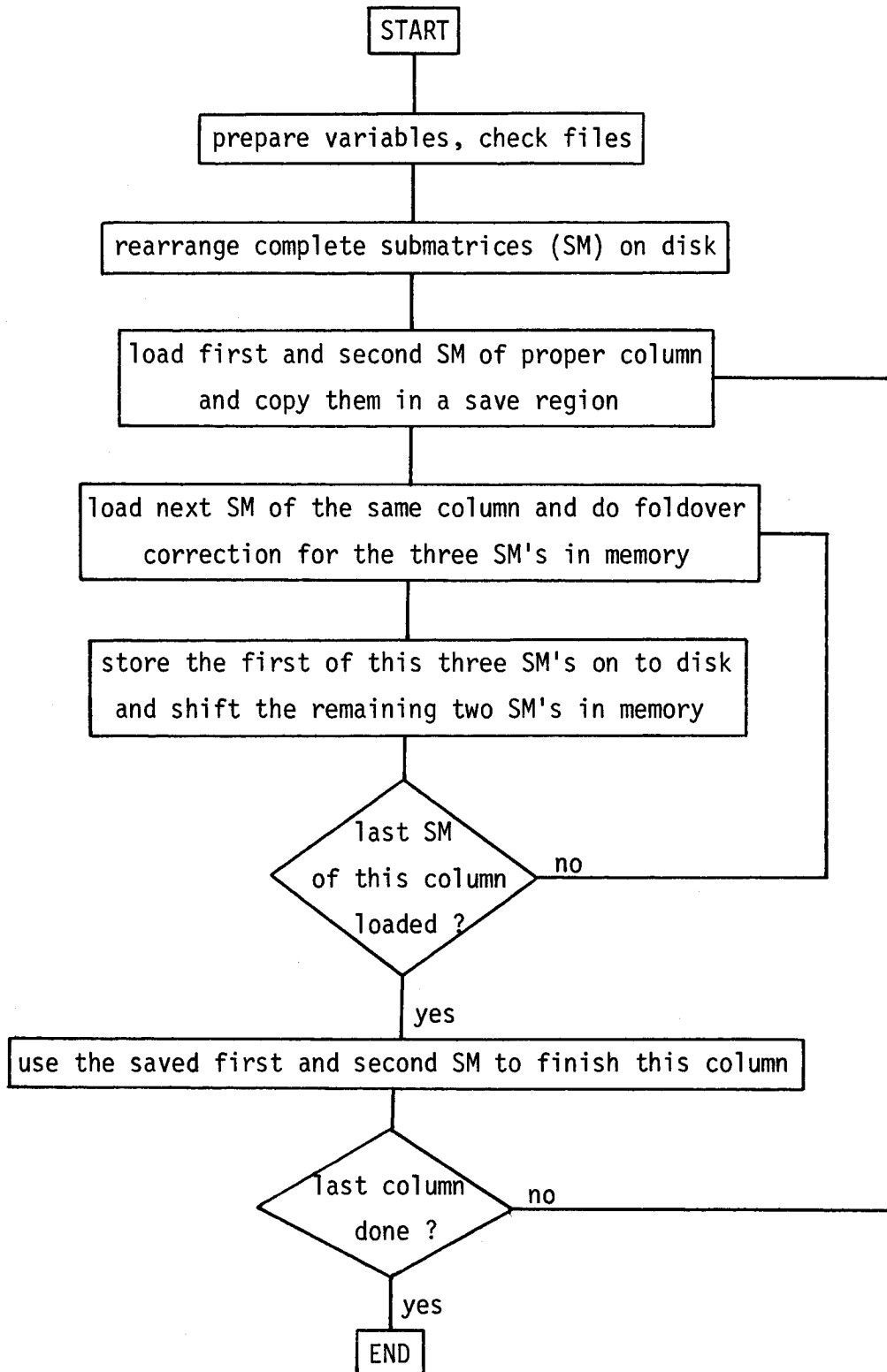
Das Programm "FOCSY" berechnet faltungskorrigierte Spektren (Kap. 2.5.4). Es wurde als integrierender Bestandteil des 2D Programms der Firma Bruker-Spectrospin geschrieben und es benützt die Submatrix-Struktur der auf Disk gespeicherten Daten. Das "FOCSY"-Programm ersetzt den Overlay.0003 des 2D Programms. Der 2-Buchstabencode PK (mit "C" bestätigen) startet die Berechnung des faltungskorrigierten Spektrums aus dem gefalteten Spektrum. Das ursprüngliche Datenfile wird durch das korrigierte File überschrieben. Das "FOCSY"-Programm berechnet die Korrektur unter der Voraussetzung, dass die digitale Auflösung in ω_1 - und in ω_2 -Richtung übereinstimmen. Ist die Auflösung in ω_1 -Richtung um einen Faktor 2^n besser, kann man das PK-Kommando mehrmals anwenden, um die gewünschte Korrektur zu erhalten.

Die Berechnung des faltungskorrigierten Spektrums verlangt grosse Datenumordnungen auf der Disk, die in zwei Schritten ausgeführt werden. Zuerst werden die grossen Verschiebungen durchgeführt, welche mit kompletten Submatrizen möglich sind. Im zweiten Schritt folgt dann die Datenverschiebung innerhalb der Submatrizen, um die Datenumordnung nach Gleichung (2.20) zu vervollständigen. In diesem Schritt genügt es, jeweils drei Submatrizen gleichzeitig im Kernspeicher des Computers bereitzustellen. Dies ist eine Folge der Submatrixgrösse von 64 x 32 Punkten und der gleichen digitalen Auflösung in ω_1 - und ω_2 -Richtung.

Mit Hilfe des Flussdiagramms (Tab. A1.1) und mit dem daran anschliessenden "Listing" lässt sich der Ablauf des Programms im Detail verfolgen. Zu diesem Zweck wurde das "Listing" mit sehr vielen Kommentaren versehen.

Tabelle A1.1

Flow chart for the FOCSY program.



FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

```
1 FOCYS  G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82

1      .TITLE %FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")<17><215><212>%
2      /
3      .HEADER %G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82
4
5
6
7      .MODULE FOCYS
8      .PREL
9      .EXTERN PARATR WRLINE ISTAR1 CRLF FPPINT CRLFWR
10     .EXTERN FCHAR FIXIN
11     106 .PAGESIZE 70.
12
13
14     /THIS PROGRAM CALCULATES A FOCYS SPECTRUM
15     /THE ORIGINAL WI- AND WR-FILE WILL BE REPLACED WITH THE
16     /CALCULATED SPECTRUM.
17     /DIMENSION OF SUBMATRIX USED IS 64. TIMES 32..
18     /PK: CALCULATES FOCYS
19
20
21     20000000 ABIT=1%22.
22
23     0'      6'EP
24     1'      13'FK
25     2'      0 0
26     3'      0 0
27     4'      0 0
28     5'      0 0
29
30
31
32
33
34
35     /MAIN PROGRAM
36     /*****
37
38
39     6'      0 EP,      0
40     7' 7000714      JMS @=CRLF
41     10' 7000712     JMS@=WRLINE
42     11' 674'      EPERR
43     12' 5000707     JMP @=ISTAR1
44
45     13'      0 FK,      0
46     14' 216002      MEMA (2
47     15' 5421003     APMM FK
48     16' 6000107     JMS HZPPT
49     17' 7000701     JMS @=CRLFWR
50     20' 664'      FOCST
51     21' 6000572     JMS YESNO
52     22' 6000001     JMS FOCYS
53     23' 5001011     JMP @PK
54
55     24'      0 FOCYS, 0
56     25' 6000004     JMS PRMAT      /PREPARE VARIABLES;CHECK FILES
57     26' 6000127     JMS EXSM      /REARRANGE SUBMATRICES ON DISK
58     27' 6000260     JMS SMFOC     /LOAD SM;CALCULATE FOLDOVER
59                                     /CORRECTION AND STORE BACK
60     30' 6000653     JMS ZERMEM     /ZERO MEMORY (SA UP TO SA+N2)
61     31' 5001006     JMP @FOCSY     /LEAVE OVERLAY
62
63
64
65
66     /SUBROUTINES
67     /*****
68
69
70     /PREPARE VARIABLES AND CONSTANTS
```

FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

2 FOCSY G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82

```
1
2 32' 0 PRMAT, 0
3 33' 1216450 MEMA FDT+(2*FDTSIZ)+4
4 34' 1260470 AOMA FDT+(3*FDTSIZ)+4
5 35' 4020541 JFM PRMA10 /FILE NOT FOUND
6 36' 1216450 MEMA FDT+(2*FDTSIZ)+4
7 37' 5412102 ACCM SECWR /STARTING SECTOR OF WR-FILE
8 40' 1216470 MEMA FDT+(3*FDTSIZ)+4
9 41' 5412101 ACCM SECWI /STARTING SECTOR OF WI-FILE
10 42' 5254655 LMQ =TABLSZ /TABLSZ=ROWDIM*COLDIM
11 43' 202000 ZERA
12 44' 471261 DIVD
13 45' 333 SECLN
14 46' 5406104 AXXM SUBSEC /# OF SECTORS USED FOR ONE SM (CDC)
15 47' 670010 SKIP ZAC
16 50' 5436102 MPOM SUBSEC /DIABLO DISK DRIVE
17 51' 1216147 MEMA SA
18 52' 5412071 ACCM SMBUF1 /FWA FOR FIRST SM
19 53' 5220644 APMA =TABLSZ
20 54' 5412070 ACCM SMBUF2 /FWA FOR SECOND SM
21 55' 5220642 APMA =TABLSZ
22 56' 5412067 ACCM SMBUF3 /FWA FOR THIRD SM
23 57' 216040 MEMA (COLDIM)
24 60' 5412057 ACCM DIVI
25 61' 1216223 MEMA N1
26 62' 40736030 TACMQZ
27 63' 471261 DIVD
28 64' 140' DIVI
29 65' 5406061 AXXM SMCOL /# OF SM PER COLUMN IN WR PLUS WI
30 66' 5216060 MEMA SMCOL
31 67' 40704002 RASH 2
32 70' 4040512 JFZ SMALER /N1<128
33 71' 216100 MEMA (ROWDIM)
34 72' 5412045 ACCM DIVI
35 73' 1216224 MEMA N2
36 74' 40704001 RASH 1
37 75' 1116207 MEMZ SM
38 76' 40704001 RASH 1
39 77' 40736030 TACMQZ
40 100' 471261 DIVD
41 101' 140' DIVI
42 102' 5406047 AXXM SMROW /# OF SM PER ROW
43 103' 5252043 LAX SMCOL
44 104' 202000 ZERA
45 105' 436060 MULT
46 106' 152' SMROW
47 107' 735230 TMQAC
48 110' 5412043 ACCM TOTSM /TOTAL # OF SUBMATRICES TO TREAT
49 111' 270000 ONEA /CORRECTION TO DO FOR
50 112' 1116141 MEMZ QUAF LG /DIFFERENT CASES :
51 113' 202000 ZERA /QF=1: SM=1, SM=0 SMCORR=1
52 114' 5412034 ACCM SMCORR / SM=-1 SMCORR=0
53 115' 1136207 MPOZ SM /QF=0: SM=1, SM=0 SMCORR=SMCORR
54 116' 5434032 MMOM SMCORR / SM=-1 SMCORR=SMCORR-1
55 117' 5216031 MEMA SMCORR
56 120' 660010 EXCT ZAC
57 121' 5001070 JMP @PRMAT
58 122' 5216024 MEMA SMCOL
59 123' 40704001 RASH 1
60 124' 5412024 ACCM SMCORR
61 125' 5001074 JMP @PRMAT
62
63 126' 0 HZPPT, 0
64 127' 7000567 JMS @=FPPINT
65 130' 2000127 FGETF F0 HZPPT1
66 131' 14000131 FSUB F0 HZPPT2
67 132' 300040003 FJMPZ F0 #+4
68 133' 4 FEXIT
69 134' 6000452 JMS MATERR
70 135' 4000001 JMP #12
```

FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

3 FOCSY G.WIDER, BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z, 9.3.82

```
1 136'      4      FEXIT
2 137' 5001012    JMP @HZPPT
3
4
5          /VARIABLES AND CONSTANTS
6
7 140'      0 DIVI, 0      /DIVISOR; DIFFERENT DEFINITIONS
8 141'      0 SECNUM, 0    /CALCULATED SECTOR FOR SM
9 142'      0 SECWR, 0     /FIRST SECTOR OF WR-FILE
10 143'      0 SECWI, 0    /FIRST SECTOR OF WI-FILE
11 144'      0 SMBUF1, 0   /FWA FOR FIRST SM
12 145'      0 SMBUF2, 0   /FWA FOR SECOND SM
13 146'      0 SMBUF3, 0   /FWA FOR THIRD SM
14 147'      0 SMCOL, 0    /# OF SM IN ONE COLUMN
15 150'      0 SMCOL2, 0   /# OF SM IN HALF A COLUMN
16 151'      0 SMCORR, 0   /CORRECTION FOR DECR
17 152'      0 SMROW, 0    /# OF SM IN ONE ROW
18 153'      0 SUBSEC, 0   /# OF SECTOR USED FOR ONE SM
19 154'      0 TOTSM, 0    /TOTAL # OF SM IN FILES TO TREAT
20 155' 70000000 WRITEN, 70000000 /WRITE ENABLE BITS
21
22
23          /REARRANGE SUBMATRICES ON DISK
24
25 156'      0 EXSM, 0
26 157' 5217006      MEMA SMROW
27 160' 5412117      ACCM CLCNT1      /COLCOUNTER STARTING AT HIGHEST VALUE
28 161' 5217016      MEMA SMBUF1      /FWA OF FIRST BLOCK IN MEMORY
29 162' 5412113      ACCM BUF1
30 163' 5217017      MEMA SMBUF2      /FWA OF SECOND BLOCK
31 164' 5412112      ACCM BUF2
32 165' 5216112      EXSM1, MEMA CLCNT1
33 166' 5412120      ACCM SMNUM1      /# OF FIRST SM OF A COLUMN
34 167' 5412116      ACCM SMNUM0      /BACKUP OF SMNUM1
35 170' 5234107      MMOA CLCNT1
36 171' 702001      LASH 1
37 172' 5221022      APMA SMCORR      /CORRECT FOR DIFFERENT CASES
38 173' 4040077      JPZ EXSM3      /IF DECREMENT=0 DO NEXT COLUMN
39 174' 5223026      AMMA SMCOL
40 175' 670100      SKIP AC23
41 176' 4001003      JMP #-2      /CALCULATE DECR MODULO SMCOL
42 177' 5221031      APMA SMCOL
43 200' 4040072      JPZ EXSM3      /IF DECR=0 DO NEXT COLUMN
44 201' 5412100      ACCM DECR
45 202' 5402076      ZERM CYCLNM
46 203' 726230      TACAXZ
47 204' 40732201      TRASH 1
48 205' 660010      EXCT ZAC
49 206' 5436072      MPOM CYCLNM      /HOW MANY TIMES IS 2 A FACTOR OF DECR
50 207' 660010      EXCT ZAC
51 210' 4001005      JMP #-4
52 211' 5216071      MEMA LASH0
53 212' 5220066      APMA CYCLNM
54 213' 5412001      ACCM #+2
55 214' 270000      ONEA
56 215' 702000      LASH 0      /CALCULATE CYCLNM=2**CYCLNM
57 216' 5412062      ACCM CYCLNM      /# OF CYCLES IN ONE COLUMN
58 217' 5255051      LMQ SMCOL
59 220' 202000      ZERA
60 221' 471261      DIVD
61 222' 301'      CYCLNM
62 223' 5406060      AXXM RWCNT1      /# OF DECREMENTS WITHIN ONE CYCLE
63 224' 5406060      AXXM RWCNT3      /BACKUP OF RWCNT1
64 225' 5216054      MEMA DECR
65 226' 726230      TACAXZ
66 227' 436060      MULT      /DECR=DECR*SMROW
67 230' 152'      SMROW
68 231' 735230      TMQAC
69 232' 5412047      ACCM DECR      /DECREMENT OF SMNUM1
70 233' 6000254      EXSM1A, JMS TRMAT      /LOAD FIRST SM OF COLUMN
```

FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

4 FOCSY G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82

```

1 234' 0 0
2 235' 20000307' SMNUM1+ABIT
3 236' 20000276' BUF1+ABIT
4 237' 5216047 EXSM2, MEMA SMNUM1 /CALCULATE NEXT SM NUMBER
5 240' 5222041 AMMA DECR /SMNUM1=SMNUM1-DECR
6 241' 670110 SKIP AC23 ZAC
7 242' 4000002 JMP #+3
8 243' 5221070 APMA TOTSM /MAKE SMNUM1 POSITIVE (MODULO TOTSM)
9 244' 4001004 JMP #-3
10 245' 5412041 ACCM SMNUM1 /# OF NEXT SM
11 246' 6000241 JMS TRMAT /READ NEXT SM
12 247' 0 0
13 250' 20000307' SMNUM1+ABIT
14 251' 20000277' BUF2+ABIT
15 252' 6000235 JMS TRMAT /STORE PREVIOUS LOADED SM AT
16 253' 1 1 /PLACE OF LAST ONE LOADED
17 254' 20000307' SMNUM1+ABIT
18 255' 20000276' BUF1+ABIT
19 256' 5216017 MEMA BUF1
20 257' 5656017 SWPAM BUF2 /BUF2 IS NOW BUF1
21 260' 5656015 SWPAM BUF1 /BUF1 IS NOW BUF2
22 261' 5534022 MMOMZ RWCNT1 /CYCLE FINISHED ?
23 262' 4001024 JMP EXSM2 /NO
24 263' 5216021 MEMA RWCNT3
25 264' 5412017 ACCM RWCNT1 /RESTORE RWCNT1 FOR NEXT CYCLE
26 265' 5217114 MEMA SMROW
27 266' 5220017 APMA SMNUM0
28 267' 5412017 ACCM SMNUM1 /FIRST SM OF NEXT CYCLE
29 270' 5412015 ACCM SMNUM0
30 271' 5534007 MMOMZ CYCLNM /ALL CYCLES DONE ?
31 272' 4001040 JMP EXSM1A /NO
32 273' 5534004 EXSM3, MMOMZ CLCNT1 /YES ; ALL COLUMNS DONE ?
33 274' 4001110 JMP EXSM1
34 275' 5001120 JMP @EXSM
35
36 276' 0 BUF1, 0 /=SMBUF1 OR SMBUF2
37 277' 0 BUF2, 0 /=SMBUF2 OR SMBUF1
38 300' 0 CLCNT1, 0 /COUNTER FOR WHOLE COLUMNS
39 301' 0 CYCLNM, 0 /# OF REPETITIONS TO DO IN ONE COL
40 302' 0 DECR, 0 /DECREMENT OF SMNUM1
41 303' 702000 LASH0, LASH 0 /LASH 0
42 304' 0 RWCNT1, 0 /COUNTER FOR POINTS WITHIN ONE COLUMN
43 305' 0 RWCNT3, 0 /BACKUPCOPY OF RWCNT1
44 306' 0 SMNUM0, 0 /BACKUPCOPY OF SMNUM1
45 307' 0 SMNUM1, 0 /NUMBER OF SM;START LEFT LOWER COR-
46 /NER OF WHOLE MATRIX,GOING UP ROWWISE
47
48
49 /LOAD SM;CALCULATE FOLDOVER CORRECTION;STORE SM BACK
50
51 310' 0 SMFOC, 0
52 311' 5217140 MEMA SMROW
53 312' 5412157 ACCM CLCNT2 /COUNTER FOR WHOLE COLUMNS
54 313' 5217145 SMFOC1, MEMA SMCOL
55 314' 5412170 ACCM RWCNT2 /COUNTER FOR SM WITHIN ONE COLUMN
56 315' 5216154 MEMA CLCNT2
57 316' 5412167 ACCM SMNUM2 /# OF SM TO BE LOADED
58 317' 5223146 AMMA SMROW
59 320' 5412166 ACCM SMNUM3 /# OF SM TO BE STORED
60 321' 6000166 JMS TRMAT /LOAD SM
61 322' 0 0
62 323' 20000506' SMNUM2+ABIT
63 324' 20000144' SMBUF1+ABIT
64 325' 5217154 MEMA SMROW
65 326' 5420157 APMM SMNUM2 /# OF NEXT SM TO LOAD
66 327' 5434155 MMOM RWCNT2
67 330' 6000157 JMS TRMAT /LOAD NEXT SM
68 331' 0 0
69 332' 20000506' SMNUM2+ABIT
70 333' 20000145' SMBUF2+ABIT

```

FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

5 FOCYS G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82

```
1 334' 5216363 MEMA =TABLSZ /TABLSZ=# OF POINTS IN ONE SM
2 335' 702001 LASH 1
3 336' 5221171 APMA SMBUF3
4 337' 5412140 ACCM PNTWR /FWA OF BACKUPCOPY OF SM1,SM2
5 340' 5217175 MEMA SMBUF1
6 341' 5412135 ACCM PNTRE /FWA OF SM1,SM2
7 342' 5216355 MEMA =TABLSZ
8 343' 702001 LASH 1
9 344' 5412126 ACCM COUNT0 /COPY SO MANY POINTS
10 345' 6000064 JMS RELOC /SAVE SM1 AND SM2 OF EACH COLUMN
11 346' 5434136 MMOM RWCNT2
12 347' 5217176 SMFOC2, MEMA SMROW
13 350' 5420135 APMM SMNUM2 /# OF NEXT SM TO BE LOADED
14 351' 5420135 APMM SMNUM3 /# OF NEXT SM TO BE STORED
15 352' 6000135 JMS TRMAT /STORE SM
16 353' 0 0
17 354' 20000506' SMNUM2+ABIT
18 355' 20000146' SMBUF3+ABIT
19 356' 216040 MEMA (COLDIM
20 357' 5412116 ACCM COUNT3 /# OF POINTS TO BE COPIED
21 360' 6000057 JMS EXCOR /DO FINAL FOLDOVER CORRECTION
22 361' 6000126 JMS TRMAT /STORE CORRECTED SM
23 362' 1 1
24 363' 20000507' SMNUM3+ABIT
25 364' 20000144' SMBUF1+ABIT
26 365' 5217222 MEMA SMBUF1
27 366' 5412110 ACCM PNTRE
28 367' 5412110 ACCM PNTWR /WRITING PNTR FOR TRANSFER IN CORE
29 370' 5216327 MEMA =TABLSZ /TABLSZ=# OF WORDS PER SM
30 371' 5412101 ACCM COUNT0
31 372' 5440100 DBMM COUNT0 /# OF POINTS TO BE COPIED
32 373' 5420103 APMM PNTRE /READING PNTR FOR TRANSFER IN CORE
33 374' 6000035 JMS RELOC /DO DATA TRANSFER IN CORE
34 375' 5534107 MMOMZ RWCNT2 /ALL SM OF PRESENT COLUMN LOADED ?
35 375' 4001030 JMP SMFOC2 /NO ; LOOK FOR NEXT SM OF THIS COLUMN
36 377' 5217232 MEMA SMBUF3 /YES ; GET BACK SM1,SM2 ;FINISH COL
37 400' 5412077 ACCM PNTWR /WRITING PNTR FOR TRANSFER IN CORE
38 401' 5412075 ACCM PNTRE
39 402' 5216315 MEMA =TABLSZ
40 403' 702001 LASH 1
41 404' 5412066 ACCM COUNT0 /# OF WORDS TO COPY
42 405' 5420071 APMM PNTRE /READING PNTR FOR TRANSFER IN CORE
43 406' 6000023 JMS RELOC /GET BACK SM1,SM2
44 407' 5217236 MEMA SMROW
45 410' 5420076 APMM SMNUM3
46 411' 216040 MEMA (COLDIM
47 412' 702001 LASH 1
48 413' 5412062 ACCM COUNT3
49 414' 6000023 JMS EXCOR /DO TWO REMAINING SM TOGETHER
50 415' 6000072 JMS TRMAT /STORE SECOND LAST SM OF THIS COLUMN
51 416' 1 1
52 417' 20000507' SMNUM3+ABIT
53 420' 20000144' SMBUF1+ABIT
54 421' 5217250 MEMA SMROW
55 422' 5420064 APMM SMNUM3
56 423' 6000064 JMS TRMAT /STORE LAST SM OF THIS COLUMN
57 424' 1 1
58 425' 20000507' SMNUM3+ABIT
59 426' 20000145' SMBUF2+ABIT
60 427' 5534042 MMOMZ CLCNT2 /LAST COLUMN DONE
61 430' 4001116 JMP SMFOC1 /NO
62 431' 5001122 JMP @SMFOC
63
64 /RELOCATE SUBMATRICES (COPY SM(I) ONTO SM(I-1)) IN CORE
65 432' 0 RELOC, 0 /DEFINE PNTRE,PNTWR,COUNT0
66 433' 7216043 RELOC1, MEMA ^PNTRE /READING POINTER
67 434' 7412043 ACCM ^PNTWR /WRITING POINTER
68 435' 5534035 MMOMZ COUNT0 /ALL POINTS COPIED
69 436' 4001004 JMP RELOC1 /NO
70 437' 5001006 JMP @RELOC
```


FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

6 FOCSY G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82

```
1
2
3      /CALCULATE FOLDOVER CORRECTION IN CORE
4      440'      0 EXCOR, 0      /NEEDS DEFINITION OF COUNT3
5      441' 5217276      MEMA SMBUF1
6      442' 5412041      ACCM PNTWR3
7      443' 5412037      ACCM PNTRE3
8      444' 216100      MEMA (ROWDIM
9      445' 5450026      AMOM COUNT1
10     446' 5436035 EXCOR1, MPOM PNTWR3      /FWA FOR WRITING
11     447' 5216034      MEMA PNTWR3
12     450' 5412031      ACCM PNTWR2      /POINTER FOR WRITING
13     451' 5216031      MEMA PNTRE3
14     452' 220100      APMA (ROWDIM
15     453' 246000      APOA
16     454' 5412026      ACCM PNTRE3
17     455' 5412023      ACCM PNTRE2      /POINTER FOR READING
18     456' 5216017      MEMA COUNT3
19     457' 5412015      ACCM COUNT2      /# OF POINTS TO BE SHIFTED
20     460' 6216020 EXCOR2, MEMA @PNTRE2      /GET DATAPPOINT
21     461' 6412020      ACCM @PNTWR2      /STORE IT AT PROPER POSITION
22     462' 216100      MEMA (ROWDIM
23     463' 5420015      APMM PNTRE2      /NEXT POINT TO BE COPIED
24     464' 5420015      APMM PNTWR2      /STORE IT HERE
25     465' 5534007      MMOMZ COUNT2      /ALL 32 POINTS OF A SM COL DONE ?
26     466' 4001007      JMP EXCOR2
27     467' 5534004      MMOMZ COUNT1      /ALL 64 COL OF THE SUBMATRIX DONE ?
28     470' 4001023      JMP EXCOR1
29     471' 5001032      JMP @EXCOR
30
31     472'      0 CLCNT2, 0      /COUNTER FOR WHOLE COLUMNS
32     473'      0 COUNT0, 0      /# OF POINTS TO COPY
33     474'      0 COUNT1, 0      /COUNTER
34     475'      0 COUNT2, 0      /COUNTER
35     476'      0 COUNT3, 0      /# OF POINTS TO COPY IN ONE COL
36     477'      0 PNTRE, 0      /READING POINTER
37     500'      0 PNTWR, 0      /WRITING POINTER
38     501'      0 PNTRE2, 0      /POINTER
39     502'      0 PNTWR2, 0      / "
40     503'      0 PNTRE3, 0      / "
41     504'      0 PNTWR3, 0      / "
42     505'      0 RWCNT2, 0      /COUNTER FOR SM IN ONE COLUMN
43     506'      0 SMNUM2, 0      /# OF SM TO LOAD
44     507'      0 SMNUM3, 0      /# OF SM TO STORE
45
46
47      /TRANSFER SUBMATRIX FROM .WI-FILE
48
49     510'      0 TRMAT, 0
50     511' 7000204      JMS @=PARATR
51     512'      3      3
52     513'      0 TRM10, 0      /0=READ ; 1=WRITE
53     514'      0 TRM20, 0      /# OF SM
54     515'      0 TRM30, 0      /FWA OF CORE BUFFER
55
56      /CALCULATE SECTOR NUMBER
57     516' 5217003      MEMA TRM20
58     517' 5217355      MEMA SECWI
59     520' 5412161      ACCM TRM5      /ASSUME WI
60     521' 5217346      MEMA TOTSM
61     522' 40704001      RASH 1
62     523' 5225010      MMAA TRM20
63     524' 660110      EXCT AC23 ZAC
64     525' 4000003      JMP #+4      /JUMP: SM WILL BE STORED IN WI-FILE
65     526' 5413013      ACCM TRM20
66     527' 5217366      MEMA SECWR
67     530' 5412151      ACCM TRM5      /SM WILL BE STORED IN WR-FILE
68     531' 5235016      MMOA TRM20
69     532' 726230      TACAXZ
70     533' 436060      MULT
```

FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

7 FOCYS G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82

```
1 534' 153' SUBSEC /(# OF SM - 1)*(# OF SECTORS PER SM)
2 535' 735230 TMQAC
3 536' 5220143 APMA TRM5 /ADD TO FIRST SECTOR OF MATRIX
4 537' 5413377 ACCM SECNUM /FIRST SECTOR OF THIS MATRIX
5
6 /DO TRANSFER
7 540' 216444 MEMA (FDT+(2*FDTSIZ) /ASSUME WR
8 541' 1252450 LAX FDT+(2*FDTSIZ)+4
9 542' 5344137 MMXXZ TRM5 /SKIP IF WR
10 543' 216464 MEMA (FDT+(3*FDTSIZ) /IT IS WI
11 544' 10623701 LOADX0
12 545' 1234342 MMOA DUR1
13 546' 11460000 AOMM 0 IX0 /SET DRIVE
14 547' 5217407 MEMA SECNUM
15 550' 11412012 ACCM 12 IX0 /SET SECTOR NUMBER
16 551' 5217035 MEMA TRM30
17 552' 11412011 ACCM 11 IX0 /SET STARTING ADDRESS
18 553' 5234144 MMOA =TABLSZ /TABLSZ=# OF WORDS IN ONE SM
19 554' 11412013 ACCM 13 IX0 /SET WORDCOUNT
20 555' 5217401 MEMA WRITEN
21 556' 11460015 AOMM 15 IX0 /SET WRITE ENABLE BITS
22 557' 5217045 MEMA TRM10 /READ OR WRITE ?
23 560' 5412001 ACCM #+2 /SET EN-CODE
24 561' 7000133 JMS @=SVRN
25 562' 0 0 /EN-CODE INSERTED HERE
26 563' 4000007 JMP TRM200 /ERROR EXIT
27 564' 11216014 TRM300, MEMA 14 IX0 /GET STATUS
28 565' 40704026 RASH 22. /REMOVE UNWANTED BITS
29 566' 5041057 JPZ @TRMAT /DONE
30 567' 7000125 JMS @=SVRN /WAIT A BIT
31 570' 2 2
32 571' 670001 STOP /IMPOSSIBLE ERROR
33 572' 4001007 JMP TRM300
34
35 573' 7000130 TRM200, JMS @=CRLF
36 574' 7000126 JMS @=WRLINE
37 575' 623' TRM210
38 576' 5000123 JMP @=ISTAR1
39
40 577' 7000124 PRMA10, JMS @=CRLF
41 600' 7000122 JMS @=WRLINE
42 601' 634' PRMA11
43 602' 5000117 JMP @=ISTAR1
44
45 603' 7000120 SMALER, JMS @=CRLF
46 604' 7000116 JMS @=WRLINE
47 605' 642' SMALT
48 606' 5000113 JMP @=ISTAR1
49
50 607' 0 MATERR, 0
51 610' 7000113 JMS @=CRLF
52 611' 7000111 JMS @=WRLINE
53 612' 652' MATTX
54 613' 5001005 JMP @MATERR
55
56 614' 0 YESNO, 0
57 615' 7000076 JMS @=FCHAR
58 616' 4001002 JMP #-1
59 617' 122303 AMNZ ("C
60 620' 5000101 JMP @=ISTAR1
61 621' 7000102 JMS @=CRLF
62 622' 5001007 JMP @YESNO
63
64 623' 50151725 TRM210, .TEXT * SUBMATRIX TRANSFER ERROR *
65 624' 60546701
66 625' 65151311
67 626' 66120324
68 627' 64540716
69 630' 64743305
70 631' 64520305
```

FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

8 FOCSY G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82

```
1 632'64551317
2 633'64520000
3 634'50143311 PRMA11, .TEXT * FILE NOT FOUND *
4 635'63142640
5 636'63547724
6 637'50143317
7 640'65347304
8 641'50000000
9 642'50147261 SMALT, .TEXT * N1 IS SMALER THAN 128 *
10 643'50144723
11 644'50151715
12 645'60346305
13 646'64520324
14 647'62140716
15 650'50130662
16 651'56120000
17 652'50144332 MATTX, .TEXT * HZ/PT 1 NOT EQUAL HZ/PT 2 *
18 653'53750324
19 654'50130640
20 655'63547724
21 656'50142721
22 657'65340714
23 660'50144332
24 661'53750324
25 662'50131240
26 663' 0
27 664'50143317 FOCST, .TEXT * FOCSY CALCULATION ? : *
28 665'60751731
29 666'50141701
30 667'63141725
31 670'63140724
32 671'62347716
33 672'50137640
34 673'56520000
35 674'41720306 EPERR, .TEXT X<007> FOCSY-OVERLAY %
36 675'63741723
37 676'66326717
38 677'65542722
39 700'63140731
40 701'50000000
41
42 702' 0 TRMS, 0 /FIRST SECTOR OF WR- OR WI-FILE
43 703' 0 PNTZ, 0 /POINTER FOR ZERMEM
44
45
46 /ZERO MEMORY
47
48 704' 0 ZERMEM, 0
49 705' 1216147 MEMA SA
50 706' 5413004 ACCM PNTZ
51 707' 1216224 MEMA N2
52 710' 7403006 ZERM ^PNTZ
53 711' 350000 AMOAZ
54 712' 4001003 JMP #-2
55 713' 5001010 JMP @ZERMEM
56
57 714'77777777 .LTOrg
58 715' 13
59 716'77777777
60 717'77777777
61 720' 4000
62 721'77777777
63 722'77777777
64 723'77777777
65 724'77777777
.END
```

FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

9 FOCSY G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82

ABIT		20000000	1/21	4/ 2	4/ 3	4/13	4/14
			4/17	4/18	4/62	4/63	5/ 5
			5/ 6	5/17	5/18	5/24	5/25
			5/52	5/53	5/58	5/59	
BUF1		276'	3/29	4/ 3	4/18	4/19	4/21
			4/36				
BUF2		277'	3/31	4/14	4/20	4/37	
CLCNT1		300'	3/27	3/32	3/35	4/32	4/38
CLCNT2		472'	4/53	4/56	5/60	6/31	
COLDIM		40	2/23	5/19	5/46		
COUNT0		473'	5/ 9	5/30	5/31	5/41	6/ 4
			6/32				
COUNT1		474'	6/ 9	6/27	6/33		
COUNT2		475'	6/19	6/25	6/34		
COUNT3		476'	5/20	5/48	6/18	6/35	
CRLF	XT	724	1/ 8	1/40	7/35	7/40	7/45
			7/51	7/61			
CRLFWR	XT	721	1/ 8	1/49			
CYCLNM		301'	3/45	3/49	3/53	3/57	3/61
			4/30	4/39			
DECR		302'	3/44	4/ 0	4/ 5	4/ 5	4/40
DIVI		140'	2/24	2/28	2/34	2/41	3/ 7
DURI		342	7/12				
EP		6'	1/23	1/39			
EPERR		674'	1/42	8/35			
EXCOR		440'	5/21	5/49	6/ 4	6/29	
EXCOR1		446'	6/10	6/28			
EXCOR2		460'	6/20	6/26			
EXSM		156'	1/57	3/25	4/34		
EXSM1		165'	3/32	4/33			
EXSM1A		233'	4/ 6	4/31			
EXSM2		237'	4/ 4	4/23			
EXSM3		273'	3/38	3/43	4/32		
FCHAR	XT	714	1/ 9	7/57			
FDT		404	2/ 3	2/ 4	2/ 6	2/ 8	7/ 7
			7/ 8	7/10			
FDTsiz		20	2/ 3	2/ 4	2/ 6	2/ 8	7/ 7
			7/ 8	7/10			
FIXIN	XT	77777777	1/ 9				
FOCST		664'	1/50	8/27			
FOCSY		24'	1/ 6	1/52	1/55	1/61	
FPINT	XT	717	1/ 8	3/ 0			
HZPPT		126'	1/48	2/63	3/ 2		
HZPPT1		127	3/ 1				
HZPPT2		131	3/ 2				
ISTAR1	XT	722	1/ 8	1/43	7/38	7/43	7/48
			7/60				
LASH0		303'	3/52	4/41			
MATERR		607'	3/ 5	7/50	7/54		
MATX		652'	7/53	8/17			
N1		223	2/25				
N2		224	2/35	8/51			
PARATR	XT	716	1/ 8	6/50			
PK		13'	1/24	1/45	1/47	1/53	
PNTRE		477'	5/ 6	5/27	5/32	5/38	5/42
			6/ 2	6/36			
PNTRE2		501'	6/17	6/20	6/23	6/38	
PNTRE3		503'	6/ 7	6/13	6/16	6/40	
PNTWR		500'	5/ 4	5/28	5/37	6/ 3	6/37
PNTWR2		502'	6/12	6/21	6/24	6/39	
PNTWR3		504'	6/ 6	6/10	6/11	6/41	
PNTZ		703'	8/43	8/50	8/52		
PRMAT		32'	1/56	2/ 2	2/57	2/61	
PRMA10		577'	2/ 5	7/40			
PRMA11		634'	7/42	8/ 3			
QUAFLB		141	2/50				
RELOC		432'	5/10	5/33	5/43	6/ 1	6/ 6
RELOC1		433'	6/ 2	6/ 5			
ROWDIM		100	2/33	6/ 8	6/14	6/22	
RWCNT1		304'	3/62	4/22	4/25	4/42	

FOLDOVER CORRECTION ("FOCSY")

10 FOCYSY G.WIDER , BIOPHYSICS DEPARTMENT ETH-Z , 9.3.82

RWCNT2	505'	4/55	5/ 2	5/11	5/34	6/42
RWCNT3	305'	3/63	4/24	4/43		
SA	147	2/17	8/49			
SECLN	333	2/13				
SECNUM	141'	3/ 8	7/ 4	7/14		
SECWI	143'	2/ 9	3/10	6/58		
SECWR	142'	2/ 7	3/ 9	7/ 2		
SM	207	2/37	2/53			
SMALER	603'	2/32	7/45			
SMALT	642'	7/47	8/ 9			
SMBUF1	144'	2/18	3/11	3/28	4/63	5/ 5
		5/25	5/26	5/53	6/ 5	
SMBUF2	145'	2/20	3/12	3/30	5/ 6	5/59
SMBUF3	146'	2/22	3/13	5/ 3	5/18	5/36
SMCOL	147'	2/29	2/30	2/43	2/58	3/14
		3/39	3/42	3/58	4/54	
SMCOL2	150'	3/15				
SMCORR	151'	2/52	2/54	2/55	2/60	3/16
		3/37				
SMFOC	310'	1/58	4/51	5/62		
SMFOC1	313'	4/54	5/61			
SMFOC2	347'	5/12	5/35			
SMNUM0	306'	3/34	4/27	4/29	4/44	
SMNUM1	307'	3/33	4/ 2	4/ 4	4/10	4/13
		4/17	4/28	4/45		
SMNUM2	506'	4/57	4/62	5/ 1	5/ 5	5/13
		5/17	6/43			
SMNUM3	507'	4/59	5/14	5/24	5/45	5/52
		5/55	5/58	6/44		
SMROW	152'	2/42	2/46	3/17	3/26	4/ 3
		4/26	4/52	4/58	5/ 0	5/12
		5/44	5/54			
SUBSEC	153'	2/14	2/16	3/18	7/ 1	
SVRN	13	7/24	7/30			
TABLSZ	4000	2/10	2/19	2/21	5/ 1	5/ 7
		5/29	5/39	7/18		
TOTSM	154'	2/48	3/19	4/ 8	6/60	
TRMAT	510'	4/ 6	4/11	4/15	4/60	5/ 3
		5/15	5/22	5/50	5/56	6/49
		7/29				
TRM10	513'	6/52	7/22			
TRM20	514'	6/53	6/57	6/62	7/ 1	7/ 4
TRM200	573'	7/26	7/35			
TRM210	623'	7/37	8/ 0			
TRM30	515'	6/54	7/16			
TRM300	564'	7/27	7/33			
TRM5	702'	6/59	7/ 3	7/ 3	7/ 9	8/42
WRITEN	155'	3/20	7/20			
WRLINE	XT 723	1/ 8	1/41	7/36	7/41	7/46
		7/52				
YESNO	614'	1/51	7/56	7/62		
ZERMEM	704'	1/60	8/48	8/55		

ANHANG A 2

NOESY - SPEKTREN DES AUF MICELLEN GEBUNDENEN GLUCAGONS

Die in diesem Anhang gezeigten H_2O NOESY-Spektren wurden gemäss den in Kap. 5.2.1 beschriebenen experimentellen Einzelheiten gemessen. Die verwendeten Mischzeiten τ_m betragen 30 ms, 50 ms, 80 ms, 130 ms und 200 ms. Die mit Nullen auf 1024×2048 Datenpunkte aufgefüllten FID-Datenmatrizen wurden in t_1 -Richtung mit einer Sinus- und in t_2 -Richtung mit einer Sinusquadrat-Funktion multipliziert (Kap. 2.5.2). Die Phasenverschiebung $t_o / (t_s + t_o)$ (Gleichungen (2.17) und (2.18)) für die Sinusfunktion betrug $1 / 64$ und für die Sinusquadratfunktion $1 / 128$. Die digitale Auflösung in den gezeigten Spektren beträgt in beiden Richtungen 7.5 Hz/Punkt.

Für jedes der fünf Spektren sind drei Ausschnitte gezeigt, die zusammen den ganzen ω_1 -Frequenzbereich umfassen. In ω_2 -Richtung ist nur der Bereich der Amidprotonen und der aromatischen Protonen zwischen 6.7 ppm und 8.8 ppm gezeigt. Alle Spektren sind mit denselben Höhenlinien gezeichnet, die den folgenden Zahlenwerten entsprechen: 2'000, 2'500, 3'000, 3'500, 4'000, 5'000, 6'250, 7'500, 8'750, 10'000, 12'500, 15'000, 20'000, 25'000, 35'000, 50'000, 75'000, 100'000. Die Höhenlinien sind also nicht äquidistant. Bei jeder Figur ist die Mischzeit τ_m des Spektrums angegeben. Die für kurze τ_m auftretenden, starken Störungen in ω_1 -Richtung sind in Kap. 5.2.1 diskutiert.

