

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Dipl.-Phys. Leif Schröder
aus Itzehoe

Tag der mündl. Prüfung: 15. Oktober 2003

Quantenmechanische Feinstruktur und
molekulare Dynamik gekoppelter Spin- $\frac{1}{2}$ -Systeme
in der *In-vivo*-NMR-Spektroskopie

Gutachter: Priv.-Doz Dr. Peter Bachert
Prof. Dr. Josef Bille

Quantenmechanische Feinstruktur und molekulare Dynamik gekoppelter Spin- $\frac{1}{2}$ -Systeme in der *In-vivo*-NMR-Spektroskopie

In Experimenten an Modell-Lösungen und am lebenden Gewebe (*in vivo*) wurden die Spin- $\frac{1}{2}$ -Systeme der körpereigenen Metaboliten Kreatin, Taurin, Citrat, Carnosin und Adenosin-5'-triphosphat (ATP) mit ^1H -NMR-Spektroskopie bzw. ^{31}P -NMR-Spektroskopie (für ATP) an einem konventionellen Ganzkörper-MR-Tomographen bei 1,5 T untersucht. Die Systeme weisen sowohl skalare als auch residuale dipolare Spin-Spin-Kopplungen verschiedener Stärken auf. Daraus resultieren unterschiedlich starke Drehungen der Eigenbasis eines 2-Spin-Systems, die den Spektren eine charakteristische Feinstruktur in Form veränderter Linienpositionen und -intensitäten aufprägen. Im Fall des Carnosins wurde durch Übertragung der Theorie der ^1H -Hyperfeinstruktur auf das System zweier dipolar koppelter Protonen-Spins eine verallgemeinerte Breit-Rabi-Gleichung hergeleitet, um die residuale Wechselwirkung zweier Ringprotonen des Moleküls nachzuweisen. Aus der Quantifizierung der dipolaren Kopplungsstärken konnte der Ordnungsparameter S verschiedener Molekül-Untereinheiten der Metaboliten bestimmt werden. Dadurch wurden qualitative Aussagen über die Molekulardynamik *in vivo* mit einer nicht-invasiven Technik möglich. Für ATP wurden aus der Feinstruktur die Clebsch-Gordan-Koeffizienten der gekoppelten Spins ermittelt, um eine Verbesserung der Quantifizierung hochaufgelöster ^{31}P -NMR-Spektren der menschlichen Wade zu ermöglichen. Theoretische und experimentelle Betrachtungen zeigten, daß bei einer Grundfeldinduktion von 1,5 T für alle hier untersuchten Metaboliten der Übergang vom Zeeman- zum Paschen-Back-Effekt noch nicht vollständig stattgefunden hat und quantenmechanische Korrekturen – vor allem der Linienintensitäten – für hochaufgelöste Spektren nicht vernachlässigt werden können.

Quantum Mechanical Fine Structure and Molecular Dynamics of Coupled Spin- $\frac{1}{2}$ Systems in *In vivo* NMR Spectroscopy

Experiments on model solutions and living tissue (*in vivo*) were used to study the spin- $\frac{1}{2}$ systems of the endogenous metabolites creatine, taurine, citrate, carnosine and adenosine-5'-triphosphate (ATP) by means of ^1H NMR spectroscopy and ^{31}P NMR spectroscopy (in case of ATP). Measurements were performed on a conventional whole-body MR scanner operating at 1.5 T. The systems exhibit scalar and dipolar couplings of different strength and the resultant varying modifications of the eigenbase of a two-spin system induce a characteristic fine structure in NMR spectra. As a consequence, changes in line positions and intensities can be observed. By transferring the theory of the hydrogen hyperfine interaction to a system of two dipolar-coupled protons, a generalized Breit-Rabi equation was derived in order to detect a residual interaction of two imidazole ring protons of carnosine. The quantification of dipolar coupling strengths allowed to determine the order parameter S of several molecular subgroups and, finally, yielded qualitative information about molecular dynamics *in vivo* by means of a non invasive technique. A detailed study of the fine structure was done to derive the Clebsch-Gordan coefficients of the coupled ^{31}P spins of ATP in order improve quantification of high resolution NMR spectra from human calf muscle. Theoretical and experimental considerations demonstrate that using a field inductivity of 1.5 T the transition from Zeeman to Paschen-Back effect is not yet completed. Therefore, quantum mechanical corrections – in particular for the line intensities – should not be neglected.

Zwei Menschen gewidmet, denen die Gabe, andere ihre Herzlichkeit spüren zu lassen, sie zu begeistern und ihnen ihre Fähigkeiten zu vermitteln, viel zu früh genommen wurde.

Mami * 1936 † 2003

Dr. rer. nat. Ernst Winkel * 1944 † 1999

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Teil I: Quantentheoretische Beschreibung von Spin-Systemen	3
1 Grundlagen der NMR-Spektroskopie	5
1.1 Atomkerne im externen Magnetfeld: Zeeman-Effekt	5
1.2 Makroskopische Magnetisierung einer Probe	6
1.3 Das FID-Experiment	7
1.4 Die chemische Verschiebung	8
1.5 Grundlegende Relaxationsprozesse	9
1.6 Das Spinecho-Experiment	11
2 Skalare Kopplung	13
2.1 Der skalare Hamilton-Operator	13
2.2 Berechnung der Energieniveaus	14
2.2.1 Simultane Eigenfunktionen	14
2.2.2 Eigenwerte des Zeeman-Operators	16
2.2.3 Korrekturterme der skalaren Kopplung	17
2.3 Erlaubte Dipol-Übergänge, Linienintensitäten	17
2.4 Nomenklatur von Spin-Systemen und ihrer Spektren	21
2.5 Extremfall starker bzw. isochroner Kopplung (A_2 -Systeme)	21
2.6 Extremfall schwacher Kopplung (AX-Systeme)	22
2.7 Ausbildung von Multipletts, Composite-Particle-Modell	23
2.7.1 Spektren in der X-Näherung	24
2.7.2 Übergänge in stark gekoppelten Systemen	25
3 Dipolare Kopplung	27
3.1 Der dipolare Hamilton-Operator	27
3.1.1 Säkularer Anteil des Operators	28
3.2 Berechnung der Energieniveaus	30
3.2.1 Simultane Eigenfunktionen	30
3.2.2 Eigenwerte des Zeeman-Operators	31
3.2.3 Korrekturterme der dipolaren Kopplung	31
3.3 Erlaubte Dipol-Übergänge, Linienintensitäten	32
3.4 Extremfall starker bzw. isochroner Kopplung	34
3.5 Extremfall schwacher Kopplung	35

3.6	Dipolare Multipletts bei schneller, aber anisotroper Bewegung	36
3.6.1	Mobilität eines 2-Protonen-Systems	37
3.6.2	Rotation einer CH ₃ -Gruppe	39
3.7	Ordnungsparameter aus Spektren 2. Ordnung	43
4	Analogien zur Hyperfeinstruktur des Wasserstoff-Atoms	47
4.1	Wahl der Observablen, verallgemeinerte Clebsch-Gordan-Koeffizienten . . .	47
4.2	Paschen-Back-Effekt, Breit-Rabi-Formel	48
4.2.1	Breit-Rabi-Diagramm der skalaren Kopplung	50
4.2.2	Breit-Rabi-Diagramm der dipolaren Kopplung	52
4.2.3	Sonderfall isochroner Systeme	54
4.2.4	Hanle-Effekt, Interkombinationsverbot	56
5	Vergleich von skalarer und dipolarer Kopplung	59
5.1	Die Hamilton-Operatoren	59
5.2	Spektren stark gekoppelter Systeme	59
5.2.1	Kumulierter Dach-Effekt dublierter Dubletts	62
5.3	Spinecho-Experiment an stark gekoppelten Systemen	63
Teil II: Biochemische und apparative Grundlagen		67
6	Eigenschaften der untersuchten Metaboliten	69
6.1	Kreatin und Phosphokreatin	69
6.2	Carnosin	70
6.3	Adenosin-5'-triphosphat	72
6.4	Citrat	74
6.5	Taurin	77
7	Lokalisierte NMR-Spektroskopie	81
7.1	Der Ganzkörpermograph und das Spulensystem	81
7.2	¹ H-NMR-Spektroskopie	82
7.2.1	Unterdrückung von Wasser- und Fett-Signalen	82
7.2.2	PRESS und STEAM	84
7.3	³¹ P-NMR-Spektroskopie	86
7.3.1	CSI	87
7.3.2	³¹ P- ^{{1}H} -Spin-Entkopplung und Cross-Polarisation	87
7.4	Nachbearbeitung der Daten	88
7.5	Simulation mit WinDNMR-Pro	89
Teil III: Experimentelle Ergebnisse		91
8	Untersuchung skalarer Kopplungen <i>in vitro</i>	93
8.1	Die AB-Systeme Citrat und Taurin	93
8.2	Das AMX-System ATP	97
8.2.1	Spektren des unkomplexierten ATP	97
8.2.2	Spektren des Komplexes MgATP	101

8.3	Das Carnosin-Spektrum	105
8.3.1	Hinweise auf skalare Kopplungen innerhalb des Imidazol-Rings . . .	105
8.3.2	Identifikation der detektierbaren NH-Gruppe	106
8.3.3	Einfluß der Komplexbildung mit Cu^{2+}	108
8.4	Ionische Bindungen <i>in vitro</i> : Taurin mit Phospholipiden	110
9	Untersuchung gekoppelter Systeme <i>in vivo</i>	113
9.1	Untersuchte Muskelgewebe	113
9.2	Dipolare Kopplung im Phosphokreatin	114
9.2.1	Sichtbare Linienaufspaltungen	114
9.2.2	Bestimmung der Faserorientierung	115
9.2.3	Phasenmodulation des Methylen-Dubletts	116
9.2.4	Kopplungskonstante der (P)Cr-Methylgruppe	118
9.3	Dipolare Kopplungen im Taurin	119
9.4	Dipolare Kopplung im Carnosin	122
9.4.1	Nachweis der dipolaren Kopplung H2-H4	122
9.4.2	Alternative Bestimmung der Kopplungskonstanten aus den Asymmetrien	125
9.5	Molekulardynamik: Vergleich der Kopplungsstärken	127
9.6	Skalare Kopplung im ATP	127
9.7	Skalare Kopplung im Citrat	129
	Teil IV: Diskussion und Zusammenfassung	131
10	Diskussion der Ergebnisse	133
10.1	Stark gekoppelte Systeme wie Citrat und Taurin	133
10.1.1	Vorwissen aus den <i>In-vitro</i> -Studien	133
10.1.2	Auswirkungen der Effekte <i>in vivo</i>	136
10.2	Feinstruktur des ATP-Spektrums	137
10.2.1	Vorwissen aus den <i>In-vitro</i> -Studien	137
10.2.2	Auswirkungen der Effekte <i>in vivo</i>	138
10.2.3	Konsequenzen einer leichten Drehung der Eigenbasis	140
10.3	Erklärung des Carnosin-Spektrums	140
10.3.1	Skalare Kopplungen und detektierbare Protonen in den <i>In-vitro</i> -Studien	140
10.3.2	Nachweis residualer dipolarer Kopplung <i>in vivo</i>	141
10.3.3	Hinweise auf eine großräumige Fixierung des Moleküls <i>in vivo</i>	145
10.4	Bestimmung der residualen Kopplungsstärken	147
10.5	Phospholipide zum Verständnis der Molekulardynamik <i>in vivo</i>	148
10.5.1	Substruktur der Muskelzelle, Eigenschaften von Membranen	149
10.5.2	Interaktion von Taurin und Phospholipiden als Ausgangspunkt . . .	151
10.5.3	Übertragung des Modells auf Kreatin	154
10.5.4	Anhaltspunkte für die Dynamik von Carnosin an Membranen	157
10.6	Carbonyl-Gruppen bei der Glycation; Fixierung aminohaltiger Metaboliten	159
10.6.1	Bedeutung von Cs bei der Glycation	160
10.6.2	Erweiterung des Modells auf andere Metaboliten	162

11 Résumé und Ausblick	165
Literaturverzeichnis	169
Abbildungsverzeichnis	181

Einleitung

Commonplace as such experiments have become in our laboratories, I have not yet lost a feeling of wonder, and of delight, that this delicate motion should reside in all the ordinary things around us, revealing itself only to him who looks for it. I remember, in the winter of our first experiments, just seven years ago, looking on snow with new eyes. There the snow lay around my doorstep - great heaps of protons quietly precessing in the earth's magnetic field.

Edward M. Purcell, Nobel-Vortrag 1952

Nach der experimentellen Entdeckung der Kernspinresonanz (NMR) in kondensierter Materie durch die beiden unabhängigen Arbeitsgruppen von BLOCH und PURCELL 1946 kam es schon bald zu weiterführenden Ergebnissen, die Aufschluß über die Feinstruktur der NMR-Spektren lieferten. Die zwei Arten der Wechselwirkung von Kernen in Molekülen (direkt und indirekt) machten die NMR-Spektroskopie in experimenteller Hinsicht zu einem der grundlegenden Analyseverfahren von Molekülstrukturen und Reaktionsabläufen in der Chemie und Biologie sowie von Kristallstrukturen in der Festkörperphysik. Zu Beginn der hochauflösenden NMR war die Wechselwirkung von Drehimpulsen in der Quantenmechanik bereits ein gelöstes Problem und erlaubte eine detaillierte theoretische Analyse z. B. des Wasserstoff-Spektrums. Die NMR-Spektroskopie an Molekülen war somit prädestiniert für eine präzise quantenmechanische Beschreibung und ist heute, besonders aufgrund der binären Eigenschaften von ^1H -Kernen im Rahmen des Quantencomputing, Gegenstand aktueller Forschung.

Seit 1979 wird die NMR auch in der medizinischen Diagnostik vor allem in Form der MR-Tomographie genutzt. Darüber hinaus wird seit der Verfügbarkeit von Lokalisationsmethoden Ende der 1980er Jahre die NMR-Spektroskopie zur nicht-invasiven Untersuchung der Stoffwechselfvorgänge *in vivo* eingesetzt. Hier spielt vor allem die Detektion von ^1H -Kernen eine wichtige Rolle. Hinzu kommen andere Kerne wie ^{31}P , ^{13}C , ^{19}F und ^{23}Na .

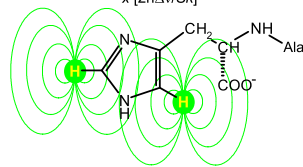
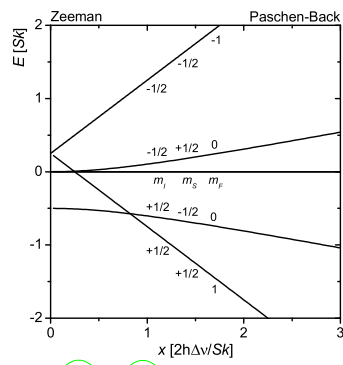
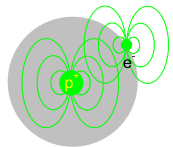
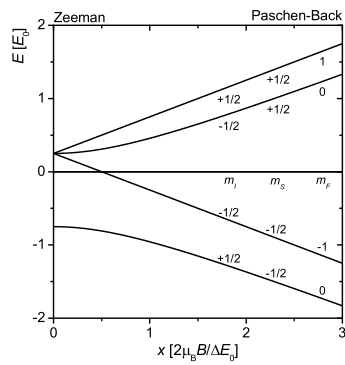
Die Untersuchung der direkten Spin-Spin-Kopplung war zunächst eine Methode der Festkörper-NMR und gewann anschließend Bedeutung in der Strukturaufklärung von Makromolekülen. Fortschritte auf dem Gebiet der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie ermöglichen heute die Darstellung selbst komplexer Strukturen in wäßriger Lösung (Nobelpreis für Chemie 2002). Inzwischen rückt diese Wechselwirkung auch zunehmend in das Interesse der *In-vivo*-NMR, da die resultierende Feinstruktur des Spektrums einen bisher ungenutzten Zugang zu Informationen über die Moleküldynamik beinhaltet. Dabei stellen Analogien zur Hyperfeinstruktur des ^1H -Spektrums eine interessante Möglichkeit zur Ana-

lyse der Spektren dar. Obwohl die residuale direkte Wechselwirkung ebenso wie die indirekte Kopplung im Vergleich zur Hyperfeinstruktur ein schwacher Effekt ist, können prinzipiell beide Interaktionen bei den gebräuchlichen Feldern eines Ganzkörper-MR-Tomographen (1,5 T) als starke Kopplung mit den entsprechenden Abweichungen vom Paschen-Back-Effekt auftreten.

Die vorliegende Arbeit soll zunächst den theoretischen Hintergrund der Feinstruktur von *In-vivo*-NMR-Spektren klären und dann quantitative Aussagen über die gekoppelten Spinsysteme und die damit verbundenen Aufschlüsse über die Dynamik bestimmter endogener Metaboliten liefern. Dabei wird auch der biochemische Hintergrund miteinbezogen, um einen Zusammenhang zwischen den Aussagen bezüglich der Dynamik und der Funktion der Moleküle im lebenden Gewebe herzustellen.

Teil I

Quantentheoretische Beschreibung von Spin-Systemen



When the great innovation appears, it will almost be in a muddled, incomplete and confusing form. To the discoverer himself it will only be half-understood; to everybody else it will be a mystery. For any speculation which does not at first glance look crazy, there is no hope.

Freeman J. Dyson, *1923

Kapitel 1

Grundlagen der NMR-Spektroskopie

1.1 Atomkerne im externen Magnetfeld: Zeeman-Effekt

Alle Atomkerne mit ungerader Nukleonenzahl besitzen einen nicht verschwindenden Eigendrehimpuls \vec{I} – auch Spin genannt –, mit dem ein magnetisches Moment $\vec{\mu}$ verbunden ist. Beide sind über das kernspezifische gyromagnetische Verhältnis γ miteinander verknüpft:

$$\hat{\mu} = \gamma \hat{I}. \quad (1.1)$$

Das Spinsystem ist durch seine Drehimpulsquantenzahl I und die magnetische Spinquantenzahl m gekennzeichnet ($m = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I$). Dabei gelten die aus der Quantenmechanik bekannten Regeln für den Betrag des Drehimpulses und die Größe der z -Komponente. Die Anwendung der Operatoren auf einen Drehimpulseigenzustand $|I, m\rangle$ liefert:

$$\begin{aligned} \hat{I}^2 |I, m\rangle &= \hbar^2 I(I + 1) |I, m\rangle \\ \hat{I}_z |I, m\rangle &= \hbar m |I, m\rangle. \end{aligned} \quad (1.2)$$

Die Wechselwirkung des magnetischen Moments mit einem äußeren Magnetfeld \vec{B} der Form $\vec{B} = (0, 0, B_0)$ wird quantenmechanisch durch folgenden Hamiltonoperator beschrieben:

$$\hat{H}_Z = -\hat{\mu} \cdot \vec{B} = -\gamma \hat{I} \cdot \vec{B} = -\gamma \hat{I}_z B_0. \quad (1.3)$$

Die Eigenzustände von \hat{H}_Z sind also nach (1.2) gleich den Drehimpulseigenzuständen $|I, m\rangle$. Folglich erhält man aus der Schrödingergleichung

$$\hat{H}_Z |I, m\rangle = E_m |I, m\rangle$$

die Energieeigenwerte E_m der verschiedenen Zustände. Für das obige Feld also

$$E_m = -\gamma \hbar m B_0. \quad (1.4)$$

Die durch das äußere Feld aufgehobene Entartung der Zustände bezeichnet man auch als Zeeman-Effekt, bei dem eine Aufspaltung in $2I + 1$ äquidistante Niveaus stattfindet. Die Energiedifferenz beträgt

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0.$$

Wegen dieser Äquidistanz wird man im Experiment nur eine Resonanzlinie beobachten. Auf die zeitliche Entwicklung des Spins wird im nächsten Abschnitt eingegangen, wenn eine makroskopische Probe mit einer großen Anzahl an Kernen betrachtet wird.

1.2 Makroskopische Magnetisierung einer Probe

In einer makroskopischen Probe mit N unabhängigen Kernen im Volumen V werden beim Anlegen eines konstanten äußeren Feldes der oben beschriebenen Form die $2I+1$ möglichen Energieniveaus entsprechend der Boltzmann-Statistik besetzt. Die Besetzungswahrscheinlichkeit für das Niveau m beträgt demnach:

$$p_m = \frac{1}{Z} e^{-E_m/kT}.$$

Dabei ist Z die Zustandssumme des Systems: $Z = \sum_{m=-I}^I e^{-E_m/kT}$. Bei Raum- bzw. Körpertemperatur kann aufgrund $\gamma\hbar B_0 \ll kT$ eine Taylor-Entwicklung (Hochtemperatur-Näherung) der Exponentialfunktionen gemacht werden:

$$p_m \approx \frac{1 + \frac{\gamma\hbar m B_0}{kT}}{\sum_{m=-I}^I \left(1 + \frac{\gamma\hbar m B_0}{kT}\right)} = \frac{1 + \frac{\gamma\hbar m B_0}{kT}}{2I + 1}.$$

Hieraus läßt sich dann zusammen mit (1.1) und (1.2) der Erwartungswert der z -Komponente des magnetischen Moments bestimmen:

$$\langle \mu_z \rangle = \gamma \langle I_z \rangle = \gamma\hbar \sum_{m=-I}^I m p_m = \gamma\hbar \sum_{m=-I}^I m \frac{1 + \frac{\gamma\hbar m B_0}{kT}}{2I + 1} = \frac{\gamma\hbar}{2I + 1} \frac{\Delta E_m}{kT} \sum_{m=-I}^I m^2.$$

Der Betrag der makroskopischen Magnetisierung in z -Richtung $M_0 = \sum_{i=1}^N \frac{\langle \mu_z \rangle_i}{V}$ beträgt dann

$$M_0 = N\gamma^2 B_0 \frac{\hbar^2 I(I+1)}{3kTV}. \quad (1.5)$$

Für den hier zur Signalgebung ausgenutzten Spin des Wasserstoffkerns ($I = \frac{1}{2}$) beträgt das Besetzungszahlverhältnis

$$\frac{N_{-1/2}}{N_{+1/2}} = e^{-\gamma\hbar B_0/kT}.$$

Mit $\gamma = 2,68 \cdot 10^8 (\text{Ts})^{-1}$, $\hbar = 1,05 \cdot 10^{-34} \text{Js}$ und $k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{J/K}$ erhält man bei $B_0 = 1,5 \text{T}$ einen Wert der Größenordnung 10^{-6} für den Besetzungszahlunterschied. Dies reicht bei der großen Teilchenanzahl aus, um ein meßbares Signal zu erzeugen.

Die zeitliche Entwicklung der Magnetisierung \vec{M} läßt sich aus folgender Überlegung unter Berücksichtigung von (1.1) bestimmen:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \frac{d}{dt} \sum_i^N \frac{\vec{\mu}_i}{V} = \frac{d}{dt} \frac{\gamma}{V} \sum_i^N \vec{I}_i =: \frac{\gamma}{V} \frac{d}{dt} \vec{I}.$$

Aus der Elektrodynamik ist bekannt, daß auf ein magnetisches Moment $\vec{M} = V\vec{M}$ ein Drehmoment $\vec{T} = \vec{M} \times \vec{B}$ wirkt. Dieses Drehmoment ist aber auch gleich der Drehimpulsänderung, so daß gilt:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{M}(t) \times \gamma \vec{B}(t). \quad (1.6)$$

In Anwesenheit eines Feldes der Form $\vec{B} = (0, 0, B_0)$ bedeutet dies, daß die Magnetisierung um die z -Achse präzediert, und zwar mit der Larmorfrequenz $\omega_L = \gamma B_0$.

Tab. 1.1: Eigenschaften einiger NMR-detektierbarer Kerne mit Spin $I = \frac{1}{2}$

Kern	γ [$10^8 \text{ rad (Ts)}^{-1}$]	natürliche Häufigkeit [%]	relative Sensitivität	absolute Sensitivität
^1H	2,675	99,98	1,0000	0,9998
^{13}C	0,673	1,108	0,0159	0,0002
^{19}F	2,517	100,00	0,8328	0,8328
^{31}P	1,083	100,00	0,0664	0,0664

Für das MR-Experiment ist die Häufigkeit des detektierten Kerns in der natürlichen Isotopenmischung von zentraler Bedeutung. Wasserstoff ist nicht nur in großen Konzentrationen im Körper vorhanden, sondern liegt auch noch zu 99,985% als Protonium und nur zu 0,015% als Deuterium ($I = 1$) vor.

Die Signalstärke hängt außerdem von der relativen Sensitivität des Kerns ab. Von der Empfangsspule wird eine Induktionsspannung registriert, die der zeitlichen Änderung des sie durchsetzenden magnetischen Flusses proportional ist. Dieser wiederum ist proportional zur präzedierenden Magnetisierung, also

$$U \propto \dot{M}.$$

Da M mit ω_L rotiert und proportional zu γ^2 ist, bekommt man

$$U \propto \gamma^3.$$

Das Produkt aus natürlicher Häufigkeit und relativer Sensitivität ergibt die absolute Sensitivität, die bei gleichen molaren Konzentrationen ein vergleichendes Maß für die erwartete Signalstärke verschiedener Kerne ist. In Tab. 1.1 sind die Eigenschaften einiger für die NMR-Spektroskopie interessanter Kerne aufgelistet.

1.3 Das FID-Experiment

Das erwähnte Induktionssignal läßt sich nicht durch ein statisches Grundfeld alleine erzeugen. Um kernmagnetische Resonanz zu beobachten, muß Energie in Form eines HF-Feldes \vec{B}_1 eingestrahlt werden, auf die das Kernspin-Ensemble dann reagieren kann. Dazu benutzt man Felder der Frequenz ω_{HF} , die in der Ebene senkrecht zum Grundfeld $\vec{B} = (0, 0, B_0)$ polarisiert sind:

$$\vec{B}_1 = B_1 \begin{pmatrix} \cos(\omega_{\text{HF}}t) \\ \sin(\omega_{\text{HF}}t) \\ 0 \end{pmatrix}.$$

Analog zu (1.3) lautet hier der Hamiltonoperator

$$\hat{H}_{\text{HF}} = -\gamma\hbar B_1 \begin{pmatrix} \cos(\omega_{\text{HF}}t) \\ \sin(\omega_{\text{HF}}t) \\ 0 \end{pmatrix}.$$

Eingesetzt in Gleichung (1.5) erhält man die Bewegungsgleichung der Magnetisierung unter dem Einfluß des HF-Feldes im Laborsystem. Hier ist jedoch ein Wechsel in ein mit ω_{HF}

um die z -Achse mitrotierendes Koordinatensystem $(x', y'; z' = z)$ vorteilhaft, in dem sich dann die Bewegungsgleichung wie folgt vereinfacht:

$$\frac{d\vec{M}'}{dt} = \vec{M}'(t) \times \gamma \vec{B}_{\text{eff}}.$$

\vec{B}_{eff} ist in diesem System statisch. Im rotierenden System präzediert die Magnetisierung natürlich mit einer anderen Winkelgeschwindigkeit um die z -Achse. Damit muß auch die z -Komponente des nun effektiv wirkenden Feldes modifiziert werden. Man erhält $B_{\text{eff}} = (B_1, 0, B_0 + \omega_{\text{HF}}/\gamma)$. Ist die Resonanzbedingung

$$\omega_{\text{HF}} = -\gamma B_0.$$

erfüllt, so wirkt auf das magnetische Moment im rotierenden System nur noch ein konstantes Feld in x' -Richtung, um welche \vec{M} dann präzediert. Je nach Dauer t_p des eingestrahnten Pulses erreicht man so eine Drehung der Magnetisierung um den Winkel

$$\alpha = \gamma B_1 t_p.$$

Durch geeignete Kombination von HF-Amplitude und Pulsdauer läßt sich eine Drehung um jeden beliebigen Winkel erreichen. Für die weitere Betrachtung sind besonders die sogenannten 90° - und 180° -Pulse von Bedeutung.

Nach dem Ende solch einer Resonanzabsorption präzediert die Magnetisierung dann wieder um die Richtung des konstanten Grundfeldes B_0 . Die transversalen Anteile induzieren dabei eine hochfrequente Wechselspannung in einer Spule. Durch Mischung mit dem eingestrahnten HF-Signal läßt sich die niederfrequente Modulation auf der Trägerfrequenz ω_0 herausfiltern. Sie wird als eigentliches Meßsignal dargestellt. Dabei enthält der zeitliche Verlauf $U(t)$ nach Fourier-Transformation die spektrale Information.

Aufgrund der Rückkehr ins thermische Gleichgewicht zerfällt die transversale Magnetisierung, und man beobachtet $\lim_{t \rightarrow \infty} U(t) = 0$. Dieser Effekt wird als freier Induktionszerfall bezeichnet (engl. FID). Die Prozesse dieses Zerfalls werden später behandelt.

1.4 Die chemische Verschiebung

Bisher wurden nur freie Kernspins betrachtet. Bei molekular gebundenen Kernen ist jedoch ein Effekt zu berücksichtigen, der auf den Einfluß der Elektronenhülle zurückzuführen ist. Dieser Effekt erzeugt erst die verschiedenen Resonanzen der unterschiedlichen chemischen Gruppen. Man spricht daher von der chemischen Verschiebung. Die Hüllenelektronen verursachen eine Abschirmung, die nach der Lenzschen Regel dem äußeren Magnetfeld entgegenwirkt und damit ein leicht geschwächtes lokales Magnetfeld am Kern erzeugt:

$$B_{\text{loc}} = B_0 + \delta B = B_0(1 - \sigma).$$

Da σ (diese Größe ist i. A. ein Tensor, aber darauf soll hier nicht weiter eingegangen werden) mit der Position des Kerns im Molekül variiert, kann die chemische Verschiebung zur Strukturaufklärung genutzt werden. Der Störoperator hat demnach die Form

$$\hat{H}_C = -\hat{\vec{\mu}} \cdot \delta \vec{B} = -\gamma \hat{I} \sigma \vec{B}_0.$$

Man sieht leicht, daß die Eigenzustände zum ungestörten, nur durch die Zeeman-Aufspaltung beschriebenen System auch Eigenzustände zu diesem Operator sind (vergleiche (1.3)). Wendet man nun $\hat{H}_Z + \hat{H}_C$ an, so werden die aus (1.4) bekannten Energieniveaus alle mit dem Vorfaktor $(1 - \sigma)$ multipliziert und bleiben demnach äquidistant, so daß man weiterhin nur eine Resonanzlinie beobachtet. Der modifizierte Zeeman-Hamiltonoperator für ein Molekül aus N Kernen mit nicht verschwindenden Spins ist dann

$$\hat{H}'_Z = - \sum_{i=1}^N \hat{\mu}_i \cdot \vec{B}_{\text{loc}} = - \sum_{i=1}^N \gamma_i \hat{I}_i (1 - \tilde{\sigma}_i) \vec{B}_0.$$

Dabei ist $\tilde{\sigma}_i$ der Chemical-Shift-Tensor zum Kern i .

1.5 Grundlegende Relaxationsprozesse

Wie bereits angedeutet ist das mit einer Induktionsspule nach Präparation der Transversalmagnetisierung aufgenommene Signal einer zeitlichen Veränderung unterworfen, die die Rückkehr des Spin-Systems ins thermische Gleichgewicht mit der Magnetisierung M_0 zur Ursache hat. Gleichung (1.6) wurde daher von BLOCH unter Berücksichtigung folgender experimenteller Ergebnisse ergänzt [Blo46]:

- Die zum Grundfeld parallele Komponente M_z nähert sich proportional zu ihrer momentanen Abweichung wieder dem Gleichgewichtszustand an.
- Die beiden anderen transversalen Komponenten zerfallen proportional zu ihrer momentanen Größe.

Beide Prozesse laufen mit bestimmten Zeitkonstanten ab, die folgendermaßen in die sogenannten Bloch-Gleichungen eingehen:

$$\begin{aligned} \frac{dM_x}{dt} &= \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_x - \frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} &= \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_y - \frac{M_y}{T_2} \\ \frac{dM_z}{dt} &= \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_z - \frac{M_0 - M_z}{T_2}. \end{aligned} \quad (1.7)$$

Für die Lösung muß nur das konstante Grundfeld berücksichtigt werden, da Relaxationen während der HF-Pulse aufgrund der kurzen Zeit t_p vernachlässigt werden können. Faßt man die beiden transversalen Komponenten zu $M_{tr} = M_x + iM_y$ zusammen, dann erhält man folgende zeitliche Entwicklung der Magnetisierung:

$$M_{tr}(t) = M_{tr}(0) e^{i\omega_0 t} e^{-t/T_2} \quad (1.8)$$

$$M_z(t) = M_0 - (M_0 - M_z(0)) e^{-t/T_1}. \quad (1.9)$$

Dabei sind $(M_x(0), M_y(0), M_z(0))$ die Komponenten des Systems zu Beginn der Relaxation. Der Zerfall der Transversalmagnetisierung wird im FID als exponentielle Abnahme der Wechselspannung sichtbar (Abb. 1.1).

Die Relaxationsprozesse kommen durch intra- und intermolekulare Störfelder zustande,

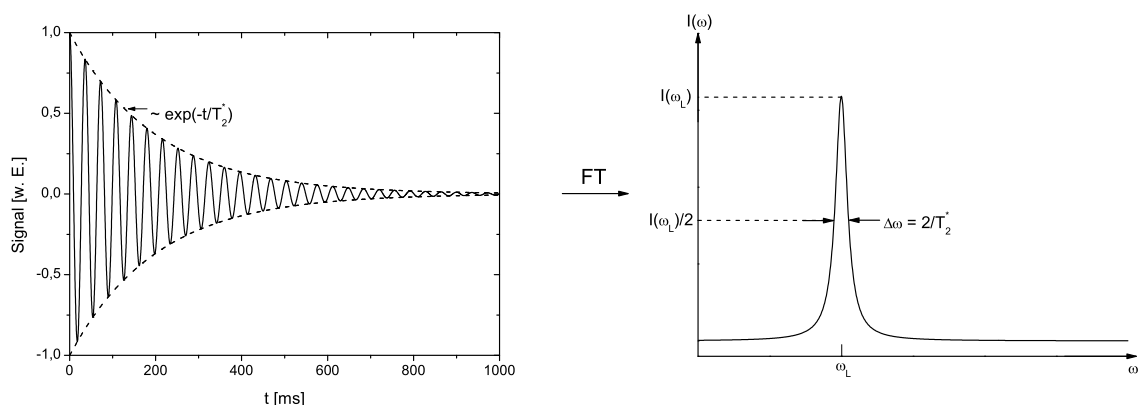


Abb. 1.1: Meßbares FID-Signal einer Relaxation und Darstellung in der Zeitdomäne nach Fourier-Transformation

welche wiederum durch Schwingungen, Rotationen und Translationen der Moleküle verursacht werden. Diese Felder haben verschiedene Frequenzen, die sich über die Autokorrelationsfunktion bzw. die spektrale Dichtefunktion ableiten lassen. Auf Details soll hier verzichtet werden; wichtig ist jedoch, daß in Flüssigkeiten wie sie im menschlichen Körper vorkommen - im Gegensatz zu Festkörpern - auch hochfrequente Störfelder auftreten. Dies ist deshalb von Bedeutung, da auf die während der Relaxation mit ω_0 rotierende Magnetisierung nur solche Felder Einfluß haben können, die im mitrotierenden Bezugssystem statisch erscheinen. Das vom Störfeld \vec{b} auf die Magnetisierung ausgeübte Drehmoment ergibt sich aus dem Kreuzprodukt beider Größen. Daher können T_1 -Prozesse nur von transversalen Komponenten geeigneter Frequenz hervorgerufen werden. Für T_2 -Prozesse können dagegen Störungen aller drei Komponenten verantwortlich sein, und da statische Komponenten in z' -Richtung denen in z -Richtung entsprechen, sind hierfür nicht unbedingt hochfrequente Störungen erforderlich. Das Resultat ist, daß T_1 oftmals deutlich größer als T_2 ist.

Die beiden Zeitkonstanten heißen Spin-Spin- (T_2) und Spin-Gitter-Relaxationszeit (T_1), und zwar aus folgenden Gründen: Die Auflösung der Transversalmagnetisierung wird als Ergebnis der Wechselwirkung einzelner Spins gedeutet, während die Relaxation der Longitudinalmagnetisierung durch Übergänge zwischen den Energieniveaus der Einzelspinsy-

Tab. 1.2: Relaxionszeiten von Gewebe *in vivo* ; Quelle: M. Reiser, W. Semmler: Magnetresonanztomographie

Gewebe	T_1 [ms]	T_2 [ms]
Graue Hirnsubstanz	920±160	101±13
Weißer Hirnsubstanz	790±130	92±22
Skelettmuskel	870±160	47±13
Herzmuskel	870±140	57±16
Fett	260±70	84±36
Leber	500±110	43±14
Niere	650±80	58±24
Milz	780±150	62±27

steme zustande kommt und daher ein Energieaustausch mit dem thermodynamischen Reservoir, dem sogenannten Gitter, stattfindet.

Durch die T_2 -Prozesse geht die Phasenkohärenz des Gesamt-Spins verloren. Diese Dephasierung spielt beim Spinecho-Experiment eine zentrale Rolle. Für den gleichen Effekt sorgen Inhomogenitäten des Grundfeldes ΔB , denn lokal leicht unterschiedliche ω_0 führen natürlich auch zu einer Dephasierung. Daher wird zusätzlich auch die effektive T_2 -Relaxationszeit T_2^* definiert:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \Delta B \cdot \text{const.} \quad (1.10)$$

Tabelle 1.2 gibt die Werte für einige Gewebearten an.

1.6 Das Spinecho-Experiment

Von E. HAHN wurde 1950 entdeckt, daß man die sich während des FID auflösende Transversalmagnetisierung durch einen zweiten HF-Puls teilweise wieder zurückgewinnen kann. Diese sogenannte Spinecho-Sequenz ist in Abbildung 1.2 dargestellt (Betrachtung im rotierenden Koordinatensystem) und läuft folgendermaßen ab:

Die in z' -Richtung zeigende Gleichgewichtsmagnetisierung wird zunächst wie bekannt durch einen 90° -Puls (das HF-Feld zeigt in Richtung x') auf die y' -Achse geklappt. Nun beginnt die Relaxation mit der schon angesprochenen Dephasierung in der Transversalebene. Nach der Zeit $TE/2$ wird ein 180° -Puls eingestrahlt, der eine Spiegelung des momentanen Zustandes an der x' -Achse bewirkt. Dadurch wird die Dephasierung wieder rückgängig

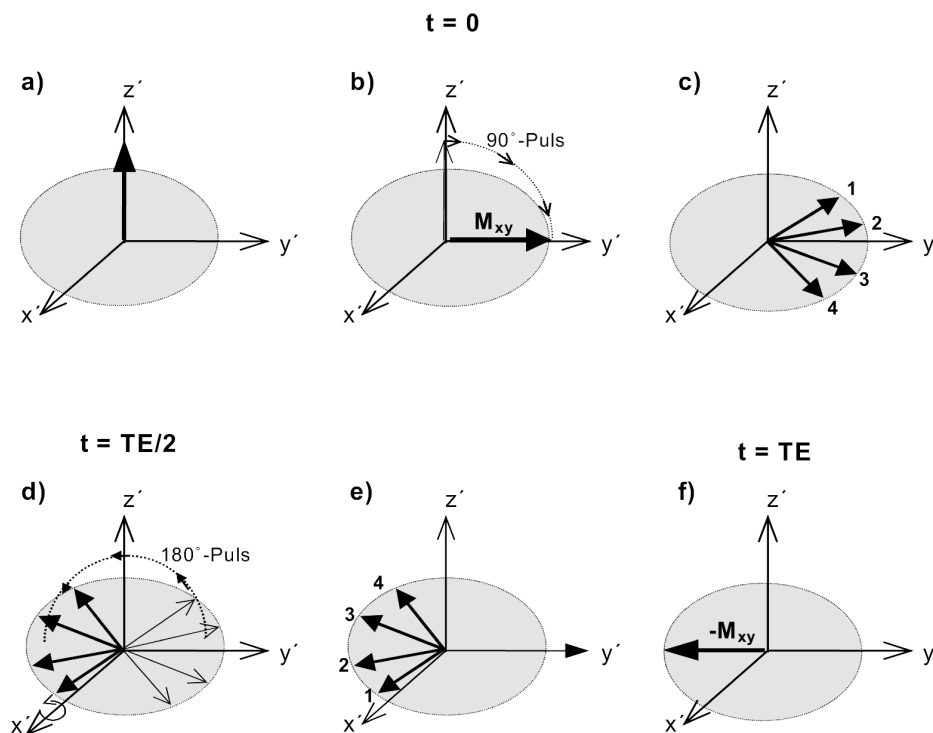


Abb. 1.2: Erzeugung eines Spinechos durch eine 90° - 180° -Pulsfolge

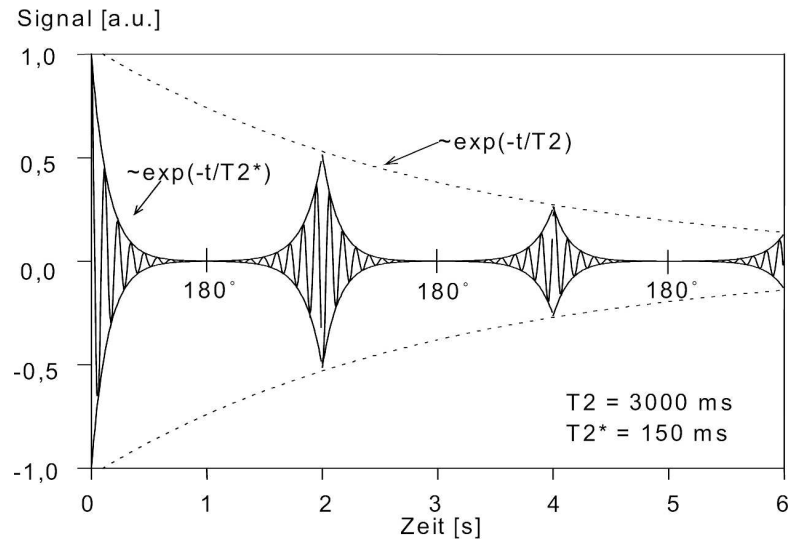


Abb. 1.3: Signalverlauf beim Spinecho-Experiment

gemacht. Zum Zeitpunkt TE sind die einzelnen Magnetisierungen wieder in Phase, so daß man ein meßbares Spinecho erhält. Anschließend setzt wieder eine Dephasierung ein, so daß das Signal wieder exponentiell abfällt (T_2^* ist die bestimmende Konstante).

TE wird als Echozeit bezeichnet. Die Amplitude des Signals ist wegen der schon während TE einsetzenden T_2 -Prozesse um den Faktor e^{-TE/T_2} geringer (s. Abbildung 1.3). Das Echo kann mehrfach erzeugt werden, wenn nach $TE/2$ wieder ein 180° -Puls eingestrahlt wird. Natürlich ist die Amplitude dann irgendwann nicht mehr meßbar, da sich der exponentielle Abfall fortsetzt.

Kapitel 2

Skalare Kopplung

Es sollen nun Systeme von gekoppelten Spins betrachtet werden. In diesem Kapitel wird dabei zunächst auf die skalare Wechselwirkung eingegangen, die auch uneingeschränkt in Modell-Lösungen zu beobachten ist. Die dipolare Kopplung, deren Meßbarkeit vom Medium abhängt, wird im nächsten Kapitel behandelt.

2.1 Der skalare Hamilton-Operator

Die skalare Spin-Spin-Kopplung wird durch die Hüllenelektronen vermittelt und wird daher auch indirekte Kopplung genannt. Sie ist ein rein quantenphysikalisches Phänomen, denn bei Kernen (hier: Protonen) und Elektronen handelt es sich um ein gekoppeltes fermionisches System. Daher muß der Gesamtzustand des Systems antisymmetrisch sein, und die Ausrichtung der Kernspins erfolgt nicht unabhängig von der der Elektronenspins. Die skalare Kopplung kann analog zur dipolaren Kopplung durch die Tensorgleichung

$$\hat{H}'_J = \hat{I} \tilde{J} \hat{S}$$

beschrieben werden. \tilde{J} ist der Tensor der skalaren Kopplung, der im Gegensatz zu dem der dipolaren Kopplung eine nicht verschwindende Spur besitzt. Bei zeitlicher Mittelung infolge der Brownschen Bewegung verschwindet die Kopplung daher nicht vollständig, und es bleibt stets der Operator

$$\hat{H}_J = J_{12} \hat{I} \hat{S} \quad (2.1)$$

mit der skalaren Kopplungskonstante J_{12} erhalten. Es ergibt sich somit als Gesamt-Hamilton-Operator für das System aus 2 Spins

$$\hat{H} = \hat{H}'_Z + \hat{H}_J = -\hbar\omega_1 \hat{I}_z - \hbar\omega_2 \hat{S}_z + J_{12} \hat{I} \hat{S}.$$

\hat{H}'_Z ist der Operator für den Zeeman-Effekt des Grundfeldes inklusive der chemischen Verschiebung. Dabei soll zunächst der allgemeine Fall unterschiedlicher Resonanzfrequenzen

$$\omega_i = \gamma_i(1 - \sigma_i)B_0 \quad i = 1, 2$$

angenommen werden. Die Eigenfunktionen des ungestörten Systems (zu \hat{H}'_Z) sind die Produktfunktionen der Einzelspins, also

$$\psi_1 = |++\rangle, \quad \psi_2 = |+-\rangle, \quad \psi_3 = |-+\rangle, \quad \psi_4 = |--\rangle.$$

Gesucht werden nun Eigenfunktionen zu \hat{H} . Zunächst soll gezeigt werden, daß \hat{H}_J mit dem Operator für die Zeeman-Wechselwirkung, $\hat{Z} \propto \hat{I}_z + \hat{S}_z$, kommutiert. Dann existiert nämlich ein Satz simultaner Eigenfunktionen, der die geeignete Darstellung für die weitere Betrachtung des Problems ist.

