

Freie Universität Berlin
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin

Dynamische Kernpolarisation in der Festkörper- Magnetresonanzspektroskopie von Proteinen

**Kann die dynamische Kernpolarisation
zum strukturellen Verständnis von
Membranrezeptoren beitragen?**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Arne Helge Linden
aus Kiel

Berlin, Juli 2012

Diese Arbeit wurde von Mai 2008 bis Juli 2012 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter Anleitung von Prof. Dr. Hartmut Oschkinat angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Freund
Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin

Disputation am 03. Mai 2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungen	IX
1. Einführung	1
1.1. Strukturforschung an biologischen Systemen	1
1.2. Magnetresonanzspektroskopie (NMR)	1
1.2.1. Funktionsweise	2
1.2.2. Relaxation	4
1.2.3. Chemische Verschiebung	5
1.2.4. Linienform und -verbreiterung	5
1.3. Festkörper-Magnetresonanzspektroskopie	6
1.3.1. Drehung im „magischen Winkel“	7
1.3.2. Protonen-Entkopplung	7
1.3.3. Kreuzpolarisation	8
1.3.4. Protonen-getriebene Spin-Diffusion	9
1.3.5. Probenmarkierung und Strukturbiologie	9
1.4. Dynamische Kernpolarisation (DNP)	10
1.4.1. DNP-Transfer-Mechanismen	11
„solid effect“	12
„cross effect“	13
„thermal mixing“	14
Ausbreitung der Polarisation	15
1.4.2. Instrumentierung für DNP-Messungen	15
1.4.3. Biradikale für die DNP	16
TEMPO	16
TOTAPOL	17
Trityl und weitere Radikale	18

1.4.4.	Andere Formen der DNP	18
1.5.	Auswirkungen eines paramagnetischen Zentrums in der NMR	20
1.5.1.	Paramagnetische Relaxations-Verstärkung (PRE)	20
1.5.2.	Paramagnetische Verschiebung	21
1.6.	Proteindynamik bei kalten Temperaturen	21
1.6.1.	Dynamik von hydrierten Proteinen beim Einfrieren	22
1.6.2.	Temperatur-Zyklen und Schock-Frieren	25
1.7.	Neurotoxin II an nikotineren Acetylcholinrezeptoren	25
1.7.1.	Acetylcholin und seine Rezeptoren	25
	Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren	26
	Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren	26
	Acetylcholin-bindende Proteine	28
	nAChR aus <i>Torpedo californica</i>	28
1.7.2.	Neurotoxin aus <i>Naja naja oxiana</i>	29
1.8.	Fragestellung dieser Arbeit	31
2.	Materialien und Methoden	35
2.1.	Probenherstellung	35
2.1.1.	SH3 für kryogene Untersuchungen	35
2.1.2.	Prolin für die Untersuchung der Radikal-Effekte	36
2.1.3.	Neurotoxin II an nikotineren Acetylcholinrezeptoren	36
2.1.4.	TOTAPOL	37
2.1.5.	Rotorfüllung	38
2.2.	Spektrometrie	38
2.2.1.	Spektrometer	38
2.2.2.	Mikrowelle	39
2.2.3.	Messung der Relaxationszeiten	40
2.2.4.	Prozessierung der Daten	41
2.2.5.	SH3 für kryogene Untersuchungen	41
	1D Experimente	41
	2D Experimente	42
2.2.6.	Prolin für die Untersuchung der Radikal-Effekte	43
2.2.7.	Neurotoxin II an nikotineren Acetylcholinrezeptoren	43
	1D Experimente	43
	2D Experimente	43

2.3. Strukturen	44
2.3.1. SH3 für kryogene Untersuchungen	44
2.3.2. Neurotoxin II an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren	44
3. Ergebnisse und Diskussion	45
3.1. Proteine in der Cryo-NMR am Beispiel SH3	45
3.1.1. Hintergrund & Fragestellung	45
3.1.2. Ergebnisse & Diskussion	46
1D Spektren	46
2D Spektren	47
„Auslöschen“ eines schmalen Frequenzbereiches	52
Effekte der Deuterierung	53
Strukturelle Aspekte	54
3.2. Effekte des zugegebenen Biradikals	59
3.2.1. Hintergrund & Fragestellung	59
3.2.2. Ergebnisse & Diskussion	59
1D Spektren mit unterschiedlichen TOTAPOL Konzentrationen	59
Einzelne Effekte des TOTAPOLs	60
Optimierung der Biradikal-Konzentration	66
3.3. Deuterierte Proben	67
3.3.1. Hintergrund & Fragestellung	67
3.3.2. Ergebnisse & Diskussion	67
DNP-Verstärkungsfaktoren mit deuterierten Proteinen	67
Verstärkungsfaktoren bei intermediärer Temperatur	68
2D Spektren bei intermediärer Temperatur	69
3.4. Neurotoxin II an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren	73
3.4.1. Hintergrund & Fragestellung	73
3.4.2. Ergebnisse & Diskussion	74
Untersuchung der Signalverstärkung	74
2D Spektren nach der Präparation	76
Equilibrierung der Proben bei 253 K	78
Weitere Proben	82
4. Allgemeine Diskussion und Ausblick	85
4.1. Temperatur	85
4.2. Radikale	91
4.3. Membranproteine	94

Literatur	97
A. Zusammenfassung	117
B. Summary (english)	119
C. Publikationen	121
D. Anhang	123
E. Danksagung	127
F. Eidesstattliche Erklärung	129

Abbildungsverzeichnis

1.1. Schema des SE-Mechanismus	12
1.2. Schema des CE-Mechanismus	13
1.3. Schema eines DNP-Spektrometers	16
1.4. Strukturformeln von TOTAPOL, TEMPO und Trityl	17
1.5. DNP-Profil und EPR-Spektren verschiedener Radikale	19
1.6. Modell von NTII am nikotinergen ACh-Rezeptor	27
1.7. Kristallstruktur und Sequenz von NTII	29
2.1. Rotor-Füller	38
2.2. Photo des DNP-Spektrometers	40
2.3. Pulssequenz zum „Auslöschen“ eines schmalen Frequenzbereichs	42
3.1. 1D ^{13}C Spektren von SH3 bei verschiedenen Temperaturen	46
3.2. 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren von SH3 bei verschiedenen Temperaturen	48
3.3. Detailansicht einzelner Signale von SH3 bei verschiedenen Temperaturen	49
3.4. Detailansicht der Isoleucin Diagonal- und Kreuzsignale	50
3.5. Detailansicht der aromatischen Region bei verschiedenen Temperaturen	51
3.6. 1D ^{13}C Spektren mit „Auslöschen“ eines schmalen Frequenzbereiches	52
3.7. 2D ^{13}C - ^{13}C Spektrum von deuterierten SH3 bei 95 K	53
3.8. Struktur von SH3 mit einer Darstellung der Ergebnisse kryogener NMR	54
3.9. 1D ^{13}C Spektren von CN-markiertem Prolin mit verschiedenen Konzentrationen von TP	61
3.10. Effekte der TP-Konzentration auf verschiedene NMR-Messwerte bei Prolin Proben	62
3.11. Auswirkung der TP-Konzentration auf die Effizienz des CP-Transfers	63
3.12. Berechnete paramagnetische Effekte und gemessene Signalintegrale	65
3.13. DNP-Verstärkungsfaktoren von SH3 bei Temperaturen zwischen 98 K und 198 K	68
3.14. Vergleich von 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren bei 98 K und 178 K	69

3.15. 2D ^{13}C - ^{13}C Spektren der Alanine von deuteriertem und protoniertem SH3 bei verschiedenen Temperaturen	70
3.16. 1D ^{13}C Spektren von NT II mit unterschiedliche TP-Konzentrationen . . .	74
3.17. Aufbau der DNP-Polarisation bei Protonen	75
3.18. Aufbau der DNP-Polarisation bei Kohlenstoffen	76
3.19. 2D ^{13}C - ^{13}C DNP-Spektrum von uniform markiertem NT II an nAChR . .	77
3.20. Effekt der TP-Konzentration auf 2D ^{13}C - ^{13}C DNP-Spektren von NT II . .	78
3.21. 2D ^{13}C - ^{13}C DNP-Spektrum von [$2\text{-}^{13}\text{C}$] Glycerol markiertem NT II	80
3.22. Simulierte NMR-Signale aus den Lösungs-NMR Daten und der Struktur von NTII	81
3.23. Illustration der Hypothese zur Verbesserung der DNP-Auflösung	82
3.24. 2D ^{13}C - ^{13}C DNP-Spektren von [$1,3\text{-}^{13}\text{C}$] Glycerol markiertem NTII nach der Präparation und nach Equilibrierung	83
3.25. 2D ^{13}C - ^{13}C Spektrum von NTII bei 100 K ohne Biradikal	83
4.1. Theoretische Messzeiten für ein 2D Spektrum	91

Tabellenverzeichnis

1.1. Häufige Atomkerne in der NMR-Spektroskopie	3
1.2. Auswahl von Arbeiten zum Protein-Glasübergang	25
2.1. TOTAPOL-Konzentrationen der Prolin-Proben	36
2.2. Verschieden Proben von NTII an nAChR und ihre TP Konzentrationen .	37
2.3. SH3 – die Parameter der 1D Spektren	41
2.4. SH3 – die Parameter der 2D Spektren	42
3.1. Wasser-Akzessibilität und Debye-Waller Faktoren von SH3	57
3.2. Abstand der Moleküle in idealer Lösung	60
3.3. Linienbreiten bei verschiedenen Temperaturen	71
4.1. Radikal-Konzentrationen anderer Arbeiten	92
D.1. Tabelle der einzelnen Signale von SH3 bei unterschiedlichen Temperaturen	123

Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
AChR	Acetylcholinrezeptor
B	Trägergasstrom (bearing)
B_0	Äußeres Magnetfeld
B_1	Magnetfeld durch die Radiowellen
CE	Kreuzeffekt (cross effect)
CP	Kreuzpolarisation (cross polarization)
c_T	TOTAPOL-Konzentration
D	Antriebsgasstrom (drive)
δ	homogene Linienbreite im EPR-Spektrum
Δ	inhomogene Linienbreite im EPR-Spektrum
d_1	Zeit der Verzögerung zwischen einzelnen Experimenten
DNP	Dynamische Kernpolarisation (dynamic nuclear polarization)
ϵ	Faktor der DNP-Verstärkung (enhancement)
EPR	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (electron paramagnetic resonance)
γ	gyromagnetisches Verhältnis
GB	Wert des Gauß'schen Maximums bei der GM
GDH	Lösungsmittel aus 60 % d_8 -Glycerol, 30 % D_2O und 10 % H_2O
GM	Gauß-Lorentz Funktion
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-protein coupled receptors)
J	J-Kopplung, skalare Kopplung
κ	Sensitivität
mAChR	muskarinerges Acetylcholinrezeptor
MAS	Drehung im „magischen Winkel“ (magic angle spinning)
nAChR	nikotinerges Acetylcholinrezeptor
NMR	Magnetresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
NTII	α -Neurotoxin II
PCS	Pseudo-Kontakt-Verschiebungen (pseudocontact shifts)
PDB	Datenbank für Proteine (protein data bank)

PE	paramagnetische Effekte (paramagnetic effects)
PDSD	Protonen-getriebene Spin-Diffusion (proton driven spin diffusion)
RDC	restliche dipolare Kopplung (residual dipolar coupling)
ppm	ein Millionstel (10^{-6} ; parts per million)
PRE	paramagnetische Relaxations-Verstärkung (paramagnetic relaxation enhancement)
QS	gemischte Sinus/Kosinus Quadratfunktion
RF	Radiowellen (radio frequency)
RT	Raumtemperatur
σ	berechnete Intensität des Rauschens
SE	Festkörper-Effekt (solid effect)
SH3	Src-homology 3 (Sarcoma-Homologie 3) Domäne der α -Kette des Proteins Spektrin aus dem Hirn von <i>Gallus gallus</i>
SH3 _H	vollständig protoniertes SH3
SH3 _{D50}	deutertes SH3, das an den austauschbaren Positionen zu 50 % protoniert ist
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise-ratio)
SSB	Parameter einer gemischten Sinus/Kosinus Quadratfunktion (siehe Seite 41)
ssNMR	Festkörper-Magnetresonanzspektroskopie (solid state NMR)
T ₁	Zeitkonstante der Spin-Gitter-Relaxation
T _{1ρ}	Zeitkonstante der Spin-Gitter-Relaxation im rotierenden Koordinatensystem
T ₂	Zeitkonstante der Spin-Spin-Relaxation
t _{CP}	Kontaktzeit der Kreuzpolarisation
T _{DNP}	Zeitkonstante des Aufbaus der DNP-Polarisation
T _g	Glasübergangstemperatur von Proteinen
TM	thermische Mischung (thermal mixing)
t _{mix}	PDSD-Mischzeit
TEMPO	(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
TP	TOTAPOL (1-(TEMPO-4-oxy)-3-(TEMPO-4-amino)-propan-2-ol)
VT	Kühlgasstrom (variable temperature)
WA	Wasser-Akzessibilität

1. Einführung

1.1. Strukturforschung an biologischen Systemen

Pharmazeutische Wirkstoffe beeinflussen physiologische Systeme. Diese Wechselwirkung zwischen Pharmakon und Körper ist in den meisten Fällen strukturell, das heißt, ein Pharmakon bindet, durch seinen chemischen Aufbau bedingt, an spezifische Strukturen und löst so Effekte aus. Eine genaue Kenntnis des atomaren Aufbaus sowohl des Pharmakons als auch des Ziels hilft, diese Wirkung im Detail zu verstehen. Außerdem können für bekannte Zielstrukturen passende neue Wirkstoffe entwickelt werden.

Membranproteine nehmen einen besonderen Stellenwert in der modernen Pharmakologie ein, da sie für die Informationsübertragung von außen in die Zellen hinein und zwischen den Zellen verantwortlich sind. Demzufolge sind sie eine der wichtigsten Zielstrukturen der Pharmakotherapie. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden, stellt die Strukturaufklärung von Membranproteinen in nativer Umgebung immer noch eine der großen Herausforderungen heutiger struktureller biologischer Forschung dar.

In dieser Dissertation wird eine neue Methode – die dynamische Kernpolarisation (dynamic nuclear polarization, DNP) – analysiert und weiterentwickelt, um die Strukturaufklärung solcher Proteinsysteme zu verbessern.

Auf den folgenden Seiten werden die Grundzüge der Magnetresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance, NMR) und der DNP dargestellt. Besonderes Augenmerk gilt dabei den jeweils nötigen Bedingungen und deren Einfluss auf die NMR-Spektren. Anschließend wird das Modellsystem dieser Arbeit vorgestellt, nikotinerge Acetylcholinrezeptoren und deren Ligand Neurotoxin II.

1.2. Magnetresonanzspektroskopie (NMR)

Die dynamische Kernpolarisation ist eine Erweiterung der Magnetresonanzspektroskopie. Die NMR selbst ist neben der Röntgenbeugung eine Standardmethode der Strukturaufklärung und lässt sich sowohl bei gelösten Proben (Lösungs-NMR) als auch bei festen Körpern anwenden.

Für die Lösungs-NMR ist die thermische Bewegung der gelösten Moleküle entscheidend. Ihre Anwendung bei Proteinen ist deshalb häufig durch die Größe der Moleküle und ihre Einbindung in Komplexe limitiert. Zum Beispiel lassen sich in Membranen gebettete Proteine schlecht mittels Lösungs-NMR untersuchen. Festkörper-NMR (solid state NMR; ssNMR) hingegen ist nicht von der Größe des Analyten abhängig und deshalb die Methode der Wahl für große Proteine und Proteinkomplexe [1].

Außerdem sind heutzutage DNP-Messungen mit mehreren Dimensionen und deutlichen Signalverstärkungen nur bei kryogenen Temperaturen möglich, bei denen alle Proben gefroren vorliegen (siehe Abschnitt 1.4 auf Seite 10). Aus diesen Gründen konzentrieren sich die folgenden Betrachtungen auf die NMR an Festkörpern.

1.2.1. Funktionsweise

Die Hintergründe der Kernspinresonanz und ihrer Spektroskopie umfassen weite Bereiche der Physik. Im Folgenden wird auf die für diese Dissertation wichtigen Aspekte eingegangen – für eine detailliertere Betrachtung sei auf die Standardliteratur verwiesen (z. B. [1, 2]). Als aktuelles Beispiel für die Lösungs-NMR sei die Strukturbestimmung von Protorhodopsin genannt [3], die eindrucksvoll die Möglichkeiten dieser Technik zeigt.

Magnetresonanzspektroskopie misst die magnetischen Momente von Atomkernen. Nur Atomkerne mit ungerader Ordnungs- und/oder Massenzahl haben ein magnetisches Moment ($\vec{\mu}$, Gleichung (1.1)) und sind damit der NMR-Spektroskopie zugänglich.

$$\vec{\mu} = g \frac{q}{2m} \vec{S} \quad (1.1)$$

Dabei ist g der gyromagnetische Faktor (Landé-Faktor), q die Ladung und m die Masse des Spins \vec{S} . Das gyromagnetische Verhältnis (γ) des Spins \vec{S} fasst die Terme vor dem Spin zusammen und ist für jeden Kern charakteristisch:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{S} \quad (1.2)$$

Eine Übersicht der häufig in Proteinen vorkommenden Kerne mit ihren Spinquantenzahlen, gyromagnetischen Verhältnissen und ihrer natürlichen Häufigkeit findet sich in Tabelle 1.1 auf der nächsten Seite.

Das magnetische Moment eines Kerns nimmt in einem Magnetfeld nur bestimmte Orientierungen an (Zeeman-Aufspaltung). Deren Anzahl hängt von der Kernspinquantenzahl I ab nach: $2I+1$. Für einen Atomkern mit $I=1/2$ (Spin- $1/2$) gibt es also zwei Orientierungen bzw. Energielevel. Dies sind die in der NMR bevorzugten Kerne, da sie den einfachsten spektroskopischen Fall darstellen. Kerne mit $I=1$ oder mehr (quadrupolare Kerne) ha-

Tabelle 1.1.: Auswahl von Atomkernen in der NMR-Spektroskopie mit ihren Spinquantenzahlen, gyromagnetischen Verhältnissen (γ) und ihren natürlichen Häufigkeiten

Isotop	Kernspinquantenzahl (I)	$\gamma/2\pi$ [MHz/T]	natürliche Häufigkeit [%]
^1H	$\frac{1}{2}$	42,576	99,98
^2H (D)	1	6,536	0,02
^{12}C	0	nicht messbar	98,90
^{13}C	$\frac{1}{2}$	10,705	1,10
^{14}N	1	3,077	99,63
^{15}N	$\frac{1}{2}$	-4,316	0,37
^{16}O	0	nicht messbar	99,96
^{17}O	$\frac{5}{2}$	-5,772	0,04
e^-	$\frac{1}{2}$	28027,185	

ben entsprechend drei oder mehr Energielevel, die durch eine Ungleichverteilung ihrer Ladung im Raum entstehen. NMR-Spektren solcher Kerne sind durch die Interaktionen dieser Level komplizierter zu interpretieren.

Im Fall der Spin- $\frac{1}{2}$ Kerne unterscheiden sich die beiden Energielevel um ΔE :

$$\Delta E = \hbar\gamma B_0 = \hbar\omega_0 \quad (1.3)$$

Dabei ist B_0 die Stärke des äußeren Magnetfeldes und ω_0 die Larmorfrequenz des Kernes (\hbar ist die Plancksche Konstante h geteilt durch 2π). Die Besetzung der beiden Level in einem Magnetfeld ist ungleich – mehr Kerne sind im energieärmeren Zustand. Dieser Populationsunterschied hängt im thermischen Gleichgewicht von der Boltzmann-Verteilung ab und ist für den Fall der Spin- $\frac{1}{2}$ Kerne nach Brillouin gegeben als (siehe z.B. [4]):

$$P = \tanh \frac{\vec{\mu} B_0}{kT} \quad (1.4)$$

wobei T die Temperatur und k die Boltzmann-Konstante ist. Bei Raumtemperatur ist die thermische Energie eines Spins (kT) größer als seine magnetische Energie μB_0 , so dass die messbare Kernspin-Polarisation P klein ist [5]. Je größer das äußere Magnetfeld B_0 und das γ des untersuchten Kernes, desto besser ist er der NMR-Spektroskopie zugänglich. Wird die Temperatur erniedrigt, erhöht sich entsprechend die Polarisation.

Als Beispiel: Bei Raumtemperatur ist in einem 800 MHz NMR-Magneten, d.h. Protonen haben in diesem Feld (20 T) eine Larmorfrequenz von 800 MHz, der Besetzungs-

unterschied der beiden Level von Protonen 0,01 %. Damit ist nur jedes zehntausendste Proton messbar.

In einem homogenen äußeren Magnetfeld präzedieren die magnetischen Momente von Kernen um eine Achse parallel zum Feld. Die Geschwindigkeit dieser Drehung (in Hz) ist die Larmorfrequenz und charakteristisch für den jeweiligen Kern.

Um ein Spektrum zu erhalten, wird mit einem Radiowellen-Puls (RF-Puls; B_1 -Feld) ein oszillierendes Magnetfeld eingebracht. Dies Feld ist deutlich kleiner als B_0 und rechtwinklig zu diesem. Wenn die Frequenz des magnetischen Anteils der elektromagnetischen Welle gleich der Larmorfrequenz eines Kerns ist, summieren sich die Effekte des RF-Pulses auf die Präzessionsbewegung und beeinflussen den Winkel zwischen magnetischem Moment und der Präzessionsachse.

Bei einer bestimmten Pulslänge und -stärke wird dieser Winkel z.B. 90° und die Magnetisierung damit rechtwinklig zum B_0 Feld ($\pi/2$ -Puls). Durch die Präzessionsbewegung oszilliert die Magnetisierung und kann in einer ebenfalls rechtwinklig zum B_0 -Feld positionierten Spule Strom induzieren. Dieser Strom ist das NMR-Signal und wird mittels Fourier-Transformation von der Zeitabhängigkeit in eine Frequenzabhängigkeit umgerechnet. Es wird also die Larmorfrequenz des angeregten Kerns gemessen.

1.2.2. Relaxation

Nach dem RF-Puls relaxieren die Spins wieder in ihren Gleichgewichtszustand. Diese Relaxation zum Equilibrium setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen.

Die Spin-Gitter-Relaxation ist die Wiederherstellung der Boltzmann-Verteilung, also des thermischen Gleichgewichts mit der Magnetisierung parallel zum B_0 -Feld. Ihre Zeitkonstanten ist die T_1 -Zeit.

Die Spin-Spin-Relaxation ist die Abnahme der Kohärenz mit der Zeit und ihre Konstante die T_2 -Zeit. Durch die Abnahme der Kohärenz wird die messbare, transversale Magnetisierung mit der Zeit kleiner. Diese Abnahme ist zu unterscheiden von einer reinen Dephasierung der Magnetisierung, die durch leicht unterschiedliche Präzessionsfrequenzen der Kerne entsteht (zur Messung der Relaxation siehe Abschnitt 2.2.1 auf Seite 38). Die T_2 -Zeit ist typischerweise deutlich kürzer als die T_1 -Zeit, so dass letztere damit die Wartezeit bis zum nächsten möglichen Experiment aus dem thermischen Equilibrium bestimmt.

Für diese Arbeit soll außerdem $T_{1\rho}$ herausgegriffen werden, die Spin-Gitter-Relaxation im rotierenden Koordinatensystem. Die Magnetisierung kann über einen gewissen Zeitraum rechtwinklig zum B_0 -Feld gehalten werden, indem dauerhaft mit geeigneter Frequenz ein RF-Puls eingebracht wird (spin-locking). Auch unter diesen Bedingungen rela-

xiert die Polarisation zur Boltzmann-Verteilung, allerdings in einem effektiven B_1 -Feld, das deutlich kleiner ist als das B_0 -Feld. Die entsprechende Relaxationszeit $T_{1\rho}$ ist also ähnlich der T_1 -Zeit, wird aber mit „gefangener“ Magnetisierung gemessen, wie sie z.B. bei einer Kreuzpolarisierung (Abschnitt 1.3.3 auf Seite 8) genutzt wird, und ist meistens deutlich kürzer als T_1 .

1.2.3. Chemische Verschiebung

Die Elektronen um einen Kern verstärken oder schwächen die Wirkung des äußeren Magnetfeldes B_0 auf den Kern. Da in einem Molekül die Elektronendichte um einen Kern auch von den umgebenden Kernen abhängt, unterscheiden sich die Larmorfrequenzen der Kerne leicht. Dieser Unterschied, angegeben in ppm zu einer Referenzsubstanz, wird als chemische Verschiebung bezeichnet und ist die Grundlage der NMR-Spektroskopie.

Die Elektronen-Umgebung beeinflusst das auf einen Kern wirkende Magnetfeld außerdem je nach ihrer Orientierung zum äußeren Magnetfeld. Durch eine schnelle Veränderung dieser Orientierung, wie sie z. B. bei kleinen Molekülen in Lösung durch die thermische Bewegung gegeben ist, werden diese orientierungsabhängigen (anisotropen) Unterschiede ausgemittelt. Auf der anderen Seite nimmt die Geschwindigkeit dieser Reorientierung mit der Molekülgröße ab und schränkt deshalb die Lösungs-NMR bei großen oder viskosen Systemen ein. Aus dieser Problematik entwickelte sich die Magnetresonanzspektroskopie an Festkörpern.

1.2.4. Linienform und -verbreiterung

Fourier-transformierte NMR-Signale haben die Form einer Lorentz-Kurve. Die Amplitude (A), und damit das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise, S/N), hängt von der Linienbreite auf halber Höhe (LB) ab:

$$A = \frac{1}{\pi \cdot LB} \quad (1.5)$$

Die Linienbreite ist also ein entscheidender Faktor der Sensitivität.

Es werden grundsätzlich zwei Arten der Linienbreite unterschieden [6]: homogen und inhomogen. Die T_2 -Zeit des jeweiligen Kerns bestimmt die mögliche Untergrenze der Linienbreite, je länger das Signal kohärent ist, desto schmalere Signale lassen sich detektieren. Dies ist die homogene Linienbreite, die meistens dem System inhärent ist und eine grundsätzliche Limitierung der Auflösung einer Probe darstellt.

Inhomogen sind in der NMR Spektren, wenn im Zeitregime des Experiments gleichzeitig verschiedene Konformere vorliegen und parallel beobachtet werden. Die Signale dieser

Konformere zeigen meist so ähnliche chemische Verschiebungen, dass sie nicht aufgelöst werden können, obwohl sie einzeln betrachtet schmal sind. Eine inhomogene Linienverbreiterung äußert sich darin, dass die diagonalen Signale in 2D Spektren schmal sind und die T_2 -Zeit schmaler Linienbreiten der Kreuzsignale erwarten lässt als beobachtet werden (für eine Beschreibung von Kreuzsignalen siehe Abschnitt 1.3.4 auf Seite 9) [7]. In derartig verbreiterten Spektren können schmale Bereiche der verbreiterten Signale, z.B. durch geeignete schmale Pulse, beeinflusst werden. Inhomogene Verbreiterung ist häufig von der Probenherstellung abhängig.

1.3. Festkörper-Magnetresonanzspektroskopie

In festen Körpern ist die Bewegung der einzelnen Moleküle eingeschränkt, wie auch bei sehr großen gelösten Molekülen. Demzufolge setzt sich der Hamiltonian für einen Kernspin \mathcal{H} auch aus anisotropen (richtungsabhängigen) Effekten zusammen:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_Z + \mathcal{H}_{RF} + \mathcal{H}_{CS} + \mathcal{H}_D + \mathcal{H}_J + \mathcal{H}_Q \quad (1.6)$$

Dabei beschreibt \mathcal{H}_Z die Interaktion des Spins mit dem äußeren Magnetfeld B_0 und \mathcal{H}_{RF} mit dem oszillierenden Feld B_1 , dem RF-Pulse (siehe auch Abschnitt 1.2.1). \mathcal{H}_{CS} ist der Hamiltonian der chemischen Verschiebung, und da die Elektronen nicht kugelförmig um den Kern verteilt sind, ist ein Teil der chemischen Verschiebung anisotrop. \mathcal{H}_D ist der Hamiltonian der dipolaren Kopplung. Er beschreibt die Kopplung der magnetischen Momente einzelner Kerne durch den Raum und ist demzufolge auch anisotrop. Die Stärke dieser Kopplung zwischen Spin I und Spin S hängt von der dipolaren Kopplungskonstante d ab:

$$d = \hbar \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{1}{r^3} \gamma_I \gamma_S \quad (1.7)$$

Sie nimmt also stark mit dem Abstand (r) ab und kann demzufolge auch zur Strukturaufklärung genutzt werden. Als Beispiel beträgt sie bei Proton-Kohlenstoff-Bindungen ca. 21 kHz und zwischen Protonen in einem Abstand von 1 Å ca. 120 kHz.

\mathcal{H}_J ist der Hamiltonian der J-Kopplung oder skalaren Kopplung. Er beschreibt die indirekte Kopplung von Kernen über ihre Bindungs-Elektronen. Diese Kopplung ist richtungsunabhängig (isotrop), aber wesentlich kleiner als die anderen Kopplungen. Auch die Unterschiede der Larmorfrequenzen eines Kerns sind größer, weshalb man von einer schwachen Kopplung spricht. Zwischen benachbarten Protonen liegt die J-Kopplung zwischen 2 – 20 Hz und zwischen Kohlenstoffen bei ca. 30 – 80 Hz. In der Lösungs-NMR

verursacht sie die typische Aufspaltung der Signale in Multiplets, die für die Analyse der Spektren von großer Bedeutung ist. In der ssNMR, in der vor allem Kohlenstoff und Stickstoff gemessen werden und Linien häufig breiter sind, spielt sie keine so große Rolle und wird im Folgenden meist vernachlässigt. \mathcal{H}_Q beschreibt die quadrupolare Kopplung, die nur bei Kernen mit quadrupolarem Moment auftritt. Sie entfällt für Spin- $\frac{1}{2}$ Kerne.

Die anisotropen Wechselwirkungen, namentlich \mathcal{H}_D , \mathcal{H}_Q und der anisotrope Teil von \mathcal{H}_{CS} hängen unter anderem von $3 \cos^2 \theta - 1$ ab. Dabei ist θ der Winkel zwischen dem Vektor der anisotropen Wechselwirkung und dem äußeren Magnetfeld. Der anisotrope Teil der chemischen Verschiebung und die dipolare Kopplung haben den größten Einfluss auf die NMR-Daten und führen in der statischen ssNMR zu deutlich verbreiterten und sich überlappenden Signalen, die in ihrer Summe die sogenannten Pulver-Spektren („powder spectra“) ergeben.

1.3.1. Drehung im „magischen Winkel“

Weil solche Pulver-Spektren keine Interpretation einzelner Signale zulassen, vermindert man meistens den Einfluss der anisotropen Wechselwirkungen. Dazu wird die Probe in einem Rotor um sich selbst entlang des „magischen Winkels“ gedreht (magic angle spinning, MAS [8]). Dieser Winkel ist die Diagonale durch einen Würfel ($54,74^\circ$) im Bezug auf das äußere Magnetfeld B_0 . Durch eine Drehung um dieser Achse ändern sich die Winkel (θ) der anisotropen Wechselwirkungen zum äußeren Magnetfeld. Ist die Drehgeschwindigkeit hoch genug, wird θ im Mittel gleich dem Winkel zwischen Drehachse und B_0 , unabhängig von seinem ursprünglichen Wert in der statischen Probe. Da $3 \cos^2(54,74^\circ) = 1$ ist, wird der richtungsabhängige Term der anisotropen Wechselwirkungen und damit die Stärke der Wechselwirkungen 0. Vor allem heteronukleare dipolare Kopplungen und der anisotrope Teil der chemischen Verschiebung verlieren so ihren Einfluss auf die Spektren. Die Effizienz dieser Methode hängt von der Drehgeschwindigkeit ab, so dass häufig Resteffekte in Form von Seitenbanden bleiben – scharfen Linien im Abstand der Drehgeschwindigkeit zur isotropen chemischen Verschiebung.

1.3.2. Protonen-Entkopplung

Um ^{13}C ohne die starken Effekte seiner Kopplung zu Protonen zu messen, ist meist zusätzlich zur MAS eine aktive Entkopplung nötig. Dafür wird während der Detektion dauerhaft mit hoher Stärke auf die Protonenfrequenz eingestrahlt. Da die Protonen häufig stark miteinander dipolar gekoppelt sind (Protonennetzwerke) werden dabei fast alle Protonen entkoppelt. Eine solche aktive Entkopplung erwärmt häufig die Probe.

Verschiedene Pulssequenzen für diese Protonen-Entkopplung wurden entwickelt, die effektiver als eine kontinuierliche Anregung der Protonen sind. Zum Beispiel werden bei der Zwei-Puls-Phasenmodulation (two pulse phase modulation, TPPM [9]) alternierende Pulse von ca. 180° gegeben, deren Phasen zwischen $+\phi/2$ und $-\phi/2$ wechseln.

Bei sehr hohen Drehgeschwindigkeiten (≥ 50 kHz) gelingt es, sowohl die starken homonuklearen dipolaren Kopplungen zwischen Protonen als auch die heteronuklearen dipolaren Kopplungen zwischen Protonen und Kohlenstoffen auszumitteln. So lassen sich auch Protonenspektren messen, wie sie sonst in der Lösungs-NMR erhalten werden [10]. Bei standardmäßig genutzten Drehgeschwindigkeiten (< 25 kHz), wie in dieser Arbeit verwandt, verhindert die starke dipolare Kopplung der Protonen meist deren Detektion.

Um Protonenspektren zu erhalten, werden deshalb deuterierte Proben mit nur wenigen „verdünnten“ Protonen gemessen [11]. Es lassen sich auch Deuteronen messen, wobei die dipolare Kopplung zwischen Deuteronen schwächer ist als zwischen Protonen und ein MAS-Geschwindigkeit von ca. 5 kHz ausreicht, um sie zu unterdrücken. Die Detektion der Deuteronen ist um ca. den Faktor 8,6 sensitiver als bei H, vor allem durch die schnellere T_1 Relaxation der D, bedingt durch ihre starke quadrupolare Kopplung [12]. Deutierte Proteine sind jedoch meistens schwieriger und teurer in der Herstellung als vollständig protonierte.

1.3.3. Kreuzpolarisation

Die Kreuzpolarisation (cross polarization, CP) kann die Signale von Kernen mit einem niedrigen gyromagnetischen Verhältnis verstärken. Dazu wird die Polarisation von Protonen auf z.B. ^{13}C übertragen.

Um diesen Effekt zu nutzen, wird die Polarisation der H und der ^{13}C über einen längeren Zeitraum (bis zu 2 ms) mit jeweils geeigneten Pulsen rechtwinklig zum äußeren Magnetfeld B_0 fokussiert. Die Amplituden dieser Pulse bestimmen die Frequenz, mit der sich das jeweilige magnetische Moment im Bezug auf das äußere Magnetfeld dreht. Wenn diese Frequenzen von H und ^{13}C sich genau um die einfache oder doppelte Drehgeschwindigkeit des Rotors unterscheiden (Hartmann-Hahn-Bedingung [13]), ist eine Übertragung der Magnetisierung zwischen den Kernen durch ihre dipolare heteronukleare Kopplung möglich. Die deutlich größere Magnetisierung der Protonen (durch ihre größere Anzahl und ihr größeres γ) mischt sich dabei mit der der Kohlenstoffe. Damit wird das nach diesem Transfer gemessene Signal der ^{13}C deutlich verstärkt.

1.3.4. Protonen-getriebene Spin-Diffusion

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um die Polarisation zwischen gleichen Kernen, wie z.B. ^{13}C , zu übertragen und damit den Abstand zwischen ihnen zu untersuchen. Die Protonen-getriebene Spin-Diffusion (proton driven spin diffusion, PDS) [7, 14] ist eine der Standard-Methoden dafür und wird häufig in 2D-Spektren genutzt. Zuerst wird dabei mittels CP die Magnetisierung der ^{13}C erhöht. Nach einer variablen Evolutionszeit für die indirekte Dimension wird die H- ^{13}C Entkopplung abgeschaltet und die Magnetisierung des Kohlenstoffs mit einem 90° Puls parallel zum Magnetfeld B_0 gebracht. Nach einer wählbaren Mischzeit (t_{mix}), in der sich die Magnetisierung mit Hilfe des Protonennetzwerks innerhalb der Kohlenstoffe mischt, wird zurück in die transversale Ebene gepulst und die direkte Dimension aufgezeichnet. So entstehen 2D Spektren mit Kreuzsignalen, die bei den beiden chemischen Verschiebungen zweier benachbarter ^{13}C erscheinen. Dabei entscheidet t_{mix} über die überbrückte Distanz zwischen zwei Kernen durch den Raum. Mit PDS wurden z. B. die intermolekularen Interaktionen von humanen α -Synuclein Amyloidfibrillen untersucht und damit die Orientierung der β -Faltblätter festgestellt [15].

1.3.5. Probenmarkierung und Strukturbiologie

Mit NMR lässt sich von den Kohlenstoffisotopen nur ^{13}C messen (Abschnitt 1.2.1 auf Seite 2), das natürlich zu 1,1 % vorkommt. Besonders für Korrelations-Experimente zwischen Kohlenstoffen ist diese Konzentration meistens zu klein und Analyten werden deshalb mit ^{13}C markiert. Dazu werden z. B. während der Proteinexpression in Minimalmedien die Wirte mit ^{13}C angereicherten Zuckern oder Aminosäuren versorgt. So lassen sich die exprimierten Proteine uniform oder nur mit bestimmten Aminosäure-Arten markieren. Andere Schemata markieren nur bestimmte Kohlenstoffe in ausgewählten Aminosäuren. Beispielsweise resultiert eine Expression mit [1,3- ^{13}C] oder [2- ^{13}C] markiertem Glycerol als Kohlenstoffquelle in komplexen Markierungsmustern und kann helfen die NMR-Signale den Kernen zuzuordnen [16].

Mit Hilfe der bisher beschriebenen Methoden und weiteren NMR-Experimenten lassen sich Spektren messen, aus denen strukturelle Daten gewonnen werden können. So wurden mit ssNMR bisher verschiedene Proteinstrukturen aufgeklärt (SH3 [16, 17], Kalitoxin [18], Ubiquitin [19], GB1 [20, 21], Thioredoxin [22], BPTI [23]), unter anderem auch fibrilläre (Amyloid Beta [24], Het-S [25], α -Synuclein [26]), oligomere (Crh [27], α -B Crystallin [28, 29], „Nadel“ des Typ-III-Sekretionssystems [30]) und transmembranäre Systeme (LH2 [31]). Neue Untersuchungen an ganzen Zellen und Zellwänden von *E. coli* zeigen die Möglichkeit, Membranproteine auch in ihrer natürlichen Umgebung zu untersuchen [32].

Dennoch gehört die ssNMR noch nicht zum Standardrepertoire der Strukturaufklärung. Vor allem ihre relativ geringe Sensitivität limitiert ihre Anwendung. Diese Problematik wird dadurch verstärkt, dass die Probenvolumina klein und die untersuchten Systeme häufig relativ groß sind.

1.4. Dynamische Kernpolarisation (DNP)

Im Jahre 1953 beschrieb Overhauser die Möglichkeit, die relativ große Boltzmann Polarisation von freien Elektronen (siehe Tabelle 1.1 auf Seite 3) auf Atomkerne zu übertragen [33]. Im selben Jahr waren erste Versuche an metallischem Lithium erfolgreich [34]. Der Grundgedanke ist dabei ähnlich wie bei der Kreuzpolarisation. Da das γ der Elektronen sehr groß ist, sind Signalverstärkungen von mehreren Größenordnungen denkbar. So lassen sich beispielsweise H Signale theoretisch um den Faktor 660 verstärken, ^{13}C um den Faktor 2640 und ^2H um den Faktor 4300. Da die Signalintensität proportional zum Quadrat der Messzeit ist, verkürzt ein Verstärkungsfaktor von 660 die Messzeit theoretisch um den Faktor 435600.

Um diesen Effekt zu nutzen, müssen die Elektronenspins angeregt werden. Dazu wird eine Mikrowellenbestrahlung mit der Frequenz von Elektronen im NMR-typischen Magnetfeld benötigt. Zusätzlich ist die Relaxation der Elektronen sehr schnell. Um sie zu verlangsamen und damit den Polarisations-Transfer zu verbessern, wird meistens bei möglichst niedrigen Temperaturen gearbeitet.

Die mögliche Signalverstärkung (Faktor ϵ) lässt sich vereinfacht beschreiben als (nach Gerfen et al [35] für den Mechanismus der thermischen Mischung, auch für den Mechanismus des Kreuzeffekts anwendbar, siehe nächster Abschnitt):

$$\epsilon \sim \frac{\gamma_e}{\gamma_n} \cdot \frac{N_e^2}{\delta^2} \cdot \frac{B_{1e}^2}{B_0} \cdot T_{1n} \cdot T_{1e} \quad (1.8)$$

Das heißt, die mögliche Verstärkung ist um so größer, wenn das γ des untersuchten Kerns (γ_n) klein, die Konzentration an Radikalen (N_e) hoch, die homogene Linienbreite der Elektronen (δ) klein, die Stärke des Mikrowellenfeldes (B_{1e}) groß, das äußere Magnetfeld (B_0) klein und die Relaxationszeiten von Kern (T_{1n}) und Elektron (T_{1e}) lang sind. Diese vereinfachte Berechnung gilt nur mit folgenden Annahmen: schnelle Spin-Diffusion, niedrige Mikrowellenstärke, niedrige Radikalkonzentration und homogene Linien der Elektronen im EPR-Spektrum.

Erst in den letzten zwanzig Jahren wurden die benötigten Mikrowellenquellen entwickelt [35, 36] und inzwischen sind DNP-Spektrometer kommerziell erhältlich. Sie bestehen

aus einem NMR-Magneten mit speziellem MAS-Probenkopf, in dem sich Proben bei ca. 100 K drehen lassen und einem Gyrotron für die nötige Mikrowellenstrahlung, die möglichst homogen und verlustfrei in die Probe gestrahlt wird. Eine schematische Darstellung eines DNP-Spektrometers findet sich in Abbildung 1.3 auf Seite 16.

Als freie Elektronen werden meistens stabile organische Radikale zu der Probe gegeben. Im Lauf der Zeit wurden diese Radikale optimiert, um große Verstärkungsfaktoren zu ermöglichen und sie in biologischen Proben anzuwenden. Ein bekanntes Beispiel ist TOTAPOL ([37], siehe Seite 17), das in vielen Untersuchungen genutzt wird [38].

Zuerst wird also die Polarisation von den freien Elektronen auf Kerne in ihrer Nähe übertragen. Von diesen Kernen verteilt sie sich wahrscheinlich durch Spin-Diffusionsprozesse, vor allem über das Protonennetzwerk, über die ganze Probe. Deshalb ist ein gewisser Prozentsatz an Protonen im Lösungsmittel wünschenswert, meist 10 % [39].

Mit Hilfe der DNP-Technik wurden unterschiedlichste Systeme untersucht und die Signalverstärkung demonstriert: Bacteriophagen [40, 41], Kristalle von amyloidogenen Peptiden [42, 43], SH3-Fibrillen [44], Peptide in Membranen [45] und deuterierte Proteine [46] zeigen die breite Anwendung von DNP.

Studien an biologischen Makromolekülen wurden vor allem an Bakteriorhodopsin [47–49] durchgeführt. Das ^{13}C markierte Retinal, der Chromophor in diesem Photorezeptor, wurde in Konzentrationen von ca. 2000 nmol pro Rotor gemessen [50].

In jüngster Zeit wurde z. B. ein Signal-Peptid an einem in Lipiden rekonstituierten Translocon-Komplex [51] untersucht. Auch wurden erste Arbeiten an Proteinen in nativen Membranen durchgeführt, beispielsweise PagL im Extrakt ganzer Zellen (ca. 500 nmol/Rotor [52]) oder Mistic (ca. 20 nmol/Rotor [53]).

Auch in der Materialforschung wird DNP genutzt. Es wurde z.B. die Bindung von organischen Molekülen an Silizium-Polymere untersucht [54–56]. Dabei werden an den Bindungsstellen der organischen Moleküle nur Protonen gebunden und dann mit kurzen CP-Kontaktzeiten die Polarisation auf die Bindungs-Silizium-Atome übertragen.

1.4.1. DNP-Transfer-Mechanismen

Es wurden verschiedene DNP-Mechanismen beschrieben, je nachdem wie viele Elektronen an einem Polarisations-Transfer beteiligt sind. Ungepaarte Elektronen werden vor allem mittels Elektronenspinresonanz (electron paramagnetic resonance; EPR) untersucht. Ähnlich wie in der NMR wird dabei die Probe in ein äußeres Magnetfeld gebracht und dann die Absorption von Mikrowellen aufgezeichnet. Aus dem EPR-Spektrum eines Radikals lässt sich schließen welcher DNP-Mechanismus bevorzugt stattfindet.

und vielen Protonen (siehe auch Seite 15) und durch eine kurze T_2 -Zeit der Elektronen verbreitert und sind damit schlechter mit einer Mikrowellenstrahlung anzuregen. Die Verstärkung von Kernsignalen mittels SE liegt meist unter 15. Für eine detaillierte Betrachtung des SE siehe Hovav et al. [57].

„cross effect“

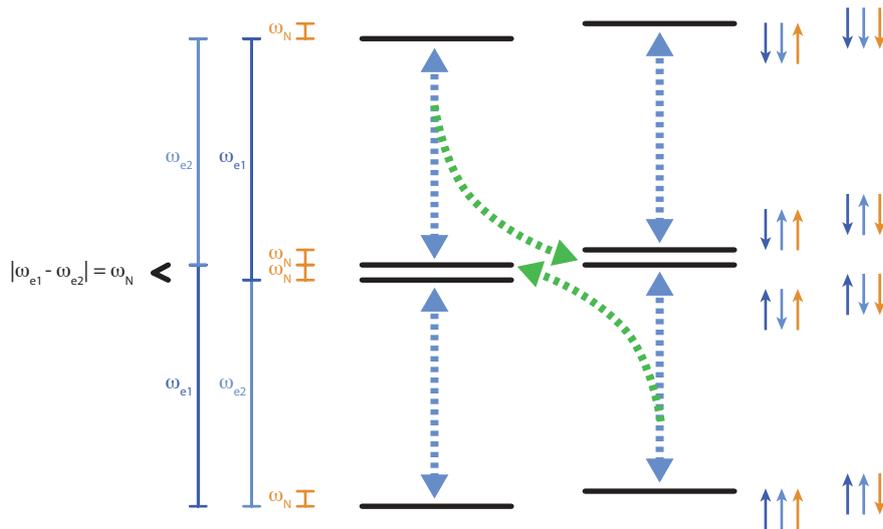


Abbildung 1.2.: Schema des CE-Mechanismus. Die schwarzen Balken repräsentieren die möglichen Energielevel eines Elektron-Elektron-Kern-Triplets (e1, e2 und N) und die Pfeile auf der rechten Seite die entsprechenden Spinzustände. Die gestrichelten blauen Pfeile stellen den Einzelquanten-Übergang bei Mikrowellenanregung dar. Die gestrichelten grünen Pfeile repräsentieren die „verbotenen“ Übergänge, die gleichzeitig mit den Einzelquanten-Übergängen angeregt werden, wenn der Unterschied der Elektronenfrequenzen im Betrag der Kernfrequenz gleicht (siehe Text).