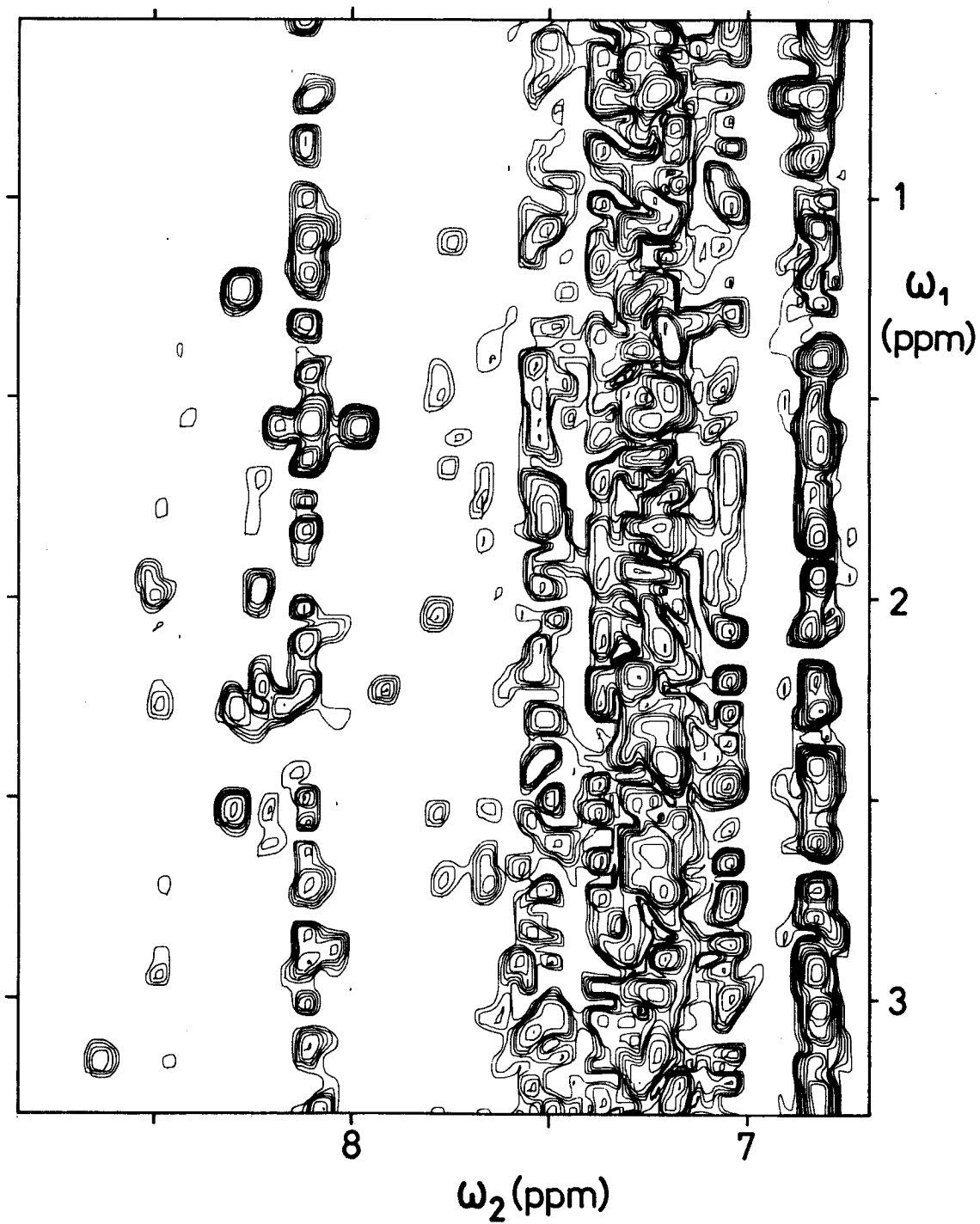


Fig. A2.1A

$\tau_m = 30$ ms

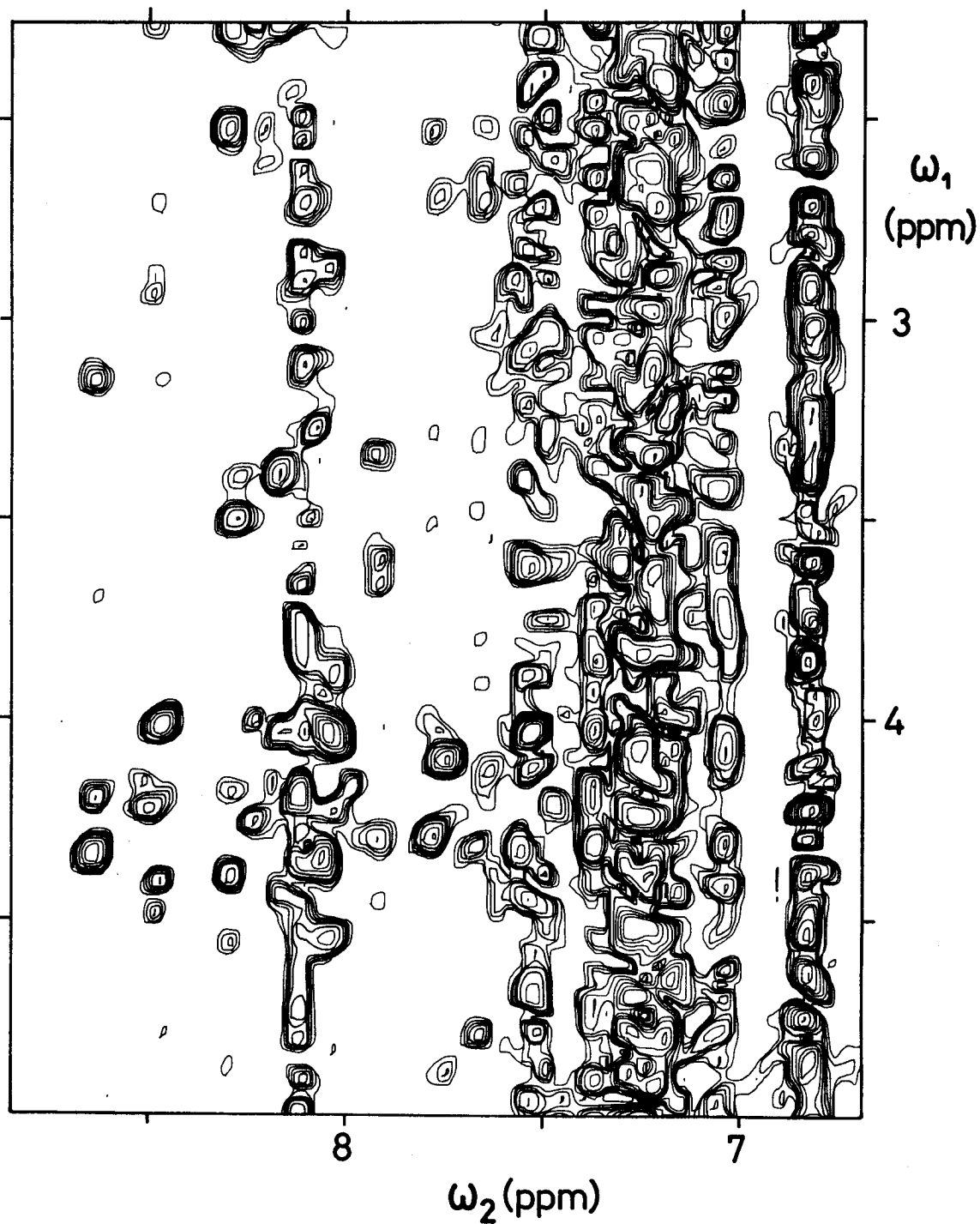


Fig. A2.1B

$\tau_m = 30$ ms

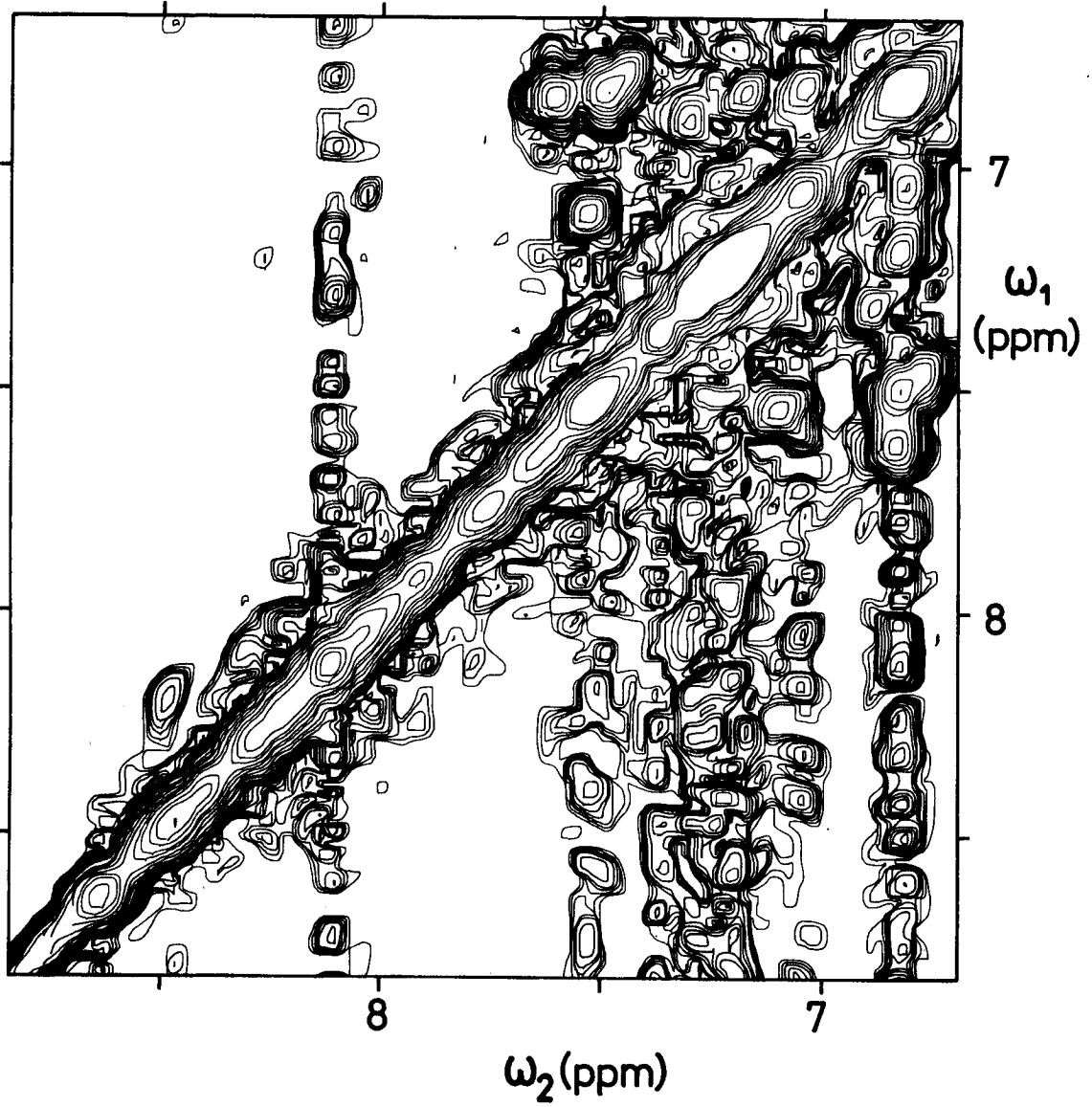


Fig. A2.1C

$\tau_m = 30$ ms

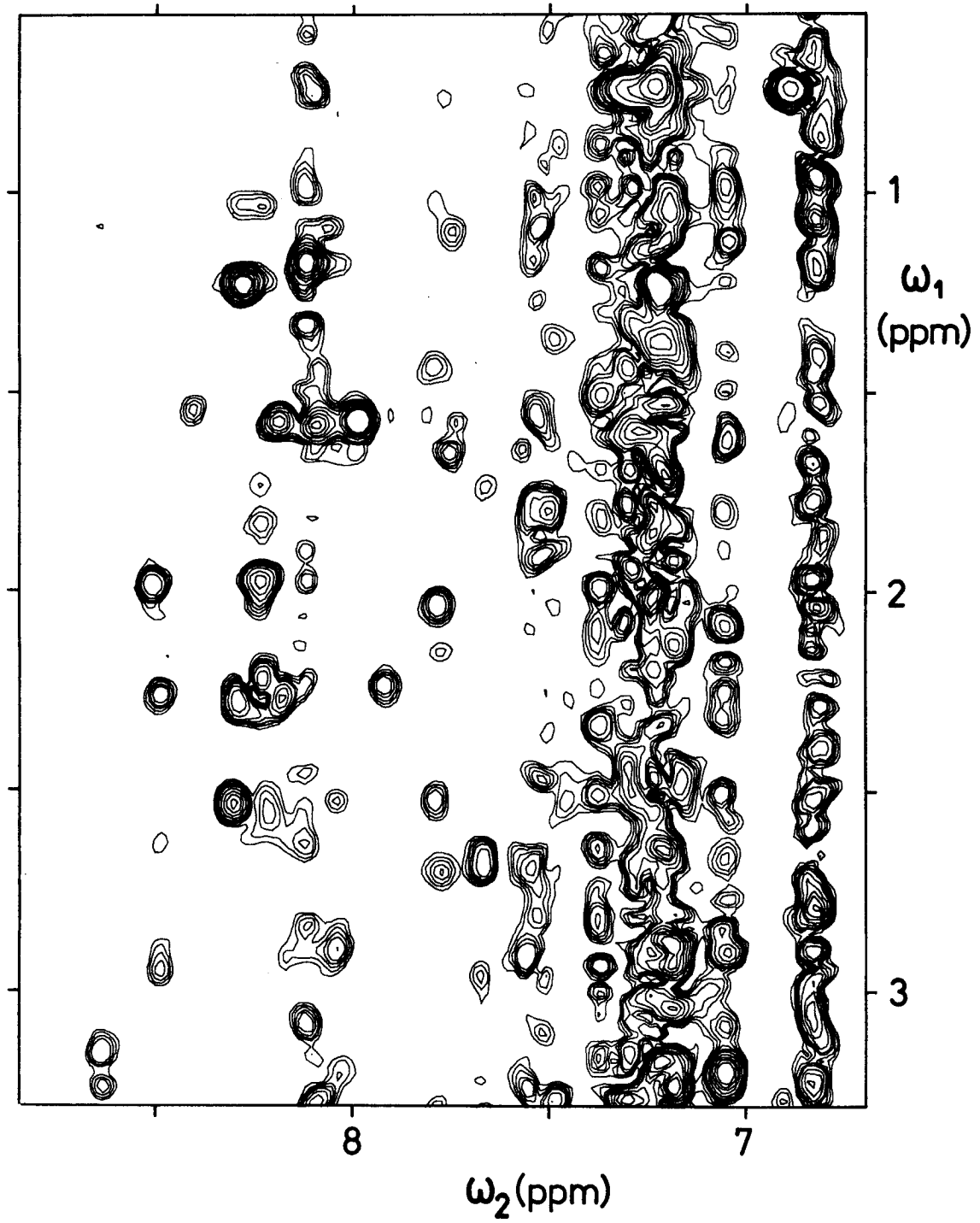


Fig. A2.2A

$\tau_m = 50$ ms

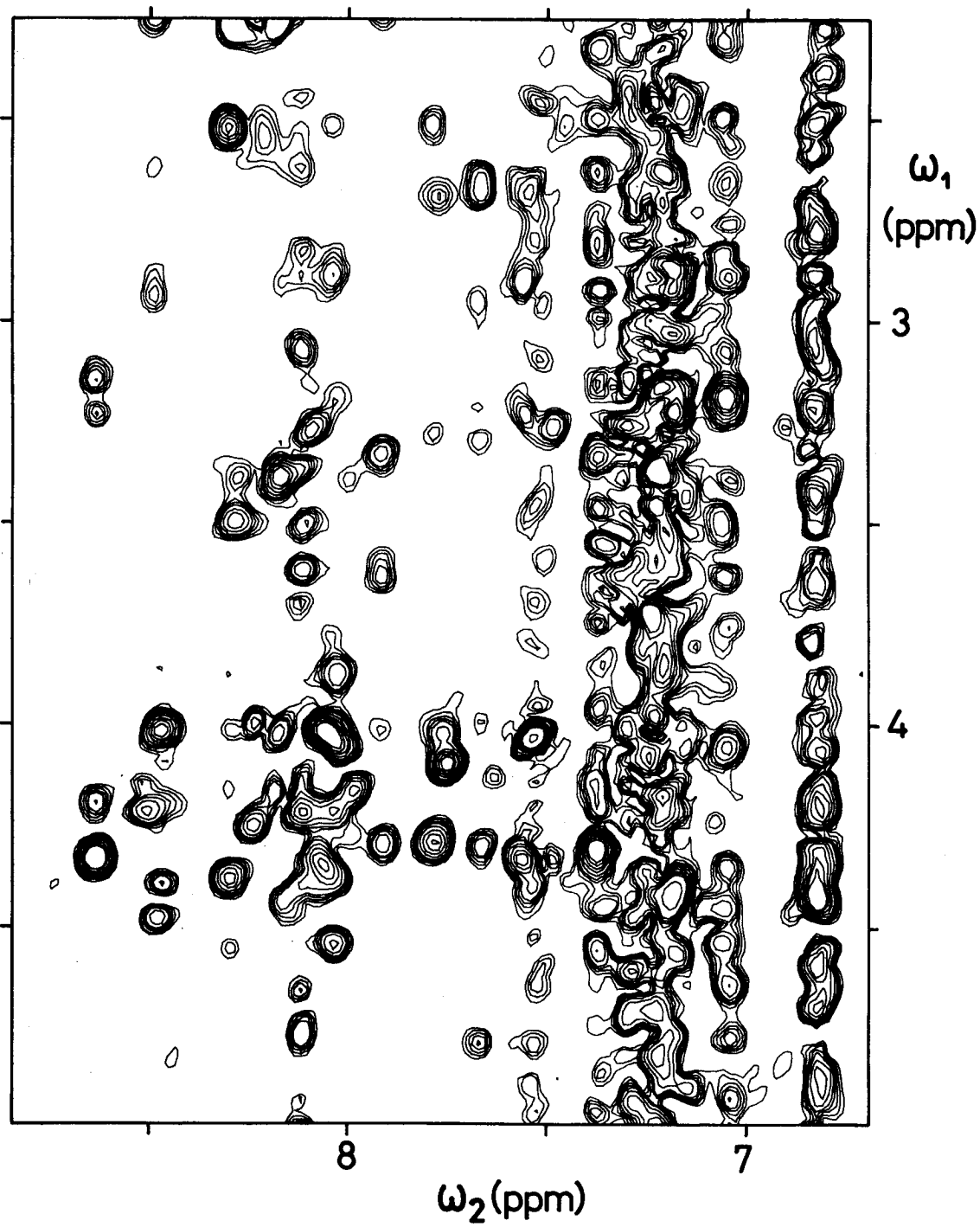


Fig. A2.2B

$\tau_m = 50$ ms

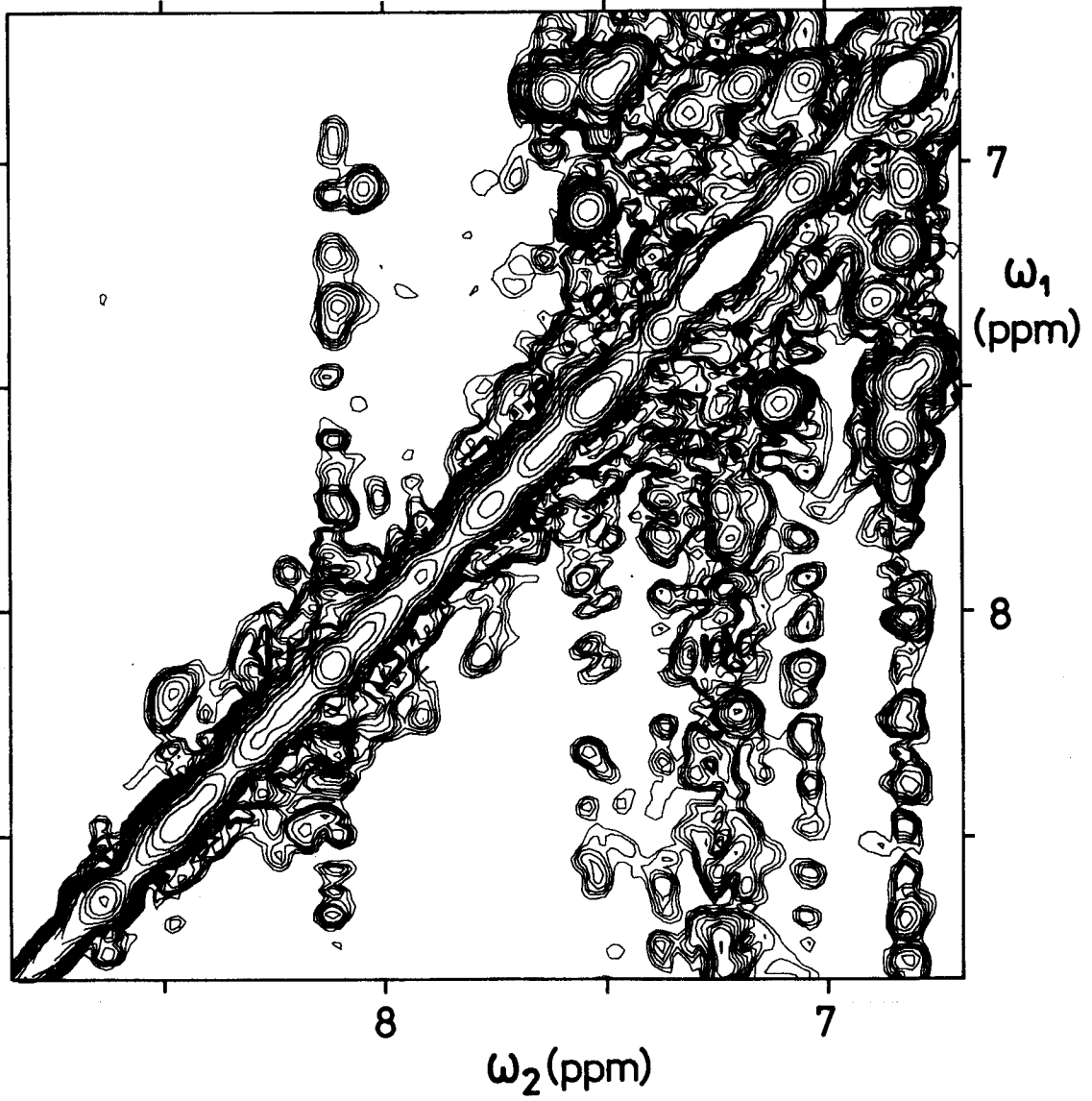


Fig. A2.2C

$\tau_m = 50$ ms

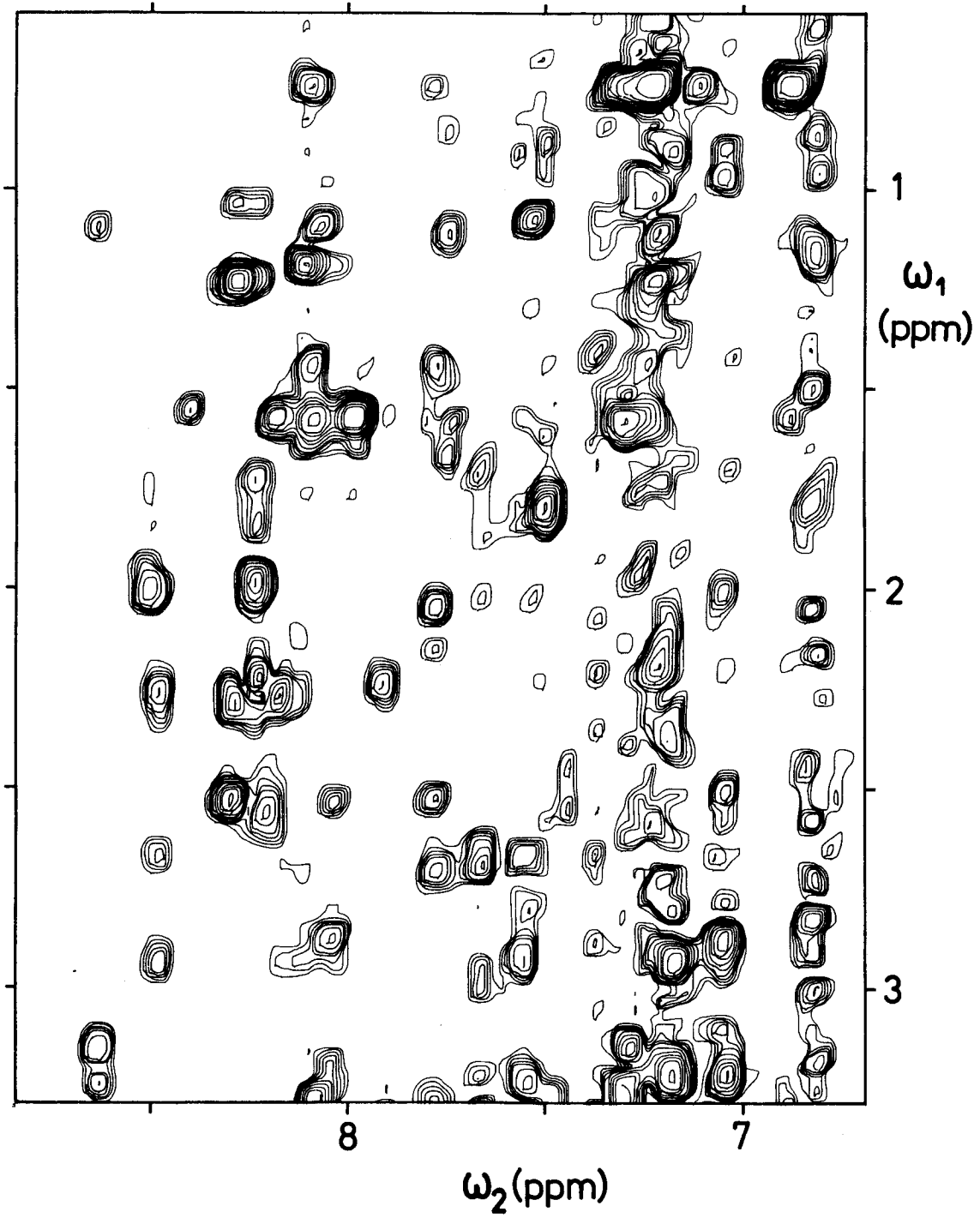


Fig. A2.3A

$\tau_m = 80$ ms

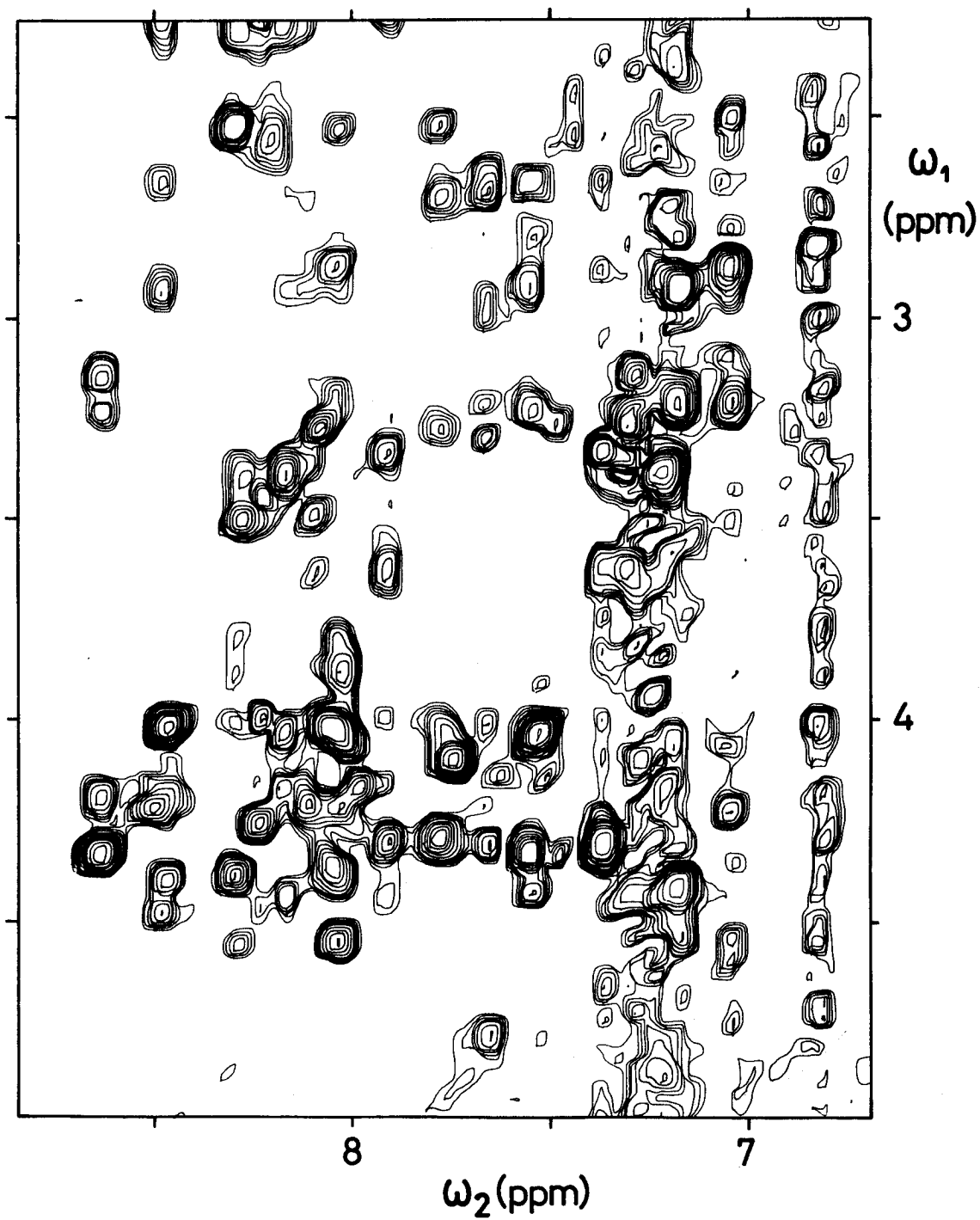


Fig. A2.3B

$\tau_m = 80$ ms