Im folgenden werden wiederholt drei Beziehungen ausgenutzt werden:

- für Kommutatoren gilt allgemein $[\hat{A}\hat{B}, \hat{C}] = \hat{A}[\hat{B}, \hat{C}] + [\hat{A}, \hat{C}]\hat{B}$;
- da die Freiheitsgrade der beiden koppelnden Spin- $\frac{1}{2}$ -Teilchen unabhängig voneinander sind, gilt $[\hat{I}_i, \hat{S}_j] = 0$ mit $i, j = x, y, z$ beliebig;
- Spinoperatoren erfüllen komponentenweise die Vertauschungsrelation für Drehimpulse: $i\hbar\hat{S}_i = [\hat{S}_j, \hat{S}_k]\epsilon_{ijk}$.

Zur Vereinfachung werden die Vorfaktoren in den jeweiligen Operatoren weggelassen. Der Kommutator für die x -Komponente des Produktoperators $\hat{I}\hat{S}$ berechnet sich dann wie folgt:

$$\begin{aligned} [\hat{I}_x\hat{S}_x, \hat{Z}] &\propto [\hat{I}_x\hat{S}_x, \hat{I}_z] + [\hat{I}_x\hat{S}_x, \hat{S}_z] \\ &= 0 + [\hat{I}_x, \hat{I}_z]\hat{S}_x + \hat{I}_x[\hat{S}_x, \hat{S}_z] + 0 \\ &= -i\hbar\hat{I}_y\hat{S}_x - i\hbar\hat{I}_x\hat{S}_y = a. \end{aligned}$$

Analog erhält man

$$\begin{aligned} [\hat{I}_y\hat{S}_y, \hat{Z}] &\propto [\hat{I}_y, \hat{I}_z]\hat{S}_y + \hat{I}_y[\hat{S}_y, \hat{S}_z] \\ &= i\hbar\hat{I}_x\hat{S}_y + i\hbar\hat{I}_y\hat{S}_x = -a \end{aligned}$$

und

$$[\hat{I}_z\hat{S}_z, \hat{Z}] \propto [\hat{I}_z, \hat{I}_z]\hat{S}_z + \hat{I}_z[\hat{S}_z, \hat{S}_z] = 0.$$

Also gilt insgesamt $[\hat{H}_J, \hat{Z}] = 0$, so daß simultane Eigenfunktionen bestimmt werden können. Für die folgenden Überlegungen ist es sinnvoll, den Operator \hat{H}_J unter Benutzung der Leiteroperatoren $I_{\pm} = \hat{I}_x \pm i\hat{I}_y$ umzuformen:

$$\hat{I}\hat{S} = \frac{1}{2}(\hat{I}_+\hat{S}_- + \hat{I}_-\hat{S}_+) + \hat{I}_z\hat{S}_z. \quad (2.2)$$

2.2 Berechnung der Energieniveaus

2.2.1 Simultane Eigenfunktionen

Mit obiger Darstellung sieht man, daß ψ_1 und ψ_4 bereits Eigenzustände zu \hat{H}_J sind:

$$\hat{I}_1\hat{I}_2|\pm\pm\rangle = \frac{1}{4}|\pm\pm\rangle. \quad (2.3)$$

Sie können also in den neuen Satz von Eigenzuständen des Gesamtoperators übernommen werden. ψ_2 und ψ_3 sind i.a. keine Eigenfunktionen zu \hat{H} , denn die Leiteroperatoren bewirken eine Beimischung des jeweils anderen Zustandes. Für den zweidimensionalen Unterraum wird eine neue Eigenbasis $\{\psi'_2, \psi'_3\}$ benötigt. Die gesuchten Eigenfunktionen

können als Linearkombinationen der alten ausgedrückt werden. Hilfreich ist hierbei die Darstellung mittels einer Drehmatrix.

$$\begin{pmatrix} \psi'_2 \\ \psi'_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha \\ -\sin \alpha & \cos \alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \psi_2 \\ \psi_3 \end{pmatrix}$$

Dadurch sind Normierung und Orthogonalität

$$|\psi'_2| = |\psi'_3| = 1, \quad \langle \psi'_2 | \psi'_3 \rangle = 0$$

gewährleistet. Aus $\langle \psi'_2 | \hat{H} | \psi'_3 \rangle = 0$ kann dann eine Bedingung für den Mischungswinkel α hergeleitet werden. Betrachten wir zunächst die Wirkung des Operators auf einen der Zustände:

$$\begin{aligned} \hat{H} | \psi'_3 \rangle &= \left(-\hbar\omega_1 \hat{I}_{1z} - \hbar\omega_2 \hat{I}_{2z} + J_{12} \left(\frac{1}{2} (\hat{I}_{1+} \hat{I}_{2-} + \hat{I}_{1-} \hat{I}_{2+}) + \hat{I}_{1z} \hat{I}_{2z} \right) \right) \\ &\quad \cdot (-\psi_2 \sin \alpha + \psi_3 \cos \alpha) \\ &= (-\sin \alpha) \left(-\frac{\hbar\omega_1}{2} \psi_2 + \frac{\hbar\omega_2}{2} \psi_2 + \frac{J_{12}}{2} \psi_3 - \frac{J_{12}}{4} \psi_2 \right) \\ &\quad + (\cos \alpha) \left(\frac{\hbar\omega_1}{2} \psi_3 - \frac{\hbar\omega_2}{2} \psi_3 + \frac{J_{12}}{2} \psi_2 - \frac{J_{12}}{4} \psi_2 \right). \end{aligned}$$

Dann ergibt sich für das Matrixelement

$$\begin{aligned} \langle \psi'_2 | \hat{H} | \psi'_3 \rangle &= (-\sin \alpha \cos \alpha) \left(-\frac{\hbar\omega_1}{2} + \frac{\hbar\omega_2}{2} - \frac{J_{12}}{4} \right) + \cos^2 \alpha \left(\frac{J_{12}}{2} \right) \\ &\quad + (\sin \alpha \cos \alpha) \left(\frac{\hbar\omega_1}{2} - \frac{\hbar\omega_2}{2} - \frac{J_{12}}{4} \right) - \sin^2 \alpha \left(\frac{J_{12}}{2} \right). \end{aligned}$$

Die obige Bedingung läßt sich dann zu

$$\frac{J_{12}}{2} (\cos^2 \alpha - \sin^2 \alpha) + (\cos \alpha \sin \alpha) (\hbar\omega_1 - \hbar\omega_2) = 0$$

$$\frac{J_{12}}{\hbar(\omega_1 - \omega_2)} = -\frac{2 \cos \alpha \sin \alpha}{\cos^2 \alpha - \sin^2 \alpha}$$

umformen. Nun kann man noch die Winkelfunktionen so zusammenfassen, daß sich

$$\frac{J_{12}}{\hbar(\omega_1 - \omega_2)} = -\tan 2\alpha \quad (2.4)$$

ergibt. Demnach ist das Verhältnis der Kopplungskonstante zum Unterschied der Resonanzfrequenzen, das auch als Störungs-Parameter bezeichnet wird, für den Mischungswinkel von entscheidender Bedeutung. Letzterer ist nämlich für anisochrome Spins ein Maß für das von außen angelegte Grundfeld. Bei hinreichend großen Feldern wird die Spin-Spin-Kopplung aufgebrochen, und die Wechselwirkung der Kerne mit B_0 wird dominant (Übergang zum Paschen-Back-Effekt, s. Kap. 4). Bei hochaufgelösten Flüssigkeitsspektren beobachtet man meist Kopplungen im Bereich von 10 Hz zwischen Kernen, deren chemische Verschiebung 10 – 100 Hz bei 1,5 T beträgt. Dies entspricht einem Bereich von $\frac{J_{12}}{\hbar(\omega_1 - \omega_2)} \leq 1$ und somit einem Mischungswinkel $\alpha > -20^\circ$. Dies verdeutlicht, daß bei den für die MR-Spektroskopie gebräuchlichen Feldern die skalare Kopplung oft nur eine schwache Wechselwirkung ist und die Spektren durch die Wechselwirkung der Kernspins mit B_0 dominiert werden.

2.2.2 Eigenwerte des Zeeman-Operators

Zwar sind Eigenwerte unter Basistransformationen invariant, aber bei der Betrachtung der Spin-Spin-Kopplung geht die durch α bewirkte Basistransformation mit einer Änderung in der Wichtung zweier verschiedener Effekte einher. Der Anstieg von α , also die Zunahme der Kopplungsstärke, stellt im zweidimensionalen Unterraum $\{\psi'_2, \psi'_3\}$ eine zunehmende Mischung der beiden Ausgangs-Zustände dar. Gleichzeitig verliert der Zeeman-Operator des Grundfeldes an Bedeutung, so daß diese Basistransformation auch andere Eigenwerte zur Folge hat, weil sich die Wechselwirkungen ändern (s. Breit-Rabi-Diagramm Kap. 4). Es sollen nun zunächst die α -abhängigen Eigenwerte des Zeeman-Operators bestimmt werden.

Für die reinen Zustände gilt:

$$\hat{H}'_Z |\psi_1\rangle = -(\hbar\omega_1 \hat{I}_z + \hbar\omega_2 \hat{S}_z) |++\rangle = -\frac{\hbar}{2}(\omega_1 + \omega_2) |\psi_1\rangle$$

und damit

$$\langle\psi_1| \hat{H}'_Z |\psi_1\rangle = -\frac{\hbar}{2}(\omega_1 + \omega_2).$$

Analog erhält man

$$\langle\psi_4| \hat{H}'_Z |\psi_4\rangle = +\frac{\hbar}{2}(\omega_1 + \omega_2).$$

Für die gemischten Zustände tritt eine Winkelabhängigkeit auf. Dabei gilt für den einen Zustand

$$\begin{aligned} \hat{H}'_Z |\psi'_2\rangle &= -(\hbar\omega_1 \hat{I}_z + \hbar\omega_2 \hat{S}_z)(\cos\alpha |+-\rangle + \sin\alpha |-+\rangle) \\ &= -\frac{\hbar\omega_1}{2} \cos\alpha |+-\rangle + \frac{\hbar\omega_1}{2} \sin\alpha |-+\rangle + \frac{\hbar\omega_2}{2} \cos\alpha |+-\rangle - \frac{\hbar\omega_2}{2} \sin\alpha |-+\rangle, \end{aligned}$$

so daß der Eigenwert

$$\begin{aligned} \langle\psi'_2| \hat{H}'_Z |\psi'_2\rangle &= -\frac{\hbar\omega_1}{2} \cos^2\alpha + \frac{\hbar\omega_2}{2} \cos^2\alpha + \frac{\hbar\omega_1}{2} \sin^2\alpha - \frac{\hbar\omega_2}{2} \sin^2\alpha \\ &= \frac{\hbar\Delta\omega}{2}(\sin^2\alpha - \cos^2\alpha) = -\frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos 2\alpha \end{aligned}$$

beträgt ($\Delta\omega = \omega_1 - \omega_2$). Auf die gleiche Weise ergibt sich für den anderen Zustand

$$\langle\psi'_3| \hat{H}'_Z |\psi'_3\rangle = \frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos 2\alpha.$$

Die in der neuen Eigenbasis diagonalisierte Matrixdarstellung des Zeeman-Operators lautet dann

$$\mathcal{H}_Z = \frac{\hbar}{2} \begin{pmatrix} -\omega_1 - \omega_2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -\Delta\omega \cos 2\alpha & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \Delta\omega \cos 2\alpha & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \omega_1 + \omega_2 \end{pmatrix} \quad (2.5)$$

2.2.3 Korrekturterme der skalaren Kopplung

Die Korrekturterme für die beiden beibehaltenen Eigenfunktionen lassen sich schnell bestimmen: An (1.2) sieht man bereits, daß beide Niveaus um

$$\Delta E_{1,4} = \frac{1}{4} J_{12} = \Delta$$

angehoben werden. Nun soll die Energieverschiebung der beiden mittleren Niveaus für einen beliebigen Mischungswinkel α berechnet werden:

$$\hat{H}_J |\psi'_2\rangle = (\cos \alpha) J_{12} \left(\frac{1}{2} \psi_3 - \frac{1}{4} \psi_2 \right) + (\sin \alpha) J_{12} \left(\frac{1}{2} \psi_2 - \frac{1}{4} \psi_3 \right)$$

Als Erwartungswert von \hat{H}_J bzw. als Energieverschiebung bekommt man

$$\begin{aligned} \Delta E_2 &= -(\cos^2 \alpha) \frac{J_{12}}{4} + (\sin \alpha \cos \alpha) J_{12} - (\sin^2 \alpha) \frac{J_{12}}{4} \\ &= J_{12} \left(\frac{1}{2} \sin 2\alpha - \frac{1}{4} \right) \end{aligned} \quad (2.6)$$

Für die andere Eigenfunktion erhält man analog

$$\hat{H}_J |\psi'_3\rangle = (-\sin \alpha) J_{12} \left(\frac{1}{2} \psi_3 - \frac{1}{4} \psi_2 \right) + (\cos \alpha) J_{12} \left(\frac{1}{2} \psi_2 - \frac{1}{4} \psi_3 \right)$$

und

$$\Delta E_3 = J_{12} \left(-\frac{1}{2} \sin 2\alpha - \frac{1}{4} \right) \quad (2.7)$$

für die Energieverschiebung. Mit Hilfe der simultanen Eigenfunktionen kann eine diagonalisierte Matrix-Darstellung von \hat{H}_J angegeben werden:

$$\mathcal{H}_J = \Delta \underbrace{\begin{pmatrix} +1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & +1 \end{pmatrix}}_{\mathcal{J}_1} + \frac{J_{12}}{2} \sin 2\alpha \underbrace{\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & +1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}}_{\mathcal{J}_2(\alpha)} \quad (2.8)$$

Die α -abhängigen Terme stammen vom Flip-Flop-Operator, der konstante Term vom Operator $\hat{I}_{1z} \hat{I}_{2z}$. \mathcal{J}_2 wirkt nur auf den zweidimensionalen Hilbert-Unterraum $\{\psi'_2, \psi'_3\}$ und hebt die Entartung dieser Zustände auf, die noch unter \mathcal{J}_1 vorliegt. Die beiden reinen Zustände sind dagegen unter \mathcal{J}_1 entartet (dafür nicht unter \mathcal{H}_J).

2.3 Erlaubte Dipol-Übergänge, Linienintensitäten

Mit Hilfe von Fermis „Goldener Regel“ können nun die Wahrscheinlichkeiten für Übergänge zwischen den Niveaus berechnet werden. Die Rate des Übergangs vom Zustand ψ_i nach ψ_j beträgt bei kontinuierlicher Einstrahlung mit $\hbar\omega$

$$W_{ij}(\omega, t) = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \langle \psi_i | \hat{H}_{\text{HF}}(t) | \psi_j \rangle \right|^2 \delta(E_i - E_j - \hbar\omega). \quad (2.9)$$

Dabei ist \hat{H}_{HF} der Hamiltonoperator für die Wechselwirkung des Spinsystems mit einem eingestrahlt HF-Feld, das z.B. in x -Richtung des rotierenden Koordinatensystems zeigen soll:

$$\begin{aligned}\hat{H}_{\text{HF}}(t) &= \hbar(\gamma_I \hat{I} + \gamma_S \hat{S}) \vec{B}_1(t) = \hbar B_1 (\gamma_I \hat{I}_x + \gamma_S \hat{S}_x) \cos \omega t \\ &= \hbar(\omega_1 \hat{I}_x + \omega_2 \hat{S}_x) \cos \omega t.\end{aligned}\quad (2.10)$$

Für die Übergangsraten erhält man als entscheidenden Term

$$\langle \psi_i | \omega_1 \hat{I}_x + \omega_2 \hat{S}_x | \psi_j \rangle = \frac{1}{2} \langle \psi_i | \omega_1 (\hat{I}_+ + \hat{I}_-) + \omega_2 (\hat{S}_+ + \hat{S}_-) | \psi_j \rangle,$$

wenn resonant mit der Frequenz $\omega = \frac{E_i - E_j}{\hbar}$ eingestrahlt wird.

Von den 6 denkbaren Übergängen sind $\psi'_1 \leftrightarrow \psi'_4$ und $\psi'_2 \leftrightarrow \psi'_3$ nicht erlaubt, was man an der Wirkung der Leiteroperatoren sieht:

$$\begin{aligned}(\hat{I}_+ + \hat{I}_- + \hat{S}_+ + \hat{S}_-) | \psi'_4 \rangle &= (\hat{I}_+ + \hat{I}_- + \hat{S}_+ + \hat{S}_-) | -- \rangle \\ &= | +- \rangle + | -+ \rangle.\end{aligned}$$

Diese beiden Zustände sind aber orthogonal zu $\psi'_1 = | ++ \rangle$, so daß $\langle \psi'_1 | \hat{H}_{\text{HF}}(t) | \psi'_4 \rangle$ verschwindet. Ein besonderer Fall liegt bei den Übergängen vor, an denen ψ'_2 beteiligt ist. Da nur Mischungswinkel $-45^\circ \leq \alpha \leq 0^\circ$ auftreten, kann man die Darstellung $\psi'_2 = a | +- \rangle - b | -+ \rangle$ mit $0 \leq b \leq a$ wählen. Dann gilt

$$\hat{H}_{\text{HF}} | \psi'_2 \rangle \propto -b(\omega_1 | ++ \rangle + \omega_2 | -- \rangle) + a(\omega_2 | ++ \rangle + \omega_1 | -- \rangle).$$

Hier treten also nur Zustände auf, die zu den in ψ'_3 vorkommenden $| +- \rangle$ und $| -+ \rangle$ orthogonal sind, so daß $\psi'_2 \leftrightarrow \psi'_3$ immer verboten ist. Für $\omega_1 = \omega_2$ gilt $\alpha = -45^\circ$ und somit auch $a = b$; also verschwindet der Ausdruck $\hat{H}_{\text{HF}} | \psi'_2 \rangle$. Bei der Kopplung isochroner Spins liegt demnach ein Interkombinationsverbot vor. Ansonsten gilt für $\alpha = -45^\circ$ und anisochrone Spins

$$\hat{H}_{\text{HF}} | \psi'_2 \rangle \propto a(\omega_2 - \omega_1) | ++ \rangle + a(\omega_1 - \omega_2) | -- \rangle.$$

Das bedeutet, daß die Übergänge zwar nicht verboten sind, aber wegen der kleinen chemischen Verschiebungen homonuklearer Spins von nur einigen ppm extrem unterdrückt sind. Bei heteronuklearen Kopplungen oder der Kopplung von Elektronen- und Kernspin ist dies nicht der Fall (s. Kap. 4).

Für alle anderen Fälle sind die 4 Übergänge

$$\begin{array}{cc}\psi'_2 \leftrightarrow \psi'_4 & \psi'_1 \leftrightarrow \psi'_3 \\ \psi'_1 \leftrightarrow \psi'_2 & \psi'_3 \leftrightarrow \psi'_4\end{array}$$

erlaubt. Zur Berechnung der Übergangsenergien brauchen wir noch einmal die allgemeine Formulierung der Energieniveaus. Sie zeigen insgesamt mit (2.5) und (2.8) folgende Winkelabhängigkeit:

$$E_1 = -\frac{\hbar(\omega_1 + \omega_2)}{2} + \Delta \quad (2.11)$$

$$E_2 = -\frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos 2\alpha - \Delta + 2\Delta \sin 2\alpha \quad (2.12)$$

$$E_3 = \frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos 2\alpha - \Delta - 2\Delta \sin 2\alpha \quad (2.13)$$

$$E_4 = \frac{\hbar(\omega_1 + \omega_2)}{2} + \Delta. \quad (2.14)$$

Damit betragen die Übergangsenergien

$$\left. \begin{aligned} E_{24} &= \frac{\hbar}{2}(\Delta\omega \cos 2\alpha + \omega_1 + \omega_2) + 2\Delta - 2\Delta \sin 2\alpha \\ E_{13} &= \frac{\hbar}{2}(\Delta\omega \cos 2\alpha + \omega_1 + \omega_2) - 2\Delta - 2\Delta \sin 2\alpha \end{aligned} \right\} \quad (2.15)$$

$$\left. \begin{aligned} E_{12} &= \frac{\hbar}{2}(-\Delta\omega \cos 2\alpha + \omega_1 + \omega_2) - 2\Delta + 2\Delta \sin 2\alpha \\ E_{34} &= \frac{\hbar}{2}(-\Delta\omega \cos 2\alpha + \omega_1 + \omega_2) + 2\Delta + 2\Delta \sin 2\alpha. \end{aligned} \right\} \quad (2.16)$$

Diese vier Terme lassen sich paarweise zu Dublett 1 und Dublett 2 zusammenfassen, denn für schwache Kopplung erhält man 2 symmetrische Linien um $\hbar\omega_1$ (2.15) und um $\hbar\omega_2$ (2.16). Bei zunehmender Kopplungsstärke liegen die Resonanzen immer asymmetrischer um die ursprünglichen Resonanzfrequenzen ω_i . Dabei ist das eine Dublett praktisch das Spiegelbild des anderen (s. Abb. 2.1).

Da innerhalb eines Dubletts die winkelabhängigen Terme identisch sind, ist die Aufspaltung interessanterweise konstant. Sie beträgt

$$\Delta\nu = \frac{E_{24} - E_{13}}{h} = \frac{E_{34} - E_{12}}{h} = \frac{4\Delta}{h} = \frac{J_{12}}{h}.$$

Wie in Abb. 2.1 gezeigt, werden die beiden Dubletts jeweils nach außen gegen die Resonanzfrequenzen verschoben. Formt man die Ausdrücke für die Energieniveaus um, so läßt

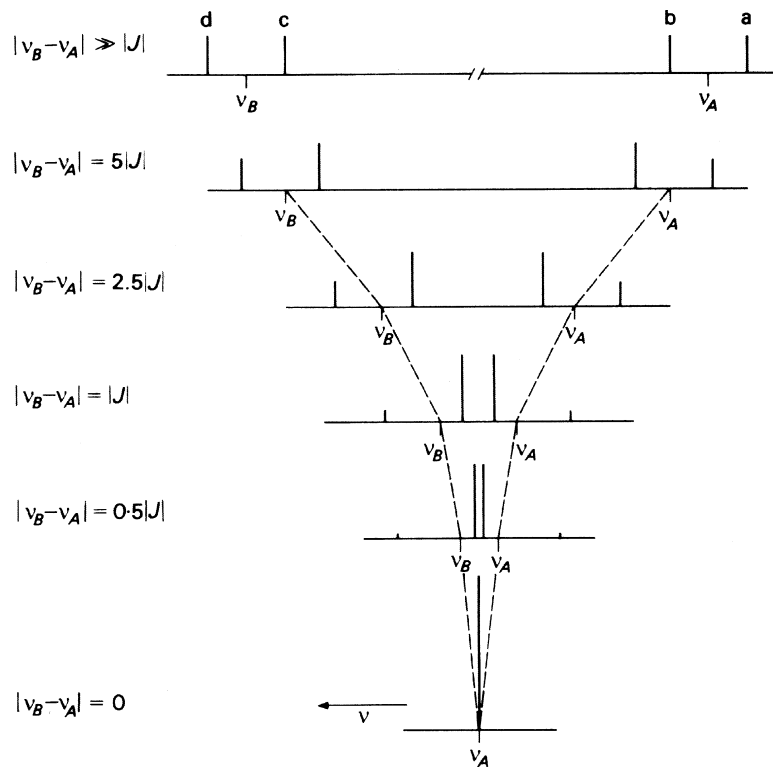


Abb. 2.1: Verhalten der J -Kopplung bei unterschiedlicher Kopplungsstärke (entnommen aus [Har86])

sich ein Asymmetrieparameter definieren. Mit Hilfe von $\omega_2 = \omega_1 - \Delta\omega$ läßt sich (2.15) zu

$$\begin{aligned}
E_{24} &= \frac{\hbar}{2}(\Delta\omega(\cos^2 \alpha - \sin^2 \alpha) + \omega_1 + \omega_1 - \Delta\omega) + 2\Delta - 2\Delta \sin 2\alpha \\
&= \hbar\omega_1 + \frac{\hbar\Delta\omega}{2}(\cos^2 \alpha - \sin^2 \alpha - 1) + 2\Delta - 4\Delta \sin \alpha \cos \alpha \\
&= \hbar\omega_1 + 2\Delta \underbrace{-\hbar\Delta\omega \sin^2 \alpha - 4\Delta \sin \alpha \cos \alpha}_{A_P^J(\alpha)} \\
E_{13} &= \hbar\omega_1 - 2\Delta \underbrace{-\hbar\Delta\omega \sin^2 \alpha - 4\Delta \sin \alpha \cos \alpha}_{A_P^J(\alpha)}
\end{aligned}$$

umformen. Die winkelabhängigen Terme (also wegen (2.4) auch $\Delta\omega$!) bewirken bei wachsender Kopplungsstärke eine Verschiebung des Dublett-Mittelpunktes von ω_1 weg (der Term mit $\sin^2 \alpha$ stammt aus dem Zeeman-Operator, $\sin \alpha \cos \alpha$ aus dem Flip-Flop-Operator der Kopplung). Damit läßt sich der Asymmetrie-Parameter A_P^J des Dubletts definieren:

$$A_P^J(\alpha) = -\hbar\Delta\omega \sin^2 \alpha - 4\Delta \sin \alpha \cos \alpha. \quad (2.17)$$

Diese Beziehung läßt sich noch mit (2.4) umformen:

$$\begin{aligned}
A_P^J(\alpha) &= -\hbar\Delta\omega \sin^2 \alpha + \hbar\Delta\omega \tan 2\alpha \sin \alpha \cos \alpha \\
&= \hbar\Delta\omega \left(\frac{1}{2} \tan 2\alpha \sin 2\alpha - \sin^2 \alpha \right) \quad (2.18)
\end{aligned}$$

$$= -J_{12} \left(\frac{\sin 2\alpha}{2} - \frac{\sin^2 \alpha}{\tan 2\alpha} \right). \quad (2.19)$$

Ein Vergleich mit der dipolaren Kopplung wird zeigen, daß die beiden Asymmetrie-Parameter unterschiedlich stark sind (s. Kap. 5).

Die Linienintensitäten sollen am Beispiel des Dubletts mit den Übergängen $\psi'_1 \leftrightarrow \psi'_2$ und $\psi'_3 \leftrightarrow \psi'_4$ betrachtet werden. Für den ersten Übergang erhält man:

$$\begin{aligned}
\hat{H}_{\text{HF}} |\psi'_2\rangle &= \frac{1}{2} \left(\omega_1(\hat{I}_+ + \hat{I}_-) + \omega_2(\hat{S}_+ + \hat{S}_-) \right) (\cos \alpha |\psi_2\rangle + \sin \alpha |\psi_3\rangle) \\
&= \frac{1}{2} [\omega_2(\sin \alpha |\psi_4\rangle + \cos \alpha |\psi_1\rangle) + \omega_1(\cos \alpha |\psi_4\rangle + \sin \alpha |\psi_1\rangle)].
\end{aligned}$$

Demnach gilt

$$\langle \psi'_1 | \hat{H}_{\text{HF}} | \psi'_2 \rangle \propto \omega_1 \sin \alpha + \omega_2 \cos \alpha.$$

Für den Übergang $\psi'_3 \leftrightarrow \psi'_4$ bekommt man analog

$$\langle \psi'_4 | \hat{H}_{\text{HF}} | \psi'_3 \rangle \propto \omega_2 \cos \alpha - \omega_1 \sin \alpha.$$

Bei homonuklearer Kopplung gilt näherungsweise $\omega_2 = \omega_1 - \Delta\omega \approx \omega_1$, denn besonders bei Protonen liegen die chemischen Verschiebungen im Bereich weniger ppm (die Intensitäten für heteronukleare Kopplung sind nicht so zu vereinfachen!). Exakt gilt dieser Ausdruck natürlich für isochrone Spins, die wie stark koppelnde Teilchen betrachtet werden (s.u.). Die Intensitäten sind dann proportional zu

$$I_{12} \propto |\sin \alpha + \cos \alpha|^2 = 1 + \sin 2\alpha \quad (2.20)$$

$$I_{34} \propto |\cos \alpha - \sin \alpha|^2 = 1 - \sin 2\alpha. \quad (2.21)$$

Genauso kann man für das zweite Dublett verfahren. Man sieht, daß im Extremfall starker Kopplung jeweils eine Linie verschwindet, weil die Intensität des Übergangs, an dem ψ'_2 beteiligt ist, Null wird. Dementsprechend nimmt das Intensitätsverhältnis $I_{12} : I_{34}$ mit steigendem α ab (s. Kap. 5).

Die winkelabhängigen Terme, die die Asymmetrie in den Intensitäten verursachen, treten auf, weil der Flip-Flop-Operator der Kopplung mit steigendem J_{12} eine zunehmende Beimischung von ψ_2 zu ψ_3 (bzw. umgekehrt) verursacht.

2.4 Nomenklatur von Spin-Systemen und ihrer Spektren

Eine Konvention zur Beschreibung gekoppelter Spins ist die sogenannte PSB-Notation (nach POPLE, SCHNEIDER und BERNSTEIN [Ber57, Pop57]). Dabei werden die einzelnen Kerne durch lateinische Großbuchstaben repräsentiert. Die Notation beginnt mit A für die am stärksten abgeschirmten Kerne, also die höchsten chemischen Verschiebungen.

Je größer die Differenz der chemischen Verschiebung zweier Kerne, desto weiter liegen die entsprechenden Buchstaben im Alphabet auseinander. Isochrone Kerne werden durch identische Buchstaben gekennzeichnet. Ein System aus zwei isochronen Spins wird dann mit AA' oder A_2 bezeichnet. Letztere Notation gilt, wenn neben der chemischen auch noch magnetische Äquivalenz vorliegt.

Da die chemische Verschiebung in Hz vom Grundfeld abhängt, ist der Störungsparameter 2.4 für ein gegebenes Spin-System abhängig von der verwendeten Feldstärke. Daher ist bei der Notation zu beachten, daß eine Kopplung bei z.B. 600 MHz schwächer erscheint als bei 60 MHz und somit ein an einem Hochfeld-Spektrometer untersuchtes AX-System an einem Ganzkörper-Tomographen zu einem AB-System werden kann.

AX-Systeme zeigen Spektren erster Ordnung, die durch zwei symmetrische Dubletts gekennzeichnet sind. Es gilt die sogenannte X-Näherung für die Eigenzustände, die für AB- oder gar A_2 -Systeme keine adäquate Beschreibung liefert. Bei starken Kopplungen wie AB-Systemen spricht man von Spektren zweiter Ordnung. Die Extremfälle starker und schwacher Wechselwirkungen sollen nun näher betrachtet werden.

2.5 Extremfall starker bzw. isochroner Kopplung (A_2 -Systeme)

Eine extrem starke Kopplung in dem Sinne, daß J_{12} dominant gegenüber $\Delta\omega$ bei 1,5 T ist, kann man nicht beobachten. Für anisochrome Spins handelt es sich immer maximal um AB-Systeme.

Eine besondere Situation liegt jedoch vor, wenn es sich um die Kopplung isochroner Spins ($\Delta\omega = 0$) handelt. Diese erscheint mathematisch wie eine unendlich starke Kopplung, denn es ergibt sich ein Mischungswinkel α von -45° . Setzt man diesen Wert in die Drehmatrix ein, so ergeben sich symmetrisierte Wellenfunktionen, die auch Eigenzustände des Spinvertauschungs-Operators \hat{P} sind. Man kann den Gesamtspin F definieren und die Zustände zu einem Triplett und einem Singulett zusammenfassen. Die Eigenwerte zum Zeeman-Operator lassen sich direkt aus (2.5) ablesen.

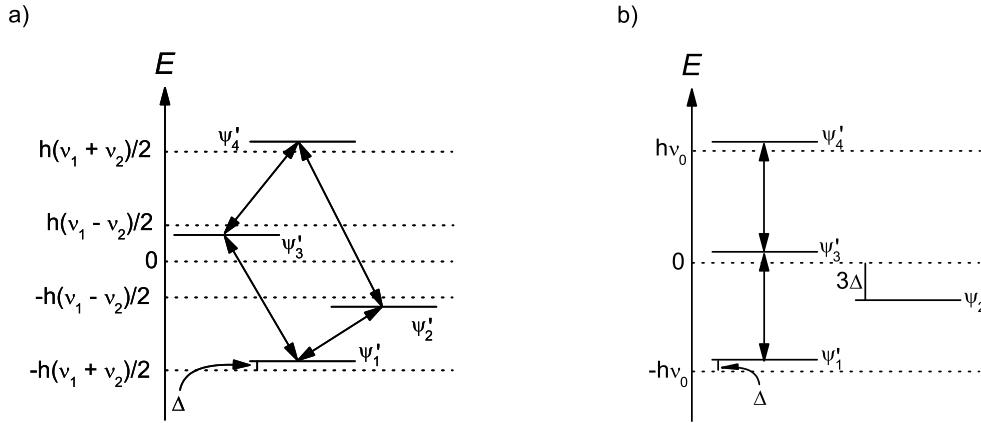


Abb. 2.2: Energieniveaus für (a) schwache und (b) starke J -Kopplung

Eigenfunktion	$ F, I_z + S_z\rangle$	Eigenwert von		Multiplizität
		\hat{H}_Z	\hat{P}	
$\psi'_1 = ++\rangle$	$ 1, 1\rangle$	$E_1^0 = -\hbar\omega_0$	+1	Triplet
$\psi'_2 = \frac{1}{\sqrt{2}}(+-\rangle - --\rangle)$	$ 0, 0\rangle$	$E_2^0 = 0$	-1	Singulett
$\psi'_3 = \frac{1}{\sqrt{2}}(-+\rangle + --\rangle)$	$ 1, 0\rangle$	$E_3^0 = 0$	+1	Triplet
$\psi'_4 = --\rangle$	$ 1, -1\rangle$	$E_4^0 = +\hbar\omega_0$	+1	Triplet

Die Energieverschiebungen betragen nach (2.8)

$$\begin{aligned}\Delta E_1 &= \Delta E_3 = \Delta E_4 = \Delta \\ \Delta E_2 &= -3\Delta.\end{aligned}$$

Von den maximal 4 möglichen Dipol-Übergängen verschwinden in diesem Fall wegen (2.20) alle mit ψ'_2 . Es bleiben nur zwei Übergänge (einer von jedem der ursprünglich zwei Doublets) innerhalb des Triplets:

$$\psi'_1 \leftrightarrow \psi'_3 \quad \psi'_3 \leftrightarrow \psi'_4.$$

Dies wird auch als Interkombinationsverbot von Singulett und Triplet bezeichnet. Die Übergangsenergien der entsprechenden Linien sind nach (2.15) und (2.16)

$$\hbar\omega_0 \quad \hbar\omega_0.$$

Für chemisch äquivalente Spins findet also keine Aufspaltung durch J -Kopplung statt. Wir werden noch sehen, daß das bei der dipolaren Kopplung nicht der Fall ist. Das Termschema für starke und schwache Kopplung ist in Abb. 2.2 gezeigt.

2.6 Extremfall schwacher Kopplung (AX-Systeme)

Bei schwacher Kopplung ist die Differenz der Resonanzfrequenzen dominant gegenüber der Kopplungsstärke, und es ergibt sich ein Mischungswinkel von 0° . Man erhält gerade wieder die ursprünglichen Eigenfunktionen nach der Drehung zurück.

Die Energieniveaus nach der Zeeman-Aufspaltung ergeben sich wieder direkt aus (2.5). Der Einfluß der J -Kopplung ist durch (2.8) gegeben:

$$\begin{aligned}\Delta E_1 &= \Delta E_4 = \Delta \\ \Delta E_2 &= \Delta E_3 = -\Delta.\end{aligned}$$

Die Übergangsenergien der entsprechenden Linien sind nach (2.15) und (2.16)

$$\begin{array}{ll}\hbar\omega_1 + 2\Delta & \hbar\omega_1 - 2\Delta \\ \hbar\omega_2 - 2\Delta & \hbar\omega_2 + 2\Delta.\end{array}$$

Die vormals sichtbaren 2 Resonanzen bei ω_1 und ω_2 spalten also jeweils in ein Dublett mit der Breite

$$\Delta\nu = \frac{4\Delta}{h} = \frac{J_{12}}{h}$$

auf. Das Intensitätsverhältnis innerhalb eines Dubletts beträgt nach (2.20) und (2.21) 1:1.

2.7 Ausbildung von Multipletts, Composite-Particle-Modell

Bisher wurde nur die Kopplung zwischen zwei Spins betrachtet. Koppeln Gruppen mit mehreren Spins untereinander, so kommt es im Spektrum zur Ausbildung von Multipletts mit bestimmten Intensitätsverhältnissen der einzelnen Linien. Zum Verständnis dieser Muster ist das Composite-Particle-Modell hilfreich, das mehrere n magnetisch äquivalente Spins I zu einem Teilchen (CP) mit einem Gesamtspin $F = nI$ zusammenfaßt. Unter Berücksichtigung der Auswahlregel $\Delta m = 1$ lassen sich dann alle erlaubten Übergänge herleiten (eine ausführliche Darstellung ist in [Web98] zu finden).

Je nach Orientierung der n Einzelspins ergeben sich verschiedene Werte F_T für den Gesamtspin, die in Analogie zur Atomphysik in sogenannte Terme zusammengefaßt werden. Jeder Term hat eine Multiplizität von $2F_T + 1$ und stellt eine irreduzible Komponente des Gesamt-Spektrums dar. Zwischen den Termen findet keine Wechselwirkung statt, so daß diese Teil-Spektren in der Summe das Gesamt-Spektrum liefern. Zur Unterscheidung von einzelnen Spins werden die Terme der CP in geschweiften Klammern geschrieben.

Als einfachstes Beispiel soll zunächst ein A_2 -System betrachtet werden. Es läßt sich in ein Triplet und ein Singulett zerlegen. Die vollständige Notation ist in Tab. 2.1 gezeigt.

Im folgenden wird es nützlich sein, für die Bestimmung der Übergänge die Zustände nicht nach der Frequenz in Hz, sondern nach m_T zu sortieren. Mit der Auswahlregel sind dann im A_2 -System nur zwei Übergänge erlaubt. In der Darstellung in Abb. 2.3 liegen entartete

Tab. 2.1: Nomenklatur in der CP-Beschreibung für ein A_2 -Teilchen ($I = \frac{1}{2}$)

A_2 -Teilchen	Zustand 1	Zustand 2
Spin-Symbole	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\downarrow$
F_T	1	0
Multiplizität	3	1
Zustand	Triplet	Singulett
Term	$^3\{A_2\}$	$^1\{A_2\}$

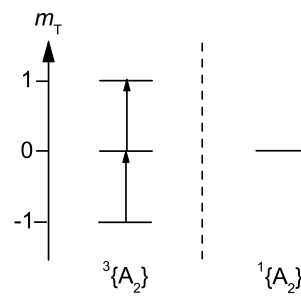


Abb. 2.3: Irreduzible Komponenten eines A_2 -Systems

Übergänge (gleiche Frequenz) hintereinander, so daß wie erwartet nur ein Signal sichtbar ist.

Im nächsten Schritt kann man nun das Spektrum eines A_2X -Systems herleiten. Hierbei sind das Triplett und das Singulett des A_2 -Teilchens mit dem Dublett des X-Spins zu kombinieren, so daß sich zwei Teilspektren ergeben (Abb. 2.4). Mit der Auswahlregel ergeben sich vier A-Übergänge und vier X-Übergänge. Von den A-Übergängen sind wieder die entartet, die hintereinander liegen. Das Signal der A_2 -Gruppe spaltet also in ein Dublett mit Intensitätsverhältnis 2:2 auf. Bei den X-Übergängen sind die entartet, die auf einer Höhe nebeneinander liegen. Also hat der einzige Übergang im $^1\{A_2\}^2X$ -Term die gleiche Frequenz wie der mittlere diagonale im Untersystem zu $^3\{A_2\}^2X$. Daraus resultiert für den X-Spin ein Triplett mit dem Verhältnis 1:2:1.

2.7.1 Spektren in der X-Näherung

Für schwache Kopplungen von A_NX_M -Systemen kann man analog vorgehen und sich die Spektren zusammenfassend folgendermaßen erklären, ohne daß dabei der volle Nutzen der abgeleiteten Termschemata deutlich wird:

Man betrachte eine Gruppe A mit N und eine Gruppe B mit M äquivalenten Spins. Die skalare Wechselwirkung innerhalb der Gruppe führt zu keiner Aufspaltung. Allerdings koppelt jeder der A-Spins mit den B-Spins und umgekehrt. Für die erste Gruppe gibt es 2^N , für die zweite 2^M Einstellmöglichkeiten, von denen aber einige energetisch äquivalent

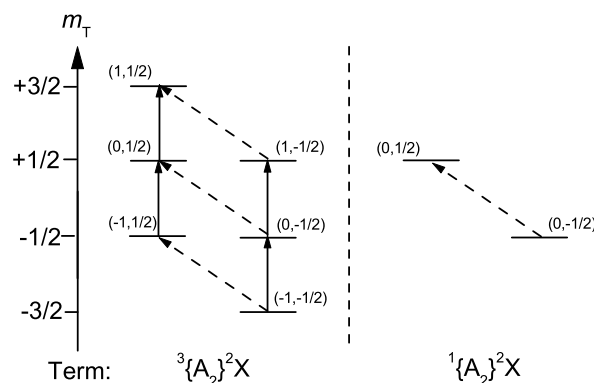


Abb. 2.4: Irreduzible Komponenten eines A_2X -Systems. Es sind vier A-Übergänge (vertikal) und vier X-Übergänge (diagonal) erlaubt. Wegen der teilweisen Entartung treten aber nur 5 Resonanzlinien auf.

Tab. 2.2: Pascalsches Dreieck zur Bestimmung von Linienintensitäten in Multipletts

N	Intensitäten
0	1
1	1 1
2	1 2 1
3	1 3 3 1
4	1 4 6 4 1
5	1 5 10 10 5 1

sind ($\uparrow\uparrow\downarrow, \uparrow\downarrow\uparrow, \downarrow\uparrow\uparrow$), so daß die Resonanz der A-Spins in $M + 1$ Linien und die der B-Spins in $N + 1$ Linien aufspaltet. Die Intensitätsverhältnisse ergeben sich im Grenzfall der schwachen Kopplung aus den Realisierungsmöglichkeiten der einzelnen Niveaus. Bei Spin- $\frac{1}{2}$ -Teilchen sind dies gerade die Binomialkoeffizienten, und man kann die Linienintensitäten innerhalb eines Multipletts mit Hilfe des Pascalschen Dreiecks darstellen, welches in Tab. 2.2 gezeigt ist.

2.7.2 Übergänge in stark gekoppelten Systemen

Der Vorteil der Termschemata wird erst bei Systemen deutlich, bei denen die X-Näherung nicht mehr vollständig gilt. Geht man vom $A_N X_M$ -System aus, so wird bei zunehmender Kopplungsstärke durch die Mischung der ursprünglichen Produktzustände die Entartung der verschiedenen Übergänge aufgehoben. Das $A_2 B$ -System zeigt also zunächst acht mögliche Übergänge. Ihre Intensitäten ergeben sich wie bei AB-Systemen aus den Mischungswinkeln. Auf die kompliziertere Diagonalisierung eines Hamilton-Unterraums für mehr als zwei Spins soll hier nicht näher eingegangen werden, denn die damit verknüpften Intensitätsverhältnisse werden in Simulationsprogrammen bereits berücksichtigt.

Zusätzlich zur Aufhebung der Entartung kommt bei stark gekoppelten Systemen noch ein Effekt hinzu, der zu weiteren (sehr schwachen) Resonanzen im Spektrum führen kann. Die Auswahlregel $m_T = 1$ wird dahingehend aufgeweicht, daß nicht nur ein Spin umklappen darf, sondern daß sich bei einer Kombination von Spin-Flips nur die Netto-Differenz für

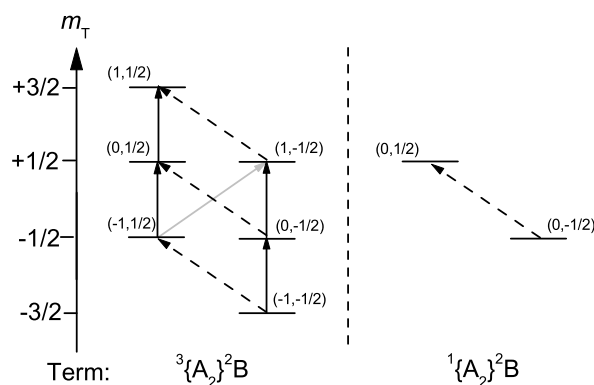


Abb. 2.5: Irreduzible Komponenten eines $A_2 B$ -Systems. Neben den acht Übergängen, die in der X-Näherung teilweise entartet sind, tritt nun auch noch der sehr schwache Kombinations-Übergang (\nearrow) auf. Insgesamt sind nun neun Signale theoretisch detektierbar.

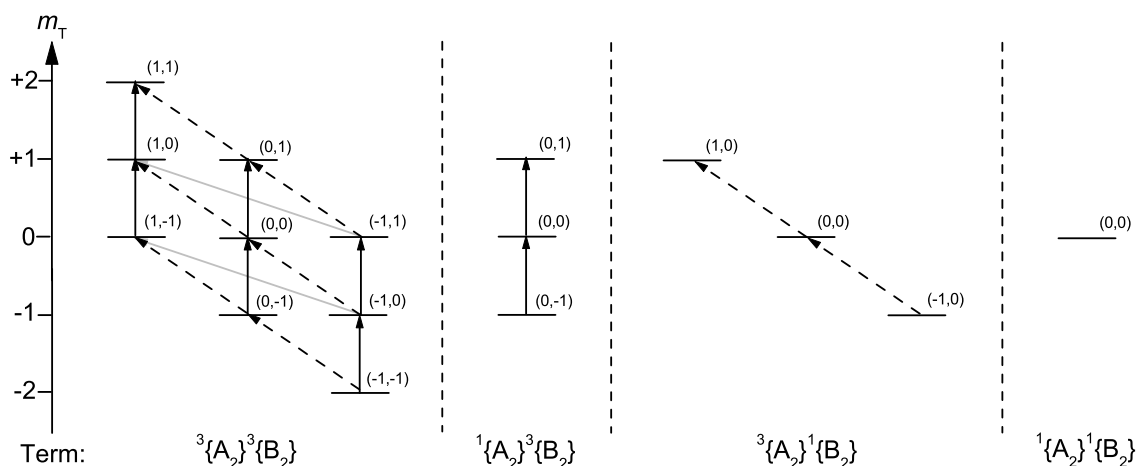


Abb. 2.6: Irreduzible Komponenten eines A_2B_2 -Systems. Je acht A- (diagonal) und acht B-Übergänge (vertikal) ergeben insgesamt 16 nicht entartete Linien; Zusätzlich gibt es zwei sehr schwache Kombinations-Übergänge (\searrow).

m_T um ± 1 ändern muß. Im A_2X -System ist dann auch der Übergang $(1, -\frac{1}{2}) \leftrightarrow (-1, \frac{1}{2})$ erlaubt, der in Abb. 2.5 grau gekennzeichnet ist.

