



Dynamische Kernpolarisation

Die Empfindlichkeit in der Festkörper-NMR

D. Richter, M. Kaushik, B. Corzilius

Die dynamische Kernpolarisation (DNP) wurde bereits vor mehr als 60 Jahren entwickelt [1] und steigert die Empfindlichkeit von NMR um mehrere Größenordnungen. Trotzdem fand diese Technik erst vor wenigen Jahren Einzug in die moderne Hochfeld-NMR. In diesem kurzen Übersichtsartikel werden wir diese Wendung näher erläutern und einige Anwendungen beschreiben.

NMR findet breite Anwendung in der chemischen Analyse oder in der industriellen Qualitätskontrolle. Neben diesen analytischen Anwendungsbereichen spielt die NMR aber auch eine tragende Rolle in angewandter Forschung, zum Beispiel im Gebiet der Strukturbiologie oder der Materialforschung. In diesem Zusammenhang wird die Lösungs-NMR oft an deren Grenzen geführt, da die entsprechenden Probensysteme entweder zu groß für effiziente Orientierungsmittelung sind oder als funktionelle Feststoffe vorliegen. In diesem Fall kommt häufig die Festkörper-NMR, meist in Verbindung mit der sog. „Magic-Angle Spinning“ (MAS) Methode, zum Einsatz. Hierbei wird die Probe mit bis zu ~ 100 kHz im „magischen Winkel“ von 54.74° zum ex-

ternen Magnetfeld rotiert. Dabei kollabieren die meisten anisotropen Wechselwirkungen und ein isotropes NMR-Spektrum ähnlich dem der Lösungs-NMR wird erhalten.

Leider leidet NMR unter einer intrinsisch geringen Empfindlichkeit. Dies ist auf den geringen thermischen Besetzungsunterschied der Spin-Zustände (Spinpolarisation, Abb. 1A) zurückzuführen welche im einfachen Falle eines Kernspins mit $I = 1/2$ durch die Boltzmannverteilung beschrieben werden kann:

$$P_I = \frac{N_\alpha - N_\beta}{N_\alpha + N_\beta} = \tanh\left(\frac{\gamma_I \hbar B_0}{2k_B T}\right) \quad (1)$$

Hierbei bezeichnen N_α und N_β jeweils Populationen der parallel sowie antiparallel orientierten Spins, γ_I das gyromagnetische Verhältnis, B_0 die Flussdichte des externen Magnetfeldes sowie T die Proben temperatur. \hbar und k_B sind die reduzierte Planck- sowie die Boltzmann-Konstante. Wege, diese Polarisation zu erhöhen, sind die Verwendung immer höherer Magnetfelder oder die Verwendung kryogener Temperaturen, wie aus Gl. (1) ersichtlich. Allerdings sind diese Methoden technisch oder anderweitig beschränkt.

Ein kleiner Schritt für einen Spin, ein großer Sprung für die Empfindlichkeit

Eine weitere Möglichkeit, die Kernspinpolarisation und somit NMR-Empfindlichkeit zu erhöhen, ist die Übertragung der sehr viel größeren Spinpolarisation von ungepaarten Elektronen auf die Kerne (Abb. 1B). Durch das um den Faktor 660 (i.V. zu ^1H) größere magnetische Moment kann im Idealfall genau dieses Verhältnis als DNP-Signalverstärkungsfaktor (ϵ) erzielt werden. In der Praxis werden ϵ von bis zu ~ 500 im Falle von Modellsystemen [3], bzw. typischerweise bis zu 250 für isolierte Biomoleküle erzielt [4]. Mit steigender Komplexität der biologischen Proben, z.B. im Falle von Zelllysaten oder ganzen Zellen [5], ergeben sich geringere Verstärkungsfaktoren. Nichtsdestotrotz kann selbst ein „geringes“ ϵ in der Größenordnung 10 eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor $10^2 = 100$ bedeuten.