Wenn zwei Elektronen dipolar gekoppelt sind und ihre Polarisation auf einen Kern übertragen wird, spricht man vom „cross effect“ (Kreuzeffekt, CE). Dabei sollte die Differenz der beiden Elektronenfrequenzen idealerweise der Larmorfrequenz des Kerns entsprechen ($|\omega_{e1} - \omega_{e2}| = \omega_N$), so dass die EPR-Seitenbande eines Elektrons mit der Einzelquanten-Frequenz des zweiten zusammenfällt. Dadurch lassen sich ein Einzelquanten- und ein „verbotener“ Übergang gleichzeitig anregen (blaue und grüne gestrichelte Pfeile in (Abbildung 1.2)). So vergrößern sich die Populations-Unterschiede zwischen den Kernleveln und die Kernsignale werden verstärkt. Dies lässt sich auch als „Flip-Flop-Prozess“ beschreiben, bei dem sich durch Anregung eines Elektronenspins sowohl der Spinzustand des zweiten gekoppelten Elektrons als auch ein Kernspinzustand ändern.

Die dipolare Kopplung zwischen den Elektronen hängt erstens vom Abstand der beiden Radikale ab. Eine Distanz von weniger als 10 Å führt zu einem Frequenz-Unterschied, der größer ist als die Kernfrequenz ([58] für Protonen in einem 400 MHz Magnetfeld). Zweitens spielt die Orientierung der beiden Elektronenspins zueinander eine entscheidende Rolle. Am größten ist die gemessene DNP-Verstärkung, wenn der Winkel zwischen den beiden Spins ungefähr 90° beträgt, das heißt, die beiden C-NO-C Ebenen der einzelnen TEMPO-Moleküle stehen am besten rechtwinklig zueinander [58]. Es wurden spezielle Biradikale entwickelt, um diese Voraussetzungen möglichst optimal zu erfüllen (siehe auch Seite 17).

Im echo-detektierten EPR-Spektrum eines solchen Moleküls ist die inhomogene Breite größer als die Larmorfrequenz des Kerns, die homogene Linienbreite allerdings kleiner ($\Delta > \omega_N > \delta$). Eine Anregung im tieferen Feld führt zu einem negativen Maximum und im höheren Feld zu einem positiven Maximum der DNP-Verstärkung (siehe Abbildung 1.5 auf Seite 19). Für eine detaillierte Betrachtung sei auch hier auf eine Veröffentlichung von Hovav et al. verwiesen [59].

Der CE hängt unter anderem von B_0^{-1} ab und lässt sich deshalb auch bei hohen Magnetfeldern ausnutzen. Bei dem in dieser Arbeit verwandten Feld von 9,4 T und durch den Einsatz von Biradikalen ist CE der vorherrschende Mechanismus. Eine Beteiligung des SE oder, bei hohen Radikal-Konzentrationen, des TM an der Polarisation-Übertragung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

„thermal mixing“

Wenn mehr als zwei Elektronen dipolar gekoppelt sind und ein Elektronen-Netzwerk bilden, spricht man von dem DNP-Mechanismus als „thermal mixing“ (thermischer Mischung; TM). Zwischen CE und diesem Mechanismus lässt sich nicht immer unterscheiden, es ist vielmehr, je nach Elektronen-Konzentration, ein fließender Übergang. Beim TM sind beide EPR-Linienbreiten größer als die Kern-Larmorfrequenz ($\Delta, \delta > \omega_N$) und der Mechanismus lässt sich mit dem Konzept der Spintemperatur und der thermischen Reservoirs folgendermaßen skizzieren.

Das Elektronen-Zeeman-Reservoir, d.h. ihre Energie durch die Zeeman-Aufspaltung, ist im Magnetfeld bei kryogenen Temperaturen deutlich größer („kälter“) als das Reservoir der Kernspins. Es ist unter Mikrowellenbestrahlung thermisch mit dem Elektronen-Spin-Spin-Reservoir gekoppelt und dieses wiederum mit dem Reservoir der Kernspins. Durch die Kopplung der Reservoirs gleichen sich die „Temperaturen“ an, das Reservoir der Kernspins wird „gekühlt“ und so wird schließlich die Polarisation der Kerne gesteigert [5, 60].

Mit der thermischen Mischung lassen sich hohe Verstärkungen erzielen. Die dafür benötigten hohen Elektronen-Konzentrationen haben jedoch teilweise negative Effekte für die NMR-Spektroskopie (siehe Abschnitt 1.5.1 auf Seite 20).

Ausbreitung der Polarisation

Bei der DNP wird nicht nur die Polarisation der Kerne um ein paramagnetisches Zentrum gesteigert, der Effekt dringt vielmehr auch weiter in die Probe ein. Dies ist vor allem über das Netzwerk stark dipolar gekoppelter Protonen möglich, ähnlich wie bei einem PDS-D-Spektrum (vgl. Abschnitt 1.3.4 auf Seite 9) und dauert nur einige Hundert Millisekunden [49]. In Untersuchungen an Kristall-Nadel eines kleinen Peptids wurden auch Signale von Kernen deutlich verstärkt, die mehr als 100 nm vom Radikal entfernt sind [42].

Im einfachsten Fall des SE liegen die direkt polarisierten Kerne innerhalb von 10 Å bei Protonen und innerhalb von 30 Å bei Kohlenstoffen um das Radikalzentrum. Bei TO-TAPOL (siehe Seite 17), das heißt unter dem CE-Mechanismus, werden Protonen in bis zu 20 Å direkt polarisiert [57]. Je weniger Protonen in diesem Kernbereich liegen, desto weniger ist die Seitenbande im EPR-Spektrum durch Hyperfeinkopplung verbreitert und der schmale Frequenzbereich der Mikrowelle kann einen höheren Anteil der Seitenbande anregen. Eine Verbreiterung der Seitenbanden durch dipolare e^- - e^- Wechselwirkungen, wie im Fall des CE und TM, spielt kaum eine Rolle, da die Elektronen gekoppelt sind und die Anregung eines schmalen Bereiches auch Elektronen außerhalb der Mikrowellenfrequenz beeinflusst.

Auf der anderen Seite müssen im Kernbereich ausreichend Protonen sein, um die Polarisation über deren homonukleare, dipolar Kopplung zu übertragen. Ein guter Wert sind 10% Protonen im Lösungsmittel [42]. Der Aufbau der Polarisation dauert für die innersten Kerne am kürzesten. Die Elektronen-Polarisation stellt sich nach dem DNP-Prozess in kurzer Zeit wieder her und ein Elektron kann somit viele Kerne polarisieren.

Je kälter die Probe ist, desto unbeweglicher sind die Lösungsmittel-Moleküle und desto stärker ist die dipolare Kopplung der Protonen [56]. Entsprechend trägt eine kryogene Temperatur dazu bei, die Polarisation schnell über die Probe auszubreiten. Bei ungefähr 100 K ist der DNP-Aufbau über alle Protonen gemittelt der $H T_1$ -Zeit ähnlich. Bei tieferen Temperaturen (6 K) ist der DNP-Aufbau deutlich schneller.

1.4.2. Instrumentierung für DNP-Messungen

Gyrotrone sind starke Mikrowellenquellen, die bei Frequenzen über 100 GHz emittieren. Erst mit ihrer Entwicklung wurden DNP-Systeme für höhere Felder möglich [36]. Vor

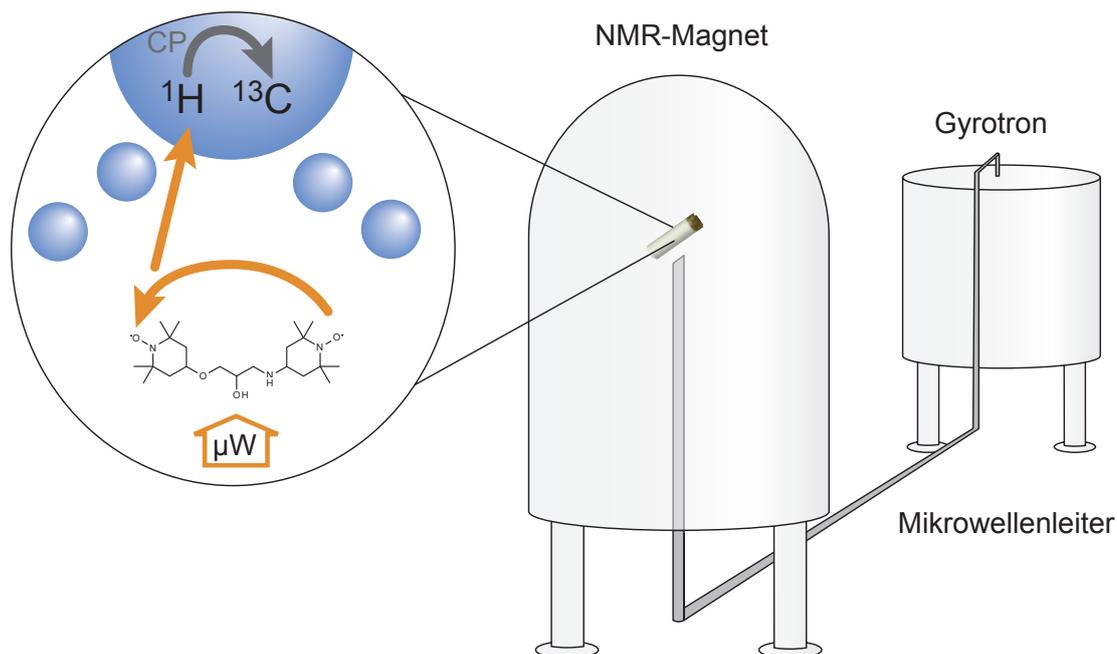


Abbildung 1.3.: Schema eines DNP-Spektrometers und Piktogramm des DNP-Mechanismus. Die Polarisation der Elektronen wird unter Mikrowellenbestrahlung (μW) in einem Flip-Flop-Prozess auf Protonen (siehe Text) und anschließend mittels Kreuzpolarisation (CP) auf Kohlenstoffe übertragen. Dadurch werden die Signale von Analyt-Molekülen (blau) durch DNP verstärkt.

allein in der Arbeitsgruppe von Robert Griffin wurde diese Entwicklung vorangetrieben und mündete schließlich in kommerziell vertriebenen DNP-Spektrometern der Firma Bruker. In dieser Arbeit wurde das erste ausgelieferte DNP-System für einen 9,4 T NMR-Magneten mit einer Mikrowellenfrequenz von 263 GHz benutzt (für eine Beschreibung siehe Abschnitt 2.2.1 auf Seite 38). Instrumente für höhere Felder sind ebenso wie Instrumente mit gepulsten Mikrowellen in der Entwicklung.

1.4.3. Biradikale für die DNP

TEMPO

Zuerst wurde ein Standard-Agens der EPR-Spektroskopie für DNP-Versuche genutzt. TEMPO ((2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl; [61]) ist ein stabiles, organisches NO-Radikal (Nitroxid), das sowohl günstig verfügbar als auch ausreichend wasserlöslich ist. Seine Strukturformel ist in Abbildung 1.4 auf der nächsten Seite gestrichelt markiert und sein EPR-Spektrum in Abbildung 1.5 auf Seite 19 dargestellt. Bei Raumtempera-

tur ist TEMPO in Lösung für mehrere Tage stabil, es neigt jedoch dazu mit anderen Molekülen, z.B. den SH-Gruppen von Cysteinen, schnell zu reagieren [62]. Es kann auch als Katalysator in der organischen Synthese dienen [63]. Mit TEMPO wurden die ersten DNP-Messungen bei hohen NMR-Feldern an gefrorenen Lösungen durchgeführt [35, 36]. Als Konsequenz der effektiveren DNP mittels CE wurden Biradikale entwickelt, bei denen vor allem ein vorgegebener Radikal-Radikal-Abstand zwischen zwei TEMPO-Molekülen für höhere Verstärkungsfaktoren sorgt.

TOTAPOL

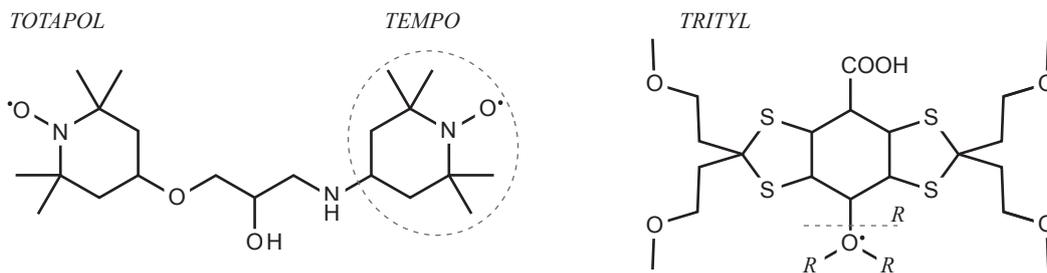


Abbildung 1.4.: Links: Strukturformel von TOTAPOL (1-(TEMPO-4-*oxy*)-3-(TEMPO-4-*amino*)-propan-2-ol). Die graue, gestrichelte Markierung zeigt ein TEMPO Molekül. Rechts: Strukturformel von Trityl.

Schließlich wurde ein möglichst hydrophiles Biradikal für biologische Proben entwickelt. Dazu wurden in TOTAPOL (1-(TEMPO-4-*oxy*)-3-(TEMPO-4-*amino*)-propan-2-ol; im Folgenden mit TP abgekürzt) in die Verbindung der TEMPO-Moleküle eine Hydroxylgruppe und ein sekundäres Amin eingebaut (siehe Abbildung 1.4).

Die beiden Elektronen der Radikale in TP sind $11,2 \text{ \AA}$ voneinander entfernt und durch die relativ unflexible Verbindung der TEMPO-Moleküle werden starke Elektron-Elektron J-Kopplungen verhindert. In anderen Molekülen, z. B. auch bei hohen Konzentrationen von TEMPO, sind die J-Kopplungen 10-fach oder stärker als die Hyperfeinkopplung und im EPR-Spektrum als zwei zusätzliche Linien zu beobachten [37].

Auf der anderen Seite ist die dipolare Elektron-Elektron Kopplungskonstante von TP verglichen mit einer 40 mM Lösung von TEMPO (0,5 MHz) deutlich größer ($\sim 30 \text{ MHz}$). Das Absorptions-EPR Spektrum ist vergleichsweise breit ($\Delta \approx 660 \text{ MHz}$, siehe auch Abbildung 1.5 auf Seite 19; [12]) und zeigt hauptsächlich drei Linien. TP unterstützt also eine Polarisations-Übertragung mittels CE und ermöglicht damit eine effektive DNP-Verstärkung auch bei hohen Feldern (siehe auch Seite 13).

TP hat ein Molekulargewicht von 399,57 g/mol und ein berechnetes Volumen von

405,27 Å³ (Chimera [64]). Der Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (logP) von TP ist 0,12 [65] – berechnet liegt er bei 1,49 (xlogP2, Entwicklung aus [66]). Es ist damit noch hydrophiler als TEMPO, das einen logP von 1,83 [67] (berechnet 1,79) hat. Im Allgemeinen ist TP eine ausgesprochen polare organische Substanz und Wechselwirkungen mit anderen geladenen Molekülen, wie beispielsweise Kopfgruppen von Lipiden, sind wahrscheinlich. Bei pH 7 ist TP bei Raumtemperatur mehrere Tage stabil, bei pH 5 hingegen hat es bei –20 °C nur eine Halbwertszeit von ca. 144 h und wird bei RT schnell inaktiviert [65].

Abbildung 1.5 auf der nächsten Seite zeigt neben dem EPR-Spektrum auch die gemessene DNP-Verstärkung und ein für Nitroxidradikale typisches Verhalten: Bei Kernen mit niedrigem γ , in diesem Fall ¹³C, ist die Verstärkung bei einer Anregung im niedrigen Feld (links) größer [12] und negativ.

TP wird meist in Konzentration von 10–25 mM eingesetzt, was vor allem auf den Erfahrungen der Arbeitsgruppe von Robert Griffin beruht. Es waren jedoch keine Untersuchungen veröffentlicht, die systematisch den Einfluss der Konzentration auf DNP-Messungen analysieren.

Trityl und weitere Radikale

Trityl (OX063) hat ein relativ schmales EPR-Spektrum ($\Delta \approx 55$ MHz) und einen relativ langen DNP-Aufbau (21 s) [12, 69]. Bei geeigneten Feldern wird die Polarisation zu Kernen mit kleinem γ folglich mittels thermischer Mischung übertragen. Bei deuteriertem Prolin lassen sich Verstärkungen der ²H Signale von über 700 messen [12].

Viele weitere Radikale wurden entwickelt, z. B. indem zwei TEMPO-Moleküle durch eine Spiroverbindung rechtwinklig zueinander verbunden wurden [58]. Damit lassen sich zum Teil größere Verstärkungsfaktoren als mit TP erzielen. Die Mehrheit solcher Moleküle ist allerdings schlecht wasserlöslich und damit für biologische Fragestellungen in wässrigen Medien ungeeignet.

1.4.4. Andere Formen der DNP

Es werden auch andere Möglichkeiten untersucht, die DNP zu nutzen. Lösungs-DNP, Schmelz-DNP und DNP in der Magnetresonanztomographie sind Beispiele dafür. Im Fall der Lösungs-DNP wird die Polarisation direkt in einer Lösung bei Raumtemperatur übertragen.

Ein Beispiel dafür ist die photochemisch induzierten DNP, bei der mit Hilfe von Laserbestrahlung ein lokaler Radikal-Paar-Mechanismus genutzt wird. Dafür wird ein lich-

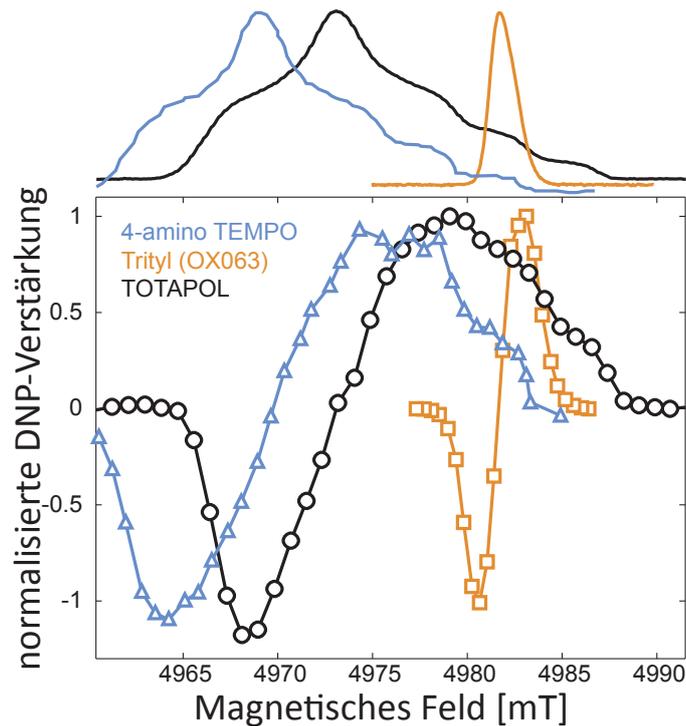


Abbildung 1.5.: Die unterschiedlichen DNP-Profile von 4-amino TEMPO (blau), TOTAPOL (schwarz) und Trityl (orangefarbig). Oben sind die Zwei-Pulse Echo-detektierten EPR Spektren der drei Radikale bei 140 GHz dargestellt (Die Daten von 4-amino TEMPO sind mit Erlaubnis verändert übernommen aus Farrar et al. [68], Copyright 2001, American Institute of Physics; Die Daten von TOTAPOL und Trityl entstammen einer persönlichen Nachricht von Thorsten Maly [12]).

tabsorbierender, oxidierender Farbstoff in seinen Triplett-Zustand angeregt und entzieht einer oxidierbaren Aminosäure ein Elektron, so dass kurzzeitig ein Radikal-Paar entsteht. Mit dieser Technik lässt sich das C-H Signal von Peptiden um das S/N von 16 steigern [70]. Die Aminosäure sollte allerdings möglichst schnell zurück reagieren, so dass keine paramagnetische Relaxations-Verstärkung (Abschnitt 1.5.1 auf der nächsten Seite) auftritt.

Andere Untersuchungen, die Polarisation bei Raumtemperatur zu übertragen, zeigen niedrige Verstärkungsfaktoren und ein starkes Erhitzen der wässrigen Probe durch die Mikrowellenbestrahlung [71]. Letzteres lässt sich elegant vermeiden, indem sehr kleine Volumina untersucht werden (z.B. 80 nl von ^{15}N 4-Hydroxy-TEMPO in Wasser). So kann die Absorption der Mikrowellen vermindert werden, und es lassen sich Verstärkungen von 30 bei 310 K erreichen [72].

Die Schmelz-DNP (Dissolution-DNP) verfolgt einen Mittelweg. Die Proben werden

bei kryogenen Temperaturen polarisiert, dann geschmolzen, z.B. mit einem Laser, und anschließend in einem zweiten Magneten bei Raumtemperatur gemessen [73]. Neueste Untersuchungen polarisieren einen Liganden bei 1,4 K, schmelzen die Probe mit D₂O und messen im NMR-Magneten die Übertragung der Polarisation von diesem Liganden über den Rezeptor auf den nächsten Liganden [74].

In der Magnetresonanz-Tomographie werden praktisch nur Protonen und ihre Relaxation detektiert, da ¹³C und ¹⁵N nicht ausreichend natürlich vorkommen und kaum räumliche Auflösung zulassen. Mit Hilfe der DNP könnten auch solche Kerne gemessen werden und eine große Weiterentwicklung dieser Tomographie sein. Dafür werden entweder hyperpolarisierte Gase [75] in Hohlräumen, wie z.B. der Lunge genutzt, oder hyperpolarisierte Lösungen werden injiziert oder infundiert [76, 77].

1.5. Auswirkungen eines paramagnetischen Zentrums in der NMR

1.5.1. Paramagnetische Relaxations-Verstärkung (PRE)

Paramagnetische Zentren beeinflussen lokale Magnetfelder stark und verändern dadurch die NMR-Signale benachbarter Kerne. Diese Veränderung setzt sich primär aus drei Effekten zusammen: Die Paramagnetische Relaxations-Verstärkung (paramagnetic relaxation enhancement, PRE) äußert sich in stark verkürzten T₂-Zeiten benachbarter Kerne und damit in stark verbreiteten NMR-Signalen. Pseudo-Kontakt Verschiebungen (pseudo-contact shifts, PCS) verändern die gemessenen chemischen Verschiebungen und restliche dipolare Kopplung (residual dipolar coupling, RDC) die gemessenen skalaren Kopplungen.

In dieser Arbeit kommen nur Nitroxidradikale zum Einsatz, deren ungepaartes Elektron isotropisch ist und deshalb als weitreichenden Effekt nur PRE aufweist [78]. Andere Untersuchungen nutzen z.B. Cu²⁺ Ionen als paramagnetische Zentren [79].

Nach Batiste und Wagner [80] ist der durch ein paramagnetisches Zentrum hervorgerufene Anteil der transversalen Relaxation $R2^{sp}$ bei Raumtemperatur vereinfacht:

$$R2^{sp} \sim \frac{\gamma^2}{r^6} \quad (1.9)$$

Die PRE nimmt also stark mit dem Abstand ab und ist für Kerne mit großem gyromagnetischem Verhältnis stärker. Bei Protonen lassen sich noch in 25 Å Entfernung vom Radikal Veränderungen der NMR-Signalen messen, Kohlenstoffsignale behalten in einem Abstand von 15–20 Å noch 85–95 % ihrer Intensität [81].

Auf der anderen Seite sind Kerne in einem Abstand von weniger als $\sim 10 \text{ \AA}$ zum Radikal meistens so stark durch die PRE beeinflusst, dass sie in der NMR nicht mehr detektiert werden können. Bei Kohlenstoffen sind Pseudo-Kontakt Verschiebungen und Linienverbreiterung auch erst bei solch kleinen Abständen von Bedeutung [49].

Mit Hilfe der PRE lassen sich also relativ große Abstände zwischen paramagnetischem Zentrum und anderen Kernen messen, mit denen NMR-Daten ergänzt werden können [79]. Die Signale von Kernen, die nah an einem paramagnetischen Zentrum sind, lassen sich durch ihre Verbreiterung allerdings nicht mehr messen.

1.5.2. Paramagnetische Verschiebung

Radikale verändern durch ihre dipolare Hyperfeinkopplung zu benachbarten Kernen auch deren chemische Verschiebung. So sind z. B. bei einem Abstand von 9 \AA zwischen Elektronen und Protonen Änderungen der Protonenfrequenz von bis zu 200 kHz zu erwarten [82]. Bei Proben mit Kupfer- und Mangan-Ionen sind diese Verschiebungen bei H und ^{13}C bis zu 900 ppm groß, wenn der Abstand zwischen Kern und paramagnetischem Zentrum weniger als 5 \AA beträgt. Die Abhängigkeit der Verschiebung vom Abstand der Kerne zum paramagnetischen Zentrum ist wahrscheinlich r^{-3} [83]. Wie auch schon bei der PRE sind diese Auswirkungen besonders bei hohen Radikal-Konzentrationen zu erwarten.

1.6. Proteindynamik bei kalten Temperaturen

NMR-Messungen bei kryogenen Temperaturen wurden bisher besonders aus zwei Gründen durchgeführt: Die Sensitivität der Messung wird um einen Faktor von 2–3 erhöht, weil der Populationsunterschied der Spins größer wird (siehe Abschnitt 1.2 auf Seite 1). Außerdem lassen sich Zwischenzustände von Proteinstrukturen stabilisieren und untersuchen. Dies wurde z.B. bei Proteinen mit Metall-Zentrum [84] oder verschiedenen funktionellen Zuständen von Membranproteinen [85] genutzt.

Kryogene Temperaturen werden auch bei Röntgenbeugungs-Experimenten häufig genutzt, um die Proben vor Bestrahlungs-Schäden zu schützen. Im Allgemeinen sind Proteinstrukturen, die bei kryogenen Temperaturen oder Raumtemperatur gemessen werden, bemerkenswert ähnlich, und kleine strukturelle Unterschiede hängen oft nur mit den verschiedenen Methoden der Durchschnittsberechnung der Atomabstände zusammen [20]. In der DNP sind kryogene Temperaturen nötig, um einen effektiven Polarisationstransfer von Elektronen auf Kerne zu ermöglichen (vgl. Abschnitt 1.4 auf Seite 10 und [46, 50, 86]).

Die dynamischen Prozesse in hydrierten Proteinen während des Einfrierens und bei kryogenen Temperaturen sind jedoch nicht vollständig bekannt. Dies liegt unter anderem an den unterschiedlichen Zeitfenstern verschiedener Methoden. In der NMR-Spektroskopie werden normalerweise folgende Zeitskalen unterschieden: langsam (s bis ms), intermediär (μ s) und schnell (ns und kürzer) [87]. Für die Messung von dynamischen Systemen heißt das, dass langsame Prozesse als verschiedene Zustände aufgelöst werden können. Schnelle Prozesse finden während einer Messung statt und nur der gewichtete Durchschnitt ist messbar. Im intermediären Zeitrahmen interagieren die dynamischen Prozesse mit der Messung. Meist führt das zu sehr schwachen und breiten Signalen.

1.6.1. Dynamik von hydrierten Proteinen beim Einfrieren

Beim Einfrieren eines hydrierten Proteins lassen sich im Hinblick auf die Dynamik drei Bereiche unterscheiden:

1. Das Gros des Lösungsmittels („bulk“) wird zu Eis oder einem Glas,
2. die Lösungsmittel-exponierten Seitenketten interagieren mit den Lösungsmittel-Molekülen der Hydrationshülle und
3. die vom Lösungsmittel unabhängige Dynamik des Proteins verlangsamt sich.

Alle diese Prozesse können die NMR-Spektren des Proteins beeinflussen. Die verlangsamte Dynamik kann im intermediären Zeitrahmen liegen und mit experimentellen Parametern interagiert, beispielsweise mit der heteronuklearer Entkopplung [88]. Besonders Methylgruppen lassen sich in einem bestimmten Temperaturbereich nur sehr schlecht detektieren (häufig um ca. 240 K [89, 90]).

Die drei genannten Bereiche unterscheiden sich jeweils in ihrem Einfrierverhalten.

1. Das Einfrieren des freien Lösungsmittels findet meist bei einer relativ eng definierten Temperatur statt. Da Eiskristalle andere Strukturen, wie Membranen oder Proteine, zerstören können, wird bei biologische Proben versucht, deren Bildung zu verhindern. Dafür werden Proben z. B. besonders schnell eingefroren oder ein Kryoprotektivum wird zugegeben. In wasserfreien Systemen ist die Kristallbildung häufig vernachlässigbar und langsames Einfrieren (0,1 K/s reichen häufig aus) ohne Kryoprotektivum führt nicht zu Schäden [91].

Als Kryoprotektivum, das in Mischungen mit Wasser in einem Glas gefriert, wird häufig Glycerol verwandt – wie auch in dieser Arbeit. Glycerol dringt durch Membranen [92] und muss in Konzentrationen über 40 vol% eingesetzt werden, um eine

Kristallbildung zu verhindern. Es interagiert nicht direkt mit der Proteinoberfläche [93] und ist in der Hydrationshülle niedriger konzentriert als im Bulk [94].

Das Bulk-Eis scheint bis ca. -50°C nicht mit Proteinen zu interagieren – Ausnahmen sind besondere Eis-bindende Proteine [95].

2. Mit den Wassermolekülen direkt an der Proteinoberfläche verhält es sich anders, was schon früh durch scharfe Protonen Signale bei gefrorenen Proben gezeigt wurde [96] und von den OH Gruppen der gelösten Substanz abhängt [97]. Die Wassermoleküle dieser Hydrationshülle sind bei RT etwas weniger mobil als diejenigen des Bulks und ca. 10–15 % dichter [98]. Sie rotieren bei Temperaturen unter ca. 240 K schneller als diejenigen im freien Lösungsmittel.

Auch nehmen die ersten zwei Molekülschichten nie an der Kristallbildung teil und werden deshalb als „nicht-frierbar“ bezeichnet [99]. Dies entspricht ungefähr 1–3 Molekülen Wasser pro Seitenkette [100]. Das Wasser der Hydrationshülle beginnt erst bei ca. 220–200 K zu frieren [101] und seine Übergangstemperatur liegt bei 170 K [99]. Eine andere Untersuchung mittels dielektrischer Spektroskopie fand zwei dynamische Übergänge: Bei ca. 252 K findet wahrscheinlich die größte Fluktuation bei der Bildung und Auflösung von Wasserstoff-Brücken statt und bei 181 K die größte Fluktuation bei der lokalen Orientierung der Wasserstoffbrücken [102]. Wieder andere Studien stellen in Simulationen nur einen sehr schwachen Übergang fest [103].

Trotz der divergierenden Ergebnisse verschiedener Untersuchungen lässt sich sagen, dass die Hydrationshülle die Bewegung der exponierten Seitenketten stark beeinflusst. Häufig wird deshalb von einem Einschließen (caging) des Proteins durch das umgebende Wasser und von einer Lösungsmittel-kontrollierten Dynamik der Aminosäuren gesprochen ([104]). In vivo sind ungefähr 15 % aller Wassermoleküle Teil einer Hydrationshülle und entsprechend wichtig für die Funktion von Proteinen [98].

3. Die Dynamik des Proteins selbst setzt sich aus vielen verschiedenen Komponenten zusammen. Dies können z.B. sein: das Pendeln und Rotieren von Seitenketten, die Drehung von Methylgruppen („Hopping“), das Klappen aromatische Ringe und das „Pulsieren“ der Tertiärstruktur [105].

In der Literatur wird bei Proteinen häufig das Auftreten einer „Glasübergangstemperatur“ (T_g) diskutiert, bei der sich die Dynamik des Systems besonders stark verändert. Diese T_g ist bei hydrierten Proteinen um ungefähr 200 K beschrieben

[106]. Der Glasübergang findet allerdings über einen breiten Temperaturbereich statt [107]. Je visköser das Lösungsmittel ist [108] und je schneller das Einfrieren stattfindet [99], desto höher die T_g . Je höher der Druck ist, desto tiefer ist die T_g [109].

Unterhalb dieser T_g ist der Einfluss des Lösungsmittels nur noch schwach und die inhärente Dynamik des Proteins dominiert. Ein Glasübergang wurde mittels Neutronen-Streuung sowohl bei hydrierten als auch wasserfreien Proben beschrieben [110] – bei Proben ohne Methylgruppen jedoch nicht [106, 111]. Entsprechend treten zwischen der T_g und 100 K besonders die Drehungen der Methyl-Gruppen in den Vordergrund der insgesamt gemessenen Dynamik [88, 112]. Methylgruppen in einfachen metallorganischen Verbindungen, die ungehindert rotieren, verlangsamen unter 40 K ihre Dynamik und stehen unter 10 K still [113].

Auch das „Klappen“ aromatischer Ringe verlangsamt sich beim Einfrieren und wechselt häufig vom intermediären Regime der NMR zum langsamen, so dass die Signale der Aromaten bei tiefen Temperaturen deutlich stärker sind. Wahrscheinlich hängt dies auch mit einer höheren Effizienz des CP-Transfers zusammen [88].

Die Messung eines Glasübergangs bei Proteinen hängt allerdings von den unterschiedlichen Zeitfenstern der Messmethoden ab. Außerdem wird ein Glasübergang verschieden definiert – z.B. als Beginn von anharmonischen Bewegungen oder als eine Änderung der Steigung in einer Kalorimetrie-Messkurve – so dass die Werte für T_g in der Literatur uneinheitlich sind (beispielhaft in Tabelle 1.2 auf der nächsten Seite dargestellt).

Die ganze Hypothese eines Glasübergangs von Proteinen wird von manchen Autoren auch komplett verworfen und die beobachteten Veränderungen ausschließlich auf eine Interaktion des Proteins mit der Hydrationshülle zurückgeführt [104].

Im Allgemeinen zeigen NMR-Untersuchungen an Proteinen bei kryogenen Temperaturen eine Verbreiterung der Signale auf 2–3 ppm [117, 118]. Dabei ist zu beachten, dass beim Eintauchen eines 3,2 mm Rotors in flüssigen Stickstoff, wie in dieser Arbeit durchgeführt, die Probe relativ langsam mit ca. 10 K/s eingefroren wird [117]. Bei Retinal in Bakteriorhodopsin wurden Linienbreiten von 1 ppm gemessen, da die gemessenen Kohlenstoffe stark durch ihre Umgebung fixiert sind. Bei fast wasserfreien Peptiden wurden Linienbreiten von 0,4 ppm gemessen [49]. Nichtsdestotrotz wurden bei 90 K (für das Tripeptid MLF, [88]) und 180 K (für das Protein GB1, [119]) Spektren mit der Qualität von Raumtemperatur Messungen berichtet.

Tabelle 1.2.: Auswahl von Arbeiten zum Protein-Glasübergang

Probe	Lösungsmittel (Rest Wasser)	T_g	Sonstiges	Referenz
Wasser	–	136 K		[114]
Crambin	Wasser	180 K	Röntgenbeugung	[115]
Myoglobin	Glycerol 75 %	169 K	Anharm. Bewegung ab 210 K	[99]
	Sucrose 80 %	228 K		[99]
Myoglobin	Wasser	190 K	Dyn. Differenzkalorimetrie	[107]
	Glycerol 66 %	175 K		[107]
BSA	Wasser	200 K	adiabatische Kalorimetrie	[116]
Myoglobin	Wasser	153 K	Neutronenstreuung	[106]
	Glycerol 60 %	153 K		[106]
Lysozyme	Wasser	210 K	Neutronenstreuung	[108]
	d ₈ -Glycerol 20 %	330 K		[108]

Zusammenfassend haben die bisher beschriebenen Aspekte des Einfrierens wahrscheinlich einen entscheidenden Einfluss auf die Spektren, die mit DNP-NMR erhalten werden können.

1.6.2. Temperatur-Zyklen und Schock-Frieren

Bei Röntgenbeugungs-Untersuchungen, die meist bei kryogenen Temperaturen durchgeführt werden, leidet die Homogenität des Kristalls häufig beim Einfrieren. Um dies zu verhindern, wurden spezielle Techniken entwickelt kleine Proben sehr schnell einzufrieren (siehe z.B. [120]), bei denen mit 100–1000 K/s eingefroren wird [91]. Die Qualität des Kristalls lässt sich auch verbessern, wenn er in wenigen Zyklen erwärmt und wieder eingefroren wird [121, 122]. Dies kann sowohl durch eine Verminderung von Inhomogenitäten im Kristallgitter als auch durch eine Optimierung der Konzentration des Kryoprotektivums geschehen.

1.7. Neurotoxin II an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren

1.7.1. Acetylcholin und seine Rezeptoren

Acetylcholin, der Essigsäureester des Cholins, ist einer der wichtigsten Neurotransmitter und in unzählige physiologische Prozesse involviert. Sowohl im zentralen als auch im vegetativen Nervensystem und an der muskulären Endplatte spielt Acetylcholin eine

entscheidende Rolle. Entsprechend ist das Acetylcholinsystem auch an vielen pathophysiologischen Vorgängen beteiligt, z.B. Epilepsie, Parkinson, Schizophrenie und Alzheimer [123–125]. Viele pharmakologische Wirkstoffe, die die Reizübertragung durch Acetylcholin beeinflussen, sind bekannt und werden bei den verschiedenen Krankheitsbildern eingesetzt. Ein Beispiel dafür sind Acetylcholinesterase-Hemmer, deren Wirkung seit 1889 erforscht wurde. Sie werden heutzutage bei *Myasthenia gravis* und *Morbus Alzheimer* eingesetzt, heben die Blockierung der Acetylcholinrezeptoren durch Muskelrelaxanzien des Curare-Typs auf und dienen ferner als Insektizide [126].

Die Rezeptoren, an die Acetylcholin bindet, wurden schon 1921 entdeckt [127] und werden nach Art ihrer Leitliganden in zwei Klassen eingeteilt: Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR, ionotrop) binden Nikotin, während muskarinerge AChR (mAChR, metabotrop) als Leitsubstanz das Fliegenpilzgift Muskarin binden. Beide Klassen binden das namensgebende Acetylcholin. Sie repräsentieren außerdem zwei wichtige Grundtypen von Membranrezeptoren: Ionenkanäle und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren

Muskarinerge AChR gehören zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (g-protein coupled receptors; GPCR), die über nachgeschaltete Proteinkaskaden Signale von außen in eine Zelle übertragen [128]. Nach den bekannten Genen, die zu einer Expression von mAChR führen, wurden sie in fünf Typen unterteilt, M1 bis M5. Sie haben vor allem im zentralen Nervensystem, am Herzen und im Endothel wichtige Funktionen.

Die Struktur eines veränderten M2-Rezeptors wurde vor Kurzem im Komplex mit einem Antagonisten mittels Röntgenbeugung aufgeklärt [129]. Dabei orientierte sich die Herstellung des Kristalls an den herausragenden Arbeiten von Brian Kobilka am β_2 -adrenergen Rezeptor [130, 131].

Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren

Nikotinerge AChR auf der anderen Seite sind Ionenkanäle, die im Gehirn, den Gangli- en des Parasympathikus und an der motorischen Endplatte exprimiert werden [132]. Im Allgemeinen sind Ionenkanäle, zusammen mit Transportproteinen und Ionenpumpen für Transportprozesse über Membranen hinweg verantwortlich und regulieren so beispielsweise pH-Wert und osmotische Verhältnisse und sorgen für die Erregungsleitung in Nerven- und Muskelzellen.

Nicotinerge AChR gehören zur Superfamilie der Cys-Schleifen Liganden-gesteuerten Ionenkanälen [133]. Sie bestehen aus fünf Untereinheiten, die jeweils aus vier Transmem-

bran-Domänen bestehen. Die Untereinheiten sind unterteilt in α , β , γ , δ und ϵ , wobei die Bindungsstelle von Acetylcholin in der α -Untereinheit liegt. Jeder Rezeptor enthält mindestens zwei α -Untereinheiten. Die Rezeptoren unterscheiden sich, je nach Funktion, in der Zusammensetzung der Untereinheiten. So besteht der muskuläre Typ aus $\alpha_1\alpha_1\beta_1\epsilon\delta$, neuronale Typen aus verschiedenen Kombinationen aus α_2 - α_7 und β_2 - β_4 [132, 134].

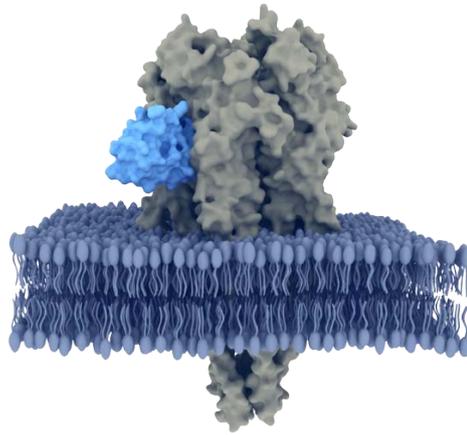


Abbildung 1.6.: Struktur von NTII (PDB 1NOR; blau) als Modell an den nikotinergeren Acetylcholinrezeptor gebunden. Die Darstellung orientiert sich an bekannten Strukturen von Bungarotoxin und dem nAChR (siehe Abschnitt 2.3.2 auf Seite 44).

Wenn zwei Bindungsstellen an einem Rezeptor besetzt werden, z.B. durch zwei Moleküle Acetylcholin, öffnet sich der Kanal, so dass Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle strömen und wenige K^+ hinaus. Damit wird das Membranpotenzial depolarisiert. Die Zusammensetzung des Rezeptors aus den verschiedenen Untereinheiten beeinflusst die Öffnungszeit, die Durchlässigkeit und Selektivität für Ionen und ist verantwortlich für die unterschiedlichen Effekte eines Wirkstoffs [125]. Zum Beispiel sind Rezeptoren aus $\alpha_9\alpha_{10}$ besonders durchlässig für Ca^{2+} und führen zu einer Hyperpolarisation der Haarzellen im Innenohr von Säugetieren [135].

Im Rahmen der *Myasthenia gravis* werden unter anderem Autoantikörper gegen den Muskeltyp gebildet, was zu dem typischen Krankheitsbild führt. Mutationen im neuronalen Typ hingegen sind wahrscheinlich für einige Epilepsie-Formen mitverantwortlich [136–138]. Außerdem sind nAChR die Wirkorte von Nikotin, dem psychoaktiven Hauptwirkstoff des Tabakrauches. Dabei sind die Untereinheiten α_4 , α_6 und β_2 besonders für die Abhängigkeit verantwortlich, während α_5 wohl als limitierender Faktor involviert ist, der eine toxische Nikotinaufnahme verhindert [139].

Verschiedene Wirkstoffe binden an nAChR, z.B. Anästhetika wie Isofluran. Im Gegensatz zu Acetylcholin und Peptidliganden haben diese wahrscheinlich andere Bindungsstellen am Rezeptor. Vielleicht erklärt dies auch die unterschiedlichen Effekte solcher Wirkstoffe an verschiedenen Cys-Schleifen Kanälen, wie nAChR oder GABA_A [140]. Gegenstand heutiger Forschung sind u.a. partielle Antagonisten am nAChR, hervorgegangen aus dem Frosch-Gift Epibatidine, die als hochpotente Analgetika wirken [141, 142]. Partielle Agonisten wie Vareniclin [143] können helfen eine Nikotinabhängigkeit zu überwinden [144]. Von prokaryotischen Cys-Schleifen Kanälen sind Strukturen bekannt, die den eukaryotischen ähnlich sind [145–147] und die deshalb auch als Modellsysteme verwandt werden.

Acetylcholin-bindende Proteine

Da, wie bei allen großen Membranproteinen, strukturelle Untersuchungen an nativen nAChR mittels Röntgenbeugung und Lösungs-NMR ausgesprochen schwierig sind, wurde nach Alternativen gesucht. Nicht Membran-gebundene Proteine anderer Organismen, v.a. aus Wasserschnecken, können Acetylcholin binden (Acetylcholin-bindende Proteine, AchBP) und dienen in unzähligen Untersuchungen als Modellsysteme. Beispielsweise wurde die Bindung von α -Cobratoxin [148] oder Vareniclin [143] mit Hilfe von AchBP aufgeklärt. Proteine aus *Lymnaea stagnalis* sind der α_7 -Untereinheit der nAChR besonders ähnlich [149].

Näher am physiologischen nAChR als diese Proteine sind isolierten Bindungsdomänen von nAChR. Ein bekanntes Beispiel ist die α_1 Untereinheit und daran gebundenes α -Bungarotoxin [150]. Auch AchBP mit gebundenen extrazellulären Domänen der nAChR wurden untersucht [151].