Zum Schluß soll noch das Spektrum eines A_2B_2 -Systems hergeleitet werden, da ein solches System in dem hier untersuchten Metaboliten Taurin vorkommt. Die Kombination der Triplett- und Singulett-Zustände ergibt vier irreduzible Komponenten mit insgesamt 12, 2, und 2 Übergängen. Sie sind je zur Hälfte A- (diagonal) und B-Übergänge (vertikal). In der AX-Näherung liegt eine solche Entartung vor, daß die Übergänge von $^3\{A_2\}^1\{B_2\}$ gerade der mittleren Diagonalen in $^3\{A_2\}^3\{B_2\}$, und die Übergänge in $^1\{A_2\}^3\{B_2\}$ gerade der mittleren Vertikalen in $^3\{A_2\}^3\{B_2\}$ entsprechen. Somit ergibt sich das für ein A_2X_2 -System erwartete Muster aus zwei Triplets mit den Intensitäten 2 : 4 : 2.

Die Simulation des Taurin-Spektrums bei 1,5 T wird zeigen, daß bei höchster Auflösung alle 16 Resonanzen detektierbar sind. Ihre Intensitäten ergeben sich aus dem Mischungswinkel nach Drehung des (6-dimensionalen) Hamilton-Unterraums. Auf Details soll hier nicht weiter eingegangen werden. Das verwendete Programm berechnet die Intensitäten zur entsprechenden Kopplungsstärke, berücksichtigt allerdings nicht die zwei noch möglichen Kombinations-Übergänge $(1, 0) \leftrightarrow (-1, 1)$ und $(1, -1) \leftrightarrow (-1, 0)$. Sie sind in Abb. 2.6 grau dargestellt.

Kapitel 3

Dipolare Kopplung

3.1 Der dipolare Hamilton-Operator

Die dipolare Kopplung ist vergleichbar mit der aus dem Alltag bekannten Wechselwirkung zwischen den Dipolfeldern eines Stabmagneten und einer Kompassnadel. Sie ist eine direkte Kopplung zwischen den magnetischen Dipolen der Spins. In der klassischen Elektrodynamik ist die Wechselwirkungsenergie zweier magnetischer Dipole im Abstand r gegeben durch

$$E = \frac{\mu_0}{4\pi} \left(\frac{\vec{\mu}_1 \vec{\mu}_2}{r^3} - \frac{3(\vec{\mu}_1 \vec{r})(\vec{\mu}_2 \vec{r})}{r^5} \right)$$

(mit $\frac{\mu_0}{4\pi} = 10^{-7} \frac{\text{m}\cdot\text{kg}}{\text{s}^2\cdot\text{A}^2}$). Der Übergang zur Quantenmechanik erfolgt durch Substitution des Vektors $\vec{\mu}$ mit dem Operator $\gamma\hbar\hat{I}$. Der Hamiltonoperator \hat{H}_{DD} für die direkte dipolare Wechselwirkung von N Spins ist dann

$$\hat{H}_{\text{DD}} = \frac{1}{2} \frac{\mu_0}{4\pi} \hbar^2 \sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^N \left(\frac{\gamma_i \hat{I}_i \gamma_k \hat{I}_k}{r_{ik}^3} - \frac{3(\gamma_i \hat{I}_i \vec{r}_{ik})(\gamma_k \hat{I}_k \vec{r}_{ik})}{r_{ik}^5} \right).$$

Für ein 2-Spin-System (\hat{I}, \hat{S}) erhält man also

$$\hat{H}_{\text{DD}} = \frac{\mu_0}{4\pi} \gamma_I \gamma_S \hbar^2 \left(\frac{\hat{I} \hat{S}}{r_{IS}^3} - \frac{3(\hat{I} \vec{r}_{IS})(\hat{S} \vec{r}_{IS})}{r_{IS}^5} \right). \quad (3.1)$$

Dies ergibt mit $r := r_{IS}$ nach Ausführung der Produkte und Sortierung der Komponenten von \tilde{D} in kartesischen Koordinaten:

$$\hat{H}_{\text{DD}} = \frac{\mu_0 \hbar^2}{4\pi} \frac{\gamma_I \gamma_S}{r^5} \hat{I} \begin{pmatrix} r^2 - 3x^2 & -3xy & -3xz \\ -3xy & r^2 - 3y^2 & -3yz \\ -3xz & -3yz & r^2 - 3z^2 \end{pmatrix} \hat{S} = \kappa \hat{I} \tilde{D} \hat{S}.$$

$\kappa = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar^2}{r^5}$ kann als Kopplungskonstante aufgefaßt werden (analog zu J). Da der Tensor \tilde{D} spurfrei ist, verschwindet sein zeitlicher Mittelwert, wenn isotrope Brownsche Bewegung möglich ist. Dies wird aber auch noch an anderer Stelle sichtbar.

Unter Benutzung von Polarkoordinaten r, ϕ, θ , der Operatoren \hat{I}_z, \hat{S}_z sowie der Leiteroperatoren $\hat{I}_+, \hat{I}_-, \hat{S}_+$ und \hat{S}_- kann man die Gleichung (3.1) auch zu

$$\hat{H}_{\text{DD}} = \frac{\mu_0 \hbar^2}{4\pi} \frac{\gamma_I \gamma_S}{r^3} (\hat{A} + \hat{B} + \hat{C} + \hat{D} + \hat{E} + \hat{F})$$

umschreiben. Dabei sind die Terme \hat{A} bis \hat{F} das sogenannte dipolare Alphabet von Operatoren, die Übergänge verschiedener „Kohärenzordnungen“ darstellen:

$$\begin{aligned}
\hat{A} &= \hat{I}_z \hat{S}_z (1 - 3 \cos^2 \theta) \\
\hat{B} &= -\frac{1}{4} (\hat{I}_+ \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_+) (1 - 3 \cos^2 \theta) & 0\text{QC} \\
\hat{C} &= -\frac{3}{2} (\hat{I}_+ \hat{S}_z + \hat{I}_z \hat{S}_+) \sin \theta \cos \theta e^{-i\phi} & 1\text{QC} \\
\hat{D} &= \hat{C}^* = -\frac{3}{2} (\hat{I}_- \hat{S}_z + \hat{I}_z \hat{S}_-) \sin \theta \cos \theta e^{i\phi} & 1\text{QC} \\
\hat{E} &= -\frac{3}{4} \hat{I}_+ \hat{S}_+ \sin^2 \theta e^{-2i\phi} & 2\text{QC} \\
\hat{F} &= \hat{E}^* = -\frac{3}{4} \hat{I}_- \hat{S}_- \sin^2 \theta e^{2i\phi} & 2\text{QC}
\end{aligned}$$

Term \hat{B} beschreibt eine Nullquanten-Kohärenz (beide Spins „flippen gegeneinander“, z.B. $|+-\rangle \rightarrow |-+\rangle$). Analog beschreiben die Terme \hat{C} und \hat{D} Einquanten-Kohärenzen (\hat{I} oder \hat{S} flippt) und \hat{E} bzw. \hat{F} Doppelquanten-Kohärenzen (beide „flippen parallel“, z.B. $|++\rangle \rightarrow |--\rangle$).

Durch die Brownsche Bewegung fallen nun in Flüssigkeiten und in den meisten Geweben die Terme \hat{A} bis \hat{F} wegen

$$\langle e^{\pm i\phi} \rangle = \langle e^{\pm 2i\phi} \rangle = \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle = 0$$

weg. Das heißt, daß die dipolare Kopplung keinen Einfluß auf die Linienposition und -intensität hat. In vielen Fällen ist die dipolare Kopplungskonstante so groß, daß ohne diesen Mittelungsprozeß die Effekte der skalaren Kopplung gar nicht sichtbar wären. Bei Flüssigkeitsspektren handelt es sich daher immer um hochaufgelöste Spektren.

Anders sieht die Situation aus, wenn die Brownsche Bewegung nicht isotrop erfolgen kann (z. B. in Muskel- oder Kollagen-Fasern). Leider ist der Operator für die dipolare Wechselwirkung wesentlich komplexer als der für die J -Kopplung, da hier zusätzlich Terme für Ein- und Doppelquantenkohärenzen auftreten. Es wird eine Vereinfachung von \hat{H}_{DD} benötigt, die nun hergeleitet werden soll.

3.1.1 Säkularer Anteil des Operators

Die dipolare Wechselwirkung kann bei starken Grundfeldern als klein gegen die Zeeman-Aufspaltung angesehen werden ($\kappa \ll \hbar\omega_I, \hbar\omega_S$, sog. Hochfeldnäherung). Dann kann man \hat{H}_{DD} so vereinfachen, daß nur Terme eingehen, die mit dem Zeeman-Operator $\hat{Z} \propto \hat{I}_z + \hat{S}_z$ kommutieren („säkularer“ Anteil des Operators). So lassen sich simultane Eigenfunktionen finden, die eine genaue Bestimmung der Verschiebung der Zeeman-Niveaus ermöglichen. Zur Vereinfachung werden die Vorfaktoren in den jeweiligen Operatoren zunächst weggelassen. Für \hat{A} läßt sich sehr leicht zeigen, daß er mit \hat{Z} kommutiert:

$$[\hat{A}, \hat{Z}] \propto [\hat{I}_z \hat{S}_z, \hat{I}_z] + [\hat{I}_z \hat{S}_z, \hat{S}_z] = 0 + [\hat{I}_z, \hat{I}_z] \hat{S}_z + \hat{I}_z [\hat{S}_z, \hat{S}_z] + 0 = 0.$$

Bei der Betrachtung aller anderen Vertauschungsrelationen ist es sinnvoll, zunächst die Leiteroperatoren wieder in die kartesischen Komponenten der Spin-Operatoren zu überführen.

Für $\hat{B} \propto \hat{I}_+ \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_+$ ergibt sich dann

$$\begin{aligned}
[\hat{B}, \hat{Z}] &\propto [\hat{I}_x \hat{S}_x + \hat{I}_y \hat{S}_y, \hat{I}_z + \hat{S}_z] \\
&= [\hat{I}_x \hat{S}_x, \hat{I}_z] + [\hat{I}_x \hat{S}_x, \hat{S}_z] + [\hat{I}_y \hat{S}_y, \hat{I}_z] + [\hat{I}_y \hat{S}_y, \hat{S}_z] \\
&= [\hat{I}_x, \hat{I}_z] \hat{S}_x + \hat{I}_x [\hat{S}_x, \hat{S}_z] + [\hat{I}_y, \hat{I}_z] \hat{S}_y + \hat{I}_y [\hat{S}_y, \hat{S}_z] \\
&= -i\hbar \hat{I}_y \hat{S}_x - i\hbar \hat{I}_x \hat{S}_y + i\hbar \hat{I}_x \hat{S}_y + i\hbar \hat{I}_y \hat{S}_x = 0.
\end{aligned}$$

Die Operatoren für die Einquantenübergänge kommutieren allerdings nicht mehr mit dem Zeeman-Operator. Zwar enthält auch der Nullquantenoperator die nicht mit der z -Komponente kommutierenden x - und y -Komponenten der Spinoperatoren, aber bei \hat{B} liegt eine solche Symmetrie vor, daß sich die Terme gegenseitig aufheben. Dies ist bei den anderen Operatoren nicht der Fall.

$$\begin{aligned}
[\hat{C}, \hat{Z}] &\propto [\hat{I}_+ \hat{S}_z + \hat{I}_z \hat{S}_+, \hat{I}_z + \hat{S}_z] \\
&= \underbrace{[\hat{I}_+ \hat{S}_z, \hat{I}_z]}_a + \underbrace{[\hat{I}_+ \hat{S}_z, \hat{S}_z]}_b + \underbrace{[\hat{I}_z \hat{S}_+, \hat{I}_z]}_c + \underbrace{[\hat{I}_z \hat{S}_+, \hat{S}_z]}_d
\end{aligned}$$

Diese 4 Terme sollen nun einzeln betrachtet werden. Man sieht leicht, daß die beiden mittleren nur kommutierende Größen enthalten:

$$\begin{aligned}
b &= [\hat{I}_x \hat{S}_z, \hat{S}_z] + i[\hat{I}_y \hat{S}_z, \hat{S}_z] = 0 \\
c &= [\hat{I}_z \hat{S}_x, \hat{I}_z] + i[\hat{I}_z \hat{S}_y, \hat{I}_z] = 0
\end{aligned}$$

Für a und d gilt dagegen

$$\begin{aligned}
a &= [\hat{I}_x \hat{S}_z, \hat{I}_z] + i[\hat{I}_y \hat{S}_z, \hat{I}_z] = [\hat{I}_x, \hat{I}_z] \hat{S}_z + i[\hat{I}_y, \hat{I}_z] \hat{S}_z \\
&= -\hbar(i\hat{I}_y + \hat{I}_x) \hat{S}_z \\
d &= [\hat{I}_z \hat{S}_x, \hat{I}_z] + i[\hat{I}_z \hat{S}_y, \hat{I}_z] = +\hat{I}_z [\hat{S}_x, \hat{S}_z] + i\hat{I}_z [\hat{S}_y, \hat{S}_z] \\
&= -\hbar \hat{I}_z (i\hat{S}_y + \hat{S}_x).
\end{aligned}$$

Insgesamt bleibt mit

$$[\hat{C}, \hat{Z}] \propto -\hbar \left((i\hat{I}_y + \hat{I}_x) \hat{S}_z + \hat{I}_z (i\hat{S}_y + \hat{S}_x) \right)$$

ein nicht verschwindender Term. Wegen $\hat{D} = \hat{C}^*$ unterscheiden sich die beiden Operatoren nur im Vorzeichen der Konstanten i , und man kann direkt

$$[\hat{D}, \hat{Z}] \propto -\hbar \left((\hat{I}_x - i\hat{I}_y) \hat{S}_z + \hat{I}_z (\hat{S}_x - i\hat{S}_y) \right)$$

ablesen. Auch die Zweiquantenoperatoren kommutieren nicht mit \hat{Z} .

$$\begin{aligned}
[\hat{E}, \hat{Z}] &\propto [\hat{I}_+ \hat{S}_+, \hat{I}_z + \hat{S}_z] = [\hat{I}_+ \hat{S}_+, \hat{I}_z] + [\hat{I}_+ \hat{S}_+, \hat{S}_z] \\
&= \underbrace{[\hat{I}_x \hat{S}_x, \hat{I}_z]}_a + \underbrace{i[\hat{I}_x \hat{S}_y, \hat{I}_z]}_b + \underbrace{i[\hat{I}_y \hat{S}_x, \hat{I}_z]}_c - \underbrace{[\hat{I}_y \hat{S}_y, \hat{I}_z]}_d \\
&\quad + \underbrace{[\hat{I}_x \hat{S}_x, \hat{S}_z]}_e + \underbrace{i[\hat{I}_x \hat{S}_y, \hat{S}_z]}_f + \underbrace{i[\hat{I}_y \hat{S}_x, \hat{S}_z]}_g - \underbrace{[\hat{I}_y \hat{S}_y, \hat{S}_z]}_h
\end{aligned}$$

Diese acht Terme sind alle von Null verschieden:

$$\begin{aligned}
a &= [\hat{I}_x, \hat{I}_z] \hat{S}_x = -i\hbar \hat{I}_y \hat{S}_x \\
b &= i[\hat{I}_x, \hat{I}_z] \hat{S}_y = \hbar \hat{I}_y \hat{S}_y \\
c &= i[\hat{I}_y, \hat{I}_z] \hat{S}_x = -\hbar \hat{I}_x \hat{S}_x \\
d &= -[\hat{I}_y, \hat{I}_z] \hat{S}_y = -i\hbar \hat{I}_x \hat{S}_y \\
e &= \hat{I}_x [\hat{S}_x, \hat{S}_z] = -i\hbar \hat{I}_x \hat{S}_y = d \\
f &= i\hat{I}_x [\hat{S}_y, \hat{S}_z] = -\hbar \hat{I}_x \hat{S}_x = c \\
g &= i\hat{I}_y [\hat{S}_x, \hat{S}_z] = \hbar \hat{I}_y \hat{S}_y = b \\
h &= -\hat{I}_y [\hat{S}_y, \hat{S}_z] = -i\hbar \hat{I}_y \hat{S}_x = a
\end{aligned}$$

Insgesamt ergibt sich für den Kommutator

$$[\hat{E}, \hat{Z}] \propto 2\hbar(\hat{I}_y \hat{S}_y - \hat{I}_x \hat{S}_x - i\hat{I}_y \hat{S}_x - i\hat{I}_x \hat{S}_y).$$

Genau wie für den zweiten Einquantenoperator erhält man automatisch auch

$$[\hat{F}, \hat{Z}] \propto 2\hbar(\hat{I}_y \hat{S}_y - \hat{I}_x \hat{S}_x + i\hat{I}_y \hat{S}_x + i\hat{I}_x \hat{S}_y).$$

Der säkulare Anteil besteht demnach nur aus den ersten beiden Termen des dipolaren Alphabets, so daß der Hamilton-Operator für die weitere Betrachtung folgende Gestalt hat:

$$\begin{aligned}
\hat{H}'_{\text{DD}} &= \frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar^2}{4\pi r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) \left(\hat{I}_z \hat{S}_z - \frac{1}{4} (\hat{I}_+ \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_+) \right) \\
&= k \left(\hat{I}_z \hat{S}_z - \frac{1}{4} (\hat{I}_+ \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_+) \right). \tag{3.2}
\end{aligned}$$

3.2 Berechnung der Energieniveaus

3.2.1 Simultane Eigenfunktionen

Der Operator (3.2) hat nun eine Gestalt, die schon in ähnlicher Weise bei der skalaren Kopplung auftauchte. Um simultane Eigenfunktionen des Zeeman- und des säkularen dipolaren Operators zu finden, geht man wieder von den 4 Produktzuständen

$$\psi_1 = |++\rangle, \quad \psi_2 = |+-\rangle, \quad \psi_3 = |-+\rangle, \quad \psi_4 = |--\rangle$$

aus. ψ_1 und ψ_4 können wiederum als Eigenzustände beibehalten werden, weil

$$\hat{H}'_{\text{DD}} |\pm\pm\rangle = \frac{k}{4} |\pm\pm\rangle \tag{3.3}$$

gilt. Auch die weitere Betrachtung gestaltet sich analog zur skalaren Kopplung über die Drehung der alten Zustände ψ_2 und ψ_3 . Sie müssen dann Eigenfunktionen sein zu

$$\hat{H} = -(\hbar\omega_1 \hat{I}_z + \hbar\omega_2 \hat{S}_z) + k \left(\hat{I}_z \hat{S}_z - \frac{1}{4} (\hat{I}_+ \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_+) \right).$$

Dabei liefert die Orthogonalitätsbedingung $\langle \psi'_3 | \hat{H} | \psi'_2 \rangle$ eine Beziehung zwischen Drehwinkel und Kopplungskonstante k . Die Wirkung des Operators auf den einen Zustand ist:

$$\begin{aligned} \hat{H} | \psi'_2 \rangle = & (\cos \alpha) \left(-\frac{\hbar\omega_1}{2} \psi_2 - \frac{\hbar\omega_2}{2} \psi_2 + k \left(-\frac{1}{4} \psi_2 - \frac{1}{4} \psi_3 \right) \right) + \\ & + (\sin \alpha) \left(+\frac{\hbar\omega_1}{2} \psi_3 - \frac{\hbar\omega_2}{2} \psi_3 + k \left(-\frac{1}{4} \psi_3 - \frac{1}{4} \psi_2 \right) \right). \end{aligned}$$

Das Skalarprodukt ist dann

$$\begin{aligned} \langle \psi'_3 | \hat{H} | \psi'_2 \rangle = & -(\sin \alpha \cos \alpha) \left(-\frac{\hbar\omega_1}{2} + \frac{\hbar\omega_2}{2} - \frac{k}{4} \right) - (\cos^2 \alpha) \left(\frac{k}{4} \right) \\ & + (\sin \alpha \cos \alpha) \left(\frac{\hbar\omega_1}{2} - \frac{\hbar\omega_2}{2} - \frac{k}{4} \right) + (\sin^2 \alpha) \left(\frac{k}{4} \right). \quad (3.4) \end{aligned}$$

Dieser Term verschwindet, wenn

$$\frac{1}{4} k (\sin^2 \alpha - \cos^2 \alpha) = -\hbar(\omega_1 - \omega_2) \sin \alpha \cos \alpha$$

gilt. Dies kann man noch so umformen, daß man analog zu (2.4) die Beziehung

$$\frac{k}{2\hbar(\omega_1 - \omega_2)} = \tan 2\alpha \quad (3.5)$$

erhält. Der Verlauf ist bis auf das Vorzeichen der gleiche wie bei der skalaren Kopplung. Dies hat im Extremfall der starken Kopplung Auswirkungen auf die Einteilung in Singulett- und Triplett-Zustände (s.u.).

3.2.2 Eigenwerte des Zeeman-Operators

Aufgrund des analogen Vorgehens bei der Bestimmung der simultanen Eigenfunktionen bekommt man gerade wieder die Darstellung (2.5) für \mathcal{H}_Z . Für die dipolare Kopplung treten zwar nur positive Mischungswinkel auf, aber da nur die Funktion $\cos 2\alpha$ Bedeutung hat, ist das Ergebnis identisch.

3.2.3 Korrekturterme der dipolaren Kopplung

Für die reinen Zustände kann man direkt an (3.3) die Energiekorrekturen

$$\begin{aligned} \Delta E_1 &= \frac{k}{4} = \Delta \text{ und} \\ \Delta E_4 &= \Delta \end{aligned}$$

ablesen. Für die gemischten Zustände ist die Wirkung des zusätzlichen Operators folgende:

$$\hat{H}'_{\text{DD}} | \psi'_2 \rangle = (\cos \alpha) k \left(-\frac{1}{4} \psi_2 - \frac{1}{4} \psi_3 \right) + (\sin \alpha) k \left(-\frac{1}{4} \psi_3 - \frac{1}{4} \psi_2 \right).$$

Demnach ist die Energieverschiebung

$$\begin{aligned} \Delta E_2 &= -(\cos^2 \alpha) \frac{k}{4} - (\sin \alpha \cos \alpha) \frac{k}{2} - (\sin^2 \alpha) \frac{k}{4} \\ &= \frac{k}{4} (-\sin 2\alpha - 1). \quad (3.6) \end{aligned}$$

Für die andere Eigenfunktion erhält man analog

$$\hat{H}'_{\text{DD}} |\psi'_3\rangle = -(\sin \alpha)k \left(-\frac{1}{4}\psi_2 - \frac{1}{4}\psi_3 \right) + (\cos \alpha)k \left(-\frac{1}{4}\psi_3 - \frac{1}{4}\psi_2 \right)$$

und

$$\Delta E_3 = \frac{k}{4} (\sin 2\alpha - 1) \quad (3.7)$$

als Energieverschiebung. Wie bei der skalaren Kopplung wird der winkelabhängige Term durch den Flip-Flop-Operator verursacht.

Durch die Wahl simultaner Eigenfunktionen kann nun auch die durch (3.4) diagonalisierte Matrixdarstellung von \hat{H}'_{DD} angegeben werden. Sie läßt sich wie der Ausdruck für die skalare Kopplung in einen konstanten und einen winkelabhängigen Term zerlegen:

$$\mathcal{H}_{\text{DD}}(\alpha) = \underbrace{\Delta \begin{pmatrix} +1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & +1 \end{pmatrix}}_{\mathcal{A}} + \underbrace{\Delta \sin 2\alpha \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & +1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}}_{\mathcal{B}(\alpha)} \quad (3.8)$$

\mathcal{A} und $\mathcal{B}(\alpha)$ sind die diagonalisierten Matrixdarstellungen von \hat{A} und \hat{B} . Sie entsprechen den Matrizen \mathcal{J}_1 und \mathcal{J}_2 der skalaren Kopplung. Wiederum wirkt der winkelabhängige Operator nur im zweidimensionalen Hilbert-Unterraum $\{\psi'_2, \psi'_3\}$. Er hebt die Entartung der beiden Zustände auf, die noch unter \mathcal{A} vorliegt.

3.3 Erlaubte Dipol-Übergänge, Linienintensitäten

Die meßbaren Übergänge berechnen sich wieder mit (2.9) und (2.10). Daher ist auch der Übergang $\psi'_1 \leftrightarrow \psi'_4$ genauso wie bei der skalaren Kopplung verboten. Da hier aber Mischungswinkel $0^\circ \leq \alpha \leq 45^\circ$ auftreten, läuft die Betrachtung der weiteren Übergänge etwas anders ab. Für stark gekoppelte Systeme wird ψ'_3 der Singulett-Zustand sein:

$$\begin{aligned} \psi'_3 &= -\sin \alpha |\psi_2\rangle + \cos \alpha |\psi_3\rangle \\ \Rightarrow \psi'_3 &= -a |\psi_2\rangle + b |\psi_3\rangle \quad \text{mit } a \leq b \text{ und } a \geq 0. \end{aligned}$$

Zwar entstehen auch bei

$$\hat{H}_{\text{HF}} |\psi'_3\rangle \propto -a(|++\rangle + |--\rangle) + b(|++\rangle + |--\rangle)$$

wieder Terme, die den Übergang $\psi'_2 \leftrightarrow \psi'_3$ generell verbieten, aber hier gilt für isochrone Systeme bzw. für den Extremfall starker Kopplung $a = b$, so daß dann alle Übergänge mit ψ'_3 (statt ψ'_2) verboten sind. Für alle anderen Mischungswinkel sind wieder die Übergänge

$$\begin{array}{ll} \psi'_1 \leftrightarrow \psi'_3 & \psi'_2 \leftrightarrow \psi'_4 \\ \psi'_3 \leftrightarrow \psi'_4 & \psi'_1 \leftrightarrow \psi'_2 \end{array}$$

erlaubt. Mit den winkelabhängigen Energieniveaus aus (2.5) und (3.8)

$$E_1 = -\frac{\hbar(\omega_1 + \omega_2)}{2} + \Delta \quad (3.9)$$

$$E_2 = -\frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos 2\alpha - \Delta - \Delta \sin 2\alpha \quad (3.10)$$

$$E_3 = \frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos 2\alpha - \Delta + \Delta \sin 2\alpha \quad (3.11)$$

$$E_4 = \frac{\hbar(\omega_1 + \omega_2)}{2} + \Delta \quad (3.12)$$

erhält man die Übergangsenergien

$$\left. \begin{aligned} E_{24} &= \frac{\hbar}{2}(\Delta\omega \cos 2\alpha + \omega_1 + \omega_2) + 2\Delta + \Delta \sin 2\alpha \\ E_{13} &= \frac{\hbar}{2}(\Delta\omega \cos 2\alpha + \omega_1 + \omega_2) - 2\Delta + \Delta \sin 2\alpha \end{aligned} \right\} \quad (3.13)$$

$$\left. \begin{aligned} E_{12} &= \frac{\hbar}{2}(-\Delta\omega \cos 2\alpha + \omega_1 + \omega_2) - 2\Delta - \Delta \sin 2\alpha \\ E_{34} &= \frac{\hbar}{2}(-\Delta\omega \cos 2\alpha + \omega_1 + \omega_2) + 2\Delta - \Delta \sin 2\alpha. \end{aligned} \right\} \quad (3.14)$$

Auch diese vier Ausdrücke lassen sich aufgrund einer symmetrischen Aufspaltung um $\hbar\omega_1$ in (3.13) und um $\hbar\omega_2$ in (3.14) zu zwei Dubletts zusammenfassen. Die winkelabhängigen Terme treten innerhalb eines Dubletts in identischer Form auf, so daß die Aufspaltung unabhängig von der dipolaren Kopplungskonstante ist:

$$\Delta\nu_1 = \frac{E_{24} - E_{13}}{h} = \frac{E_{34} - E_{12}}{h} = \frac{4\Delta}{h} = \frac{k}{h}$$

Mit wachsendem α wächst die Asymmetrie der Dubletts um die ursprünglichen Resonanzfrequenzen ω_i . Sie ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei der skalaren Kopplung. Daß der Mittelpunkt von den ursprünglichen Resonanzen abweicht kann man leicht am Beispiel des 1. Dubletts zeigen. Mit Hilfe von $\omega_2 = \omega_1 - \Delta\omega$ läßt sich (3.13) zu

$$\begin{aligned} E_{24} &= \frac{\hbar}{2}(\Delta\omega(\cos^2 \alpha - \sin^2 \alpha) + \omega_1 + \omega_1 - \Delta\omega) + 2\Delta + \frac{k}{2} \sin \alpha \cos \alpha \\ &= \hbar\omega_1 + \frac{\hbar\Delta\omega}{2}(\cos^2 \alpha - \sin^2 \alpha - 1) + 2\Delta + \frac{k}{2} \sin \alpha \cos \alpha \\ &= \hbar\omega_1 + 2\Delta \underbrace{-\hbar\Delta\omega \sin^2 \alpha + 2\Delta \sin \alpha \cos \alpha}_{A_P^D(\alpha)} \\ E_{13} &= \hbar\omega_1 - 2\Delta \underbrace{-\hbar\Delta\omega \sin^2 \alpha + 2\Delta \sin \alpha \cos \alpha} \end{aligned}$$

umformen. Alle winkelabhängigen Terme (also wegen (3.5) auch $\Delta\omega$!) bewirken bei wachsender Kopplungsstärke eine Verschiebung des Dublett-Mittelpunktes von ω_1 weg. Damit läßt sich der Asymmetrie-Parameter A_P^D des Dubletts definieren:

$$A_P^D(\alpha) = -\hbar\Delta\omega \sin^2 \alpha + 2\Delta \sin \alpha \cos \alpha. \quad (3.15)$$

Dieser ist auch ein Maß für die Kopplungsstärke (wenn $\Delta\omega$ für das System ohne Kopplung bekannt ist) und kann zur Beurteilung dipolar gekoppelter Systeme *in vivo* herangezogen werden (s. Kap. 3.7).

Die Intensitäten eines Dubletts zeigen die gleiche Abhängigkeit wie (2.20) und (2.21), was aber diesmal zum Verschwinden des Übergangs $\psi'_1 \leftrightarrow \psi'_3$ führt. Dadurch kommt es zu einer veränderten Zusammenfassung der Linien in einzelne Dubletts:

Im Fall $\omega_1 \neq \omega_2$ werden die Linien folgendermaßen zusammengefaßt:

$$\begin{aligned} \text{Dublett 1: } & \psi'_1 \leftrightarrow \psi'_3 \text{ und } \psi'_2 \leftrightarrow \psi'_4 \\ \text{Dublett 2: } & \psi'_1 \leftrightarrow \psi'_2 \text{ und } \psi'_3 \leftrightarrow \psi'_4. \end{aligned}$$

Fallen die Resonanzfrequenzen aber zusammen (zu ω_0), so verschwinden die Übergänge, an denen ψ'_3 beteiligt ist, und in (3.13) und (3.14) ist $\alpha = 45^\circ$ einzusetzen. Man erhält

$$\begin{aligned} E_{12} &= \frac{\hbar}{2}2\omega_0 - 2\Delta - \Delta = \hbar\omega_0 - 3\Delta \\ E_{24} &= \frac{\hbar}{2}2\omega_0 + 2\Delta + \Delta = \hbar\omega_0 + 3\Delta \end{aligned}$$

und faßt somit zwei Linien zusammen, die vorher zu verschiedenen Dubletts gehörten:

$$\text{Dublett 3: } \psi'_1 \leftrightarrow \psi'_2 \text{ und } \psi'_2 \leftrightarrow \psi'_4.$$

Die Aufspaltung beträgt

$$\Delta\nu_2 = \frac{E_{24} - E_{12}}{h} = \frac{6\Delta}{h} = \frac{3}{2}\Delta\nu_1.$$

Ebenso wie für die asymmetrischen Linienpositionen kann man auch für die unterschiedlichen Intensitäten einen Asymmetrie-Parameter definieren:

$$A_I = \frac{I_{34}}{I_{12}}. \quad (3.16)$$

Dieser nimmt Werte $0 < A_I \leq 1$ an und ist wiederum ein Maß für die Kopplungsstärke (s. Kap. 3.7).

3.4 Extremfall starker bzw. isochroner Kopplung

Genau wie bei der skalaren Kopplung tritt die Beobachtung einer extrem starken Kopplung (d.h. die Spin-Spin-Wechselwirkung ist dominant und die Ankopplung ans Grundfeld von geringerer Bedeutung) bei den verwendeten Grundfeldern nicht auf. Zwar liegen die Kopplungskonstanten $k \approx 10^3 - 10^4$ Hz deutlich über den skalaren Kopplungskonstanten J_{12} , aber immer noch um drei Größenordnungen unter dem $\Delta\omega$ anisochroner Spins.

Ein Sonderfall ist auch hier die Identität der Resonanzfrequenzen $\omega_0 := \omega_1 = \omega_2$. Der Mischungswinkel beträgt $\alpha = 45^\circ$. Die neue Basis sind die schon bekannten symmetrisierten Zustände mit den Eigenwerten aus (2.5):

Eigenfunktion	$ F, I_z + S_z\rangle$	Eigenwert von		Multipllett
		\hat{H}_Z	\hat{P}	
$\psi'_1 = ++\rangle$	$ 1, 1\rangle$	$E_1^0 = -\hbar\omega_0$	+1	Triplet
$\psi'_2 = \frac{1}{\sqrt{2}}(+-\rangle + -+\rangle)$	$ 0, 1\rangle$	$E_2^0 = 0$	+1	Triplet
$\psi'_3 = \frac{1}{\sqrt{2}}(-+\rangle - +-\rangle)$	$ 0, 0\rangle$	$E_3^0 = 0$	-1	Singulett
$\psi'_4 = --\rangle$	$ 1, -1\rangle$	$E_4^0 = +\hbar\omega_0$	+1	Triplet

Für die Korrekturterme bekommt man mit (3.8) folgende Werte:

$$\begin{aligned}\Delta E_1 &= \Delta E_4 = \Delta \\ \Delta E_2 &= -2\Delta \\ \Delta E_3 &= 0.\end{aligned}$$

Zusammenfassend erhält man also folgende Niveaus:

Eigenfunktion	Erwartungswert von	
	\hat{H}'_Z	\hat{H}'_{DD}
ψ'_1	$-\hbar\omega_0$	$+\Delta$
ψ'_2	0	-2Δ
ψ'_3	0	0
ψ'_4	$\hbar\omega_0$	$+\Delta$

Durch die Symmetrisierung der Zustände sind nach der goldenen Regel wieder nur zwei Übergänge innerhalb des Triplets erlaubt:

$$\psi'_1 \leftrightarrow \psi'_2 \quad \psi'_2 \leftrightarrow \psi'_4.$$

Das Termschema ist in Abb. 3.1 zusammen mit dem der schwachen Kopplung gezeigt. Im Gegensatz zur skalaren Kopplung fallen die beiden Linien bei starker Kopplung aber nicht zusammen, denn wie bereits erwähnt, beträgt die Aufspaltung für diesen Fall

$$\Delta\nu_2 = \frac{3k}{2h} = \frac{3}{2} \frac{\mu_0}{16\pi^3} \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta).$$

Dies wird oft auch als

$$\Delta\nu_2 = \frac{3}{2} D_0 (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (3.17)$$

geschrieben. Dabei ist D_0 die sogenannte dipolare Kopplungskonstante

$$D_0 = \frac{\mu_0}{16\pi^3} \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{r^3}. \quad (3.18)$$

Die Frequenzaufspaltung hängt also nicht nur von k und damit vom Kernabstand r und von den gyromagnetischen Verhältnissen γ_i ab, sondern nach (3.5) auch noch vom Verhältnis $k/(\omega_1 - \omega_2)$. Zwei Kerne A und B mit festem Abstand r zeigen demnach unterschiedliche Aufspaltungen der Resonanzlinien, wenn ω_1 und ω_2 zusammenfallen (z. B. durch unterschiedliche chemische Verschiebungen: einmal für Kopplung innerhalb einer CH_2 -Gruppe und einmal bei Kopplung zwischen einer CH_2 - und einer CH_3 -Gruppe).

3.5 Extremfall schwacher Kopplung

Es sei k verschwindend klein. Dann geht $\tan 2\alpha$ gegen 0, was einem Mischungswinkel von 0° entspricht. Die Energiekorrekturen sind nach (3.8)

$$\begin{aligned}\Delta E_1 &= \Delta E_4 = \Delta \\ \Delta E_2 &= \Delta E_3 = -\Delta.\end{aligned}$$

Die 4 Niveaus sehen bei schwacher Kopplung wie folgt aus:

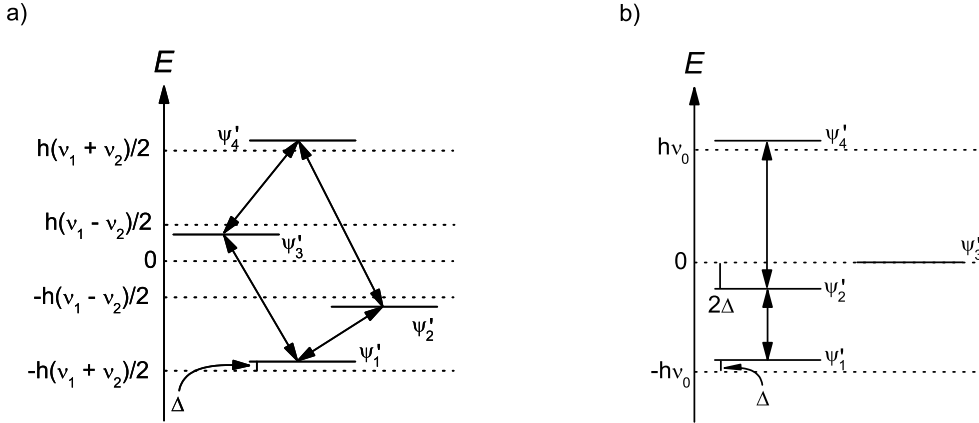


Abb. 3.1: Energieniveaus für (a) schwache und (b) starke bzw. homonukleare dipolare Kopplung. Im Gegensatz zur J -Kopplung kommt es bei (b) zur Ausbildung eines Dubletts.

Eigenfunktion	Erwartungswert von	
	\hat{H}'_Z	\hat{H}'_{DD}
$\psi'_1 = ++\rangle$	$-\frac{\hbar}{2}(\omega_1 + \omega_2)$	$+\Delta$
$\psi'_2 = +-\rangle$	$-\frac{\hbar}{2}(\omega_1 - \omega_2)$	$-\Delta$
$\psi'_3 = -+\rangle$	$\frac{\hbar}{2}(\omega_1 - \omega_2)$	$-\Delta$
$\psi'_4 = --\rangle$	$\frac{\hbar}{2}(\omega_1 + \omega_2)$	$+\Delta$

Mit (2.9) ergeben sich

$$\begin{aligned} \psi'_2 &\leftrightarrow \psi'_4 & \psi'_1 &\leftrightarrow \psi'_3 \\ \psi'_1 &\leftrightarrow \psi'_2 & \psi'_3 &\leftrightarrow \psi'_4 \end{aligned}$$

als mögliche Übergänge mit den Energien

$$\begin{aligned} \hbar\omega_1 + 2\Delta & \quad \hbar\omega_1 - 2\Delta \\ \hbar\omega_2 - 2\Delta & \quad \hbar\omega_2 + 2\Delta. \end{aligned}$$

Wieder spalten die beiden vormals sichtbaren Resonanzen bei ω_1 und ω_2 jeweils in ein Dublett mit der Breite

$$\Delta\nu_1 = \frac{4\Delta}{h} = \frac{k}{h} = \frac{\mu_0}{16\pi^3} \frac{\gamma_I \gamma_S \hbar}{r^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) = D_0 (1 - 3 \cos^2 \theta) \quad (3.19)$$

auf. Die Linienintensitäten innerhalb eines Dubletts stehen wieder im Verhältnis 1:1.

3.6 Dipolare Multipletts bei schneller, aber anisotroper Bewegung

Die bisherigen Überlegungen gingen davon aus, daß der Verbindungsvektor zwischen den Spins zeitlich konstant ist und daher zum Grundfeld immer den gleichen Winkel θ einschließt. Dies ist aber nur in Kristallen bei hinreichend tiefen Temperaturen der Fall und führt dann zu den aus der Festkörper-NMR bekannten Kopplungskonstante im kHz-Bereich. Für Körpergewebe muß man jedoch davon ausgehen, daß sich größere Moleküle zwar entlang einer Vorzugsrichtung (z. B. in der Muskelfaser) orientieren, einzelne Gruppen oder Kerne sich aber noch eingeschränkt bewegen können, so daß θ zeitlich schwankt,

ohne daß es zu einem vollständigen Verschwinden der dipolaren Kopplung kommt. Die Kopplungskonstante nimmt dann deutlich kleinere Werte an.

In der Flüssigkristall-NMR führte man daher den Ordnungsparameter S ein, der solch eine Skalierung bewirkt [Ems75]. Dieser führt teilweise zu einer erheblichen Verkleinerung der sichtbaren Linienaufspaltung. Untersuchungen an Kristallen zeigen bereits die Folgen einer Rotation von Methylen- und Methyl-Gruppen, bevor das Medium flüssig wird. Die einzelnen Effekte sollen hier kurz vorgeführt werden.

3.6.1 Mobilität eines 2-Protonen-Systems

GUTOWSKY et al. untersuchten den Einfluß der Molekulardynamik auf die Linienbreiten von ^1H -NMR-Signalen in Kristallen [Gut50]. Hier ist bereits deutlich unterhalb des Schmelzpunktes die Rotation von Methylen-Gruppen um eine Achse senkrecht zur Kernverbindungslinie zu beobachten. Die Linienaufspaltung (3.17) verändert sich dadurch folgendermaßen:

Der Kernverbindungsvektor \vec{r}_{IS} schließe mit dem Feld B_0 den Winkel θ ein und die Rotationsachse ist um θ' gegen das Feld gekippt (es sei eine freie Rotation um $0 \leq \phi \leq 2\pi$ möglich, Abb. 3.2). Eine CH_2 -Gruppe des Typs $\text{R}_1-\text{CH}_2-\text{R}_2$ kann sich um eine der Einfachbindungen (zusammen mit einem der Reste) oder mit dem ganzen Molekül um die Achse durch R_1 und R_2 drehen. In beiden Fällen erfolgt die Rotation senkrecht zu \vec{r}_{ik} . Der Geometrie-Faktor $(3 \cos^2 \theta - 1)$ aus (3.17) transformiert sich dann zu $\frac{1}{2}(3 \cos^2 \theta' - 1)$, so daß die Linienaufspaltung für diese Art der Rotation

$$\Delta\nu_{\text{rot}\perp} = \frac{3}{4}D_0(3 \cos^2 \theta' - 1) \quad (3.20)$$

beträgt. Die Herleitung für diese Transformation ist identisch mit der Betrachtung des "Magic Angle- Spinnings" (MAS) – einem Verfahren, das die dipolare Kopplung gerade unterdrücken soll. Dabei ist eine Koordinatentransformation des in Kugelflächenfunktionen Y_{lm} dargestellten winkelabhängigen Teils $(3 \cos^2 \theta - 1)$ der dipolaren Kopplung notwendig, die letztendlich den oben angegebenen Ausdruck liefert (Details siehe [Sli89]). Die Charakteristik der Orientierungsabhängigkeit bleibt also erhalten, aber sie bezieht sich nicht mehr auf den internuklearen Vektor, sondern auf die Rotationsachse. Dabei ist zu beachten, daß eine schnelle Rotation nicht von den Tunnel-Effekten in einem Potential mit 3- oder 6-zähliger Symmetrie unterschieden werden kann.

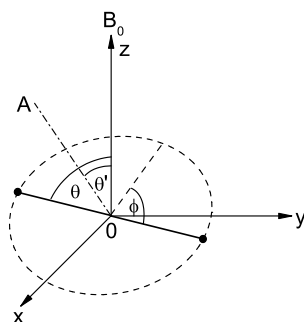


Abb. 3.2: Rotation einer CH_2 -Gruppe um eine Achse A senkrecht zur Kernverbindungslinie. Die Winkelabhängigkeit des Hamilton-Operators bezieht sich nicht mehr auf θ , sondern auf θ' .

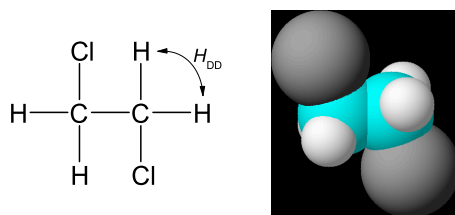


Abb. 3.3: Struktur von 1,2-Dichloroethan. Die dominante dipolare Kopplung findet zwischen den Protonen innerhalb der CH_2 -Gruppen statt. Diese Spin-Paare rotieren um eine Achse senkrecht zu \vec{r}_{HH} . Wegen der Größe der Cl-Atome ist dies aber wohl nicht die C–C-Achse, sondern das Molekül rotiert als Ganzes am Gitterplatz im Kristall.