Dieser Gewinn an Empfindlichkeit kommt allerdings nicht ohne einen gewissen Preis. Zum einen müssen der Probe ungepaarte Elektronen in Form von sog. Polarisationsmitteln (PM) zugesetzt werden (Abb. 2). Während in Pionierzeiten der DNP meist ein-

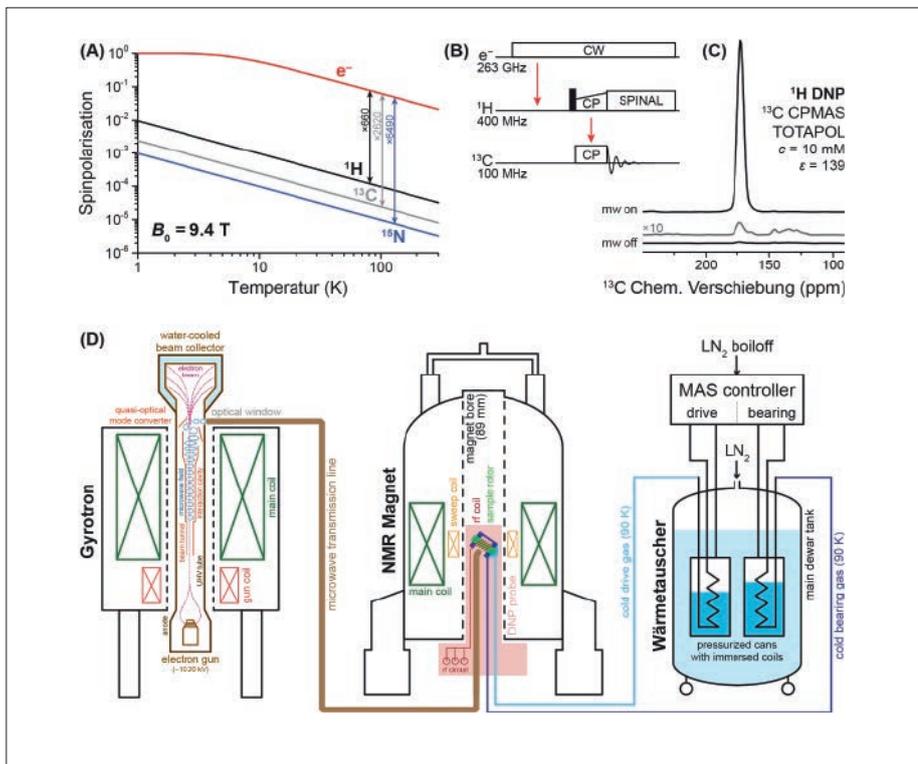


Abb. 1: Spinpolarisation nach Gl. (1) (A); Pulsschema für DNP-verstärkte Kreuzpolarisation (CPMAS) mit Transferpfad der verstärkten Polarisation (rote Pfeile) (B). CPMAS NMR-Signal von 1 M ^{13}C -Harnstoff in d_8 -glycerol/ $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (60/30/10 vol.-%) bei 5 T und 84 K mit (mw on) und ohne (mw off) DNP-Verstärkung, Daten aus [2] (C); Schema eines typischen MAS DNP Instruments (D, Probenkopf, Kryostat sowie variable Temperatur (VT) Zuleitung sind nicht dargestellt).

fache Radikale in relativ hoher Konzentration (40–60 mM) zum Einsatz kamen, wurde dieses Feld im Jahre 2004 durch die Entwicklung von verbrückten bis-Nitroxiden revolutioniert [6]. Durch die Verbrückung werden effiziente dipolare Kopplungen zwischen den Elektronenspins bereitgestellt, welche einen effizienteren Polarisationstransfer bei einer deutlich geringeren Radikalkonzentration von 5–20 mM erlauben (Abb. 1C) und wodurch generell Nachteile durch paramagnetische Relaxation reduziert werden [2]. Weiterhin müssen Experimente bei kryogenen Temperaturen von ~ 100 K durchgeführt werden, was die Ausnutzung sehr effizienter DNP-Mechanismen erlaubt. Das abschließende Problem ist die Erzeugung von Mikrowellen mit einer Strahlungsleistung von mehreren Watt bei Frequenzen zwischen 263 und 527 GHz, um entsprechende Übergänge der Elektronen-Paramagnetischen Resonanz (EPR), die für den DNP-Transfer verantwortlich sind, anzuregen. Diese beiden letztgenannten Aspekte bedeuten nicht

nur einen deutlich höheren Anschaffungs- und Betriebsaufwand sowie potentielle Linienerweiterung durch Inhomogenität in der gefrorenen Lösung, sondern waren auch eine enorme Hürde bei der Entwicklung von MAS DNP bei hohen Magnetfeldern. Zyklotron-Maser, sog. Gyrotrons, konnten erstmalig die benötigte Leistung von etwa 20 W dieser hohen Frequenzen bei kontinuierlichem Betrieb über mehrere Tage liefern [7, 8], während ein effizientes Wärmetauschersystem für die Kühlung von MAS-Gasen durch flüssigen Stickstoff sorgt (Abb. 1D) [9].