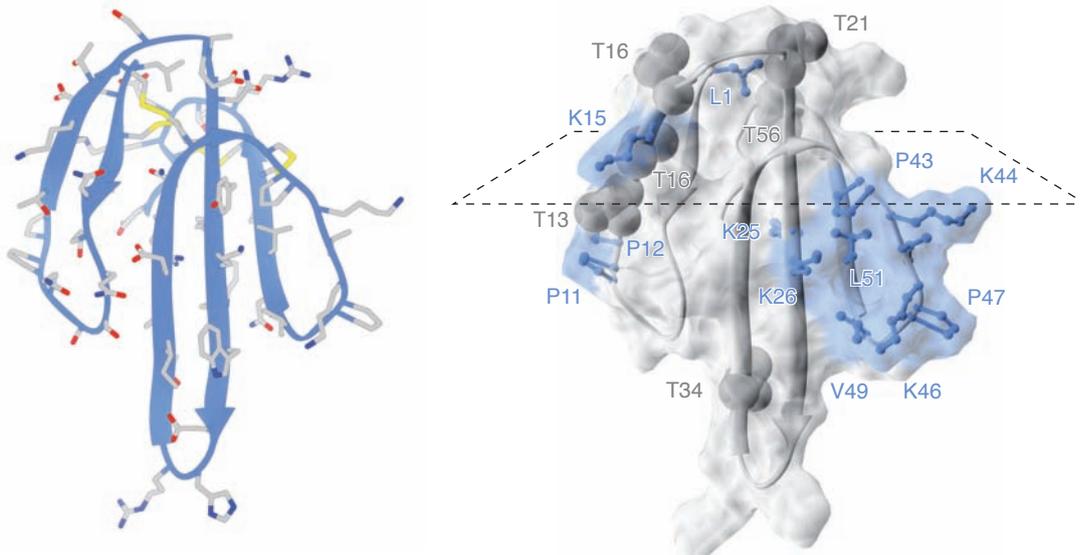
nAChR aus *Torpedo californica*

Für Methoden, die grundsätzlich Strukturen von Membranproteinen ermitteln können, war es vor allem schwierig, nAChR ausreichend hoch zu konzentrieren. Besonders eignet sich dafür das elektrische Organ des kalifornischen Zitterrochens, *Torpedo californica* [152]. Es enthält große Mengen nAChR [153], die dem Fisch dazu dienen Entladungsströme zur Verteidigung zu produzieren (1 kW bei 50 V [154]). Durch einen einzelnen geöffneten Rezeptor fließen ungefähr 10^7 Ionen pro Sekunde, der entsprechende Strom beträgt ca. 4 pA und das Membranpotenzial -100 mV. Damit wird deutlich, dass die Dichte der Rezeptoren im elektrischen Organ sehr hoch sein muss (ca. $20\,000/\mu\text{m}^2$) [155].

Entsprechend lassen sich aus diesem Gewebe nAChR relativ einfach und hoch kon-

zentriert isolieren (siehe Abschnitt 2.1.3 auf Seite 36). Außerdem sind die gewonnenen Rezeptoren den humanen nAChR sehr ähnlich [156]. Eine Kryo-Elektronenmikroskop Struktur eines sehr ähnlichen Rezeptors ist bekannt und zeigt unter anderem eine Verknüpfung der Rezeptoren untereinander über Cystein-Brücken [157–159].

1.7.2. Neurotoxin aus *Naja naja oxiana*



LECHNQSSQ **P**PTTKTCSGE TNCY**K**KWWS D HRGTIIERGC GC**P**K**V**K**P**GVN **L**NCCRTDRCN N

Abbildung 1.7.: Kristallstruktur von NTII (PDB 1NOR). Links sind alle Seitenketten mit farbigen Heteroatomen dargestellt. Rechts sind die Lysine, Leucine und Proline – ^{13}C markiert nach dem $[2-^{13}\text{C}]$ -Glycerol Schema – blau markiert, die Threonine grau und die Oberfläche des Moleküls in jeweiliger Farbe. Der obere Teil über der gestrichelten Linie ist Lösungsmittel-exponiert, der untere Teil, mit einer drei-Finger Struktur, ist an der Bindung an den Rezeptor beteiligt. Im selben Farbschema wie in der rechten Abbildung ist die Sequenz des NTII dargestellt.

Zusätzlich zu kleinen organischen Molekülen sind auch Peptide bekannt, die Liganden am nAChR sind. Die meisten wurden aus den Giften von Schlangen und Meeresschnecken gewonnen und werden als Modell-Liganden in vielen Studien genutzt [153, 160–163]. Im Laufe der Evolution haben sich diese hochpotenten Liganden wahrscheinlich aus physiologisch vorkommenden Molekülen entwickelt [164]. Erste Gensequenzen wurden gefunden, Beispiel sind LYNX und SLURP, die darauf schließen lassen, dass ähnliche Peptide auch in Säugetieren physiologisch vorkommen. Sie scheinen dann mit einem Membran-Anker in der Nähe der nAChR exprimiert zu sein und als Modulatoren der nAChR-Aktivität zu wirken [165].

Auch die arabische Kobra (*Naja naja oxiana*; [166]) besitzt in ihrem Gift eine Mischung starker Antagonisten der muskulären nAChR [167]. Damit lähmt sie ihre Beute, meist kleine Nager oder Vögel. Grundsätzlich lassen sich solche Neurotoxine in zwei Klassen einteilen: α -Neurotoxine blockieren die Signalübertragung vor allem postsynaptisch durch eine Blockade der nAChR. Die β -Neurotoxine sind Phospholipasen, die präsynaptisch die Ausschüttung von ACh verhindern [168]. Die α -Neurotoxine lassen sich weiter unterteilen in kurze (60–62 Aminosäuren) und lange (66–74 Aminosäuren) α -Neurotoxine, wobei die kurzen nur postsynaptisch an der muskulären Endplatte wirken während die langen auch an präsynaptischen nAChR der Nervenzellen binden. Dabei blockiert ein Molekül beide Acetylcholin-Bindungsstellen des Rezeptors (siehe Übersichtsarbeit von Tsetlin [169]).

In dieser Arbeit wird eines dieser Neurotoxine verwandt, α -Neurotoxin II (NT II; [170]). Es bindet relativ stark, im pikomolaren Bereich [171], an nAChR. So lässt sich ein stabiles Ligand-Rezeptor-System herstellen, das außerdem relativ sicher zu handhaben ist. NT II besteht aus 61 Aminosäuren (Sequenz in Abbildung 1.7 auf der vorherigen Seite), die über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Es ist also ein kurzes α -Neurotoxin. Sein Molekulargewicht beträgt 6889 g/mol und seine Lösungs-NMR Struktur ist unter dem PDB-Eintrag 1NOR veröffentlicht ([172]; siehe Abbildung 1.7 auf der vorherigen Seite). Es wird aus sechs β -Strängen gebildet und ähnelt in seiner Form einer dreifingrigen Struktur, von der angenommen wird, dass sie für die Bindung an den Rezeptor entscheidend ist [169]. Dabei scheint im Gegensatz zu Kobra- und Bungarotoxin die dritte Schleife (rechts in Abbildung 1.7 auf der vorherigen Seite) wichtiger für die Bindung zu sein als die erste (links) [171]. Neurotoxin II bindet an den nAChR zwischen den δ - α und γ - α Untereinheiten und ist als stark gebundener kompetitiver Antagonist toxisch. Die LD₅₀ i.v. bei Säugetieren liegt bei nur 60 μ g/kg [173], d.h. 4,2 mg für einen durchschnittlichen Erwachsenen. Es wirkt ähnlich dem Curare, einem Pfeilgift aus Südamerika, und führt vor allem zu Blutdruckabfall und Atemlähmung. Als Antidot ist z.B. der Acetylcholinesterase-Hemmer Physostigmin geeignet, der die ACh-Konzentration an der muskulären Endplatte erhöht. Der Effekt ist allerdings aufgrund der starken Bindung des NTII nur schwach.

1.8. Fragestellung dieser Arbeit

Festkörper-Magnetresonanzspektroskopie ist prinzipiell geeignet die atomare Struktur großer Moleküle, wie z. B. von Membranproteinen in Lipid-Doppelschichten, zu untersuchen. Die Sensitivität dieser Methode ist jedoch gering und limitiert ihre Anwendung. Mit der dynamischen Kernpolarisation lässt sich die hohe Polarisation von ungepaarten Elektronen auf Kerne übertragen und so die Intensität der NMR-Signale um bis zu zwei Größenordnungen steigern. Dazu werden die Radikale bei kryogenen Temperaturen mit Mikrowellenstrahlung angeregt.

Erst in den letzten Jahren wurden genügend starke Mikrowellenquellen entwickelt, Gyrotrone, die eine Anwendung der DNP bei hohen NMR-Magnetfeldern zulassen. Besonders die Arbeitsgruppe von Robert Griffin am Massachusetts Institute of Technology (MIT) hat diese Entwicklung vorangetrieben und erste Experimente durchgeführt [35, 37, 39, 42, 47, 174–179]. Es zeigte sich, dass sich mit DNP bei Modellmolekülen Verstärkungsfaktoren von bis zu 40 erreichen lassen. Die Arbeiten von Griffin et al. mündeten in der Entwicklung eines DNP-Spektrometers der Firma Bruker und die Experimente dieser Arbeit wurden an dem ersten ausgelieferten DNP-System durchgeführt. Bisher bestanden die einzigen Erfahrungen mit DNP an physiologischen Proteinen aus Experimenten an zwei Kohlenstoffen des Retinals in Bakteriorhodopsin [180].

Es ist zu erwarten, dass zwei Unterschiede zur konventionellen ssNMR einen großen Einfluss auf die Qualität der NMR-Spektren haben und einen routinemäßigen Einsatz bei biologischen Proben limitieren können:

- Kryogene Temperaturen sind nötig, um den DNP-Effekt zu nutzen. Dadurch verlangsamt sich die Dynamik von Protein und Lösungsmittel, was häufig zu einer Verbreiterung der Linien führt und die Interpretation der Spektren erschwert. Die genauen Zusammenhänge zwischen Temperatur, Proteinstruktur, Lösungsmittel und NMR-Signalen sind allerdings nicht im Detail bekannt.
- Ungepaarte Elektronen, deren Polarisation mittels DNP übertragen wird, verändern als Paramagneten das Magnetfeld in ihrer Umgebung. Die daraus folgenden Auswirkungen auf NMR-Spektren sind bei Raumtemperatur und niedrig konzentrierten Radikalen beschrieben. Ihr Einfluss auf NMR-Parameter bei kryogenen Temperaturen und in den benötigten hohen Konzentrationen bedarf gleichwohl einer umfassenden Analyse.

Um DNP für strukturbiochemische Fragestellungen weiterzuentwickeln, werden diese beiden Aspekte systematisch untersucht. Dazu wurden folgende Fragen formuliert:

1. Wie verhalten sich NMR-Signale von Proteinen bei kryogenen Temperaturen? Es ist wahrscheinlich, dass durch das Einfrieren der unterschiedlichen, bei Raumtemperatur vorhandenen Konformere die kryogen gemessenen NMR-Spektren inhomogen verbreitert sind. Falls dieser Effekt die Spektren dominiert, stellen sich weitere Fragen:
 - a) Ist eine inhomogene Verbreiterung für alle Signale gleich oder haben die Dynamik der Seitenketten, das Lösungsmittel oder andere Parameter einen Einfluss? Es ist zu erwarten, dass besonders mobile Atome stärker verbreiterte Signale zeigen. Ob das ein Protein umgebende Wasser eine Verbreiterung der Signale exponierter Seitenketten verstärkt oder vermindert, lässt sich nur schwer abschätzen.
 - b) Lässt sich eine inhomogene Verbreiterung beeinflussen? Vielleicht kann durch eine optimierte Probenherstellung, z. B. mit der Geschwindigkeit des Einfrierens, eine Verbreiterung der Signale vermindert werden. Oder es lassen sich Proben finden, deren Signale schwächer inhomogen verbreitert sind, z.B. durch eine inhärent rigidere chemische Struktur des Proteins.
 - c) Können auch bei höheren Temperaturen als ca. 100 K Experimente durchgeführt werden, bei denen noch eine signifikante Verstärkung der Signale durch DNP vorhanden ist? Es ist zu erwarten, dass eine inhomogene Verbreiterung der Signale temperaturabhängig ist. Vielleicht lässt sich ein Temperaturbereich und eine Probenherstellung finden, bei denen ein Kompromiss aus guter DNP-Verstärkung und aufgelösten Signalen möglich ist. Dafür ist es notwendig, die Temperaturabhängigkeiten der inhomogenen Verbreiterung und der DNP-Verstärkung zu untersuchen.
2. Welchen Einfluss haben die zugegebenen organischen Radikale auf die NMR-Parameter und damit auf die Spektren? Die für die DNP eingesetzten relativ hohen Konzentrationen von Biradikalen lassen vermuten, dass bei Raumtemperatur bekannte Effekte auch bei DNP-Messungen eine Rolle spielen. Dabei können NMR-Signale durch paramagnetische Relaxationsverstärkung homogen verbreitert und undetektierbar werden. Falls dies oder ähnliche Effekte die Spektren beeinflussen, muss im Detail untersucht werden:

- a) Wie verhalten sich die einzelnen NMR-Parameter bei der Zugabe von Radikalen? Es macht für die praktische NMR-Spektroskopie große Unterschiede, ob z. B. die T_1 -Relaxation der Protonen verkürzt ist, was erwünscht wäre, oder ob eine verkürzte T_2 -Relaxation der Kohlenstoffe die Auflösung der Spektren limitiert.
 - b) Wie ändern sich die gemessenen Effekte mit der Konzentration der Biradikale und welche Konzentration ist optimal für Proteinproben? Vielleicht kann die Konzentration der Radikale optimiert werden, um die DNP-Verstärkung zu maximieren ohne die Qualität der Spektren stark zu beeinträchtigen.
3. Wie verhalten sich Membranproteine in der DNP-NMR und welche Ergebnisse lassen sich mit ihnen gewinnen? Abgesehen von den zwei zuvor behandelten Einflüssen ist nicht auszuschließen, dass unbekannte oder unerwartete Faktoren bei der DNP-NMR an Membranproteinen eine Rolle spielen. Letzten Endes entscheidet die Auflösung und Signalintensität der Spektren, ob es möglich ist mittels DNP strukturbiochemische Ergebnisse von Membranproteinen zu gewinnen.

Die Beantwortung dieser Fragen legt die Grundlage für eine Anwendung und Weiterentwicklung der DNP-NMR in der biologischen Strukturaufklärung. Nur durch ein besseres Verständnis der unterschiedlichen Effekte kann das Potenzial der DNP beurteilt und genutzt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Probenherstellung

2.1.1. SH3 für kryogene Untersuchungen

Bei dem SH3 in dieser Arbeit handelt es sich um die Src-homology 3 (Sarcoma-Homologie 3) Domäne der α -Kette des Proteins Spektrin aus dem Hirn von *Gallus gallus*. Das sind die Seitenketten 965–1025 der α -Kette, mit einem Molekulargewicht von 7229,3 g/mol (PDB: 1M8M; [16]). Die Sequenz des SH3 ist:

```
MDETG  KELVL  ALYDY  QEKSP  REVTM  KKGDI
LTLLN  STNKD  WWKVE  VNDRQ  GFVPA  AYVKK  LD
```

Die Herstellung erfolgte nach Pauli et al. [181] und lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 und in M9 Minimalmedium. Für die Markierung wurde uniform ^{13}C markierte Glukose und $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ zugegeben (beides Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts). Durch Wechsel des pH-Wertes vom Säuren zu 7,5 wurde das Protein über drei Tage bei 4 °C präzipitiert und per Zentrifugation konzentriert.

Dreifach markiertes SH3 (deuteriert) wurde ähnlich gewonnen, nur dass der Expressions-Puffer D_2O statt H_2O enthielt. Dadurch wurden längere Wachstums- und Induktionszeiten benötigt. Das deuterierte Protein wurde anschließend in H_2O oder Mischungen von H_2O und D_2O gegeben, um diejenigen D mit H zu ersetzen, vollständig oder zu einem gewissen Prozentsatz, die mit dem Lösungsmittel im Austausch stehen, vor allem N-D oder COO-D [46, 182, 183]. Die entsprechenden Prozentsätze sind bei den jeweiligen Proben vermerkt.

Bei der Herstellung von DNP-Proben wurde die jeweils angegebene Menge TOTALPOL, in 5 μl Lösungsmittel gelöst, mit der SH3-Probe gemischt. Als Lösungsmittel für die protonierten Proben wurde d_8 -Glycerol/ D_2O / H_2O (60 /30 /10 %; im Folgenden GDH genannt) verwandt. Bei den deuterierten Proben wurde eine entsprechende Mischung aus d_8 -Glycerol bzw. protoniertem Glycerol (zusammen 60 %) und D_2O bzw. H_2O (zusammen 40 %) dem Deuterierungsgrad der austauschbaren D angepasst. Abweichungen sind jeweils angegeben.

2.1.2. Prolin für die Untersuchung der Radikal-Effekte

^{13}C , ^{15}N markiertes Prolin stammt von der Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri. Eine Stammlösung mit 50 mM Prolin in GDH wurde hergestellt und mit verschiedenen Mengen TOTAPOL versetzt (siehe Tabelle 2.1). Die höchste Konzentration löste sich auch über mehrere Tage nicht vollständig.

Tabelle 2.1.: TOTAPOL-Konzentrationen der Prolin-Proben

TOTAPOL		
[mg]	[μmol]	[mM]
0,1179	0,295	14,8
0,2063	0,516	25,8
0,4170	1,044	52,2
0,8213	2,056	102,8
1,5660	3,919	196,0

2.1.3. Neurotoxin II an nikotineren Acetylcholinrezeptoren

Als Neurotoxin wurde das kurze α -Neurotoxin aus *Naja naja oxiana* verwandt [172]. Es besteht aus sechs β -Strängen, die über vier Disulfidbrücken verknüpft sind, hat ein Molekulargewicht von 6889 g/mol und seine Sequenz ist:

```

LEC1HN  QQSSQ  PPTTK  TC2SGE  TNC1YK  KWWS
HRGTI   IERGC2  GC3PKV  KPGVN   LNC3C4R  TDRC4N  N

```

Die Zahlen zeigen jeweils die beiden Cysteine einer Disulfidbrücke. Die Präparation der Neurotoxin-nAChR-Komplexes in Membranen wurde nach Krabben et al. [171] durchgeführt. Die nAChR reichen Membranen wurden von C. Winkler (San Pedro, Kalifornien) nach Schieber und Hucho [152] gewonnen. Das Neurotoxin NTII wurde in *E. coli* BL21 unter Zugabe von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ und Glycerol (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, Massachusetts) exprimiert, wobei letzteres entweder uniform ^{13}C , [1,3- ^{13}C] oder [2- ^{13}C] markiert war. Die Zellen wurden aufgeschlossen und zentrifugiert, der Überstand auf 70°C erhitzt und das NTII durch Sepharose, Kationenaustausch und Gelfiltration gereinigt. Alle Arbeiten mit freiem NTII wurden am Shemyakin-Ovchinnikov Institut für Bioorganische Chemie, Russische Akademie der Wissenschaften, Moskau durchgeführt.

Um den Komplex zu erhalten, wurden die Membranen mit Ringerlösung verdünnt, das jeweilige NTII dazugegeben und 10 min im Schüttler oder Drehteller bei Raumtempe-

ratur (RT) gemischt. Danach wurde Triton X-100 in Ringer-Lösung bis zu einer Konzentration von 0,02 % zugegeben und erneut 30 min bei RT gemischt. Das Triton X-100 (INN: Octoxinol 9) erhöhte dabei lediglich als nichtionisches Tensid die Zugänglichkeit der Bindungsstelle am Rezeptor für das NTII. Der Komplex aus Rezeptor und Ligand wurde durch mehrfache Zentrifugationsschritte aufkonzentriert. Das so entstandene Pellet wurde in 4 mm Rotoren überführt und nach den RT-NMR-Messungen [184] bei -80°C gelagert.

Für die DNP-Messungen wurde die Probe aus dem Rotor genommen, mit in $10\ \mu\text{l}$ GDH gelöstem TOTAPOL (TP) gemischt und in einen 3,2 mm Rotor überführt. Durch eine Abnahme der TP-Konzentration während der Lagerung (Abschnitt 3.4 auf Seite 73) musste erneut TP dazugegeben werden. In Tabelle 2.2 sind die unterschiedlichen TP-Konzentrationen der verschiedenen Proben aufgeführt ohne die Abnahme an aktivem TP zu berücksichtigen. Alle Arbeiten wurden unter Laminar Flow ausgeführt und die benutzten Gegenstände entweder autoklaviert oder mit Ethanol desinfiziert.

Tabelle 2.2.: Verschieden Proben von NTII an nAChR und ihre TP Konzentrationen

Probennummer	Markierung mit ^{13}C	zugegebenes TP [mg]	Summe des TP [mg]
1	uniform	0,4311	0,4311
1	uniform	0,3878	0,8189
1	uniform	0,5235	1,3424
2	[2- ^{13}C] Glycerol	0,4722	0,4722
2	[2- ^{13}C] Glycerol	0,5857	1,0579
3	[1,3- ^{13}C] Glycerol	0,4812	0,4812
3	[1,3- ^{13}C] Glycerol	0,4532	0,9344

2.1.4. TOTAPOL

TOTAPOL wurde nach Song et al. [37] am FMP von Edgar Specker synthetisiert. Das Produkt war pastös und orangefarbig und seine Masse wurde mit LC-MS überprüft. Es wurde aliquotiert, mit N_2 überschichtet und dicht verschlossen bei -80°C aufbewahrt. Für die Probenherstellung wurde die jeweilige Menge TOTAPOL auf einer Mikrowaage abgewogen.

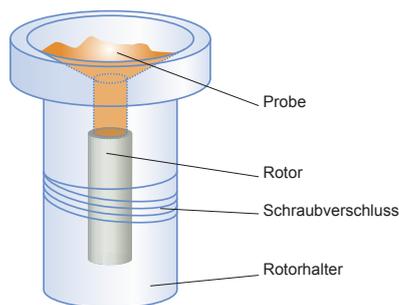


Abbildung 2.1.: Schema des gebauten Rotor-Füllers aus Plexiglas. Die Probe (orangefarbig) wird durch einen Trichter in den Rotor zentrifugiert. Der Rotor-Füller ist dabei so konstruiert, dass er genau in die Zentrifugen-Halterung für Eppendorf[®]-Gefäße (2 ml) passt.

2.1.5. Rotorfüllung

Soweit nicht anders beschrieben wurden 3,2 mm Rotoren aus Zirkonium (Bruker) verwendet, die mit einer Silikon-Scheibe (ca. 1 mm dick) versiegelt und mit einer Vespel-Kappe (Bruker) verschlossen wurden. Die Proben wurden mit einem selbst gebauten Rotorhalter in einer Tischzentrifuge in die Rotoren überführt (Abbildung 2.1). Soweit nicht anders beschrieben wurden die gefüllten Rotoren durch Immersion in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dabei wurde der Rotor bewegt, um ein N₂-Gaspolster um den Rotor zu verhindern. Die Proben wurden normalerweise bei -80°C gelagert, andere Lagerbedingungen sind jeweils angegeben.

2.2. Spektrometrie

2.2.1. Spektrometer

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Spektren an einem Bruker AVANCE III 400 MHz Spektrometer (9,4 T) mit Topspin Version 2.1 gemessen. Ein Bruker DNP-Kryo-Probenkopf für 3,2 mm Rotoren, eingestellt auf Protonen, Kohlenstoff und Stickstoff, wurde verwendet. Der Stickstoff-Kanal ließ sich durch Umbau des Probenkopfes auf Deuterium-Frequenzen einstellen. Alle Spektren wurden auf das Tieffeld-Signal von Adamantan bei Raumtemperatur (40,48 ppm; [185]) referenziert. Dazu wurden die chemischen Verschiebungen von Glycerol und der Silikon-Scheibe bei verschiedenen Temperaturen gemessen und mit Adamantan referenziert. Bei 98 K sind diese: 74,1 ppm für das C2 des Glycerol, 63,8 ppm für C1 und C3 des Glycerol und 4,3 ppm für die im Silikon enthaltenen Kohlenstoffe.

Eine Bruker Kühleinheit („cooling-cabinet“) kontrollierte die Temperaturen der Gas-

ströme für die Rotordrehung und die Temperatur des Probenkopfes. Diese Ströme sind der Trägergasstrom (bearing, B), der Antriebsgasstrom (drive, D) und der Kühlgasstrom (variable temperature, VT). Die im Folgenden angegebenen Temperaturen bezeichnen immer die Temperatur des eingehenden VT-Kühlgases, gemessen an der Kühleinheit. Die Temperatur der Probe im Rotor wurde verifiziert nach Thurber und Tycko [186]: Bei VT=96 K, B=100 K und D=105 K und unter Mikrowellenbestrahlung betrug die Proben temperatur 103,5 K. Bei allen höheren Temperaturen, bei denen die drei Gasströme identische Temperaturen hatten, war die gemessene Temperatur zwischen 2°C und 4°C höher als die Temperatur des eingehenden Kühlgases. Durch die Drehung des Rotors und die Bestrahlung mit der Mikrowelle erwärmt sich die Probe also nur wenig.

Eine Bruker MAS-Einheit kontrollierte die Drehung des Rotors auf 8889 Hz \pm 2 Hz oder den jeweils angegebenen Wert. Das Spektrometer wurde bei allen Temperaturen mindesten 20 Minuten equilibriert und danach die Messparameter optimiert.

Eine Optimierung der Ausgleichströme für das Hauptmagnetfeld B_0 („shimming“) mit n-Pentan bei 145 K und bei 273 K ergab keine Unterschiede der Qualität von Proteinspektren. Die Verzögerungszeit zwischen den Experimenten („delay time“) wird nachfolgenden als d_1 bezeichnet. Wenn nicht anders vermerkt, wurde die d_1 -Zeit 1,3-mal so lang gewählt wie die Protonen T_1 -Zeit. Die T_1 -Zeit wurde dabei mittels Inversions-Erhholung gemessen (siehe Seite 40).

Soweit nicht anders erwähnt betrug bei allen Experimenten die Frequenz des $\pi/2$ -Pulses bei Protonen 100 kHz, die Frequenz der CP-Pulse bei Kohlenstoff 62,5 kHz und die Frequenz der CP-Pulse für Protonen wurde bei jeder Probe angepasst. Dabei lag die letztgenannte ungefähr eine MAS-Frequenz über dem Wert für Kohlenstoff, also z.B. bei einer Drehung von 8889 Hz bei ca. 71 kHz. Zusätzlich wurde eine Rampe von 70–100 % bei den Protonen verwandt, um den CP-Transfer robuster zu machen. Die Entkopplung der Protonen erfolgte mit TPPM [9] bei einer Stärke von 100 kHz.

2.2.2. Mikrowelle

Das verwendete Gyrotron (Bruker) hat eine Frequenz von 263 GHz und ein Magnetfeld von 9,7 T. Es wurde mit einer Beschleunigungs-Spannung von ca. 15 kV betrieben und dabei die Stärke des Elektronenstroms auf 30 mA kontrolliert. Die Stärke der Mikrowelle betrug am Ausgang der Kavität ca. 20 W und bei der Probe ca. 4 W (Messwerte der Fa. Bruker, [38]). Die Mikrowelle wurde durch einen geriffelten Mikrowellenleiter in den Magneten gestrahlt. Für eine genaue Beschreibung des Gyrotrons siehe Rosay et al. [38]. Abbildung 2.2 auf der nächsten Seite zeigt ein Photo des aktuellen Aufbaus des DNP-Spektrometers am FMP.

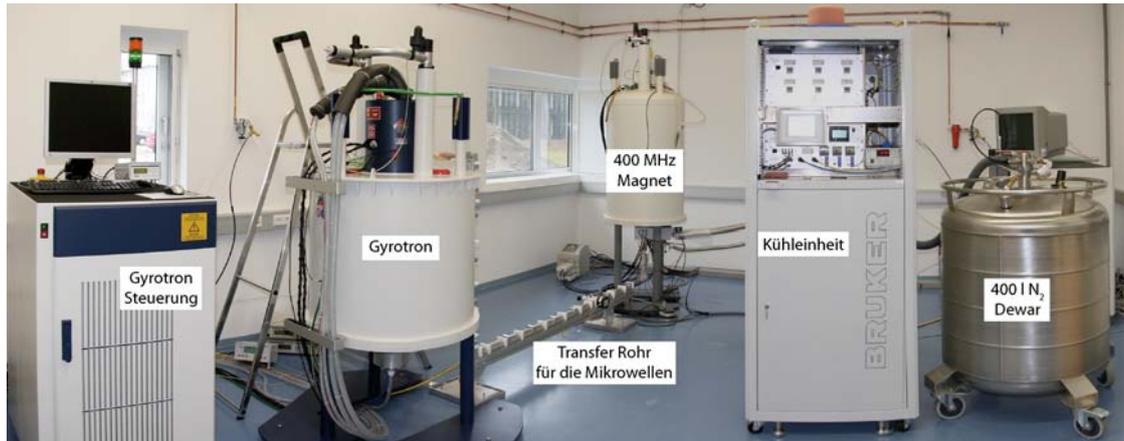


Abbildung 2.2.: Photo des DNP-Spektrometers am FMP in Berlin; links das Gyrotron, das die Mikrowellen erzeugt, die dann in den NMR-Magneten (Mitte) geführt werden; auf der rechten Seite die Kühleinheit

2.2.3. Messung der Relaxationszeiten

Die T_1 -Zeit ist die Konstante der exponentiellen Funktion, mit der die Magnetisierung nach einem Puls wieder in den Gleichgewichtszustand relaxiert. Sie wird gemessen, indem zuerst mit einem π -Puls die Magnetisierung entgegen dem äußeren B_0 -Feld gebracht wird. Nach einer variablen Zeit τ wird die Magnetisierung mit einem $\pi/2$ -Puls in die transversale Ebene gebracht und gemessen. Mit ansteigenden Zeiten τ ändert sich das erhaltene Signal vom negativen zu einem positiven Maximum (dem Gleichgewichtszustand). Aus der Funktion dieser Signalveränderung wird T_1 berechnet.

Die T_2 Zeit als physikalische Größe lässt sich nicht ohne Weiteres messen. Andere Einflüsse, wie noch bestehende Kopplungen, instrumentenspezifische Magnetfeldgradienten oder Temperaturunterschiede in der Probe, verändern den gemessenen Wert. Der gemessene Abfall der Transversalen Relaxation wird dann T_2^* genannt und ist entsprechend $\geq T_2$. Gemessen wird die T_2^* -Zeit folgendermaßen: Zuerst lässt man die Magnetisierung in der transversalen Ebene über die Zeit τ dephasieren, dann wird ein π -Puls eingestrahlt. Dadurch wird die Magnetisierung sozusagen achsensymmetrisch gespiegelt. Während einer zweiten Zeitspanne τ wird sie wieder kohärent (refokussiert) und danach gemessen. Während der zwei τ hat die Magnetisierung indes in ihrer Stärke abgenommen. Mit unterschiedlichen Zeiten τ wird die Funktion dieser Abnahme bestimmt und die daraus ermittelte Konstante des exponentiellen Abfalls ist T_2^* . Im Folgenden wird zur Vereinfachung meist nicht zwischen T_2 und T_2^* unterschieden.

2.2.4. Prozessierung der Daten

Die aufgenommenen Daten wurden mit Topspin Version 2.1 prozessiert und üblicherweise mit Null aufgefüllt, um eine bessere Fourier-Transformierung zu ermöglichen. Die Basislinie wurde automatisch oder manuell korrigiert. 1D Spektren wurden mit einer Gauss-Lorentz Funktion (GM) mit exponentieller Linienverbreiterung prozessiert. Die Parameter sind bei den jeweiligen Spektren angegeben als: GM (−40 Hz, GB 0,8), wobei in diesem Beispiel die Verbreiterung −40 Hz beträgt und das gauß'sche Maximum 0,8. In 2D Spektren wurden die gemessenen Punkte auch mit gemischten Sinus/Kosinus Quadratfunktionen gewichtet (Gleichung (2.1)).

$$QSIN(t) = \sin \left(\left(\pi - \frac{\pi}{S} \right) \cdot \frac{t}{AQ} + \frac{\pi}{S} \right)^2 \quad (2.1)$$

Dabei ist t der Zeitpunkt des Messwertes, AQ die Aufzeichnungszeit, also $0 < t < AQ$ und S ein gesetzter, ganzzahliger Parameter, genannt „sine bell shape“ (SSB), der bei den jeweiligen Spektren angegeben ist, z.B. 2 als QS (SSB 2).

2.2.5. SH3 für kryogene Untersuchungen

1D Experimente

Tabelle 2.3.: SH3 – die Parameter der 1D Spektren

Temperatur	Experimente	d_1 [s]	CP-Kontaktzeit [ms]
295–270 K	32	4	1,5
253–133 K	64	3	2
95 K	128	3	2
295 K aufgetaut	64	3	2

Die 1D Spektren wurden mit den in Tabelle 2.3 dargestellten Parametern aufgenommen und nicht mit einer Funktion gewichtet. Für die Darstellung wurden sie entsprechend der unterschiedlichen Anzahl an Experimenten skaliert.

Für das „Auslöschen“ eines schmalen Frequenzbereiches wurde die Kohlenstoff-Magnetisierung nach der CP wieder entlang der longitudinalen Achse gebracht und ein schwacher Puls von 10 ms Länge gegeben (Pulssequenz in Abbildung 2.3 auf der nächsten Seite). Dieser Puls hat entsprechend nur eine schmale Bandbreite, im Gegensatz zu den normalerweise genutzten „harten“ Pulsen, die alle Kohlenstoff-Frequenzen von Pro-

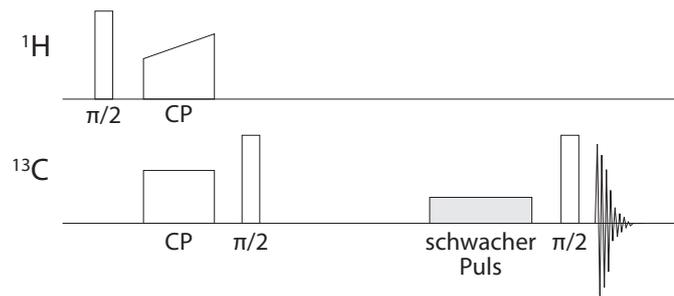


Abbildung 2.3.: Pulssequenz zum „Auslöschen“ eines schmalen Frequenzbereichs.

teinen anregen. Nur die Signale mit ähnlicher Larmorfrequenz wie die Trägerfrequenz dieses Pulses werden aus der longitudinalen Ebene gebracht und sind damit nicht mehr detektierbar. Die Trägerfrequenz dieses Pulse wurde jeweils bei 293 K und 98 K auf die Methyl-, C α - und Carbonyl-Region verschoben.

2D Experimente

Tabelle 2.4.: SH3 – die Parameter der 2D Spektren

Temperatur	Experimente	CP-Kontaktzeit	PDS-D-Mischzeit	d ₁
		[ms]	[ms]	[s]
293–253 K	4	2	11,25	3
213 K	4	2	11,25	4
193 K	8	2	11,25	4
153 K	4	0,75	10	4,7
113 K	4	0,75	10	13
95 K	4	0,75	10	17
295 K aufgetaut	4	1,5	11,25	2

Die 2D PDS-D-Spektren (siehe Abschnitt 1.3.4 auf Seite 9) wurden mit den in Tabelle 2.4 dargestellten Parametern aufgenommen. Vier Experimenten in der direkten Dimension entsprachen dabei 1186 Punkten. Für die indirekte Dimension wurde 512-mal inkrementiert. Die Aufzeichnungszeiten waren 25 bzw. 8,2 ms für die direkte bzw. indirekte Dimension. Die PDS-D-Mischzeit der deuterierten Probe betrug 50 ms. Die d₁-Zeiten der Messungen zwischen 193–95 K wurden 1,3-mal so lang gewählt wie die gemessene Protonen T₁ Zeit.

Für die Übersichten (Abbildung 3.2) wurden die Spektren in der direkten Dimension mit GM (–30 Hz, GB 0,1) und in der indirekten Dimension mit SQ (SSB 3) prozessiert.

Für die Detailansichten wurde die Prozessierung auf GM (-8 Hz, GB 0,08) in beiden Dimensionen geändert. Um die Aromaten besser zu detektieren, wurde mit GM (-40 Hz, GB 0,05) und GM (-60 Hz, GB 0,04) gearbeitet.

Die unterste dargestellte Kontur wurde bei der sechsfachen Intensität des berechneten Rauschens (6σ , ermittelt mit Sparky [187] aus 3000 Punkten) gezeichnet und die folgenden Konturen mit dem Faktor 1,1 inkrementiert. Die Zuordnungen bei Raumtemperatur wurden von Pauli und Castellani [17, 181] übernommen. Die Ergebnisse der einzelnen Kreuzsignale finden sich im Anhang (Tabelle D.1 auf Seite 123). Die Analyse wurde drei mal mit unterschiedlichen Prozessierungen durchgeführt und nur die übereinstimmenden Ergebnisse wurden berücksichtigt.

2.2.6. Prolin für die Untersuchung der Radikal-Effekte

Die 1D Spektren wurden entweder mit 1024 Experimenten oder so vielen, wie in 10 min möglich, gemessen. Die Aufzeichnungszeit war 25 ms. Die CP-Kontaktzeit betrug 0,5 ms und die Proben temperatur 101 K. Die Spektren wurden nicht mit einer Funktion gewichtet. Die d_1 Zeiten waren entweder 1,5 s (103 und 196 mM TP) oder 1,3 mal die gemessene ^1H T_1 Zeit: 3 s bei 52 mM, 8 s bei 26 mM und 16 s bei 15 mM TP. Die Protonen T_1 Zeit wurde mit Hilfe von Inversions-Erholung auf den Signalen von $\text{C}\delta$, $\text{C}\beta$ und $\text{C}\gamma$ gemessen. Die Linienbreiten wurden auf dem $\text{C}\delta$ - oder CO -Signal auf halber Höhe gemessen, wobei im CP-Schritt ein sogenannter „Soft-Pulse“ auf Kohlenstoff verwandt wurde. Durch die schwache Amplitude dieses Pulses wurde nur der Bereich um die Pulsfrequenz angeregt und dipolare Kopplungen zu anderen Kohlenstoffen vermieden. Die Messung der $T_{1\rho}$ erfolgte nur indirekt, indem die Intensitäten der Signale bei verschiedenen CP-Kontaktzeiten bestimmt wurden.

2.2.7. Neurotoxin II an nikotinerger Acetylcholinrezeptoren

1D Experimente

Die 1D Spektren wurden mit 128 Experimenten, einer Aufnahmezeit von 25 ms, einer CP-Kontaktzeit von 1,5 ms und bei 101 K gemessen. Die d_1 Zeit betrug 4,7 s bei 40 mM TP mit und ohne Mikrowellenbestrahlung und 2,4 s bei 80 mM TP und 130 mM TP.

2D Experimente

Die 2D Spektren wurden mit 32 Experimenten und 3456 Punkten aufgenommen und 688 mal für die indirekte Dimension inkrementiert. Die entsprechenden Aufzeichnungszeiten

waren 30 ms und 8,5 ms für die direkte bzw. indirekte Dimension. Die CP-Kontaktzeit betrug 1 ms und die Proben temperatur 100 K (VT). Die Konturen wurden mit dem Faktor 1,1 inkrementiert. Weitere und veränderte Parameter und die Prozessierung sind bei dem jeweiligen Spektrum angegeben und im Text diskutiert.

2.3. Strukturen

2.3.1. SH3 für kryogene Untersuchungen

Die Debye-Waller-Werte von SH3 wurden aus zwei Kristallstrukturen ermittelt, die bei 100 K (RCSB PDB Eintrag 1U06 [188]; Auflösung von 1,49 Å) und bei 293 K (PDB Eintrag 2NUZ [189]; Auflösung von 1,85 Å) gemessen wurden. Die H-Brücken zwischen den SH3 Molekülen wurden mit einer Flexibilität von 0,4 Å und $\pm 10^\circ$ [190] berechnet. Diese Berechnungen und die Abbildungen wurden mit der Software UCSF Chimera erstellt (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco unterstützt durch NIH P41 RR-01081; [64]). Die Berechnung der Wasser-Zugänglichkeit wurde nach Linser et al. [191] durchgeführt, wobei der Durchmesser der um das SH3-Molekül rotierenden Kugel von 4 Å auf 1,4 Å geändert wurde, um ein Wassermolekül zu simulieren.

2.3.2. Neurotoxin II an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren

Die Struktur des Neurotoxins wurde mit Protonen Lösungs-NMR ermittelt [172]. Das Modell des gebundenen Neurotoxins (z.B. in Abbildung 1.6 auf Seite 27) wurde aus drei Komponenten erstellt. Die Kristallstruktur der Bindung von α -Bungarotoxin (aus *Bungarus multicinctus*) an den extrazellulären Teil der α_1 -Untereinheit eines nikotinergen Acetylcholinrezeptors (aus *Mus musculus*; PDB: 2QC1; [150]) wurde mit der Struktur des Rezeptors kombiniert (PDB: 2BG9; Elektronenmikroskopie, 4 Å Auflösung; aus *Torpedo marmorata*; [157]). Anschließend wurde das Neurotoxin mit dem Bungarotoxin überlagert und ausgetauscht. Dieses Modell dient nur der Orientierung.

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Aspekte untersucht, die DNP von konventioneller ssNMR unterscheiden. Zuerst wird dargestellt wie sich Proteinsignale in der NMR bei kryogenen Temperaturen verhalten. Im zweiten Abschnitt steht die Zugabe von Radikalen zu den Proben im Vordergrund und ihre Effekte auf die NMR-Parameter und -Daten. Die Ergebnisse dieser beiden Teile lassen die Frage aufkommen, ob DNP-Messungen auch bei höheren Temperaturen als ca. 100 K durchgeführt werden können. Dies behandelt der dritte Abschnitt am Beispiel einer deuterierten Probe. Schließlich werden die gewonnenen Erkenntnisse auf Präparationen von Membranproteinen angewandt: In Abschnitt 3.4 werden beispielhaft Liganden an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren in nativen Membranen untersucht.

In Kapitel 4 findet sich eine allgemeine und zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse, die der Frage nachgeht, was DNP für die Strukturforschung an Membranproteinen beitragen kann. Die entsprechenden Veröffentlichungen zu den jeweiligen Themen sind: Abschnitt 3.1 [192], Abschnitt 3.2 [193], Abschnitt 3.3 [194] und Abschnitt 3.4 [195].

3.1. Proteine in der Cryo-NMR am Beispiel SH3

3.1.1. Hintergrund & Fragestellung

Zuerst wurden die Auswirkungen von kryogenen Temperaturen auf NMR-Spektren von Proteinen untersucht. Dazu wurden mikrokristalline Proben der SH3 Domäne aus der α -Kette von Spektrin (SH3) bei Temperaturen zwischen 295 und 95 K gemessen. Vorausgegangene Untersuchungen zeigen meist eine starke Verbreiterung der NMR-Signale bei kryogenen Temperaturen (Linienbreiten von 2–3 ppm [117, 118]). Um diese Verbreiterung im Detail zu verstehen, wurden folgende Fragen formuliert und mit dem genannten Modellsystem untersucht: Wie verändern sich die Spektren abhängig von der Temperatur? Ändert sich die Linienbreite, wenn ja inhomogen oder homogen? Sind die Veränderungen in den Spektren abhängig von der Art der Seitenkette? Werden sie vom Lösungsmittel beeinflusst? Hängt die Veränderung von der Position der jeweiligen Seitenkette im Protein ab? Ist es prinzipiell möglich schmale Linien bei tiefen Temperaturen zu beobachten?

3.1.2. Ergebnisse & Diskussion

1D Spektren

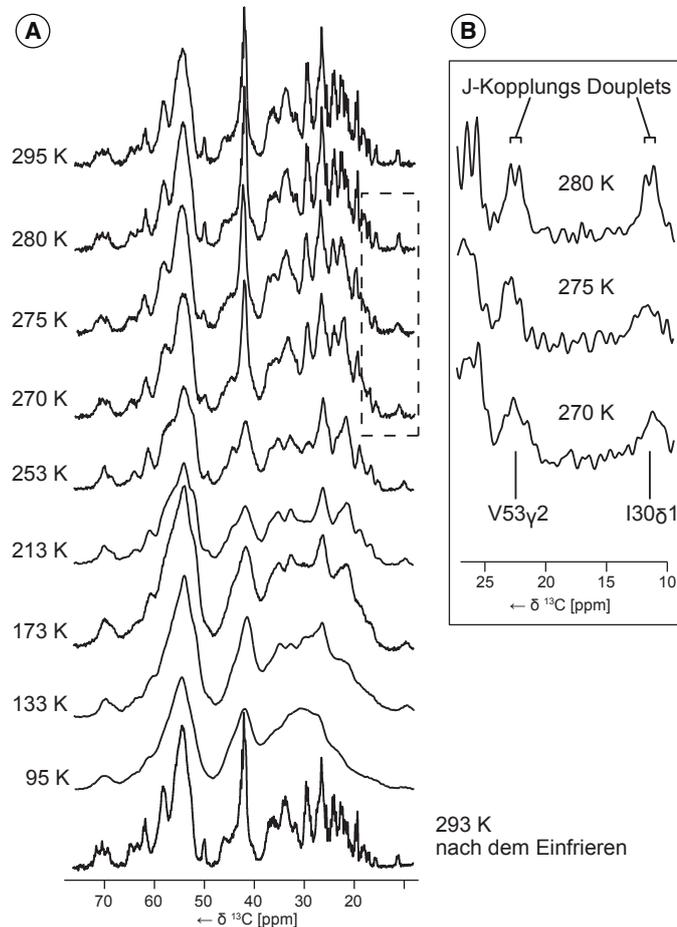


Abbildung 3.1.: **A.** 1D ^{13}C CP-Spektren der aliphatischen Region von SH3 bei verschiedenen Temperaturen. **B.** Vergrößerung der Isoleucin C δ 1 und Valin 53 C γ 2 Signale. Die Spektren wurden entsprechend ihrer Anzahl an Experimenten skaliert und nicht mit einer Funktion gewichtet.

Beim langsamen Einfrieren der Probe zeigen sich deutliche Veränderungen schon in 1D ^{13}C CP-Spektren von SH3 (Abbildung 3.1). Das Spektrum bei 295 K repräsentiert ein konventionelles Spektrum, in dem sogar skalare Kopplungen aufgelöst sind. Bei ungefähr 275 K sind diese Doublets nicht länger aufgelöst (B in Abbildung 3.1). Ein weiteres Absenken der Temperatur verbreitert die Signale kontinuierlich bis bei 95 K nur noch wenige breite Signale vorhanden sind. Im gesamten Temperaturbereich ist keine plötzliche Veränderung zu beobachten, wie sie z. B. ein definierter Glasübergang bei 200 K erwarten ließe.

Nach dem Auftauen der Probe sind die Auflösung und die chemischen Verschiebungen wieder wie vor dem Einfrieren. Die Probe wurde fünfmal eingefroren und aufgetaut und die Spektren bei Raumtemperatur (RT) bleiben unverändert. Daraus lässt sich schließen, dass SH3 in seiner tertiären Struktur nicht durch die Temperaturwechsel beeinflusst wird und ein geeignetes Modellsystem für diese Untersuchung ist.

Die Protonen T_1 -Zeit verlängert sich mit sinkender Temperatur, wie durch die verlangsamt Dynamik des Systems zu erwarten. Bei 295 K beträgt sie 0,5 s, bei 95 K 13 s, gemessen mit Inversions-Erholung und detektiert nach einer Protonen-Kohlenstoff CP.