Als Beispiel für rotierende Protonen-Paare wurde z. B. kristallines 1,2-Dichlorethan untersucht [Gut50]. Dabei stellte sich heraus, daß die Wechselwirkung zwischen den Protonen der gleichen Methylen-Gruppe dominant ist. Intramolekulare Wechselwirkungen mit anderen Spins liefern nur einen schwachen Beitrag und intermolekulare Wechselwirkungen im Kristall sind noch einmal geringer. Also sind die beiden CH_2Cl -Gruppen näherungsweise wie zwei identische, isolierte Systeme zu behandeln. Etwa 60 K unterhalb des Schmelzpunktes nimmt die Dublett-Breite auf die Hälfte ab. Dies wird so interpretiert, daß eine Rotation senkrecht zu \vec{r}_{HH} stattfindet. Wahrscheinlich handelt es sich dabei nicht um die Achse der C–C-Bindung, denn dann würden sich die Cl-Atome berühren (s. Abb. 3.3). Da außerdem die Energieschwelle für eine Rotation der beiden CH_2Cl -Gruppen gegeneinander in der gasförmigen Phase recht hoch ist, geht man davon aus, daß das Molekül als Ganzes an seinem Gitterplatz eine Rotation vollführt.

Schon die Einführung eines Rotations-Freiheitsgrades verringert also die sichtbare Aufspaltung um den Faktor 2.

Unter *In-vivo*-Verhältnissen wird jedoch keine Rotation um eine feststehende Achse senkrecht zu \vec{r}_{IS} stattfinden. Die Molekularbewegung führt zu einer Herabskalierung, die deutlich stärker sein kann als nur der Faktor 1/2. Man führt den Ordnungsparameter S ein, der für isotrope Bewegung in Flüssigkeiten den Wert 0 und für Festkörper den Wert 1 annimmt [Gen93]. Die residuale Linienaufspaltung beträgt dann analog zu (3.17)

$$\Delta\nu_{vivo} = \frac{3}{2}SD_0(3\cos^2\theta - 1), \quad (3.21)$$

bei der sich θ wieder auf die Orientierung von \vec{r}_{IS} bezieht (S selber ist das zeitliche Mittel einer Funktion, die vom Winkel zwischen \vec{r}_{IS} und der Vorzugsachse, um die eine Molekül-Rotation stattfindet, abhängt [Sli89]). Diese ist zwar nicht starr, weist aber im Mittel aufgrund der anisotropen Bewegung eine Vorzugsrichtung auf. Bisherige Arbeiten zeigten, daß eine Euler-Transformation zwischen Labor- und Molekül-System vernachlässigt werden kann und somit die Vorzugsrichtung von \vec{r}_{IS} mit der makroskopischen Anisotropie der Muskelfasern zusammenfällt [Kre94, Asl99]. Für θ kann daher der Winkel benutzt werden, den die Fasern mit \vec{B}_0 bilden.

Eine analoge Beziehung ist für zwei Protonen unterschiedlicher Resonanzfrequenz gültig, die sich an einer aromatischen Ringstruktur befinden. Der relativ steife Ring wird als geschlossene Einheit einem Reorientierungsprozeß unterliegen, der die Linienaufspaltung (3.19) für anisochrome Spins folgendermaßen modifiziert:

$$\Delta\nu_{vivo,aniso} = SD_0(3\cos^2\theta - 1) \quad (3.22)$$

3.6.2 Rotation einer CH₃-Gruppe

Die Protonen einer Methyl-Gruppe bilden ein gleichseitiges Dreieck, das um die R–C-Achse rotieren kann, und befinden sich somit in einem Potential mit dreizähliger Symmetrie. Bei tiefen Temperaturen spielen Tunneleffekte eine Rolle, während bei hohen T -Werten die Übergänge durch die schnelle Rotation geprägt sind. Die Größe des an das C-Atom gebundenen Restes beeinflusst die Rate der Tunnelprozesse und die Rotationsfrequenz. Ist die Tunnelfrequenz im gekühlten Kristall ausreichend groß, ist das Spektrum nicht von dem bei hoher Rotationsfrequenz zu unterscheiden. Dies ist z. B. bei Acetonitril der Fall [Hae03].

Der Hamilton-Operator für drei dipolar wechselwirkende Protonen (Gesamtspin 3/2) ist in [And50] angegeben und führt zu orientierungsabhängigen Energiekorrekturen, die sich aus zwei Termen zusammensetzen (Notation wurde an diese Arbeit angepaßt):

$$x = \frac{3h}{4} D_0 (1 - 3 \cos^2 \psi) \quad (3.23)$$

$$y = \frac{3h}{2} D_0 \sqrt{\frac{27}{4} \sin^4 \psi - 3 \sin^2 \psi + 1}. \quad (3.24)$$

Dabei ist ψ der Winkel zwischen \vec{B}_0 und der Normalen der Dreiecksebene, die durch die drei Protonen definiert wird. Die Wirkung des Hamilton-Operators auf die 4 ursprünglichen Zustände ist in Abb. 3.4 angegeben. Die Zustände mit $I = \pm 1/2$ spalten in drei Unterniveaus auf. Es sind insgesamt neun Übergänge erlaubt, die zu einer Zentralresonanz und drei orientierungsabhängigen Dubletts mit den Aufspaltungen $\pm 2y$, $\pm(3x + y)$ und $\pm(3x - y)$ zusammengefaßt werden können. Der Verlauf von x und y sowie die Variation der Dublett-Aufspaltungen ist in Abb. 3.5 dargestellt. Aus Abb. 3.5(b) wird deutlich, daß kein Kollaps des Multipletts auftritt und der magische Winkel keine ausgezeichnete Orientierung mehr ist. Von den drei Dubletts kollabiert nur das mit der Energiedifferenz $3x + y$ bei ca. 42° .

Die Übergangswahrscheinlichkeiten sind ebenfalls von den Funktionen (3.23) und (3.24) abhängig (s. Tab. 3.1). Abb. 3.6 zeigt die Multipletts einer stationären Methyl-Gruppe für

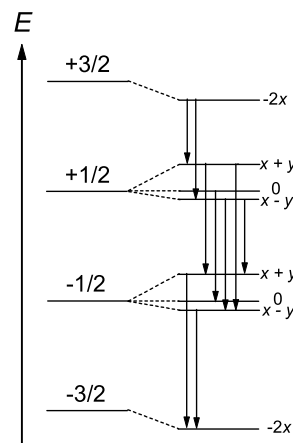


Abb. 3.4: Energieniveaus für ein System aus drei dipolar koppelnden Spin-1/2-Kernen. Die neun erlaubten Übergänge erzeugen eine Zentralresonanz und drei Dubletts.

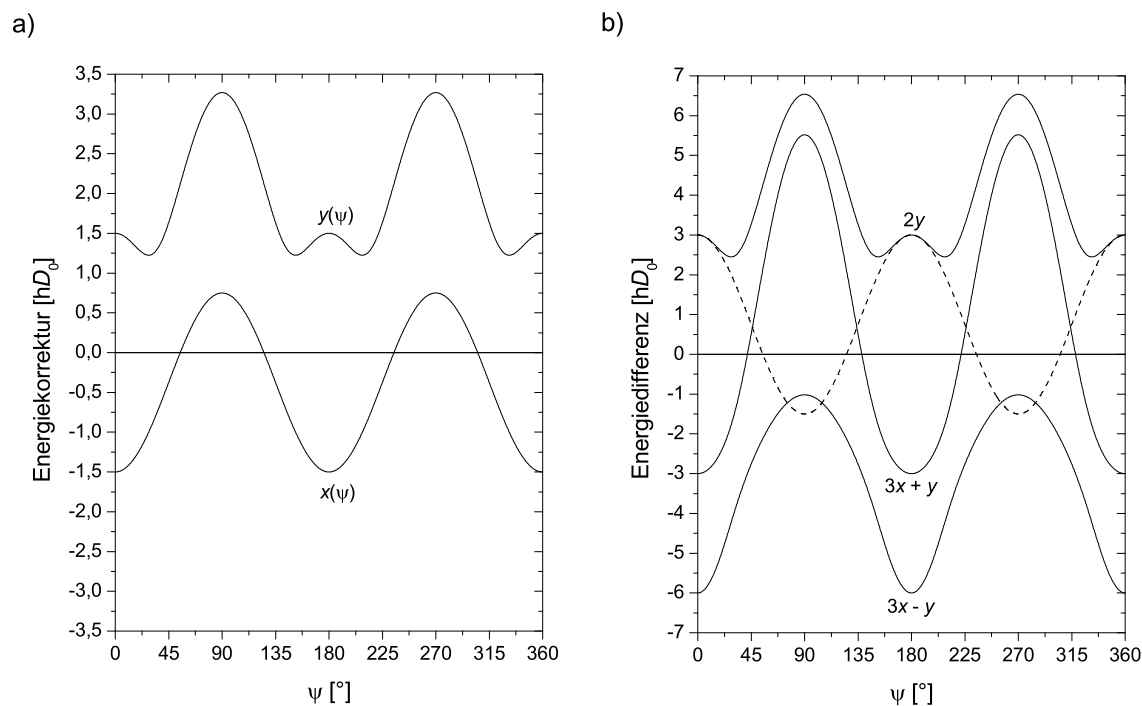


Abb. 3.5: Orientierungsabhängigkeit der Energiekorrekturen x und y (a) sowie der Energieunterschiede der 3 Dubletts einer stationären CH₃-Gruppe relativ zur Zentralresonanz bei $\hbar\omega$ (b). Zum Vergleich ist noch die Winkelabhängigkeit einer stationären CH₂-Gruppe angegeben (gestrichelt).

verschiedene Orientierungen im Feld. Der allgemeine Fall mit sieben Resonanzen vereinfacht sich für $\psi = 0$ zu einem einfachen Triplet, weil die Übergangswahrscheinlichkeiten für zwei der Dubletts auf 0 absinken. Der Mittelwert über alle Orientierungen ψ ist für die einzelnen Dubletts verschieden, so daß das ¹H-NMR-Spektrum einer Pulver-Probe ein nicht mehr mit den trivialen Mustern der J -Kopplung vergleichbares Schema aufweist. Die freie Rotation der Methyl-Gruppe oder das Auftreten von Tunnelprozessen mit hoher Frequenz können das Spektrum aber erheblich vereinfachen. Die Energiekorrekturen für die Rotation der Protonen um eine beliebig orientierte Achse mit dreizähliger Symmetrie

Tab. 3.1: Übergangswahrscheinlichkeiten der sieben ¹H-NMR-Resonanzen einer stationären CH₃-Gruppe nach [And50]. Die gemittelten Werte ganz rechts spielen für Kristallpulver-Spektren eine Rolle.

Energieverschiebung des Übergangs relativ zur ungestörten Resonanz	Übergangs- wahrscheinlichkeit	Wahrscheinlichkeit gemittelt über alle Orientierungen ψ
0	$\frac{1}{8} \left(1 + \frac{3x^2}{y^2} \right)$	0,19
$\pm 2y$	$\frac{3}{16} \left(1 - \frac{x^2}{y^2} \right)$	0,31
$\pm(3x + y)$	$\frac{1}{8} \left(1 + \frac{x}{y} \right)$	0,22
$\pm(3x - y)$	$\frac{1}{8} \left(1 - \frac{x}{y} \right)$	0,28

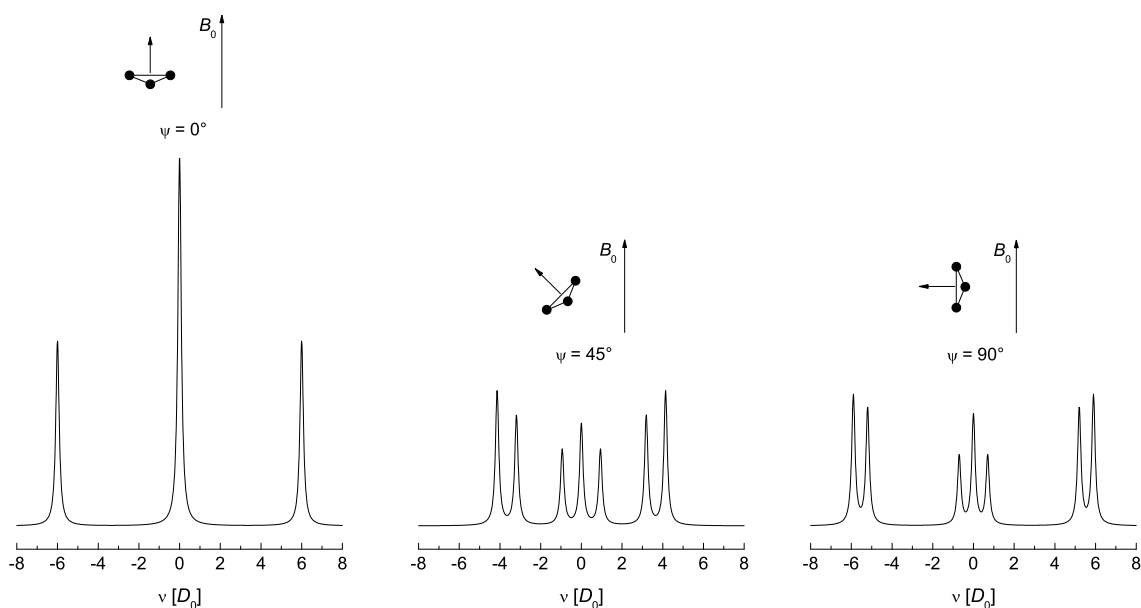


Abb. 3.6: Simulation von ^1H -NMR-Spektren einer stationären Methyl-Gruppe für verschiedene Orientierungen zum Grundfeld. Bei $\psi = 0$ verschwinden die Übergangswahrscheinlichkeiten von zwei der drei möglichen Dubletts, und es tritt nur ein Triplet mit den Intensitätsverhältnissen 1 : 2 : 1 auf.

sind [And50]

$$x' = \frac{3h}{8}D_0(1 - 3\cos^2\eta)(1 - 3\cos^2\epsilon) \quad (3.25)$$

$$y' = \frac{3h}{4}D_0(1 - 3\cos^2\eta)\sqrt{\frac{27}{4}\sin^4\epsilon - 3\sin^3\epsilon + 1}, \quad (3.26)$$

wobei ϵ und η die Winkel zwischen der Rotationsachse und der Dreiecksnormalen bzw. zwischen dem Grundfeld und der Drehachse sind. Methylgruppen können sich meist frei um die R–C-Achse drehen, welche parallel zur Normalen des Dreiecks steht. Setzt man also $\epsilon = 0$ in (3.25) und (3.26) ein, so erhält man

$$x' = -\frac{3h}{4}D_0(1 - 3\cos^2\eta) = -y'. \quad (3.27)$$

Die Darstellung dieser Korrekturterme in Abb. 3.7 zeigt, daß für die Rotation der Gruppe um diese Achse der magische Winkel wieder von Bedeutung ist und es zu einem Kollaps des Multipletts kommen kann, weil x' und y' identische Nullstellen haben.

Mit den Wahrscheinlichkeiten aus Tab. 3.1 ergibt sich, daß außer der Zentralresonanz nur noch das Dublett mit $\pm(3x' - y') = \pm 4x'$ sichtbar ist (Abb. 3.7b)). Man erhält ein Triplet mit dem Verhältnis 1 : 2 : 1 und der Aufspaltung $|4x'/h|$, also

$$\Delta\nu_{\text{rot}\Delta} = 3D_0(1 - 3\cos^2\eta) \quad (3.28)$$

Ist das Dreieck also so orientiert, daß es maximal vom Feld durchsetzt wird ($\eta = 0$ bzw. $\psi = 0$) kann man wegen $x' = -y'$ bzw. $x = -y$ nicht unterscheiden, ob es sich um ein stationäres System oder den dreizähligen Protonen-Rotor handelt – in beiden Fällen beobachtet man ein Triplet mit der Aufspaltung $6D_0$.

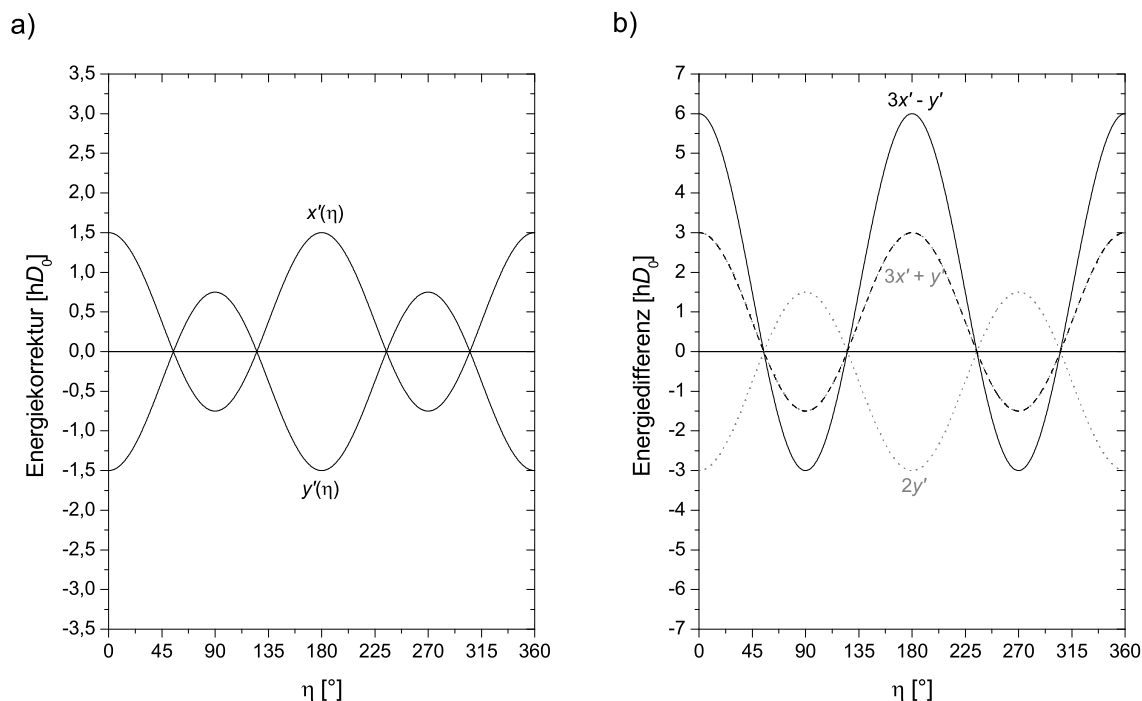


Abb. 3.7: Orientierungsabhängigkeit der Energiekorrekturen x' und y' (a) sowie der Energieunterschiede der drei Dubletts einer rotierenden CH₃-Gruppe relativ zur Zentralresonanz bei $\hbar\omega$ (b). Außer dieser Resonanz hat nur das Dublett bei $\pm(3x' - y')$ eine nicht verschwindende Übergangswahrscheinlichkeit; die anderen Verläufe sind daher nur in Grau angegeben. Zum Vergleich ist noch die Winkelabhängigkeit einer stationären CH₂-Gruppe angegeben (gestrichelt); sie fällt mit der Kurve $3x' + y'$ zusammen.

Auch für den Rotor stimmt die Orientierungsabhängigkeit qualitativ mit der in (3.17) überein, bezieht sich aber diesmal auf die Richtung der Drehachse R–C und ist um den Faktor 2 größer. Kommt nun noch die Skalierung durch eine zeitliche Variation dieser Achse hinzu, so kann auch diese Linienaufspaltung um mehrere Größenordnungen herunterskaliert werden. (3.28) wird daher zu

$$\Delta\nu_{vivo\Delta} = 3SD_0(1 - 3\cos^2 \eta). \quad (3.29)$$

Das Triplett einer rotierenden Methyl-Gruppe, das die gleiche Aufspaltung wie das Dublett einer rotierenden Methylen-Gruppe aufweist, impliziert aber für die R–C-Achse eine größere räumliche Beweglichkeit mit einem nur halb so großen Ordnungsparameter S . Die typische Rotation der Methyl-Gruppe führt demnach im Gegensatz zu dem bei der Methylen-Gruppe auftretenden Freiheitsgrad zu einem Verschwinden von Resonanzen. In den Arbeiten zur Rotation von CH₃-Gruppen wurde deutlich, daß sterische Aspekte innerhalb des Moleküls eine wichtige Rolle spielen. 1,1,1-Trichlorethan (Abb. 3.8a)) zeigt z.B. erst 100 K unterhalb des Schmelzpunktes Anzeichen für eine Rotation [Gut50]. Dies liegt daran, daß die großen Cl-Atome die Bewegung des Protonen-Rotors um die Molekül-Hauptachse behindern. Bei 90 K kann dieses System im Vergleich zu Acetonitril (Abb. 3.8b)) als stationäre CH₃-Gruppe angesehen werden [And50]. Auch Dimethyl-Quecksilber (H₃C–Hg–CH₃) zeigt bereits 150 K vor Erreichen des Phasenübergangs eine Abnahme der Linienbreite aufgrund der schnellen Rotation der Methyl-Gruppen. In der *In-vivo*-MR-Spektroskopie sind die Auswirkungen der Molekularbewegung so aus-

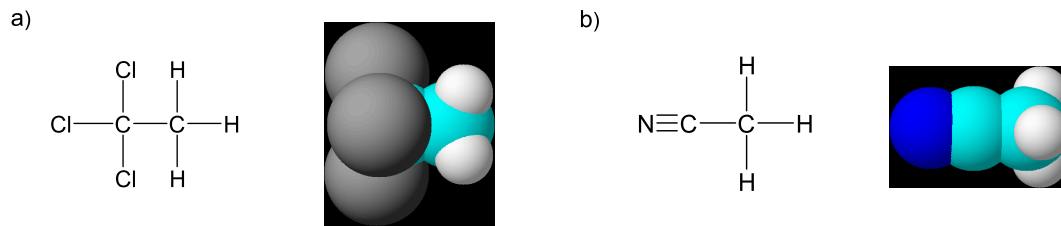


Abb. 3.8: Struktur von 1,1,1-Trichlorethan (a) und Acetonitril (b). In kristallinem Zustand findet wegen der großen Cl-Atome bei (a) keine Rotation der Methyl-Gruppe statt. Bei (b) dagegen bewegt sich diese frei um die Längsachse des Moleküls, die senkrecht auf der durch die Protonen definierten Dreiecks-Ebene steht.

geprägt, daß S auf keinen Fall zu vernachlässigen ist und man nur effektive Kopplungskonstanten beobachtet, die in keiner Weise mehr direkt mit dem Kernabstand korreliert sind. Daher wird in dieser Arbeit in allen weiteren Betrachtungen k durch Sk ersetzt.

3.7 Ordnungsparameter aus Spektren 2. Ordnung

Bei Spektren 2. Ordnung können neben der sichtbaren Aufspaltung des Dubletts auch die asymmetrischen Linienpositionen in Kombination mit dem Frequenzunterschied $\Delta\omega$ zur Bestimmung der effektiven Kopplungsstärke herangezogen werden. Dies soll anhand der dipolaren Kopplung im Folgenden ausführlich untersucht werden. Der Asymmetrie-Parameter (3.15),

$$A_{\text{P}}^D(\alpha) = -\hbar\Delta\omega \sin^2 \alpha + 2\Delta \sin \alpha \cos \alpha,$$

läßt sich leicht aus der Verschiebung der Dublett-Mittelpunkte von $\hbar\omega_i$ (Linienposition ohne Kopplung muß bekannt sein) bestimmen. Nun kann man folgendermaßen den Mischungswinkel berechnen: die Energieverschiebung $2\Delta = \frac{Sk}{2}$ läßt sich mit (3.5) in $2\Delta = \hbar\Delta\omega \tan 2\alpha$ umformen. Dann erhält der Asymmetrie-Parameter die Form

$$\begin{aligned} A_{\text{P}}(\alpha) &= -\hbar\Delta\omega \sin^2 \alpha + \hbar\Delta\omega \tan 2\alpha \sin \alpha \cos \alpha \\ &= \hbar\Delta\omega \left(\frac{1}{2} \tan 2\alpha \sin 2\alpha - \sin^2 \alpha \right) \end{aligned} \quad (3.30)$$

$$= Sk \left(\frac{\sin 2\alpha}{4} - \frac{\sin^2 \alpha}{2 \tan 2\alpha} \right). \quad (3.31)$$

Dies sind die analogen Gleichungen zu (2.18) und (2.19). $\Delta\omega$ in (3.30) ist zwar auch eine Funktion von α , kann andererseits aber direkt aus einem Spektrum abgelesen werden, in dem die beiden Spins nicht koppeln (z. B. Aufhebung der dipolaren Kopplung in Modell-Lösungen). Daher ist die Darstellung (3.30) praktischer, weil zur Anwendung von (3.31) die effektive Kopplungskonstante Sk bekannt sein muß. Will man die Kopplungsstärke aber alternativ aus der Asymmetrie bestimmen, um zu testen, ob sie konsistent mit dem Wert der Linienaufspaltung ist, so läßt sich Sk gerade nicht als Vorwissen benutzen, um mit A_{P}^D den Winkel α und daraus dann letztendlich die Kopplungsstärke Sk zu bestimmen. Beide Gleichungen wurden mit Hilfe von Maple[©] umgeformt und danach weiter vereinfacht. Für (3.30) gilt

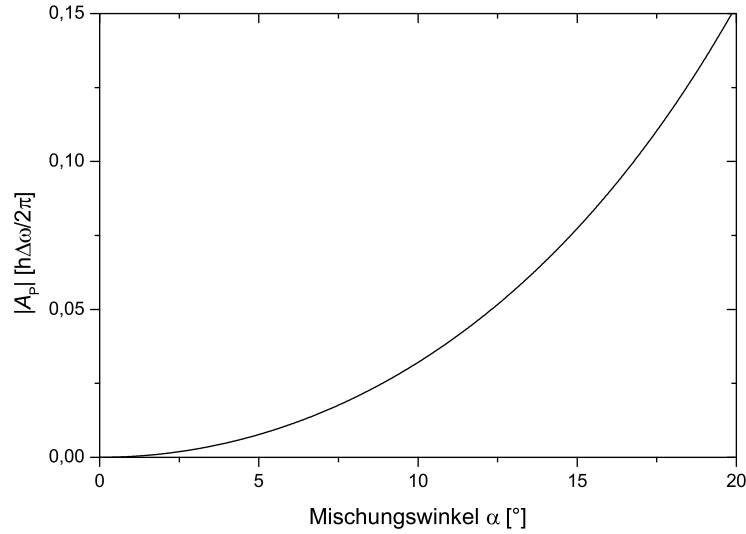


Abb. 3.9: Verlauf des Asymmetrie-Parameters $A_P(\alpha)$ für dipolare Kopplung nach Gleichung (3.30). Man sieht, daß A_P^D selbst bei relativ starken Mischungswinkeln von 20° nur ca. 15% des Frequenzunterschieds $\delta\omega$ beträgt.

$$\begin{aligned} A_P^D(\alpha) &= -\hbar\Delta\omega \frac{\cos^2 \alpha - 1}{\cos 2\alpha} = -\hbar\Delta\omega \frac{\frac{1}{2}(1 + \cos 2\alpha) - 1}{\cos 2\alpha} \\ &= -\frac{\hbar\Delta\omega}{2} \left(1 - \frac{1}{\cos 2\alpha} \right). \end{aligned}$$

Da die residualen Kopplungsstärken *in vivo* recht schwach sind, reicht es, kleine Winkel zu betrachten. Der Verlauf für $\alpha < 20^\circ$ ist in Abb. 3.9 dargestellt. Es wird deutlich, daß die Asymmetrie für kleine Mischungswinkel sehr schwach ist. Selbst für $\alpha = 20^\circ$ sind die Resonanzen nur um ca. 15% des Frequenzabstandes $\Delta\omega$ verschoben. Die Auflösung nach α ergibt:

$$\alpha_P = \frac{1}{2} \arccos \frac{\hbar\Delta\omega}{2A_P^D + \hbar\Delta\omega}. \quad (3.32)$$

Der Vollständigkeit halber soll noch die Vereinfachung für (3.31) angegeben werden:

$$A_P^D(\alpha) = -Sk \frac{\cos^2 \alpha - 1}{2 \sin 2\alpha} = Sk \frac{\sin^2 \alpha}{2 \sin 2\alpha}.$$

Die α -Abhängigkeit von A_P^D wird noch einmal vergleichend mit der skalaren Kopplung in Kap. 5 diskutiert.

Analog kann man die Asymmetrie der Linienintensitäten (3.16) ausnutzen. Hier ist es auch möglich, direkt aus

$$A_I(\alpha) = \frac{1 + \sin 2\alpha}{1 - \sin 2\alpha}$$

als Umkehrfunktion den Mischungswinkel

$$\alpha_I = \frac{1}{2} \arcsin \left(\frac{A_I - 1}{A_I + 1} \right) \quad (3.33)$$

zu berechnen. Hat man α mit einer der beiden Methoden ermittelt, so erhält man zusammen mit (3.5) die effektive Aufspaltung Sk/h in Hz und kann sie ins Verhältnis zum

theoretisch aus der Molekulargeometrie bestimmten Wert setzen, um den Ordnungsparameter zu erhalten.

Außerdem kann die Asymmetrie zum Nachweis residualer dipolarer Kopplungen herangezogen werden, denn die über A_{P}^D und α bestimmte Kopplungsstärke muß im Spektrum einer Aufspaltung von Sk/h entsprechen.

Kapitel 4

Analogien zur Hyperfeinstruktur des Wasserstoff-Atoms

Betrachtet man koppelnde magnetische Momente, so läßt sich das Problem zweier wechselwirkender Protonen direkt mit der Hyperfeinstruktur des Wasserstoff-Atoms vergleichen. Die magnetische Wechselwirkung von Proton und Elektron wurde 1931 von KOPFERMANN und SCHÜLER experimentell untersucht. Die theoretische Grundlage ist durch die quantenmechanische Kopplung von Drehimpulsen gegeben.

4.1 Wahl der Observablen, verallgemeinerte Clebsch-Gordan-Koeffizienten

Die Bestimmung neuer, simultaner Eigenzustände verläuft im Grunde sowohl für die skalare als auch für die dipolare Kopplung analog zum Verfahren, das bei der Kombination von Drehimpulsen bei der Spin-Bahn- oder Spin-Spin-Kopplung Anwendung findet. Allgemein geht man bei zwei Drehimpulsen \hat{L}_1 und \hat{L}_2 von den Produktzuständen aus, wenn man geeignete Eigenzustände für die neuen Operatoren $\hat{L} = \hat{L}_1 + \hat{L}_2$ und $\hat{L}_z = \hat{L}_{1z} + \hat{L}_{2z}$ sucht.

Dabei bilden Zustände mit gleichem m -Wert (die Quantenzahl zu \hat{L}_z) Linearkombinationen, die sich in der Quantenzahl L (zu \hat{L}^2) unterscheiden. Für die hier betrachteten Spin-Spin-Kopplungen sind das gerade die Zustände $|+-\rangle$ und $| -+\rangle$, die zu geeigneten ψ'_i kombiniert werden. Bei der verallgemeinerten Betrachtung der Kopplungen bilden die in m entarteten Zustände Linearkombinationen, die sich in der Quantenzahl des Flip-Flop-Operators (\mathcal{B} bzw. \mathcal{J}_2) unterscheiden. Die zugehörigen Entwicklungskoeffizienten C_{ij} in

$$\begin{pmatrix} \psi'_2 \\ \psi'_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos \alpha & \sin \alpha \\ -\sin \alpha & \cos \alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \psi_2 \\ \psi_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} C_{11} & C_{12} \\ C_{21} & C_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \psi_2 \\ \psi_3 \end{pmatrix}$$

sind dann nichts anderes als verallgemeinerte Clebsch-Gordan-Koeffizienten, die mit der relativen Stärke der Kopplung variieren:

$$\begin{aligned} C_{ij;J}(\alpha) &= C_{ij}(J) && \text{für skalare Kopplung und} \\ C_{ij;D}(\alpha) &= C_{ij}(Sk) && \text{für dipolare Kopplung.} \end{aligned}$$

Für den Extremfall starker Kopplung ergeben sich gerade die aus der Hyperfeinstruktur bekannten Werte $C_{11} = C_{22} = C_{12} = \frac{1}{\sqrt{2}}$ und $C_{21} = -\frac{1}{\sqrt{2}}$.

Tab. 4.1: Analogien in der Betrachtung von gekoppelten Spinsystemen

	vollständiger Satz von Observablen	Clebsch-Gordan- Koeffizienten
anfangs	$\hat{S}^2, \hat{I}^2, \hat{S}_z, \hat{I}_z$	
Hyperfeinstruktur	$\hat{S}^2, \hat{I}^2, \hat{F}^2, \hat{F}_z$	$\frac{1}{\sqrt{2}}, -\frac{1}{\sqrt{2}}$
skalierbare skalare Kopplung	$\hat{S}^2, \hat{I}^2, \mathcal{J}_2(\alpha), \hat{F}_z$	$C_{ij;J}(\alpha)$
skalierbare dipolare Kopplung	$\hat{S}^2, \hat{I}^2, \mathcal{B}(\alpha), \hat{F}_z$	$C_{ij;D}(\alpha)$

Tabelle (4.1) zeigt zusammenfassend, daß sich die Betrachtung der durch α skalierbaren Kopplungen von der Theorie der Spin-Spin-Kopplung der Hyperfeinstruktur nur durch einen Operator im vollständigen Satz der Observablen unterscheidet.

\mathcal{J}_2 und \mathcal{B} sind deshalb die geeigneten Observablen, weil sich die Stärke der Kopplung nicht im Gesamspinoperator $\hat{F}^2 = (\hat{S} + \hat{I})^2$, wohl aber über die Effektivität der Flip-Flop-Vorgänge ausdrückt.

Ein Verzicht auf die Observable \hat{F}^2 ist aus folgendem Grund plausibel: Bei der Betrachtung der Linienintensitäten (s. u.) zeigte sich, daß das Interkombinationsverbot nur im Extremfall starker Kopplung gilt. Demnach ist F mit seinen Eigenwerten 0 (Singulett) und 1 (Triplet) bei der allgemeinen Betrachtung keine geeignete Quantenzahl mehr, weil die Einteilung in Singulett- und Triplet-Zustände zur Beschreibung des Systems obsolet geworden ist. Wie sich zeigen wird, ist m_F trotz des aufgebrochenen Gesamspins eine geeignete Quantenzahl und taucht in der Breit-Rabi-Formel auf (s.u.).

4.2 Paschen-Back-Effekt, Breit-Rabi-Formel

Das Aufbrechen einer Kopplung von Drehimpulsen geladener Teilchen durch ein hinreichend starkes Magnetfeld ist in der Atomphysik auch als Paschen-Back-Effekt bekannt (PASCHEN und BACK 1912/13). Die dafür notwendige Feldstärke richtet sich nach der Stärke der Wechselwirkung zwischen den Teilchen, also nach der Größe der Drehimpulse (klassisch oder intrinsisch). Demnach ist die LS -Kopplung am schwierigsten aufzuheben. Etwas einfacher ist es bei der IJ -Kopplung der Hyperfeinstruktur, bei der die magnetischen Momente von Elektron und Proton von Bedeutung sind. Da das Kernmagneton um den Faktor 1836 kleiner ist als das Bohrsche Magneton, bricht die Spin-Spin-Kopplung zwischen zwei Protonen als erstes auf. Wegen des hohen gyromagnetischen Verhältnisses sind gekoppelte Protonen aber das stabilste unter den Kern-Systemen.

Der Übergangsbereich vom Zeeman-Effekt (normal und anomal) zum Paschen-Back-Effekt der Hyperfeinstruktur wird durch die Breit-Rabi-Formel beschrieben [Bre31]. Sie gibt allerdings nur die einfachste Lösung für die S -Orbitale, also $F = I + \frac{1}{2}$ an:

$$E_B^{\text{HFS}} \left(F = I \pm \frac{1}{2}, m_F \right) = -\frac{A}{4} + m_F g_K \mu_K B \pm \frac{\Delta E_0}{2} \sqrt{1 + \frac{4m_F}{2I+1} x + x^2}. \quad (4.1)$$

Dabei wird die Variable x aufgrund des kleinen Kernmagnetons zu

$$x = \frac{g_J \mu_B - g_K \mu_K}{\Delta E_0} B \approx \frac{2\mu_B}{\Delta E_0} B$$

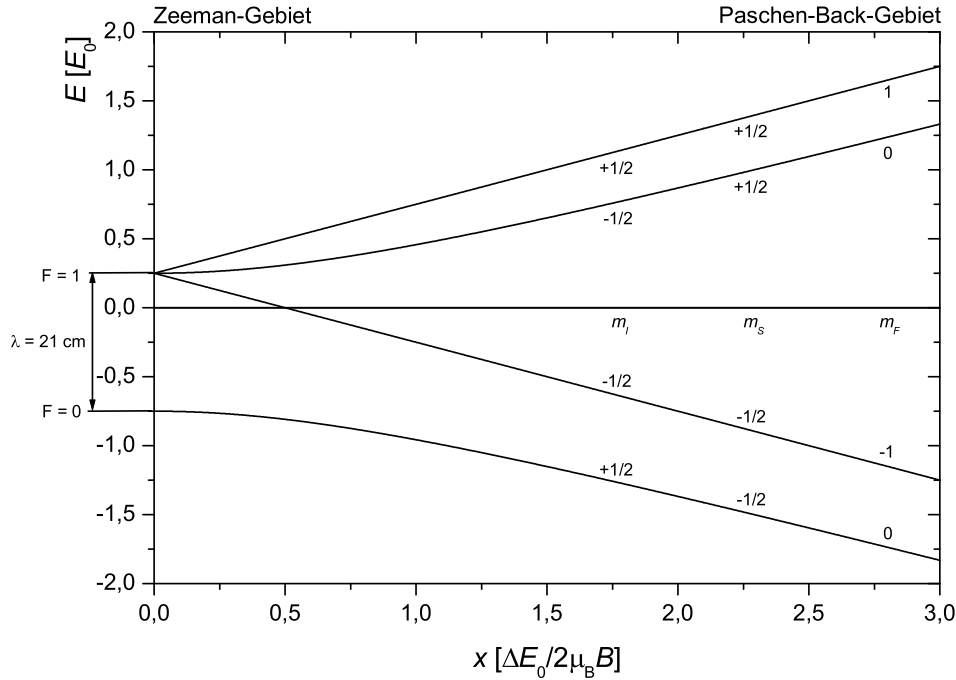


Abb. 4.1: Breit-Rabi-Diagramm für die Hyperfeinstruktur des Wasserstoff-Atoms. Die drei Spinquantenzahlen jedes Niveaus sind angegeben.

mit der Annahme $g_J = 2$ vereinfacht und ΔE_0 ist die Energieaufspaltung zwischen Triplett und Singulett des Gesamtspins F (sichtbar bei $x = 0$)

$$\Delta E_0 = A \left(I + \frac{1}{2} \right).$$

A ist die Hyperfeinaufspaltung, die bei ^1H $1,419 \text{ GHz}/h$ beträgt. Die beiden Niveaus mit den extremalen Quantenzahlen $m_F = \pm F$, also für die Hyperfeinstruktur des Wasserstoffs $m_F = \pm 1$, zeigen dann eine lineare Abhängigkeit vom Grundfeld ($g_k \mu_k B$ kann vernachlässigt werden und das Argument unter der Wurzel ist eine binomische Formel). Die restlichen Niveaus zeigen einen Verlauf, der anfangs vom Wurzel-Term dominiert wird und für starke Felder annähernd parallel und äquidistant (nur noch einfache Zeeman-Spektren) zu den beiden anderen Niveaus ist.

Mit der bisher benutzten Nomenklatur für die Energieniveaus vereinfacht sich (4.1) beim Wasserstoff folgendermaßen (man beachte das unterschiedliche Vorzeichen von Protonen- und Elektronen-Spin!):

$$\begin{aligned} E_1/A &= -\frac{1}{4} + g_k \mu_k B + \frac{1}{2} \sqrt{1 + 2x + x^2} \approx \frac{1}{4} + \frac{x}{2} \\ E_2/A &= -\frac{1}{4} + \frac{1}{2} \sqrt{1 + x^2} \\ E_3/A &= -\frac{1}{4} - \frac{1}{2} \sqrt{1 + x^2} \\ E_4/A &= -\frac{1}{4} - g_k \mu_k B - \frac{1}{2} \sqrt{1 - 2x + x^2} \approx \frac{1}{4} - \frac{x}{2}. \end{aligned}$$

Der Hauptunterschied zur skalaren Kopplung der NMR-Spektroskopie besteht darin, daß hier ein magnetisches Moment verschwindend klein gegenüber dem anderen ist, weil verschiedene Teilchen koppeln. Dies ermöglicht eine Vereinfachung, die bei der Kopplung identischer Teilchen nicht zulässig ist.

Wegen der isotropen Bewegung des s -Elektrons um den Kern kann bei der Hyperfeinstruktur eigentlich keine dipolare Kopplung die Ursache sein. Daß im Grundzustand aber trotzdem eine Aufspaltung zu sehen ist, hängt damit zusammen, daß für s -Orbitale der Kern nicht als punktförmiger magnetischer Dipol angesehen werden darf (die s -Elektronen haben im Kern eine endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit). In diesem Fall der Fermi-Kontakt-Wechselwirkung liegt ein nicht verschwindendes mittleres Feld des Kerns vor, das der Spin des Elektrons erfährt.

Für alle Zustände $l > 0$ gilt eine Näherung, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Die Hyperfeinstruktur wird dann wegen der Anisotropie der Orbitale richtungsabhängig.

4.2.1 Breit-Rabi-Diagramm der skalaren Kopplung

Um ein Breit-Rabi-Diagramm für die skalare Kopplung zwischen zwei Protonen zu erhalten, muß man die Energieniveaus (2.11) - (2.14) betrachten. Im Prinzip wird ein Ausdruck $E_i = E_i(B)$ gesucht. Die Resonanzfrequenzen hängen linear von B ab, so daß sowohl $\Delta\omega \propto B$ als auch $\omega_1 + \omega_2 \propto B$ geeignete Größen sind. An dieser Stelle macht sich bemerkbar, daß zwei identische magnetische Momente miteinander koppeln. Betrachtet man

$$E_1 = \Delta - \frac{\hbar(\omega_1 + \omega_2)}{2} \approx \Delta - \hbar\gamma B = \Delta - c_1 B \quad \text{und} \quad (4.2)$$

$$E_4 = \Delta + \frac{\hbar(\omega_1 + \omega_2)}{2} \approx \Delta + \hbar\gamma B = \Delta + c_1 B, \quad (4.3)$$

so sieht man, daß in die Steigung $c_1 = \hbar\gamma$ dieser Geradengleichung so etwas wie eine Summe aus magnetischen Momenten eingeht. Dagegen tritt bei den beiden anderen Zuständen eine Differenz auf, denn nach Substitution des Winkels $\alpha = \frac{1}{2} \arctan\left(\frac{-J_{12}}{\hbar\Delta\omega}\right)$ in

$$E_2 = -\frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos 2\alpha - \Delta + 2\Delta \sin 2\alpha$$

$$E_3 = \frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos 2\alpha - \Delta - 2\Delta \sin 2\alpha,$$

erhält man zwei Funktionen von $\Delta\omega$:

$$E_2 = -\frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos \left[\arctan \left(\frac{-J_{12}}{\hbar\Delta\omega} \right) \right] - \Delta + 2\Delta \sin \left[\arctan \left(\frac{-J_{12}}{\hbar\Delta\omega} \right) \right] \quad (4.4)$$

$$E_3 = \frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos \left[\arctan \left(\frac{-J_{12}}{\hbar\Delta\omega} \right) \right] - \Delta - 2\Delta \sin \left[\arctan \left(\frac{-J_{12}}{\hbar\Delta\omega} \right) \right]. \quad (4.5)$$

Für große Felder, also $\Delta\omega \rightarrow \infty$, geht das Argument im arctan gegen Null. Dann vereinfachen sich auch diese Ausdrücke zu Geradengleichungen:

$$E_2(B \rightarrow \infty) = -\Delta - \frac{\hbar\Delta\omega}{2} = -\Delta - \frac{\hbar\Delta\gamma}{2} B = -\Delta - c_2 B$$

$$E_3(B \rightarrow \infty) = -\Delta + \frac{\hbar\Delta\omega}{2} = -\Delta + \frac{\hbar\Delta\gamma}{2} B = -\Delta + c_2 B$$

(mit $\Delta\gamma$ als scheinbarem Unterschied im gyromagnetischen Verhältnis, verursacht durch die chemische Verschiebung). Nun ist aber die Steigung $c_2 = \frac{\hbar\Delta\gamma}{2} = \frac{\hbar\gamma\sigma}{2}$ wegen der kleinen chemischen Verschiebung σ um ca. 6 Größenordnungen kleiner als c_1 ! Das bedeutet, daß die beiden Niveaus mit paralleler Orientierung der Spins ($m_F = \pm 1$) wesentlich stärker vom Grundfeld abhängen als die beiden gemischten Zustände ($m_F = 0$).

In der Hyperfeinstruktur des Wasserstoffatoms tritt dieser Unterschied nicht auf, weil das magnetische Moment des Kerns vernachlässigt werden kann und somit sowohl in der Summe als auch in der Differenz die Resonanzfrequenz des Elektrons dominiert: $\omega_e + \omega_p \approx \omega_e \approx \omega_e - \omega_p$.