Moderne Anwendungen von MAS DNP

Durch die Kombination dieser Entwicklungen in der Arbeitsgruppe um Robert G. Griffin am MIT gelang erstmals die Untersuchung von Zwischenstufen im Photozyklus von Bacteriorhodopsin [15] sowie der strukturbestimmenden Elemente von amyloiden Fibrillen [16, 17]. Diese Erfolge führten im

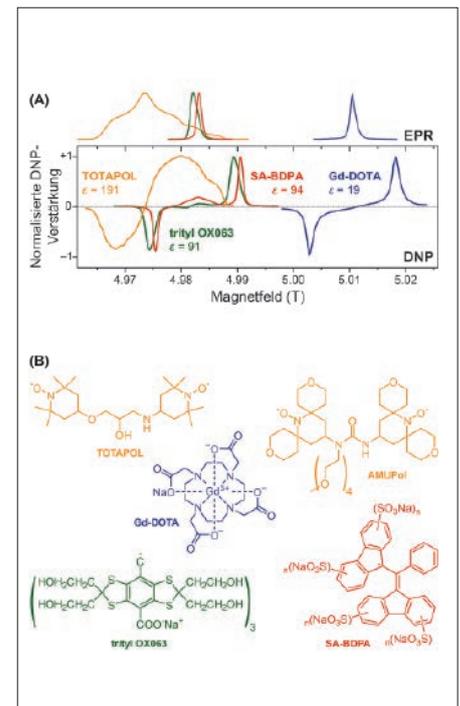


Abb. 2: EPR-Spektren und magnetfeldabhängige Verstärkung (normalisiert auf angegebenes ϵ) von TOTAPOL [10] (10 mM), OX063 [11] (40 mM), SA-BDPA [12] (40 mM) und Gd-DOTA [13] (10 mM) bei einer Mikrowellenfrequenz von 140 GHz (A) sowie deren chemische Struktur (B). Struktur von AMUPol nach Sauvé et al. [14].

Jahre 2009 zur Entwicklung und Vermarktung eines kommerziellen MAS-DNP-Spektrometers durch Bruker Biospin, das bei 9.4 T bzw. 400 MHz arbeitet [18], sowie Weiterentwicklungen bei 14.1 T/600 MHz und 18.8 T/800 MHz. Neben den Anwendungen in Strukturbiologie konnten sich auch die Vorteile von DNP in den Materialwissenschaften durchsetzen. Während NMR ideal für die Untersuchung von oberflächenfunktionalisierten Materialien für die heterogene Katalyse geeignet ist, scheitert dieses Unterfangen generell an der Kombination aus geringer Empfindlichkeit und sehr kleiner Volumenkonzentration der aktiven Zentren. Lesage et al. gelang es, ^1H -Kerne innerhalb der Poren eines gepulverten Trägermaterials zu polarisieren. Durch einen DNP-Verstärkungsfaktor von ~ 50 konnten dadurch Signale von ^{13}C -Kernen der funktionellen organischen Gruppen in natürlicher Isotopenhäufigkeit (1.1%) erstmalig durch MAS NMR sichtbar gemacht und ausgewertet werden [19].