2D Spektren

2D ^{13}C - ^{13}C PDS-D-Spektren offenbaren die Veränderungen einzelner Seitenketten (Abbildung 3.2 auf der nächsten Seite; für PDS-D siehe Abschnitt 1.3.4 auf Seite 9). Die meisten Signale werden bei sinkender Temperatur breiter, bis sie eine – individuell unterschiedliche – Koaleszenz-Temperatur erreichen und sich in mehrere Signale aufspalten. Durch diese Aufspaltung überlagern sich viele Signale und lassen sich zum Teil nicht mehr auflösen. Die messbaren Linienbreiten der einzelnen aufgespaltenen Signale sind bei kryogenen Temperaturen (je nach Seitenkette zwischen 153 und 96 K) und bei RT ähnlich. Die Diagonalsignale sind bei kryogenen Temperaturen nicht breiter als bei RT. Diese Beobachtungen deuten alle auf eine inhomogene Verbreiterung der Signale hin. Dabei werden wahrscheinlich unterschiedliche Konformationen eingefroren. Je nachdem wie groß der Unterschied der chemischen Verschiebung der einzelnen Signale ist, erscheinen die Konformationen als ein breites oder als mehrere relativ schmale Signale bei kryogenen Temperaturen.

Bei einer inhomogenen Verbreiterung ist es möglich, dass die Geschwindigkeit des Einfrierens einen großen Einfluss auf die Spektren hat. In dieser Untersuchung zeigt sich allerdings kein Unterschied in den Daten bei 95 K wenn die Probe schnell, z.B. durch Immersion in flüssigem Stickstoff, oder langsam im Spektrometer über mehrere Stunden eingefroren wurde.

Die beobachtete Vervielfachung der Signale erschwert bei kryogenen Temperaturen die Analyse der Spektren. Um einzelne Signale im Detail zu untersuchen, wurden diejenigen ausgewählt, die bei Raumtemperatur besonders singulär und aufgelöst sind: Threonin $\text{C}\beta$ - $\text{C}\alpha$ und $\text{C}\beta$ - $\text{C}\gamma$ (T24, T32, T37), Serin $\text{C}\beta$ - $\text{C}\alpha$ (S19, S36), Prolin $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\delta$ (P20, P54), Alanin $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ (A11, A55, A56) und die Kreuzsignale mit Isoleucin $\text{C}\delta$ (a bis e im ersten Spektrum in Abbildung 3.2 auf der nächsten Seite und Abbildung 3.3 auf Seite 49).

Drei der vier Threonin-Signale sind normalerweise in CP basierten Raumtemperatur-Spektren sichtbar. Das vierte Threonin (T4) erscheint nur in Experimenten mit direkter

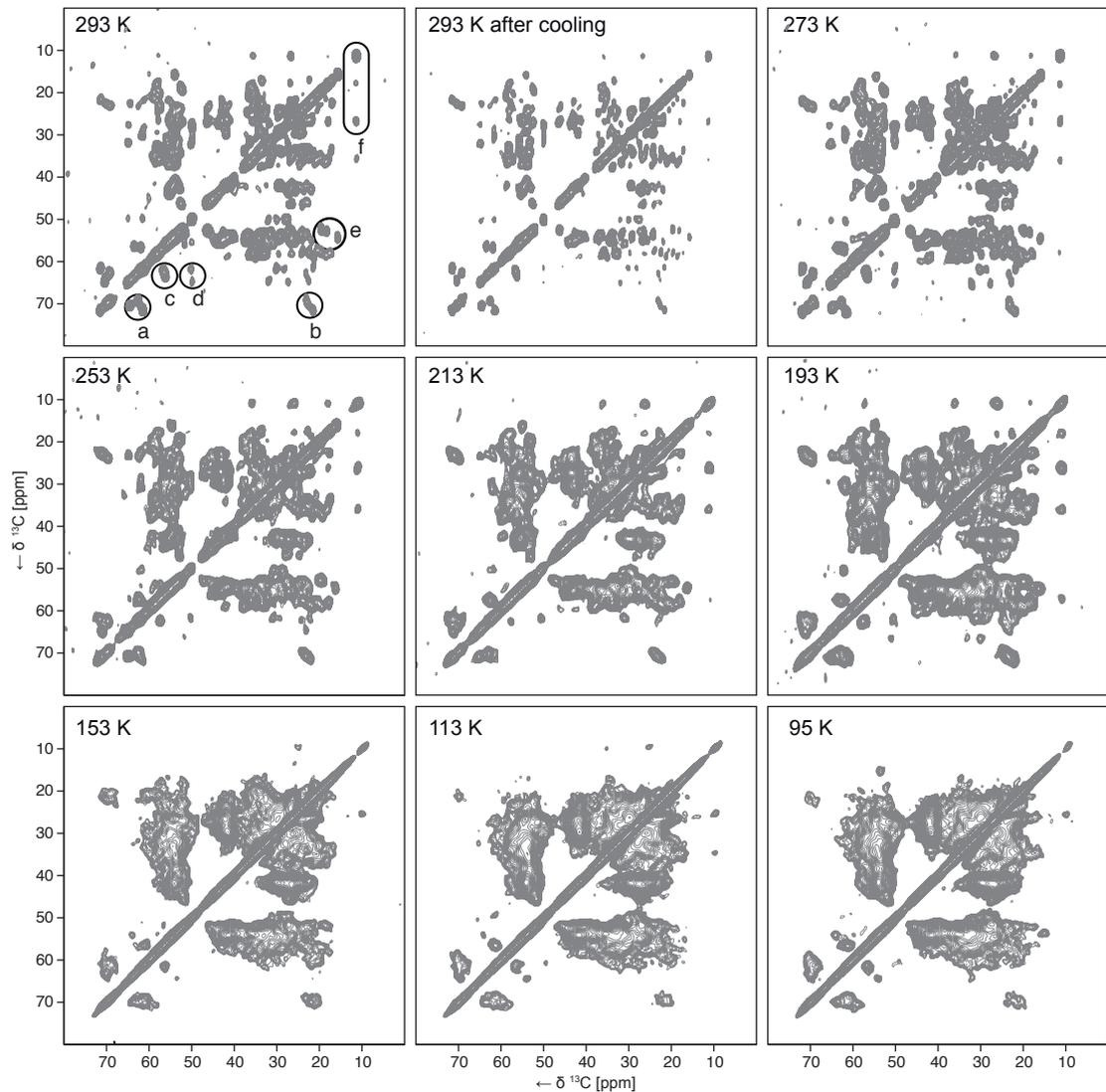


Abbildung 3.2.: 2D ^{13}C - ^{13}C PDSD-Spektren von SH3 bei den angegebenen Temperaturen. Die Spektren wurden mit 2 ms CP-Kontaktzeit und 11,25 ms PDSD-Mischzeit aufgenommen. Die bei 293 K markierten Signale werden im Text und zum Teil in Abbildung 3.3 auf der nächsten Seite näher betrachtet (a: Thr C β -C α ; b: Thr C β -C γ ; c: Pro C α -C δ ; d: Ala C α -C β ; e: Ile C δ 1, C δ 1-C γ 2, C δ 1-C γ 1). Die Daten wurden in der direkten Dimension GM (-30 Hz, GB 0,1) und in der indirekten Dimension SQ (SSB 3) prozessiert.

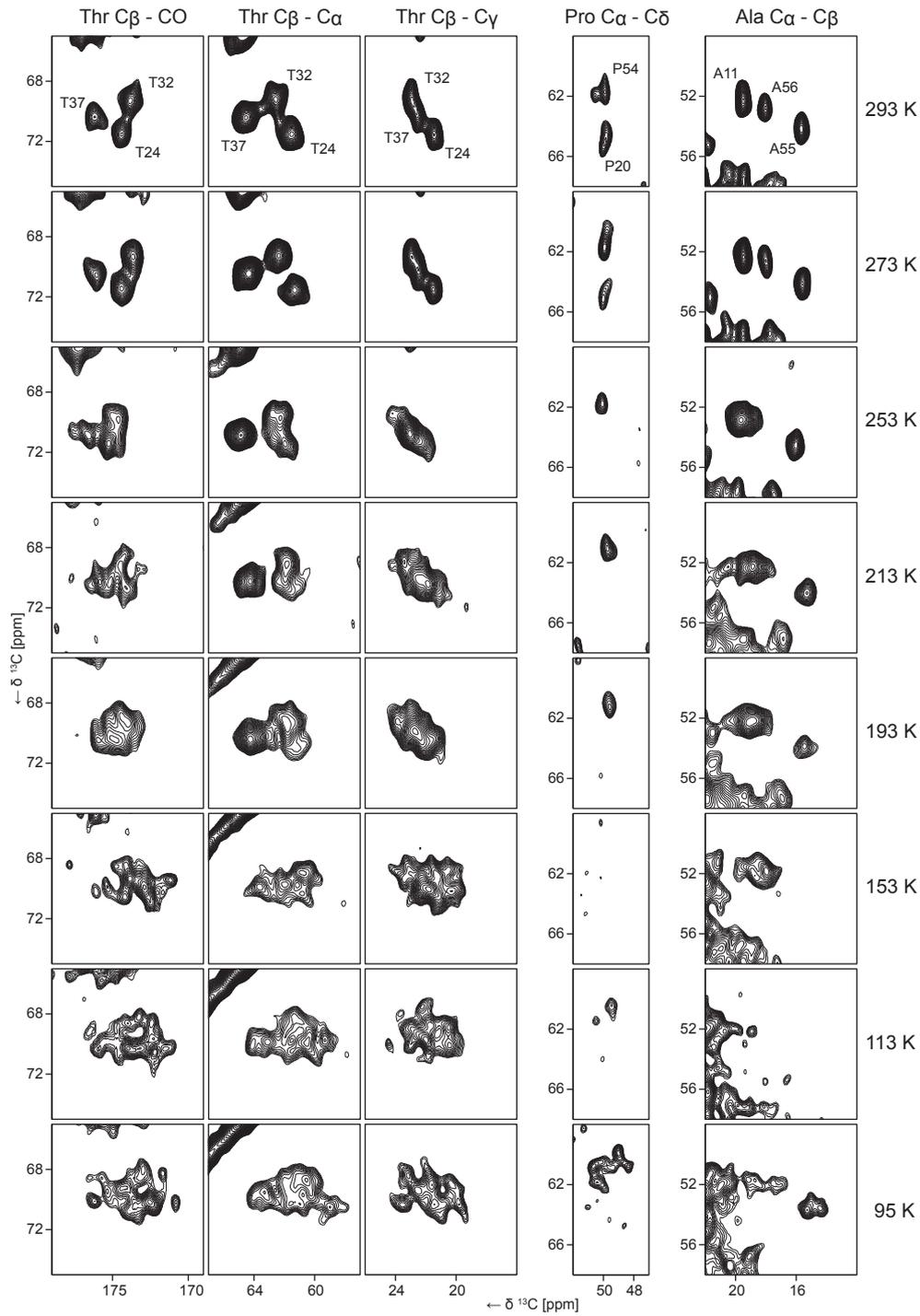


Abbildung 3.3.: 2D ^{13}C - ^{13}C PDSD-Spektren der Thr, Pro und Ala Seitenketten bei den angegebenen Temperaturen. Die Daten wurden in beiden Dimension mit GM (-8 Hz , GB 0,08) prozessiert.

Anregung der Kohlenstoffe. Da es wahrscheinlich fast keinen Einfluss auf die beobachteten Signale hat, wird T4 im Folgenden nicht berücksichtigt. In den ersten drei Spalten der Abbildung 3.3 auf der vorherigen Seite sind die C β -CO, C β -C α und C β -C γ Kreuzsignale der Threonine dargestellt. Mit sinkender Temperatur werden sie breiter und spalten sich dann in mehrere Signale auf. Dabei verbreitert sich das Signal von T37 bei einer tieferen Temperatur als die anderen beiden. Entsprechend hat es bei 193 K auch eine höhere Signalintensität (2,5- bzw. 3,8-mal größer als die Signale von T32 bzw. T24).

Die Proline (vierte Spalte) zeigen bei 293 K aufgelöste, einzelne C α -C β Signale. Bei 253 K ist das Signal von P20 so stark verbreitert, dass es unter die Detektionsgrenze von 6 mal dem berechneten Rauschen (6σ) fällt. Auch bei tieferen Temperaturen ist es nicht zu detektieren. Anders das Signal von Prolin 54: Es bleibt bis 193 K über den 6σ der ersten Konturlinie und ist erst darunter zu breit, um detektiert zu werden. Interessanterweise erscheint es jedoch bei Temperaturen von 113 K und darunter wieder über der Detektionsgrenze, nun als Gruppe aufgespaltener Signale.

Auch die C α -C β Signale der Alanine (fünfte Spalte) koaleszieren und fallen unter 6σ , das Signal von A55 bei ungefähr 153 K, die von A11 und A56 bei ungefähr 113 K. Die letzteren überlagern sich schon bei 253 K in einem Signal. Bei 95 K erscheinen alle drei wieder über 6σ , wobei das Signal von A55 in mindestens vier Signale aufgespalten ist. In beiden Fällen, bei den Prolinen und den Alaninen, wurden die neu erscheinenden Signale wieder diesen Seitenketten zugeordnet, da sich bei Raumtemperatur keine anderen Signale bei ähnlichen chemischen Verschiebungen befinden.

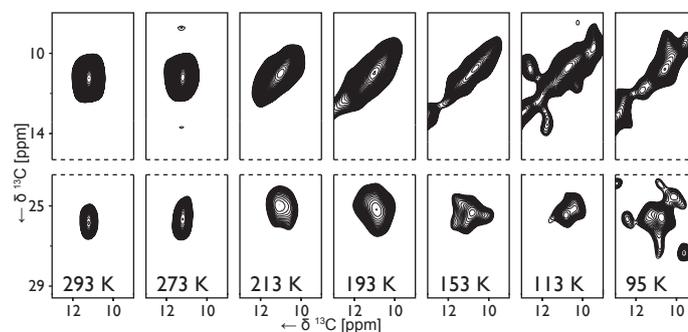


Abbildung 3.4.: C δ 1 Diagonalsignale (oben) und C γ 1-C δ 1 Kreuzsignale (unten) von Isoleucin 30 bei den angegebenen Temperaturen. Die bei 95 K beobachteten zusätzlichen Signale haben ein relativ kleines Signal-zu-Rausch-Verhältnis und es lässt sich schwer unterscheiden, ob es sich um zusätzliche Konformationen oder Rauschen handelt.

Die Kreuzsignale von Isoleucin 30, das Teil eines Kristallkontaktes zum Asparagin 38 des nächsten SH3 Moleküls ist, zu seinem C δ 1 (Abbildung 3.4) bleiben homogen bei Temperaturen über 193 K. Bei tieferen Temperaturen sind sie inhomogen verbreitert und

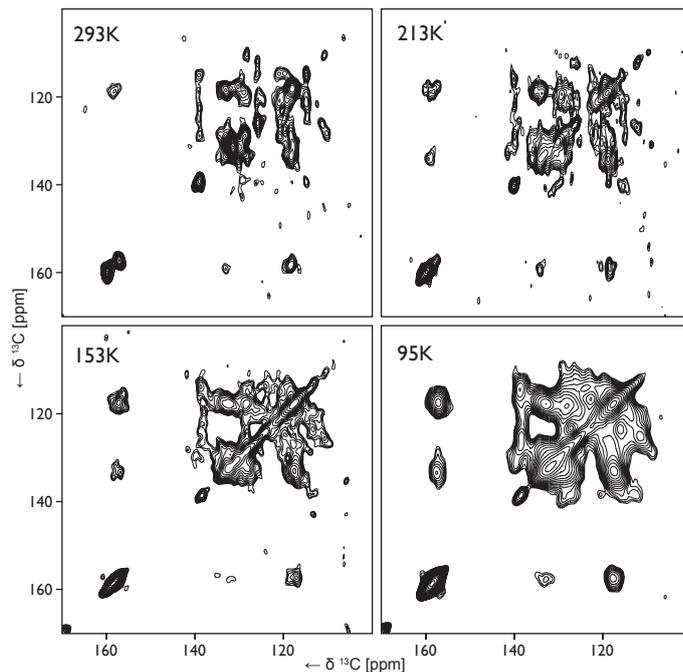


Abbildung 3.5.: 2D ^{13}C - ^{13}C PDS-D-Spektren der aromatischen Region von SH3 bei den angegebenen Temperaturen. Die Spektren wurden mit einer PDS-D-Mischzeit von 11,25 ms aufgenommen und in beiden Dimensionen breit mit GM (-40 Hz, GB 0,05 bzw. -60 Hz, GB 0,04) prozessiert.

aufgespalten, sie sind jedoch bei allen Temperaturen detektierbar.

Die Signale der aromatischen Seitenketten (zwischen 110 und 165 ppm, Abbildung 3.5) sind bei RT nur schwach über der Signalgrenze. Mit sinkender Temperatur werden sie jedoch stärker. Wahrscheinlich ändert sich die Dynamik der aromatischen Ringe, so dass sie nicht mehr mit dem Zeitfenster der Messung interferiert (die Dynamik wechselt vom intermediären Regime zum langsamen; siehe auch Seite 21). Da die Dynamik von aromatischen Ringen häufig ein Sprung zwischen zwei Konformationen ist, erscheinen in manchen Fällen auch aufgesplante Signale bei kryogenen Temperaturen. Zum Beispiel sind von den drei Tyrosinen von SH3 bei 95 K mindestens sechs Signale detektierbar.

Die Hauptketten CO- $\text{C}\alpha$ Signale sind größtenteils nicht aufgelöst, selbst bei RT. Zuordnen lassen sich nur CO- $\text{C}\alpha$ Signale von P20, P54 und G51. Mit sinkender Temperatur werden die Prolin Signale nur wenig verbreitert und bleiben über der gesetzten Detektionsgrenze. Das Glycin CO- $\text{C}\alpha$ Kreuzsignal ändert seine Intensität kaum mit sinkender Temperatur, zeigt jedoch eine leichte Aufspaltung in mehrere Signale bei tiefen Temperaturen. Soweit die Spektren eine Interpretation zulassen, scheinen die Signale der Hauptkette weniger stark beeinflusst zu sein als die der Seitenketten. Das ist bei einer

inhomogenen Verbreiterung zu erwarten, da die Atome der Hauptkette deutlich unbeweglicher sind als die der Seitenketten und entsprechend schon bei RT in weniger oder ähnlichere Konformationen vorliegen.

„Auslöschen“ eines schmalen Frequenzbereiches

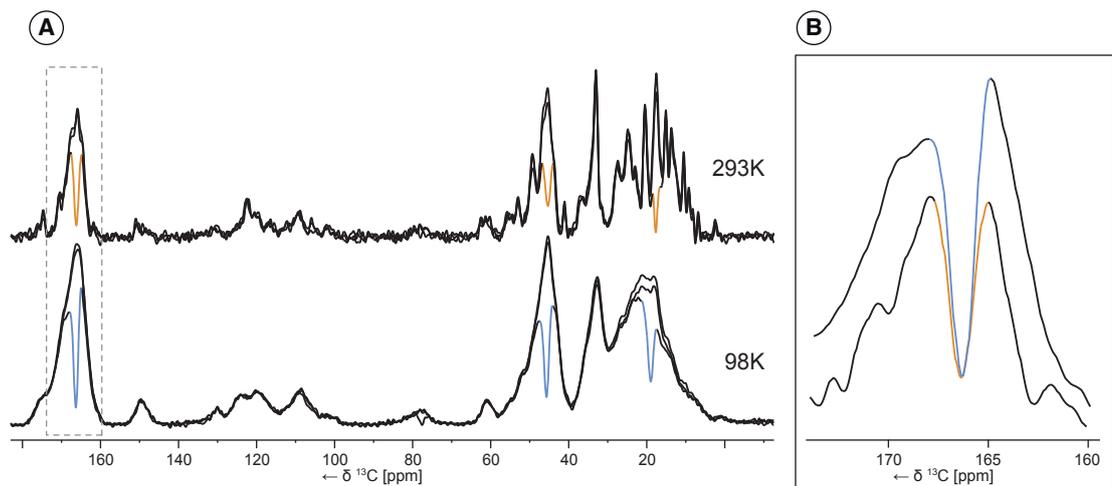


Abbildung 3.6.: A. Jeweils drei ^{13}C Spektren von SH3 bei 293 K (oben) und 98 K (unten). Ein langer Kohlenstoff-Puls von 10 ms mit 471 Hz wurde angewandt, um bei drei verschiedenen Trägerfrequenzen die Signale einer schmalen Bandbreite „auszulöschen“, dargestellt in orange und blau. B. Detailansicht der Carbonyl-Region.

Um zu bestätigen, dass die beobachtete Verbreiterung vor allem inhomogener Natur ist, wurde ein schmaler Frequenzbereich eines Kohlenstoffspektrums „ausgelöscht“ (Abbildung 3.6; siehe auch Seite 41). Bei 293 K und 98 K wurde jeweils in der Methyl-, $\text{C}\alpha$ - und Carbonyl-Region ein Puls geringer Bandbreite vor der Detektion eingestrahlt. Die entstehenden „Löcher“ im Spektrum haben bei beiden Temperaturen vergleichbare Tiefen und Breiten. Beispielsweise beträgt im CO-Signal die Breite der „Löcher“ auf halber Tiefe bei 293 K 129 Hz und bei 98 K 137 Hz. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Verbreiterung der Signale bei kryogenen Temperaturen vor allem inhomogen ist. Was als ein breites Signal erscheint, besteht also aus vielen einzelnen, dicht beieinander liegenden Resonanzen. Ein schmaler Puls beeinflusst dann nur den Teil der Signale, die seiner Frequenz entsprechen.

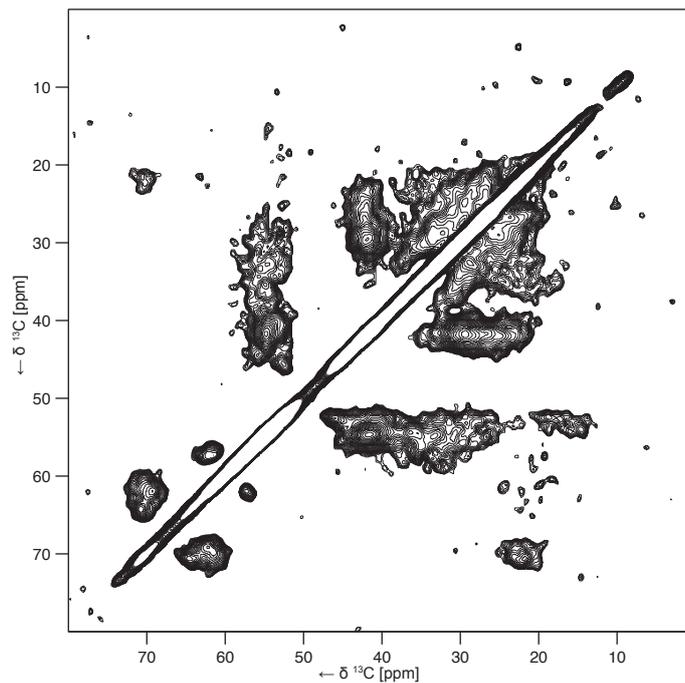


Abbildung 3.7.: 2D ^{13}C - ^{13}C PDSN-Spektrum von deuteriertem SH3 bei 95 K. Nur die Deuteronen, die sich mit dem Lösungsmittel austauschen (v.a. ND), sind durch Protonen ersetzt. Das Spektrum wurde mit 4 Experimenten und 1186 Punkten in der direkten Dimension aufgenommen und 512 mal inkrementiert. Die CP-Kontaktzeit betrug 3 ms, die Zeit zwischen den Experimenten (d_1) 2,8 s und die PDSN-Mischzeit 50 ms. Das Spektrum wurde wie die protonierten Spektren prozessiert.

Effekte der Deuterierung

Eine andere mögliche Erklärung für das Auftreten verbreiteter Linien und besonders für das Fehlen von Methylgruppen-Signalen ist eine Interferenz mit der Protonenentkoppelung (s.a. Abschnitt 1.6 auf Seite 21). Bei kryogenen Temperaturen ist die Dynamik der Seitenketten verlangsamt und kann im gleichen Frequenzbereich liegen wie die Entkoppelungspulse.

Um den Einfluss der Entkopplung auf die Spektren zu untersuchen, wurde deuteriertes SH3 gemessen (Abbildung 3.7). Dafür wurde SH3 vollständig deuteriert exprimiert und nur die Deuteronen, die sich mit dem Lösungsmittel austauschen, durch Protonen ersetzt (siehe auch Abschnitt 2.1.1 auf Seite 35; [46, 182, 183]). Dadurch sind die Protonen insgesamt so verdünnt, dass sie nur schwach dipolar gekoppelt sind und keine aktive Entkopplung mehr nötig ist. Um die im CP-Schritt fehlenden Protonen zu kompensieren, wurde die PDSN-Mischzeit vergleichsweise lang gewählt (50 ms). Trotzdem zeigt das Spektrum weniger Kreuzsignale als Spektren von vollständig protoniertem SH3. Die vor-

handenen Signale sind allerdings ähnlich verbreitert wie bei der vollständig protonierten Probe. Damit kann eine ungenügende Entkopplung nicht die Hauptursache der Verbreiterung sein und hat wahrscheinlich höchstens Einfluss auf Methylgruppen-Signale.

Strukturelle Aspekte

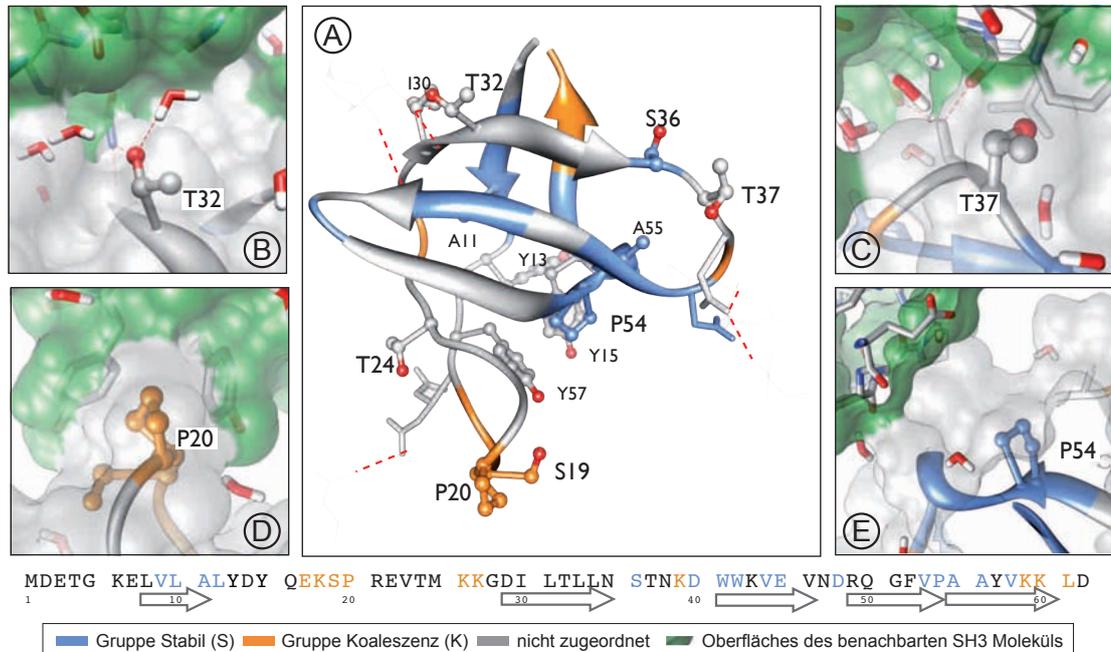


Abbildung 3.8.: A. Die Struktur von SH3 im simulierten Kristall aus 14 Molekülen (PDB:1U06 [188]). Nur das zentrale Molekül ist dargestellt und die Seitenketten nach dem Verhalten ihrer NMR-Signale eingefärbt: Wenn die Kreuzsignale zwischen 293 und 213K detektierbar bleiben, ist die jeweilige Seitenkette blau, wenn sie unter die Signalgrenze verbreitert sind, orangefarbig dargestellt. Die vier Detailansichten zeigen T32 (B.), T37 (C.), P20 (D.) und P54 (E.) mit Oberflächenmodellen ihrer direkten Umgebung und gebundenem Kristallwasser; die nächsten SH3 Moleküle sind grün dargestellt. Unten ist die Sequenz von SH3 im gleichen Farbschema dargestellt, die Pfeile zeigen β -Stränge.

Das Verhalten der NMR-Signale unterscheidet sich auch zwischen gleichen Seitenketten, z. B. zwischen den beiden Prolinen. Es ist wahrscheinlich, dass jeweils die lokale Umgebung diese Effekte hervorruft. Im Folgenden wird dieser Einfluss der Struktur auf das Temperaturverhalten der Signale untersucht. Dazu wurden sowohl die Debye-Waller-Faktoren der bekannten Kristallstrukturen als auch eine Berechnung der Exposition zum Lösungsmittel zur Hilfe genommen.

In der Röntgenbeugungs-Kristallographie sind Debye-Waller-Faktoren [196, 197] ein Index für die Verteilung und Dynamik von Atomen. Sie geben die Temperaturabhängig-

keit der Intensität bestimmter gestreuter Strahlung an. Im Folgenden wird als B-Wert B^{jl} [198] in \AA^2 verwandt, ein Wert von 80\AA^2 entspricht dabei ungefähr einer Abweichung der Atomposition um 1\AA . Kleine B-Werte sind entsprechend ein Indiz für eine relative Rigidität des entsprechenden Atoms in seiner Umgebung.

Die Berechnung der Wasser-Akzessibilität (WA) erfolgte nach Linser et al. [191]. Dazu wurde in einer Simulation mit einem SH3 Kristall aus 14 Molekülen (bei 293 K [189]) eine Kugel mit einem Durchmesser von $1,4 \text{\AA}$ über die Oberfläche des zentralen SH3-Moleküls „gerollt“. Die erhaltenen Abstände zwischen diesem simulierten Wassermolekül und den Seitenketten wurden in Abstandsgruppen eingeteilt. Im Anhang in Tabelle D.1 auf Seite 123 finden sich die B-Werte und berechneten WA der einzelnen Seitenketten.

Die Kreuzsignale von Seitenketten mit aufgelöster, charakteristischer Verschiebung können über den gesamten Temperaturbereich verfolgt werden – vor allem von Threoninen, Alaninen und Serinen. Viele andere Signale lassen sich unterhalb von 213 K nicht mehr zweifelsfrei zuordnen.

Von den vier Threoninen in SH3 lässt sich T4 nicht bei RT beobachten. Es befindet sich in einer beweglichen Schleife und wird wie erwähnt im Weiteren nicht berücksichtigt. T24 (WA 0,3 - $0,8 \text{\AA}$; B-Wert 12,02) befindet sich in einer Schleife ohne stabilisierende Einflüsse. T32 (WA 0 - $0,3 \text{\AA}$; B-Wert 14,15; B in Abbildung 3.8 auf der vorherigen Seite) befindet sich in einem β -Strang und ist über eine Wasserstoffbrücke mit N38 des benachbarten SH3-Moleküls verbunden. Als Teil des H-verbrückten Netzwerkes ist T32 in seiner Bewegung eingeschränkt. Das dritte Threonin, T37, (WA 1 - $1,5 \text{\AA}$; B-Wert 9,81; C in Abbildung 3.8 auf der vorherigen Seite) befindet sich in einer Schleife und in einem Kristallkontakt, wobei es in einer Art Tasche in der Hydrationshülle des nächsten Moleküls ist. Außerdem unterscheidet es sich von den anderen zwei Threoninen in seinem χ_1 Winkel von $+59^\circ$ (T32: -65° ; T24: -66° ; aus der Struktur bei 100 K [188]). In Proteinen ist χ_1 der Winkel zwischen $C\alpha$ und $C\beta$, der durch N und $C\gamma$ determiniert ist. Dadurch befindet sich die Methylgruppe des T37 näher am NH als am CO der Hauptkette und ihre Rotation kann dadurch eingeschränkt sein.

Wenn mehrere Konformationen und die Beweglichkeit einer Seitenkette die Ursache der Signalverbreiterung sind, erscheint es logisch, dass das Signal des weniger beweglichen T37 erst bei tieferen Temperaturen verbreitert ist. Auch wäre zu erwarten, dass T24 bei höheren Temperaturen als T32 und T37 eine Signalverbreiterung aufweist. Die beobachteten Koaleszenztemperaturen bestätigen diese Überlegungen: T37 (200 K) < T32 (246 K) < T24 (253 K; gemessen als Durchschnitt der Koaleszenztemperaturen der drei Kreuzsignale jedes Threonins).

Bei den beiden Prolinen befindet sich P54 (B-Wert 12,18) in einem β -Strang und seine

Seitenkette zeigt zum Zentrum des Proteins. Seine Signale bleiben relativ unverändert zwischen RT und 193 K. Bei tieferen Temperaturen sind sie unter die Detektionsgrenze verbreitert, erscheinen jedoch bei 113 K und darunter wieder über der Grenze. Im Unterschied dazu werden die Signale des P20 nicht unter 273 K beobachtet. Dieses Prolin (B-Wert 14,58) befindet sich in einer Schleife und zwischen zwei aromatischen Ringen von Tyrosinen des nächsten SH3-Moleküls. Durch die unterschiedlichen Konformationen und Ringinversionen der Tyrosine, die Flexibilität der Schleife und verschiedene Prolin-Konformere sind viele, magnetisch unterschiedliche Umgebungen möglich. Dies spiegelt sich in der Beobachtung einer relativ hohen Koaleszenztemperatur über einen breiten Temperaturbereich wieder.

Die drei Alanine zeigen ein ähnliches Signalverhalten wie P54. A11 ist Teil eines β -Strangs, während die anderen beiden sich in einem Übergang zwischen zwei β -Strängen befinden. Deren $C\alpha$ - $C\beta$ Signale (A55 und A56) koaleszieren bereits bei 153 K, während das Signal von A11 noch deutlich über der Signalgrenze liegt. Bei 113 K liegen alle drei Signale nur schwach über dieser Grenze. Bei 95 K sind sie jedoch alle wieder detektierbar und deutlich in mehrere Signale aufgespalten.

Das Isoleucin 30 ist Teil eines Kristallkontaktes zum Asparagin 38 eines benachbarten SH3 Moleküls. Obwohl die beobachtete Resonanz von der $C\delta$ -Methylgruppe stammt, ist mit sinkender Temperatur nur wenig inhomogene Verbreiterung zu beobachten. Wahrscheinlich ist die Dynamik der ganzen Seitenkette durch den Kontakt zwischen den Molekülen stark eingeschränkt und erklärt so die überraschend starken Signale der Methylgruppe bei kryogenen Temperaturen.

Andere ^{13}C Resonanzen, mit weniger solitärer Verschiebung, lassen sich kaum über den ganzen Temperaturbereich verfolgen, weil eine eindeutige Zuordnung der Signale zu einzelnen Seitenketten nicht möglich ist. Häufig überlappen sich Signale, besonders bei tiefen Temperaturen. Von 62 Seitenketten wurden 26 zwischen 293 und 213 K analysiert, wobei die Serine und Proline mitgezählt wurden. Das Rauschen jedes Spektrums wurde berechnet und die unterste Konturlinie bei 6-mal diesem Rauschen (6σ) gezeichnet. Wenn die Kreuzsignale einer Seitenkette bei allen Temperaturen von 213 K und höher größer als 6σ waren, wurde dieser Rest der Gruppe S (stabil) zugeordnet. Wenn die Signale unter 6σ fielen, wurde die Seitenkette zu der Gruppe K (Koaleszenz) gezählt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 auf Seite 54 zur Veranschaulichung in der Struktur von SH3 dargestellt. 10 von 26 Seitenketten sind in der Gruppe K und befinden sich vor allem in Schleifen (orange dargestellt), z.B. zwischen E17 und P20. Nur K59 und K60 liegen in einem β -Strang, jedoch am C-Terminus des Proteins. Alle 16 Seitenketten der Gruppe S sind entweder in einem β -Strang oder nur eine Position davon entfernt (blau).

Tabelle 3.1.: Durchschnittlich Wasser-Akzessibilität [\AA] berechnet mit der SH3 Struktur bei 293 K [189] und Debye-Waller Faktoren [\AA^2] der Seitenketten von SH3 bei 100 K ohne N, CO, C α [188]. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen.

	Wasser- Akzessibilität	Debye-Waller Faktoren
Extrema	0 – 5,3	9,81 – 28,93
Durchschnitt:		
aller Seitenketten	$1,38 \pm 1,1$	$16,70 \pm 5,2$
der bis 213 K detektierbaren (S)	$2,16 \pm 1,4$	$14,91 \pm 3,7$
der nicht bis 213 K detektierbaren (K)	$0,88 \pm 0,7$	$19,81 \pm 3,8$

In Tabelle 3.1 sind die B-Werte der Seitenkettenatome bei 100 K ([188]; ohne N, CO und C α der Hauptkette) und die berechneten WA für beide Gruppen S und K dargestellt. Die Seitenketten der Gruppe K haben einen berechneten Durchschnitts-Abstand zum Wasser von $0,88 \text{\AA}$ und einen Maximalabstand von $2,15 \text{\AA}$. Im Gegensatz dazu ist die WA der Gruppe S im Durchschnitt $2,16 \text{\AA}$ und über einen Bereich von 0 bis $5,3 \text{\AA}$ verteilt. Daraus lässt sich schließen, dass die Exposition zum Lösungsmittel einen starken Einfluss auf die beobachtete Linienverbreiterung hat.

Verglichen mit dem Durchschnitt aller Seitenketten sind die Atome aus S mit einem kleineren und diejenigen aus K mit einem größeren B-Wert assoziiert. Dies deutet darauf hin, dass die Seitenketten, die in der Röntgenstruktur flexibel erscheinen, in NMR-Spektren bei höheren Temperaturen koaleszieren und stärker verbreitert sind.

Zusammenfassend kann mit dieser Untersuchung gezeigt werden, dass sich die NMR-Spektren von hydrierten Proteinen mit sinkender Temperatur stark verändern. Die Signale werden dabei vor allem inhomogen verbreitert. Der Grad der Verbreiterung und die Temperatur, bei der sie auftritt, hängen stark vom einzelnen Atom und seiner Umgebung ab. Je flexibler und Lösungsmittel-exponierter eine Seitenkette bei RT ist, desto stärker und bei höheren Temperaturen setzt die Signalverbreiterung ein. Dabei lassen sich beide Faktoren schlecht trennen, da naturgemäß Seitenketten an der Oberfläche von Proteinen meist auch beweglicher sind. Diese Ergebnisse werden unterstützt durch Untersuchungen von fast wasserfreien Kristallen, in denen die Verbreiterung nur marginal ist [88]. Vor dem Hintergrund der komplexen Wechselwirkungen von Hydrationswasser und Protein wird deutlich, wie viele Faktoren den eingefrorenen Zustand der Seitenketten beeinflussen.

Eine Untersuchung verschiedener Einfrier-Geschwindigkeiten zeigte keinen messbaren Effekt. Ob sich mit deutlich schnellerem oder langsamerem Einfrieren die Verbreiterung

vermindern lässt, bleibt fraglich. Zu keiner Zeit wurde ein definierter Übergang während des Einfrierens beobachtet. Weder ein Proteinglasübergang noch das Einfrieren des Hydrationswassers zeigten bei den zu erwartenden Temperaturen deutliche Veränderungen der Spektren. Vielmehr ist die Veränderung der Spektren stark abhängig vom betrachteten Atom und diese einzelnen Übergänge erstrecken sich über einen großen Temperaturbereich.

Andere Methoden, mit denen häufig Glasübergänge gemessen werden, wie beispielsweise die Neutronenstreuung, betrachten nur die Gesamtheit der Dynamik eines Proteins. Das entspricht im Fall der NMR-Spektren dem Durchschnitt der Koaleszenztemperaturen, der bei ca. 213 K liegt. Die atomare Auflösung der NMR-Spektroskopie erlaubt ein differenziertes Bild, und die Ergebnisse dieser Untersuchung machen einen allgemeinen Glasübergang der Proteindynamik unwahrscheinlich.

Es bleibt festzuhalten, dass die beobachtete inhomogene Verbreiterung die Analyse der Spektren erschwert. Könnten die einzelnen, aufgespaltenen Signale aufgelöst werden, würde sich eine Fülle neuer und interessanter Informationen ergeben.

Bis dies möglich ist, lassen sich zwei Wege beschreiten und kombinieren, die eine Auswertung zulassen: Entweder werden nur einzelne Atome in einem System markiert, so dass sich keine Signale überlappen (z.B. [47]). Oder besonders rigide Analyten werden ausgewählt, wie z. B. wasserfreier Kristalle (z.B. [42]) oder stark gebundenen Liganden (Abschnitt 3.4 auf Seite 73).

3.2. Effekte des zugegebenen Biradikals

3.2.1. Hintergrund & Fragestellung

Eine weitere Voraussetzung für DNP-Messungen ist die Zugabe von Radikalen zu der Probe. Im Folgenden werden die Auswirkungen dieser Zugabe auf die NMR-Parameter und damit auf die Spektren untersucht. Dazu wurde uniform ^{13}C , ^{15}N markiertes Prolin (CN-Prolin) mit unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0 und 196 mM des Biradikals TOTAPOL (TP) versetzt und vermessen. TP ist ein häufig verwandtes DNP-Agens (siehe auch Abschnitt 1.4.3 auf Seite 16), das unter anderem bei kommerziellen DNP-Spektrometern zum Einsatz kommt. Andere Untersuchungen messen bei TP-Konzentrationen von 5 bis 20 mM keine Verbreiterung der NMR-Signale durch das zugegebene Biradikal [199].

Die Fragestellungen dieses Abschnitts sind: Welche Konzentration an TP führt zur größten Sensitivität der Methode? Beeinflusst TP die Linienbreite? Welche Effekte hat TP auf NMR-relevante Parameter?

3.2.2. Ergebnisse & Diskussion

1D Spektren mit unterschiedlichen TOTAPOL Konzentrationen

Um die Effekte des Biradikals zu untersuchen wurden Proben von 50 mM CN-Prolin mit unterschiedlichen TP-Konzentrationen (c_T) vermessen. Zur Veranschaulichung wurden die Abstände der jeweiligen Moleküle in einer idealen Lösung wie folgt berechnet:

$$x[\text{nm}] = \left(\frac{10^{24} \text{nm}^3}{M \cdot N_A} \right)^{1/3} \quad (3.1)$$

Dabei ist x die Kantenlänge eines Würfels um ein einzelnes Molekül und entsprechend gleich dem durchschnittlichen Abstand zweier Molekül-Zentren; M ist die Molarität der Lösung und N_A die Avogadro-Konstante ($6,022\,141\,29 \cdot 10^{23} \text{mol}^{-1}$). Die Abstände der TP-Moleküle bei unterschiedlichen c_T und für das Prolin sind in Tabelle 3.2 auf der nächsten Seite dargestellt.

Die Konzentration des Prolins ist so gewählt, dass sie derjenigen von aufkonzentrierten biologischen Proben entspricht. Zusätzlich ergibt diese Konzentration Radikal-Analyt-Verhältnisse von 0,3 bis 3,92 und sollte geeignet sein, Prolin als ein Art „Sonde“ für die Effekte des Radikals zu nutzen.

Beim TP beträgt der Abstand der beiden Radikal-Zentren $11,2 \text{ \AA}$, das ist der Mittelwert aus dem Abstand der Sauerstoffe ($12,2 \text{ \AA}$) und der Stickstoffe ($10,2 \text{ \AA}$) jeweils zueinander.

Tabelle 3.2.: Abstand der TOTAPOL Moleküle zueinander bei verschiedenen c_T und Abstand der Prolin Moleküle (siehe Text).

	c_T [mM]	Abstand [nm]
TOTAPOL	14,8	4,82
	25,8	4,01
	52,2	3,17
	102,8	2,53
	196,0	2,04
Prolin	50,0	3,21

Je nach Orientierung der TP-Moleküle zueinander variiert der Abstand der Radikal-Zentren benachbarter Moleküle. Er liegt z.B. bei einer c_T von 52,2 mM zwischen 31,7 Å und 20,5 Å.

1D ^{13}C CP-Spektren wurden entweder mit 1024 Experimenten gemessen oder mit so vielen Experimenten, wie in 10 Minuten Messzeit möglich sind (Reihen A und B in Abbildung 3.9 auf der nächsten Seite). Bei einer konstanten Nummer von Experimenten nimmt das gemessene Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) mit steigender c_T ab (Reihe A). Im Gegensatz dazu erreicht das S/N bei einer konstanten Versuchsdauer sein Maximum bei einer c_T von 26 mM und fällt erst bei höheren c_T ab. Um diese Beobachtung zu erklären, wurden die Einflüsse von TP auf die Relaxations-Zeiten, die Linienbreite, die DNP-Verstärkung und die Sensitivität untersucht.

Einzelne Effekte des TOTAPOLS

Radikale beschleunigen als Paramagneten die Relaxationen benachbarter Kerne. Zusätzlich können sie die chemischen Verschiebungen von Protonen so stark verändern, dass keine adäquate Entkopplung mehr möglich ist [83]. Im Folgenden werden diese Effekte unter dem Begriff paramagnetische Effekte (PE) zusammengefasst.

Der offensichtlichste Effekt steigender c_T ist eine Verminderung der Signalintensität. Bei hohen c_T sind sowohl das S/N als auch die Integrale der Signale deutlich vermindert. Bei Versuchen mit gleicher Dauer (Reihe B) tritt dieser Effekt allerdings erst bei einer c_T über 26 mM auf.