Unter Ausnutzung der Quantenzahlen läßt sich eine verallgemeinerte Form der Breit-Rabi-Gleichung formulieren, die alle vier Energieniveaus für die skalare Kopplung zweier identischer Teilchen mit $S = I = \frac{1}{2}$ wiedergibt. Die Variable, die die Abhängigkeit vom B -Feld enthält, ist

$$x = \frac{\hbar\Delta\omega}{J_{12}} = \frac{\hbar\sigma\gamma B}{J_{12}}.$$

Für die beiden Geraden, in denen B nach der Vereinfachung $\omega_1 + \omega_2 \approx 2\gamma B$ direkt auftaucht, muß dann entsprechend substituiert werden. Man erhält insgesamt:

$$E_{m_F, m_I}^J(x) = \frac{J_{12}}{4}(-1)^{1+m_F} - \frac{m_F J_{12}}{\sigma} x + (1 - |m_F|)(-1)^{-\frac{1}{2}+m_I} \left[-\frac{x J_{12}}{2} \cos(\arctan -x^{-1}) + \frac{J_{12}}{2} \sin(\arctan -x^{-1}) \right]. \quad (4.6)$$

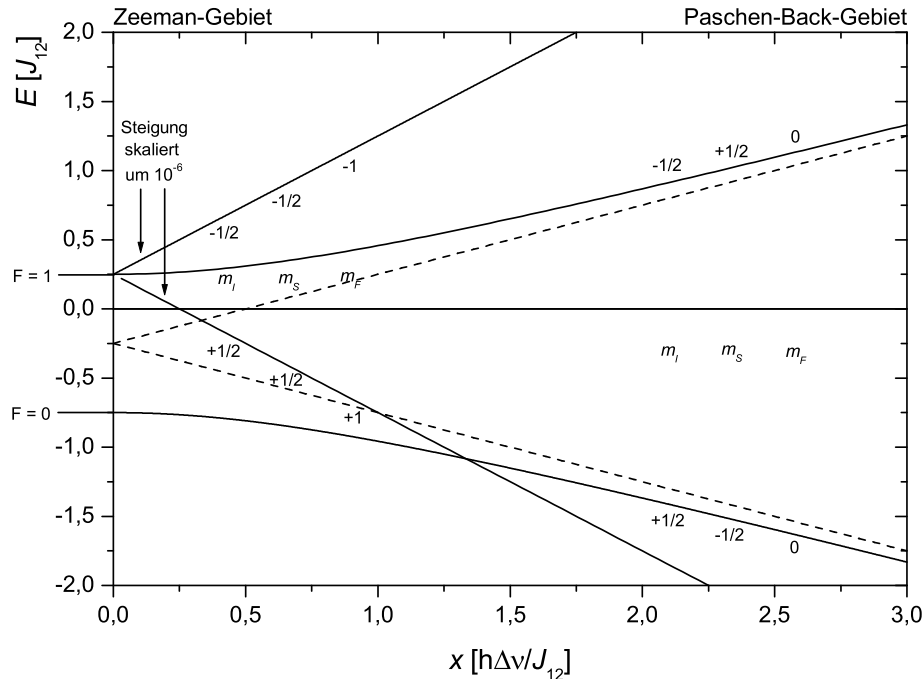


Abb. 4.2: Breit-Rabi-Diagramm für skalare Spin-Spin-Kopplung. Die vier Niveaus sind durch die z -Komponenten der einzelnen Spins und der des Gesamtspins gekennzeichnet. Das asymptotische Verhalten der gemischten Zustände ist gestrichelt dargestellt.

Mit den Beziehungen

$$\sin(\arctan x) = \frac{x}{\sqrt{1+x^2}} \quad \text{und} \quad \cos(\arctan x) = \frac{1}{\sqrt{1+x^2}}$$

läßt sich diese Gleichung noch vereinfachen zu

$$E_{m_F, m_I}^J(x) = \frac{J_{12}}{4} (-1)^{1+m_F} - \frac{m_F J_{12}}{\sigma} x - \frac{J_{12}}{2} \sqrt{x^2 + 1} (1 - |m_F|) (-1)^{-\frac{1}{2}+m_I}. \quad (4.7)$$

Die unterschiedliche Skalierung in der Steigung bewirkt, daß es zu einem Schnittpunkt von E_2 und E_1 kommt! Bei gezielter Veränderung des Grundfeldes könnte man zunächst beide Niveaus in Kontakt bringen und einen Populationsausgleich erzielen, der dann beim Trennen der Niveaus zu einer Polarisationsverstärkung führt. Da x aber mit dem Planckschen Wirkungsquantum skaliert ist, liegt dieser Schnittpunkt bei sehr kleinen Feldern, und dort unterscheiden sich die Besetzungszahlen der einzelnen Zustände noch nicht sehr stark.

Die Asymmetrie in den Linienpositionen ist im Breit-Rabi-Diagramm daran erkennbar, daß der Schnittpunkt der beiden Geraden (+0,25) gegen den extrapolierten Schnittpunkt der beiden anderen Kurven (-0,25) verschoben ist. Da die Steigung der beiden Geraden extrem stark ist und somit die Übergangsenergien schnell anwachsen, ist man schon bei kleinen x -Werten in einem Bereich, in dem diese Verschiebung kaum noch relevant ist: es ergeben sich sehr schnell Spektren 1. Ordnung.

4.2.2 Breit-Rabi-Diagramm der dipolaren Kopplung

Aufgrund der starken Analogien zwischen der skalaren und der (säkularen) dipolaren Kopplung kann man für eine geeignete Darstellung der Energieniveaus auf die gerade berechneten Ausdrücke zurückgreifen. Gln. (4.2) und (4.3) können direkt übernommen werden.

$$\begin{aligned} E_1 &= \Delta - \frac{\hbar\omega_1 + \omega_2}{2} \approx \Delta - \hbar\gamma B = \Delta - c_1 B \\ E_4 &= \Delta + \frac{\hbar\omega_1 + \omega_2}{2} \approx \Delta + \hbar\gamma B = \Delta + c_1 B. \end{aligned}$$

Einzigster Unterschied ist hier, daß jetzt $\Delta = Sk/4$ gilt. Der Vergleich der Energieniveaus beider Kopplungen zeigt, daß bei der dipolaren Kopplung in (4.4) und (4.5) die Kopplungsstärke vor dem letzten Produktterm nur in halber Wichtung eingeht. Außerdem treten nur positive Mischungswinkel auf, so daß nun $\alpha = \frac{1}{2} \arctan\left(\frac{Sk}{2\hbar\Delta\omega}\right)$ substituiert werden muß. Es ergibt sich somit sofort

$$E_2 = -\frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos\left[\arctan\left(\frac{Sk}{2\hbar\Delta\omega}\right)\right] - \Delta - \Delta \sin\left[\arctan\left(\frac{Sk}{2\hbar\Delta\omega}\right)\right] \quad (4.8)$$

$$E_3 = \frac{\hbar\Delta\omega}{2} \cos\left[\arctan\left(\frac{Sk}{2\hbar\Delta\omega}\right)\right] - \Delta + \Delta \sin\left[\arctan\left(\frac{Sk}{2\hbar\Delta\omega}\right)\right] \quad (4.9)$$

Die Asymptoten der beiden Kurven sind die gleichen wie bei der skalaren Kopplung. Allerdings nähern sich die Kurven anders an als bei der skalaren Kopplung. Aufgrund der

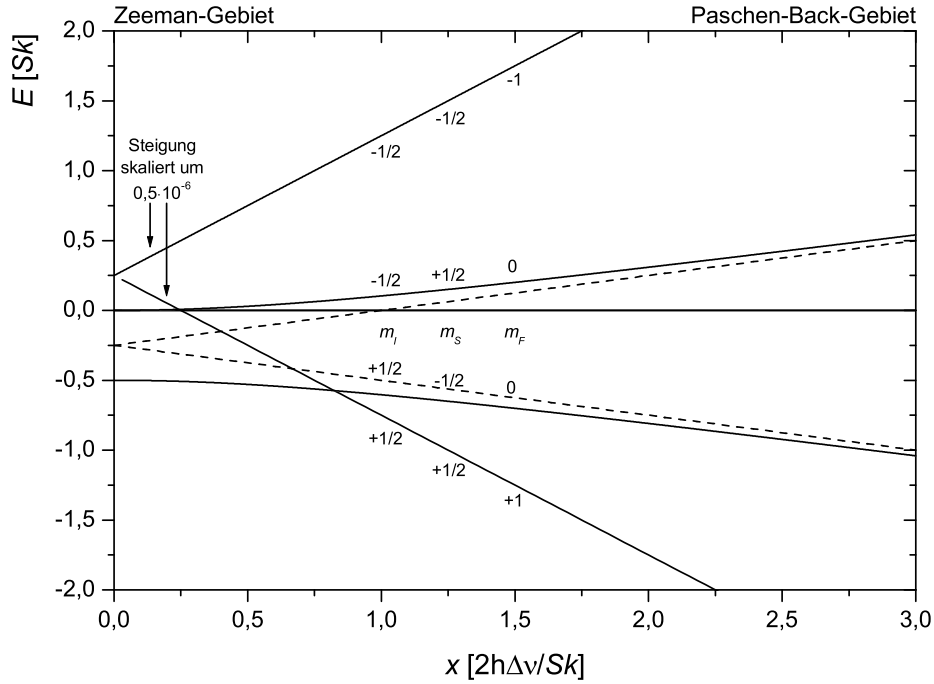


Abb. 4.3: Breit-Rabi-Diagramm für dipolare Spin-Spin-Kopplung. Die Darstellung ist an Abb. 4.2 angelehnt.

Tatsache, daß die Korrekturterme des Flip-Flop-Operators schwächer gewichtet werden, ist die Konvergenz mit den Asymptoten schneller. Der Unterschied im Vorzeichen der Wichtung führt außerdem dazu, daß bei $x = 0$ nicht alle Triplett-Zustände zusammenfallen.

Dadurch kommt es sogar zu zwei Niveau-Kreuzungen: mit sinkendem Feld schneiden sich zunächst E_1 und E_2 und dann E_1 und E_3 . Auch hier gilt, daß wegen $x \propto \hbar$ die Schnittpunkte bei sehr schwachen Feldern liegen. Dort ist die Kopplung aber nicht mehr unbedingt klein gegen die Effekte des Grundfeldes, so daß die Näherung mit dem säkularen Anteil des Hamilton-Operators nicht mehr gültig ist. Wie weit sie im Übergangsbereich zwischen Zeeman- und Paschen-Back-Effekt gültig ist, kann hier nicht gesagt werden.

Die stark unterschiedlichen Steigungen haben wiederum die Beobachtung von Spektren 1. Ordnung bei großen x -Werten zur Folge.

Analog zu (4.7) kann man eine Breit-Rabi-Gleichung für die dipolare Kopplung angeben:

$$E_{m_F, m_I}^D(x) = \frac{Sk}{4}(-1)^{1+m_F} - \frac{m_F Sk}{\sigma} x + (1 - |m_F|)(-1)^{-\frac{1}{2}+m_I} \left[-\frac{xSk}{4} \cos(\arctan x^{-1}) - \frac{Sk}{4} \sin(\arctan x^{-1}) \right]. \quad (4.10)$$

Auch hier lassen sich die Winkelfunktionen vereinfachend zusammenfassen. Man erhält:

$$E_{m_F, m_I}^D(x) = \frac{Sk}{4}(-1)^{1+m_F} - \frac{m_F Sk}{\sigma} x - \frac{Sk}{4}(1 - |m_F|)(-1)^{-\frac{1}{2}+m_I} \sqrt{x^2 + 1}. \quad (4.11)$$

Hier lautet die Variable

$$x = \frac{2\hbar\Delta\omega}{Sk} = \frac{2\hbar\sigma\gamma B}{Sk}.$$

4.2.3 Sonderfall isochroner Systeme

Die in den letzten beiden Abschnitten betrachteten Breit-Rabi-Diagramme gelten nur für anisochrone Systeme, also $\sigma \neq 0$, denn für den Breit-Rabi-Parameter x besteht folgende Problematik:

Für $x = 0$ zeigen die Diagramme eine Entartung der Zustände ψ_1 und ψ_4 . Diese liegt aber nur vor, wenn kein äußeres Feld anliegt und man nur noch die Nullfeld-Aufspaltung beobachtet (bei der HFS gerade die 21 cm-Linie), da die entsprechenden Komponenten von \mathcal{H}_Z verschwinden. Andererseits gilt $x = 0$ aber auch für isochrone Systeme, weil dort $\sigma = 0$ gilt. Daher muß dieser Fall gesondert betrachtet werden, wenn ein äußeres Feld anliegt. (Bleibt die Frage, ob $x = 0$ mit $\sigma \neq 0$ bei dipolarer Kopplung im Breit-Rabi-Diagramm richtig wiedergegeben wird, wenn nur der säkulare Anteil berücksichtigt ist.)

Bei einem A_2 -System ist der Mischungswinkel unabhängig von B_0 auf $\pm 45^\circ$ festgelegt, so daß die Energieniveaus nur noch durch die winkelunabhängigen Terme der Zeeman-Wechselwirkung beeinflusst werden können. Davon sind aber nur die beiden Produktzustände betroffen, die den nicht-transformierten Unterraum aufspannen. Da die beiden gemischten Zustände in diesem Sonderfall unter dem Zeeman-Operator mit Eigenwert 0 entartet sind, bleiben sie konstant auf dem Niveau, das die durch α bestimmte Nullfeld-Aufspaltung erzeugt. Die Breit-Rabi-Parameter beinhalten logischerweise nicht mehr die chemische Verschiebung,

$$x' = \frac{\hbar\gamma B}{J_{12}} \quad \text{bzw.} \quad x' = \frac{2\hbar\gamma B}{Sk}$$

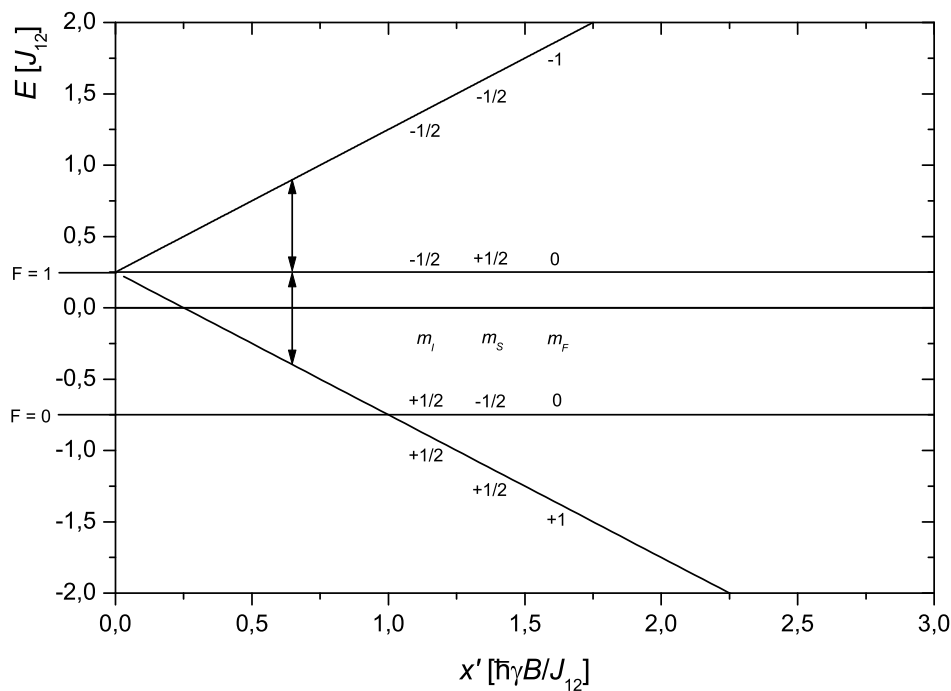


Abb. 4.4: Breit-Rabi-Diagramm für ein skalar gekoppeltes A_2 -System. Die erlaubten Übergänge innerhalb des Triplets sind entartet.

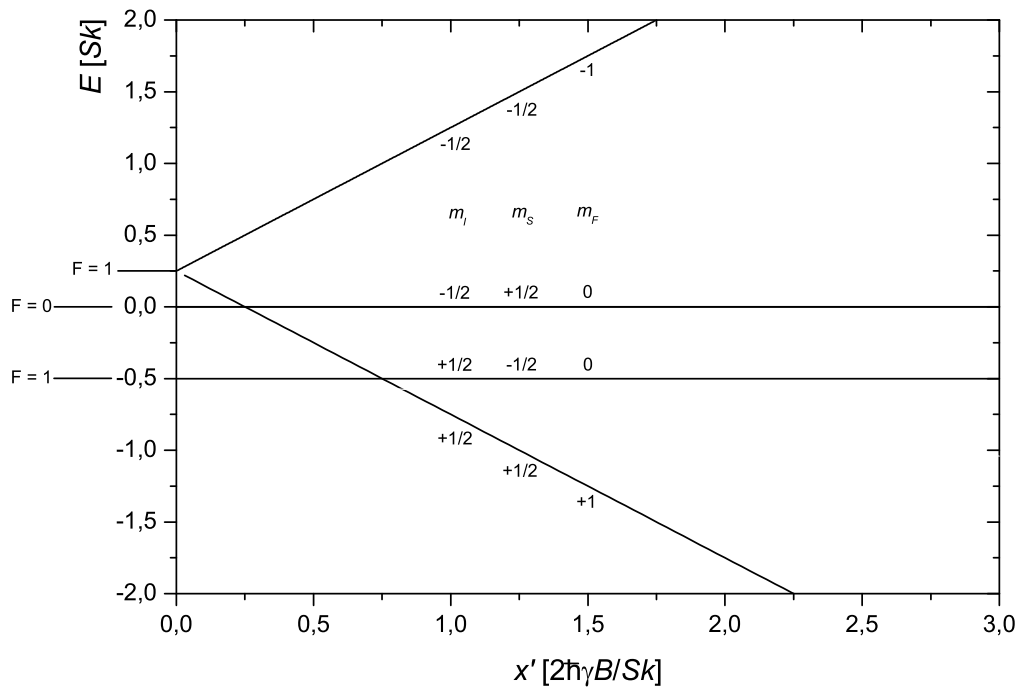


Abb. 4.5: Breit-Rabi-Diagramm für ein dipolar gekoppeltes A_2 -System

und die Breit-Rabi-Gleichungen zeigen nur noch für die Zustände mit $m_F \neq 0$ eine x -Abhängigkeit:

$$E_{m_F, m_I}^J(x') = J_{12} \left(\frac{1}{4} (-1)^{1+m_F} - x' m_F - \frac{1}{2} (1 - |m_F|) (-1)^{-\frac{1}{2}+m_I} \right) \quad (4.12)$$

$$E_{m_F, m_I}^D(x') = Sk \left(\frac{1}{4} (-1)^{1+m_F} - x' m_F - \frac{1}{4} (1 - |m_F|) (-1)^{-\frac{1}{2}+m_I} \right). \quad (4.13)$$

Die zugehörigen Diagramme sind in Abb. 4.4 und 4.5 gezeigt. Für den Fall, daß die neuen Breit-Rabi-Parameter gleich 0 sind, ergeben sich erwartungsgemäß die gleichen Situationen wie in Abb. 4.2 und 4.3, denn $x' = 0 \Leftrightarrow B = 0$ bedingt automatisch $x = 0$ (nicht aber umgekehrt!).

Abb. 4.4 verdeutlicht noch einmal, daß in isochronen skalar gekoppelten Systemen nur ein Signal zu beobachten ist: Wegen des symmetrischen Verlaufs der drei Zustände mit $F = 1$ sind die beiden erlaubten Übergänge immer entartet. Dagegen hat bei dipolaren A_i -Systemen das Feld-unabhängige Triplett-Niveau immer eine negative Energie, so daß die erlaubten Übergänge nicht mehr entartet sind.

Interessanterweise kann man bei isochroner Kopplung einen sinnvollen Gesamtspin (mit Interkombinationsverbot) definieren, obwohl nicht wirklich eine starke Kopplung vorliegt. Denn dann würde die Näherung wieder nicht gelten. Die Bedingung, daß in (3.5) $\frac{Sk}{2\hbar\Delta\omega} \rightarrow \infty$ gilt, ist demnach nur eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung für das Vorliegen einer starken Kopplung. A_i -Systeme sollten daher nur als pseudo-starke Systeme bezeichnet werden (bei der J -Kopplung spielt dies keine Rolle, weil dort sowieso keine isochrone Kopplung beobachtet werden kann).

4.2.4 Hanle-Effekt, Interkombinationsverbot

Die in den Breit-Rabi-Diagrammen sichtbare Niveau-Kreuzung bei abgeschaltetem Grundfeld wird auch als Hanle-Effekt bezeichnet (HANLE, 1924). Soweit es sich um keine verbotenen Übergänge handelt, ist dann eine kohärente Anregung der Zeeman-Aufspaltungen im Nullfeld möglich.

In Kap. 2.3 und 3.3 wurde das Interkombinationsverbot stark gekoppelter Systeme betrachtet. Wegen $B_0 \rightarrow 0 \Rightarrow \omega_i \rightarrow 0$ liegen im Nullfeld nur isochrone Systeme vor, und somit gilt selbst für heteronukleare Systeme das Verbot und es können höchstens die Triplet-Übergänge beobachtet werden. Nun sind jedoch alle Triplet-Zustände der skalaren Kopplung im Nullfeld entartet (s. Abb. 4.2), so daß das Interkombinationsverbot zum Verschwinden aller Resonanzlinien (in Form von Dipolübergängen) eines A_2 -Systems führt¹.

Bei der dipolaren Kopplung besteht die Frage, inwieweit das Breit-Rabi-Diagramm in Abb. 4.3 überhaupt für das Nullfeld gültig ist. Die Näherung mit dem säkularen Anteil des Hamilton-Operators wurde unter der Annahme gemacht, daß die Störung des Grundfeldes dominant ist. Hier würden Experimente mit SQUIDS Aufschluß über den Verlauf der Energieniveaus für $B \rightarrow 0$ liefern. Sollte das Diagramm weiterhin gültig sein, so wären die zwei Übergänge innerhalb des Triplets (Abb. 3.1b) entartet und könnten kohärent angeregt werden. Demnach wäre der Hanle-Effekt für isochrone Spins bei dipolarer Kopplung im Gegensatz zur J -Kopplung möglich.

Auch bei der Hyperfeinstruktur des Wasserstoffs ist dieser Effekt nicht direkt im Labor

¹Durch Stoßprozesse induzierte Übergänge dürften zu vernachlässigen sein.

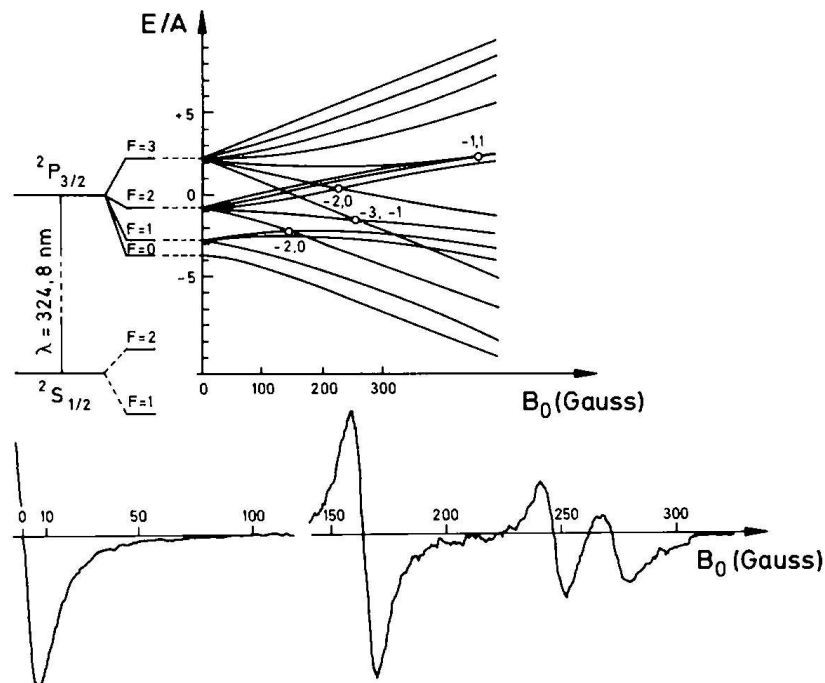


Abb. 4.6: Beobachtung von Niveau-Kreuzungen und Hanle-Effekt am Beispiel von Cu: Im unteren Diagramm ist die Ableitung der Emissions-Intensität nach dem Magnetfeld, dI/dB_0 , aufgetragen. Diese zeigt beim Kreuzen der Niveaus Nulldurchgänge (entnommen aus [Hak96]).

beobachtbar. Aufgrund der Auswahlregel $\Delta l \neq 0$ ist der mit der 21-cm-Linie verbundene Übergang zwischen $F = 0$ und $F = 1$ im Grundzustand (s -Orbital) nicht erlaubt. Der Triplett-Zustand ist metastabil und im interstellaren Gas nur aufgrund der hohen Teilchenzahl zu beobachten.

Kapitel 5

Vergleich von skalarer und dipolarer Kopplung

5.1 Die Hamilton-Operatoren

Die beiden Operatoren (2.2) und (3.2) unterscheiden sich nur durch einen konstanten Vorfaktor. Für die Energiekorrekturen ist bei beiden nur der Flip-Flop-Operator, also die Null-Quanten-Kohärenzen, ausschlaggebend. Die Zwei-Quanten-Kohärenzen machen sich erst bei der Relaxation bemerkbar.

Wie man am Vergleich von (2.4) und (3.5) sieht, erfolgt die Drehung des 2-dimensionalen Hilbert-Unterraumes bei direkter und indirekter Kopplung in entgegengesetzten Richtungen. Außerdem läuft sie bei der dipolaren Kopplung langsamer ab, da sich bei gleichem Verhältnis von Linienaufspaltung zum Unterschied der Resonanzfrequenzen ein kleinerer Mischungswinkel ergibt. Demnach ist eine stärkere Kopplungskonstante nötig, um die dominante Wechselwirkung mit dem Grundfeld zu stören; oder anders ausgedrückt: der säkulare Anteil der dipolaren Kopplung läßt sich leichter durch ein externes Feld aufbrechen.

Die unterschiedlichen Hamilton-Operatoren und die damit verbundenen Linearkombinationen der Eigenzustände haben auf die Spektren charakteristischen Einfluß. Wie die nächsten Abschnitte zeigen werden, kann man bei mittelstark und stark gekoppelten Systemen anhand der spektralen Muster einer einzigen Messung eindeutig dipolare von skalarer Kopplung unterscheiden und ist somit nicht auf die Untersuchung der Winkelabhängigkeit angewiesen, die nur bei der direkten Wechselwirkung auftritt.

5.2 Spektren stark gekoppelter Systeme

Das zunehmende Verschwinden jeweils einer Resonanz eines Dubletts bei anwachsender Kopplungsstärke (bzw. bei sinkendem äußeren Grundfeld) wird als Dach-Effekt bezeichnet. Er ist eine Folge des allmählich auftretenden Interkombinationsverbotes zwischen Singulett- und Triplett-Zuständen. Dabei ist das Vorzeichen des Mischungswinkels α von Bedeutung. Es führt bei skalarer und dipolarer Kopplung zu konträren Effekten.

Für die J -Kopplung geht der Singulett-Zustand aus ψ_2 des AX-Systems hervor. Dies ist der Zustand mit der zweitniedrigsten Energie. Das Termschema ist in Abb. 5.1 dargestellt und verdeutlicht, daß die Intensität der äußeren Resonanzen a und d abnimmt, wenn der

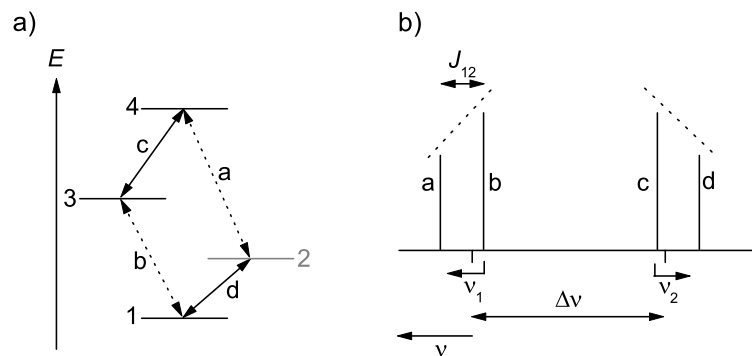


Abb. 5.1: Dach-Effekt der skalaren Kopplung eines AM-Systems. Der Singulett-Zustand (ψ_2) ist grau dargestellt und man beobachtet eine Intensitätsabnahme der äußeren Resonanzen. Die Verschiebung der Dubletts a,b und c,d (relativ zu den Frequenzen ν_1 und ν_2) in Richtung Niedrig- bzw. Hochfeldseite ist durch Pfeile angedeutet.

Übergang zum AM-System erfolgt. Dies ist der wohlbekannte Dach-Effekt der skalaren Kopplung. Er erleichtert in 1D-Spektren die Zuordnung der koppelnden Partner, weil die Resonanz mit der höheren Intensität zu der Seite weist, auf der das zugehörige Dublett mit komplementärer Asymmetrie zu suchen ist.

Bei der dipolaren Kopplung geht wegen des anderen Vorzeichens von α der Singulett-Zustand aus ψ_3 des AX-Systems hervor. Dies ist aber nun das zweit-höchste Energieniveau, so daß die inneren Resonanzen b und c vom Interkombinationsverbot betroffen sind (s. Abb. 5.2).

Der Dach-Effekt zusammen mit den asymmetrischen Verschiebungen verdeutlicht auch, warum die Spektren von A_2 -Systemen der beiden Kopplungsarten so unterschiedlich aussehen. Durch den größeren Vorfaktor des Flip-Flop-Operators im skalaren Hamilton-Operator kommt es zu einer doppelt so großen Asymmetrie wie bei der dipolaren Kopplung (s. Abb. 5.3). Das A_2 -System stellt den Extremfall der Entwicklung dar, die in Abb. 5.1 und 5.2 gezeigt ist. Während jedoch im ersten Fall die Dublett-Mittelpunkte um maximal $J_{12}/2$ verschoben werden und daher die verbleibenden Linien mit der Frequenz des ungekoppelten Systems zusammenfallen, kommt es bei der dipolaren Kopplung zu keiner Überlagerung von Resonanzen. Die beiden inneren Resonanzen laufen gegenseitig aneinander

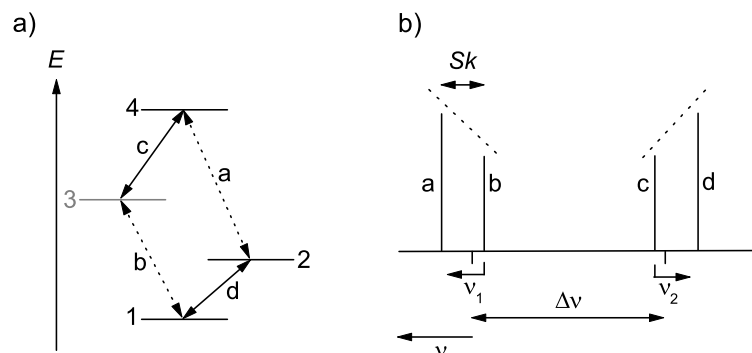


Abb. 5.2: Dach-Effekt der dipolaren Kopplung eines AM-Systems. Der Singulett-Zustand wird nun aus ψ_3 gebildet, weshalb das zunehmende Interkombinationsverbot zur Intensitätsabnahme der inneren Resonanzen führt. Die Verschiebung der Dubletts erfolgt in die gleiche Richtung wie in Abb. 5.1.

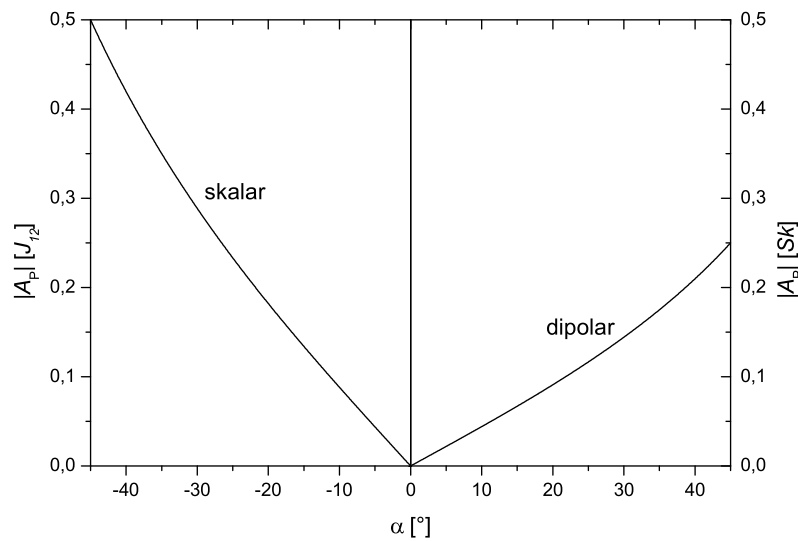


Abb. 5.3: Absoluter Verlauf des Asymmetrie-Parameters $A_P(\alpha)$ für skalare und dipolare Kopplung nach Gleichung (2.19) bzw. (3.31). Die stärkere Asymmetrie der J -Kopplung führt zu einem Kollaps der Multipletts (s. Text).

vorbei und liegen dann um $k/2$ auseinander. Die beiden noch sichtbaren Signale liegen aber $\frac{3Sk}{4}$ rechts und links von ν_0 und zeigen daher die verstärkte Aufspaltung von $1,5Sk$ (s. Abb. 5.4).

Gleichwertig zur Darstellung des Asymmetrie-Verlaufs in Abb. 5.3 kann auch der Breit-Rabi-Parameter herangezogen werden, um die entsprechenden Verschiebungen der Resonanzen anzugeben. x hat im Gegensatz zu α den Vorteil, daß er direkt proportional zum Quotienten aus Frequenzabstand und Linienaufspaltung ist. Mit der Definition aus Kap. 4 und den Größen $\Delta\omega$ und Sk , die direkt in [Hz] aus einem Spektrum abgelesen werden

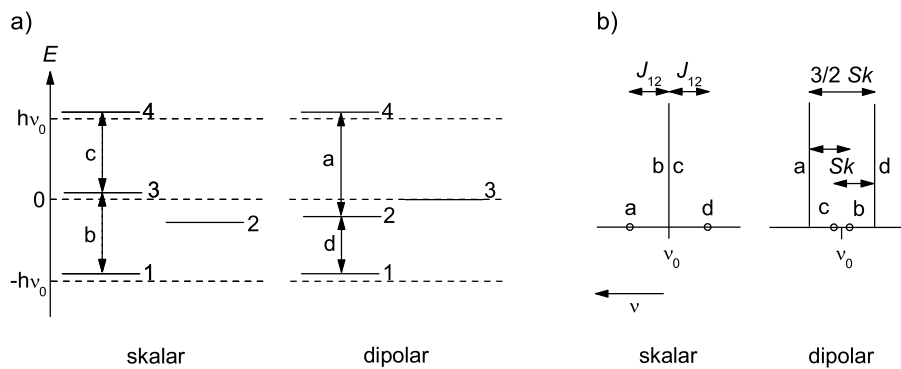


Abb. 5.4: A_2 -Systeme als Extremfälle des Dach-Effekts für skalare und dipolare Kopplung. Die verschiedenen Asymmetrie-Parameter bewirken nur bei der J -Kopplung den Kollaps der Multipletts.

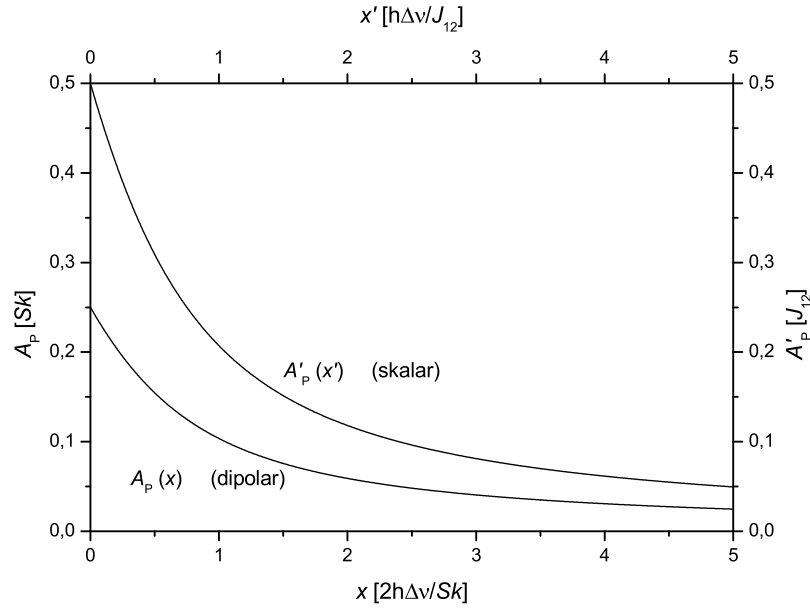


Abb. 5.5: Darstellung der Asymmetrie-Parameters nach Gl. 5.1 und 5.2. Selbst für einen Breit-Rabi-Parameter von $x = 2$ ist ein dipolares Dublett nur um weniger als 10% der Linienaufspaltung verschoben.

können, kann man x leicht bestimmen. Die Beziehungen für die Asymmetrien lauten dann:

$$\begin{aligned} A_P^J(x) &= -J_{12} \left(\frac{1}{2} \sin \arctan(-x^{-1}) + x \sin^2 \frac{\arctan(-x^{-1})}{2} \right) \\ &= J_{12} \left(\frac{1}{2} \sin \arctan(x^{-1}) - x \sin^2 \frac{\arctan(x^{-1})}{2} \right) \end{aligned} \quad (5.1)$$

$$A_P^D(x) = \frac{Sk}{2} \left(\frac{1}{2} \sin \arctan(x^{-1}) - x \sin^2 \frac{\arctan(x^{-1})}{2} \right) \quad (5.2)$$

Abb. 5.5 zeigt die beiden Funktionen. Es wird deutlich, daß besonders für dipolar gekoppelte Systeme die zu erwartenden Verschiebungen recht gering sind. Bei $x = 2$ hat das externe Feld die Kopplung bereits so weit aufgebrochen, daß die Dubletts nur noch um ca. 10% ihrer Linienaufspaltung verschoben sind.

5.2.1 Kumulierter Dach-Effekt dublierter Dubletts

Bei einer multiplen Linienaufspaltung kann es zu einem kumulativen Dach-Effekt kommen, wenn mehr als eine der Konnektivitäten kein AX-System mehr repräsentiert. Ein Beispiel hierfür sind die beiden skalaren Kopplungen der drei ^{31}P -Kerne im ATP-Molekül. Wenn es sich nur um leichte Abweichungen von einer schwachen Kopplung handelt, so kann man die Korrekturen für die Linienintensitäten in erster Näherung additiv behandeln:

Betrachtet werden soll ein AMX-System, bei dem zwei Kopplungen des mittleren Kerns mit den beiden äußeren vorliegen (J_{12} und J_{23} mit den dazugehörigen Mischungswinkeln α_{12} und α_{23}). Eine Wechselwirkung der beiden äußeren Kerne sei zu vernachlässigen. Die chemischen Verschiebungen sollen der Einfachheit halber so vorliegen, daß die beiden

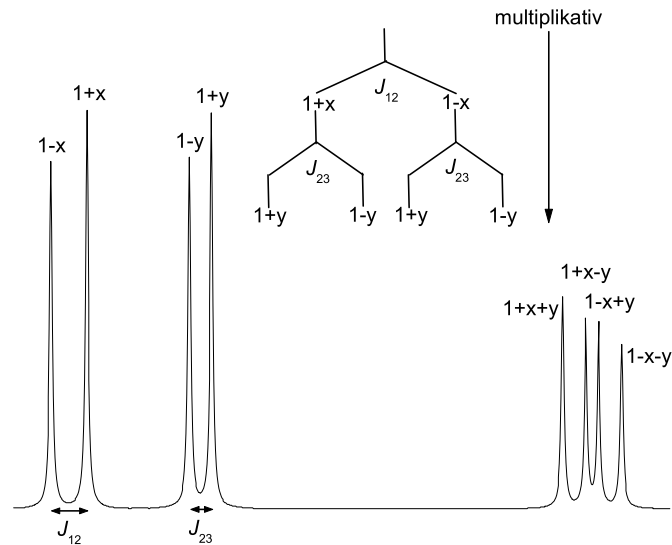


Abb. 5.6: Kumulierter Dach-Effekt eines AMX-Systems. Die Korrekturen der Intensitäten für die einzelnen Dubletts treten bei der multiplen Aufspaltung additiv auf.

einfachen Dubletts auf der Niederfeldseite des dublierten Dubletts liegen. Die Korrekturfaktoren für die Kopplungen seien $x = |\sin 2\alpha_{12}|$ und $y = |\sin 2\alpha_{23}|$. Die Intensitäten nach multipler Aufspaltung ergeben sich multiplikativ aus den schrittweise korrigierten Werten. Wenn die Effekte der Mischung klein sind ($\alpha_{ij} < 5^\circ$), können wegen $x, y \propto 10^{-2}$ Produktterme wie xy vernachlässigt werden. Man erhält dann für die vier Resonanzen des dublierten Dubletts (in der Reihenfolge abnehmender Frequenz):

$$\begin{aligned}
 1 & : (1+x)(1+y) \approx 1+x+y \\
 2 & : (1+x)(1-y) \approx 1+x-y \\
 3 & : (1-x)(1+y) \approx 1-x+y \\
 4 & : (1-x)(1-y) \approx 1-x-y
 \end{aligned}$$

Es ergibt sich dann das in Abb. 5.6 gezeigte Spektrum. Man sieht leicht, daß im Multipllett des Kerns 2 die beiden mittleren Linien zusammenfallen, wenn die beiden Kopplungskonstanten nicht signifikant verschieden sind. Dies führt dann zu einer relativen Intensität, die unabhängig von den Kopplungskonstanten den Wert 2 hat.

Es sei hier noch erwähnt, daß die multiple Aufspaltung für die Resonanz eines CH_3 -Rotors mit den zugehörigen Intensitäten der sieben Resonanzen nicht so einfach als kumulierter Effekt zu betrachten ist.

5.3 Spinecho-Experiment an stark gekoppelten Systemen

Die bei zunehmender Kopplung notwendige Linearkombination der ursprünglichen Produktzustände wird für die 4-dimensionale Basis durch die elementare Jacobi-Rotationsma-

trix

$$\mathcal{U} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \alpha & \sin \alpha & 0 \\ 0 & -\sin \alpha & \cos \alpha & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (5.3)$$

beschrieben. Diese hat auch Einfluß auf das Ergebnis eines Spinecho-Experiments. Ein Inversionspuls (entlang der x -Achse orientiert) hat auf einzelne Zustände folgende Auswirkung (Notation nach [Ern97]):

$$\begin{aligned} |+\rangle &\xrightarrow{\pi_x} i|-\rangle \\ |-\rangle &\xrightarrow{\pi_x} i|+\rangle. \end{aligned}$$

Demnach ist die Matrixdarstellung des zum π -Puls gehörenden Operators in der Produktbasis des 2-Spin-Systems gegeben durch

$$\mathcal{R}_\pi^{(p)} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}. \quad (5.4)$$

Bei zunehmend starker Kopplung muß natürlich auch dieser Operator transformiert werden. Im rotierten Eigenraum ergibt sich dann nach Zusammenfassung einiger Winkelfunktionen ($2 \sin \alpha \cos \alpha = \sin 2\alpha$ und $\sin^2 \alpha - \cos^2 \alpha = -\cos 2\alpha$)

$$\mathcal{R}_\pi^{(r)} = \mathcal{U}^{-1} \mathcal{R}_\pi^{(p)} \mathcal{U} = \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & \sin 2\alpha & -\cos 2\alpha & 0 \\ 0 & -\cos 2\alpha & -\sin 2\alpha & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}. \quad (5.5)$$

Die einzelnen Übergänge werden dann nach ERNST et al. in der neuen Basis folgendermaßen ausgedrückt [Ern97]:

$$|t\rangle \langle u| \xrightarrow{R_x} \sum_{r,s} R_{rs\ tu} |r\rangle \langle s|. \quad (5.6)$$

Dabei ergeben sich die sog. Transferkoeffizienten

$$R_{rs\ tu} = (R_\pi^{(r)})_{rt} (R_\pi^{(r)})_{su}^* \quad (5.7)$$

aus der Darstellung des Puls-Operators. Man bekommt für die vier Übergänge nach Einstrahlung des Inversionspulses

$$|1\rangle \langle 2| \xrightarrow{\pi_x} |4\rangle \langle 3| \cos 2\alpha - |4\rangle \langle 2| \sin 2\alpha \quad (5.8)$$

$$|3\rangle \langle 4| \xrightarrow{\pi_x} |2\rangle \langle 1| \cos 2\alpha + |3\rangle \langle 1| \sin 2\alpha \quad (5.9)$$

$$|1\rangle \langle 3| \xrightarrow{\pi_x} |4\rangle \langle 2| \cos 2\alpha + |4\rangle \langle 3| \sin 2\alpha \quad (5.10)$$

$$|2\rangle \langle 4| \xrightarrow{\pi_x} |3\rangle \langle 1| \cos 2\alpha - |2\rangle \langle 1| \sin 2\alpha. \quad (5.11)$$

Während in einem AX-System ($\alpha = 0$) nur die ersten Terme eine Rolle spielen, kommt es durch die zunehmende Drehung der Eigenbasis beim Anwachsen der Kopplungsstärke zu

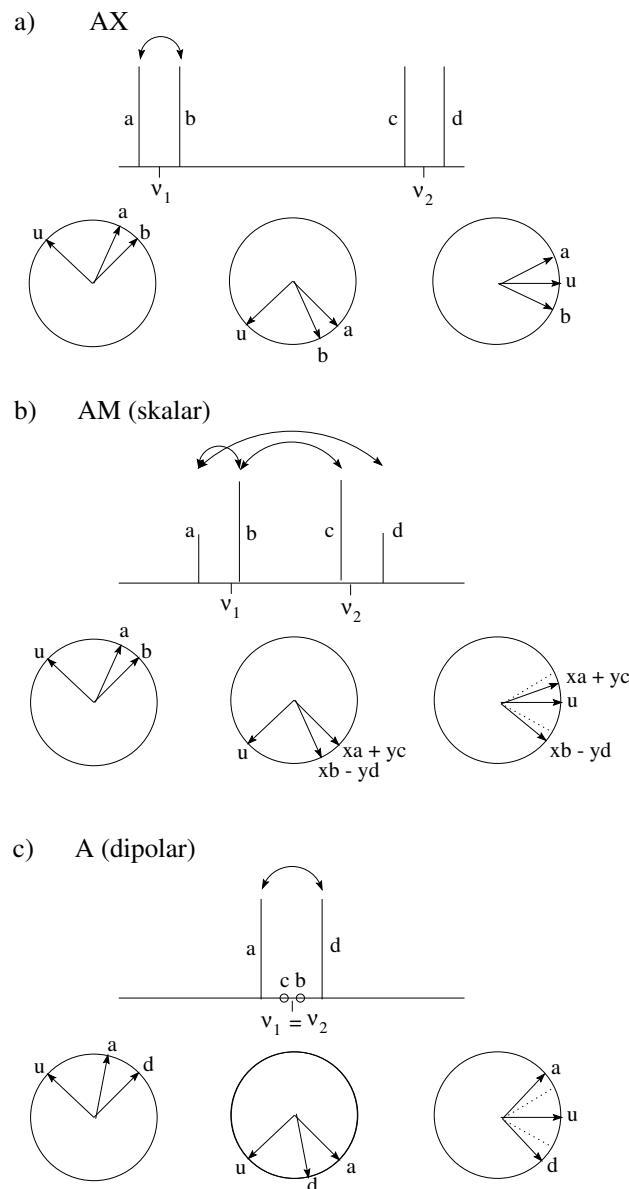


Abb. 5.7: Phasenmodulation für unterschiedlich stark gekoppelte Systeme. (a) Im AX-System kommt es zu symmetrischen Phasenakkumulationen, weil nur Konnektivitäten innerhalb eines Dubletts bestehen. Die Phasen ungekoppelter Resonanzen dienen als Referenz und sind mit u gekennzeichnet. (b) Die Drehmatrix (5.3) bewirkt für das AM-System zusätzliche Konnektivitäten, die für die beiden äußeren Resonanzen zu einer beschleunigten und für die beiden inneren Resonanzen zu einer verlangsamten Phasenmodulation führen. (c) Ein dipolares A_2 -System kann dagegen wieder wie ein AX-System behandelt werden.

einer progressiven Verknüpfung der Übergänge aus beiden Dubletts. Dies führt zu komplexeren 2D-Korrelations-Spektren und zu einer veränderten Phasenmodulation der einzelnen Resonanzen.