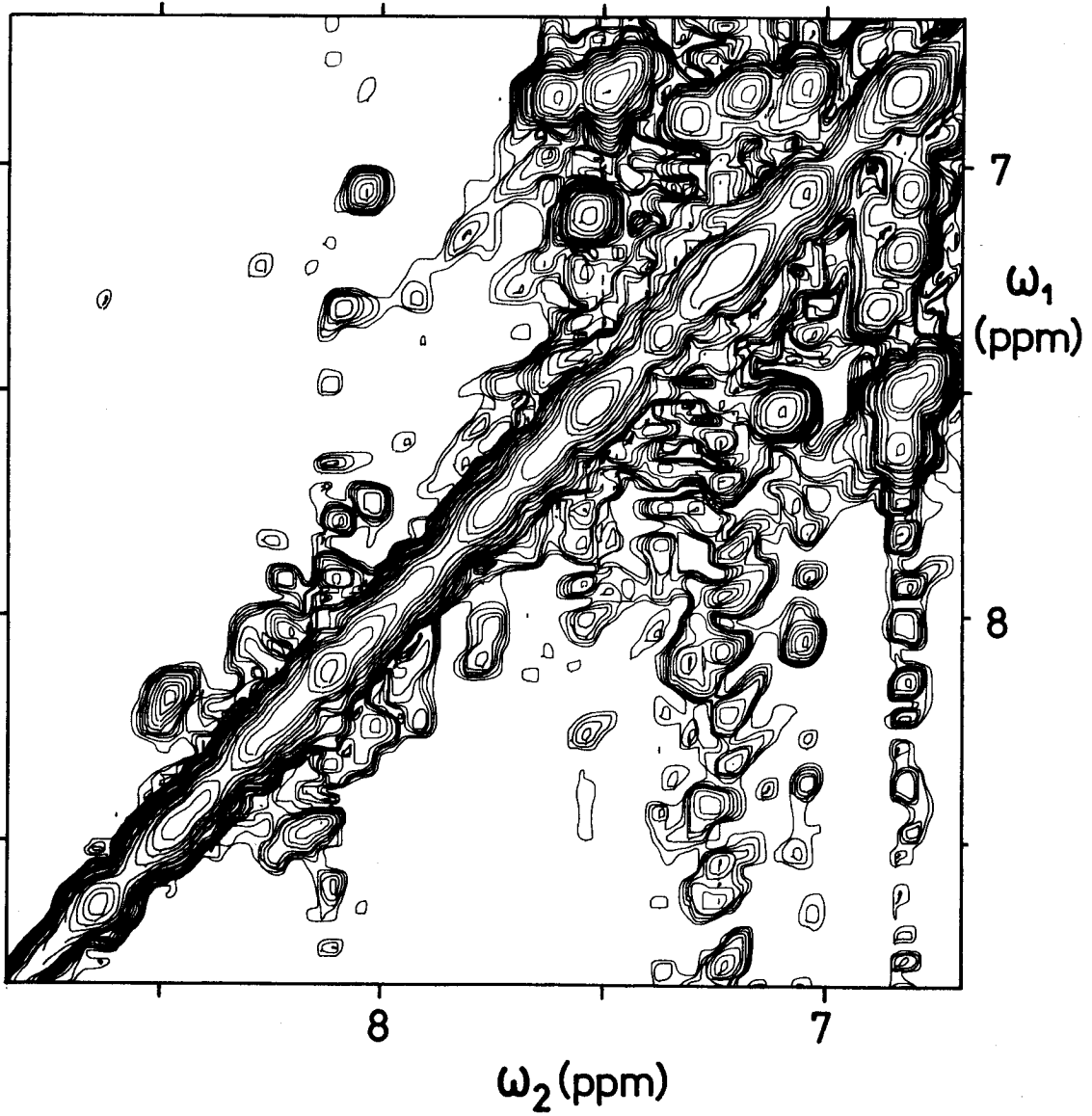


Fig. A2.3C

$\tau_m = 80$ ms

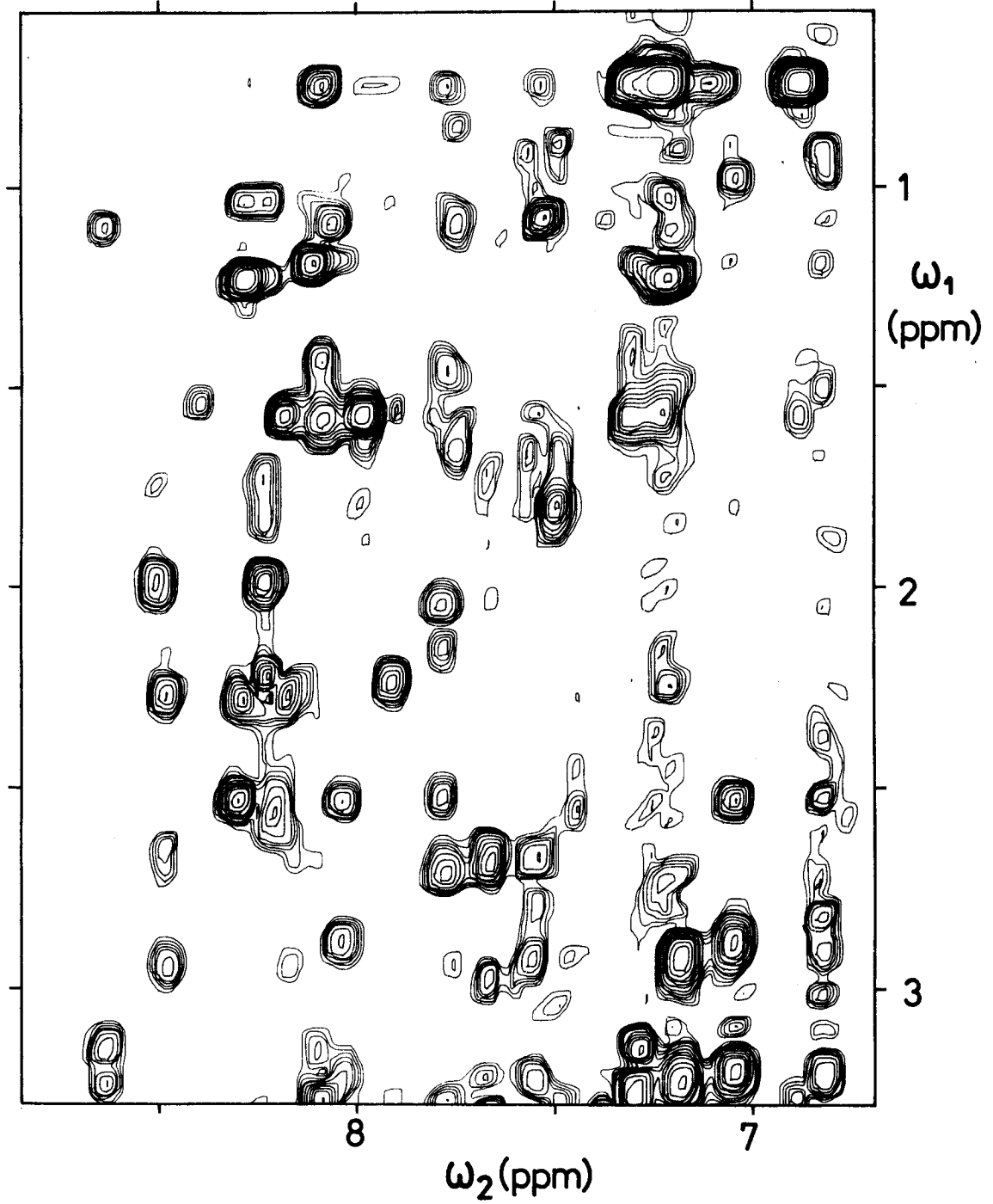


Fig. A2.4A

$\tau_m = 130$ ms

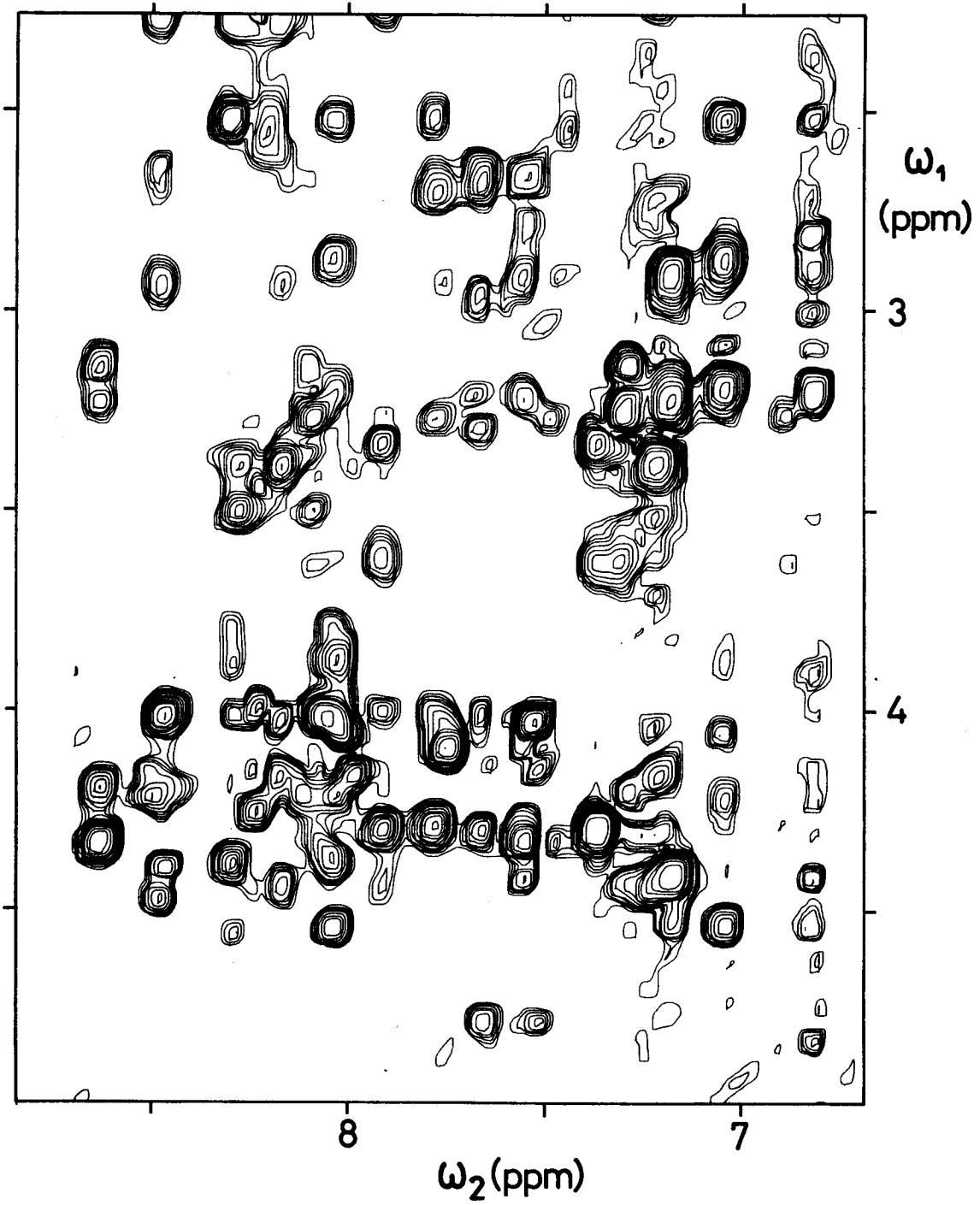


Fig. A2.4B

$\tau_m = 130$ ms

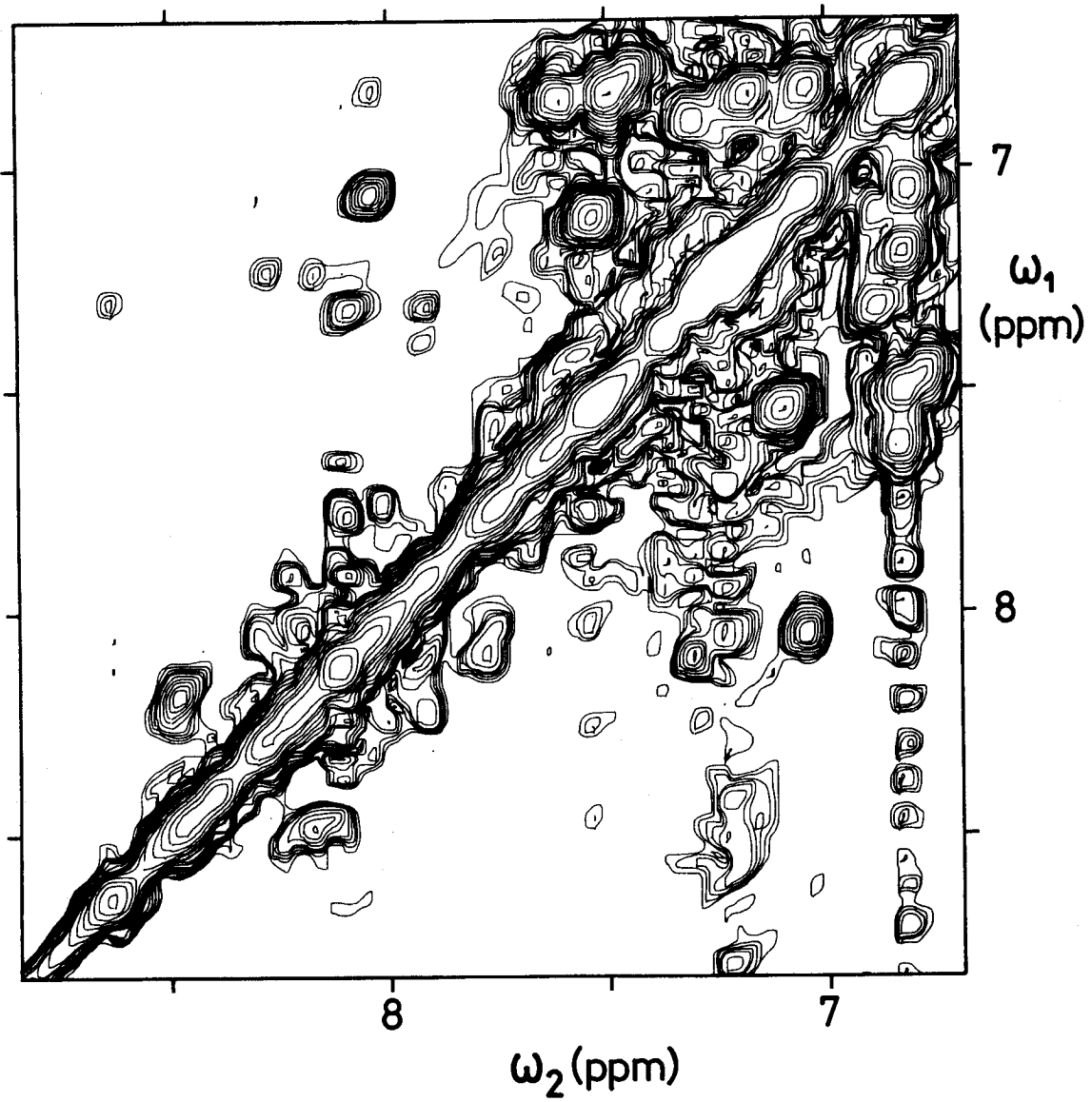


Fig. A2.4C

$\tau_m = 130$ ms

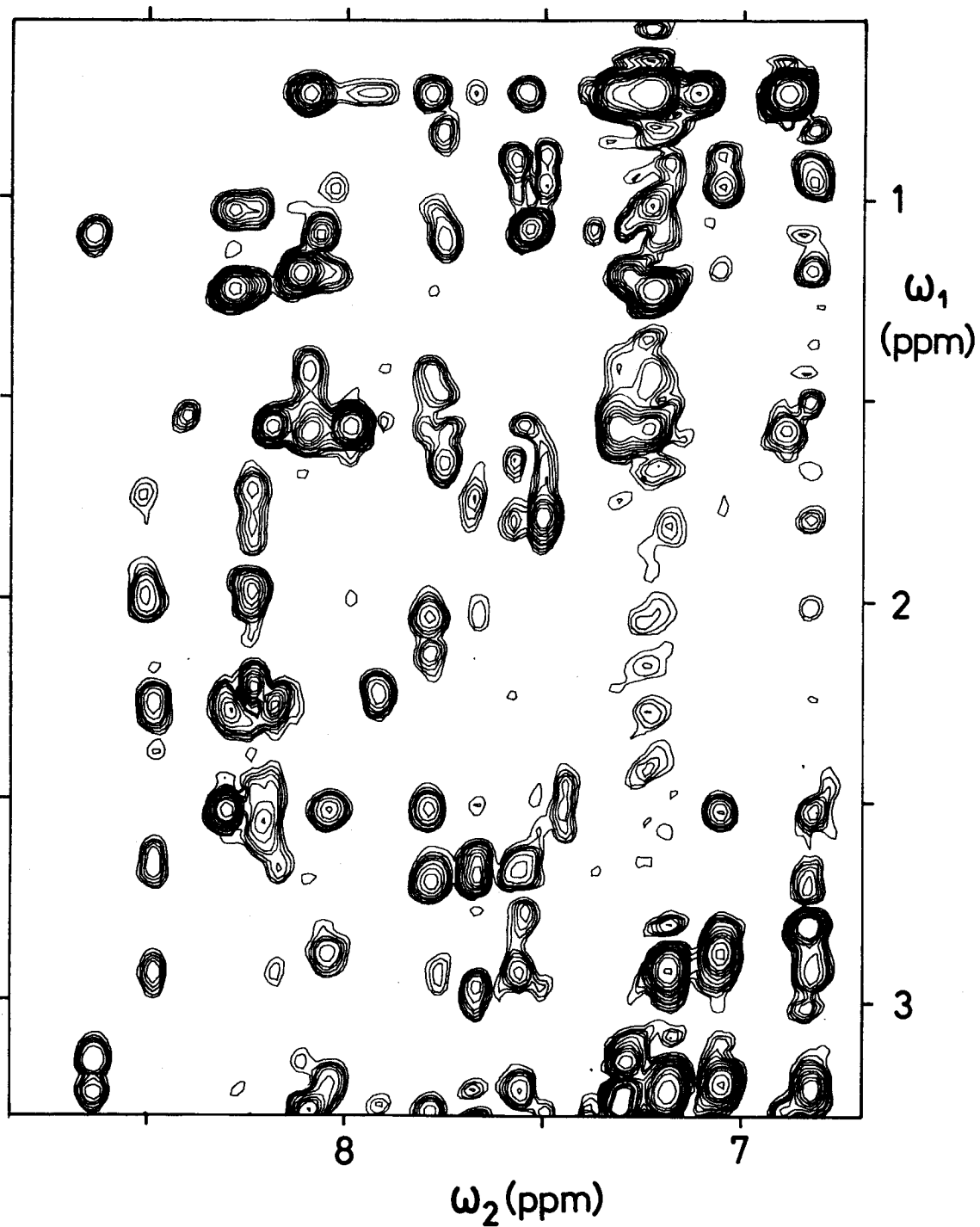


Fig. A2.5A

$\tau_m = 200$ ms

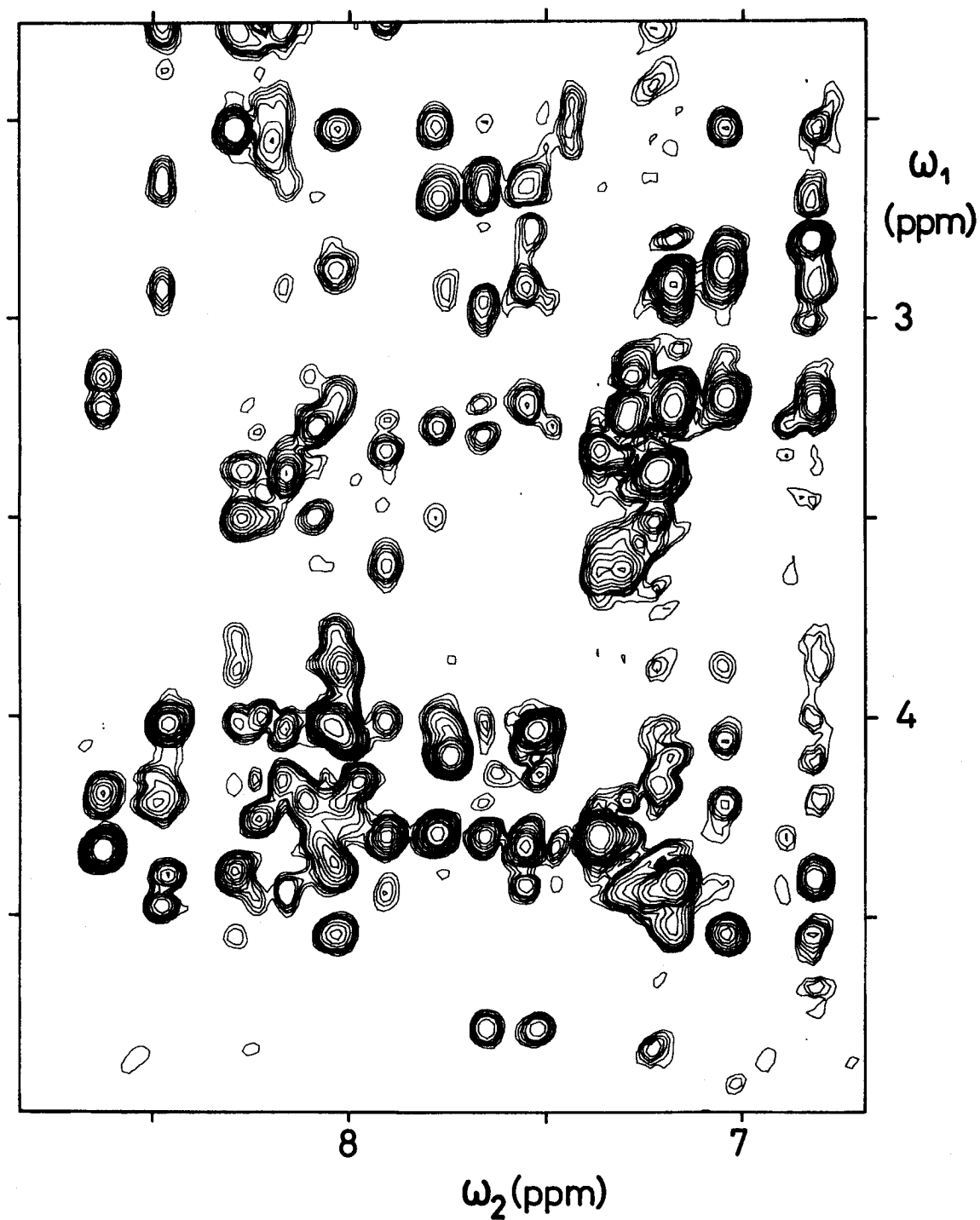


Fig. A2.5B

$\tau_m = 200$ ms

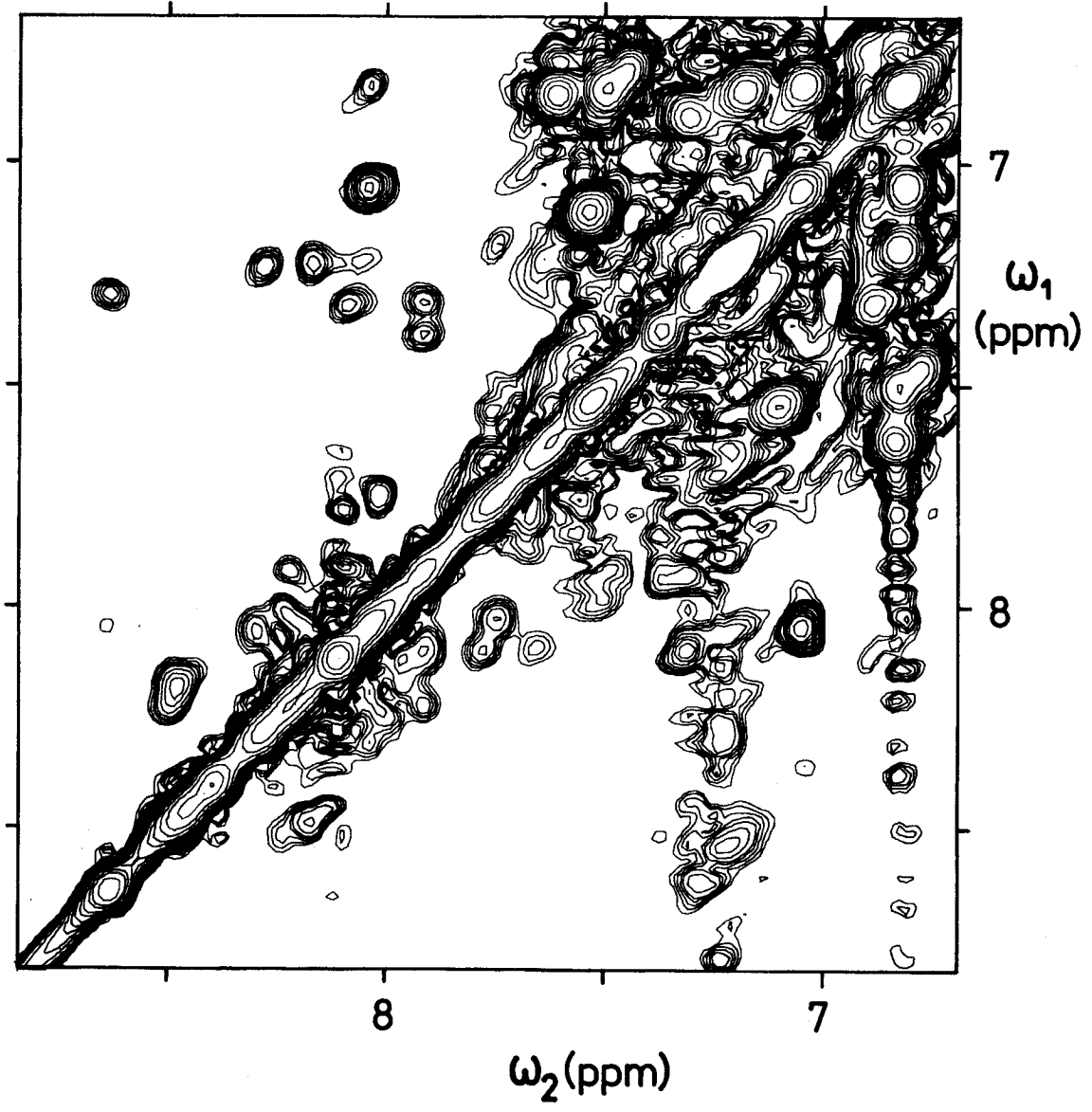


Fig. A2.5C

$\tau_m = 200$ ms

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Abragam, A. (1962), "The Principles of Nuclear Magnetism",