Das TP beschleunigt unter anderem die Spin-Gitter-Relaxation der Prolin-Protonen (T_1 -Zeit). Eine kurze T_1 -Zeit erlaubt es, mehr Experimente pro Zeit aufzunehmen, da die zwischen den Experimenten benötigte Wartezeit kurz ist. Ohne TP ist die T_1 -Zeit der

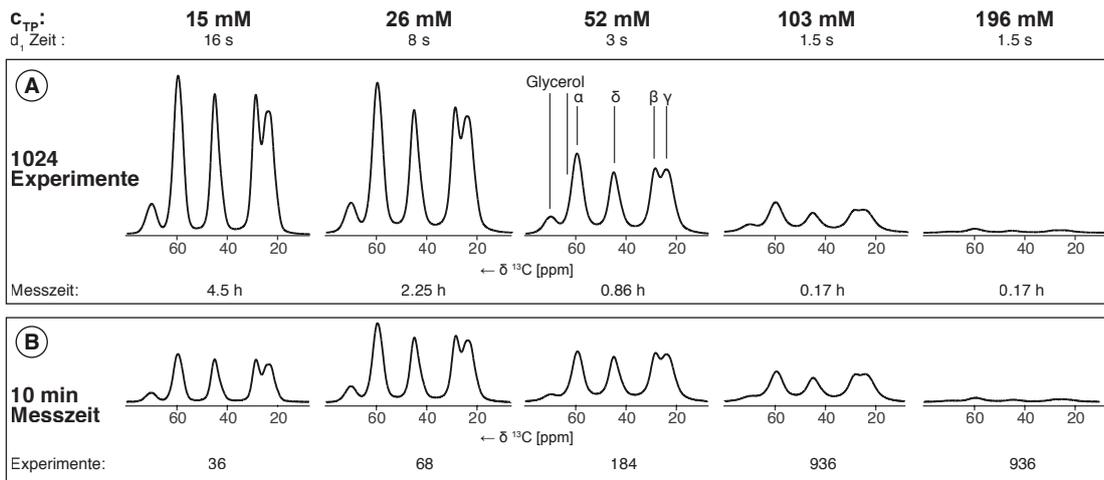


Abbildung 3.9.: 1D ^1H - ^{13}C CP-Spektren von ^{13}C , ^{15}N -markiertem Prolin mit verschiedenen Konzentrationen von TP, aufgenommen mit 1024 Experimenten (**A.**) oder innerhalb einer Messzeit von 10 Minuten (**B.**). Die Zeit zwischen den Experimenten wurde an die längste gemessene Protonen T_1 -Zeit angepasst, außer bei der Probe mit 196 mM TP, weil die berechnete Zeit aus technischen Gründen zu kurz ist. Alle Spektren wurden bei 101 K mit einer CP-Kontaktzeit von 500 μs und einer Aufzeichnungszeit von 25 ms aufgenommen. Sie wurden alle ohne Gewichtung prozessiert und mit derselben Rausch-Intensität dargestellt.

Protonen bei 100 K von Prolin in Lösung 27,8 s. Mit nur 15 mM TP sinkt die T_1 -Zeit auf 5,4 s und mit 26 mM auf 2,7 s (Diagramm A in Abbildung 3.10 auf der nächsten Seite). Mit mehr möglichen Experimenten in derselben Zeit steigt auch das S/N pro Messzeit. Deshalb erreicht das gemessene S/N in den 10 min-Versuchen sein Maximum bei einer c_T von 26 mM. Diese Möglichkeit die T_1 -Zeit zu verkürzen wird auch bei anderen Messungen genutzt, indem Paramagneten wie Kupfer-EDTA zu den Proben gegeben werden [83, 200, 201].

Schon dieser Effekt zeigt deutlich, dass zur Optimierung und zum Vergleich unterschiedlicher Proben die DNP-Verstärkung allein kein geeignetes Maß ist. Entscheidender Antrieb für die DNP-Technik ist eine Verbesserung der Sensitivität. Entsprechend wurde in dieser Untersuchung die Sensitivität (κ) ähnlich dem Konzept von Ernst et al. [202] berechnet:

$$\kappa = \frac{S/N}{n_A \cdot \sqrt{T_1 \cdot n_S \cdot 1,3}} \quad (3.2)$$

n_A = Analyt pro Rotor in μmol

n_S = Anzahl der Experimente

In dem hier untersuchten System liegt die berechnete Sensitivität, abhängig von c_T ,

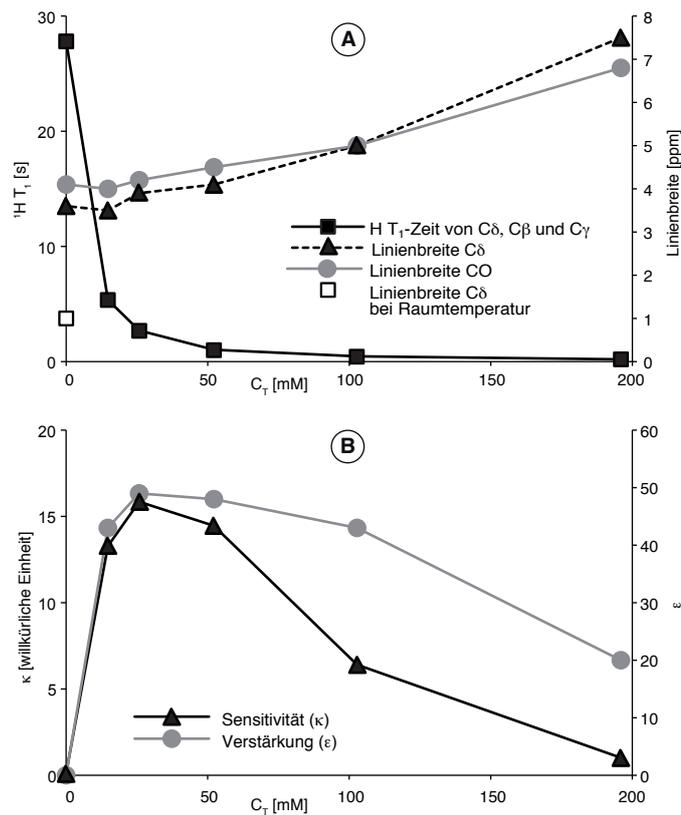


Abbildung 3.10.: Verschiedene NMR-Messwerte bei veränderter TP-Konzentration: **A.** Protonen T_1 -Relaxationszeit bei 100 K (gefüllte Quadrate) und bei Raumtemperatur ohne TP (offenes Quadrat, beide linke Achse); Kohlenstoff Linienbreite des $\text{C}\delta$ Signals auf halber Höhe mit Hilfe eines Soft-Pulses gemessen (rechte Achse, Dreiecke) **B.** Sensitivität (κ , linke Achse, Dreiecke) und DNP-Verstärkung (ϵ , rechte Achse, Kreise) des $\text{C}\delta$ Signals. Alle Daten wurden mit 50 mM ^{13}C , ^{15}N markiertem Prolin gemessen, außer dem Wert bei Raumtemperatur, der mit 120 mg natürlichem Prolin in Pulverform gemessen wurde. Alle Spektren sind mit einer CP-Kontaktzeit von 500 μs aufgenommen.

zwischen 1 und 15,8. Ohne TP und damit ohne DNP-Verstärkung beträgt die Sensitivität nur 0,15, was eindrucksvoll das Potential der DNP zeigt (Diagramm B in Abbildung 3.10). Ein Vergleich der Sensitivität mit und ohne DNP wurde zur gleichen Zeit am Beispiel von Silikon-Oberflächen veröffentlicht [55]. Auch in dieser Arbeit wird auf die Bedeutung eines solchen Vergleichs im Gegensatz zu einer einfachen Messung der DNP-Verstärkung hingewiesen.

Das Biradikal beschleunigt ebenfalls die Spin-Spin-Relaxation (T_2^* -Zeit) der beobachteten Kerne, besonders in diesem Fall einer gefrorenen Lösung kleiner Moleküle. Die T_2^* -Zeit korreliert mit der messbaren homogenen Linienbreite ($b_{1/2}$):

$$b_{1/2} = \frac{1}{\pi \cdot T_2^*} \quad (3.3)$$

Da die Signale von Prolin durch die kryogene Temperatur inhomogen verbreitert sind (siehe auch Abschnitt 3.1 auf Seite 45), erscheint eine homogene Verbreiterung der Signale erst bei einer c_T über 26 mM (Diagramm A in Abbildung 3.10 auf der vorherigen Seite). Bei 196 mM ist die gemessene Linienbreite in halber Höhe doppelt so groß wie bei 26 mM. Die gemessenen T_2^* -Zeiten dieser Konzentrationen sind 298 μs und 990 μs und entsprechen damit einer minimalen Linienbreite von 5,3 ppm und 1,6 ppm. Zusätzlich kann eine unvollständige Entkopplung der Protonen durch paramagnetische Verschiebung der Protonensignale diesen Effekt verstärken. Die Signale in den Spektren sind breiter, als die T_2^* -Zeiten erwarten lassen (7,5 und 3,9 ppm), beide um einen ähnlichen Betrag. Dieser Unterschied liegt höchstwahrscheinlich an der inhomogenen Verbreiterung, die besonders in gefrorenen Lösungen wie hier ausgeprägt ist. Wenn die Signale inhomogen verbreitert sind, lässt sich also bei niedrigen c_T keine homogene Verbreiterung durch das TP feststellen. Entsprechend zeigen auch Untersuchungen bei GNNQQNY Kristallen keine Verbreiterung bei c_T bis 50 mM [179].

Bei Untersuchungen größerer Moleküle, wie z.B. von Proteinen, würde man erwarten, dass der durchschnittliche Abstand von Radikal und Analyt-Kernen deutlich größer ist, und demzufolge kaum homogene Verbreiterung auftritt und sich schmale Signale beobachten lassen (wie z.B. in [49]). Dieser Effekt wird in Abschnitt 3.4 auf Seite 73 näher beschrieben.

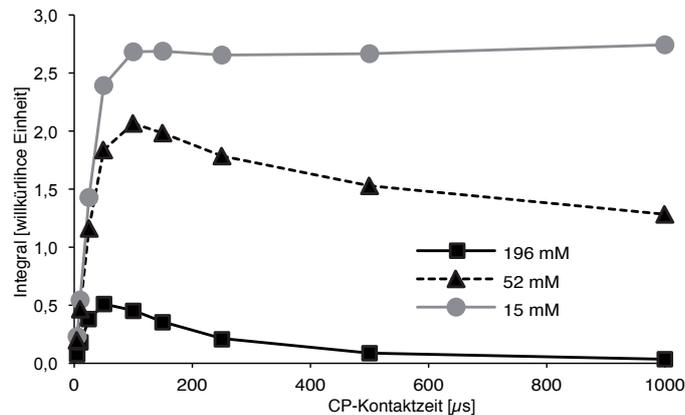


Abbildung 3.11.: Effizienz einer Protonen-Kohlenstoff CP mit verschiedenen CP-Kontaktzeiten und bei verschiedenen c_T . Die 1D Spektren von CN-Prolin wurden mit 128 Experimenten bei 100 K gemessen. Die Zeit zwischen den Experimenten wurde der gemessenen Protonen T_1 -Zeit angepasst außer, aus technischen Gründen, bei der Messreihe mit 196 mM TP.

Die c_T beeinflusst ebenfalls die Spin-Gitter-Relaxationszeit im rotierenden Koordinatensystem ($T_{1\rho}$ -Zeit; siehe auch Seite 4). Ein CP-Transfer von H zu ^{13}C ist nur bei CP-Kontaktzeiten (t_{CP}) effizient, die kürzer als die $T_{1\rho}$ -Zeit der Protonen sind [13]. Die Effizienz des CP-Transfers bei verschiedenen t_{CP} ist also stark abhängig von der c_T (Abbildung 3.11 auf der vorherigen Seite). Bei einer c_T von 15 mM bleibt die Effizienz fast unverändert für t_{CP} von 100 μs bis 1000 μs . Bei einer c_T von 52 mM, was die Obergrenze der normalen Verwendung darstellen dürfte, erreicht die CP-Transfer-Effizienz ihr Maximum bei einer t_{CP} von 100 μs und fällt auf 63 % dieses Wertes bei einer t_{CP} von 1000 μs . Mit einer c_T von 196 mM ist das Maximum bei einer t_{CP} von 50 μs erreicht und die Effizienz fällt auf nur 6 % dieses Wertes bei einer t_{CP} von 1000 μs . Dieser Effekt ist besonders wichtig, wenn z.B. lange Kontaktzeiten nötig sind, um große Abstände zwischen Atomen zu messen. Auch wenn der Polarisationsverlust in einem kurzen CP-Transfer nur gering ist, können mehrere CP-Schritte in einem Experiment, deren Faktoren der Transfer-Effizienz sich multiplizieren, die Signalintensität deutlich vermindern. In solchen Fällen sollte also die kleinstmögliche c_T angewandt werden.

Wie in Abschnitt 1.5.1 auf Seite 20 beschrieben, beeinflussen Radikale benachbarte Kerne besonders stark. Durch PRE und paramagnetische Verschiebung (zusammen paramagnetische Effekte, PE) können Kerne in der Nähe des TP nicht mehr detektierbar sein. Diese Effekte beeinflussen auch die Spektren, die ohne Mikrowellen-Bestrahlung aber mit Biradikal gemessen wurden. Durch den Vergleich solcher Spektren mit Messungen unter Mikrowellen-Bestrahlung wird normalerweise der DNP-Verstärkungsfaktor (ϵ) ermittelt. Das so gemessene ϵ ist also im Gegensatz zu κ unempfindlich gegenüber den PE. Da bei hohen c_T die Anzahl der messbaren Analyt-Moleküle abnimmt, ist die Sensitivität vermindert, während die DNP-Verstärkung einen schwächeren Abfall bei hohen c_T zeigt (Diagramm B in Abbildung 3.10 auf Seite 62).

Um die PE zu quantifizieren wurde folgendes Modell entwickelt: Jedes TP Molekül ist von einem Bereich umgeben, in dem durch PE die NMR-Signale so verbreitert sind, dass sie nicht mehr detektiert werden können (verdeckt genannt). Dieser Bereich wird durch zwei Kugeln um die Radikalzentren dargestellt, die durch einen Zylinder mit demselben Radius verbunden sind (zusammen Stäbchen genannt). Diese Stäbchen, jedoch nicht die TP Moleküle selbst, können sich überlappen (Abbildung 3.12 auf der nächsten Seite). Das Volumen V_{b_N} , dass von N Stäbchen verdeckt wird ist:

$$V_{b_N} = \sum_{i=1}^N B_i \quad (3.4)$$

wobei B_i das verdeckte Volumen des Stäbchens i ist:

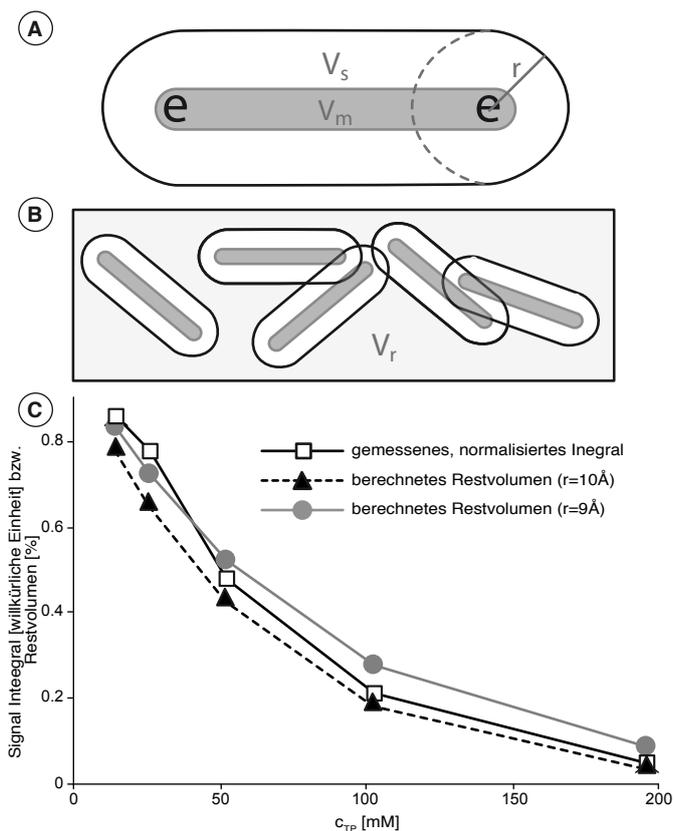


Abbildung 3.12.: **A.** Um die TP Moleküle wurde der Bereich berechnet, in dem die PE die Signale der Analyten-Kerne verdecken. Als Modell der PE dienten Kugeln um die Radikal-Zentren, die durch einen Zylinder verbunden sind. **B.** Diese Stäbchen füllen Teile des Messvolumens aus und können sich, im Gegensatz zu den TP Molekülen selbst, überlappen. **C.** Normalisierte Integrale von Kohlenstoffspektren mit einer konstanten Anzahl von Experimenten gemessen an 50 mM CN-Proline (offene Quadrate) und die berechneten Verhältnisse von unverdeckten Volumina (V_r , siehe Text) zum Gesamtvolumen, berechnet für einen 3,2 mm Rotor und PE-Radii von 9 Å (Kreise) und 10 Å (Dreiecke).

$$B_i = V_m + (V_s \cdot a_i) \quad (3.5)$$

mit V_m als nicht überlappendes Volumen eines TP Moleküls. Das Volumen des umgebenden Stäbchens V_s wurde korrigiert mit dem Faktor a , der die Überlappung berücksichtigt:

$$a_i = \left[\frac{V - (i \cdot V_m) - \sum_{j=1}^{i-1} D_j}{V - (i \cdot V_m)} \right] \quad (3.6)$$

wobei

$$D_j = V_s \cdot a_j \text{ mit } j < i \quad (3.7)$$

Melnyk, Rowlinson [203] haben als Vereinfachung für die Füllung eines Volumens mit überlappenden Volumina beschrieben:

$$V_r = V - V_{b_N} \approx V - e^{-k \cdot c_T} \quad (3.8)$$

Dabei ist V_r das restliche, nicht verdeckte Volumen und k ein Proportionalitäts-Faktor. Mit diesem Modell wurde k für verschiedene Radien der PE berechnet und die sich ergebenden Funktionen aus Gleichung (3.8) zusammen mit den gemessenen Signal-Integralen gegen die c_T aufgetragen (Abbildung 3.12 auf der vorherigen Seite).

Vergleicht man die berechneten Funktionen mit den gemessenen Integralen, so sind im Durchschnitt die Signale von Kernen näher als 10 \AA zu den Radikalen zu breit, um detektiert zu werden. Dieser Wert deckt sich mit Literaturwerten zur PRE [78]. Daraus folgt im Rückschluss, dass z.B. bei einer c_T von 50 mM nur 48 % aller Analytenkerne gemessen werden können.

Optimierung der Biradikal-Konzentration

In dem hier untersuchten System ist die Sensitivität bei einer c_T von ungefähr 25 mM am größten. Dieser Wert stimmt mit anderer DNP-Untersuchungen überein (siehe Tabelle 4.1 auf Seite 92). Eine Verbreiterung der Signale tritt nur bei sehr hohen c_T in Erscheinung, da sie sonst durch die temperaturbedingte inhomogene Verbreiterung überdeckt wird. Alles in allem zeigt diese Untersuchung, dass die Konzentration von TP einen großen Einfluss auf die NMR-Daten hat. Hohe Konzentrationen führen zwar zu einer größeren DNP-Verstärkung und erlauben mehr Experimente pro Messzeit, vermindern aber andererseits die Effizienz des CP-Transfers und das detektierbare Volumen und verbreitern die Signale. Deshalb sollte die c_T abhängig von der jeweiligen Probe und den durchzuführenden Experimenten gewählt werden, um den besten Kompromiss zu finden. Die DNP-Verstärkung allein ist dabei kein ausreichendes Beurteilungskriterium.

3.3. Deuterierte Proben

3.3.1. Hintergrund & Fragestellung

Wenn in einem Protein die meisten Protonen durch Deuterium ersetzt werden, können sich für DNP-Experimente drei Vorteile ergeben:

1. Es ist zu erwarten, dass die Polarisierung der Protonen durch DNP stärker ist als in vollständig protonierten Proben, da ein Elektron weniger Protonen polarisieren muss. Aus dem gleichen Grund sind bei Standard-Lösungsmitteln für die DNP nur 10 % des Volumens protoniert [42] (siehe auch Seite 15).
2. Die Abstände der restlichen Protonen zueinander sind deutlich größer als in vollständig protonierten Proben. Dadurch ist ihre homonukleare dipolare Kopplung nur schwach, es sind kaum Protonennetzwerke vorhanden und die Spektren lassen sich ohne starke Entkopplungen messen.
3. Die quadrupolare Kopplung der Deuteronen ist relativ klein (100–200 kHz) und ermöglicht zusätzliche Untersuchungen. So lässt sich z.B. ohne MAS aus der Signalform von CD_2 und CD_3 Gruppen deren Dynamik ablesen [1].

Auf der anderen Seite lassen sich deuterierte Kohlenstoffe in solchen Proben mit $\text{H-}^{13}\text{C}$ CP-Experimenten nur indirekt messen. Selbst wenn sich die Deuteronen selbst anregen lassen, so erlauben moderne Probenköpfe dies nur mit relativ schwachen Amplituden.

Erste Ergebnisse mit deuterierten SH3-Proben bestätigen, dass sich größere DNP-Verstärkungsfaktoren erreichen lassen. Diese und weitere Untersuchungen, z.B. an deuterierten Silikon-Polymeren, wurden von Akbey et al. veröffentlicht [46, 182, 183, 204, 205]. Im Folgenden werden nur die für diese Arbeit wichtigen Aspekte herausgegriffen: Wie viel größer sind die Verstärkungsfaktoren und welche Signale lassen sich messen? Sind die Linien schmäler als in protonierten Proben? Lassen sich durch die größeren Verstärkungsfaktoren DNP-Experimente bei höheren Temperaturen durchführen, die eine bessere Auflösung zeigen als Spektren bei kryogenen Temperaturen?

3.3.2. Ergebnisse & Diskussion

DNP-Verstärkungsfaktoren mit deuterierten Proteinen

Als Modellsystem dient SH3, das vollständig deuteriert exprimiert wurde. Anschließend wurden unterschiedliche Anteile derjenigen Deuteronen durch Protonen ersetzt, die mit dem Lösungsmittel im Austausch stehen. Dies sind vor allem die ND und COOD der

Haupt- und Seitenketten. Dazu wurde das Protein in Lösungsmitteln mit entsprechenden Protonen-Anteilen gewaschen. SH3 mit einem Austausch von 50 % dieser Deuteronen (SH3_{D50}) zeigt DNP-Verstärkungen (ϵ) von 140–148 bei direkter Anregung der Kohlenstoffe und 120–145 in $\text{H-}^{13}\text{C}$ CP-Experimenten (ϵ der Protonen). In einer vollständig protonierten Probe (SH3_H) sind die entsprechenden Werte deutlich kleiner (~ 9 und ~ 31 ; siehe Diagramm in Abbildung 3.13).

Verstärkungsfaktoren bei intermediärer Temperatur

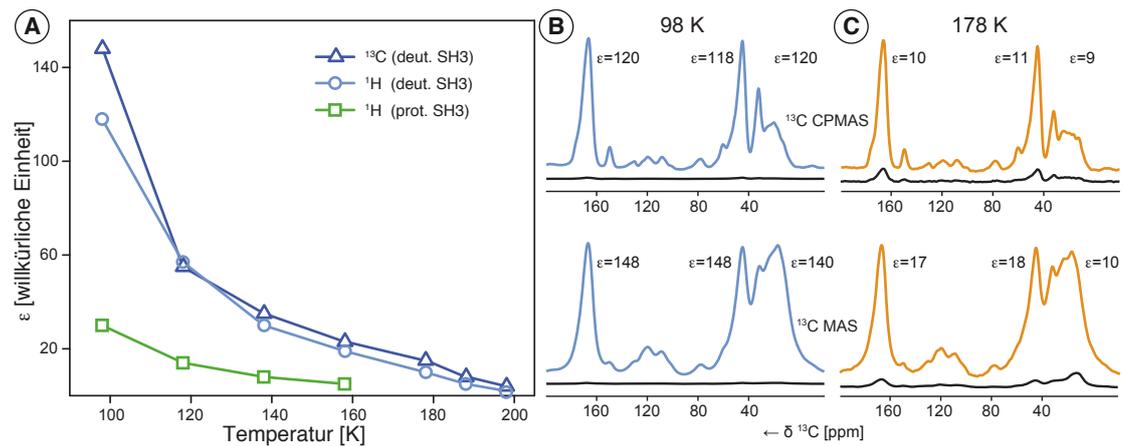


Abbildung 3.13.: A. Gemessene DNP-Verstärkungsfaktoren von protoniertem und deuteriertem SH3 bei Temperaturen zwischen 98 K und 198 K. Auf der rechten Seite finden sich die entsprechenden 1D $\text{H-}^{13}\text{C}$ CP-Spektren von deuteriertem SH3 bei 98 K (B.) und 178 K (C.), oben mittels $\text{H-}^{13}\text{C}$ CP und unten mittels direkter ^{13}C -Anregung gemessen. Schwarz sind jeweils die Spektren ohne Mikrowellen-Bestrahlung dargestellt und die gemessenen Verstärkungsfaktoren stehen bei dem jeweiligen Signal. Bei der deuterierten Probe wurden 50 % der austauschbaren Deuteronen durch Protonen ersetzt.

Mit zunehmender Proben­temperatur nimmt die gemessene DNP-Verstärkung deutlich ab, besonders weil die Elektronenspins schneller relaxieren (siehe auch Abschnitt 1.4 auf Seite 10). Um dies zu quantifizieren, wurden 1D ^{13}C Spektren von SH3_{D50} und vollständig protoniertem SH3 (SH3_H) bei Temperaturen zwischen 100 und 200 K gemessen (Abbildung 3.13). Ein Anstieg um 20 K resultiert in einer Abnahme von ungefähr 30–40 % des Verstärkungsfaktors. Demzufolge ist mit einer vollständig protonierten Probe (SH3_H) bei 160 K die DNP-Verstärkung zu klein, um signifikant das S/N gegenüber Raumtemperatur-Messungen zu erhöhen. Da ϵ bei SH3_{D50} deutlich größer ist, lassen sich bis ungefähr 200 K DNP-Messungen durchführen.

Ein Vergleich der 1D Spektren mit ^{13}C -Anregung und mit einem $\text{H-}^{13}\text{C}$ CP-Schritt ist für 98 und 178 K rechts in Abbildung 3.13 dargestellt. Die gemessenen Verstärkungen der

SH3_{D50} Signale sind bei 178 K in derselben Größenordnung wie bei SH3_H und kryogenen Temperaturen (~ 11 für H; ~ 18 für ^{13}C).

2D Spektren bei intermediärer Temperatur

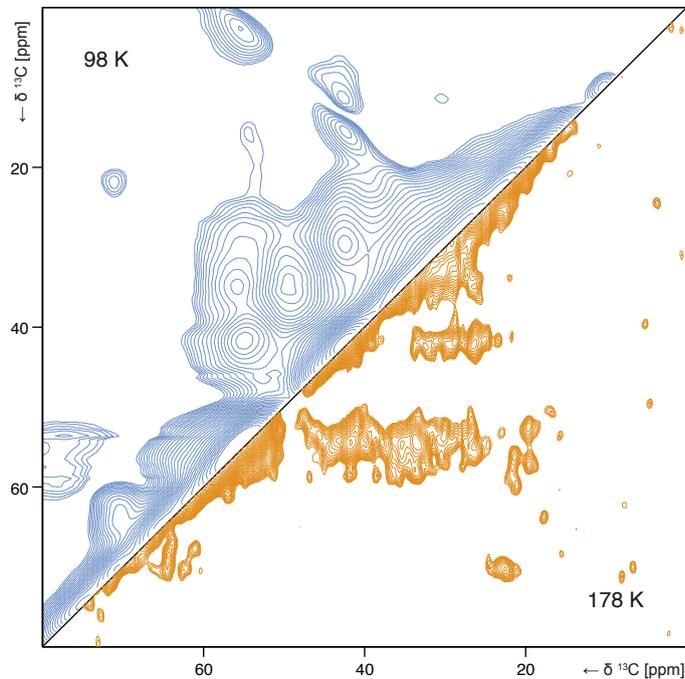


Abbildung 3.14.: Vergleich von 2D ^{13}C - ^{13}C PDS-Spektren bei 98 K und 178 K von deuteriertem SH3. 50 % der austauschbaren Deuterone wurden durch Protonen ersetzt

Wie in Abschnitt 3.1 auf Seite 45 beschrieben, nimmt die Auflösung der Spektren bei steigender Temperatur zu, da die Dynamik von Hydrationswasser und Protein größer ist. Das größere ϵ deuterierter Proben erlaubt es, einen Kompromiss zu finden zwischen ausreichender DNP-Verstärkung und einer besseren Auflösung bei höheren Temperaturen.

Ein 2D ^{13}C - ^{13}C Spektrum der SH3_{D50} Probe bei 178 K (orange in Abbildung 3.14) zeigt deutliche Unterschiede zu dergleichen Messung bei 98 K (blau). Die Signale sind deutlich schmaler und damit besser aufgelöst als bei 98 K. Die meisten Seitenketten sind bei 178 K beweglicher – die Übergangstemperatur des Hydrationswassers liegt anscheinend bei 170 K [98] – und die schwächere inhomogene Verbreiterung führt wahrscheinlich zu aufgelösten Signalen. Wie bei deuterierten Proben zu erwarten ist die Zahl der Kreuzsignale allerdings kleiner als bei Messungen einer protonierten Probe bei Raumtemperatur (RT), wodurch auch Überlappungen vermindert sein können.

Abbildung 3.15 auf der nächsten Seite zeigt im Detail den Bereich der Alanin-Signale,

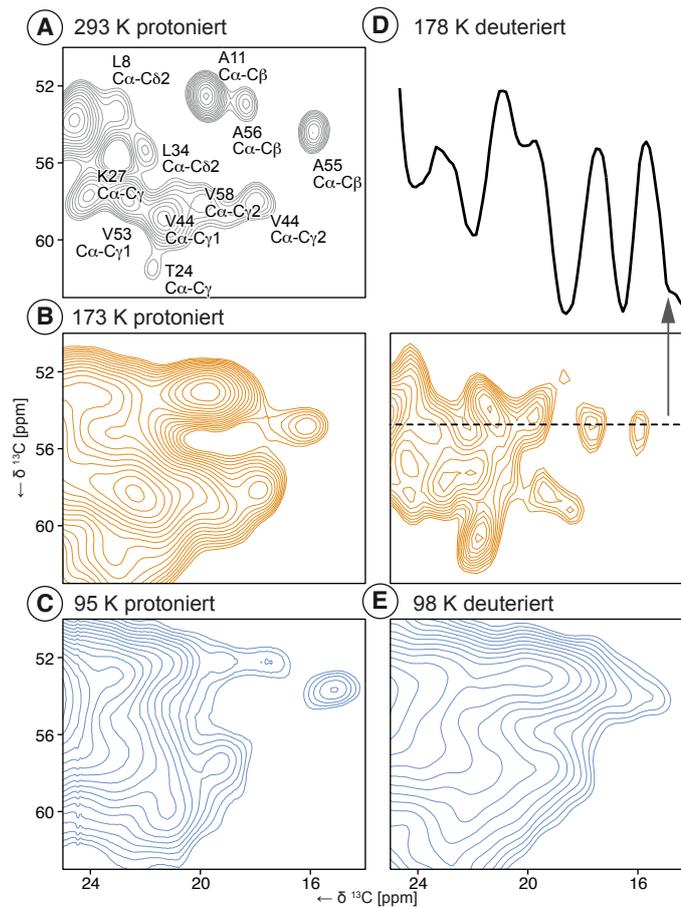


Abbildung 3.15.: Die Alanin-Region in 2D ^{13}C - ^{13}C PDSD-Spektren von protoniertem (**A.-C.**, ohne Glycerol, TP und DNP) und deuteriertem SH3 (**D.**, **E.**, mit Glycerol, TP und DNP). **A.** zeigt die Auflösung bei Raumtemperatur und **C.** und **E.** die inhomogen verbreiterten Signale bei 95 bzw. 98 K. In **D.** ist zusätzlich ein 1D Schnitt durch das Spektrum bei der gestrichelten Linien dargestellt. Die deuterierte Probe wurden mit 20 mM TOTAPOL und 50 ms Mischzeit aufgenommen, die protonierte Probe mit 10 ms Mischzeit. Alle Spektren sind mit GM (-20 Hz , 0,08) und QS (SSB 2) prozessiert.

links der vollständig protonierten Probe (ohne DNP und TP) und rechts von SH3_{D50} (mit DNP und TP). Bei unter 100 K sind die Signale sehr breit und überlappen sich. Das Spektrum der deuterierten Probe (**E.**) erscheint noch breiter als das von SH3_H (**C.**), wahrscheinlich als Folge der TP-Zugabe (siehe auch Abschnitt 3.2 auf Seite 59). Ein anderes Bild zeigt sich bei der gewählten intermediären Temperatur von 178 K. Während bei SH3_H sich nur einzelne Signale aus dem Überlappungsbereich lösen (**B.**), sind bei SH3_{D50} viele Signale aufgelöst (**D.**). Dies Spektrum ähnelt den schmalen Linien bei RT (mit SH3_H gemessen, **A.**). Zum Beispiel sind alle drei Alanin C α -C β Signale aufgelöst,

während im protonierten Fall A11 und A56 unterhalb von 253 K zu einem Signal verschmelzen. Dass SH3_{D50} schmalere Signale bei 178 K zeigt als SH3_H, ist vermutlich auf die DNP-Verstärkung der Signale oder die schwächere dipolare Kopplung der Protonen zurückzuführen.

Im Vergleich zu RT-Messungen lassen sich bei 178 K drei Signaltypen unterscheiden:

1. Viele Signale erscheinen bei dergleichen chemischen Verschiebung wie in RT-Experimenten, z.B. T24 C α -C γ oder A55 C α -C β .
2. Andere Signale fehlen, wahrscheinlich aufgrund ihrer Dynamik, die dem Zeitfenster der Messung ähnelt (siehe auch Abschnitt 3.1 auf Seite 45) oder wegen der Deuterierung der Probe, z.B. T32 und T37 C α -C γ .
3. Manche Signale erscheinen verschoben bezogen auf ihre chemische Verschiebung bei RT, z.B. A11 und A56 C α -C β (Abbildung 3.15).

Die Messung bei 178 K liegt in einem Temperaturbereich, in dem sich die Dynamik der Hydrationshülle und der Seitenketten verändert. Je nach der individuellen Lage einzelner Seitenketten und ihrer Umgebung sind sie unterschiedlich beweglich. Wahrscheinlich sind die beobachteten Verschiebungen hierauf zurückzuführen.

Tabelle 3.3.: Linienbreiten in halber Höhe von deuteriertem und protoniertem SH3 bei verschiedenen Temperaturen. Das SH3_H wurde ohne Radikal und ohne Mikrowelle gemessen (wie in Abschnitt 3.1 auf Seite 45). Die Spektren wurden mit Aufzeichnungszeiten von 10 und 5 ms aufgenommen und mit GM (−20 Hz, GB 0,08) und QS (SSB 2) prozessiert. Die Werte in Klammern wurden mit 25 und 10 ms aufgenommen und ohne wertende Funktion verarbeitet.

Probe	Temperatur [K]	ϵ ¹ H	ϵ ¹³ C	Linienbreite [ppm]	
				T37 C β -C α	A55 C α -C β
SH3 _H ; kein DNP	98	-	-	4,6	3,2
SH3 _{D50}	98	120	148	4,2	5
SH3 _H ; kein DNP	173	-	-	3,4	3,2
SH3 _{D50}	178	9–11	10–18	2,8	1,2
SH3 _H ; kein DNP	278	-	-	1,3 (0,6)	1,1 (0,7)

Um die Auflösung der Spektren zu vergleichen, wurden die Linienbreiten von Kreuzsignalen bestimmt. Die Werte von T37 und A55 sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Dabei entsprechen die Linienbreiten von SH3_H bei RT (1,1–1,3 ppm) bei optimaler Prozessierung Werten von 0,6–0,7 ppm. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden indes alle Spektren gleich prozessiert. Dieselbe Probe ergibt bei 98 K deutlich verbreiterte Signale

mit Linienbreiten zwischen 3 und 5 ppm (vgl. Abschnitt 3.1 auf Seite 45). Das SH3_{D50} zeigt bei dieser Temperatur etwas breitere Linien zwischen 4 und 5 ppm, wahrscheinlich ein Effekt des TP (siehe auch Abschnitt 3.2 auf Seite 59).

Bei der intermediären Temperatur von 178 K sind die Signale beider Proben deutlich schmaler. Mit SH3_H ist dieser Effekt etwas weniger ausgeprägt, die Linienbreiten sind knapp über 3 ppm. Bei der deuterierten Probe hingegen lassen sich Signale von nur 1,2 ppm messen. Die 2D Spektren wurden dabei in weniger als 9 Minuten mit nur 4 Experimenten in der direkten Dimension aufgenommen, um die Möglichkeit von 3D Experimenten zu verdeutlichen. Mit mehr Experimenten und etwas veränderten Aufnahmeparametern lassen sich vielleicht noch schmalere Signale beobachten.

Die Linienbreiten hängen, wie bei kryogenen Temperaturen auch, von der jeweiligen Seitenkette ab. Dies spricht dafür, dass bei 178 K die Dynamik der einzelnen Seitenketten und des Hydrationswassers, abhängig von der Umgebung, noch sehr unterschiedlich ist.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass es immer vorteilhaft wäre, deuterierte Systeme zu untersuchen. Mit dem Fokus auf Verstärkungsfaktoren und Linienbreiten ist das sicher richtig. Für biologische Systeme sollten andere Aspekte nicht außer Acht gelassen werden:

1. Durch die Deuterierung lässt sich mittels H-C CP nur ein Teil der Kohlenstoffe detektieren.
2. Wenn mit D-C CP gemessen wird, ist die gemessene Signalstärke nur ein Bruchteil verglichen mit H-C CP-Messungen; vor allem weil moderne Probenköpfe nicht auf starke Deuterium-Pulse ausgelegt sind.
3. Selbst mit einem Doppel-CP von H auf D und anschließend von D auf ^{13}C ist die Signalintensität nur ca. 10% verglichen mit H-C CP-Spektren. Die DNP-Verstärkung bei 178 K kompensiert diesen Unterschied, die Sensitivität der Messung ist dann allerdings ähnlich wie bei RT ohne DNP.
4. Es ist nicht immer möglich oder sehr kostenintensiv deuterierte Proben großer biologische Systeme herzustellen, von denen sich häufig nur sehr kleine Ausbeuten erhalten lassen.

Nichtsdestotrotz können deuterierte Proben in vielen Fällen hilfreich sein. Der Versuch DNP-Messungen bei höheren Temperaturen durchzuführen wird intensiv auch von anderen Arbeitsgruppen unternommen (siehe Abschnitt 1.4.4 auf Seite 18) – ein Erfolg hätte sicherlich eine große Zukunft.

3.4. Neurotoxin II an nikotinerger Acetylcholinrezeptoren

3.4.1. Hintergrund & Fragestellung

Ein System aus nikotinerger Acetylcholinrezeptoren in Membranen (nAChR; aus *Torpedo californica*) und ^{13}C , ^{15}N markiertem α -Neurotoxin II (NTII; aus *Naja naja oxiana*) wurde am FMP schon mittels konventioneller ssNMR untersucht. Daraus resultierte eine Zuordnung der meisten NTII-Signale und erste Erkenntnisse über die Bindung des Liganden [171, 184]. Die Konzentration von nur ca. 20 nmol markiertem NTII in einem Rotor erforderte jedoch Messzeiten von über einer Woche für ein 2D Spektrum.

Eine Einführung in Acetylcholin und seine Rezeptoren, sowie die Struktur des NTII und seine Sequenz finden sich in Abschnitt 1.7 auf Seite 25.

Dies System wurde für die DNP-NMR aus folgenden Gründen ausgewählt:

1. Die Sequenz des NTII ist relativ kurz und die NMR-Signale sind über einen weiten Bereich der ^{13}C chemischen Verschiebung verteilt. Deshalb ist zu erwarten, dass selbst mit der in Abschnitt 3.1 auf Seite 45 untersuchten Verbreiterung der NMR-Signale durch die kryogenen Temperaturen noch Kreuzsignale detektiert werden können.
2. Durch die starke Bindung des Liganden an den Rezeptor ist ein Teil des Liganden nicht zugänglich für das Lösungsmittel und das enthaltene TP. Außerdem ist es unwahrscheinlich, dass TP Moleküle zwischen Ligand und Rezeptor gelangen. Eine Verschlechterung der Signale durch das TP, wie in Abschnitt 3.2 auf Seite 59 beschrieben, könnte also nur schwach ausgeprägt sein.
3. Durch die starke Bindung ist auch die Beweglichkeit der beteiligten Seitenketten eingeschränkt. Dies könnte die inhomogene Signalverbreiterung durch die kryogenen Temperaturen vermindern.

Es sollen folgende Fragen untersucht werden: Wie verhalten sich NMR-Signale von Membran-gebundenen Proteinsystemen bei kryogenen Temperaturen? Kann die erhöhte Sensitivität der DNP-Messungen die benötigte Messzeit deutlich verkürzen? Wie verhält sich TOTAPOL in einem solchen System? Was ist bei der Herstellung der Proben zu beachten im Unterschied zu gelösten oder kristallinen Analyten?

3.4.2. Ergebnisse & Diskussion

Untersuchung der Signalverstärkung

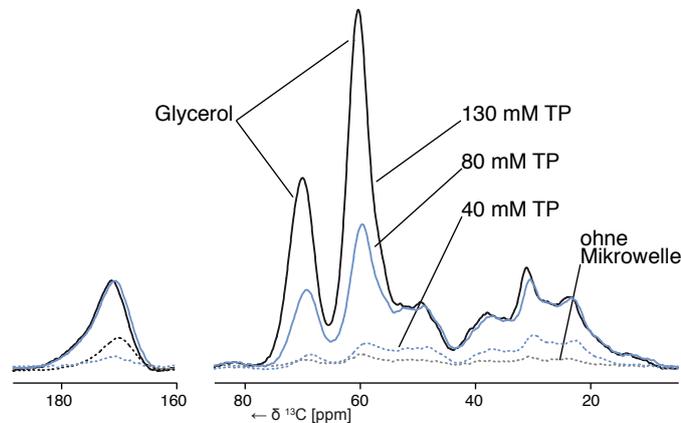


Abbildung 3.16.: 1D ^{13}C CP-Spektren von uniform ^{13}C , ^{15}N markiertem NT II an nAChR in Membranen. Unterschiedliche Konzentrationen von TP wurden vermessen und zeigen unterschiedliche Verstärkungsfaktoren. Bei der höchsten eingesetzten TP-Konzentration werden nur die Signale des Glycerols weiter verstärkt.

Zuerst wurde uniform ^{13}C , ^{15}N markiertes NT II an nAChR in Membranen vermessen (Abbildung 3.16). Die Zugabe von TOTAPOL (TP) auf eine Konzentration (c_T) von 40 mM ergab eine DNP-Verstärkung (ϵ) von 5 bei den Glycerolsignalen und 8 bei den Protein- und Lipidsignalen. Um den Effekt der c_T auf die Verstärkung zu untersuchen, wurde weiteres TP auf eine c_T von 80 mM dazugegeben (siehe auch Abschnitt 2.1.3 auf Seite 36). Dabei stieg ϵ auf 24 (Glycerol) und 20 (Protein/Lipid). Bei noch höherer c_T von insgesamt 130 mM wurde ϵ von Glycerol weiter auf 62 erhöht, wohingegen die Verstärkung von Protein- und Lipidsignal bei 21 blieb.

Die unterschiedlichen Verstärkungsfaktoren lassen auf eine Ungleichverteilung des TP schließen. Die Atomkerne direkt um das TP sind durch die PE nicht detektierbar (siehe auch Abschnitt 3.2 auf Seite 59), auf der anderen Seite nimmt der DNP-Effekt bei großen Distanzen ab. Es gibt also einen Abstand Kern zu TP, bei dem die Signale besonders gut verstärkt werden. Da bei kleinen c_T v.a. die Lipid- und Proteinsignale verstärkt werden, scheint das TP sich an ihnen anzulagern.

TP ist für ein organisches Molekül sehr wasserlöslich. Trotzdem verteilt es sich in einer Oktanol-Wasser-Mischung mehr in die Oktanolphase (siehe Abschnitt 1.4.3 auf Seite 16). Zusätzlich bieten die OH und NH Gruppen des TP Interaktionsmöglichkeiten für z.B. Wasserstoffbrücken. Andere Versuche an Zellen zeigten, dass TP nicht in Zellen diffundiert (Daten nicht gezeigt). Die hydrophilen Gruppen verhindern wahrscheinlich

ein Einlagern in Membranen. Zusammengenommen ist es wahrscheinlich, dass sich das TP an Proteinen und Lipiden anlagert. Bei hohen c_T sind dann die Oberflächen von Membranen und Proteinen gesättigt und zusätzliche TP-Moleküle verteilen sich vor allem im Lösungsmittel und verstärken dessen Signale. Diese Hypothese bestätigt sich durch die Beobachtung, dass die Glycerolsignale weiter verstärkt werden, wenn c_T von 80 auf 130 mM erhöht wird, während die Lipid- und Proteinsignalen unverändert bleiben.

Als nächstes wurde der Polarisations-Transfers untersucht. Dazu wurde die Zeit gemessen, die nach einer Kette von Pulsen, die die Polarisation der Kerne aufheben, mit der Mikrowelle bestrahlt werden muss, um die DNP-Polarisation wieder aufzubauen. An die gemessenen Integrale (I) wurden Funktionen nach

$$I = 1 - e^{-x/n} \quad (3.9)$$

angepasst. Dabei repräsentieren n die DNP-Aufbau-Zeit (T_{DNP}) und x die jeweilige Zeit zwischen Pulsreihe und Messung.

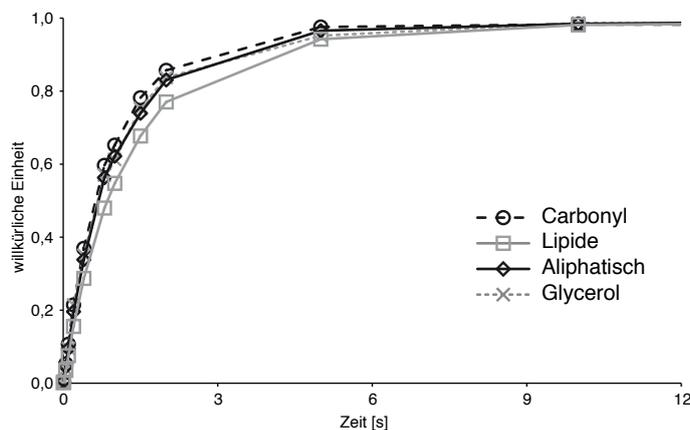


Abbildung 3.17.: Aufbau der DNP-Polarisation bei Protonen, gemessen durch die Integrale der angegebenen Bereiche in einem CP-Experiment. Die T_{DNP} ist für alle Bereiche der Probe relativ gleich.

Die Messwerte der Integrale finden sich für Protonen in Abbildung 3.17 und für Kohlenstoffe in Abbildung 3.18 auf der nächsten Seite. Die T_{DNP} der Protonen ist relativ kurz und für die verschiedenen Protonen fast gleich: Bei den Proteinsignalen beträgt die T_{DNP} 0,93 bis 1,03 s, bei den Glycerolsignalen 1,03 s und bei den Lipidsignalen ist sie etwas länger (1,28 s). Bei der Messung ist zu beachten, dass Kohlenstoffe detektiert werden und durch die CP die Polarisation von einem Proton auf verschiedene Kohlenstoffe übertragen werden kann. Da alle Zeiten sehr ähnlich sind hat die T_{DNP} bei CP-Experimenten, wie sie meist in der ssNMR verwendet werden, fast keinen Einfluss auf die Signale.