Die Konsequenzen für ein Dublett (z. B. das mit den höheren Frequenzen; Nomenklatur wie in Abb. 5.1) sollen anhand von Abb. 5.7 verdeutlicht werden. (a) Die Situation für ein AX-System: Nur die Resonanzen a und b werden durch den Inversionspuls miteinander

der verknüpft, und das anfangs schnell laufende Spinpaket läuft nach dem Puls mit der langsameren Frequenz von b hinter dem anderen Spinpaket her. Daher kommt es nach TE zu einer symmetrischen Phasenakkumulation $+\phi$ und $-\phi$ relativ zu den Resonanzen ungekoppelter Spins (u). Diese ist wegen des gegenseitigen Austauschs von nur zwei Präzessionsfrequenzen direkt mit der Kopplungskonstante verknüpft. Für skalare Kopplung gilt z. B.:

$$\pm\phi = 180^\circ \cdot J_{12} \cdot TE. \quad (5.12)$$

(b) Im AM-System entwickeln sich die Phasen vor dem Puls genauso wie bei schwacher Kopplung. Resonanz a wird durch die Inversion aber nicht nur mit b , sondern auch zunehmend mit d verknüpft. Letztere bringt nun einen noch langsameren Anteil für die Präzessionsfrequenz hinzu, so daß die Phase $-\phi$ von a vom Betrag her wächst, die Phasenmodulation also beschleunigt stattfindet. Im Gegensatz dazu präzediert die zu b gehörende Magnetisierung nun nicht mehr nur mit den schnelleren Anteilen von a , sondern auch mit den langsameren von c . Diese kompensieren sich teilweise, so daß die Phase $+\phi$ kleiner wird. Analoge Betrachtungen für das andere Dublett ergeben insgesamt, daß die beiden inneren Resonanzen eine verzögerte, die beiden äußeren Resonanzen eine beschleunigte Phasenmodulation erfahren.

Diese spezielle Phasenmodulation der äußeren Resonanzen spielt bei dipolaren AM-Systemen eine besondere Rolle: da es sich hierbei gerade um die Linien höherer Intensität handelt, kann die schnelle Phasenmodulation dazu führen, daß der Dach-Effekt umgedreht wird und wie bei der skalaren Kopplung erscheint. Die inneren Resonanzen unterliegen aufgrund ihrer sehr langsamen Modulation fast nur dem T_2 -Zerfall und erscheinen deshalb ab einem bestimmten TE höher. Bei der J -Kopplung fällt dieser Effekt nicht ins Gewicht, da dort die schnelle Phasenmodulation die schwächeren Linien betrifft und somit das Intensitätsverhältnis nicht umgekehrt werden kann.

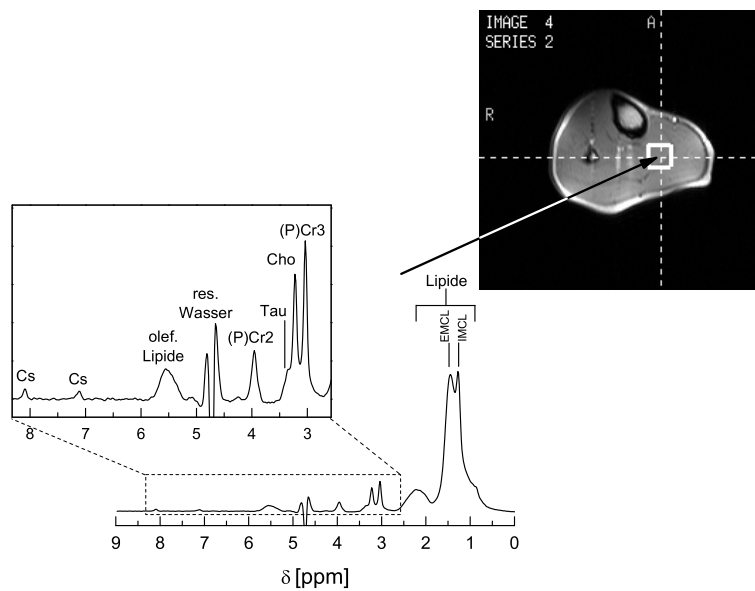
Die Betrachtung des A_2 -Systems als Extremfall starker Kopplung macht nur für die dipolare Wechselwirkung Sinn. Abb. 5.7 (c) geht daher direkt aus der Betrachtung in Abb. 5.4 (b) hervor. Es kommt nur noch zu einer Verknüpfung der Resonanzen a und d , weshalb man eine zum AX-System analoge Überlegung durchführen kann. Man beobachtet wieder eine symmetrische Phasenakkumulation, die aber wegen der nun vergrößerten Aufspaltung von $1,5Sk$ und der Winkelabhängigkeit etwas komplexer als (5.12) ausfällt:

$$\pm\phi = 180^\circ \cdot 1,5SD_0(3 \cos^2 \theta - 1) \cdot TE. \quad (5.13)$$

Das dipolare A_2 -System ist daher nur eine pseudo-starke Wechselwirkung: es ist zwar mit dem maximalen Mischungswinkel verknüpft, zeigt aber spektrale Eigenschaften wie ein AX-System. Außerdem ist der Zeeman-Effekt weiterhin dominant, und die Spins koppeln hauptsächlich an das Grundfeld.

Teil II

Biochemische und apparative Grundlagen



Welche gewaltige Umwälzung würde es für die Biologie bedeuten, wenn die Physik oder die Chemie dem Physiologen eine Methode verschaffen könnte, um die molekulare Struktur lebendiger Gewebe aufzuklären – vergleichbar jenem revolutionären Fortschritt, den die Spektroskopie für die Erforschung der Natur der Himmelskörper brachte.

Thomas Henry Huxley, 1825 - 1895

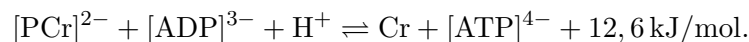
Kapitel 6

Eigenschaften der untersuchten Metaboliten

Die Kenntnis des biochemischen Hintergrundes der hier untersuchten Metaboliten spielt eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der *In-vivo*-NMR-Spektren bzw. der darin enthaltenen Information über die Molekulardynamik. Es soll daher kurz ein Überblick über die in diesem Zusammenhang wichtigen biochemischen Eigenschaften der verschiedenen Substanzen gegeben werden.

6.1 Kreatin und Phosphokreatin

Phosphokreatin (PCr) ist als phosphorylierte Form des Kreatins (Cr) der Puffer für den universellen Energielieferanten Adenosin-5'-triphosphat (s. u.). Für die rasche Nachbildung dieser Substanz aus Adenosin-5'-diphosphat wird bei akutem Energiebedarf mit Hilfe des Enzyms Kreatin-Kinase die Phosphoryl-Gruppe vom PCr auf ADP übertragen:



Die Gleichgewichtskonstante dieser Phosphorylierung ist

$$K = \frac{[\text{ATP}][\text{Cr}]}{[\text{ADP}][\text{PCr}]} = 162.$$

Kreatin wird sowohl über die Nahrung aufgenommen, als auch vom Organismus in Leber, Niere und Pankreas synthetisiert. Kommt der Stoffwechsel zum Erliegen, so wird das ganze PCr zu Cr abgebaut.

Da der PCr-Gehalt im Muskel drei- bis viermal höher als der des ATP ist (s. Tab 6.3), liegt ein ausreichender Speicher an Phosphoryl-Gruppen vor, um einen hohen Energiebedarf kurzzeitig zu decken. Das akkumulierte Cr wird in der anschließenden Erholungsphase ebenfalls über die Kreatin-Kinase-Reaktion phosphoryliert, denn diese ist reversibel. Ein anderer Stoffwechselfad für Erzeugung und Abbau des PCr besteht nicht.

In ^1H -NMR-Spektren der beiden Stoffe lassen sich vier Resonanzen erkennen (s. Tab. 6.1), die jedoch bei 1,5 T keine Unterscheidung zwischen PCr und Cr zulassen, da der Einfluß der Phosphat-Gruppe auf die detektierbaren Signale zu gering ist. Man spricht daher auch oft vom totalen Kreatin-Signal (tCr), denn es ist nicht genau bekannt, welcher Anteil am

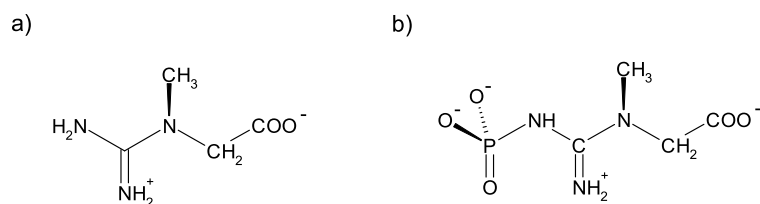


Abb. 6.1: Strukturformel des Kreatin (a) und seiner phosphorylierten Form PCr (b)

NMR-Signal auf Cr und welcher auf PCr zurückzuführen ist. Man kann jedoch davon ausgehen, daß das Gleichgewicht der Kreatin-Kinase-Reaktion zu 90% auf der Seite des PCr liegt [Bru91] und daher relativ wenig Cr zum Signal beiträgt.

Die Signale der an Stickstoff gebundenen Protonen sind aufgrund des raschen chemischen Austausches sehr schwach und werden vor allem *in vivo* praktisch nicht detektiert; die Resonanzen der Methyl- und der Methylen-Gruppe sind dagegen leicht zu erkennen. Aufgrund der geringen chemischen Verschiebung zur Wasser-Resonanz bei 4,7 ppm besteht beim Signal der CH₂-Gruppe die Gefahr, daß die CHESS-Pulse der Wassersignal-Unterdrückung (s. Kap. 7) und das Herausfiltern des restlichen H₂O-Signals zu unerwünschten Veränderungen im Spektrum führen.

Quantifizierungen der Konzentration von PCr mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie liefern übereinstimmende Werte mit Ergebnissen aus Biopsien [Bru91]. Aktuelle Studien mit Protonen-MRS [Kru99] deuten jedoch auf einen NMR-unsichtbaren Anteil des PCr/Cr-Pools von ca. 30% hin. Dies ist ein Hinweis darauf, daß ein Teil der Moleküle *in vivo* bewegungsgehemmt ist und somit residuale dipolare Kopplungen sichtbar werden können.

Tab. 6.1: ¹H-NMR-Resonanzen von PCr und Cr

Gruppe	Zahl äquivalenter Protonen	Bezeichnung der Resonanz	δ [ppm]
CH ₃	3	(P)Cr3	3,04
CH ₂	2	(P)Cr2	3,93
NH	1 (PCr)		6,62
NH ₂	2 (PCr) bzw. 4 (Cr)		6,73

6.2 Carnosin

Carnosin (β -Alanin-*L*-histidin, Cs) ist ein aus den Aminosäuren Histidin (His) und Alanin (Ala) bestehendes Dipeptid. Es wird entweder über die Nahrung aufgenommen (hohe Konzentrationen in Geflügel) oder über das Enzym Cs-Synthase aus His und β -Ala endogen erzeugt. Cs-produzierende Zellen (wie sie z. B. im Muskel und in Oligodendrozyten zu finden sind) brauchen hierfür ein effektives Transportsystem für β -Ala. Diese Aminosäure entsteht als Endprodukt des Uracil- und Thymin-Abbaus in der Leber. Über das Enzym Carnosinase kann die Spaltung in His und Ala erfolgen.

Bislang gibt es verschiedene Anhaltspunkte für die Einbindung von Cs in metabolische Prozesse; seine physiologische Bedeutung ist allerdings noch immer nicht vollständig geklärt. Viele Studien zeigen, daß die Substanz bei der Muskelkontraktion eine wichtige

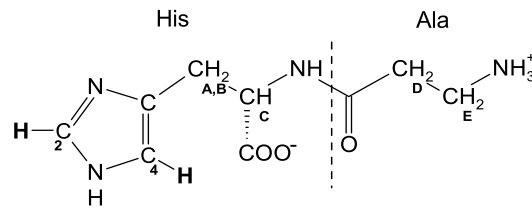


Abb. 6.2: Strukturformel des Dipeptids *L*-Carnosin. Die Linie grenzt die beiden Aminosäuren Histidin (His) und Alanin (Ala) voneinander ab. Die für *In-vivo*-Untersuchungen relevanten Protonen des Imidazol-Rings sind fett dargestellt; alle weiteren detektierbaren Kerne sind durch Buchstaben gekennzeichnet.

Rolle zu spielen scheint, denn in diesem Gewebe-Typ ist die Konzentration auch erstaunlich hoch. So konnten im m. gluteus von Kamelen je nach Gewebetyp Werte von 25 mM (Typ I-Fasern) bzw. 40 mM (Typ II-Fasern) nachgewiesen werden [Dun97]. Diese Unterschiede scheinen auf den unterschiedlichen Stoffwechsel der Fasern zurückzuführen zu sein, denn Cs fungiert als wichtiger Puffer für das bei Kontraktion von Typ-II-Fasern in großen Mengen anfallende Laktat [Abe00]. Da ein Anstieg von $[H^+]$ die Enzyme der Glycolyse hemmt, ist in diesen anaeroben Fasern eine effektive Pufferung unerlässlich. Der pK_S -Wert des Imidazol-Rings liegt mit 7,01 nahe am intrazellulären pH-Wert, weshalb sich Cs (und ähnliche Verbindungen wie Anserin und His) hervorragend zur Pufferung eignen [Abe00]. In diesem Zusammenhang wird von der "Alphastat-Reaktion" gesprochen, bei der der Wert

$$\alpha_{\text{Imid}} = \frac{\text{nicht-protoniertes Imidazol}}{\text{gesamtes Imidazol}}$$

möglichst konstant gehalten werden soll; er liegt typischerweise bei ca. 0,55 im Cytoplasma. Dabei sind die metabolisch inerten Dipeptide für diesen Prozeß besser geeignet als andere Puffer wie z. B. anorganisches Phosphat oder His-Residuen in Proteinen.

Auffällig ist jedoch, daß Cs (und andere His-enthaltende Substanzen) beim Menschen im Gegensatz zu anderen Säugern wie Pferd und Hund nur einen geringen Anteil (ca. 7%) an der Pufferkapazität des Gewebes hat. Hingegen kommen diese Stoffe in sehr hohen Konzentrationen bei Lebewesen vor, die einen hohen Energieumsatz bei andauernder, starker Hypoxie (z. B. Wale) haben [Har90].

Weiterhin kann durch Cs die inaktivierende Wirkung von H_2O_2 auf die Kreatin-Kinase aufgehoben werden, so daß das Molekül direkt die Energiezufuhr der Zellen unterstützen kann [Pre99]. Außerdem gibt es starke Hinweise darauf, daß die zur Kontraktion notwendigen Ca-Kanäle (Ryanodin-Rezeptoren) durch Cs geöffnet werden, und zwar vor allem bei Übermüdung des Muskels (Severin-Effekt). Das zur Muskelkontraktion notwendige Enzym Myofibrillar-ATPase scheint ebenfalls durch Cs aktiviert werden zu können [Yun65].

Die Komplexbildung von Cs mit verschiedenen Kationen ist in mehreren Arbeiten untersucht worden und liefert weitere Anhaltspunkte für das Verhalten dieses Metaboliten *in vivo* [Bar00, Gag90]. Deformation des Moleküls und eine Verklumpung mit erheblichen Bewegungseinschränkungen bestimmter Teile des Moleküls lassen es plausibel erscheinen, daß auch hier residuale dipolare Kopplungen beobachtet werden können. Hinweise auf eine Fixierung, die nur im intakten Muskelgewebe auftritt, liegen auch bereits seit einigen Jahren vor [Alo90].

Das 1H -NMR-Spektrum dieses Moleküls kann also viele Anhaltspunkte für die Moleküldynamik *in vivo* und *in vitro* liefern. Es besteht aus mehreren Signalgruppen, die bei 1,5 T

Tab. 6.2: ^1H -NMR-Signale des Dipeptids Carnosin in D_2O bei $\text{pH} = 7$. Chemische Verschiebungen sind relativ zu $[\text{2,2,3,3-}^2\text{H}_4]\text{-3-Tetramethylsilylpropanoat}$ angegeben [Gag90]; dadurch liegen die Werte ca. 1 ppm niedriger als bei der Referenz TMS.

Gruppe	Aminosäure	Protonen		δ [ppm]
		(s. Abb. 6.2)	Struktur	
$\beta\text{-CH}_2$	Ala	E	t	1,88
CH_2	His	A, B	dd	2,21; 2,37
$\alpha\text{-CH}_2$	Ala	D	t	2,44
CH	His	C	dd	3,71
C4-H	His		s	6,17
C2-H	His		s	6,93

zwar teilweise überlappen, deren Zuordnung aber noch zweifelsfrei möglich ist. Die Signale der verschiedenen Protonen sind in Tab. 6.2 aufgelistet. Für die Untersuchungen *in vivo* werden nur die aromatischen Resonanzen der Ringprotonen H2 und H4 von Bedeutung sein. Der aliphatische Teil des Spektrums besteht aus zwei Triplets (t) der Ala-Methylen-Gruppen und zwei dublierten Dubletts (dd), die von der CH- bzw. CH_2 -Gruppe des His stammen.

6.3 Adenosin-5'-triphosphat

Adenosin-5'-triphosphat (ATP) gehört zur Gruppe der Nukleosid-5'-triphosphate (NTP), bei denen die Phosphorylgruppen über Kohlenhydrate an eine organische Base (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin oder Uracil) gebunden sind. ATP dient als universeller Überträger freier Energie in lebenden Organismen und kommt daher in wesentlich höheren Konzentrationen als die übrigen NTP im Gewebe vor. Deren Beitrag zum *In-vivo*- ^{31}P -Spektrum kann daher vernachlässigt werden.

Im Muskel wird ATP von den Aktin- und Myosin-Filamenten als Energieträger zur Kontraktion benötigt. Dabei erfolgt durch die Aktomyosin-ATPase die Abspaltung der endstän-

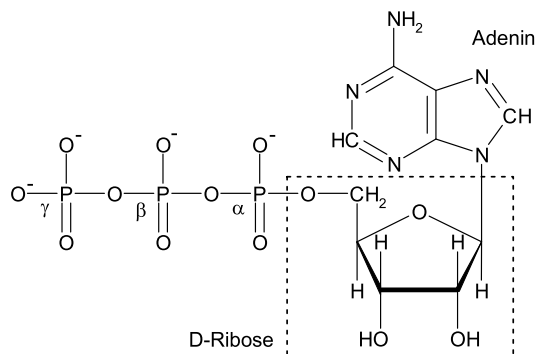


Abb. 6.3: Strukturformel des ATP. Die Nomenklatur der drei Phosphor-Kerne in der Polyphosphat-Kette ist angegeben.

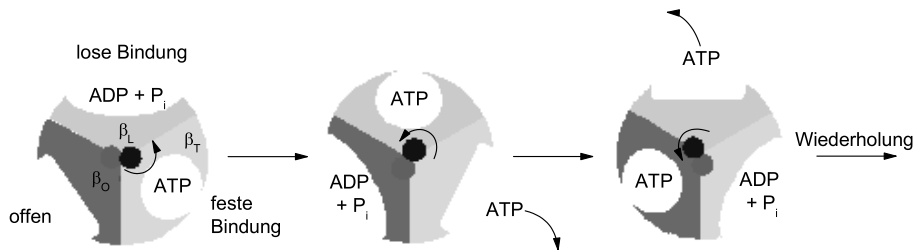
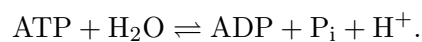


Abb. 6.4: Funktionsweise der ATPase bei der Phosphorylierung von ADP

digen Phosphorylgruppe:



Da die Coulomb-Abstoßung zwischen den negativ geladenen Gruppen im Adenosin-5'-diphosphat (ADP) geringer ist, werden die NTP auch als energiereiche Phosphate bezeichnet. Die freigesetzte Energie von $\Delta G^0 = -30,5 \text{ kJ/mol}$ ermöglicht die Muskelkontraktion. Um einen Zusammenbruch des Energiehaushaltes zu verhindern, muß ADP schnell wieder phosphoryliert werden. Dies geschieht durch Übertragung der Phosphorylgruppe von PCr mit der in 6.1 beschriebenen Reaktion. Die ATP-Produktion in Phasen ohne akuten Energiebedarf erfolgt in Prozessen der Atmungskette (s. auch Abschnitt über Citrat). Die Netto-Reaktion ist praktisch die Rückreaktion der eben genannten Dephosphorylierung der Aktomyosin-ATPase. Dabei ist jedoch das freiwerdende ATP nicht aus dem gleichen ADP entstanden, das zuvor als Edukt an die ATPase gebunden wurde. Abb. 6.4 zeigt, daß der aktive Teil einer ATPase aus drei Untereinheiten besteht, die durch Drehung der zentralen γ -Struktur eine Konformationsänderung erfahren und so ADP zu ATP phosphorylieren können.

Zunächst befinden sich fest gebundenes (tight) ATP und lose gebundenes (light) ADP + P_i an den Untereinheiten β_T bzw. β_L . Eine Drehung der γ -Einheit läßt β_T zu β_O (offen) werden und gibt ATP frei. Gleichzeitig wird β_L zu β_T , um die Phosphorylierung zu ermöglichen, und β_O wird zu β_L , um neue Edukte aufzunehmen. Die nächste Konformationsänderung erfolgt analog, so daß nach einer Umdrehung der γ -Einheit alle β -Einheiten jede der drei möglichen Funktionen einmal durchlaufen haben.

Bei Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen (oder anderen zweiwertigen Ionen) findet eine Komplexbildung mit ATP statt. Sie hat eine große Bedeutung für die von Enzymen gesteuerte Übertragung einer Phosphorylgruppe auf einen Akzeptor. Diese Kinasen sind nur aktiv,

Tab. 6.3: Konzentration von Adenin-Nukleotiden, anorganischem Phosphat (P_i) und PCr in verschiedenen Zellen (in mM; nach [Leh82]).

	ATP	ADP	AMP	P_i	PCr
Leber (Ratte)	3,38	1,32	0,29	4,80	0,0
Muskel (Ratte)	8,05	0,93	0,04	8,05	28,0
Gehirn (Ratte)	2,59	0,73	0,06	2,72	4,7
Erythrocyten (Mensch)	2,25	0,25	0,02	1,65	0,0
<i>E. coli</i>	7,90	1,04	0,82	7,90	0,0

Tab. 6.4: Mittelwerte spektraler Parameter der ^{31}P -NMR-Signale von ATP aus Messungen an Waden- und Herzmuskulatur [Jun96] in *In-vivo*-Experimenten (Referenz: PCr bei $\delta = 0$ ppm)

Signal	Struktur	δ [ppm]	$J_{i\beta}$ [Hz]
γ -ATP	d	-2,39	16,8
α -ATP	d	-7,48	16,0
β -ATP	dd (t)	-16,00	

wenn ATP in komplexierter Form vorliegt. Die zwei möglichen MgATP-Komplexe sind in Abb. 6.5 gezeigt.

Die Komplexbildung hat über die Veränderung der Elektronen-Konfiguration Auswirkung auf das ^{31}P -NMR-Spektrum von ATP (auf das Protonen-Spektrum soll hier nicht eingegangen werden). Die drei Phosphor-Kerne bilden ein AMX-System und zeigen bei 1,5 T insgesamt sieben Resonanzen im Spektrum. Das System wird durch zwei Kopplungskonstanten des Typs $^2J_{\text{PP}'}$ hinreichend beschrieben, denn die Wechselwirkung zwischen dem α - und dem γ -Kern über vier Bindungen kann vernachlässigt werden. Somit liegen zwei Dubletts und ein dubliertes Dublett vor. Letzteres erscheint wegen des geringen Unterschieds in den Kopplungskonstanten ($J_{\alpha\beta} \approx J_{\gamma\beta} \approx 16 - 17 \text{ Hz in vivo}$ [Jun96]) als "Triplett". Die Linienpositionen der Resonanzen für ein *In-vivo*-Experiment (ATP liegt dann fast vollständig komplexiert vor) sind in Tab. 6.4 angegeben.

6.4 Citrat

Citrat (Cit) spielt im Rahmen des Zitronensäure-Zyklus bei der Zellatmung eine zentrale Rolle. Die Mehrzahl der Zellen in lebenden Organismen oxidiert auf diesem Wege energiereiche Brennstoffe vollständig zu CO_2 und Wasser. So wird z. B. bei dieser Art der Verbrennung von Glukose wesentlich mehr Energie freigesetzt als bei der anaeroben Glykolyse, in deren Endprodukt Laktat noch ca. 93% der Energie gebunden sind.

Die Zellatmung läuft im wesentlichen in drei Stufen ab, die in Abb. 6.6 gezeigt sind. Zunächst werden die Brennstoffe wie Kohlenwasserstoffe, Fettsäuren sowie einige Aminosäuren oxidiert, um Fragmente mit 2 Kohlenstoffatomen – die Acetyl-Gruppen des Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) – zu gewinnen. Im zweiten Schritt gelangen diese Gruppen in den Citrat-Zyklus, in dem sie enzymatisch schrittweise zu verschiedenen Tricarbonsäuren umgewandelt werden. Dabei werden CO_2 und energiereiche Wasserstoff-Atome abgegeben. Letztere werden im dritten Schritt in Protonen und energiereiche Elektronen getrennt, welche dann in der Atmungskette über die elektronentransportierenden Moleküle

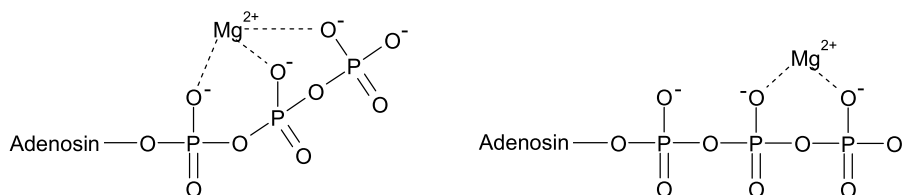


Abb. 6.5: Mögliche Komplexe von Mg^{2+} mit ATP

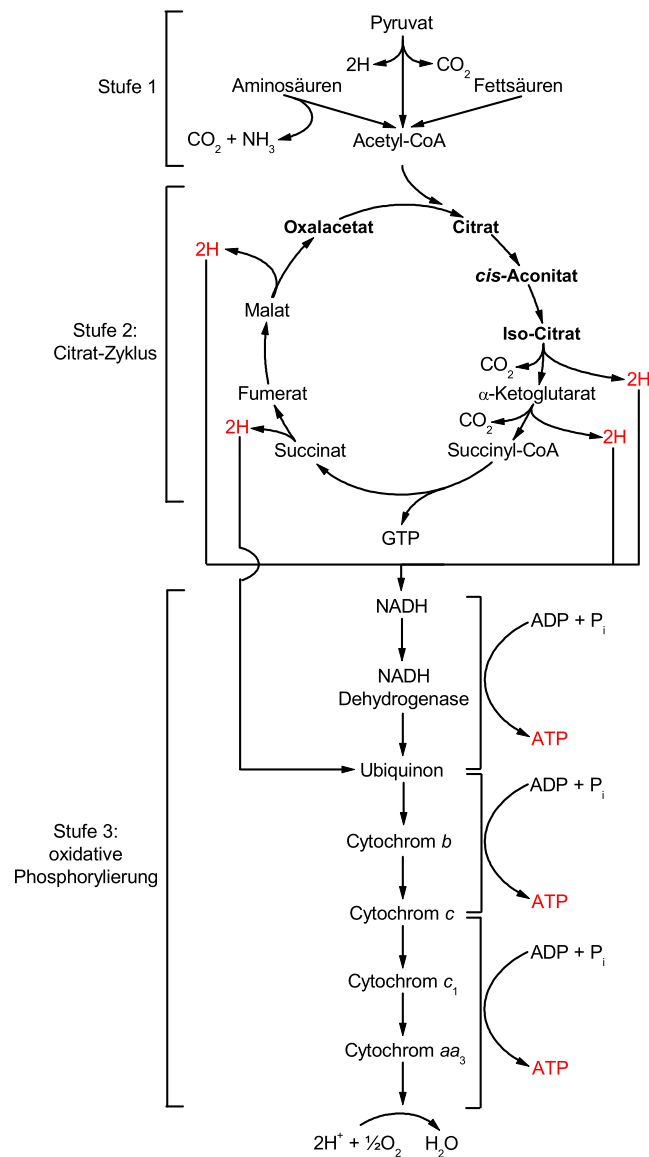


Abb. 6.6: Überblick über die drei Stufen der Zellatmung. Die energiereichen Wasserstoff-Atome, die aus dem Citrat-Zyklus in die oxidative Phosphorylierung übergehen, sind ebenso wie der Energiespeicher ATP rot dargestellt. Der zu Beginn des Zyklus stattfindende Metabolismus von Cit ist fett wiedergegeben und wird im Detail in Abb. 6.7 und 6.8 dargestellt.

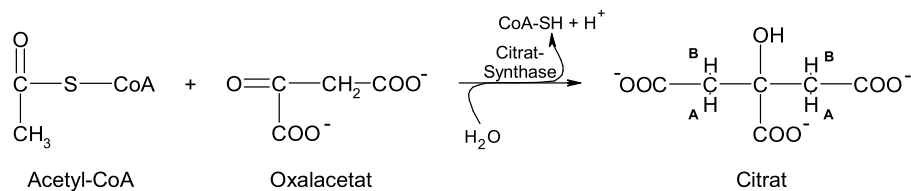


Abb. 6.7: Bildung von Cit beim Eintritt von Acetyl-CoA in den Zyklus. Die NMR-detektierbaren Protonen des (AB)₂-Systems sind gekennzeichnet.

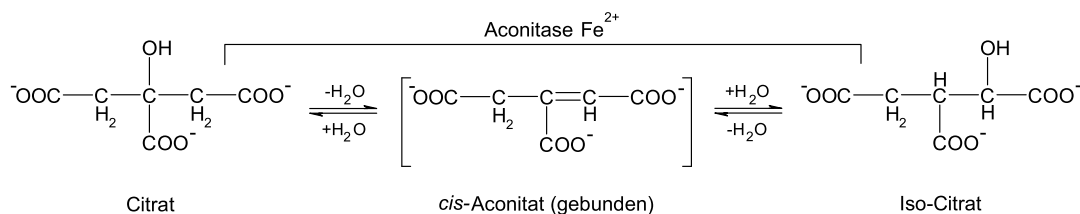


Abb. 6.8: Enzymatische Umwandlung zwischen Cit und Iso-Cit. Zur Aktivierung des Prozesses werden Eisen-Ionen benötigt.

mit molekularem Sauerstoff in Verbindung gebracht werden, um diesen zu Wasser zu reduzieren. Die Verarbeitung der Elektronen setzt viel Energie frei, die in Form von ATP gespeichert wird (Prozeß der oxidativen Phosphorylierung).

Auf die enzymatischen Reaktionen, an denen Cit beteiligt ist, soll nun etwas näher eingegangen werden. Beim Eintritt von Acetyl-CoA in den Citrat-Zyklus wird zunächst die Acetyl-Gruppe auf Oxalacetat übertragen. Diese Reaktion wird durch die Citrat-Synthase gesteuert (Abb. 6.7). Im aktiven Zentrum des Enzyms wird zunächst Citryl-CoA gebildet, das aber schnell zu Cit und CoA-SH hydrolysiert wird. Wegen der großen negativen freien Energie der Hydrolyse von $\Delta G^{o'} = -7,7 \text{ kcal/mol}$ ist das Gleichgewicht dieser Reaktion in den meisten Fällen stark nach rechts verschoben.

Im nächsten Schritt wird Cit in Iso-Cit umgewandelt. Das Zwischenprodukt *cis*-Aconitat löst sich normalerweise nicht vom aktiven Zentrum der Aconitase ab. Dieses Enzym ermöglicht auf zwei Arten die reversible Addition von H₂O an die Doppelbindung des gebundenen *cis*-Aconitat (Abb. 6.8). Dabei entsteht entweder Cit oder Iso-Cit:



Bei einem pH-Wert von 7,4 und 25°C liegt im Gleichgewicht einer Modell-Lösung weniger als 10% Iso-Cit vor. In der Zelle ist jedoch aufgrund der schnellen Weiterverarbeitung des Iso-Cit im nächsten Schritt des Zyklus' das Gleichgewicht normalerweise stark nach rechts verschoben.

Das aktive Zentrum der Aconitase besteht aus einem sogenannten Eisen-Schwefel-Zentrum, das das Substrat bei der Reaktion käfigartig umschließt. Normalerweise ist Cit wegen der schnellen Verstoffwechslung nicht NMR-detektierbar. In der Prostata ist die enzymatische Reaktion jedoch durch Zn²⁺-Ionen gehemmt, wodurch die Aktivierung durch Fe²⁺ ausbleibt [Cos00]. Daher ist das Gleichgewicht stark nach links verschoben und die Oxidation von Cit im Zyklus herabgesetzt. Dies führt zu einer Akkumulierung dieses Metaboliten und einer im Vergleich zu anderen Geweben etwa drei- bis vierfach höheren Konzentration.

Die Prostata zeigt daher als einziges Gewebe beim Menschen intensive Cit-Resonanzen bei *In-vivo*-Untersuchungen. Die beiden detektierbaren Methylen-Gruppen bilden aufgrund der Chiralität ein (AB)₂-System (Abb. 6.7). Die Kopplung innerhalb der Gruppen ist sehr stark, die über das Symmetriezentrum hinweg kann dagegen vernachlässigt werden. Da sich die Kernsorten A und B nicht stark in der Resonanzfrequenz unterscheiden, ist mit einem starken Dach-Effekt zu rechnen. Dies wurde auch experimentell bestätigt. Aus dem Zentrum der Signalgruppe (bei 2,63 ppm) und der Ausprägung des Dach-Effekts konnte mit (2.4) ein Frequenzunterschied von $\Delta\omega = 0,12 \text{ ppm}$ ermittelt werden [Sch93], so daß

die Linienpositionen der beiden Kernsorten in Hochfeld-Experimenten bei $\delta = 2,69$ ppm bzw. $\delta = 2,57$ ppm liegen.

6.5 Taurin

Taurin (2-Aminoethansulfonsäure, Tau) ist das Abbauprodukt der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. Da die Sulfonat-Gruppe keine Peptidbindung eingehen kann, ist die Substanz nicht am Aufbau von Proteinen beteiligt und liegt im Körper fast nur in freier Form vor. Im physiologischen pH-Bereich treten die Aminogruppe zu ca. 96%, die Sulfonat-Gruppe zu 100% in ionisiertem Zustand auf. Das Gesamtmolekül ist somit fast vollständig als Zwitterion im Gewebe vorhanden (s. Abb. 6.9)

Während Taurin bislang nur in einer Pflanzenart nachgewiesen wurde, ist schon seit langem bekannt, daß es im Tierreich ubiquitär vorkommt. Dies deutet darauf hin, daß es dort eine wichtige Funktion hat. Die Konzentrationen variieren jedoch stark zwischen den einzelnen Spezies und Gewebetypen. Besonders hohe Werte treten in jeder Art von Muskelgewebe auf (30-160 mg/100 g); bei Ratten macht die Substanz 0,15% des gesamten Körpergewichts aus.

Physiologische Bedeutung für den Menschen hat Tau in erster Linie im Skelettmuskel, denn dort liegt 75% des gesamten Taurins vor. Die Aufnahme des Stoffes ist stark ernährungsabhängig (vegane Ernährung unterbindet die Taurin-Aufnahme).

Da Tau als Stoffwechsel-Endprodukt beim Abbau der Aminosäure Cystein auftritt, ist es metabolisch inert, was für seine weitere physiologische Rolle von Bedeutung ist. Die Metabolisierung von Cystein, das bei zu hohen Konzentrationen in der Zelle toxisch ist, kann auf verschiedene Weise geschehen. Im Menschen ist der Reaktionsweg über Cysteinsulfinsäure und Hypotaurin der quantitativ bedeutendste (s. Abb. 6.10.) Zunächst findet die durch Cysteindioxygenase gesteuerte Oxidation statt. Daran schließt sich die Decarboxylierung durch Cysteinsulfatdecarboxylase (CSAD) an. Die letzte Oxidation vom Hypotaurin zum Tau verläuft nach bisherigen Kenntnissen spontan.

Physiologisch spielt Tau im Muskel eine ähnliche Rolle wie Cs. Es kann auf den Ca^{2+} -Haushalt der Zelle auf zwei Arten einwirken. Einerseits können durch Tau direkt die entsprechenden Transportkanäle reguliert werden [Bre01]. Diese Funktion ist aber unspezifisch, da das Molekül auch andere Ionen-Kanäle beeinflusst. Andererseits wird die Bindung von Ca^{2+} an die Phospholipide der Zellmembran durch Tau gesteuert [Seb86]: bei einem Mangel an Ca-Ionen wird die Affinität gesteigert, bei einem Überschuß werden die Bindungen zur Zellmembran gelöst. Diese Einflußnahmen auf die Ca-Ionenkonzentration spielen besonders im Herzmuskel sowohl für die Regelmäßigkeit als auch für die Stärke der Kontraktion eine wichtige Rolle; sie sind aber auch in allen anderen Muskelzellen relevant.

Darüber hinaus hat Tau noch weitere allgemeine physiologische Bedeutungen, von denen hier noch zwei erwähnt seien. Es kann als Antioxidans auftreten, womit eine weitere

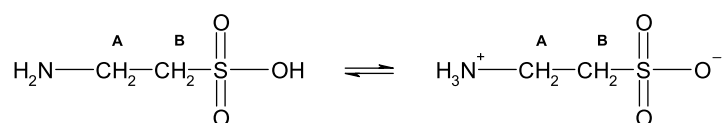


Abb. 6.9: Strukturformel von Taurin, das bei physiologischem pH-Wert fast vollständig als Zwitterion vorliegt. Die Protonen des A₂B₂-Systems sind angegeben.

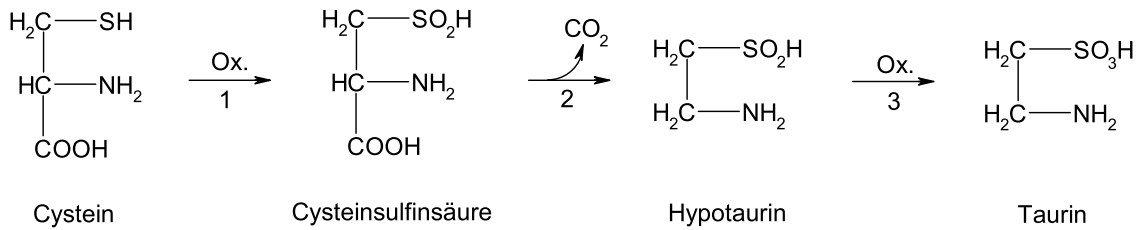


Abb. 6.10: Hauptpfad der Metabolisierung von Cystein. Die Schritte 1 und 2 sind enzymatisch gesteuert, die letzte Oxidation verläuft (wahrscheinlich) spontan.

Parallele zu Cs besteht. Dabei wirkt es folgendermaßen als Hypochlorit-Radikalquencher: bei stark erhöhtem oxidativem Stoffwechsel (z. B. zur Infektions-Abwehr) entsteht in der Zelle vermehrt das starke Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid. Da dessen Abbau durch das Enzym Katalase dann nicht rasch genug erfolgt, werden Chlorid-Ionen, welche aus den Leukozyten stammen, zu hypochloriger Säure umgewandelt (Abb. 6.11). Der Abbau dieses starken Oxidationsmittels, das u. a. die schädliche Carbonylisierung von Proteinen verursacht ([Hip00], s. Kap. 10.5), geschieht durch Tau. Dabei entsteht *N*-Monochloro-Taurin, das zwar langlebiger ist, aber eine viel schwächere oxidative Wirkung hat. Der Zelle bleibt daher mehr Zeit zur Entgiftung, welche über die Reduktion durch Glutathion erfolgt. Für weitere Details sei auf [Bre01] verwiesen.

Die zweite gewebeunspezifische Bedeutung von Tau liegt in Form seiner osmoregulativen und membranstabilisierenden Wirkung vor. Diese scheint auch zu erklären, warum die Substanz nicht in pflanzlichen Zellen nachzuweisen ist. Im Gegensatz zu tierischen Zellen verfügen letztere nämlich über eine verstärkte Zellwand. Daher ist die Regulation des Zellvolumens über den osmotischen Druck für tierisches Gewebe von großer Bedeutung. Tau hat aufgrund seiner Eigenschaften als ionische (also lipophobe) und metabolisch inerte Substanz ideale Eigenschaften für die Aufgabe als Osmolyt: das Zwitterion unterliegt keiner ungerichteten Diffusion, und es besteht keine durch den Metabolismus verursachte konkurrierende Funktion. Hinzu kommt der Vorteil, daß Tau im Gegensatz zu anorganischen Osmolyten wie NaCl oder KCl kaum enzymatische Funktionen inhibiert. Tau wird bei Hyperosmolarität zusammen mit freien Aminosäuren in die Zelle transportiert, um den Innendruck zu stabilisieren. Hypoosmolarität führt zu gemeinsamer Diffusion von Tau und K^+ in das Plasma [Bre01].

Der Transportprozeß von Tau in die Zelle ist äußerst effektiv. Es wird hauptsächlich durch das Na^+ - und Cl^- -abhängige *L*-Aminosäuren-Carriersystem bereitgestellt. Aufgrund seiner strukturellen Analogie zu *L*-Aminosäuren kann Tau auf diese Weise mit hoher Affinität

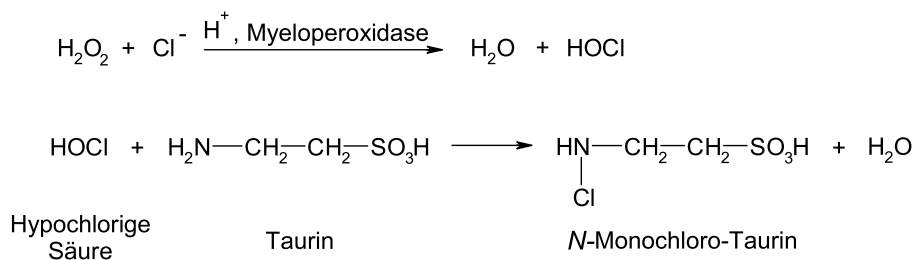


Abb. 6.11: Antioxidative Wirkung von Tau als Hypochlorit-Radikalquencher

Tab. 6.5: ^1H -NMR-Signale von Tau. Die angegebene Struktur bezieht sich auf die bei 250 MHz sichtbare Multiplizität [Gov00]. Bei 1,5 T liegt näherungsweise ein A_2B_2 -system vor.

Gruppe	Struktur	Protonen (s. Abb. 6.9)	δ [ppm]	J [Hz]
N-CH ₂	t	B, B'	3,25	$J_{\text{AB}} = 6,742$ $J_{\text{A'B}} = 6,403$
S-CH ₂	t	A, A'	3,42	$J_{\text{AB}'} = 6,464$ $J_{\text{A'B}'} = 6,792$

transportiert werden. Ein zweites, sehr langsames System ist vorhanden, aber bislang noch nicht weiter charakterisiert. Die Abgabe von Tau aus der Zelle erfolgt dagegen nur durch passive Diffusion, was zu hohen Konzentrationsunterschieden zwischen intra- und extrazellulärem Medium führt. Die Diffusion ist wegen der lipophoben Eigenschaften erschwert. Im Skelettmuskel beträgt der Gradient 1 : 220, im Herzmuskel sogar 1 : 450 [Bre01].

Das ^1H -NMR-Spektrum von Tau weist die Signale der beiden Methylen-Gruppen auf. Diese bilden ein stark gekoppeltes System, das nur bei hohen Feldern aus zwei Triplets besteht (Tab. 6.5); für *In-vivo*-Untersuchungen ist mit starken Abweichungen von der X-Näherung zu rechnen.