Clarendon Press, Oxford.
- Anil Kumar, (1978), J. Magn. Reson. 30, 227 - 249.
- Anil Kumar, Ernst, R.R. und Wüthrich, K. (1980a),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 1 - 6.
- Anil Kumar, Wagner, G., Ernst, R.R. und Wüthrich, K. (1980b),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1156 - 1163.
- Anil Kumar, Wagner, G., Ernst, R.R. und Wüthrich, K. (1981),
J. Am. Chem. Soc. 103, 3654 - 3658.
- Arseniev, A.S., Wider, G., Joubert, J. und Wüthrich, K. (1982),
J. Mol. Biol., im Druck.
- Aue, W.P., Bachmann, P., Wokaun, A. und Ernst, R.R. (1978),
J. Magn. Reson. 29, 523 - 533.
- Aue, W.P., Bartholdi, E. und Ernst, R.R. (1976a), J. Chem. Phys.
64, 2229 - 2246.
- Aue, W.P., Karhan, J. und Ernst, R.R. (1976b), J. Chem. Phys.
64, 4226 - 4227.
- Bachmann, P., Aue, W.P., Müller, L. und Ernst, R.R. (1977),
J. Magn. Reson. 28, 29 - 39.
- Bain, A.D., Bornais, J. und Brownstein, S. (1981), Can. J. Chem.
59, 723 - 730.
- Bartholdi, E. und Ernst, R.R. (1973), J. Magn. Reson. 11, 9 - 19.
- Baumann, R., Wider, G., Ernst, R.R. und Wüthrich, K. (1981),
J. Magn. Reson. 44, 402 - 406.
- Bax, A. und Freeman, R. (1981), J. Magn. Reson. 44, 542 - 561.