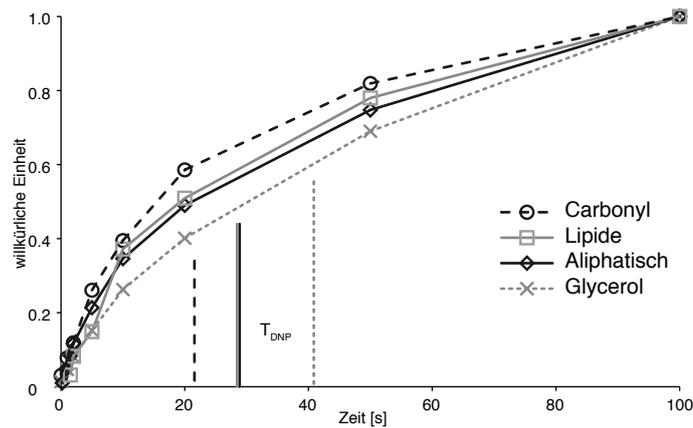


Abbildung 3.18.: Aufbau der DNP-Polarisation bei Kohlenstoffen, gemessen mittels direkter ^{13}C Anregung. Der Aufbau erfolgt für die Glycerolsignale am langsamsten.

Bei der direkten Anregung von Kohlenstoffen zeigen sich jedoch Unterschiede. Die CO Signale haben die kürzeste T_{DNP} von 21,6 s, bei den aliphatischen Signalen beträgt sie 28,9 s und bei den Lipidsignalen 28,5 s. Eine deutlich längere Zeit für die Übertragung benötigen die Glycerolsignale, nämlich 40,9 s. Diese Versuche wurden mit einer c_T von 40 mM durchgeführt und unterstützen die Hypothese von der Aufkonzentrierung der TP-Moleküle an Lipiden und Proteinen. So wird eine längere Zeit benötigt, um den DNP-Effekt auf das Glycerol im Lösungsmittel zu übertragen.

Dieser neue Effekt hat zweierlei Einfluss auf die DNP-Untersuchungen an Biomolekülen. Zum einen reichen relativ niedrige c_T , um den Analyten zu polarisieren, zum anderen werden die Signale der Lösungsmittel-exponierten Atome verstärkt durch PE beeinflusst.

2D Spektren nach der Präparation

2D Spektren des uniform ^{13}C markierten NT II an nAChR gebunden zeigen deutliche Ähnlichkeiten mit konventionellen ssNMR-Spektren. Jedoch ist bei niedrigen c_T die DNP-Verstärkung relativ klein und bei höheren c_T sind die Spektren deutlich verbreitert. Wie in Abschnitt 3.1 auf Seite 45 und Abschnitt 3.2 auf Seite 59 beschrieben, sind vor allem zwei Mechanismen für die Signalverbreiterung verantwortlich: Auf der einen Seite sind verschiedene Konformere bei tiefen Temperaturen ausgefroren und verbreitern inhomogen Signale, d.h. viele ähnliche Signale liegen unmittelbar nebeneinander. Auf der anderen Seite verbreitert das Radikal durch PE die Signale von Kernen in seiner Nähe. Das DNP-Spektrum in Abbildung 3.19 auf der nächsten Seite (blau) zeigt vor allem eine stark verbreiterte Autokorrelations-Diagonale neben sich überlappenden Signalen. Dies

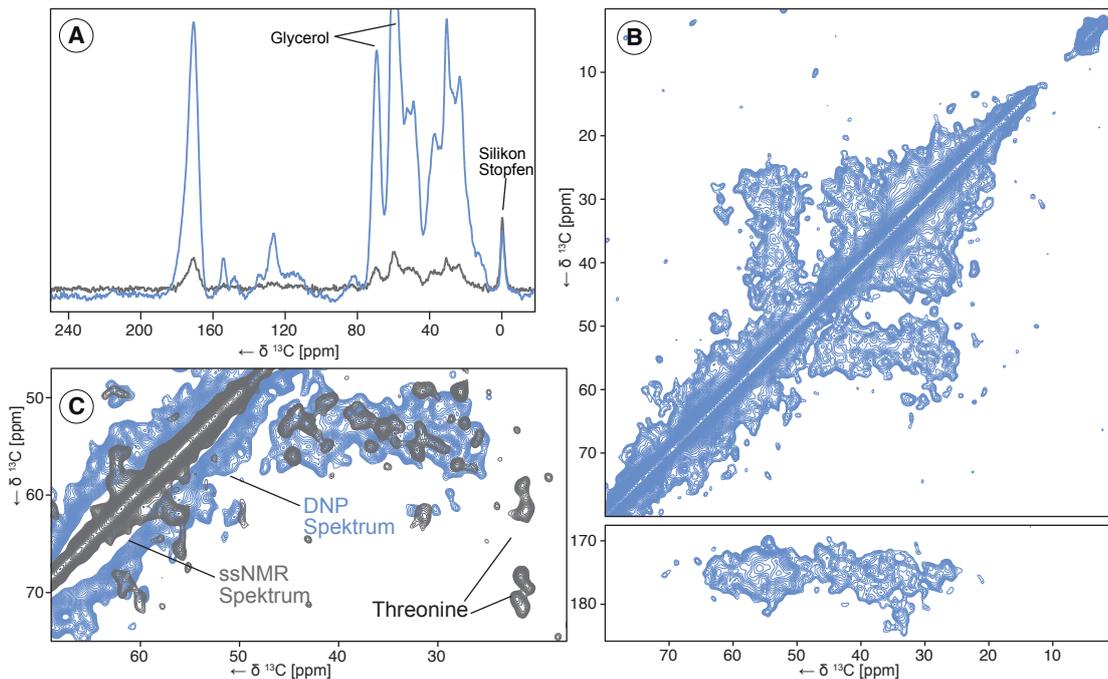


Abbildung 3.19.: 2D DNP-Spektrum von uniform markiertem NT II an nAChR. **A.** zeigt die DNP-Verstärkung mit und ohne Mikrowellenstrahlung, das Signal des Silikon-Stopfens wird nicht verstärkt und dient der Kontrolle. **B.** 2D ^{13}C - ^{13}C PSD-DNP-Spektrum, das die typische Linienverbreiterung zeigt. **C.** Überlagerung desselben mit einem konventionell aufgenommenen Spektrum (grau).

spricht gegen eine vor allem inhomogene Verbreiterung der Signal durch die kryogenen Temperaturen.

Auffällig ist außerdem, dass keine Threonin-Signale detektierbar sind, während bei konventionellen RT-Spektren deutliche Kreuzsignale von $\text{C}\alpha$ zu $\text{C}\gamma$ beobachtet werden (graues Spektrum in C, Abbildung 3.19). Dies kann verschiedene Gründe haben. Unter anderem ist die Dynamik der Methylgruppen bei tiefen Temperaturen stark verlangsamt. Sie kann sich im selben Zeitintervall abspielen wie die Entkopplung und mit dieser interferieren (bei SH3 ist dies allerdings nicht der Fall; siehe Seite 53). Dies wird wahrscheinlich dadurch gefördert, dass die meisten Threonine Lösungsmittel-exponiert sind. Auf der anderen Seite könnte die Nähe zum Lösungsmittel und damit zum TP die Signale durch die PE so stark verbreitern, dass sie nicht mehr detektiert werden.

Um die Anzahl der Signale und damit die Wahrscheinlichkeit von Überlappungen zu reduzieren, wurde als nächstes eine speziell markiert Probe vermessen. Durch die Expression mit Glycerol, das nur an seinem mittleren Kohlenstoff ($\text{C}2$) ^{13}C markiert ist, ergibt sich in Proteinen ein Markierungsmuster, bei dem folgende Kohlenstoffe mit mehr

als 50 % markiert sind: Isoleucin C β , C δ ; Leucin C β , C γ ; Lysin C α , C γ , C ϵ ; Prolin C β , C δ ; und Valin C α und C β (siehe [16]).

Equilibrierung der Proben bei 253 K

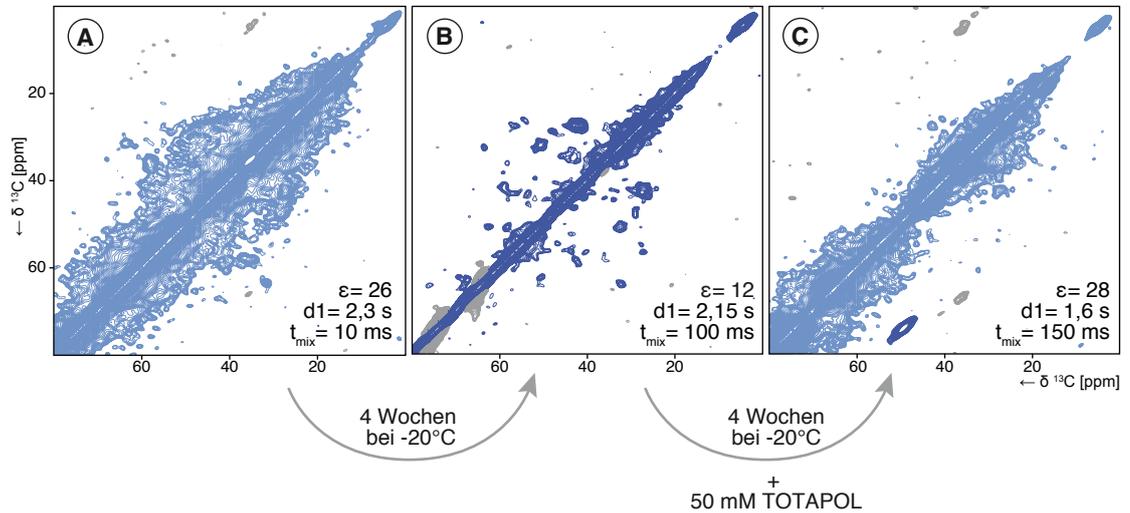


Abbildung 3.20.: Effekt der TP-Konzentration auf 2D DNP-Spektren von NT II. Spektrum **A.** wurde direkt nach der Probenherstellung aufgenommen. Nach vier Wochen Equilibrierung bei -20°C sind die Kreuzsignale deutlich besser aufgelöst, der Verstärkungsfaktor beträgt nur noch 12 (**B.**). Nach erneuter Zugabe von TP, wozu die Probe aufgetaut wurde, wird wieder ein verbreitertes Spektrum erhalten (**C.**).

Auch mit dieser [$2\text{-}^{13}\text{C}$]-Glycerol markierten Probe ist das Spektrum, das direkt nach der Probenherstellung gemessen wurde, ein typisches DNP-Spektrum, wie es für die meisten Proteinproben erhalten wurde. Die Diagonalsignale sind stark verbreitert und nur wenige Kreuzsignale lassen sich auflösen (Spektrum A in Abbildung 3.20).

Anders als bei Proben von Prolin oder SH3 mit ähnlichen c_T sank allerdings die gemessene DNP-Verstärkung während der Lagerung. Dies ist vermutlich die Folge einer Inaktivierung der TP Moleküle, wahrscheinlich einer Reduktion durch chemischen Reaktionen (siehe Seite 79). Zusätzlich könnten solche Reaktionen auch die relativ hohen Konzentrationen erklären, die nötig sind, um bei NTII Proben eine ausreichende Verstärkungen zu erreichen. Nach vier Wochen Lagerung bei -20°C war ϵ von 26 auf 12 gesunken, aber das aufgenommene Spektrum ist ungewöhnlich gut aufgelöst (Spektrum B in Abbildung 3.20). Es zeigt eine schmale Diagonale und Kreuzsignale, wie sie sonst nur bei RT erhalten werden.

Weitere vier Wochen Lagerung führten dazu, dass die gemessene Verstärkung nur noch 6 betrug. Deshalb wurden weitere 0,625 mmol TP zu der Probe gegeben, wozu die Probe

aufgetaut werden musste. Das anschließend gemessene Spektrum ist, wie nach der ersten Zugabe von TP, schlecht aufgelöst und zeigt eine breite Diagonale (Spektrum C in Abbildung 3.20 auf der vorherigen Seite).

Die Spektren sind – bis auf die in der Abbildung dargestellten Parameter – gleich aufgenommen. Die unterschiedlichen PDS-D-Mischzeiten scheiden als Ursache für die unterschiedliche Auflösung aus, da Spektrum C die gleiche Verbreiterung, besonders der Diagonalen, zeigt wie Spektrum A und weil Spektrum B, mit nur 50 ms Mischzeit aufgenommen, seine gute Auflösung behält. Als Ursache kommt also vor allem die beobachtete Abnahme der Verstärkung und damit eine abnehmende Konzentration aktiven Biradikals in Frage.

Verschiedene chemische Reaktionen können TP inaktivieren, abgesehen von der Möglichkeit der Auto-Reaktion zweier TP Moleküle. Für TEMPO sind unterschiedliche Reaktionen beschrieben: Bei Raumtemperatur sind vor allem SH-Gruppen von Cysteinen die Reaktionspartner. Unter Zusatz von kleinsten Mengen Katalysator, z.B. Metal-Ionen, reagiert TEMPO auch mit reinem Cystein [62]. Dabei scheinen oxidierte Formen der Thiolgruppe den Vorgang zu beschleunigen [206]. Aber auch Produkte der Lipidperoxidation, durch reaktive Sauerstoff-Spezies aus ungesättigten Fettsäuren entstanden, können zu einer Abnahme der aktiven Nitroxidradikale führen. Als letztes sind auch Produkte der Oxidation von Protein, z.B. Radikale aus Phenolen, mögliche Reaktionspartner [207].

Die Annahme, dass zum größten Teil Thiolgruppen von Cysteinen für die beobachtete TP-Inaktivierung verantwortlich sind, deckt sich mit weiteren Beobachtungen: In Proben von reinem Prolin oder SH₃, das kein Cystein enthält, ist über einen langen Lagerzeitraum von Jahren keine Abnahme zu beobachten. Bei NTII in nativen Membranen, wie in diesem Kapitel beschrieben, oder bei Präparationen von Proteinen in *E. coli* Membranen hingegen ist eine solche Abnahme ausgeprägt.

Das Spektrum B (Abbildung 3.20 auf der vorherigen Seite) ist in einer Detailansicht in Abbildung 3.21 auf der nächsten Seite gezeigt. Es ist ausgesprochen gut aufgelöst und erlaubt die Zuordnung von Spin-Systemen zu einzelne Seitenketten-Typen unter Zuhilfenahme der bekannten chemischen Verschiebungen. Verglichen mit einem konventionell aufgenommenen ssNMR Spektrum (bei 265 K; grau dargestellt in Abbildung 3.21), das in neun Tagen aufgenommen wurde, scheinen einige Signale sogar besser aufgelöst zu sein. Dabei betrug die DNP-Messzeit nur 14 Stunden. Zum Beispiel erscheinen alle vier erwarteten Prolin C δ -C β Kreuzsignale im DNP-Spektrum, während nur zwei mit konventioneller NMR bei RT detektiert werden (Abbildung 3.21; unten, Mitte). Wichtiger ist noch, dass die Zahl der beobachteten Signale nicht größer ist als die Anzahl der entsprechenden Seitenketten im Protein.

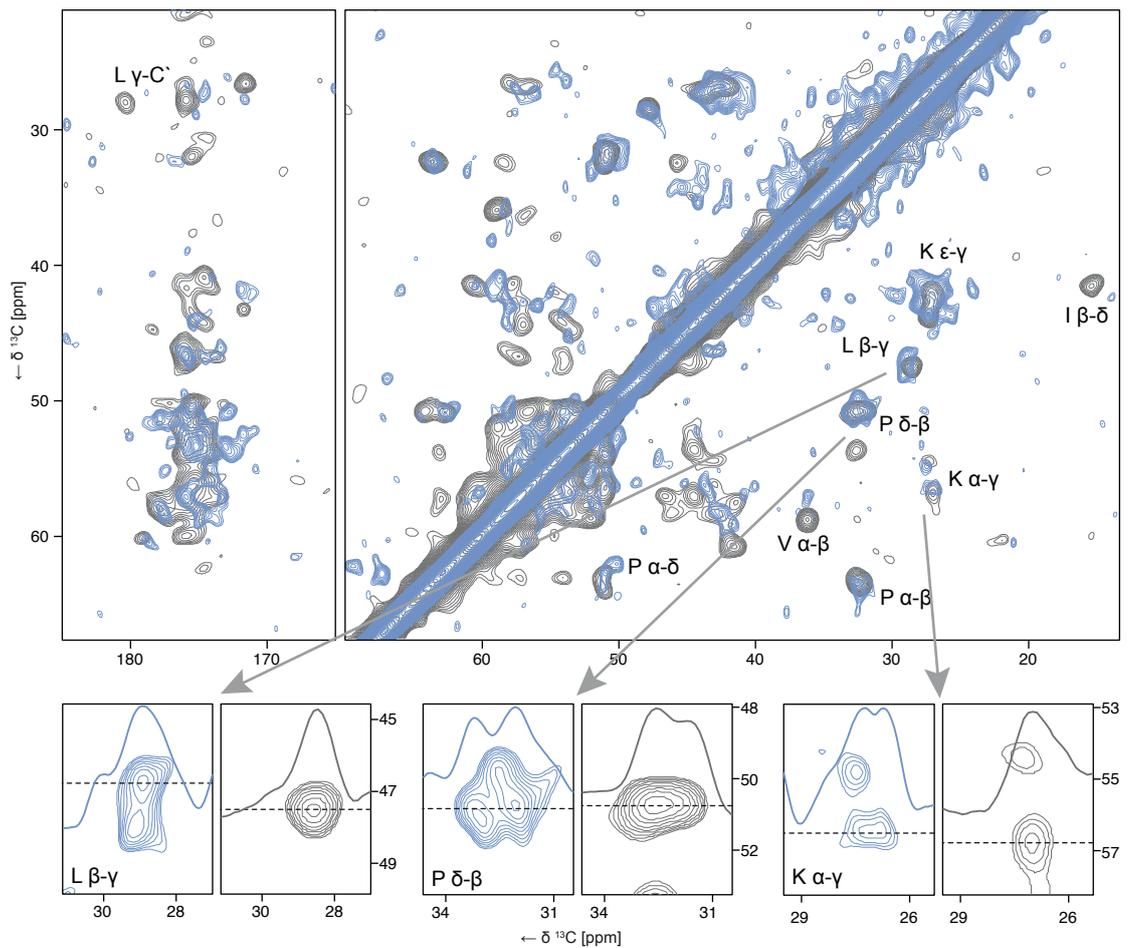


Abbildung 3.21.: Blau: Details des 2D DNP-Spektrums von $2\text{-}^{13}\text{C}$ Glycerol markiertem NT II (Ausschnitt aus B. in Abbildung 3.20 auf Seite 78). Grau: konventionell aufgenommenes Spektrum der gleichen Probe. Unten als Ausschnitte Leucin, Prolin und Lysin Kreuzsignale mit 1D Spektren, die an den gestrichelten Linien den 2D Spektren entnommen wurden.

Die Zuordnung der Signale erfolgte durch Vergleich mit Lösungs-NMR Spektren des freien NTII. Zunächst wurden in der bekannten Struktur alle C-C Paare identifiziert, die maximal 3 \AA voneinander entfernt und außerdem nach dem Glycerol-Markierungs-Schema mindestens zu 50% ^{13}C markiert sind. Bei den Schnittpunkten der zugehörigen chemischen Verschiebungen sind Signale zu erwarten. Eine Überlagerung mit dem aufgenommenen Spektrum (Abbildung 3.22 auf der nächsten Seite) zeigt eine deutliche Übereinstimmung und lässt eine Zuordnung der entsprechenden Seitenketten-Typen zu. Dies bestätigt, dass die gemessenen Signale von NTII stammen.

Die meisten detektierten Signale stammen von Seitenketten in der Bindungstasche

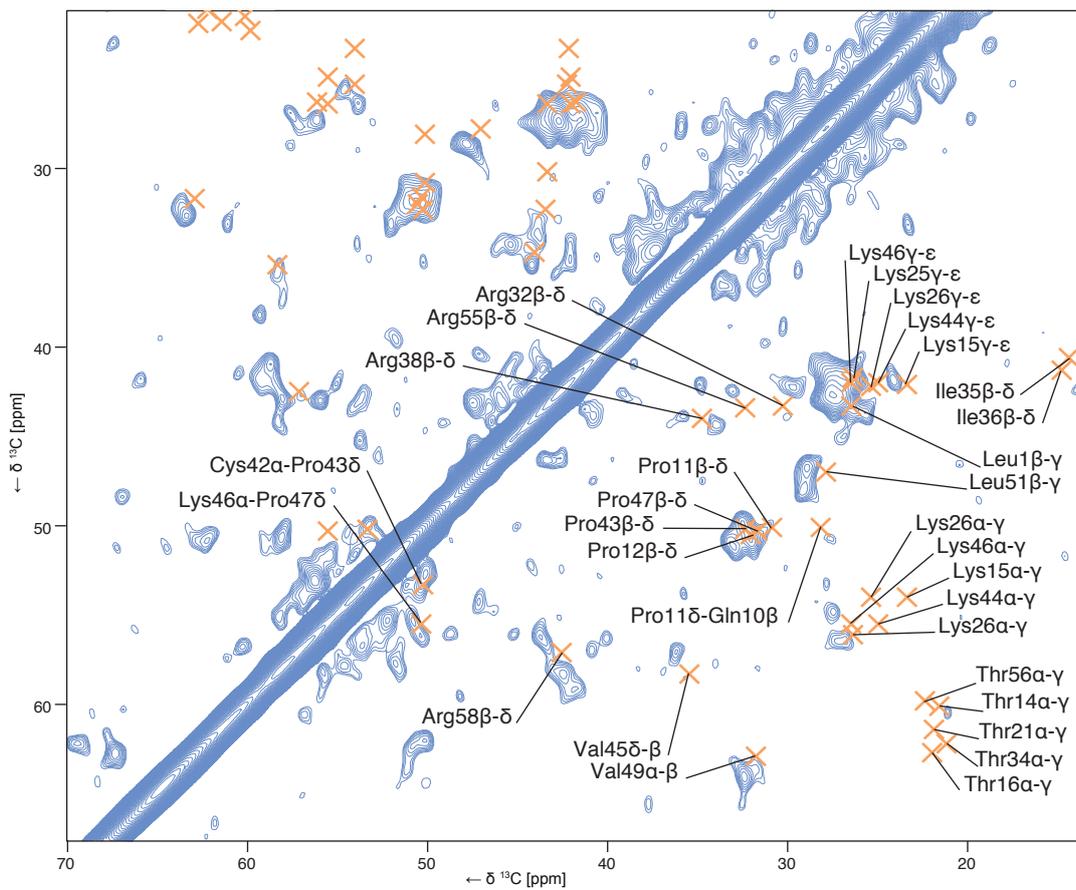


Abbildung 3.22.: Spektrum von 2- ^{13}C Glycerol markiertem NT II (blau, siehe B. in Abbildung 3.20 auf Seite 78) und die zu erwartenden, simulierten Signale (orangefarbige Kreuze), die mit Kenntnis der chemischen Verschiebung der konventionellen Messungen und mit Hilfe der Struktur von NTII ermittelt wurden (siehe Text).

des Rezeptors (siehe Abbildung 1.7 auf Seite 29). Das ist wahrscheinlich der Grund, warum ihre Signale kaum inhomogen verbreitert sind: Sie sind in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt und nur wenige verschiedene Konformationen sind für einzelne Seitenketten möglich (im Gegensatz zu den Ergebnissen mit SH3 aus Abschnitt 3.1 auf Seite 45). Die in der Fragestellung geäußerte Vermutung, dass eine starke Bindung des Liganden an den Rezeptor nur eine schwache inhomogene Verbreiterung zulässt, erweist sich also als richtig.

Aus den vorhergegangenen Betrachtungen lässt sich eine Hypothese ableiten, um die Verbesserung der Auflösung durch die Lagerung zu erklären (schematisch dargestellt in Abbildung 3.23 auf der nächsten Seite): Während der Lagerung bei -20°C sind chemische Reaktionen, wie eine Reduktion des TPs durch Thiolgruppen, in der Hydrationshülle um

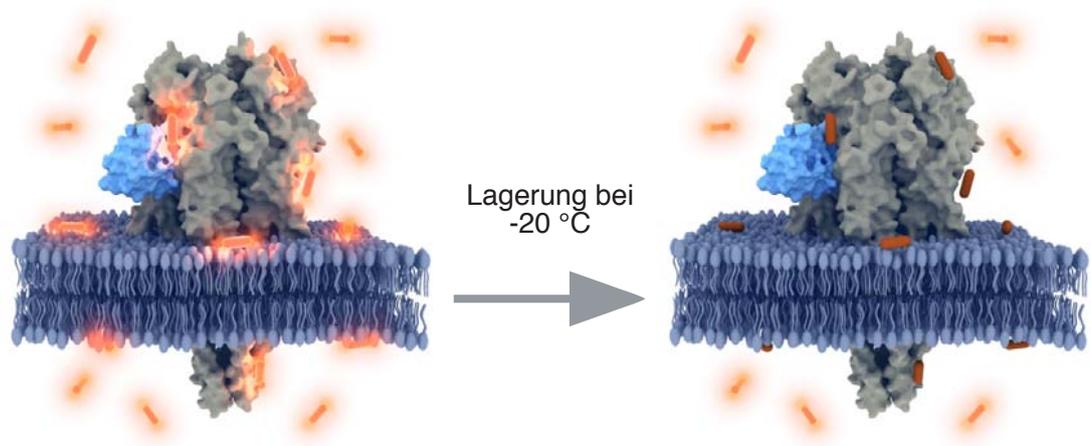


Abbildung 3.23.: Illustration der Hypothese zur Verbesserung der DNP-Auflösung. Die TP-Moleküle (orange) reagieren bei der Equilibrierung mit Probenbestandteilen an den Oberflächen und nur TP-Moleküle im Lösungsmittel bleiben aktiv (leuchten).

Proteine oder an Membran-Oberflächen verlangsamt, aber möglich. Das Hydrationswasser ist noch beweglich und enthält kaum Glycerol (Abschnitt 1.6 auf Seite 21). Deshalb nimmt die Konzentration DNP-aktiven TPs langsam mit der Zeit ab. Auf der anderen Seite ist eine Diffusion der TP-Moleküle aus dem glasartigen Lösungsmittel zu diesen Oberflächen, verstärkt durch die Zugabe des Glycerols (Schmelzpunkt von 18°C), vernachlässigbar. Demzufolge ist nur inaktiviertes TP in der Nähe der Analyten und unerwünschte Effekte, wie PE, haben keinen Einfluss auf die gemessenen Signale. Die noch aktiven Biradikale im Lösungsmittel sind hingegen noch in der Lage eine ausreichende DNP-Verstärkung zu gewährleisten.

Weitere Proben

Um diese Hypothese zu stützen, wurden weitere Experimente durchgeführt: Direkt nach dem Spektrum B (Abbildung 3.21 auf Seite 80) wurde ein weiteres Spektrum mit kürzerer PDS-Mischzeit von 50 ms aufgenommen und ist ebenfalls gut aufgelöst (Daten nicht gezeigt). Die gesamte Prozedur der Probenherstellung und -lagerung wurde mit einer Probe von [1,3-¹³C] Glycerol markiertem NTII wiederholt. Es zeigte sich genau derselbe Effekt: ϵ nahm nach einer Lagerzeit bei -20°C ab, aber die Spektren sind deutlich besser aufgelöst (siehe Abbildung 3.24 auf der nächsten Seite).

Um nur den Effekt der kryogenen Temperaturen zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Probe ohne TOTAPOL bei 100 K gemessen (Abbildung 3.25 auf der nächsten Seite). Durch die fehlende Verstärkung sind, wie zu erwarten, kaum Kreuzsignale detektierbar.

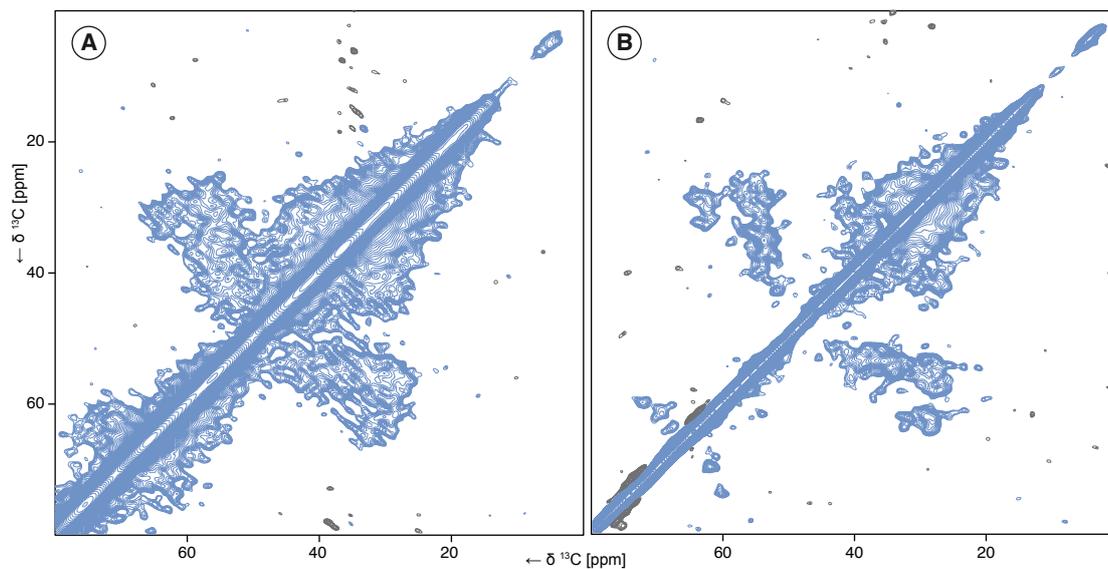


Abbildung 3.24.: 2D DNP-Spektren von $[1,3-^{13}\text{C}]$ Glycerol markiertem NTII nach der Präparation (A.) und nach Equilibrierung (B.). Auch mit dieser Probe lassen sich so aufgelöste Spektren erhalten.

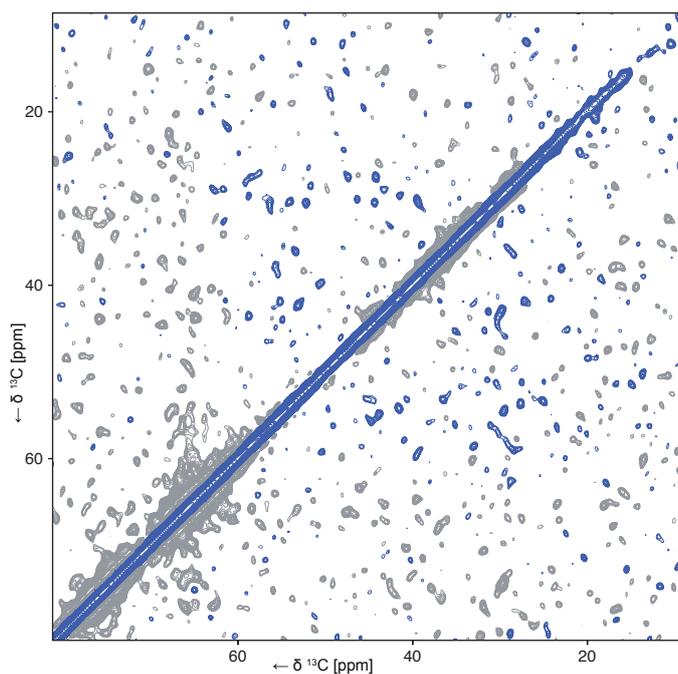


Abbildung 3.25.: 2D Spektrum von NTII bei 100 K ohne Biradikal. Durch die fehlende DNP-Verstärkung sind keine Kreuzsignale detektierbar. Die Diagonalsignale zeigen keine Verbreiterung.

Doch die Signale, die wahrscheinlich schwache Kreuzsignale sind, erscheinen schmal. Vor allem ist die Diagonale nicht verbreitert. Diese Beobachtungen sind ein weiteres Indiz dafür, dass vor allem die Zugabe von Radikalen und nicht eine inhomogene Verbreiterung durch Tieftemperaturen die Hauptursache für die beobachteten breiten Linien ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Auch bei Membranproteinen in ihrer natürlichen Umgebung ist eine DNP-Messung schwierig. Die Linien erscheinen zunächst sehr breit und es lassen sich kaum Signale ihren Kernen zuordnen. Während der Lagerung kann TP mit Bestandteilen der Probe reagieren und wird inaktiviert. Durch Einfrieren der Probe lässt sich eine Diffusion des aktiven TP aus dem Lösungsmittel zum Protein verhindern. So können die negativen Effekte direkt um das TP bei dennoch ausreichender Signal-Verstärkung vermieden werden. Unter diesen Umständen lassen sich Spektren messen, die genauso aufgelöst sind wie bei RT. Außerdem zeigt sich, dass eine inhomogene Verbreiterung durch kryogene Temperaturen für Seitenketten, die an der Bindung zum Rezeptor beteiligt sind, vernachlässigbar ist. In diesem Fall kann die DNP-Technik die Aufnahme von Spektren stark beschleunigen, wenn nicht sogar erst möglich machen. Dafür ist allerdings die Zusammensetzung der Probe entscheidend.

4. Allgemeine Diskussion und Ausblick

Die nachfolgende Diskussion orientiert sich an der in Abschnitt 1.8 formulierten Fragestellung und stellt die Ergebnisse dieser Arbeit dabei in den Kontext der aktuellen Forschung. Vor allem wird jedoch auf Basis der neugewonnenen Erkenntnisse ein Ausblick auf mögliche Entwicklungen in der Zukunft geworfen.

Im ersten Abschnitt der Diskussion steht der Einfluss der Temperatur auf die Qualität der NMR-Spektren im Mittelpunkt. Die Auswirkungen der zugegebenen Radikale behandelt der zweite Abschnitt. Im letzten Abschnitt wird zusammenfassend diskutiert, ob und wie DNP-NMR für die Strukturaufklärung von Membranproteinen geeignet ist.

4.1. Temperatur

DNP-Messungen an Festkörpern werden fast immer bei kryogenen Temperaturen durchgeführt [42, 44, 48, 51, 175]. Dadurch ist die Relaxation der Elektronenspins verlangsamt und erlaubt einen effizienteren Transfer der Polarisation von Elektronen auf Atomkerne. Versuche den DNP-Effekt bei Raumtemperatur zu nutzen, zeigen meist sehr kleine Verstärkungsfaktoren. Nur in wenigen Fällen wurden Faktoren von über 10 gemessen, so z.B. mit photochemisch induzierter DNP [70]. Dabei lassen Laser kurzzeitig und lokal Radikale in der Probe entstehen und ein DNP-Experiment wird möglich.

Ein weiteres Problem von DNP-Experimenten bei solch hohen Temperaturen ist die Absorption der Mikrowellenstrahlung durch die Wassermoleküle des Lösungsmittels. Mit konventionellen Kühleinheiten lässt sich ein Erhitzen der Probe und damit eine Denaturierung der Proteine nicht verhindern. Nur durch den Einsatz sehr kleiner Probenvolumina kann dieser Effekt vermieden werden [72] und DNP-Messungen bei Raumtemperatur werden möglich. Diese elegante Lösung kann allerdings die Sensitivität im Vergleich zu konventioneller ssNMR durch die sehr kleine Probenmenge nicht steigern (verglichen mit den Rotoren, die in dieser Arbeit verwandt wurden, ist das Volumen um einen Faktor von mehr als 300 kleiner).

Versucht man den besseren Polarisationstransfer und die bessere Kühlung der Probe bei kryogenen Temperaturen mit Messungen bei Raumtemperatur zu kombinieren, ergeben sich weitere Schwierigkeiten. Die Probe muss sehr schnell aufgetaut werden, z.B.

mit einem Laser oder mit Dampf, und dann ist nur eine Messung bei Raumtemperatur möglich. Ein ständiges Einfrieren und Auftauen der Probe ist dabei ein große thermische Belastung für Proteine.

Bei dieser Schmelz-DNP wie auch bei der oben beschriebenen photochemisch induzierten DNP ist nur jeweils ein Experiment bei Raumtemperatur möglich. Mit einzelnen Experimenten ist es aber sehr schwierig, strukturelle Daten zu gewinnen. Erst in mehrdimensionalen Spektren lassen sich die Signale von Proteinen einzelnen Atomen zuordnen und Abstandsinformationen gewinnen.

Aus all diesen Gründen ist nach heutigem Stand der Forschung DNP-NMR bei Tieftemperaturen am besten geeignet, um Proteinstrukturen zu untersuchen. Die kryogenen Temperaturen haben jedoch einen großen Einfluss auf die Spektren. Wie in Abschnitt 3.1 gezeigt wurde, sind die Signale vor allem inhomogen verbreitert, und dadurch verschlechtert sich die Auflösung und Interpretierbarkeit der Spektren. Diese Verbreiterung hängt von der jeweiligen Seitenkette und ihrer Umgebung ab. Sie ist z.B. ausgeprägter bei Seitenketten, die Lösungsmittel-exponiert und in einem flexiblen Teil des Proteins sind.

Die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen der Signale erstrecken sich dabei kontinuierlich über einen großen Temperaturbereich. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen mit anderen Methoden, die während des Einfrierens von Proteinen eine markante Veränderung der gemessenen Daten in einer bestimmten Temperaturspanne zeigen (vgl. Abschnitt 1.6). Dieser Unterschied kann den verschiedenen Zeitfenstern der Methoden geschuldet sein. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass andere Methoden, z.B. Messungen mit dynamischer Neutronenstreuung, nur die gemittelte Dynamik des gesamten Moleküls messen und nicht die Dynamik einzelner Seitenkettenatome. Dann würde die als Glasübergang des Proteins gemessene Temperatur dem Durchschnitt aller einzelnen Übergangstemperaturen der unterschiedlichen Atome entsprechen. Bei den gezeigten Daten mit SH3 (Abschnitt 3.1) ist dieser Durchschnitt 213 K, was im Bereich der meistens gemessenen Glasübergangstemperaturen liegt (zwischen 200 und 220 K, vergleiche Abschnitt 1.6). In jedem Fall hat ein allgemeiner Glasübergang des Proteins keinen deutlichen Einfluss auf die NMR-Spektren.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, sind die Signale, abhängig von der individuellen Umgebung des Atoms, bei kryogenen Temperaturen inhomogen verbreitert. Sie spiegeln also die verschiedenen Konformationen eines Moleküls auf atomarer Ebene wieder. Folglich enthalten die Signal-Ansammlungen in solchen Tieftemperatur-Spektren deutlich mehr Informationen als aufgelöste Signale in Raumtemperatur-Spektren. Letztere repräsentieren nur das dynamische Mittel der möglichen Konformationen eines Moleküls. Wäre es möglich die Informationen bei kryogenen Temperaturen zu interpretieren,

könnten Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Konformere und ihre Häufigkeit getroffen werden. Damit könnte das heutige Bild von Proteinstrukturen, das meist einen Durchschnitt verschiedener Einzelstrukturen darstellt, erweitert und verfeinert werden.

Eine solche Situation, in der zu viele Informationen zur gleichen Zeit gemessen werden, ist in der NMR nicht neu. Die ersten Signale von angeregten Kernspins konnten erst mittels Fourier-Transformation unterschiedlichen Frequenzen zugeordnet werden. Auch in der ssNMR wurden die durch Kopplungen breiten „powder“-Spektren erst durch die Drehung im magischen Winkel vereinfacht. Die inhomogene Verbreiterung der Signale bei kryogenen Temperaturen erschwert also nicht nur die Interpretation der Spektren, sie ist gleichzeitig eine Möglichkeit neue Daten zu gewinnen.

Im Moment allerdings limitiert die Signalverbreiterung häufig die Zuordnung der Signale komplexer Analyten. Alexander Barnes, aus der Gruppe von Robert Griffin, sieht das weniger problematisch:

[...] spectral resolution is not generally compromised at the cryogenic temperatures [...] ¹ [49]

Um die unterschiedlichen Sichtweisen zu verstehen, müssen die genutzten Modellsystem betrachtet werden. Auf der einen Seite stehen, wie in dieser Arbeit (Abschnitt 3.1), hydrierte Proteine im Mittelpunkt, die vollständig oder zum Großteil markiert sind. Auf der anderen Seite können einzelne markierte Atome innerhalb von hydrierten Proteinkomplexen oder auch wasserfreie Kristalle kleiner Peptide untersucht werden.

Im ersten Fall sind viele gemessene Seitenketten von Wasser umgeben und fast alle liegen bei RT in verschiedenen Konformationen vor. In dieser Arbeit wurde gezeigt, wie wichtig beides für die inhomogene Verbreiterung ist. Meiner Meinung nach ist bei hydrierten Proteinen die Verbreiterung ein allgemeines Problem, das sich nur unter besonderen Bedingungen vermindern lässt.

Der zweite Fall ist davon zu unterscheiden. Er liegt z.B. bei dem markierten Retinal innerhalb des Bakteriorhodopsin [50] oder bei Ligandenbereichen in der Bindungstasche eines Rezeptors vor (wie in Abschnitt 3.4 gezeigt). In beiden Fällen sind die gemessenen Atome nicht Lösungsmittel-zugänglich und ihre Dynamik ist durch Interaktionen mit ihrer Umgebung stark beeinträchtigt. Dies gilt umso mehr für hochgeordnete, wasserfreie Kristalle [42]. In diesen Fällen sind schon bei RT nur wenige Konformationen möglich und deshalb tritt eine inhomogene Verbreiterung der Signale bei kryogenen Temperaturen kaum in Erscheinung.

¹Die spektrale Auflösung ist nicht allgemein beeinträchtigt bei kryogenen Temperaturen

Abgesehen von den unterschiedlichen Analyten lässt sich auch darüber streiten, ob die von Barnes et al. beim Retinal gemessenen Linienbreiten von 1 ppm schmal genug sind, um Spektren von Proteinen mit vielen markierten Atomen zu interpretieren.

Durch die inhomogene Linienverbreiterung lassen sich also mittels DNP-NMR primär nur Proteine untersuchen, bei denen kleine, relativ geordnete Bereiche innerhalb des Proteins entscheidende Informationen liefern können. Die Strukturen ganzer Proteine oder Proteinkomplexe aufzuklären, bleibt auch mit DNP schwierig. Genau dies ist aber das eigentliche Potential der ssNMR, für die häufig Membranproteine und Fibrillen als typische Analyten genannt werden [1]. Wie könnten sich nun mit DNP bei solchen Systemen in Zukunft strukturelle Daten gewinnen lassen?

Grundsätzlich gibt es drei mögliche Wege:

1. Die Beweglichkeit der Seitenketten lässt sich wiederherstellen, so dass Spektren wie bei RT erhalten werden können.
 - a) Dafür kann beispielsweise die Proben­temperatur erhöht werden. Die Möglichkeiten der DNP bei Raumtemperatur und der Schmelz-DNP wurden am Anfang dieses Kapitels mit den jeweiligen Nachteilen diskutiert.

Eine andere Möglichkeit ist eine DNP-Messung bei intermediären Temperaturen, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben. Dabei wurden Spektren von deuteriertem SH3 bei 178 K aufgenommen und diese zeigen wesentlich besser aufgelöste Signale als bei kryogenen Temperaturen. Die DNP-Verstärkung ist bei diesen Messungen zwar kleiner als bei kryogenen Temperaturen, aber vergleichbar zu kryogenen Experimenten an protoniertem SH3. Diese Methode ist wahrscheinlich der einfachste und vielversprechendste Weg, die inhomogene Verbreiterung zu vermindern und aufgelöste NMR-Spektren zu erhalten. Sie setzt jedoch deuterierte Proben voraus, was nicht bei allen Analyten ohne großen Aufwand möglich ist.

- b) Oder die Proben­temperatur bleibt kryogen und es lässt sich dennoch die Beweglichkeit der Seitenketten erhöhen. Falls die Theorie stimmt, dass vor allem die Hydrationshülle für die inhomogene Verbreiterung der Signale zwischen 260–80 K verantwortlich ist, könnte ein anderes Lösungsmittel helfen. Theoretisch müsste dies bei Temperaturen zwischen 100–160 K noch flüssig sein ohne Proteine zu denaturieren. So ein Lösungsmittel zu finden ist im Moment allerdings eine unwahrscheinliche Spekulation. Außerdem würde sich damit die Untersuchung vom Idealfall einer physiologischen Umgebung entfernen.

2. Die Seitenketten lassen sich bei kryogenen Temperaturen in nur eine Konformation, ein Energieminimum, bringen.
- a) Bei manchen Systemen liegen Bereiche eines Moleküls schon bei Raumtemperatur in nur einer Konformation vor. Dies ist z.B. der Fall bei geordneten, kristallinen Strukturen und bei Atomen, die durch Interaktionen in ihrer Beweglichkeit stark eingeschränkt sind. Solche Analyten lassen sich auch bei kryogenen Temperaturen mit nur minimaler inhomogener Verbreiterung messen.
 - b) Die meisten biologischen Moleküle sind jedoch bei Raumtemperatur relativ flexibel, was häufig auch eine Voraussetzung für ihre Funktion ist. Hier hat vor allem die Geschwindigkeit des Einfrierens einen Einfluss auf die verschiedenen Konformere bei kryogenen Temperaturen. Ähnlich verhält es sich bei Kristallen, die entweder besonders langsam, besonders schnell oder mit zyklisierenden Temperaturen eingefroren werden, um ihre Homogenität zu verbessern [91, 120, 121].

Würde ein dynamischer Analyt, wie z.B. ein hydriertes Protein, sehr schnell eingefroren, so ist es wahrscheinlich, dass alle bei RT vorhandenen Konformationen ausgefroren werden. Die erhaltenen NMR-Spektren wären dann genauso inhomogen verbreitert, wie bei langsamem Einfrieren.

Ob Temperatur-Zyklen oder sehr langsames Einfrieren hilfreich sind, lässt sich schwer beurteilen. Weder ist die Dauer bekannt, über die ein solcher Versuch durchgeführt werden müsste, noch kann ein Temperaturbereich eingegrenzt werden, in dem alle Seitenketten gerade noch zwischen den Energieminima der unterschiedlichen Konformationen wechseln. Vielmehr zeigte sich in dieser Arbeit (Abschnitt 3.1), dass die Veränderung der Dynamik über einen sehr großen Temperaturbereich geschieht. Erste Versuche eine Probe sehr langsam (innerhalb von 2 Tagen) einzufrieren zeigten keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich wären also viel längere Versuche über den ganzen Temperaturbereich nötig, um einen Effekt zu erzielen.

Selbst wenn dies möglich ist, bleibt die Frage bestehen, ob es überhaupt ein definiertes Energieminimum gibt, das tiefer als andere Minima und ausreichend durch lokale Maxima isoliert ist. Robert Tycko bezweifelte das² und ich schließe mich in diesem Punkt seiner Meinung an.