Kapitel 7

Lokalisierte NMR-Spektroskopie

7.1 Der Ganzkörpertomograph und das Spulensystem

Für die multinukleare *In-vivo*-NMR-Spektroskopie verfügt das Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg über einen Ganzkörpertomographen des Typs MAGNETOM VISION Plus[©] der Firma Siemens AG, Erlangen. Das Grundfeld hat eine Stärke von $B_0 = 1,5\text{T}$ und wird durch einen supraleitenden (NbTi-Wicklung), heliumgekühlten Magneten erzeugt (Typ HELICON 2E, variable Feldstärke $B_0 = 0 - 2\text{T}$). Für die zusätzlich benötigten Gradientenfelder ist der Tomograph mit drei zueinander orthogonalen Spulen ausgestattet. Die Feinabstimmung zur Optimierung der Homogenität des Grundfeldes wird mittels acht Shimspulen realisiert. Zusätzlich sind sogenannte EPI-Booster eingebaut, durch die die Ansteuerung des Gradientensystems auf eine maximale Stärke von 25 mT/m in $300\text{ }\mu\text{s}$ erreicht wird.

Die *In vivo*- ^1H -NMR-Untersuchungen erfolgten mit einer um die Wade gelegten zirkular polarisierten Flexspule ($17 \times 35\text{ cm}^2$), die als Empfangsspule mit integriertem Vorverstärker arbeitet. Als Sendeeinrichtung diente die Ganzkörperspule des Tomographen. Für die Messungen an Phantomen wurde die zirkular polarisierte Kopfspule benutzt.

Für die ^{31}P -Experimente wurde mit einer doppelresonanten Oberflächenspule ($25 \times 25\text{ cm}^2$) gearbeitet. Sie besteht aus einer linear polarisierten Send-/Empfangsspule und einer zirkular polarisierten Empfangsspule. Erstere ermöglicht Senden und Empfang auf $63,6\text{ MHz}$ zur Akquirierung von ^1H -MR-Bildern sowie die Anregung der Phosphor-Kerne mit einer Frequenz von $25,7\text{ MHz}$. Das eigentliche Spektrum wird dann mit hohem S/N-Verhältnis von der zweiten Spule mit integriertem Vorverstärker aufgenommen. Dieses Spulen-System ist mit einem Hochpaß für die Protonen- und einem Tiefpaß für die Phosphor-Frequenz ausgestattet, um doppelresonante Experimente zur Entkopplung und Signalverstärkung zu ermöglichen (alle Spulen sind Produkte des Herstellers des Tomographen).

Die Ansteuerung des Tomographen erfolgt über eine SUN[©] SPARCTM-Workstation, auf der die Software NUMARIS/3 (**N**uclear **M**agnetic **R**esonance **I**maging **S**ystem) installiert ist. Als Pulssequenzen stehen nicht nur die ab Werk für den Klinikbetrieb mitgelieferten Standardsequenzen zur Verfügung, sondern es können auch noch zusätzlich eigene Sequenzen mit dem Programm PARGEN (**P**arameter **G**eneraor, ebenso wie NUMARIS vom Tomographen-Hersteller) erzeugt werden.

Der zweite HF-Kanal ist mit dem Hauptsystem bezüglich Frequenz und Timing der gesendeten Pulse synchronisiert und wird über zwei Steuerleitungen getriggert. Die Trigger-

Signale werden im Sequenz-Ablauf des PARGEN mitaufgeführt. Pulsform und -amplituden werden über einen Laptop, der mit dem Steuerrechner des zweiten Kanals verbunden ist, eingegeben. Die zusätzlich vom zweiten Sender applizierte HF-Leistung ist in die SAR-Überwachung (SAR = Spezifische Absorptions-Rate) des Tomographen integriert. Dabei werden, beruhend auf den jeweiligen Sequenz-Parametern eines Doppelresonanz-Experiments, minimale Repetitionszeiten vom Steuerrechner ermittelt, die nicht unterschritten werden dürfen.

7.2 ^1H -NMR-Spektroskopie

Protonen sind aufgrund ihres hohen gyromagnetischen Verhältnisses und ihrer natürlichen Häufigkeit das System mit der höchsten Sensitivität (s. Tab. 1.1). Neben der Aufnahme von ^1H -Spektren wird ihr Signal deshalb auch für mehrere Justierungs-Prozesse genutzt, die für ein hochaufgelöstes Spektrum notwendig sind.

Zunächst wird zu Beginn jedes Experiments die Protonen-Resonanzfrequenz präzise ermittelt, damit die Unterdrückung der unerwünschten Wasser- und Fettsignale möglichst vollständig erfolgen kann. Für Phosphor-Experimente wird außerdem aus der ^1H -Frequenz über das gyromagnetische Verhältnis ein erster Wert für die Resonanzfrequenz der Phosphor-Kerne bestimmt.

Zudem wird das Wassersignal benutzt, um die Flipwinkel zu kalibrieren und den Shim des Magnetfeldes durchzuführen. Letzteres wird durch manuelles Regeln der Spulenströme in den drei linearen Gradienten realisiert. Die Halbwertsbreite der Wasserresonanz dient dann als Maß für die Homogenität des Grundfeldes innerhalb des Meßvolumens. Im Muskel liegen aufgrund der Faserstruktur relativ starke Suszeptibilitätssprünge vor, die zu einer Linienverbreiterung führen (T_2^* kurz). Für hochaufgelöste Muskelspektren sind Werte von 16-20 Hz in einem Voxel von 8 ml erreichbar. In Messungen an Modell-Lösungen sind jedoch Werte von bis zu 3 Hz möglich. Für den Schicht-selektiven Shim ($250 \times 250 \times 30 \text{ mm}^3$) der Phosphor-Messungen beträgt die Linienbreite mindestens 30-40 Hz.

Die für die zur Plazierung des Meßvolumens notwendigen Basis-Bilder werden ebenfalls mit dem ^1H -Signal erzeugt, um eine hinreichend feine räumliche Auflösung bei gleichzeitiger schneller Akquisition zu ermöglichen. Auf Einzelheiten der Bildgebung soll hier nicht eingegangen werden.

7.2.1 Unterdrückung von Wasser- und Fett-Signalen

Das Signal der im Wasser enthaltenen Protonen liefert die mit Abstand (ca. Faktor 10^4) größte Resonanz in ^1H -NMR-Experimenten *in vivo* oder an Modell-Lösungen. Wie Abb. 7.1 zeigt, ist es daher unabdingbar, das Wasser-Signal zu unterdrücken und so durch Anpassung des dynamischen Empfangsbereichs eine hohe Auflösung der Metaboliten-Resonanzen zu erzielen. Andernfalls würde das Wasser-Signal den Empfänger für die schwachen Signale der Metaboliten insensitiv machen [Sch91].

Eine Unterdrückung des Wasser-Signals erfolgt durch schmalbandige, nicht-schichtselektive Gauß-Pulse, die gezielt im Bereich der chemischen Verschiebung von Wasser eingestrahlt werden. Dieser Anregungs-Modus wird als CHESS-Puls (**chemical shift selective**) bezeichnet. Der in dieser Arbeit verwendete Puls hat eine Länge von 25,6 ms mit einer Halbwertsbreite, die in der Frequenz-Domäne 0,41 ppm entspricht. Durch anschließende Applikation

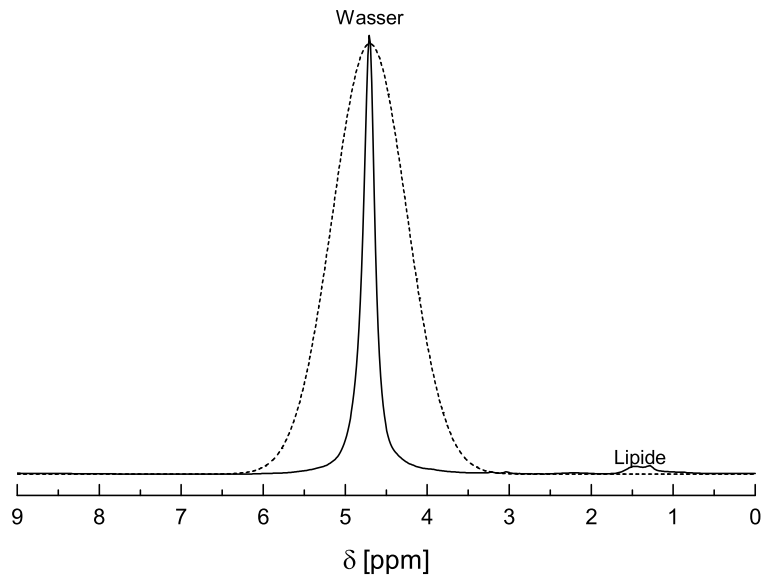


Abb. 7.1: Lokalisiertes *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektrum von der Wade eines Probanden ohne Anwendung einer Wassersignal-Unterdrückung. Die Intensität der H_2O -Protonen verhindert eine hohe Auflösung anderer Resonanzen. Der Verlauf des CHES-Pulses mit 25,6 ms Länge und einer Halbwertsbreite von 0,41 ppm ist gestrichelt dargestellt (STEAM mit $TR = 2\text{ s}$, $TE = 10\text{ ms}$, $NEX = 10$, $\text{VOI} = (2\text{ cm})^3$).

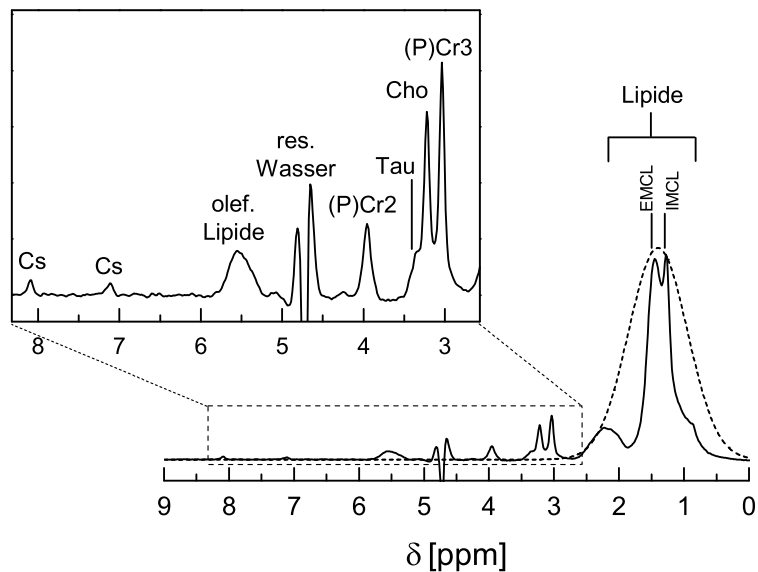


Abb. 7.2: Lokalisiertes *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektrum von der Wade eines Probanden nach Anwendung eines CHES-Pulses bei 4,7 ppm und der Software-Wassersignal-Unterdrückung. Die Signale der meisten Metaboliten sind noch sehr schwach und nur in einer Vergrößerung zu erkennen. Zu weiteren Steigerung der Auflösung kann auch noch ein CHES-Puls bei 1,4 ppm eingestrahlt werden, um die dominanten Lipid-Signale zu verringern (STEAM mit $TR = 2\text{ s}$, $TE = 10\text{ ms}$, $NEX = 256$, $\text{VOI} = (2\text{ cm})^3$).

von Spoiler-Gradienten wird die fast vollständig in transversale Komponenten transferierte Magnetisierung dephasiert und somit vor der eigentlichen Anregung mit Ortskodierung eine deutlich verringerte Ausgangs-Magnetisierung erzeugt.

Vor der Aufnahme eines Spektrums muß der Puls in Bezug auf seine Amplitude und Trägerfrequenz dahingehend optimiert werden, daß on-resonant möglichst genau ein Flipwinkel von 90° erreicht wird. Das Eingangssignal am ADC sinkt dann bei voller Verstärkung von 112,47 dB auf ca. 0,1 V ab. Für $TR < 5T_1$ muß sich im Spinsystem erst ein vom thermischen Gleichgewicht abweichender Zustand einstellen, um gleiche Ausgangsvoraussetzungen vor jeder neuen Anregung vorliegen zu haben. Dies wird durch Verwerfen der ersten vier sog. Pre-Scans realisiert. Zusätzlich zu dieser durch HF-Einstrahlung bewirkten Wasser-Signal-Unterdrückung besteht auch noch die Möglichkeit, das im Spektrum auftretende residuale Signal der Wasser-Protonen durch eine mathematische Operation weiter zu reduzieren. Dabei wird in der Zeitdomäne das aufgenommene FID-Signal punktweise durch einen FID eines Wasser-Phantoms geteilt. Dies eliminiert nach der Fourier-Transformation die entsprechende Frequenzkomponente bei 4,7 ppm.

Nach Unterdrückung des Wasser-Signals treten bei Untersuchungen der Skelett-Muskulatur starke Resonanzen der CH_2 - und CH_3 -Gruppen der Lipide zwischen 0,9 ppm und 2,7 ppm auf. Nur eine Vergrößerung der vertikalen Auflösung im Spektralbereich mit $\delta > 2,5$ ppm, wie in Abb. 7.2, läßt die Signale anderer Metaboliten erkennen. Da die aromatischen Signale des hier untersuchten Metaboliten Carnosin besonders schwach sind, ist eine zusätzliche Anpassung des Meßbereichs wünschenswert. Die beiden dominanten Signale der intra- und extramyozellulären Lipide (IMCL bzw. EMCL) können durch einen zweiten CHESS-Puls oben genannter Breite reduziert werden, wenn dieser bei 1,4 ppm eingestrahlt wird. Die Signale der olefinischen Fett-Protonen bei ca. 5,5 ppm (molekulare Gruppe $-\text{CH}=\text{CH}-$) sind wesentlich kleiner und werden schon teilweise durch den CHESS-Puls bei 4,7 ppm gesättigt, so daß eine Unterdrückung dieses spektralen Bereichs nicht notwendig ist.

7.2.2 PRESS und STEAM

Für Spin-Systeme aus Protonen sind die T_2 -Relaxationsprozesse hinreichend langsam, um die Ortskodierung des akquirierten Signals durch das Hintereinanderschalten von drei schichtselektiven HF-Pulsen zu realisieren. Der FID des sich formierenden Echos stammt dann nur aus dem quaderförmigen Schnitt-Volumen dieser drei Schichten.

Die selektive Anregung von Spins in Schichtebenen geschieht durch Einstrahlung eines HF-Pulses definierter spektraler Breite bei gleichzeitiger Schaltung eines Gradientenfeldes G entlang einer der Koordinatenachsen (z. B. z). Durch dessen Überlagerung mit dem Grundfeld wird die Resonanzfrequenz

$$\omega(z) = \gamma(B_0 + zG_z)(1 - \delta)$$

abhängig von der Ortskoordinate z . Das Frequenz-Band

$$\omega \in \left[\omega_0 - \gamma G_z \frac{d}{2}, \omega_0 + \gamma G_z \frac{d}{2} \right]$$

des HF-Pulses mit der Trägerfrequenz ω_0 regt dann nur die Spins in einer Schicht der Dicke d um z_0 an. Dabei kann der Einfluß $(1 - \delta)$ der chemischen Verschiebung auf die Schichtdicke, also $\Delta\omega$, ohne weiteres vernachlässigt werden. Die Schichtposition z_0 hängt dagegen wegen

$$z_0 \approx \frac{B_0}{G_z} \delta$$

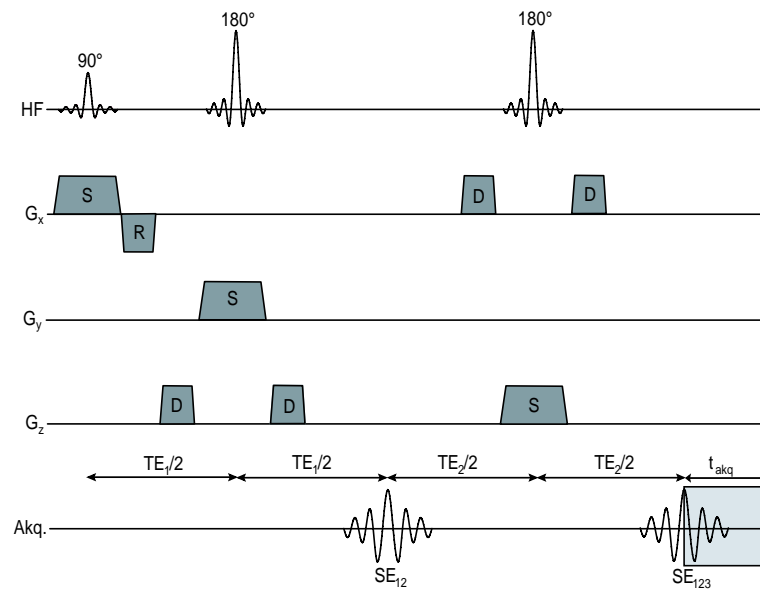


Abb. 7.3: Aufbau einer PRESS-Sequenz. Den Schichtselektionsgradienten (S) ist eine Refokussierung (R) angeschlossen. Parasitäre Signale werden durch Defokussierungsgradienten (D) zerstört.

linear von δ ab, und die chemische Verschiebung bewirkt somit eine Anregung in einer leicht versetzten Schicht (relativ zur Schicht-Position für die Wasser-Moleküle, deren Resonanz als Träger-Frequenz benutzt wird). Für die in der ^1H -NMR-Spektroskopie bei 1,5 T auftretenden kleinen chemischen Verschiebungen sind die resultierenden Fehler verhältnismäßig klein. Spektroskopie an ^{31}P - oder ^{13}C -Kernen oder mit starken Grundfeldern ist dagegen mit sogenannten Chemical-shift-Artefakten behaftet.

Die Form der Schicht im Ortsraum ergibt sich aus dem Puls-Verlauf $B_1(\omega)$ in der Frequenz-Domäne, also der Fourier-Transformierten von $B_1(t)$. Die Pulslänge t_P geht somit invers in die Bandbreite $\Delta\omega$ ein. Rechteckige Schichten werden mit einem sinc-förmigen Puls erzeugt, wobei es wegen der endlichen Pulsdauer zu Abschneideartefakten und damit zu Abweichungen vom idealen Schichtprofil kommt. Die innerhalb der Schicht aufgrund der Ortsabhängigkeit $\omega(z)$ auftretende Dephasierung der Spins muß nach Einstrahlung des Pulses durch einen Refokussierungsgradienten umgekehrter Orientierung wieder kompensiert werden.

Prinzipiell stehen für die Echo-Formation nach Applikation von drei Pulsen zwei Methoden zur Verfügung. Beide beginnen mit einer Präparation durch einen 90° -Puls. Die Rückgewinnung eines Echos mit zwei weiteren Pulsen geschieht dann entweder mit einer Doppel-Spinoecho-Sequenz oder einem stimulierten Echo.

Die erste Methode wird als PRESS (**P**oint **R**esolved **S**pectroscopy) bezeichnet [Bot84]. Die Pulssequenz hat dann das in Abb. 7.3 gekennzeichnete Schema. Unerwünschte ("parasitäre") Signale wie etwa das erste Echo werden durch zusätzliche Dephasierungsgradienten vor der Akquisition zerstört. Dieser Sequenz-Typ eignet sich zur Untersuchung der in Kap. 5.3 beschriebenen Phasen-Modulation gekoppelter Systeme. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß wegen des zweimaligen Auftretens von T_2 -Prozessen diese Technik prinzipiell mit höheren Echo-Zeiten arbeiten muß und daher für schnell relaxierende Metaboliten nicht optimal ist.

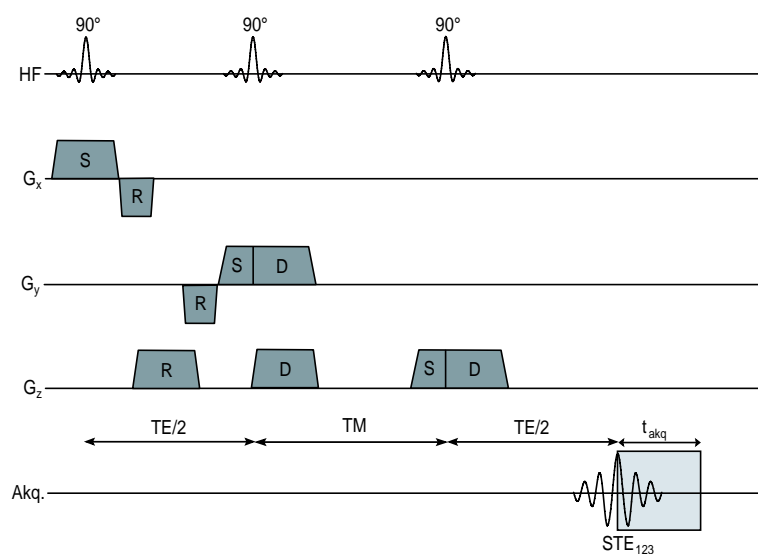


Abb. 7.4: Aufbau einer STEAM-Sequenz

Dieses Problem wird mit dem stimulierten Echo, das in der STEAM-Sequenz (**S**timulated **E**cho **A**kquisition **M**ode) Anwendung findet, umgangen [Fra87]. Sie ist in Abb. 7.4 dargestellt. Durch den zweiten 90° -Puls wird die T_2 -Relaxation zwischenzeitlich quasi eingefroren. Das stimulierte Echo nach dem letzten Puls formiert sich nicht allein in der Transversalebene, sondern die Spitzen der Magnetisierungsvektoren bilden die Kappe eines Kegels, dessen Zentralachse eine der Transversalachsen (x' oder y') des rotierenden Koordinatensystems ist. Damit liegt ein Teil der Magnetisierung zwar als Longitudinalkomponente vor (deren Summe 0 ist), aber dennoch ist das Signal für schnell relaxierende Metaboliten höher als mit PRESS.

Für die in dieser Arbeit aufgenommenen lokalisierten ^1H -NMR-Spektren wurde (soweit nicht anders angegeben) mit einem Anregungs-Volumen von $(2\text{ cm})^3$ gearbeitet. Der Positionierung des Voxels ging eine MR-Bildgebung mit einer Standard-FLASH-Sequenz des Herstellers voraus. Die einzelnen Akquisitionen ($NEX = 256$ mindestens) wurden mit einer Repetitionszeit von $TR = 2\text{ s}$ aufgenommen, wobei die minimale Echozeit bei der STEAM-Sequenz 10 ms (sowie 10 ms Delay-Zeit) und bei der PRESS-Sequenz 36 ms betrug. Bei beiden Sequenzen war standardmäßig vom Hersteller ein 25,6 ms-Gauss-Puls bei 4,7 ppm zur Wasser-Unterdrückung implementiert. Die STEAM-Sequenz zur hochauflösten Muskel-spektroskopie wurde zusätzlich mit der oben erwähnten Fett-Unterdrückung ausgestattet.

7.3 ^{31}P -NMR-Spektroskopie

Die bei der Protonen-Spektroskopie verwendeten Lokalisationstechniken können für ^{31}P -Experimente nicht zum Einsatz kommen, weil die mit einem primären Anregungspuls erzeugte Transversalmagnetisierung so schnell zerfällt, daß sie mit zwei weiteren schichtselektiven Pulsen nur sehr rudimentär zurückgewonnen werden kann. Es finden daher aus der MR-Bildgebung bekannte Kodierungsprozesse Anwendung, auf die nun kurz eingegangen werden soll.

7.3.1 CSI

Die für die ³¹P-NMR-Spektroskopie geeignete Methode zur Aufnahme orts aufgelöster Spektren ist das sogenannte Chemical Shift Imaging (CSI). Dabei werden statt der normalerweise in der Bildgebung benutzten Kombination aus Phasen- und Frequenzkodierung zur zeilenweisen Abtastung des k -Raums zwei Phasenkodierungen benutzt, um die intrinsische Frequenz-Information des Spektrums nicht zu zerstören. Durch den Wegfall der Frequenzkodierung während der Auslese ist nur noch eine punktweise Abtastung des k -Raums möglich.

Die hier benutzte CSI-Sequenz ist in Abb. 7.5 dargestellt und basiert auf einer einfachen FID-Sequenz, bei der nach schichtselektiver (in z -Richtung) Anregung (Flip-Winkel α) zwei Phasenkodier-Gradienten G_x und G_y stufenweise in x - bzw. y -Richtung geschaltet werden. Das so ortskodierte ³¹P-FID-Signal wird im Anschluß daran während t_{akq} ausgelesen und enthält die spektrale Information: Für die transversale Magnetisierung in der angeregten Schicht läßt sich das zeitliche Verhalten allgemein mit

$$M_{\perp}(t) = \iint_{\text{Schicht}} m(x, y) \cdot \exp\left(i \int \omega(x, y, t) dt\right) dx dy \quad (7.1)$$

beschreiben. Dabei ist $m(x, y)$ die lokale Magnetisierungsdichte, die in der Bildgebung nach 2-dimensionaler Rücktransformation das Bild ergibt. Die Phasenverschiebung

$$\phi(x, y) = \omega(x, y)t = \gamma B_{\text{loc}}t$$

im Exponenten von 7.1 ergibt sich aus dem während der Zeit t am Kernort herrschenden Feld B_{loc} und enthält die Ortsinformation des hochfrequenten Auslese-Signals. Aus diesem läßt sich dann wie üblich durch Mischung mit dem hochfrequenten Anregungssignal der FID zur Transformation in die Frequenz-Domäne gewinnen.

Bei der CSI-Technik tritt als nicht zu vernachlässigendes Problem das sogenannte Voxel-Bleeding auf, das in diesem Zusammenhang einerseits auf die starken chemischen Verschiebungen von ³¹P, andererseits aber vor allem auf die Abschneideartefakte bei der Transformation des diskretisierten k -Raums zurückzuführen ist. Um diesen Effekt zu vermindern, wird vor der 2D-FT durch die Software des Tomographen ein Hanning-Filter über die Matrix gelegt. Seine Stärke in % gibt an, ab welchem Bereich von der Matrixmitte aus gerechnet die Dämpfung durch den Filter einsetzt (bei 50% sind also die beiden äußeren Viertel des k -Raums betroffen).

7.3.2 ³¹P-¹H}-Spin-Entkopplung und Cross-Polarisation

Die spektrale Qualität kann mit Hilfe eines Doppelresonanz-Experiments hinsichtlich zweier Punkte verbessert werden:

- eine Entkopplung der wechselwirkenden Kerne ¹H-³¹P führt zu einem Kollaps bestimmter Phosphor-Multipletts zu Singulett; dies ist vor allem bei den Resonanzen der Phosphomono- und -diester effektiv.
- ein Übertrag der Polarisation der Protonen auf die insensitiveren ³¹P-Kerne mittels des Kern-Overhauser-Effekts (engl. NOE) führt zu einer Signalverstärkung von ca. 20%.

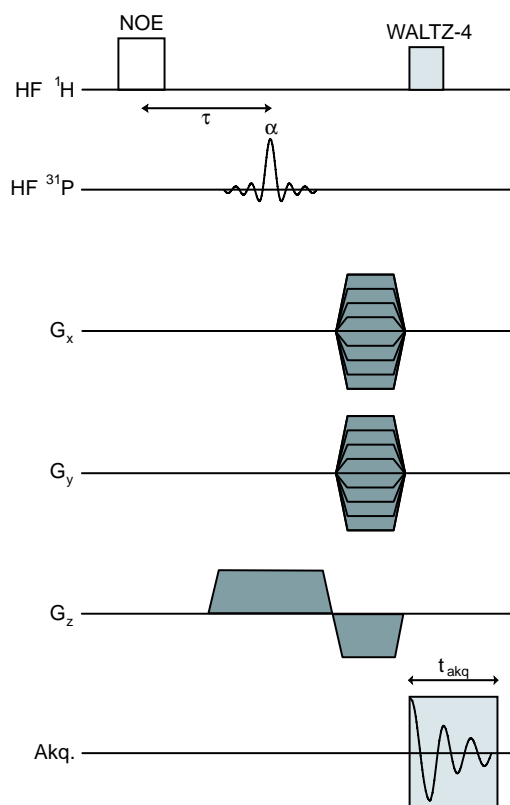


Abb. 7.5: Aufbau der benutzten ^{31}P -CSI-Sequenz mit Cross-Polarisation und Spin-Entkopplung

Die Entkopplung skalar gekoppelter Spins wird durch eine Sättigung des Protonen-Systems während der Auslese des ^{31}P -Signals ermöglicht. Die Netto-Protonenmagnetisierung ist somit 0 und kann zu keiner Aufspaltung der Phosphor-Signale mehr führen. Hierfür wird zu Beginn der Auslese ein WALTZ-4-Zyklus von 50 ms (aus Gründen des SAR-Limits wurde nur eine kurze Entkopplung benutzt) mit einer Amplitude von 100 V auf dem ^1H -Kanal eingestrahlt. Der Zyklus besteht aus Pulsen von 2 ms Dauer und einem Abstand von 0,5 ms. Eine einmalige Anregung des Protonen-Systems mit einem Puls auf der zuvor genau ermittelten Wasser-Resonanzfrequenz vor Anregung der Phosphor-Kerne ermöglicht die Cross-polarisation $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$. Hierfür wird ein rechteckförmiger Puls ($U = 100 \text{ V}$, $t = 2 \text{ ms}$) eingestrahlt, der einem effektiven 90° -Puls entspricht, um das Protonen-System aus dem thermischen Gleichgewicht zu bringen. Die so erzeugte Polarisation kann sich während der Evolutionszeit $\tau = 7,8 \text{ ms}$ auf ^{31}P -Kerne in Molekülen übertragen, an denen sich eine Hydrat-Hülle befindet. Da die Phosphoryl-Gruppen in PCr und ATP sowie das anorganische Phosphat alle ladungsbehaftet sind, bildet sich hier leicht eine Wasserstoffbrückenbindung mit umgebenden H_2O -Molekülen aus.

7.4 Nachbearbeitung der Daten

Die Nachbearbeitung der Daten wurde mit der am Tomographen implementierten Software Luise durchgeführt. Bei der Protonen-Spektroskopie wurden ein Zero-Filling von 1032 auf 4096 komplexe Datenpunkte durchgeführt. Dies entspricht einer Auflösung von

0,004 ppm bzw. 0,25 Hz. Für die Phantom-Messungen wurde auf diese Prozedur verzichtet. Der Fouriertransformation (FFT) ging eine Gauss-förmige Filterung (Zeitkonstante: 200 ms, zentriert bei $t = 0$ des FID, soweit nicht anders angegeben) zur Glättung des Spektrums voraus. Daran schlossen sich Phasen- und Baseline-Korrektur (mittels eines Splines) an. Falls notwendig, wurde vor Beginn der Anpassung mit Gauss-förmigen Resonanzen noch eine Korrektur der Frequenzverschiebung mit der Methyl-Resonanz von PCr bei 3,03 ppm als Referenz vorgenommen.

Die Datensätze der Phosphor-Spektroskopie wurden zunächst ohne Zero-Filling, aber mit einem k -Raum-Filter von 50% fouriertransformiert, um die orts aufgelösten 8×8 FID-Signale zu erhalten. Die spektrale Qualität nach Zero-Filling von 1024 auf 2048 Datenpunkte in der Zeitdomäne (Auflösung: 0,076 ppm bzw. 2 Hz) war hinreichend groß, um auf einen Glättungs-Filter verzichten zu können. Nach Phasen- und Baseline-Korrektur konnten somit Lorentz-förmige Resonanzkurven in der Frequenz-Domäne angepaßt werden. Zur besseren Darstellung wurden alle nachverarbeiteten Datensätze exportiert und mit Origin[®] 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) dargestellt.

7.5 Simulation mit WinDNMR-Pro

Simulierte NMR-Spektren zum Vergleich mit gemessenen Daten wurden mit dem frei zugänglichen Shareware-Programm WinDNMR-Pro von Hans J. Reich [Rei01] generiert. Das Programm wird vom Journal of Chemical Education veröffentlicht und ermöglicht neben der Simulation von Spektren zweiter Ordnung multipler Spin-Systeme (AB, AB₂,

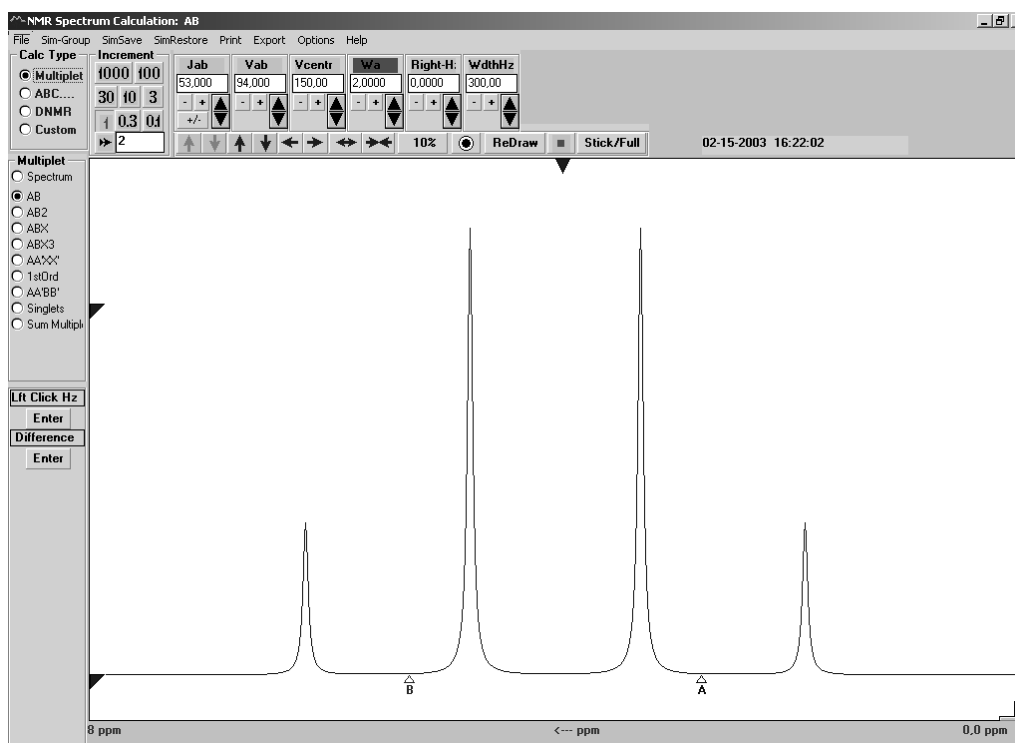


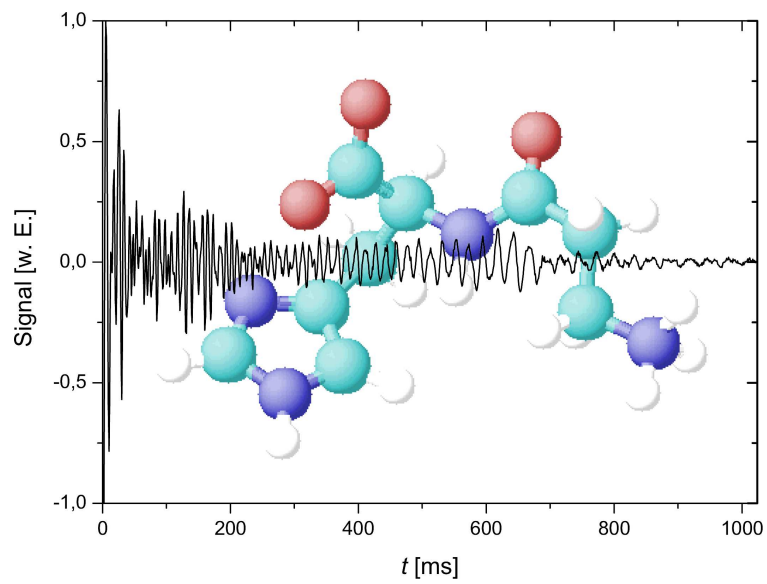
Abb. 7.6: Benutzeroberfläche des Simulationsprogramms WinDNMR-Pro. Die Parameter wie Linienposition und -breite sowie Kopplungskonstanten und die angezeigte spektrale Breite sind frei wählbar.

ABX, ABX₃, AA'BB', AA'XX' sowie bis zu 15 Singulets bzw. 10 Multipletts) auch die Erzeugung dynamischer NMR-Spektren (Spin-Austausch etc.).

Die resultierenden Spektren spiegeln die Ergebnisse von Experimenten an einem 300 MHz-Spektrometer wider. Alle wesentlichen Parameter können über eine graphische Benutzeroberfläche unter Windows[®] eingestellt werden (s. Abb. 7.6). Linienintensitäten können über frei wählbare Integrationsbereiche (auch unter Einbeziehung von Rauschen) berechnet werden.

Teil III

Experimentelle Ergebnisse



I am sure we have only begun to explore the domain of very weak interactions — the "audio spectrum" of molecules, if I may call it that.

Edward M. Purcell, Nobel-Vortrag 1952

Kapitel 8

Untersuchung skalarer Kopplungen *in vitro*

Wie bereits in den theoretischen Grundlagen angesprochen, können in Modell-Lösungen nur skalare Kopplungen beobachtet werden. So besteht zumindest für die Substanzen Cit, Tau und insbesondere ATP die Möglichkeit, Abweichungen vom Paschen-Back-Effekt zu studieren, wie sie auch im lebenden Gewebe auftreten. Wegen der vielen Parallelen zur dipolaren Kopplung können Experimente an diesen skalar gekoppelten Systemen aber auch für Vorhersagen über die dipolaren Wechselwirkungen von (P)Cr und Cs herangezogen werden.

8.1 Die AB-Systeme Citrat und Taurin

Zunächst sollen die stark gekoppelten Spin-Systeme der Metaboliten Cit und Taurin untersucht werden. Da *in vivo* keine dipolaren AB-Systeme existieren, sind dies die einzigen starken Wechselwirkungen, die am Ganzkörpertomographen studiert werden können. Ihre spektralen Parameter für 1,5 T sind in Tab. 8.1 zusammengestellt. Sie illustrieren eindrucksvoll die Konsequenzen einer starken Superposition der Eigenzustände.

Die Kopplung zwischen den zwei Protonen jeweils einer der beiden CH₂-Gruppen des Cits und die damit verbundenen Signal-Modulationen für verschiedene *TE* bei lokalisierten Spektroskopien sind ausführlich untersucht worden [Sch93, Mul93, Str95, Wil95]. Eine detaillierte Beschreibung des Intensitätsverhältnisses der inneren zu den äußeren Resonanzen dieses (AB)₂-Systems liegt jedoch nicht vor. Daher wurde der stark ausgeprägte Dach-Effekt an einer 50 mM Cit-Lösung beobachtet und mit simulierten Spektren eines AB-Systems verglichen. Die Parameter wurden dabei aus einer bei 1,5 T durchgeführten Studie entnommen: $\Delta\omega = 0,12$ ppm und $J = 15,1$ Hz [Sch93].

Hieraus ergibt sich nach Gl. (2.4) ein Störungsparameter von 1,978 (bzw. $\alpha = -31,6^\circ$). Die mit (2.20) und (2.21) berechneten Intensitäten stehen dann im Verhältnis 1,89:0,11.

Tab. 8.1: Eigenschaften der untersuchten stark gekoppelten Systeme. Für Tau wurde näherungsweise magnetische Äquivalenz der Kerne angenommen.

Metabolit	System	J_{AB} [Hz]	$\Delta\omega$ [Hz]	α [°]
Cit	(AB) ₂	15,1	7,6	-31,6
Tau	A ₂ B ₂	6,6	10,8	-15,7

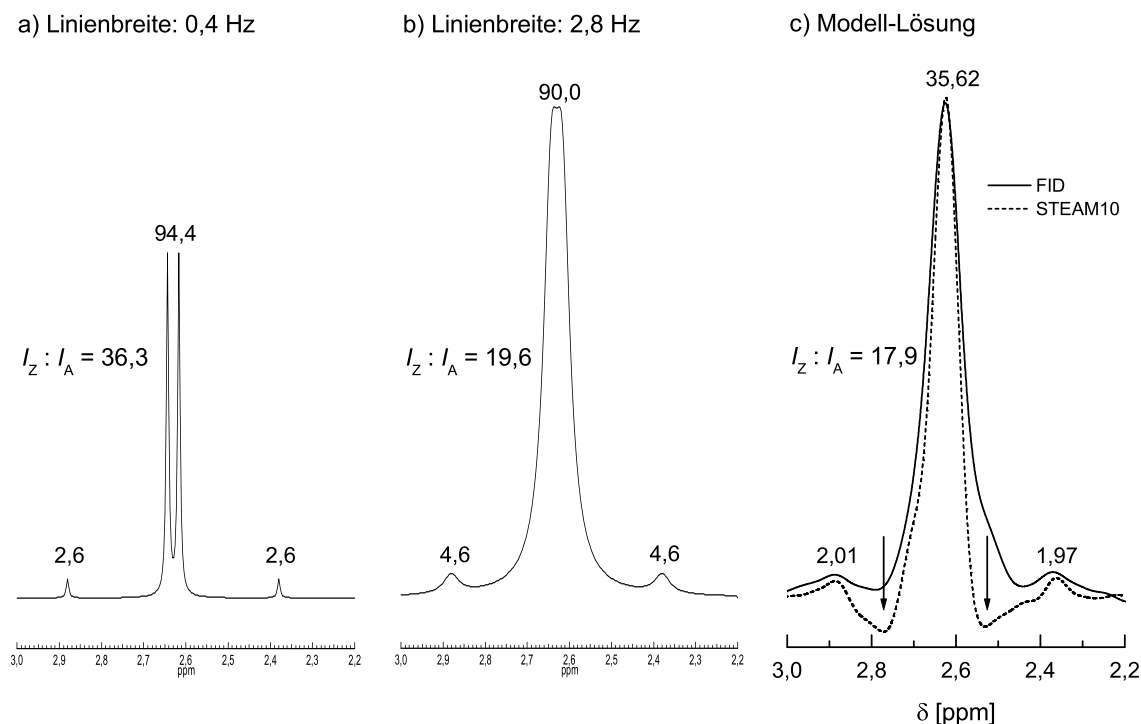


Abb. 8.1: Simulation eines ^1H -NMR-Spektrums von Cit bei 1,5 T für verschiedene Linienbreiten (a und b) und experimentelle Ergebnisse (c) unterschiedlicher Aufnahme-techniken an einer 50 mM Modell-Lösung. Die Intensitäten der beiden äußeren Resonanzen sowie die Summe des zentralen Dubletts (bestimmt durch Integration eines Kurvenabschnitts) sind angegeben (in willkürlichen Einheiten). Die Linienbreite kann wegen der Diskretisierung der Daten das Integralergebnis beeinflussen. Bei den experimentellen Daten wird die störende Phasenmodulation eines STEAM-lokalisierten Spektrums bereits für $TE = 10$ ms deutlich.

Da bei 1,5 T die beiden zentralen Resonanzen für kurze Echozeiten nicht getrennt voneinander aufgelöst werden können (für lange TE spielt die Phasenmodulation eine Rolle), betrachten wir sie als ein Signal. Somit steht diese zentrale Resonanz zu jeder der beiden äußeren theoretisch im Verhältnis $I_Z : I_A = 34,36 : 1$. Die Integration über die Peaks simulierter hoch aufgelöster Spektren (4 getrennte Signale) ergibt einen Wert von $I_{Z/A} = 36,3$ (s. Abb. 8.1). Wird die Linienbreite von 0,4 auf 2,8 Hz erhöht, so können die beiden intensiveren Resonanzen nicht mehr getrennt aufgelöst werden. Die reale Linienbreite liegt mindestens bei 3 Hz, so daß das in Abb. 8.1(b) gezeigte Spektrum eher den experimentellen Bedingungen entspricht. Die Verbreiterung der Linien zusammen mit den Folgen der Diskretisierung bewirkt eine Verminderung des Verhältnisses auf 19,6. Die Analyse eines Fourier-transformierten FID, der 500 ms ausgelesen wurde und auf den in der Nachbearbeitung ein Gauß-Filter angewendet wurde, liefert einen Wert von 17,9 (Abb. 8.1(c)): Dies bestätigt damit den erwarteten Dach-Effekt im Rahmen der erreichbaren Genauigkeit (der Filter ist nötig, da die schwachen äußeren Cit-Resonanzen ohne Wasser-Unterdrückung sonst nicht stark genug vom Rauschen getrennt sind).

Die starke Kopplung des Systems bewirkt bei Transversalmagnetisierungen eine rasche Phasenmodulation, die sich bei der Anwendung von Lokalisationstechniken durch eine Veränderung des Spektrums zwischen der Zentralresonanz und den beiden Satelliten bemerkbar macht. In Abb. 8.1(c) ist vergleichend zum FID-Experiment das Ergebnis einer

STEAM-Messung mit $TE = 10$ ms gezeigt. Die während TE akkumulierte Phase führt bereits bei kurzen Echozeiten zu einer beginnenden Teil-Inversion des Spektrums. Dadurch ist eine einfache Integralbestimmung nicht mehr möglich, weil die Einbeziehung der Phase bei einer Linienanpassung mit der Software Luise nicht automatisch erfolgt. Dies verdeutlicht, daß der Dach-Effekt stark gekoppelter Systeme sehr sensitiv auf die angewendete Meßtechnik ist. Bei Cit erfolgt daher die genaue Untersuchung der quantenmechanischen Effekte am besten mit einer FID-Sequenz. Die Homogenität der Kopfspule reicht dabei aus, um eine ausreichende spektrale Auflösung zu bekommen (Shim: 7 Hz; keine CHESS-Wassersignal-Unterdrückung).

Das ^1H -NMR-Spektrum von Tau ist bei 1,5 T noch schwieriger zu analysieren. Die Signale der beiden Methylengruppen liegen bei 3,42 ppm bzw. 3,25 ppm. Bei einer präzisen Beschreibung handelt es sich um ein AA'BB'-System mit 4 Kopplungskonstanten. Nimmt man vereinfachend an, daß es sich um jeweils 2 magnetisch äquivalente Protonen handelt, so läßt sich das Spektrum mit den irreduziblen Komponenten eines A_2B_2 -Systems (s. Theorie) erklären. Dies ist möglich, da sich die Kopplungskonstanten nur wenig unterscheiden; ihr gemittelter Wert beträgt 6,6 Hz. Ohne die Kombinations-Übergänge sind also 16 Resonanzen zu erwarten. Ihre Positionen ändern sich bei Simulation des Spektrums mit WinDNMRPro unter Berücksichtigung von $\Delta\omega = 0,17$ ppm und aller 4 Kopplungskonstanten nur unwesentlich (s. Abb. 8.2).