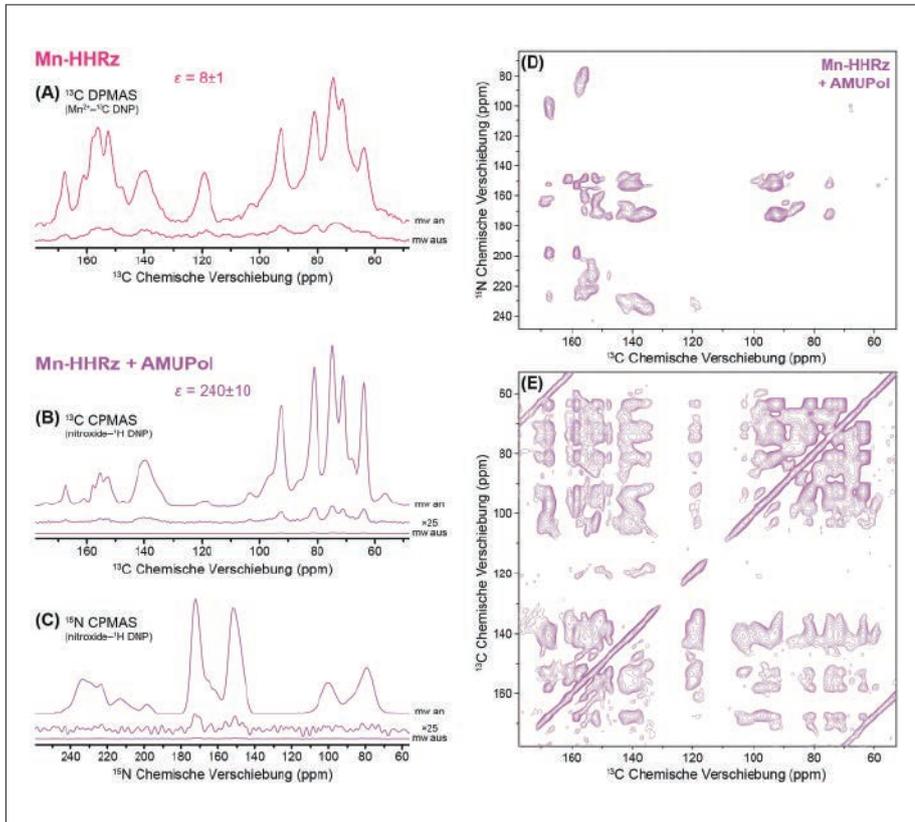


Abb. 3: MAS NMR-Spektrum von Mn-HHRz, direkte Polarisation (DPMAS) ausgelesen durch einzelnen 90° -Puls und DNP-verstärkt durch Mn^{2+} (A). ^{13}C (B) und ^{15}N (C) CPMAS Spektren sowie ^{15}N - ^{13}C (D) und ^{13}C - ^{13}C (E) Korrelationsspektren von Mn-HHRz, DNP-verstärkt durch AMUPol (jeweils $\epsilon = 240$). Alle Daten nach Wenk et al. [4].

Aktuelle Methodenentwicklung

Während in allen bisher genannten Anwendungen exogene Radikale der Probe hinzugefügt wurden, enthalten viele Biomoleküle bereits paramagnetische Zentren, allen voran Metalloproteine und Enzyme. Maly et al. demonstrierten kürzlich die Verwendung eines endogenen Radikals für die DNP eines Proteins [20]. Ein äußerst interessanter Aspekt ist allerdings die Verwendung von paramagnetischen Metallionen auf die sich unsere Forschungsgruppe besonders spezialisiert. Vor einigen Jahren konnten wir die DNP-Aktivität von Gd^{3+} sowie Mn^{2+} nachweisen [13]. Dies erlaubt die Verwendung von natürlichen oder substituierten Metallionen in aktiven Zentren von Biomolekülen für DNP. So gelang es uns z.B. erstmals ein Hammerhead-Ribozym (HHRz) durch endogen gebundenes Mn^{2+} zu polarisieren (Abb. 3A) [4]; dieses RNA-Molekül ist durch Größe und interne Dynamik generell nur bedingt für Lösungs-NMR zugänglich. Weiterhin konnte durch Zugabe eines Biradikals ein Verstärkungsfaktor von 240 erzielt werden (Abb. 3B-E). Dies sind wichtige Schritte in der Etablierung von Festkörper-NMR-basierter RNA-Strukturbiologie, ein experimentelles Feld, das sich gerade in einer sehr

frühen Phase befindet und dessen Entwicklung stark unter der begrenzten Empfindlichkeit leidet [21].

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Finanzierung im Rahmen des Emmy Noether Programms (CO802/2-1). Weiterhin wurde finanzielle und apparative Unterstützung durch das Biomolekulare Magnetresonanzzentrum (BMRZ) erhalten.

Literatur

Alle Referenzen finden Sie online: <http://bit.ly/GIT-Corzilius>

KONTAKT |

Dr. Björn Corzilius

Institut für Physikalische und Theoretische Chemie
 Institut für Biophysikalische Chemie
 Biomolekulares Magnetresonanzzentrum (BMRZ)
 Goethe-Universität Frankfurt am Main
corzilius@solidstateDNP.de