²Cryogenic NMR Symposium, 22. Sept. 2009 in Southampton

3. Die in den Spektren enthaltenen Informationen lassen sich auflösen.
 - a) Dazu könnten die Signale gefiltert und so Überlappungen vermindert werden, z. B. über mehrere CP-Schritte und mehrere Dimensionen. Allerdings sind schon Messungen von drei Dimensionen mit DNP-NMR wegen der kurzen T_2 -Zeiten der untersuchten Kerne sehr schwierig. Zusätzlich ist die Effizienz des CP-Transfers durch die Zugabe des Biradikals vermindert (vgl. Abschnitt 3.2). Vor allem aber ist auch mit solchen Filter-Methoden keine Unterscheidung der verschiedenen Signale ein und desselben Kerns möglich. Die inhomogene Verbreiterung lässt sich also nicht vermindern.
 - b) Oder die einzelnen Signale müssen deutlich schmaler sein, z.B. indem der Rotor wesentlich schneller gedreht wird. Wahrscheinlich sind jedoch nicht nur einige wenige Konformationen pro Seitenkette eingefroren, sondern auch alle Zwischenzustände. Deshalb bezweifle ich, dass sich mit schmalen Linien die Signale einzelner Konformere auflösen lassen.

Mit Sicherheit lohnt es sich, alle diese Ansätze weiter zu verfolgen und die vielversprechendsten im Detail zu untersuchen. Vielleicht kann gerade mit einer Kombination verschiedener Methoden die Informationsvielfalt in kryogenen DNP-Spektren komplexer Analyten genutzt werden.

Nichtsdestotrotz zeigt die Untersuchung an Neurotoxin II (Abschnitt 3.4) eindrucksvoll, wie DNP-NMR unter günstigen Umständen die Messzeit um das 24-fache verkürzen kann ohne dabei die Auflösung der Spektren zu beeinträchtigen.

Die Sensitivität (κ) eines Kreuzsignals dieser Untersuchung ähnelt in ihrer Größenordnung derjenigen mit Prolin-Proben und 26 mM TP (Abschnitt 3.2). Auf der einen Seite ist zwar die DNP-Verstärkung der Prolin-Probe deutlich größer als beim NTII, aber die Prolinsignale sind auch wesentlich breiter, weil es sich um eine eingefrorene Lösung handelt. Abbildung 4.1 auf der nächsten Seite zeigt die Veränderung der minimalen Messzeit für ein 2D Spektrum in Abhängigkeit von der Probenmenge anhand dieser Sensitivitäten. Dabei wurden ein S/N von 3, für die zweite Dimension 512 Inkremente und eine T_1 -Zeit von 1 s zugrunde gelegt. Auch wenn die Abbildung nur eine grobe Veranschaulichung ist, so zeigt sie doch deutlich, wie groß die Steigerung der Sensitivität im Vergleich zu konventioneller ssNMR (orangefarbige Linie) ist und in welchen niedrigen Konzentrationen Proben mit DNP grundsätzlich vermessen werden können.

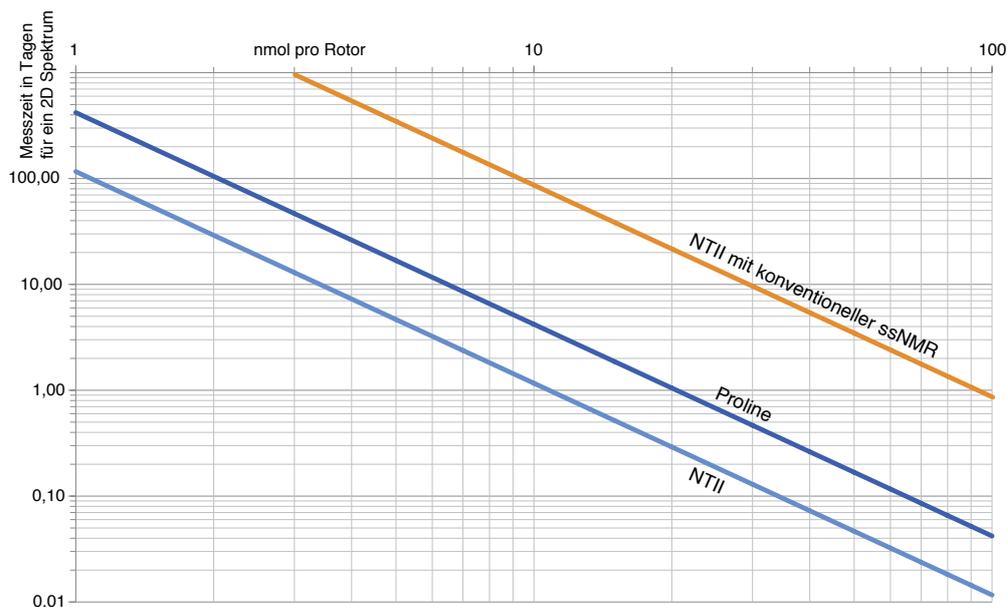


Abbildung 4.1.: Theoretische Messzeiten für ein 2D Spektrum in Tagen abhängig von der Konzentration des Analyten in nmol pro Rotor. Die Geraden sind aus folgenden Sensitivitäten berechnet: Prolin: 1D Spektrum, c_T von 26 mM, C δ Signal, Verstärkungsfaktor: 45; NTII: 2D Spektrum, Leucin C β -C γ -Kreuzsignal, [2- 13 C]-Glycerol markiert, Verstärkungsfaktor: 12.; konventionell NTII: 2D Spektrum, Leucin C β -C γ -Kreuzsignal, [2- 13 C]-Glycerol markiert, ca. 270 K, keine Verstärkung. Die beiden Achsen sind logarithmisch.

4.2. Radikale

Der zweite große Unterschied zur konventionellen ssNMR ist die Zugabe von paramagnetischen Radikalen. Auch hier möchte ich Alexander Barnes zitieren:

[...] polarizing agents can be used at sufficiently low concentration to be statistically separated from the spins of interest [...] Nevertheless, they still perform as effective sources of polarization. On the other hand high concentrations of radicals can be used when they are sterically excluded from the sites of interest.³ [49]

Um diese Aussage zu beurteilen, muss auch ein Blick auf Konzentrationen von Radikalen in anderen DNP-Untersuchungen geworfen werden. In Tabelle 4.1 auf der nächsten Seite sind einige ausgewählte Arbeiten mit ihren Analyten, Verstärkungsfaktoren und

³Die Polarisations-Agenten können in ausreichend kleinen Konzentrationen verwendet werden, so dass sie statistisch von den Spins von Interesse getrennt sind [...] Dennoch funktionieren sie als effektive Polarisations-Quellen. Andererseits können hohe Radikal-Konzentrationen genutzt werden, wenn sie räumlich vom Ort des Interesses entfernt sind.

Tabelle 4.1.: In anderen Arbeiten verwandte Konzentrationen von Radikalen und Biradikalen; ¹ Urea, ² Proline, ³ Kristalle von GNNQQNY, ⁴ Bakterio-Rhodopsin, ⁵ Wasser/Glycerol, ⁶ Phenol auf Oberflächen, ⁷ Fibrillen einer SH3-Domäne, ⁸ LamB Signalpeptid am SecYEG Translocon in Membranen

Radikal	e ⁻ Konz. [mM]	Analyt Konz. [mM]	ε (¹ H)	Referenz
TOTAPOL	6 – 10	2000 ¹	290	[37]
TOTAPOL	10	200 ²	240	[37]
TEMPO	10	2000 ¹	40	[39]
TOTAPOL	10	2000 ¹	190	[39]
bTbK	9	2000 ¹	250	[208]
TOTAPOL	20	500 ³	120	[42]
4-amino TEMPO	40	? ⁴	50	[175]
TOTAPOL	30	1000 ¹	100	[50]
TOTAPOL	30	? ⁴	90	[48]
TOTAPOL	40	? ⁵	6	[82]
TOTAPOL	20	? ⁵	130	[209]
TOTAPOL	40	? ²	40	[199]
TOTAPOL	10	? ²	20	[199]
TOTAPOL	50	? ⁶	25	[86]
TOTAPOL	20	? ⁷	30	[44]
TOTAPOL	40	1,3 ⁸	32	[51]

Radikalkonzentrationen dargestellt. Sie alle nutzen nicht mehr als 50 mM Radikale (oder 25 mM Biradikale) und zeigen keine Verbreiterung der Signale durch PE.

Genauso zeigen auch die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2 keinen Effekt der Paramagneten auf die Linienbreiten bei Konzentrationen bis 50 mM TP, wie von Alexander Barnes beschrieben. Allerdings gibt es eine grundsätzliche Schwierigkeit bei der Beurteilung. Alle hier untersuchten Systeme, die prinzipiell eine räumliche Nähe von TP und Analyt zulassen, zeigen zusätzlich inhomogene Signal-Verbreiterung. Wenn die betrachteten Linien aus mehreren, sich überlappenden Signalen bestehen, wie lässt sich auf die Linienbreite eines einzelnen Signals und die Beeinflussung durch das TP schließen? Meiner Meinung nach – und falls sich die inhomogene Verbreiterung in hydrierten Proben vermindern ließe (siehe Abschnitt 4.1) – stellt auch eine niedrige TP-Konzentration eine Schwierigkeit dar und limitiert die mögliche Linienbreite.

Zusätzlich konnte in Abschnitt 3.4 gezeigt werden, dass TP sich wahrscheinlich an Proteine und Lipide anlagert. Dann lässt sich schlecht mit einer Gleichverteilung und dem durchschnittlichen Abstand argumentieren. Vielmehr ist die Konzentration direkt

am Analyten deutlich höher als es bei einer Gleichverteilung im Lösungsmittel.

In den Proben von NTII wurde mit 50 mM eine relativ hohe Konzentration TP verwandt (vergleiche Tabelle 4.1 auf der vorherigen Seite). Dennoch zeigte sich in den Untersuchungen aus Abschnitt 3.2 auch bei diesem Wert noch keine signifikante homogene Linienverbreiterung. Nach der Lagerung bei -20°C waren die gemessenen Spektren von NTII deutlich besser aufgelöst als direkt nach der Präparation (siehe Abbildung 3.20 auf Seite 78). Da NTII stark an den Rezeptor gebunden ist und die markierten Seitenketten vor allem im Bindungsbereich und damit nicht Lösungsmittel-exponiert sind, kann eine Veränderung der inhomogenen Linienbreite während der Lagerung ausgeschlossen werden. Vielmehr sind die Radikale an der Oberfläche inaktiviert worden.

Die stark verbreiterten Signale direkt nach der Herstellung sind also höchstwahrscheinlich auf PE zurückzuführen. Das TP, das sich an der Proteinoberfläche aufkonzentriert, beeinflusst massiv die Signale der markierten Seitenketten die maximal 18 \AA vom Lösungsmittel entfernt sind (Die Berechnungen aus Abschnitt 3.2 ergeben, dass Kerne, die ungefähr 10 \AA oder näher an einem Radikal sind, gar nicht mehr detektierbar sind). Mit niedrigeren Konzentrationen bis 40 mM war die gemessene DNP-Verstärkung zu klein, um das NTII überhaupt zu messen. Es können also nicht in jedem Fall so kleine Konzentrationen verwandt werden, dass die NMR-Signale kaum durch PE beeinflusst werden.

Zusammenfassend ist es sicher richtig, dass bei TP-Konzentrationen um 20 mM die PE angesichts der inhomogenen Signalverbreiterung kaum ins Gewicht fallen. Zweifelsohne kann außerdem bei ausreichendem Abstand zwischen Analyt und Radikal eine Linienverbreiterung durch TP vernachlässigt werden (wie im Beispiel des Bakteriorhodopsins [47–49]).

Ein anderer Aspekt der Radikal-Zugabe sollte nicht vernachlässigt werden. Es ist mitentscheidend für die Messungen, dass Radikale die T_1 -Zeit von Protonen verkürzen. Aus dem gleichen Grund werden konventionelle Proben mit paramagnetischen Molekülen, wie Cu^{2+} -EDTA, versetzt [83, 200, 201]. Als Beispiel entspricht eine Verminderung der T_1 -Zeit von 12 auf 1 s, wie in dieser Arbeit beobachtet, einer Steigerung der Sensitivität (κ) um den Faktor 3,4. Im Umkehrschluss ist eine DNP-Verstärkung (ϵ) von 25 ohne diesen Effekt in Wahrheit nur eine Verstärkung von κ um ungefähr 7.

Aus all den genannten Gründen muss die Konzentration des Radikals für jede Probe individuell beurteilt und gegebenenfalls optimiert werden.

Da beide Effekte, die PE und die Verminderung der T_1 -Relaxation, sehr wichtig für die Messungen sind, ist die DNP-Verstärkung allein kein geeigneter Vergleichsparameter. Schlussendlich kann nur eine Steigerung der Sensitivität (κ) den Wert der DNP-Technik ausdrücken.

Es stellt sich nun die Frage, ob sich die Radikal-Moleküle für DNP-NMR verbessern lassen. Für biologische Proben und ein ideales Radikal gilt: Das Radikalmolekül sollte möglichst wasserlöslich sein ohne sich durch entstehende Wechselwirkungen an Protein-oberflächen anzulagern. Dadurch ließe sich die Verbreiterung, wie bei NTII beobachtet, vermindern. Allerdings bedingt die Wasserlöslichkeit eines Moleküls meist Interaktionen mit hydrophilen Seitenketten.

Außerdem wäre eine länger e^- -Relaxation wünschenswert. Wahrscheinlich könnten dann auch bei höheren Temperaturen noch ausreichende DNP-Verstärkungen genutzt und die inhomogene Linienverbreiterung so vermindert werden. Verschiedene Arbeitsgruppen forschen intensiv an neuen Radikalen und die Ergebnisse bleiben abzuwarten.

Eine andere Möglichkeit wäre es, das Radikalmolekül in ein anderes Molekül einzuschließen, um den direkten Kontakt zwischen Radikal und Analyt zu verhindern. Außerdem ließe sich so die direkte Umgebung des Radikals beeinflussen ohne das Lösungsmittel zu verändern. Anscheinend sind bei dem CE-Mechanismus der Polarisationsübertragung besonders die Kerne direkt um das Radikal entscheidend für die Effizienz [59]. Vielleicht ließe sich z.B. der Anteil der Protonen in dem umgebenden Molekül optimieren und damit der erste Schritt im Polarisations-Transfer verbessern. Erste, einfache Versuche mit allerdings protonierten Cyclodextrinen waren bisher nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist diese Möglichkeit wahrscheinlich einfacher als neue Radikale zu entwickeln und sollte weiterverfolgt werden.

Im Allgemeinen sind auch bei der Entwicklung und Anwendung von Radikalen für DNP-Messungen noch viele Fragen offen und Möglichkeiten vorhanden, die DNP-Spektroskopie zu verbessern.

4.3. Membranproteine

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Membranproteine mit DNP-NMR zu untersuchen. Die Anwendung von DNP verändert die Daten dabei im Vergleich zu konventionellen NMR-Messungen komplex, wie die vorangegangenen Punkte zeigen. Viele unterschiedliche Einflüsse sind zu berücksichtigen und nicht in allen Einzelheiten verstanden. Was lässt sich also zusammenfassend sagen?

Im Moment eignet sich die DNP-NMR besonders für detaillierte Fragen bei komplexen Systemen. Solange das Augenmerk auf wenigen, besonders interessanten Atomen oder Seitenketten liegt, lässt sich die benötigte Messzeit deutlich verkürzen. So lassen sich Proben untersuchen, die durch ihre niedrigen Analyt-Konzentrationen bisher der ssNMR nicht zugänglich waren.

Dennoch bleibt die niedrige Sensitivität von NMR-Messungen prinzipiell schwierig. In dieser Arbeit liegt selbst mit optimierten DNP-Bedingungen die Detektionsgrenze von 2D Messungen bei ungefähr 200 μM (5 nmol in 25 μl). Dafür müssen im Beispiel des nAChRs in grober Schätzung über 1% des Probenvolumens aus dem zu untersuchenden Rezeptor bestehen. Normale physiologische Konzentrationen lassen sich so nicht messen. Selbst wenn der gewünschte Rezeptor in Zellen überexprimiert wird, sind solche Konzentrationen nur schwer ohne Aufreinigung zu erreichen.

Aber die hier gezeigten Ergebnisse sind ein erster Schritt, um physiologische Messungen überhaupt erst in den Bereich des Möglichen zu rücken und zeigen eindrucksvoll, was mit DNP-NMR schon heute möglich ist.

Auf Basis dieser Ergebnisse sind momentan für die DNP-NMR bei kryogenen Temperaturen besonders Systeme interessant, die

1. sich aufkonzentrieren lassen, aber der konventionellen ssNMR nicht zugänglich sind. Das sind vor allem Membranproteine in Lipiden oder Komplexe von Proteinen, die durch ihre Größe nicht höher konzentriert werden können;
2. einzelne Bereiche von nicht mehr als ca. 50 Aminosäuren enthalten, die sich selektiv markieren lassen und deren Struktur entscheidend für biologische Fragestellungen ist;
3. Seitenketten von Interesse enthalten, die nicht Lösungsmittel-exponiert sind und deren Dynamik durch Interaktionen eingeschränkt ist.

Unter diese Definitionen fallen zahlreiche Proben von strukturbiochemischem Interesse. Sowohl in der Herstellung solcher Proben als auch in der Spektrometrie liegen noch viele Herausforderungen, die zum Teil neue Wege erfordern.

Alles in allem wurde in dieser Arbeit detailliert analysiert, wie die Anwendung von DNP die NMR-Spektren von Proteinen beeinflusst. Mit Hilfe der Ergebnisse konnten die experimentellen Bedingungen optimiert werden, so dass sich aufgelöste Spektren eines Membranprotein-Komplexes messen lassen. So konnte gezeigt werden, dass die dynamische Kernpolarisation schon heute zum strukturellen Verständnis von Membranrezeptoren beitragen kann.

Literatur

- [1] M. Duer. *The Basics of Solid-State NMR*, Blackwell Science Ltd., Oxford, 1. Aufl., **2002** (siehe S. 2, 67, 88).
- [2] M. H. Levitt. *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2. Aufl., **2008** (siehe S. 2).
- [3] S. Reckel, D. Gottstein, J. Stehle, F. Löhr, M.-K. Verhoefen, M. Takeda, R. Silvers, M. Kainosho, C. Glaubitz, J. Wachtveitl, F. Bernhard, H. Schwalbe, P. Güntert, V. Dötsch. Solution NMR structure of proteorhodopsin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11942–11946 (siehe S. 2).
- [4] F. Kurdzesau, B. van den Brandt, A. Comment, P. Hautle, S. Jannin, J. J. van der Klink, J. A. Konter. Dynamic nuclear polarization of small labelled molecules in frozen water-alcohol solutions. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2008**, *41*, 155506 (siehe S. 3).
- [5] L. Lumata, A. K. Jindal, M. E. Merritt, C. R. Malloy, A. D. Sherry, Z. Kovacs. DNP by thermal mixing under optimized conditions yields >60,000-fold enhancement of ⁸⁹Y NMR signal. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8673–8680 (siehe S. 3, 14).
- [6] M. Maricq, J. Waugh. NMR in rotating solids. *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 3300–3316 (siehe S. 5).
- [7] N. Szeverenyi, M. Sullivan, G. Maciel. Observation of spin exchange by two-dimensional fourier-transform ¹³C cross-polarisation magic-angle-spinning, *J. Magn. Reson.* **1982**, *47*, 462–475 (siehe S. 6, 9).
- [8] E. Andrew, A. Bradbury, R. Eades. Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed. *Nature* **1958**, *182*, 1659–1659 (siehe S. 7).
- [9] A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, R. G. Griffin. Heteronuclear decoupling in rotating solids. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951–6958 (siehe S. 8, 39).
- [10] M. J. Knight, A. L. Webber, A. J. Pell, P. Guerry, E. Barbet-Massin, I. Bertini, I. C. Felli, L. Gonnelli, R. Pierattelli, L. Emsley, A. Lesage, T. Herrmann, G. Pintacuda. Fast resonance assignment and fold determination of human superoxide dismutase by high-resolution proton-detected solid-state MAS NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11697–11701 (siehe S. 8).

- [11] R. Linser, M. Dasari, M. Hiller, V. Higman, U. Fink, J.-M. Lopez del Amo, S. Markovic, L. Handel, B. Kessler, P. Schmieder, D. Oesterhelt, H. Oschkinat, B. Reif. Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of fibrillar and membrane proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4508–4512 (siehe S. 8).
- [12] T. Maly, L. B. Andreas, A. A. Smith, R. G. Griffin. ^2H -DNP-enhanced ^2H - ^{13}C solid-state NMR correlation spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5872–5878 (siehe S. 8, 17 ff.).
- [13] S. Hartmann, E. Hahn. Nuclear double resonance in the rotating frame. *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042–2053 (siehe S. 8, 64).
- [14] N. Bloembergen. On the interaction of nuclear spins in a crystalline lattice. *Physica* **1949**, *15*, 386–426 (siehe S. 9).
- [15] A. Loquet, K. Giller, S. Becker, A. Lange. Supramolecular interactions probed by ^{13}C - ^{13}C solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15164–15166 (siehe S. 9).
- [16] F. Castellani, B. J. van Rossum, A. Diehl, M. Schubert, K. Rehbein, H. Oschkinat. Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy. *Nature* **2002**, *420*, 98–102 (siehe S. 9, 35, 78).
- [17] F. Castellani, B.-J. van Rossum, A. Diehl, K. Rehbein, H. Oschkinat. Determination of solid-state NMR structures of proteins by means of three-dimensional ^{15}N - ^{13}C - ^{13}C dipolar correlation spectroscopy and chemical shift analysis. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11476–11483 (siehe S. 9, 43).
- [18] A. Lange, S. Becker, K. Seidel, K. Giller, O. Pongs, M. Baldus. A concept for rapid protein-structure determination by solid-state NMR spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2089–2092 (siehe S. 9).
- [19] S. G. Zech, A. J. Wand, A. E. McDermott. Protein structure determination by high-resolution solid-state NMR spectroscopy: application to microcrystalline ubiquitin. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8618–8626 (siehe S. 9).
- [20] W. T. Franks, B. J. Wylie, H. L. F. Schmidt, A. J. Nieuwkoop, R.-M. Mayrhofer, G. J. Shah, D. T. Graesser, C. M. Rienstra. Dipole tensor-based atomic-resolution structure determination of a nanocrystalline protein by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 4621–4626 (siehe S. 9, 21).
- [21] D. H. Zhou, G. Shah, M. Cormos, C. Mullen, D. Sandoz, C. M. Rienstra. Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of fully protonated proteins at 40 kHz magic-angle spinning. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11791–11801 (siehe S. 9).

-
- [22] D. Marulanda, M. L. Tasayco, M. Cataldi, V. Arriaran, T. Polenova. Resonance assignments and secondary structure analysis of *E. coli* thioredoxin by magic angle spinning solid-state NMR spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 18135–18145 (siehe S. 9).
- [23] A. McDermott, T. Polenova, A. Bockmann, K. W. Zilm, E. K. Paulson, R. W. Martin, G. T. Montelione, E. K. Paulsen. Partial NMR assignments for uniformly (^{13}C , ^{15}N)-enriched BPTI in the solid state. *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*, 209–219 (siehe S. 9).
- [24] A. T. Petkova, Y. Ishii, J. J. Balbach, O. N. Antzutkin, R. D. Leapman, F. Delaglio, R. Tycko. A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 16742–16747 (siehe S. 9).
- [25] C. Wasmer, A. Lange, H. van Melckebeke, A. B. Siemer, R. Riek, B. H. Meier. Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a β solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* **2008**, *319*, 1523–1526 (siehe S. 9).
- [26] H. Heise, W. Hoyer, S. Becker, O. C. Andronesi, D. Riedel, M. Baldus. Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length α -synuclein fibrils studied by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 15871–15876 (siehe S. 9).
- [27] A. Loquet, B. Bardiaux, C. Gardiennet, C. Blanchet, M. Baldus, M. Nilges, T. Malliavin, A. Böckmann. 3D structure determination of the Crh protein from highly ambiguous solid-state NMR restraints. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3579–3589 (siehe S. 9).
- [28] S. Jehle, B.-J. van Rossum, J. R. Stout, S. M. Noguchi, K. Falber, K. Rehbein, H. Oschkinat, R. E. Klevit, P. Rajagopal. αB -Crystallin: A hybrid solid-state/solution-state NMR investigation reveals structural aspects of the heterogeneous oligomer. *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1481–1497 (siehe S. 9).
- [29] S. Jehle, P. Rajagopal, B. Bardiaux, S. Markovic, R. Kühne, J. R. Stout, V. A. Higman, R. E. Klevit, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat. Solid-state NMR and SAXS studies provide a structural basis for the activation of αB -Crystallin oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 1037–1043 (siehe S. 9).
- [30] A. Loquet, N. G. Sgourakis, R. Gupta, K. Giller, D. Riedel, C. Goosmann, C. Griesinger, M. Kolbe, D. Baker, S. Becker, A. Lange. Atomic model of the type III secretion system needle. *Nature* **2012**, *486*, 276–279 (siehe S. 9).
- [31] A. J. v. Gammeren, F. B. Hulsbergen, J. G. Hollander, H. J. M. d. Groot. Residual backbone and side-chain ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the intrinsic transmembrane light-harvesting 2 protein complex by solid-state Magic Angle Spinning NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **2005**, *31*, 279–293 (siehe S. 9).

- [32] M. Renault, R. Tommassen-van Boxtel, M. P. Bos, J. A. Post, J. Tommassen, M. Baldu. Cellular solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 4863–4868 (siehe S. 9).
- [33] A. W. Overhauser. Polarization of nuclei in metals. *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 411–415 (siehe S. 10).
- [34] T. Carver, C. Slichter. Polarization of nuclear spins in metals. *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 212–213 (siehe S. 10).
- [35] G. Gerfen, L. R. Becerra, D. Hall, R. Griffin, R. J. Temkin, D. Singel. High frequency (140 GHz) dynamic nuclear polarization: Polarization transfer to a solute in frozen aqueous solution. *J. Chem. Phys.* **1995**, *102*, 9494–9497 (siehe S. 10, 12, 17, 31).
- [36] L. R. Becerra, G. Gerfen, R. J. Temkin, D. Singel, R. Griffin. Dynamic nuclear polarization with a cyclotron resonance maser at 5 T. *Phys. Rev. Lett.* **1993**, *71*, 3561–3564 (siehe S. 10, 15, 17).
- [37] C. Song, K.-N. Hu, C.-G. Joo, T. M. Swager, R. G. Griffin. TOTAPOL: a biradical polarizing agent for dynamic nuclear polarization experiments in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11385–11390 (siehe S. 11, 17, 31, 37, 92).
- [38] M. Rosay, L. Tometich, S. Pawsey, R. Bader, R. Schauwecker, M. Blank, P. M. Borchard, S. R. Cauffman, K. L. Felch, R. T. Weber, R. J. Temkin, R. G. Griffin, W. E. Maas. Solid-state dynamic nuclear polarization at 263 GHz: spectrometer design and experimental results. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5850–5860 (siehe S. 11, 39).
- [39] K.-N. Hu, C. Song, H.-H. Yu, T. M. Swager, R. G. Griffin. High-frequency dynamic nuclear polarization using biradicals: a multifrequency EPR lineshape analysis. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052302 (siehe S. 11, 31, 92).
- [40] M. Rosay, A.-C. Zeri, N. S. Astrof, S. J. Opella, J. Herzfeld, R. G. Griffin. Sensitivity-enhanced NMR of biological solids: dynamic nuclear polarization of Y21M fd bacteriophage and purple membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1010–1011 (siehe S. 11).
- [41] I. V. Sergeyev, L. A. Day, A. Goldbourt, A. E. McDermott. Chemical shifts for the unusual DNA structure in Pfl bacteriophage from dynamic-nuclear-polarization-enhanced solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20208–20217 (siehe S. 11).
- [42] P. C. A. van der Wel, K.-N. Hu, J. Lewandowski, R. G. Griffin. Dynamic nuclear polarization of amyloidogenic peptide nanocrystals: GNNQQNY, a core segment of the yeast prion protein Sup35p. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10840–10846 (siehe S. 11, 15, 31, 58, 67, 85, 87, 92).

-
- [43] P. C. A. van der Wel, J. R. Lewandowski, R. G. Griffin. Solid-state NMR study of amyloid nanocrystals and fibrils formed by the peptide GNNQQNY from yeast prion protein Sup35p. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5117–5130 (siehe S. 11).
- [44] M. J. Bayro, G. T. Debelouchina, M. T. Eddy, N. R. Birkett, C. E. Macphee, M. Rosay, W. E. Maas, C. M. Dobson, R. G. Griffin. Intermolecular structure determination of amyloid fibrils with magic-angle spinning and dynamic nuclear polarization NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13967–13974 (siehe S. 11, 85, 92).
- [45] E. Salnikov, C. Aisenbrey, V. Vidovic, B. Bechinger. Solid-state NMR approaches to measure topological equilibria and dynamics of membrane polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 258–265 (siehe S. 11).
- [46] U. Akbey, W. T. Franks, A. Linden, S. Lange, R. G. Griffin, B.-J. van Rossum, H. Oshkinat. Dynamic nuclear polarization of deuterated proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7803–7806 (siehe S. 11, 21, 35, 53, 67).
- [47] A. B. Barnes, G. D. Paëpe, P. C. A. van der Wel, K.-N. Hu, C.-G. Joo, V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin. High-field dynamic nuclear polarization for solid and solution biological NMR. *Appl. Magn. Reson.* **2008**, *34*, 237–263 (siehe S. 11, 31, 58, 93).
- [48] V. S. Bajaj, M. L. Mak Jurkauskas, M. L. Belenky, J. Herzfeld, R. G. Griffin. Functional and shunt states of bacteriorhodopsin resolved by 250 GHz dynamic nuclear polarization-enhanced solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 9244–9249 (siehe S. 11, 85, 92 f.).
- [49] A. B. Barnes, B. Corzilius, M. L. Mak Jurkauskas, L. B. Andreas, V. S. Bajaj, Y. Matsuki, M. L. Belenky, J. Lugtenburg, J. R. Sirigiri, R. J. Temkin, J. Herzfeld, R. G. Griffin. Resolution and polarization distribution in cryogenic DNP/MAS experiments. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5861–5867 (siehe S. 11, 15, 21, 24, 63, 87, 91, 93).
- [50] A. B. Barnes, M. L. Mak Jurkauskas, Y. Matsuki, V. S. Bajaj, P. C. A. van der Wel, R. Derocher, J. Bryant, J. R. Sirigiri, R. J. Temkin, J. Lugtenburg, J. Herzfeld, R. G. Griffin. Cryogenic sample exchange NMR probe for magic angle spinning dynamic nuclear polarization. *J. Magn. Reson.* **2009**, *198*, 261–270 (siehe S. 11, 21, 87, 92).
- [51] L. Reggie, J. J. Lopez, I. Collinson, C. Glaubitz, M. Lorch. Dynamic nuclear polarization-enhanced solid-state NMR of a ^{13}C -labeled signal peptide bound to lipid-reconstituted Sec translocon. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19084–19086 (siehe S. 11, 85, 92).
- [52] M. Renault, S. Pawsey, M. P. Bos, E. J. Koers, D. Nand, R. Tommassen-van Boxtel, M. Rosay, J. Tommassen, W. E. Maas, M. Baldus. Solid-state NMR spectroscopy on cellular

- preparations enhanced by dynamic nuclear polarization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2998–3001 (siehe S. 11).
- [53] T. Jacso, W. T. Franks, H. Rose, U. Fink, J. Broecker, S. Keller, H. Oschkinat, B. Reif. Characterization of membrane proteins in isolated native cellular membranes by dynamic nuclear polarization solid-state NMR spectroscopy without purification and reconstitution. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 432–435 (siehe S. 11).
- [54] M. Lelli, D. Gajan, A. Lesage, M. A. Caporini, V. Vitzthum, P. Miéville, F. Héroguel, F. Rascón, A. Roussey, C. Thieuleux, M. Boualleg, L. Veyre, G. Bodenhausen, C. Copéret, L. Emsley. Fast characterization of functionalized silica materials by silicon-29 surface-enhanced NMR spectroscopy using dynamic nuclear polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2104–2107 (siehe S. 11).
- [55] A. J. Rossini, A. Zagdoun, M. Lelli, D. Gajan, F. Rascón, M. Rosay, W. E. Maas, C. Copéret, A. Lesage, L. Emsley. One hundred fold overall sensitivity enhancements for Silicon-29 NMR spectroscopy of surfaces by dynamic nuclear polarization with CPMG acquisition. *Chem. Sci.* **2011**, *3*, 108 (siehe S. 11, 62).
- [56] A. Zagdoun, A. J. Rossini, D. Gajan, A. Bourdolle, O. Ouari, M. Rosay, W. E. Maas, P. Tordo, M. Lelli, L. Emsley, A. Lesage, C. Copéret. Non-aqueous solvents for DNP surface enhanced NMR spectroscopy. *Chem. Commun. (Camb.)* **2012**, *48*, 654–656 (siehe S. 11, 15).
- [57] Y. Hovav, A. Feintuch, S. Vega. Theoretical aspects of dynamic nuclear polarization in the solid state - The solid effect. *J. Magn. Reson.* **2010**, *207*, 176–189 (siehe S. 12 f., 15).
- [58] C. Ysacco, H. Karoui, G. Casano, F. Le Moigne. Dinitroxides for solid state dynamic nuclear polarization. *Applied Magnetic ...* **2012**, *43*, 251–261 (siehe S. 14, 18).
- [59] Y. Hovav, A. Feintuch, S. Vega. Theoretical aspects of dynamic nuclear polarization in the solid state - The cross effect. *J. Magn. Reson.* **2012**, *214*, 29–41 (siehe S. 14, 94).
- [60] J. H. Ardenkjaer-Larsen, S. Macholl, H. Jóhannesson. Dynamic nuclear polarization with trityls at 1.2 K. *Appl. Magn. Reson.* **2008**, *34*, 509–522 (siehe S. 14).
- [61] O. Lebedev, S. Kazarnovskii. Die katalytische Oxidation von aliphatischen Aminen mit Wasserstoffperoxid [Übersetzung]. *Russ. J. Gen. Chem.* **1960**, *30*, 1631–1635 (siehe S. 16).
- [62] G. Giotta, H. Wang. Reduction of nitroxide free radicals by biological materials. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1972**, *46*, 1576–1580 (siehe S. 17, 79).
- [63] J. M. Hoover, J. E. Steves, S. S. Stahl. Copper(I)/TEMPO-catalyzed aerobic oxidation of primary alcohols to aldehydes with ambient air. *Nat Protoc* **2012**, *7*, 1161–1166 (siehe S. 17).

-
- [64] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612 (siehe S. 18, 44).
- [65] E. Salnikow, O. Ouari, E. Koers, H. Sarrouj. Developing DNP/Solid-State NMR Spectroscopy of Oriented Membranes. *Applied Magnetic ...* **2012**, *43*, 91–106 (siehe S. 18).
- [66] R. Wang, Y. Fu, L. Lai. A new atom-additive method for calculating partition coefficients. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **1997**, *37*, 615–621 (siehe S. 18).
- [67] I. V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V. A. Palyulin, E. V. Radchenko, N. S. Zefirov, A. S. Makarenko, V. Y. Tanchuk, V. V. Prokopenko. Virtual computational chemistry laboratory—design and description. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2005**, *19*, 453–463 (siehe S. 18).
- [68] C. Farrar, D. Hall, G. Gerfen, S. Inati, R. Griffin. Mechanism of dynamic nuclear polarization in high magnetic fields. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 4922–4933 (siehe S. 19).
- [69] S. Macholl, H. Jóhannesson, J. H. Ardenkjaer-Larsen. Trityl biradicals and ^{13}C dynamic nuclear polarization. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5804–5817 (siehe S. 18).
- [70] J. H. Lee, A. Sekhar, S. Cavagnero. ^1H -detected ^{13}C photo-CIDNP as a sensitivity enhancement tool in solution NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8062–8065 (siehe S. 19, 85).
- [71] M. Reese, D. Lennartz, T. Marquardsen, P. Höfer, A. Tavernier, P. Carl, T. Schippmann, M. Bennati, T. Carlomagno, F. Engelke, C. Griesinger. Construction of a liquid-state NMR DNP shuttle spectrometer: first experimental results and evaluation of optimal performance characteristics. *Appl. Magn. Reson.* **2008**, *34*, 301–311 (siehe S. 19).
- [72] V. Denysenkov, T. Prisner. Liquid state dynamic nuclear polarization probe with Fabry-Perot resonator at 9.2T. *J. Magn. Reson.* **2012**, *217*, 1–5 (siehe S. 19, 85).
- [73] I. J. Day, J. C. Mitchell, M. J. Snowden, A. L. Davis. Investigation of the potential of the dissolution dynamic nuclear polarization method for general sensitivity enhancement in small-molecule NMR spectroscopy. *Appl. Magn. Reson.* **2008**, *34*, 453–460 (siehe S. 20).
- [74] Y. Lee, H. Zeng, A. Mazur, M. Wegstroth, T. Carlomagno, M. Reese, D. Lee, S. Becker, C. Griesinger, C. Hilty. Hyperpolarized binding pocket nuclear Overhauser effect for determination of competitive ligand binding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012** (siehe S. 20).
- [75] T. Meldrum, L. Schröder, P. Denger, D. E. Wemmer, A. Pines. Xenon-based molecular sensors in lipid suspensions. *J. Magn. Reson.* **2010**, *205*, 242–246 (siehe S. 20).

- [76] K. Golman, J. H. Ardenkjaer-Larsen, J. S. Petersson, S. Mansson, I. Leunbach. Molecular imaging with endogenous substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 10435–10439 (siehe S. 20).
- [77] M. D. Lingwood, A. J. Sederman, M. D. Mantle, L. F. Gladden, S. Han. Overhauser dynamic nuclear polarization amplification of NMR flow imaging. *J. Magn. Reson.* **2012**, *216*, 94–100 (siehe S. 20).
- [78] G. M. Clore, J. Iwahara. Theory, practice, and applications of paramagnetic relaxation enhancement for the characterization of transient low-population states of biological macromolecules and their complexes. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4108–4139 (siehe S. 20, 66).
- [79] M. J. Knight, A. J. Pell, I. Bertini, I. C. Felli, L. Gonnelli, R. Pierattelli, T. Herrmann, L. Emsley, G. Pintacuda. Structure and backbone dynamics of a microcrystalline metalloprotein by solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 11095–11100 (siehe S. 20 f.).
- [80] J. L. Battiste, G. Wagner. Utilization of site-directed spin labeling and high-resolution heteronuclear nuclear magnetic resonance for global fold determination of large proteins with limited nuclear overhauser effect data. *Biochemistry* **2000**, *39*, 5355–5365 (siehe S. 20).
- [81] P. S. Nadaud, J. J. Helmus, N. Hofer, C. P. Jaroniec. Long-range structural restraints in spin-labeled proteins probed by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7502–7503 (siehe S. 20).
- [82] K. R. Thurber, W.-M. Yau, R. Tycko. Low-temperature dynamic nuclear polarization at 9.4 T with a 30 mW microwave source. *J. Magn. Reson.* **2010**, *204*, 303–313 (siehe S. 21, 92).
- [83] N. P. Wickramasinghe, M. A. Shaibat, C. R. Jones, L. B. Casabianca, A. C. de Dios, J. S. Harwood, Y. Ishii. Progress in ^{13}C and ^1H solid-state nuclear magnetic resonance for paramagnetic systems under very fast magic angle spinning. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052210 (siehe S. 21, 60 f., 93).
- [84] A. S. Lipton, R. W. Heck, W. A. de Jong, A. R. Gao, X. Wu, A. Roehrich, G. S. Harbison, P. D. Ellis. Low temperature ^{65}Cu NMR spectroscopy of the Cu^+ site in azurin. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13992–13999 (siehe S. 21).
- [85] A. Gansmüller, M. Concistrè, N. Mclean, O. G. Johannessen, I. Marín-Montesinos, P. M. Bovee-Geurts, P. Verdegem, J. Lugtenburg, R. C. D. Brown, W. J. Degrip, M. H. Levitt. Towards an interpretation of ^{13}C chemical shifts in bathorhodopsin, a functional intermediate of a G-protein coupled receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 1350–1357 (siehe S. 21).

-
- [86] A. Lesage, M. Lelli, D. Gajan, M. A. Caporini, V. Vitzthum, P. Miéville, J. Alauzun, A. Roussey, C. Thieuleux, A. Mehdi, G. Bodenhausen, C. Copéret, L. Emsley. Surface enhanced NMR spectroscopy by dynamic nuclear polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15459–15461 (siehe S. 21, 92).
- [87] H. Spiess. Deuteron NMR - a new tool for studying chain mobility and orientation in polymers. *Adv. Polym. Sci.* **1985**, *66*, 23–58 (siehe S. 22).
- [88] V. S. Bajaj, P. C. A. van der Wel, R. G. Griffin. Observation of a low-temperature, dynamically driven structural transition in a polypeptide by solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 118–128 (siehe S. 22, 24, 57).
- [89] J. Long, B. Sun, A. Bowen, R. Griffin. Molecular-dynamics and magic-angle-spinning NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11950–11956 (siehe S. 22).
- [90] D. Maus, V. Copie, B. Sun, J. Griffiths, R. Griffin, S. Luo, R. Schrock, A. Liu, S. Seidel, W. Davis, A. Grohmann. A solid-state NMR study of tungsten methyl group dynamics in $[W(\eta^5-C_5Me_5)Me_4][PF_6]$. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5665–5671 (siehe S. 22).
- [91] M. Warkentin, R. E. Thorne. Slow cooling and temperature-controlled protein crystallography. *J. Struct. Funct. Genomics* **2010**, *11*, 85–89 (siehe S. 22, 25, 89).
- [92] J. Szein, K. Noble, J. Farley, L. Mobraaten. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* **2001**, *42*, 28–39 (siehe S. 22).
- [93] B. S. Bhatnagar, R. H. Bogner, M. J. Pikal. Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm. Dev. Technol.* **2007**, *12*, 505–523 (siehe S. 23).
- [94] R. Sinibaldi, M. G. Ortore, F. Spinozzi, F. Carsughi, H. Frielinghaus, S. Cinelli, G. Onori, P. Mariani. Preferential hydration of lysozyme in water/glycerol mixtures: a small-angle neutron scattering study. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 235101 (siehe S. 23).
- [95] A. B. Siemer, C. Ritter, M. Ernst, R. Riek, B. H. Meier. High-resolution solid-state NMR spectroscopy of the prion protein HET-s in its amyloid conformation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2441–2444 (siehe S. 23).
- [96] I. D. Kuntz, T. S. Brassfield, G. D. Law, G. V. Purcell. Hydration of macromolecules. *Science* **1969**, *163*, 1329–1331 (siehe S. 23).
- [97] J. E. Ramirez, J. R. Cavanaugh, J. M. Purcell. Nuclear magnetic resonance studies of frozen aqueous solutions. *J. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 807–810 (siehe S. 23).

- [98] J. Qvist, E. Persson, C. Mattea, B. Halle. Time scales of water dynamics at biological interfaces: peptides, proteins and cells. *Faraday Discuss.* **2008**, *141*, 131–144 (siehe S. 23, 69).
- [99] W. Doster. The protein-solvent glass transition. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 3–14 (siehe S. 23 ff.).
- [100] G. Taborsky in *Proteins at low temperatures*. (Hrsg.: O. Fennema), ACS Publications, Washington, DC, **1979**, S. 1–26 (siehe S. 23).
- [101] K. Tompa, P. Bánki, M. Bokor, P. Kamasa, G. Lasanda, P. Tompa. Interfacial water at protein surfaces: wide-line NMR and DSC characterization of hydration in ubiquitin solutions. *Biophys. J.* **2009**, *96*, 2789–2798 (siehe S. 23).
- [102] M. G. Mazza, K. Stokely, S. E. Pagnotta, F. Bruni, H. E. Stanley, G. Franzese. More than one dynamic crossover in protein hydration water. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 19873–19878 (siehe S. 23).
- [103] M. Vogel. Temperature-dependent mechanisms for the dynamics of protein-hydration waters: a molecular dynamics simulation study. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 9386–9392 (siehe S. 23).
- [104] P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. H. McMahon, R. D. Young. Bulk-solvent and hydrationshell fluctuations, similar to α - and β -fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 14408–14413 (siehe S. 23 f.).
- [105] A. B. Siemer, K.-Y. Huang, A. E. McDermott. Protein-ice interaction of an antifreeze protein observed with solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 17580–17585 (siehe S. 23).
- [106] K. L. Ngai, S. Capaccioli, N. Shinyashiki. The protein "glass" transition and the role of the solvent. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 3826–3832 (siehe S. 24 f.).
- [107] H. Jansson, J. Swenson. The protein glass transition as measured by dielectric spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 20–26 (siehe S. 24 f.).
- [108] A. M. Tsai, D. A. Neumann, L. N. Bell. Molecular dynamics of solid-state lysozyme as affected by glycerol and water: a neutron scattering study. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 2728–2732 (siehe S. 24 f.).
- [109] C. U. Kim, M. W. Tate, S. M. Gruner. Protein dynamical transition at 110 K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 20897–20901 (siehe S. 24).