- Billeter, M., Braun, W. und Wüthrich, K. (1982), J. Mol. Biol. 155, 321 - 346.
- Bloch, F. und Siegert, A. (1940), Phys. Rev. 57, 522 - 527.
- Blundell, T.L. und Johnson, L.N. (1976), "Protein Crystallography", Academic Press, New York.
- Bodenhausen, G. und Freeman, R. (1977), J. Magn. Reson. 28, 471 - 478.
- Bodenhausen, G., Freeman, R., Morris, G.A. und Turner, D.L. (1978), J. Magn. Reson. 31, 75 - 95.
- Bodenhausen, G. und Ernst, R.R. (1981), J. Magn. Reson. 45, 367 - 373.
- Bösch, C. (1979), Dissertation ETH Zürich Nr. 6488.
- Bösch, C., Brown, L.R. und Wüthrich, K. (1980), Biochim. Biophys. Acta 603, 298 - 312.
- Bösch, C., Bindi, A., Oppliger, M. und Wüthrich, K. (1978), Eur. J. Biochem. 91, 209 - 214.
- Bösch, C., Anil Kumar, Baumann, R., Ernst, R.R. und Wüthrich, K. (1981), J. Magn. Reson. 42, 159 - 163.
- Bovey, F.A. (1969), "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", Academic Press, New York.
- Braun, W., Bösch, C., Brown, L.R., Gō, N. und Wüthrich, K. (1981), Biochim. Biophys. Acta 667, 377 - 396.
- Brown, L.R. (1979), Biochim. Biophys. Acta 557, 135 - 148.
- Brown, L.R., Bösch, C. und Wüthrich, K. (1981), Biochim. Biophys. Acta 642, 296 - 312.
- Brown, L.R., Braun, W., Anil Kumar und Wüthrich, K. (1982), Biophys. J. 37, 319 - 328.
- Bindi, A. und Wüthrich, K. (1979a), Biopolymers 18, 285 - 298.
- Bindi, A. und Wüthrich, K. (1979b), Biopolymers 18, 299 - 312.
- Carr, H.Y. und Purcell, E.M. (1954), Phys. Rev. 94, 630 - 638.

- Champeney, D.C. (1973), "Fourier Transforms and Their Physical Applications", Academic Press, London/New York.
- Contaxis, C.C. und Epand, R.M. (1973), *Can. J. Biochem.* 52, 456 - 468.
- Crippen, G.M. (1979), *Int. J. Peptide Protein Res.* 13, 320 - 326.
- Cutnell, J.D. (1982), *J. Am. Chem. Soc.* 104, 362 - 363.
- Dayhoff, M.O. (1972), *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomed. Res. Found., Washington D.C., USA.
- DeMarco, A., Llinás, M. und Wüthrich, K. (1978a), *Biopolymers* 17, 617 - 636.
- DeMarco, A., Llinás, M. und Wüthrich, K. (1978b), *Biopolymers* 17, 637 - 650.
- Dubs, A., Wagner, G. und Wüthrich, K. (1979), *Biochim. Biophys. Acta* 557, 177 - 194.
- Epand, R.M. (1978), *Biochim. Biophys. Acta* 514, 185 - 197.
- Ernst, R.R. (1966), *Adv. Magn. Reson.* 2, 1 - 135.
- Ernst, R.R. und Anderson, W.A. (1966), *Rev. Sci. Instrum.* 37, 93 - 102.
- Frandsen, E.K., Grønvald, F.C., Heding, L.G., Johansen, N.L., Lundt, B.F., Moodey, A.J., Markussen, J. und Vølund, A. (1981), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 665 - 677.
- Freeman, R. und Morris, G.A. (1979), *Bull. Magn. Reson.* 1, 5 - 26.
- Freeman, R., Kempell, S.P. und Levitt, M.H. (1980), *J. Magn. Reson.* 38, 453 - 479.
- Gordon, S.L. und Wüthrich, K. (1978), *J. Am. Chem. Soc.* 100, 7094 - 7096.
- Govil, G. und Hosur, R.V. (1982), *NMR Basic Principles and Progress*, Vol. 10, "Conformation of Biological Macromolecules", Springer Verlag, Berlin, New York.
- Gratzer, W.B., Creeth, J.M. und Beaven, G.H. (1972), *Eur. J. Biochem.* 31, 505 - 509.

- Hahn, E.L. (1950), Phys. Rev. 80, Nr. 4. 580 - 594.
- Hahn, E.L. und Maxwell, D.E. (1951), Phys. Rev. 84, 1246 - 1247.
- Hoult, D.I. und Richards, R.E. (1975), Prog. R. Soc. London A 344, 311 - 340.
- Jeener, J. (1971), Ampère International Summer School II, Pasko Polje, Yugoslavia.
- Jeener, J., Meier, B.H., Bachmann, P. und Ernst, R.R. (1979), J. Chem. Phys. 71, 4546 - 4553.
- Kalinichenko, P. (1976), Stud. Biophys. 58, 235 - 240.
- Kalk, A. und Berendsen, H.J.C. (1976), J. Magn. Reson. 24, 343 - 366.
- Karplus, M. (1959), J. Chem. Phys. 30, 11 - 15.
- Karplus, M. (1963), J. Amer. Chem. Soc. 85, 2870 - 2871.
- Levey, G.S. (1973), Rec. Progr. Hormo. Res. 29, 361 - 386.
- Llinás, M., Wilson, D.M. und Klein, M.P. (1977), J. Am. Chem. Soc. 99, 6846 - 6850.
- Macura, S. und Ernst R.R. (1980), Molecular Physics, 41, 95 - 117.
- Macura, S., Huang, Y., Suter, D. und Ernst, R.R. (1981), J. Magn. Reson 43, 259 - 281.
- Macura, S., Wüthrich, K. und Ernst, R.R. (1982a), J. Magn. Reson. 46, 269 - 282.
- Macura, S., Wüthrich, K. und Ernst, R.R. (1982b), J. Magn. Reson. 47, 351 - 357.
- Maudsley, A.A. , Müller, L. und Ernst, R.R. (1977), J. Magn. Reson. 28, 463 - 469.
- Momany, F.A., Mc Guire, R.F., Burgess, A.W. und Scheraga, H.A. (1975), J. Phys. Chem. 79, 2361 - 2381.
- Müller, L. (1979), J. Magn. Reson. 36, 301 - 309.
- Nagayama, K. und Wüthrich, K. (1981a), Eur. J. Biochem. 114, 365 - 374.

- Nagayama, K. und Wüthrich, K. (1981b), Eur. J. Biochem. 115, 653 - 657.
- Nagayama, K., Anil Kumar, Wüthrich, K. und Ernst, R.R. (1980),
J. Magn. Reson. 40, 321 - 334.
- Nagayama, K., Bachmann, P., Wüthrich, K. und Ernst, R.R. (1978),
J. Magn. Reson. 31, 133 - 148.
- Nagayama, K., Wüthrich, K., Bachmann, P. und Ernst, R.R. (1977),
Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 99 - 105.
- Nagayama, K., Wüthrich, K. und Ernst, R.R. (1979), Biochem. Biophys.
Res. Commun. 90, 305 - 311.
- Noggle, J.H. und Schirmer, R.E. (1971), "The Nuclear Overhauser Effect",
Academic Press, New York.
- Okhanov, V.V., Afanas'ev, V.A. und Bystrov, V.F. (1980), J. Magn.
Reson. 40, 191 - 195.
- Olejniczak, E.T., Poulsen, F.M. und Dobson, C.M. (1981),
J. Am. Chem. Soc. 103, 6574 - 6580.
- Panijpan, B. und Gratzer, W.B. (1974), Eur. J. Biochem. 45, 547 - 553.
- Pogliani, L., Ellenberger, M. und Valat, J. (1975),
Org. Magn. Reson. 7, 61 - 71.
- Pople, J.A., Schneider, W.G. und Bernstein, H.J. (1959), "High
Resolution Nuclear Magnetic Resonance", McGraw-Hill, New York, S. 98.
- Redfield, A.G., Kunz, S.D. und Ralph, E.K. (1975),
J. Magn. Reson. 19, 116 - 117.
- Roberts, G.C. und Jardetzky, O. (1970), Adv. Protein Chem. 24,
447 - 545.
- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L. und Sundby, F. (1971),
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 909 - 913.
- Rubalcava, B. und Rodbell, M. (1973), J. Biol. Chem. 248, 3831 - 3837.
- Sasaki, K., Dockerill, S., Adamiak, D.A., Tickle, I.J. und Blundell, T.
(1975), Nature 257, 751 - 757.

- Slichter, C.P. (1978), "Principles of Magnetic Resonance", Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Solomon, I. (1955), Phys. Rev. 99, 559 - 565.
- Stoesz, J.D., Redfield, A.G. und Malinowski, D. (1978), FEBS Letters 91, 320 - 324.
- Turner, D.L. (1980), J. Magn. Reson. 39, 391 - 398.
- Vega, S. und Pines, A. (1977), J. Chem. Phys. 66, 5624 - 5644.
- Wagman, M.E., Dobson, C.M. und Karplus, M. (1980), FEBS Letters 119, 256 - 270.
- Wagner, G. und Wüthrich, K. (1979), J. Magn. Reson. 33, 675 - 680.
- Wagner, G. und Wüthrich, K. (1982), J. Mol. Biol. 155, 347 - 366.
- Wagner, G., Anil Kumar und Wüthrich, K. (1981), Eur. J. Biochem. 114, 375 - 384.
- Wako, H. und Scheraga, H.A. (1981), Macromolecules 14, 961 - 969.
- Wider, G., Baumann, R., Nagayama, K., Ernst, R.R. und Wüthrich, K. (1981), J. Magn. Reson. 42, 73 - 87.
- Wider, G., Lee, K.H. und Wüthrich, K. (1982), J. Mol. Biol. 155, 367 - 388.
- Wokaun, A. und Ernst, R.R. (1977), Chem. Phys. Lett. 52, 407 - 412.
- Wokaun, A. und Ernst, R.R. (1978), Mol. Phys. 36, 317.
- Wüthrich, K. (1976), "NMR in Biological Research: Peptides and Proteins". North Holland, Amsterdam.
- Wüthrich, K., Nagayama, K. und Ernst, R.R. (1979), Trends in Biochem. Sci. 4, N178.
- Wüthrich, K., Wider, G., Wagner, G. und Braun, W. (1982), J. Mol. Biol. 155, 311 - 319.

KURZFASSUNG

In dieser Arbeit wird die Anwendung von homonuklearen, zweidimensionalen (2D) Kernresonanz-Experimenten auf Studien von Polypeptiden und Proteinen untersucht. Die Interpretation solcher Experimente wird anhand der 2D Spektren von Glucagon beschrieben, das an volldeuterierte Dodecylphosphocholin-Micellen gebunden ist.

In der Protein-Spektroskopie bewährten sich bis jetzt die folgenden zweidimensionalen ^1H NMR-Experimente: die 2D J-aufgelöste Spektroskopie, die 2D korrelierte Spektroskopie (COSY oder SECSY) und die 2D NOE-Spektroskopie (NOESY). Diese Techniken werden einzeln erläutert und die speziellen Probleme diskutiert, die bei der Messung von zweidimensionalen Proteinspektren auftreten. Diese Messungen lassen sich nur optimal auswerten, wenn man bei der Datenverarbeitung und der Interpretation einige Besonderheiten beachtet, die eingehend diskutiert werden.

Als Hilfsmittel zur Interpretation der 2DJ-Spektren von Proteinen wurde der Einfluss der starken Spin-Spin-Kopplung untersucht. Die Grundlage dieser Studien bildeten die Messungen und Simulationen der 2DJ-Spektren der 20 gewöhnlichen Aminosäuren.

Die individuelle Resonanzzuordnung stellt in der Polypeptid- und Protein-Spektroskopie ein grundlegendes Problem dar. Die kombinierte Verwendung von COSY- und NOESY-Spektren ermöglicht eine sequenzielle Resonanzzuordnung entlang dem Polypeptidrückgrat, welche nur auf NMR-Daten und der bekannten Sequenz beruht. Diese Methode wird anhand des Spektrums von an volldeuterierte Micellen gebundenem Glucagon beschrieben. Im Glucagonspektrum konnten alle Rückgrat- und C^β -Protonen ausser der Amidgruppe von His 1 und dem Amidproton von Ser 2 individuell zugeordnet werden. Weiter war eine Zuordnung aller nicht-austauschenden

Aminosäure-Seitenkettenprotonen ausser den C^γ-Methylenprotonen von Gln 20 und Gln 24 möglich.

Die Resonanzzuordnungen im Glucagonspektrum bildeten die Grundlage für die Bestimmung von Distanzeinschränkungen zwischen Protonen, welche aus NOESY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten erhalten wurden. Es gelang etwa 260 Distanzeinschränkungen für verschiedene Protonenpaare zu bestimmen, die über das ganze Glucagonmolekül verteilt waren. Mit Hilfe eines Distanz-Geometrie-Algorithmuses, der aus einem Satz von oberen und unteren Grenzen für interatomare Distanzen mögliche dreidimensionale Strukturen berechnet, wurden die Distanzeinschränkungen zur Untersuchung der Konformation von an Micellen gebundenem Glucagon verwendet.

SUMMARY

Applications of homonuclear two-dimensional (2D) NMR experiments to studies of polypeptides and proteins are investigated. The interpretation of these experiments is illustrated with studies of glucagon bound to perdeuterated dodecylphosphocholine micelles.

The following 2D ^1H NMR techniques have been applied to studies of proteins: 2D J-resolved spectroscopy, 2D correlated spectroscopy (COSY or SECSY), and 2D nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY). These techniques are described and some special problems which may arise in the measurements, the data handling, and the interpretation of protein 2D NMR spectra are discussed.

In order to get a better basis for the interpretation of 2DJ spectra of proteins, the influence of strong spin-spin coupling was investigated. The 2DJ spectra of the 20 common amino acids were measured and simulated. On the basis of this data characteristic features of strong coupling are described.

The individual resonance assignments in the spectrum of a polypeptide or of a protein are a fundamental step of the use of NMR for studies of these compounds. The combined use of COSY and NOESY spectra presents an efficient, reliable, and generally applicable method for assigning resonances along the polypeptide backbone. These "sequential assignments" are based entirely on NMR data and the known amino acid sequence. A detailed explanation of this method is presented on the basis of the spectrum of glucagon bound to fully deuterated micelles. In this spectrum all backbone and C^β -protons, with the exception of the N-terminal amino group and the amide proton of Ser 2, were individually assigned. Further-

more, all non-labile amino acid side chain protons were assigned, with the sole exception of the C^γ-methylene protons of Gln 20 und Gln 24.

The resonance assignments obtained for glucagon were used to determine distance constraints between specific protons. From NOESY experiments with different mixing times, ca. 260 distance constraints between specified locations along the polypeptide were obtained. This data was used as the input for a distance geometry algorithm, that generates possible three-dimensional structures from upper and lower limits for interatomic distances. These structures were used to study the conformation of micelle-bound glucagon.