-
- [110] J. Roh, V. Novikov, R. Gregory, J. Curtis, Z. Chowdhuri, A. Sokolov. Onsets of anharmonicity in protein dynamics. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, 038101 (siehe S. 24).
- [111] G. Caliskan, R. M. Briber, D. Thirumalai, V. Garcia-Sakai, S. A. Woodson, A. P. Sokolov. Dynamic transition in tRNA is solvent induced. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 32–33 (siehe S. 24).
- [112] L. Vugmeyster, D. Ostrovsky, J. J. Ford, A. S. Lipton. Freezing of dynamics of a methyl group in a protein hydrophobic core at cryogenic temperatures by deuterium NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4038–4039 (siehe S. 24).
- [113] T. Besara, P. Jain, N. S. Dalal, P. L. Kuhns, A. P. Reyes, H. W. Kroto, A. K. Cheetham. Mechanism of the order–disorder phase transition, and glassy behavior in the metal-organic framework $[(\text{CH}_3)_2\text{NH}_2] \text{Zn}(\text{HCOO})_3$. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 6828–6832 (siehe S. 24).
- [114] C. A. Angell. The old problems of glass and the glass transition, and the many new twists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 6675–6682 (siehe S. 25).
- [115] M. M. Teeter, A. Yamano, B. Stec, U. Mohanty. On the nature of a glassy state of matter in a hydrated protein: Relation to protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 11242–11247 (siehe S. 25).
- [116] N. Shinyashiki, W. Yamamoto, A. Yokoyama, T. Yoshinari, S. Yagihara, R. Kita, K. L. Ngai, S. Capaccioli. Glass transitions in aqueous solutions of protein (bovine serum albumin). *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 14448–14456 (siehe S. 25).
- [117] K.-N. Hu, R. H. Havlin, W.-M. Yau, R. Tycko. Quantitative determination of site-specific conformational distributions in an unfolded protein by solid-state nuclear magnetic resonance. *J. Mol. Biol.* **2009**, *392*, 1055–1073 (siehe S. 24, 45).
- [118] K. R. Thurber, R. Tycko. Biomolecular solid state NMR with magic-angle spinning at 25 K. *J. Magn. Reson.* **2008**, *195*, 179–186 (siehe S. 24, 45).
- [119] W. T. Franks, D. H. Zhou, B. J. Wylie, B. G. Money, D. T. Graesser, H. L. Frericks, G. Sahota, C. M. Rienstra. Magic-angle spinning solid-state NMR spectroscopy of the $\beta 1$ immunoglobulin binding domain of protein G (GB1): ^{15}N and ^{13}C chemical shift assignments and conformational analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12291–12305 (siehe S. 24).
- [120] S. Kriminski, M. Kazmierczak, R. E. Thorne. Heat transfer from protein crystals: implications for flash-cooling and X-ray beam heating. *Acta. Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 697–708 (siehe S. 25, 89).

- [121] D. H. Juers, J. Lovelace, H. D. Bellamy, E. H. Snell, B. W. Matthews, G. E. O. Borgstahl. Changes to crystals of Escherichia coli β -galactosidase during room-temperature/low-temperature cycling and their relation to cryo-annealing. *Acta. Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 1139–1153 (siehe S. 25, 89).
- [122] Y. L. Lee, T. T. Li. Crystallization and preliminary crystallographic study of the phosphoglucose isomerase from Bacillus subtilis. *Acta Crystallogr. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2008**, *64*, 1181–1183 (siehe S. 25).
- [123] B. Dean, F. Bymaster, E. Scarr. Muscarinic receptors in schizophrenia. *Curr. Mol. Med.* **2003**, *3*, 419–426 (siehe S. 26).
- [124] J. Kawamata, S. Shimohama. Stimulating nicotinic receptors trigger multiple pathways attenuating cytotoxicity in models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *24*, 95–109 (siehe S. 26).
- [125] M. Quik, S. Wonnacott. $\alpha 6\beta 2^*$ and $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors as drug targets for Parkinson's disease. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 938–966 (siehe S. 26 f.).
- [126] C. Pope, S. Karanth, J. Liu. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environ. Toxicol. Phar.* **2005**, *19*, 433–446 (siehe S. 26).
- [127] O. Loewi. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch.* **1921**, *189*, 239–242 (siehe S. 26).
- [128] M. Ishii, Y. Kurachi. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 3573–3581 (siehe S. 26).
- [129] K. Haga, A. C. Kruse, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W. I. Weis, T. Okada, B. K. Kobilka, T. Haga, T. Kobayashi. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* **2012**, *482*, 547–551 (siehe S. 26).
- [130] V. Cherezov, D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. F. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H.-J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, R. C. Stevens. High-resolution crystal structure of an engineered human beta(2)-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, *318*, 1258–1265 (siehe S. 26).
- [131] S. G. F. Rasmussen, H.-J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. P. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. X. Schertler, W. I. Weis, B. K. Kobilka. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **2007**, *450*, 383–387 (siehe S. 26).
- [132] J. Changeux, S. J. Edelstein. Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, *11*, 369–377 (siehe S. 26 f.).

-
- [133] F. Hucho, C. Weise. Ligand-gated ion channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3100–3116 (siehe S. 26).
- [134] M. Numberger, A. Draguhn. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor. *Biol. unserer Zeit* **1991**, *21*, 148–155 (siehe S. 27).
- [135] M. Lipovsek, G. J. Im, L. F. Franchini, F. Pisciotano, E. Katz, P. A. Fuchs, A. B. Elgoyhen. Phylogenetic differences in calcium permeability of the auditory hair cell cholinergic nicotinic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012** (siehe S. 27).
- [136] O. K. Steinlein, J. C. Mulley, P. Propping, R. H. Wallace, H. A. Phillips, G. R. Sutherland, I. E. Scheffer, S. F. Berkovic. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$ subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat. Genet.* **1995**, *11*, 201–203 (siehe S. 27).
- [137] O. Steinlein. Neuronal nicotinic receptors in human epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *393*, 243–247 (siehe S. 27).
- [138] M. De Fusco, A. Becchetti, A. Patrignani, G. Annesi, A. Gambardella, A. Quattrone, A. Ballabio, E. Wanke, G. Casari. The nicotinic receptor beta 2 subunit is mutant in nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 275–276 (siehe S. 27).
- [139] C. D. Fowler, Q. Lu, P. M. Johnson, M. J. Marks, P. J. Kenny. Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signalling controls nicotine intake. *Nature* **2011**, *471*, 597–601 (siehe S. 27).
- [140] G. Brannigan, D. N. LeBard, J. Hémin, R. G. Eckenhoff, M. L. Klein. Multiple binding sites for the general anesthetic isoflurane identified in the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 14122–14127 (siehe S. 28).
- [141] S. Arneric, M. Holladay, M. Williams. Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1092–1101 (siehe S. 28).
- [142] M. D. Meyer. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as a target for the treatment of neuropathic pain. *Drug. Develop. Res.* **2006**, *67*, 355–359 (siehe S. 28).
- [143] B. Billen, R. Spurny, M. Brams, R. van Elk, S. Valera-Kummer, J. L. Yakel, T. Voets, D. Bertrand, A. B. Smit, C. Ulens. Molecular actions of smoking cessation drugs at alpha 4 beta 2 nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 9173–9178 (siehe S. 28).
- [144] P. Caponnetto, C. Russo, R. Polosa. Smoking cessation: present status and future perspectives. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 229–237 (siehe S. 28).

- [145] R. J. C. Hilf, R. Dutzler. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **2009**, *457*, 115–118 (siehe S. 28).
- [146] R. J. C. Hilf, R. Dutzler. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **2008**, *452*, 375–379 (siehe S. 28).
- [147] N. Bocquet, H. Nury, M. Baaden, C. Le Poupon, J.-P. Changeux, M. Delarue, P.-J. Corringer. X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* **2009**, *457*, 111–114 (siehe S. 28).
- [148] Y. Bourne, T. T. Talley, S. Hansen, P. Taylor, P. Marchot. Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake alpha-neurotoxins and nicotinic receptors. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1512–1522 (siehe S. 28).
- [149] A. B. Smit, N. I. Syed, D. Schaap, J. van Minnen, J. Klumperman, K. S. Kits, H. Lodder, R. C. van der Schors, R. van Elk, B. Sorgedragger, K. Brejc, T. K. Sixma, W. P. Geraerts. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* **2001**, *411*, 261–268 (siehe S. 28).
- [150] C. D. Dellisanti, Y. Yao, J. C. Stroud, Z.-Z. Wang, L. Chen. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR $\alpha 1$ bound to α -bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 953–962 (siehe S. 28, 44).
- [151] S.-X. Li, S. Huang, N. Bren, K. Noridomi, C. D. Dellisanti, S. M. Sine, L. Chen. Ligand-binding domain of $\alpha 7$ -nicotinic receptor chimera and its complex with agonist. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 1253–1259 (siehe S. 28).
- [152] W. Schiebler, F. Hucho. Membranes rich in acetylcholine receptor: characterization and reconstitution to excitable membranes from exogenous lipids. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *85*, 55–63 (siehe S. 28, 36).
- [153] V. I. Tsetlin, F. Hucho. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *FEBS Lett.* **2004**, *557*, 9–13 (siehe S. 28 f.).
- [154] M. V. L. Bennett. Modes of operation of electric organs. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, *94*, 458–509 (siehe S. 28).
- [155] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 5. Aufl., **2003** (siehe S. 28).
- [156] C. J. B. da Costa, R. Michel Sturgeon, A. K. Hamouda, M. P. Blanton, J. E. Baenziger. Structural characterization and agonist binding to human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *407*, 456–460 (siehe S. 29).

-
- [157] N. Unwin. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 967–989 (siehe S. 29, 44).
- [158] N. Unwin. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 91–95 (siehe S. 29).
- [159] A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, N. Unwin. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **2003**, *423*, 949–955 (siehe S. 29).
- [160] R. Yu, D. J. Craik, Q. Kaas. Blockade of neuronal $\alpha 7$ -nAChR by α -conotoxin ImI explained by computational scanning and energy calculations. *PLoS Comput. Biol.* **2011**, *7*, e1002011 (siehe S. 29).
- [161] R. W. Janes. α -Conotoxins as selective probes for nicotinic acetylcholine receptor subclasses. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 280–292 (siehe S. 29).
- [162] B. Zhang, F. Huang, W. Du. Solution structure of a novel α -conotoxin with a distinctive loop spacing pattern. *Amino Acids* **2012**, *43*, 389–396 (siehe S. 29).
- [163] N. L. Daly, B. Callaghan, R. J. Clark, S. T. Nevin, D. J. Adams, D. J. Craik. Structure and activity of α -conotoxin PeIA at nicotinic acetylcholine receptor subtypes and GABA_B receptor-coupled N-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 10233–10237 (siehe S. 29).
- [164] E. N. Lyukmanova, Z. O. Shenkarev, M. A. Shulepko, K. S. Mineev, D. D’Hoedt, I. E. Kasheverov, S. Y. Filkin, A. P. Krivolapova, H. Janickova, V. Dolezal, D. A. Dolgikh, A. S. Arseniev, D. Bertrand, V. I. Tsetlin, M. P. Kirpichnikov. NMR structure and action on nicotinic acetylcholine receptors of water-soluble domain of human LYNX1. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 10618–10627 (siehe S. 29).
- [165] J. M. Miwa, I. Ibanez-Tallon, G. W. Crabtree, R. Sánchez, A. Sali, L. W. Role, N. Heintz. lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron* **1999**, *23*, 105–114 (siehe S. 29).
- [166] W. Wüster. Asiatic cobras: population systematics of the *Naja naja* species complex (Serpentes: Elapidae) in India and Central Asia. *Herpetologica* **1992**, *48*, 69–85 (siehe S. 30).
- [167] V. I. Tsetlin, E. Karlsson, A. S. Arseniev, Y. N. Utkin, A. M. Surin, V. S. Pashkov, K. A. Pluzhnikov, V. T. Ivanov, V. F. Bystrov, Y. A. Ovchinnikov. EPR and fluorescence study of interaction of *Naja naja* oxiana neurotoxin II and its derivatives with acetylcholine receptor protein from *Torpedo marmorata*. *FEBS Lett.* **1979**, *106*, 47–52 (siehe S. 30).

- [168] V. Chiappinelli, J. Cohen, R. Zigmond. The effects of α - and β -neurotoxins from the venoms of various snakes on transmission in autonomic ganglia. *Brain Res.* **1981**, *211*, 107–126 (siehe S. 30).
- [169] V. I. Tsetlin. Snake venom α -neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 281–286 (siehe S. 30).
- [170] E. Lyukmanova, A. Shulga, D. Arsenieva, K. Pluzhnikov, D. Dolgikh, A. S. Arseniev, M. Kirpichnikov. A large-scale expression in *Escherichia coli* of neurotoxin II from *Naja oxiana* fused with thioredoxin. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2004**, *30*, 25–34 (siehe S. 30).
- [171] L. Krabben, B.-J. van Rossum, F. Castellani, E. Bocharov, A. A. Schulga, A. S. Arseniev, C. Weise, F. Hucho, H. Oschkinat. Towards structure determination of neurotoxin II bound to nicotinic acetylcholine receptor: a solid-state NMR approach. *FEBS Lett.* **2004**, *564*, 319–324 (siehe S. 30, 36, 73).
- [172] A. P. Golovanov, A. L. Lomize, A. S. Arseniev, Y. N. Utkin, V. I. Tsetlin. Two-dimensional ^1H -NMR study of the spatial structure of neurotoxin II from *Naja naja oxiana*. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *213*, 1213–1223 (siehe S. 30, 36, 44).
- [173] A. T. Tu. *Anthony: Venoms: chemistry and molecular biology* - Google Scholar, John Wiley & Sons Inc., New York, 1. Aufl., **1977** (siehe S. 30).
- [174] V. Weis, M. Bennati, M. Rosay, J. A. Bryant, R. G. Griffin. High-field DNP and ENDOR with a novel multiple-frequency resonance structure. *J. Magn. Reson.* **1999**, *140*, 293–299 (siehe S. 31).
- [175] M. Rosay, J. C. Lansing, K. C. Haddad, W. W. Bachovchin, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin. High-frequency dynamic nuclear polarization in MAS spectra of membrane and soluble proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13626–13627 (siehe S. 31, 85, 92).
- [176] K.-N. Hu, H.-H. Yu, T. M. Swager, R. G. Griffin. Dynamic nuclear polarization with biradicals. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10844–10845 (siehe S. 31).
- [177] V. S. Bajaj, M. K. Hornstein, K. E. Kreisler, J. R. Sirigiri, P. P. Woskov, M. L. Mak Jurkauskas, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin. 250 GHz CW gyrotron oscillator for dynamic nuclear polarization in biological solid state NMR. *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 251–279 (siehe S. 31).
- [178] K.-N. Hu, V. S. Bajaj, M. Rosay, R. G. Griffin. High-frequency dynamic nuclear polarization using mixtures of TEMPO and trityl radicals. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 044512 (siehe S. 31).
- [179] T. Maly, G. T. Debelouchina, V. S. Bajaj, K.-N. Hu, C.-G. Joo, M. L. Mak Jurkauskas, J. R. Sirigiri, P. C. A. van der Wel, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin. Dynamic

- nuclear polarization at high magnetic fields. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 052211 (siehe S. 31, 63).
- [180] M. L. Mak Jurkauskas, V. S. Bajaj, M. K. Hornstein, M. L. Belenky, R. G. Griffin, J. Herzfeld. Energy transformations early in the bacteriorhodopsin photocycle revealed by DNP-enhanced solid-state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 883–888 (siehe S. 31).
- [181] J. Pauli, M. Baldus, B. van Rossum, H. de Groot, H. Oschkinat. Backbone and side-chain ^{13}C and ^{15}N signal assignments of the α -spectrin SH3 domain by magic angle spinning solid-state NMR at 17.6 Tesla. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 272–281 (siehe S. 35, 43).
- [182] U. Akbey, S. Lange, W. Trent Franks, R. Linser, K. Rehbein, A. Diehl, B.-J. van Rossum, B. Reif, H. Oschkinat. Optimum levels of exchangeable protons in perdeuterated proteins for proton detection in MAS solid-state NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **2010**, *46*, 67–73 (siehe S. 35, 53, 67).
- [183] U. Akbey, H. Oschkinat, B.-J. van Rossum. Double-nucleus enhanced recoupling for efficient ^{13}C MAS NMR correlation spectroscopy of perdeuterated proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17054–17055 (siehe S. 35, 53, 67).
- [184] L. Krabben, B.-J. van Rossum, S. Jehle, E. Bocharov, E. N. Lyukmanova, A. A. Schulga, A. S. Arseniev, F. Hucho, H. Oschkinat. Loop 3 of short neurotoxin II is an additional interaction site with membrane-bound nicotinic acetylcholine receptor as detected by solid-state NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **2009**, *390*, 662–671 (siehe S. 37, 73).
- [185] C. R. Morcombe, K. W. Zilm. Chemical shift referencing in MAS solid state NMR. *J. Magn. Reson.* **2003**, *162*, 479–486 (siehe S. 38).
- [186] K. R. Thurber, R. Tycko. Measurement of sample temperatures under magic-angle spinning from the chemical shift and spin-lattice relaxation rate of ^{79}Br in KBr powder. *J. Magn. Reson.* **2009**, *196*, 84–87 (siehe S. 39).
- [187] T. D. Goddard, D. G. Kneller. SPARKY 3. *University of California, San Francisco* (siehe S. 43).
- [188] V. Chevelkov, K. Faelber, A. Diehl, U. Heinemann, H. Oschkinat, B. Reif. Detection of dynamic water molecules in a microcrystalline sample of the SH3 domain of α -spectrin by MAS solid-state NMR. *J. Biomol. NMR* **2005**, *31*, 295–310 (siehe S. 44, 54 f., 57).
- [189] V. Agarwal, K. Faelber, M. Hologne, V. Chevelkov, H. Oschkinat, A. Diehl, B. Reif. Comparison of MAS solid-state NMR and X-ray crystallographic data in the analysis of protein dynamics in the solid state. *To be Published (PDB Eintrag)* **2007** (siehe S. 44, 55, 57).

- [190] J. Mills, P. Dean. Three-dimensional hydrogen-bond geometry and probability information from a crystal survey. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 607–622 (siehe S. 44).
- [191] R. Linser, U. Fink, B. Reif. Probing surface accessibility of proteins using paramagnetic relaxation in solid-state NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13703–13708 (siehe S. 44, 55).
- [192] A. H. Linden, W. T. Franks, U. Akbey, S. Lange, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat. Cryogenic temperature effects and resolution upon slow cooling of protein preparations in solid state NMR. *J. Biomol. NMR* **2011**, *51*, 283–292 (siehe S. 45).
- [193] S. Lange, A. H. Linden, U. Akbey, W. Trent Franks, N. M. Loening, B.-J. v. Rossum, H. Oschkinat. The effect of biradical concentration on the performance of DNP-MAS-NMR. *J. Magn. Reson.* **2012**, *216*, 209–212 (siehe S. 45).
- [194] U. Akbey, A. H. Linden, H. Oschkinat. High-temperature dynamic nuclear polarization enhanced magic-angle-spinning NMR. *Appl. Magn. Reson.* **2012**, *43*, 81–90 (siehe S. 45).
- [195] A. H. Linden, S. Lange, W. T. Franks, U. Akbey, E. Specker, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat. Neurotoxin II bound to acetylcholine receptors in native membranes studied by dynamic nuclear polarization NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19266–19269 (siehe S. 45).
- [196] P. Debye. Interferenz von Röntgenstrahlen und Wärmebewegung. *Ann. Phys.* **1913**, *348*, 49–92 (siehe S. 54).
- [197] I. Waller. Zur Frage der Einwirkung der Wärmebewegung auf die Interferenz von Röntgenstrahlen. *Z. Phys. A: At. Nucl.* **1923**, *17*, 398–408 (siehe S. 54).
- [198] K. Trueblood, H. B. Bürgi, H. Burzlaff, J. Dunitz, C. Gramaccioni, H. Schulz, U. Shmueli, S. Abrahams. Atomic displacement parameter nomenclature. Report of a subcommittee on atomic displacement parameter nomenclature. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* **1996**, *52*, 770–781 (siehe S. 55).
- [199] V. Vitzthum, M. A. Caporini, G. Bodenhausen. Solid-state nitrogen-14 nuclear magnetic resonance enhanced by dynamic nuclear polarization using a gyrotron. *J. Magn. Reson.* **2010**, *205*, 177–179 (siehe S. 59, 92).
- [200] N. P. Wickramasinghe, M. Kotecha, A. Samoson, J. Past, Y. Ishii. Sensitivity enhancement in ^{13}C solid-state NMR of protein microcrystals by use of paramagnetic metal ions for optimizing ^1H T_1 relaxation. *J. Magn. Reson.* **2007**, *184*, 350–356 (siehe S. 61, 93).
- [201] R. Linser, V. Chevelkov, A. Diehl, B. Reif. Sensitivity enhancement using paramagnetic relaxation in MAS solid-state NMR of perdeuterated proteins. *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 209–216 (siehe S. 61, 93).

-
- [202] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun. *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*. Clarendon Press, Oxford, 1. Aufl., **1987** (siehe S. 61).
- [203] T. Melnyk, J. Rowlinson. The statistics of the volumes covered by systems of penetrating spheres. *J. Comput. Phys.* **1971**, *7*, 385–393 (siehe S. 66).
- [204] U. Akbey, W. T. Franks, A. Linden, S. Lange, R. G. Griffin, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat. Dynamische Kernpolarisation bei deuterierten Proteinen. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7971–7974 (siehe S. 67).
- [205] U. Akbey, F. Camponeschi, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat. Triple resonance cross-polarization for more sensitive C-13 MAS NMR spectroscopy of deuterated proteins. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2092–2096 (siehe S. 67).
- [206] A. Wróbel. Decrease in 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl (TEMPO) EPR signal in peroxynitrite-treated erythrocyte membranes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2001**, *6*, 941–953 (siehe S. 79).
- [207] M. A. Lam, D. I. Pattison, S. E. Bottle, D. J. Keddie, M. J. Davies. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 2111–2119 (siehe S. 79).
- [208] Y. Matsuki, T. Maly, O. Ouari, H. Karoui, F. Le Moigne, E. Rizzato, S. Lyubenova, J. Herzfeld, T. Prisner, P. Tordo, R. G. Griffin. Dynamic nuclear polarization with a rigid biradical. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4996–5000 (siehe S. 92).
- [209] T. Maly, A.-F. Miller, R. G. Griffin. In situ high-field dynamic nuclear polarization—direct and indirect polarization of ^{13}C nuclei. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 999–1001 (siehe S. 92).

A. Zusammenfassung

Die Strukturaufklärung von Proteinkomplexen oder von Membranproteinen mittels Magnetresonanzspektroskopie (NMR) ist vor allem durch die geringe Sensitivität dieser Methode limitiert. Die dynamische Kernpolarisation (DNP) kann die Intensität von NMR-Signalen um bis zu zwei Größenordnungen steigern, indem die relativ große Polarisation von ungepaarten Elektronen unter Mikrowellenanregung auf Kerne übertragen wird. Erste erfolgreiche Untersuchungen an kleinen Modellmolekülen arbeiten bei Temperaturen um 100 K, so dass die Relaxation der Elektronenspins verlangsamt ist. Erfahrungen, DNP bei Proteinen anzuwenden, sind jedoch kaum vorhanden.

In dieser Arbeit wird der Einfluss der einzelnen experimentellen Parameter untersucht und optimiert, mit dem Ziel auswertbare DNP-Spektren von Proteinen zu erhalten.

In ersten Untersuchungen zeigte sich, dass Proteinsignale bei kryogenen Temperaturen eine starke Linienverbreiterung zeigen. Um die zugrundeliegenden Prozesse zu verstehen, wurden 2D Spektren des Proteins SH3 bei Temperaturen zwischen 295 und 95 K aufgenommen und im Detail analysiert. Es zeigte sich, dass die Linienverbreiterung vor allem inhomogen ist, es sich also einzelne Signale gleichzeitig vorliegender Konformere überlappen. Das Ausmaß der Verbreiterung hängt dabei stark von der jeweiligen Seitenkette ab. Je höher die Beweglichkeit der Seitenkette bei Raumtemperatur, je tiefer die Messtemperatur und je näher das umgebende Hydrationswasser ist, desto stärker sind die Linien verbreitert (Abschnitt 3.1).

Neben den kryogenen Temperaturen unterscheidet vor allem die Zugabe von Radikalen die DNP von konventioneller NMR. Die genutzten Biradikale verändern als Paramagneten die NMR-Parameter von Kernen in ihrer Nähe. Eine genaue Untersuchung und Quantifizierung dieser Effekte wurde mit gefrorenen Lösungen von Prolin durchgeführt. Die Radikale verkürzen die Relaxationszeiten der benachbarten Kerne. Eine schnellere T_1 -Relaxation der Protonen erlaubt dabei eine kürzere Messzeit, während eine schnellere T_2 -Relaxation der Kohlenstoffe deren NMR-Signale homogen verbreitert. Der zweite Effekt wird dabei bei kryogenen Temperaturen durch die oben beschriebene inhomogene Verbreiterung maskiert und tritt erst bei Biradikal-Konzentrationen über 50 mM in Erscheinung. Zusätzlich führt eine verkürzte $T_{1\rho}$ -Zeit bei hohen Radikal-Konzentrationen zu ineffektiven Polarisation-Übertragungen zwischen Kernen. In Summe führen die pa-

ramagnetischen Effekte dazu, dass Kerne in einem Abstand bis zu ungefähr 10 Å um ein radikalischeres Zentrum in der NMR nicht detektierbar sind und die optimale Konzentration an Radikalen für jede Probe unterschiedlich ist (Abschnitt 3.2).

Aus den bisherigen Ergebnissen resultiert, dass zur objektiven Beurteilung der DNP-Eigenschaften einer Probe die Sensitivität ein besserer Parameter ist als die DNP-Verstärkung. Nur so lassen sich die Verminderung des messbaren Probenvolumens und die homogene Verbreiterung durch die Radikale berücksichtigen.

Aufgrund der inhomogenen Signalverbreiterung bei kryogenen Temperaturen stellt sich die Frage, ob DNP-Experimente auch bei intermediären Temperaturen durchgeführt werden können, ohne die DNP-Verstärkung vollständig zu verlieren. Dazu wurden DNP-Messungen von deuteriertem SH3 bei 173 K durchgeführt. Durch die Deuterierung des Proteins sind die gemessenen DNP-Verstärkungsfaktoren bei kryogenen Temperaturen deutlich größer als bei einer protonierten Probe. Bei 173 K beträgt der Verstärkungsfaktor der Protonen noch ca. 11 und die Auflösung der Spektren ist wesentlich besser als bei 95 K. Diese Methode hat für Proben, die deuteriert werden können, in Zukunft ein großes Potenzial (Abschnitt 3.3).

Um zu untersuchen, wie sich Membranproteine mittels DNP messen lassen, wurde als Testsystem Neurotoxin II gebunden an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren in nativen Membranen gewählt. Seitenketten, die an der pikomolaren Bindung des Toxins beteiligt sind, sollten dabei nur eine schwache inhomogene Signalverbreiterung aufweisen. Die Untersuchungen ergaben, dass sich das Biradikal bevorzugt an Protein- und Membranoberflächen anlagert. Dadurch sind die NMR-Signale des Liganden stark homogen verbreitert. Außerdem reagiert das Biradikal mit Probenbestandteilen, wahrscheinlich mit freien Thiolgruppen von Cysteinen, und wird inaktiviert. Durch eine Lagerung bei -20°C lässt sich dieser Effekt ausnutzen, um nur die Radikale nahe des Analyten zu inaktivieren, während im gefrorenen Lösungsmittel aktive Radikale verbleiben. Unter diesen Umständen lassen sich DNP-Signale mit einer Auflösung beobachten, wie sie sonst nur bei Raumtemperatur erhalten wird. So kann ohne Informationsverlust die Messzeit von zehn Tagen auf zehn Stunden reduziert werden (Abschnitt 3.4).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, wie sich DNP-Parameter und Proben optimieren lassen, um die DNP-Spektroskopie für eine Anwendung an Proteinen weiterzuentwickeln. Zwei verschiedene Wege wurden aufgezeigt, die es erlauben, aufgelöste und DNP-verstärkte Spektren von Proteinen zu messen und in Zukunft neue strukturelle Antworten zu finden.

B. Summary (english)

Structure determination of protein-complexes and membrane-proteins with nuclear magnetic resonance (NMR) is limited by the low sensitivity of this method. Dynamic nuclear polarization (DNP) can enhance the intensity of NMR-signals by up to two orders of magnitude due to the transfer of the large polarization of unpaired electrons to nuclei under microwave irradiation. The first successful investigations on small molecules were performed at temperatures around 100 K to slow down the relaxation of the electron-spins. Not much is known about DNP-experiments with proteins.

In this thesis, individual experimental parameters are investigated and optimized with the aim of recording resolved DNP spectra of proteins.

Preliminary experiments show that protein signals broaden at cryogenic temperatures. To understand the underlying processes, two-dimensional spectra of the protein SH3 were recorded at temperatures between 295 and 95 K and analyzed in detail. The line broadening was shown to be primarily inhomogeneous, *i.e.* signals of different conformers, which overlap. The degree of broadening depends strongly on the individual sidechain. The more flexible at room temperature and closer to the hydration-shell the residue is, and the lower the temperature of the measurement, the more the lines are broadened (section 3.1).

Another difference between DNP and conventional NMR is the addition of stable radicals. Being paramagnets, the radicals change the NMR-parameters of nearby nuclei. These effects were investigated in detail and quantified with frozen solutions of proline. The radicals shorten the relaxation-times of surrounding nuclei. Faster T_1 -relaxation of protons allows for a shorter measurement time, whereas faster T_2 -relaxation of carbon homogeneously broadens their signals. The latter effect is masked at cryogenic temperatures by the aforementioned inhomogeneous broadening and only affects the signals at biracial-concentrations above 50 mM. Additionally, a shorter $T_{1\rho}$ -time leads to inefficient polarization transfers between nuclei at high radical concentrations. In sum, the paramagnetic effects make nuclei closer than 10 Å to the radical undetectable with NMR and the optimal concentration of radicals is different for every sample (section 3.2).

These findings suggest that sensitivity is a better parameter to judge the quality of a sample than the DNP-enhancement. Only the sensitivity includes the decrease of mea-

surable volume and the homogeneous broadening due to the radicals.

The observation of inhomogeneous broadening raises the question if DNP-experiments are feasible at intermediate temperatures without fully losing DNP-enhancement. To investigate this possibility, deuterated SH3 was measured at 173 K. Deuteration of the protein leads to significantly higher enhancement factors at cryogenic temperatures as compared to a fully protonated sample. At 173 K, the enhancement of protons is still *ca.* 11 and the resolution of the spectra is substantially better than at 95 K. This method has great potential for samples that can be deuterated (section 3.3).

To investigate how membrane proteins can be measured with DNP, a model system of neurotoxin II bound to nicotinic acetylcholinreceptors in native membranes was chosen. Signals of residues, which participate in the picomolar binding of the toxin, are only weakly affected by inhomogeneous broadening. Additionally, the experiments show that the biradical preferentially accumulates at the protein and membrane surfaces. Hence, the NMR-signals of the ligand are strongly homogeneously broadened. The biradical then reacts with components of the sample, most probably free thiols of cysteins, becoming inactivated. By storing the sample at -20°C , this effect can be used to inactivate the radicals close to the analyte while also keeping active radicals in the solvent. Under these conditions NMR-spectra can be measured with a resolution otherwise only observed at room temperature. In this way it is possible to decrease the measurement time from ten days to ten hours without losing information (section 3.4).

In summary, this work shows how to optimize the DNP-parameters and sample preparation to refine DNP-spectroscopy for the application to proteins. Two different ways are shown, which allow the recording of DNP-enhanced and resolved spectra of proteins and to find new answers to the questions of structural biology.

C. Publikationen

Erstautorschaften

A. H. Linden, W. T. Franks, Ü. Akbey, S. Lange, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, Cryogenic temperature effects and resolution upon slow cooling of protein preparations in solid state NMR. *J. Biomol. NMR*, **2011**, *51*, 283-292.

A. H. Linden, S. Lange, W. T. Franks, Ü. Akbey, E. Specker, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, Neurotoxin II bound to acetylcholine receptors in native membranes studied by dynamic nuclear polarization NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 19266–19269.

S. Lange¹, A. H. Linden¹, Ü. Akbey, W. T. Franks, N. M. Loening, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, The effect of biradical concentration on the performance of DNP-MAS-NMR. *J. Magn. Reson.*, **2012**, *216*, 209–212.

Andere Publikationen

Ü. Akbey, W. T. Franks, A. H. Linden, S. Lange, R. G. Griffin, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, Dynamic nuclear polarization of deuterated proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 7803-7806.

W. T. Franks, A. H. Linden, B. Kunert, B.-J. van Rossum, H. Oschkinat, Solid-state magic-angle spinning NMR of membrane proteins and protein-ligand interactions. *Eur. J. Cell. Biol.*, **2011**, *91*, 340–348.

Ü. Akbey, A. H. Linden, H. Oschkinat, High-temperature dynamic nuclear polarization enhanced MAS-NMR. *Appl. Magn. Reson.*, **2012**, *43*, 81-90.

¹gleichermaßen beteiligte Autoren

D. Anhang

Tabelle D.1.: Tabelle der einzelnen Signale von SH3 bei unterschiedlichen Temperaturen: Die erste Spalte zeigt die β -Stränge an. Die einzelnen Seitenketten sind wie in Abschnitt 3.1 auf Seite 45 farbig markiert: **blau:** Gruppe S; **orange:** Gruppe K; schwarz: nicht eindeutig zuzuordnen. Bei der Zuordnung der Signale über einen Temperaturbereich bedeutet ?: unsicher, da sehr nah bei dem entsprechenden S/N-Grenzwert; *: unsicher durch Überlappung mit anderen Signalen. Die angegebenen B-Werte in \AA^2 sind jeweils der Mittelwert der B-Werte aller Kerne ohne N, C α und CO der Hauptkette (Chevelkov2005; Agarwal2007). Bei zwei unterschiedlichen Werten in einer Struktur wurde der Mittelwert berechnet. Die Wasser-Akzessibilität (WA) wurde mit 15 SH3 Molekülen und einer Kugel mit 1,4 \AA Durchmesser berechnet. Die erhaltene Werte in \AA sind jeweils: A: 0-0,3; B: 0,3-0,3; C: 0,8-1; D: 1-1,5; E: 1,5-1,9; F: 1,9-2,4; G: 2,4-2,8; H: 2,8-3,3; I: 3,3-3,7; J: 3,7-4,4; K: 4,4-4,8; L: 4,8-5,3. Für die Zuordnung der Seitenketten zu den beiden Gruppen wurden nur die sicheren Zuordnungen verwandt.

β	Rest	B-Wert		WA	Gruppe S	Gruppe K		erscheint bei x K
		100 K	293 K			233 K	213 K	
	Glu5							
	Lys6							
	Glu7	30,54	34,39	A	$\gamma\beta$		$\alpha\gamma?$ $\alpha\beta?$	
	Leu8	13,72	25,53	A	C' β $\alpha\beta$ $\alpha\delta_2?$ $\beta\alpha$ $\beta\gamma$ $\delta_1\alpha?$ $\gamma\beta$	$\alpha\delta_1?$ $\beta\delta_1$ $\beta\delta_2$ $\delta_1\beta$ $\delta_2\beta$		
	Val9	14,79	26,24	H	$\alpha\beta$ $\alpha\gamma_1?$ $\alpha\gamma_2$ $\beta\alpha$ $\beta\gamma_1$ $\beta\gamma_2$ $\gamma_1\alpha?$ $\gamma_1\beta$ $\gamma_1\gamma_2?$ $\gamma_2\alpha?$ $\gamma_2\beta$ $\gamma_2\gamma_1?$			
	Leu10	13,9	26,26	G	$\alpha\beta$ $\alpha\delta_1^*$ $\alpha\gamma^*$ $\beta\alpha$ $\beta\delta_2?$ $\delta_1\beta$ $\delta_2\beta$ $\delta_2\gamma$ $\gamma\alpha$ $\gamma\beta$ $\beta\delta_1$ $\beta\gamma$		$\alpha\delta_2?$ $\delta_2\alpha?$	

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle D.1.: Tabelle der einzelnen Signale von SH3 bei unterschiedlichen Temperaturen

β	Rest	B-Wert		WA	Gruppe S	Gruppe K		erscheint bei x K
		100 K	293 K			233 K	213 K	
↓	Ala11	12,93	25,77	G	$\alpha\beta$ C' β ?			
	Leu12	14,6	27,07	G	$\alpha\delta_1?$ $\alpha\delta_2$ $\alpha\gamma$ $\beta\alpha?$ $\beta\delta_2^*$ $\delta_1\alpha?$ $\delta_1\delta_2?$ $\delta_2\beta^*$ $\delta_2\delta_1$ $\delta_2\gamma^*$ $\gamma\alpha$ $\gamma\delta_2^*$	$\delta_2\alpha?$		
	Tyr13	14,8	28,32	G	$\delta\epsilon^*$ $\zeta\beta^*$ $\zeta\delta^*$			233 $\zeta\beta^*$
	Asp14	17,12	30,53	A	$\alpha\beta?$ $\beta\alpha?$			
	Tyr15	12,97	26,47	D	$\delta\epsilon$ $\zeta\epsilon$			133 $\zeta\beta?$ 133 $\zeta\gamma$ 233 $\delta\zeta$ 233 $\gamma\zeta?$
	Gln16	12,2	29,06	A	$\alpha\beta^*$	$\beta\alpha$ $\gamma\beta^*$ $\gamma\alpha$		
	Glu17	13,54	27,44	D	$\beta\alpha?$	$\beta\gamma$ $\gamma\beta$	$\alpha\beta?$	
	Lys18	21,93	33,9	E	$\delta\beta?$ $\delta\epsilon?$	$\alpha\delta$ $\beta\delta$ $\delta\gamma$ $\delta\alpha$ $\gamma\alpha$ $\gamma\beta$	$\delta\gamma$ $\epsilon\gamma$	
	Ser19	17,07	25,13	D		$\alpha\beta$ $\beta\alpha$		
	Pro20	14,58	23,51		$\delta\gamma?$ $\gamma\delta?$	$\alpha\beta$ $\alpha\delta$ $\alpha\gamma$ $\beta\alpha$ $\beta\delta$ $\beta\gamma$ $\delta\beta$ C' $\delta?$ $\gamma\alpha$ $\gamma\beta$	C' α	113 $\alpha\beta?$ 193 $\alpha\beta$ 193 $\beta\alpha$ 193 $\alpha\delta$
	Arg21	28,6	38,85	A				
	Glu22	13,58	25,47	B			$\gamma\beta?$	
	Val23	12,43	23,67	G	$\alpha\gamma_1?$ $\beta\gamma_1$ $\gamma_1\beta$	$\gamma_2\alpha$	$\alpha\beta$ $\beta\alpha$	
	Thr24	12,02	23,95	B		$\beta\gamma$ $\gamma\alpha$ $\gamma\beta$	$\alpha\beta$ $\alpha\gamma$ $\beta\alpha$ C' β	
	Met25	13,48	26,93	E	$\alpha\beta$ $\beta\alpha$ $\beta\gamma^*$	$\gamma\epsilon$		
	Lys26	22,97	28,80	B	$\alpha\beta?$	$\beta\alpha$ $\beta\gamma$ $\delta\alpha$ $\gamma\alpha$ $\gamma\beta$	$\alpha\gamma$	
	Lys27	18,85	27,39	B		$\alpha\delta$ $\alpha\gamma$ $\delta\alpha$ $\gamma\alpha$ $\gamma\beta?$	$\beta\gamma$	
	Gly28			A	C' α			

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle D.1.: Tabelle der einzelnen Signale von SH3 bei unterschiedlichen Temperaturen

β	Rest	B-Wert		WA	Gruppe S	Gruppe K		erscheint bei x K
		100 K	293 K			233 K	213 K	
	Asp29	15,13	24,30	B				
	Ile30	12,46	22,94	B	$\beta\delta$ $\beta\gamma_2$ $\delta\beta$ $\delta\delta$ $\delta\gamma_1$ $\gamma_1\delta$ $\gamma_2\gamma_1?$	$\alpha\gamma_2?$ $\beta\gamma_1$ $\gamma_1\alpha$ $\gamma_1\beta$ $\gamma_2\beta$	$\gamma_1\gamma_2?$	
	Leu31	15,13	28,91	G	$\beta\alpha$ $\beta\gamma$ $\delta_1\beta$ $\gamma\beta$	$\gamma\alpha?$		
	Thr32	14,15	23,57	A	$\alpha\beta$ C' $\beta?$	$\alpha\gamma$ $\gamma\alpha$	$\beta\alpha$ $\beta\gamma$ $\gamma\beta$	
	Leu33	14,25	26,38	D	$\alpha\delta_1?$ $\delta_1\alpha?$ $\delta_2\beta$		$\beta\delta_2$	
	Leu34	14,93	25,84	E	$\alpha\delta_1$ $\beta\delta_1$ $\gamma\delta_2$		$\alpha\delta_2?$ $\delta_2\alpha?$	
↓	Asn35	13,68	24,23	D				
	Ser36	14,25	24,40	A	$\alpha\beta$ $\beta\alpha$			
	Thr37	9,81	22,07	D	C' $\beta?$ $\alpha\beta$ $\beta\alpha$ $\beta\gamma$ $\gamma\beta$		$\alpha\gamma$ $\gamma\alpha$	113 $\alpha\gamma$
	Asn38	10,27	23,06	F				
	Lys39	18,23	35,92	A		$\alpha\delta$ $\alpha\gamma$ $\beta\gamma$ $\delta\alpha$ $\gamma\alpha$		
	Asp40	16,58	29,82	D	$\alpha\beta$ $\beta\alpha$			
	Trp41	13,39	28,03	G	$\delta_1\beta$ $\delta\epsilon$ $\epsilon\delta?$ $\epsilon\zeta?$			
	Trp42	12,25	26,84	I	$\delta\epsilon$ $\delta_1\beta$ $\epsilon\delta?$ $\epsilon\zeta?$ $\gamma\alpha$			113 $\zeta_1\alpha$
	Lys43	19,14	31,5	F	$\alpha\beta$ $\beta\gamma$	$\beta\delta$ $\delta\beta$	$\alpha\delta?$ $\delta\alpha?$ $\gamma\beta?$	
	Val44	14,51	26,91	J	$\alpha\beta$ $\alpha\gamma_1$ $\alpha\gamma_2$ $\beta\alpha$ $\beta\gamma_1$ $\beta\gamma_2$ $\gamma_1\alpha$ $\gamma_1\beta$ $\gamma_1\gamma_2$ $\gamma_2\alpha$ $\gamma_2\beta$ $\gamma_2\gamma_1$			
	Glu45	20,04	37,34	F	$\alpha\gamma$ $\beta\gamma?$ $\gamma\alpha?$ $\gamma\beta?$			
↓	Val46	21,80	38,87	E	$\beta\gamma_2?$			
	Asn47	28,93	41,24	A				
	Asp48	27,06	39,00	C	$\alpha\beta$ $\beta\alpha$			
	Arg49	27,38	33,79	D				

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle D.1.: Tabelle der einzelnen Signale von SH3 bei unterschiedlichen Temperaturen

β	Rest	B-Wert		WA	Gruppe S	Gruppe K		erscheint bei x K
		100 K	293 K			233 K	213 K	
	Gln50	21,61	35,65	A		$\alpha\gamma?$ $\beta\gamma?$ $\gamma\beta?$		
	Gly51			F				
	Phe 52	13,08	26,11	D				
	Val53	13,31	27,06	L	$\alpha\gamma_2?$ $\beta\gamma_1$ $\beta\gamma_2$ $\gamma_1\beta$ $\gamma_1\gamma_2?$ $\gamma_2\alpha$ $\gamma_2\beta$ $\gamma_2\gamma_1$			
↓	Pro54	12,18	26,28		$\alpha\beta$ $\alpha\delta$ $\beta\delta$ $\delta\beta?$ $\delta\gamma$ C' α $\gamma\delta$	$\alpha\gamma$ $\gamma\alpha?$	$\delta\alpha?$	113 $\alpha\delta$
	Ala55	11,66	24,89	B	$\alpha\beta$ $\beta\alpha$			
	Ala56	12,53	25,28	A	$\alpha\beta$ $\beta\alpha$			
↓	Tyr57	15,26	27,94	F	$\delta\beta?$			$\delta\beta?$
	Val58	14,55	27,77	D	$\alpha\gamma_2$ $\beta\gamma_1$ $\beta\gamma_2$ $\gamma_1\beta$ $\gamma_2\alpha$ $\gamma_2\beta$			
	Lys59	23,14	33,22	F		$\alpha\delta$ $\alpha\gamma$ $\beta\gamma$ $\delta\beta$ $\gamma\alpha?$ $\gamma\beta$	$\alpha\beta$ $\beta\delta$	
↓	Lys60	25,96	33,35	A		$\alpha\delta$ $\delta\alpha$ $\gamma\alpha$ $\gamma\beta$	$\beta\gamma$	
	Leu61	21,8	34,47	A		$\alpha\delta_2$ $\beta\delta?$ $\delta_2\alpha?$ $\delta_2\beta?$		
	Asp62							

E. Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich während meiner Promotion unterstützt und meine Arbeit am FMP bereichert haben. Besonders hervorheben möchte ich:

Hartmut Oschkinat, der diese Arbeit erst ermöglicht hat und nie um neue Ideen und Pläne verlegen war.

Christian Freund, der sich als Gutachter zur Verfügung gestellt hat und hoffentlich noch viele positive DNP-Ergebnisse erhalten wird.

Sascha Lange, der als Freund und Kollege fast alles mit mir teilte. Wir waren ein unschlagbares DNP-Team.

Trent Franks, who teached me a lot about solid-state NMR and as a friend discovered Berlin.

Ümit Akbey, who showed us efficient productivity and supplied the office with lots of turkish delights.

Barth-Jan van Rossum, der nicht nur besonders schöne Abbildungen sonder auch immer seine Hilfe und sein Wissen zur Verfügung gestellt hat.

Anne Diehl, die mit viel Geduld meine Arbeit im Labor unterstütz hat. Sie und ihr Labor-Team hatten immer Proben, wenn man sie brauchte.

Nils Cremer, der mit mir Endothelin-Ziele verfolgte.

Edgar Specke, der immer Zeit für Synthesen und interessante Gespräche hatte.

Valerie Paneels und Irmgard Sinning, die wie ich viel Zeit und Hoffnungen in Drosophila-Augen gesteckt haben.

Melanie Rosay, Leo Tometich, Eckard Bez, Patrick Krencker an all other members of the Bruker-DNP-familiy, who always supported us with their knowledge and help.

Michael Beyermann, ohne dessen Endothelin ich nicht weiter gekommen wäre.

Margitha Date, Heike Nikolenko und Karl Sydow, deren Liposomen mehr als nur einen Versuch wert waren.

Ludwig Krabben, der mir seine NTII-Proben überlassen hat.

Gerd Krause, dessen Strukturmodelle zu vielen neuen Plänen führten.

Außerdem möchte ich alle hervorheben, mit denen das Arbeiten nie langweilig wurde, die mir immer halfen und mit denen ich auch fachfremdes austauschen konnte: Benjamin Bardiaux, Johanna Becker-Baldus, Victoria Davies, Matthias Dorn, Jenny Eichhorst,

Matthias Hiller, Alexandra Kiesling, Katharina Koscheck, Britta Kunert, Andy Nieuwkoop, Stefan Markovic, Heidi Petschick, Joren Retel, Marco Röben, Peter Schmieder, Shakeel Ahmad Shahid, Andrea Steuer, Anja Voreck, Anne Wartenberg, Janet Zapke, die gesamte Gruppe von Bernd Reif und alle die ich vergessen haben sollte.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da waren und mich immer unterstützt haben.

Finja, danke!

F. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, Juli 2012

Arne Linden