Die Simulation mit realistischen Linienbreiten ergab eine Überlagerung zu insgesamt noch 8 auflösbaren Signalen. Dies wurde im Experiment bestätigt und unterstreicht damit unabhängig vom Dach-Effekt die Abweichungen vom Paschen-Back-Effekt.

Die gemittelte Kopplungskonstante ist weniger als halb so groß wie die des Cit-Systems. Damit verläuft die Phasenmodulation auch deutlich langsamer, und eine Lokalisation mit STEAM bei kurzen Echozeiten ist möglich. Die Veränderungen im Spektrum sollten im Vergleich zum FID-Experiment vertretbar klein sein. Letzteres ist nämlich aus folgendem Grund ungeeignet zur Untersuchung des Tau-Spektrums:

Mit 6,6 Hz ist die Kopplungskonstante relativ klein und die einzelnen Resonanzen liegen sehr dicht im Spektrum. Es ist daher eine hohe Auflösung erforderlich, die nur mit dem besseren Shim eines Single-Voxel-Experiments erzielt werden kann (ca. Faktor 2 besser als

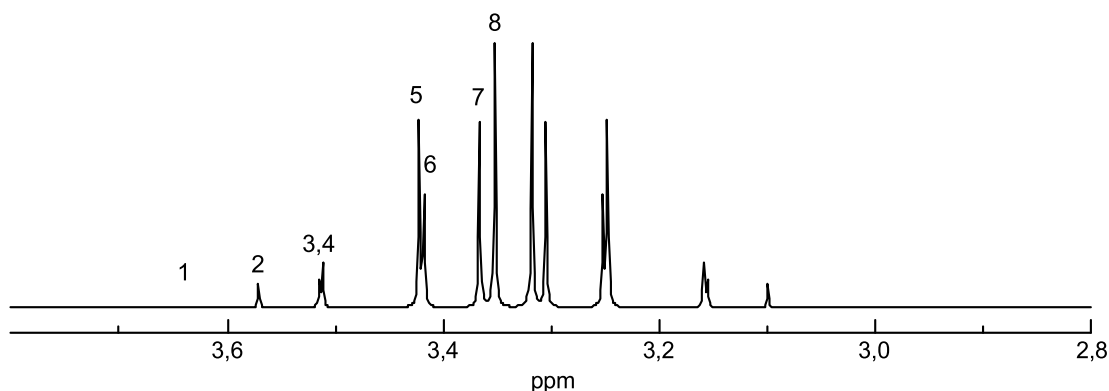


Abb. 8.2: Simulation eines hochauflösten ^1H -NMR-Spektrums von Tau bei exakter Beschreibung als AA'BB'-System (spezifische Daten aus [Gov00]). Bei einer theoretischen Linienbreite von 0,1 Hz treten bei 1,5 T 16 Resonanzen auf. Die beiden äußersten sind dabei so schwach, daß sie in dieser Darstellung nicht sichtbar sind.

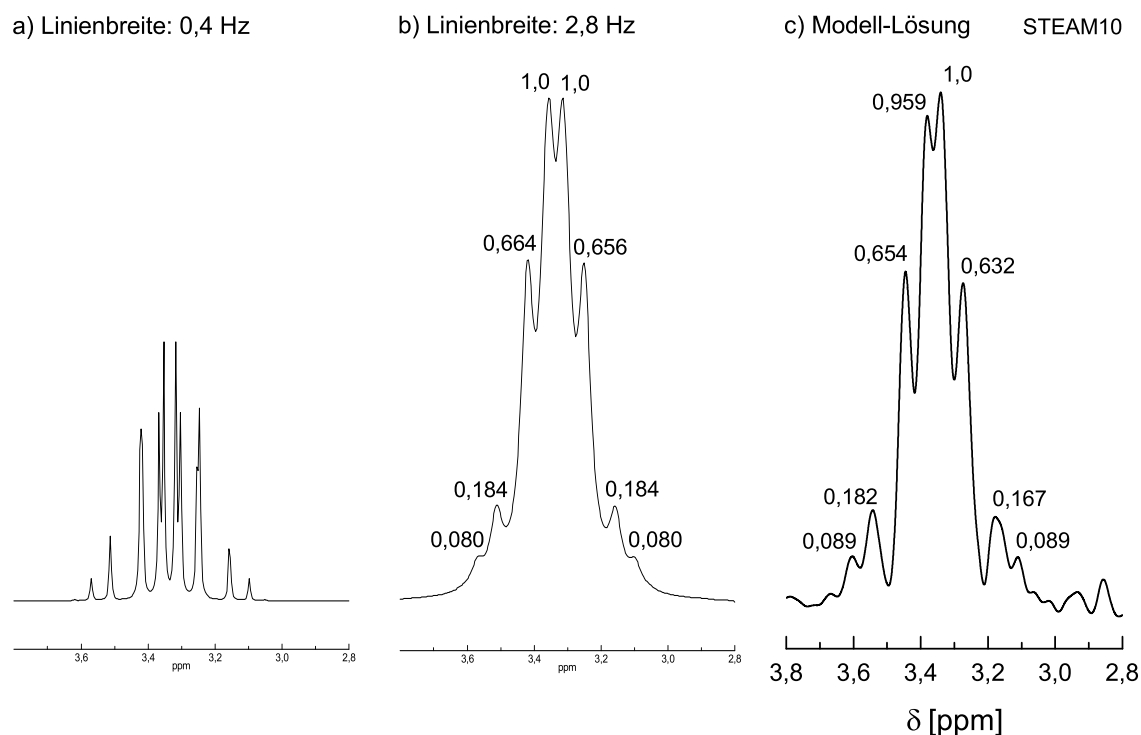


Abb. 8.3: Vergleich von simuliertem (a,b) und gemessenem ^1H -NMR-Spektrum (c) von Tau bei 63,63 MHz. Bei realistischen Linienbreiten sind nur noch 8 Resonanzen zu erwarten (b). Der Einfluß der Phasenmodulation einer STEAM-Lokalisation mit $TE = 10$ ms im Spektrum einer 50 mM Modell-Lösung ist deutlich weniger ausgeprägt als bei Cit.

beim FID). In Abb. 8.3(c) ist daher nur ein STEAM-Spektrum mit $TE = 10$ ms gezeigt. Eine Integralbestimmung im Spektrum war aufgrund der starken Überlagerung der Resonanzen nicht sinnvoll durchzuführen. Daher wurden die Amplituden der einzelnen Signale ausgewertet, um den Vergleich zwischen Simulation und Experiment zu ermöglichen. Die Werte wurden dabei immer auf die stärkste Resonanz normiert. Die Gegenüberstellung zeigt, daß die spektrale Trennung der äußeren Satelliten im gemessenen Spektrum deutlicher ist. Dies liegt daran, daß wie beim AB-System die Phasenmodulation der inneren Signale am langsamsten erfolgt. Die Konsequenzen der STEAM-Lokalisation werden daher bei den äußeren Signalen deutlich.

Der Störungsparameter ist in der 1. Näherung (nur die gemittelte Kopplungskonstante wird berücksichtigt) mit 0,61 im Vergleich zu dem des Cits sogar relativ klein ($\alpha = -15,7^\circ$), aber die Konsequenzen für Multipletts mit mehr als zwei Linien sind also wesentlich dramatischer, weil z. B. zwischen den ursprünglich 8 Produktzuständen eines A_2X -Systems durch die Mischung bei zunehmend starker Kopplung die Entartung einiger Übergänge aufgehoben wird.

Die Simulation macht klar, daß bei den Linienbreiten, die im Muskelgewebe *in vivo* erreichbar sind, aufgrund des Dach-Effekts bei 1,5 T nicht zwei, sondern nur eine Tau-Resonanz bei ca. 3,34 ppm detektiert werden kann; bei zusätzlicher dipolarer Aufspaltung von ca. 9 Hz (s. KAp 9) also dann zwei Signale.

Bei beiden Systemen wird deutlich, daß die rein theoretische Behandlung mit den sich aus Fermis Goldener Regel ergebenden Linienintensitäten nicht zu Beurteilung der expe-

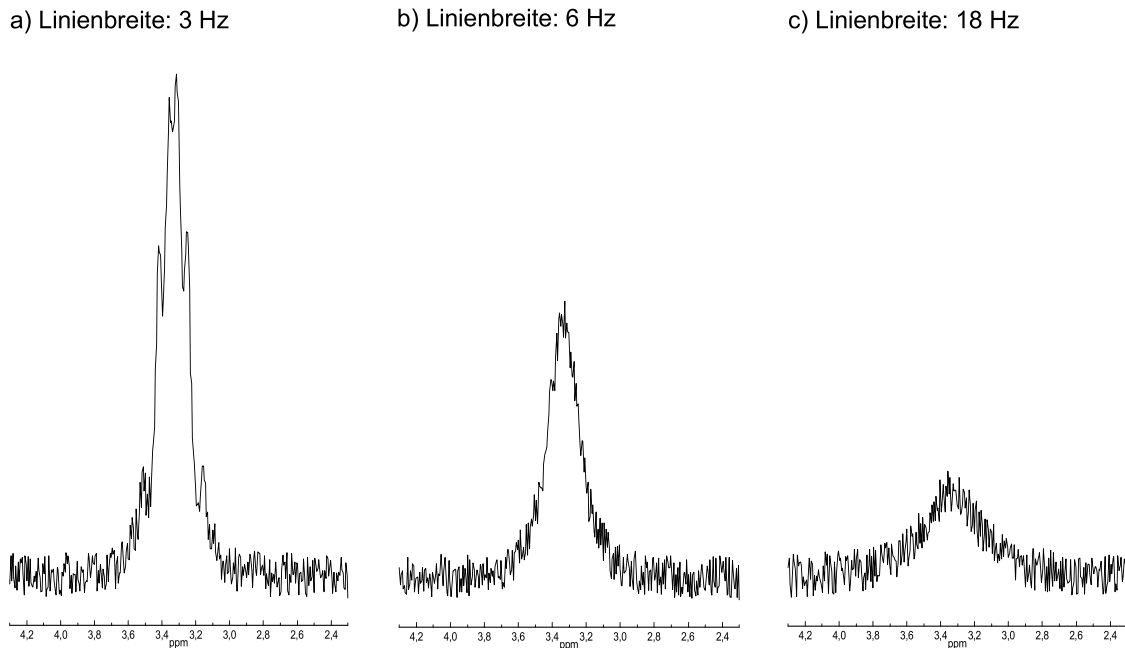


Abb. 8.4: Simulierte ^1H -NMR-Spektren von Tau bei 63,63 MHz mit verschiedenen Linienbreiten und 2% Rauschen (das Integral unter der Linie wurde dabei konstant gehalten). Bereits ab 6 Hz läßt sich die Unterstruktur der Linie nicht mehr erkennen.

rimentellen Daten herangezogen werden kann. Für die Spektren ist die Berücksichtigung der realen Linienbreiten von entscheidender Bedeutung. Ansonsten würde für Cit der gemessene Dach-Effekt eine zu kleine Mischung der Zustände ergeben, und bei Tau wäre ohne das Vorwissen über die Überlagerung einiger der 16 möglichen Signale ein Vergleich mit der Theorie gar nicht möglich.

8.2 Das AMX-System ATP

Die drei ^{31}P -Kerne des ATP stellen ein schwach gekoppeltes System dar, bei dem die Resonanz β -ATP einen kumulierten Dach-Effekt aufgrund der sukzessiven Aufspaltung der ursprünglichen Resonanz zeigt. Interessant an diesem System ist, daß sich die chemischen Verschiebungen der γ - und β -Resonanz mit Hilfe des pH-Wertes und der Konzentration von Mg^{2+} in Modell-Lösungen beeinflussen lassen. Dadurch können eventuelle Veränderungen des Dach-Effekts bei kleinen Variationen des Störungsparameters untersucht werden.

8.2.1 Spektren des unkomplexierten ATP

Zunächst wurde das Spektrum einer 45 mM ATP-Lösung untersucht, der 90 mM PCr als Chemical-Shift-Referenz zugesetzt wurden. Die Spektren wurden mit der beschriebenen CSI-Sequenz aufgenommen. Bei der Nachverarbeitung der Daten konnte wegen der guten Auflösung (Abb. 8.5) auf einen Filter verzichtet werden, so daß bei der Anpassung an die Meßdaten Lorentz-Kurven benutzt werden konnten.

Da die Abweichungen im Spektrum von der X-Näherung nicht sehr groß sind, kann man davon ausgehen, daß vornehmlich die Linienintensitäten und nicht die δ -positionen verändert

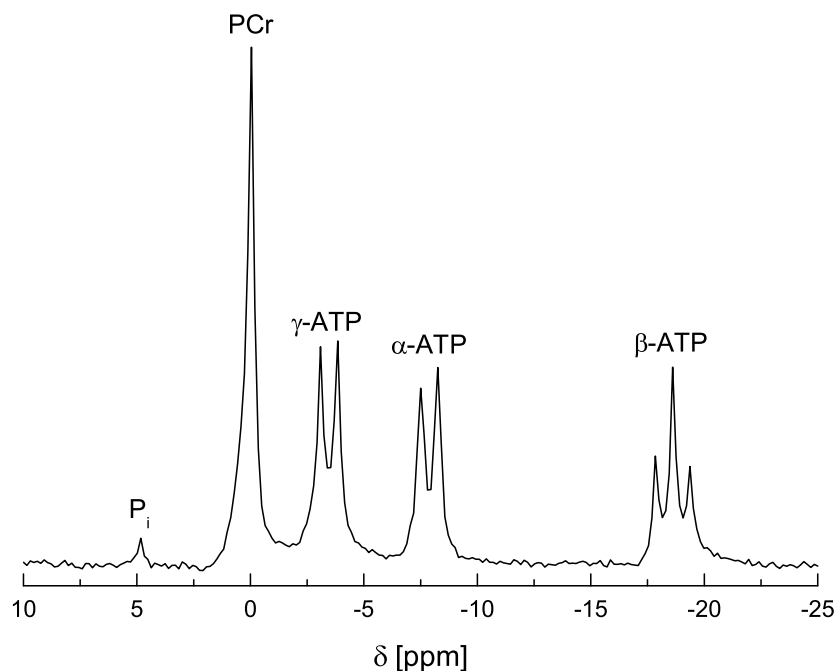


Abb. 8.5: ³¹P-NMR-Spektrum einer Lösung aus PCr (90 mM) und ATP (45 mM) bei einem pH-Wert von 7,04 (aufgenommen mit der beschriebenen CSI-Sequenz). Das starke Signal des PCr dient als Chemical-Shift-Referenz bei 0 ppm. Neben den Signalen der drei Phosphor-Kerne im ATP ist auch eine schwache Resonanz des anorganischen Phosphats (P_i) zu sehen.

sind (s.u.). Die chemischen Verschiebungen der beiden Dubletts ergeben sich somit direkt aus ihrem Mittelpunkt, und die Position der β -Resonanz ist durch die zentrale Resonanz gegeben. Mit diesen Werten für $\delta\omega$ und den sich aus der Linienaufspaltung ergebenden Kopplungskonstanten $J_{\alpha\beta}$ und $J_{\gamma\beta}$ können der Störungsparameter bzw. der Mischungswinkel bestimmt werden. Dann liefert α die Clebsch-Gordan-Koeffizienten und geht in die Korrekturterme x und y der Intensitäten ein. Diese wurden mit einer Genauigkeit von 0,01 als Vorgaben für die in LUISE verwendeten Multipletts einbezogen. Das Ergebnis der Anpassung ist in Abb. 8.6 gezeigt.

Außer den Messungen bei physiologischem pH-Wert wurden auch Experimente in saurer und basischer Lösung durchgeführt. Die pH-Werte wurden mit 5,02 und 8,00 so gewählt, daß die Resonanzen extremal verschoben waren. Ein Anhaltspunkt hierfür war die Darstellung in [Gra98]. Erwartungsgemäß ergab sich folgende Tendenz:

Die α -ATP-Resonanz ist praktisch unabhängig vom eingestellten pH-Wert. Die beiden anderen Signale liegen dagegen für hohe H⁺-Konzentrationen bei niedrigeren Frequenzen. Da das Signal der endständigen Phosphoryl-Gruppe empfindlicher auf pH-Wert-Änderungen reagiert, läßt sich mit zunehmender Ansäuerung die chemische Verschiebung zwischen dem γ - und dem β -ATP-Signal verkleinern und somit die effektive Kopplungsstärke beeinflussen. Gleichzeitig ändern sich aber auch die meßbaren Kopplungskonstanten $J_{i\beta}$ etwas, so daß die Auswertung der Spektren nur eine geringfügige Änderung des Dach-Effektes erkennen läßt. Das Signal der endständigen Phosphorylgruppe überlappt in saurer Lösung teilweise mit dem des α -Kerns. Als Linienpositionen der beiden Dubletts ergeben sich somit die beiden Minima des nun um 7,4 ppm erscheinenden "Triplets". Zusammen mit den

Tab. 8.2: Daten von am Tomographen gemessenen ^{31}P -NMR-Spektren bei verschiedenen pH-Werten zur Bestimmung der Clebsch-Gordan-Koeffizienten von ATP in Abwesenheit von Mg^{2+} ($\omega_0 = 25,758$ MHz). Der erste Datensatz entspricht dem Spektrum aus Abb. 8.5 unter physiologischen Bedingungen. Weitere Datensätze wurden bei $\text{pH} = 8,00$ (Mitte) und $\text{pH} = 5,02$ (unten) aufgenommen. Der Mischungswinkel α bestimmt den Korrekturterm der Intensitäten, der in LUISE auf 0,01 genau vorgegeben werden kann. Die Korrekturterme der Intensitäten ändern sich nur so geringfügig, daß der kumulierte Effekt ($\Sigma = x + y$) für die β -ATP-Resonanz konstant bleibt.

Signal	δ [ppm]	$J_{i\beta}$ [Hz]	α [°]	Korrekturterm		
				$ \sin 2\alpha $	$\cos \alpha$	$\sin \alpha$
γ -ATP	-3,420	19,5	-1,431	$x = 0,0499$	0,9996880	-0,0249781
α -ATP	-7,836	20,0	-2,071	$y = 0,0722$	0,9993471	-0,0361309
β -ATP	-18,560			$\Sigma = 0,1221$		
γ -ATP	-2,680	20,0	-1,421	$x = 0,0496$	0,9996924	-0,0247999
α -ATP	-7,816	19,0	-2,008	$y = 0,0701$	0,9993857	-0,0350474
β -ATP	-18,320			$\Sigma = 0,1197$		
γ -ATP	-6,980	18,0	-1,613	$x = 0,0563$	0,9996039	-0,0281444
α -ATP	-7,860	18,0	-1,736	$y = 0,0605$	0,9995412	-0,0302886
β -ATP	-19,380			$\Sigma = 0,1168$		

aus diesem Signal ermittelten Linienaufspaltungen von je 18 Hz für die beiden eigentlichen Dubletts ergeben sich die in Tab. 8.2 angegebenen Korrekturterme x und y . Das Spektrum der basischen Lösung weicht nur geringfügig von der Messung unter physiologischen Bedingungen ab. Ergänzend zu Abb. 8.6 sind die Anpassungen von Lorentz-Linien an die Spektren mit den veränderten Linienpositionen in Abb. 8.8 gezeigt.

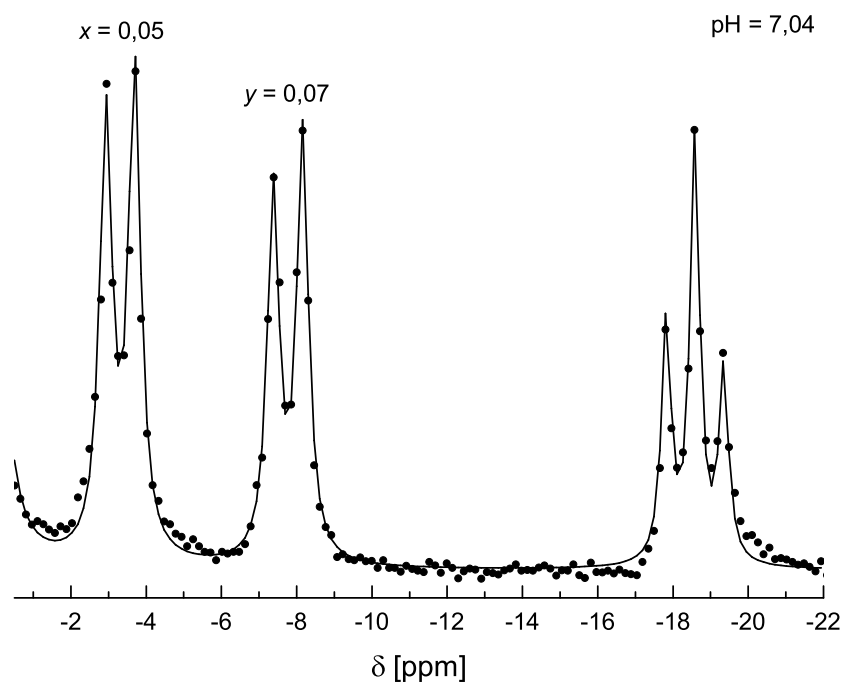


Abb. 8.6: Vergrößerung des ATP-Spektrums aus Abb. 8.5 nach Anpassung der Datenpunkte mit Lorentz-Linien unter Benutzung der Korrekturfaktoren aus Tab. 8.2.

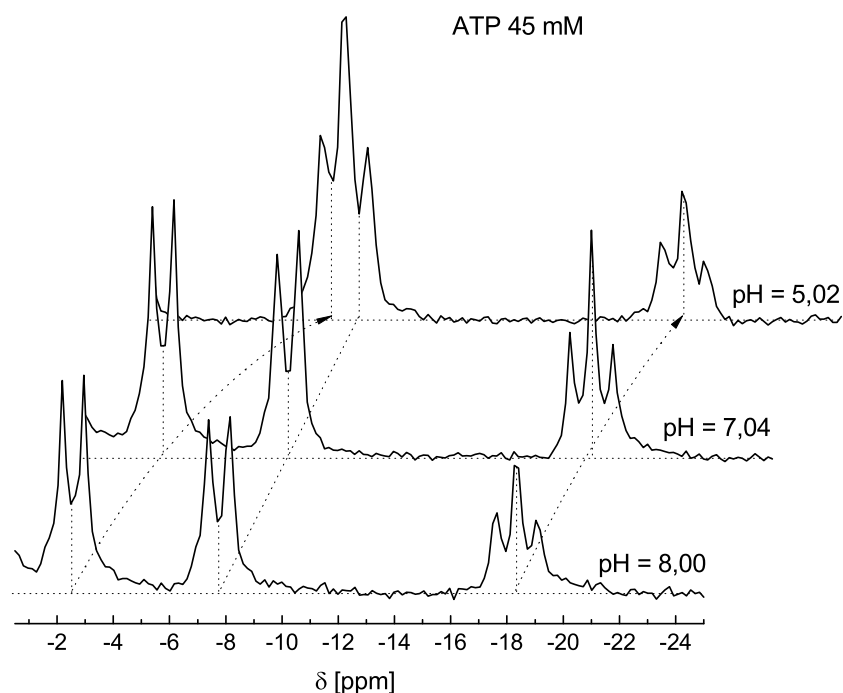


Abb. 8.7: ^{31}P -NMR Spektren von ATP bei verschiedenen pH-Werten. Eine zunehmende Ansäuerung führt zu einer Verschiebung vor allem der γ -ATP-Resonanz zu kleineren Frequenzen. Gleichzeitig wird aber auch das β -ATP-Signal leicht in diese Richtung verschoben, so daß sich der Dach-Effekt nur unwesentlich ändert.

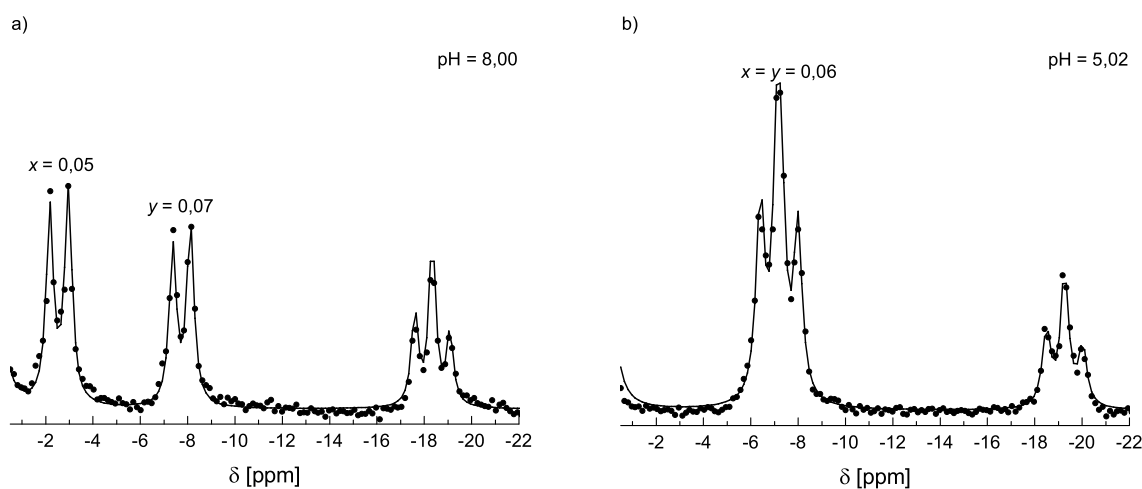


Abb. 8.8: Anpassung von Lorentz-Linien an ^{31}P -NMR-Spektren von ATP bei verschiedenen pH-Werten. Die verwendeten Korrekturfaktoren für den Dach-Effekt sind angegeben.

Innerhalb der Genauigkeit des Fit-Programms erhöht sich der Korrekturterm für das γ -Dublett von extremer Niederfeld-Position bei $-2,68$ ppm ($\text{pH} = 8,00$) zu extremer Hochfeld-Position bei $-6,98$ ppm ($\text{pH} = 5,02$) nur von $0,05$ auf $0,06$. Für das andere Dublett sinkt der Faktor von $0,07$ auf $0,06$ wegen des leicht wachsenden Abstandes zum β -Signal. Dieses verschiebt sich von $-18,32$ ppm auf $-19,38$ ppm. Der Netto-Effekt $\Sigma = x + y$ für das dublierte Dublett bleibt also (nach Rundung) mit $0,12$ konstant.

8.2.2 Spektren des Komplexes MgATP

Bei Zugabe von Mg-Ionen (z. B. in Form von Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) zur 45 mM ATP-Modell-Lösung bilden sich die in Kap. 6 beschriebenen Komplexe aus. Dies führt zu einer Veränderung der Elektronen-Verteilung entlang der Phosphoryl-Kette und damit zu einer Beeinflussung der chemischen Verschiebungen und skalaren Kopplungskonstanten.

Ein Vergleich der beiden Spektren mit und ohne Komplexierung bei physiologischem pH-Wert zeigt, daß der Ligand zu einer verstärkten Abschirmung der ^{31}P -Kerne führt, denn die Werte für die chemischen Verschiebungen steigen an (Abb. 8.9). Dabei ist die Veränderung für die α -Resonanz mit 0,236 ppm äußerst gering, was ein Anhaltspunkt für eine Komplexierung der beiden endständigen Phosphoryl-Gruppen ist. Das Modell einer Einbindung von drei Sauerstoffen in den Komplex scheint zumindest von dieser Beobachtung nicht direkt gestützt zu werden. Der Einfluß von Kationen auf die Resonanzen ist aber recht komplex und läßt sich schwer voraussagen [Jaf78]. Gleichzeitig verkleinern sich die Kopplungskonstanten im Vergleich zum unkomplexierten Molekül um ca. 3-4 Hz auf $J_{\gamma\beta} = J_{\alpha\beta} = 16$ Hz.

Die Anpassung von Lorentz-Linien an das Spektrum der neutralen Lösung ist in Abb. 8.10 gezeigt. Die sich aus den Kopplungskonstanten und Linienpositionen ergebenden Korrekturfaktoren betragen diesmal $x = 0,04$ und $y = 0,07$ (s. Tab. 8.3). Damit ist der kumulierte

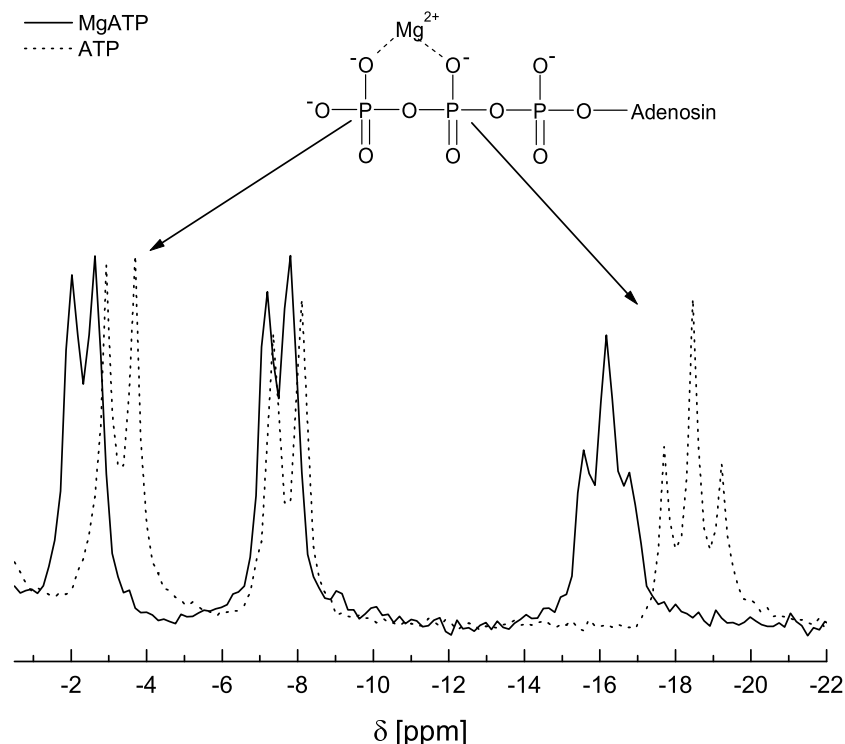


Abb. 8.9: Vergleich der ^{31}P -NMR-Spektren von ATP (45 mM) mit und ohne vollständige Komplexierung durch Mg^{2+} bei physiologischem pH-Wert von ca. 7,04 (Referenz: PCr bei $\delta = 0$ ppm). Das Mg-Ion beeinflusst hauptsächlich die Abschirmung der beiden endständigen ^{31}P -Kerne, was als Hinweis auf die Bevorzugung des MgATP-Komplexes gedeutet werden kann, der die Konformation der Phosphoryl-Gruppen nicht "verbiegt" (s. Zeichnung).

Tab. 8.3: Korrekturterme und Clebsch-Gordan-Koeffizienten aus den Daten eines ^{31}P -NMR-Spektrums von MgATP bei $\text{pH} = 7,03$ ($\omega_0 = 25,758$ MHz).

Signal	δ [ppm]	$J_{i\beta}$ [Hz]	α [$^\circ$]	Korrekturterm	CGK	
				$ \sin 2\alpha $	$\cos \alpha$	$\sin \alpha$
γ -ATP	-2,440	16,0	-1,284	$x = 0,0448$	0,9997488	-0,0224143
α -ATP	-7,600	16,0	-2,045	$y = 0,0713$	0,9993630	-0,0356884
β -ATP	-16,286			$\Sigma = 0,1161$		

Dach-Effekt etwas geringer als im Spektrum des freien ATP.

Eine Veränderung der Resonanzen von MgATP in Folge einer unterschiedlichen Ansäuerung geschieht im wesentlichen nur innerhalb eines pH-Bereichs von 4 bis 6,5 [Gra98]. Daher wurden noch Messungen bei $\text{pH} = 5$ und $\text{pH} = 4$ durchgeführt. Die Serie ist in Abb. 8.11 gezeigt und zeigt folgende Tendenz: die Resonanzen der Kerne an γ - und β -Position verschieben sich wieder zu niedrigeren Frequenzen hin (letztere erneut etwas weniger). Außerdem wird auch die Frequenz der Resonanz von α -ATP etwas beeinflusst; sie zeigt eine geringfügige gegenläufige Tendenz hin zu höheren Frequenzen. Für die Kopplungskonstanten konnte keine Variation mit dem pH-Wert festgestellt werden.

Die Auswertung ergab, daß der Dach-Effekt für die γ -Resonanz bei der Einstellung des pH-Wertes auf 5 noch geringfügig ansteigt, der für das andere Dublett geringfügig sinkt; die Summe der Korrekturfaktoren bleibt unverändert bei 0,11, wenn vor der Summation gerundet wird. Andernfalls ist der Effekt in der neutralen Lösung mit $\Sigma = 0,12$ etwas größer als in saurer Lösung. Da sich bei weiterer Ansäuerung auf $\text{pH} = 4$ die Linienpo-

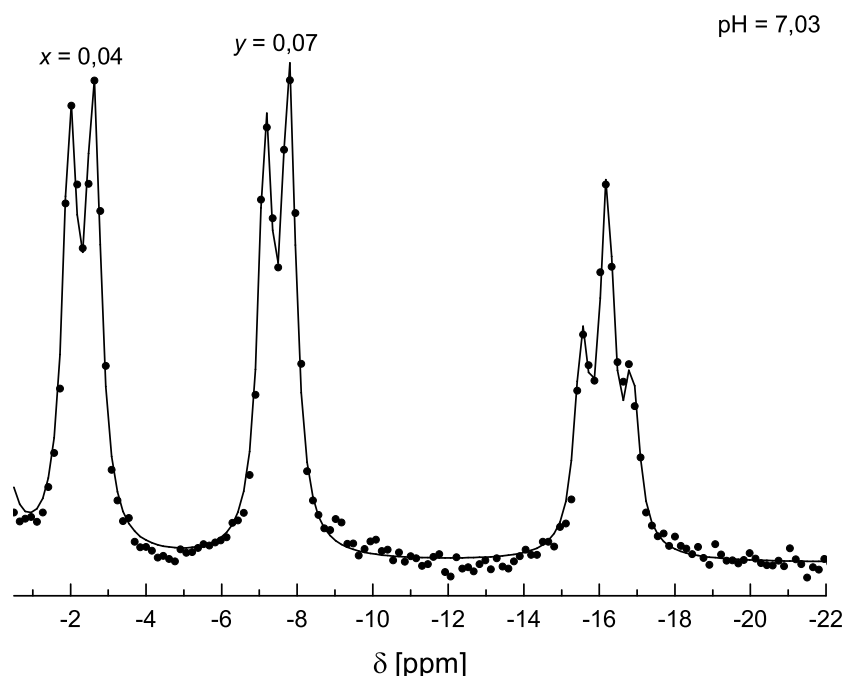


Abb. 8.10: ^{31}P -NMR-Spektrum einer Modell-Lösung aus ATP und Mg^{2+} (je 45 mM) bei physiologischem pH-Wert im Bereich der ATP-Signale. Referenz ist PCr bei $\delta = 0$ ppm. Für die Anpassung der Datenpunkte mit Lorentz-Linien wurden die Korrekturfaktoren aus Tab. 8.3 verwendet.

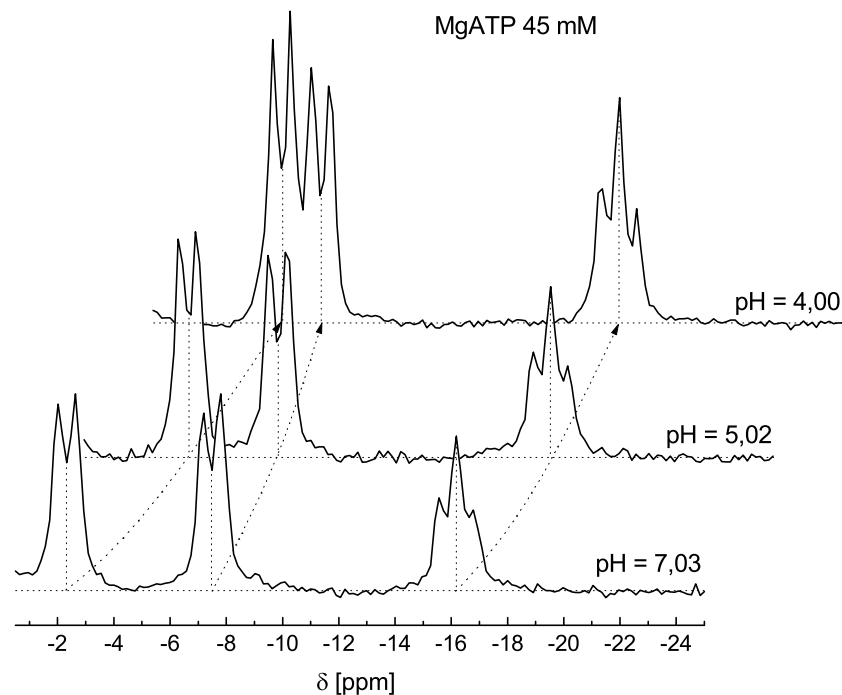


Abb. 8.11: ^{31}P -NMR-Spektren des Komplexes MgATP bei verschiedenen pH-Werten. Referenz ist PCr bei $\delta = 0$ ppm.

sitionen nicht mehr stark ändern, bleiben x und y innerhalb einer Genauigkeit von 0,01 konstant (s. Tab. 8.4).

Insgesamt ist der Dach-Effekt durch die Komplexierung mit Mg^{2+} abgeschwächt, was auch schon durch die verkleinerten Kopplungskonstanten angedeutet wird. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse zeigt Abb. 8.13. Die Komplexierung hat jedoch keinen Einfluß auf den Trend bei zunehmender Ansäuerung, denn in beiden Fällen nähern sich die beiden Korrekturfaktoren an. Da sich die Position der α -Resonanz am wenigsten ändert, das β -Signal aber fast so schnell wie das γ -Signal auf die Hochfeld-Seite verschoben wird, sinkt y schneller, als x ansteigt. Somit zeigt der kumulative Effekt Σ eine Abnahme: sich an die Phosphoryl-Kette anlagernde Protonen "ziehen" an der Elektronenhülle, so daß die effektive Kopplungsstärke abnimmt.

Tab. 8.4: Einfluß des pH-Wertes (oberer Datensatz: pH = 5,02; unterer Datensatz pH = 4,00) auf die CGK von MgATP bei 1,5 T ($\omega_0 = 25,758$ MHz). Die Korrekturterme der Intensitäten ändern sich nur geringfügig, so daß der kumulierte Effekt für die β -ATP-Resonanz konstant bleibt.

Signal	δ [ppm]	$J_{i\beta}$ [Hz]	α [°]	Korrekturterm		
				$ \sin 2\alpha $	$\cos \alpha$	$\sin \alpha$
γ -ATP	-4,215	16,0	-1,382	$x = 0,0482$	0,9997091	-0,0241188
α -ATP	-7,415	16,0	-1,838	$y = 0,0641$	0,9994852	-0,0320819
β -ATP	-17,081			$\Sigma = 0,1123$		
γ -ATP	-5,095	16,0	-1,488	$x = 0,0519$	0,9996627	-0,0259726
α -ATP	-6,475	16,0	-1,682	$y = 0,0587$	0,9995690	-0,0293566
β -ATP	-17,041			$\Sigma = 0,1106$		

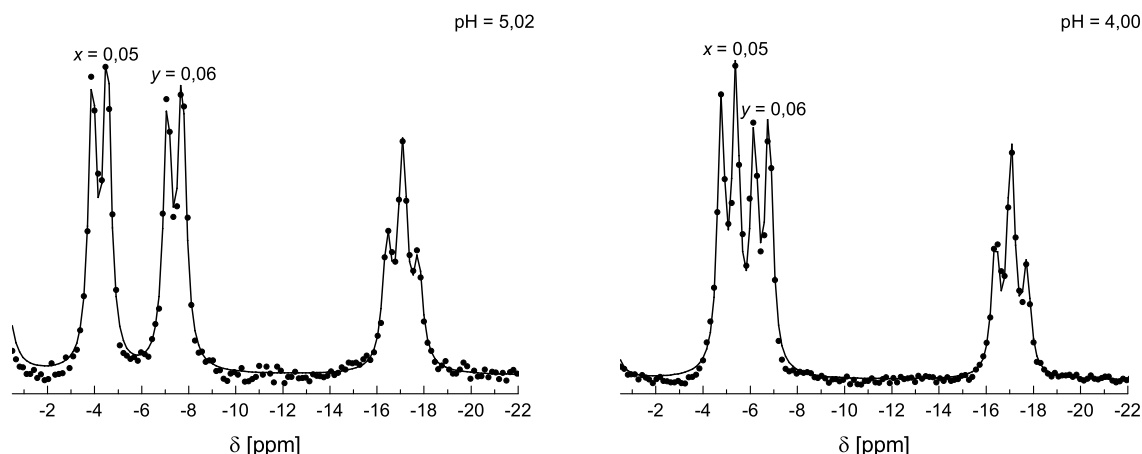


Abb. 8.12: Anpassung von Lorentz-Linien an ^{31}P -NMR-Spektren von MgATP bei verschiedenen pH-Werten. Die für den Dach-Effekt benutzten Korrekturfaktoren sind angegeben.

Es kann davon ausgegangen werden, daß wegen der Genauigkeit von 1% in der Auswertesoftware der Grad der Komplexierung unter physiologischen Bedingungen keinen Einfluß auf die Größe y und den kumulierten Effekt Σ hat. Insgesamt wird also die Verminderung der Kopplungskonstanten gerade durch den verringerten Abstand zwischen der α - und der β -Resonanz kompensiert. Höchstens für die Korrektur x könnte man einen durch starke Komplexierung verringerten Wert angeben; denn hier ist die Kompensation aufgrund der Verschiebung des γ -Signals zu höheren Frequenzen nicht ausreichend.

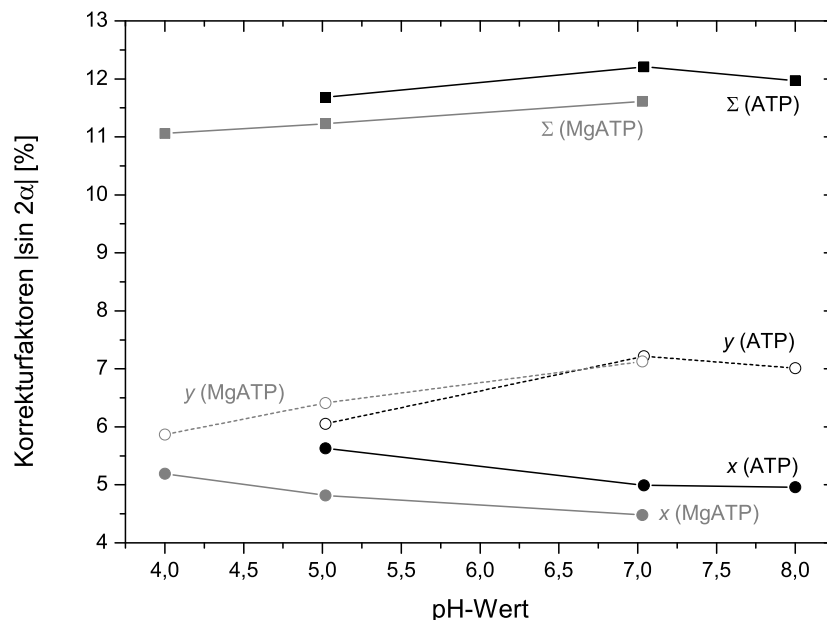


Abb. 8.13: Variation der Korrekturfaktoren x und y für den Dach-Effekt in ^{31}P -NMR-Spektren von ATP bei verschiedenen pH-Werten mit und ohne Komplexierung durch Mg^{2+} . Im Bereich physiologischer pH-Werte lassen sich wegen der für das Auswerteprogramm "Luise" notwendigen Rundungen keine signifikanten Veränderungen mit der Komplexierung feststellen. Die Ansäuerung bewirkt jedoch insgesamt einen Trend hin zu einem abgeschwächten Dach-Effekt.

8.3 Das Carnosin-Spektrum

Zur Gegenüberstellung mit *In-vivo*-Spektren von Cs wurden auch Experimente an Modell-Lösungen mit verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Alle in Kap. 5 genannten Resonanzgruppen konnten detektiert werden, wobei die Auflösung bei 1,5 T nicht ausreicht, um die volle Unterstruktur des Spektrums zu erhalten.

Die Resonanzen des Imidazol-Rings weisen erwartungsgemäß eine äquivalente Intensität auf; eine Linienaufspaltung ist nicht zu erkennen (Abb. 8.14). Die aliphatischen Resonanzen überlagern teilweise. Gut zu erkennen sind die Signale der endständigen Methylen-Gruppe des β -Alanins, die zusammen mit den benachbarten CH_2 -Protonen ein skalar gekoppeltes System bildet. Dieses zeigt ein Spektrum zweiter Ordnung, denn die Kopplungskonstante von ca. 6,3 Hz erscheint bereits relativ stark gegenüber der Differenz in der chemischen Verschiebung von 0,59 ppm \approx 37 Hz.

8.3.1 Hinweise auf skalare Kopplungen innerhalb des Imidazol-Rings

Eine mögliche skalare Kopplung zwischen den Ring-Protonen müßte aufgrund der Bindungsanzahl zwischen den Kernen relativ klein sein ($^4J < 2$ Hz) und würde nicht unbedingt als Linien-Aufspaltung sichtbar werden. Daher wurde dieser Bereich des Spektrums auf eine mögliche Phasenmodulation hin untersucht. Die Messungen mit $TE = 135\text{...}265$ ms (Inkrement $\Delta TE = 10$ ms) ergaben jedoch nur einen monotonen Signalabfall. Somit kann eine signifikante skalare Kopplung ausgeschlossen werden.

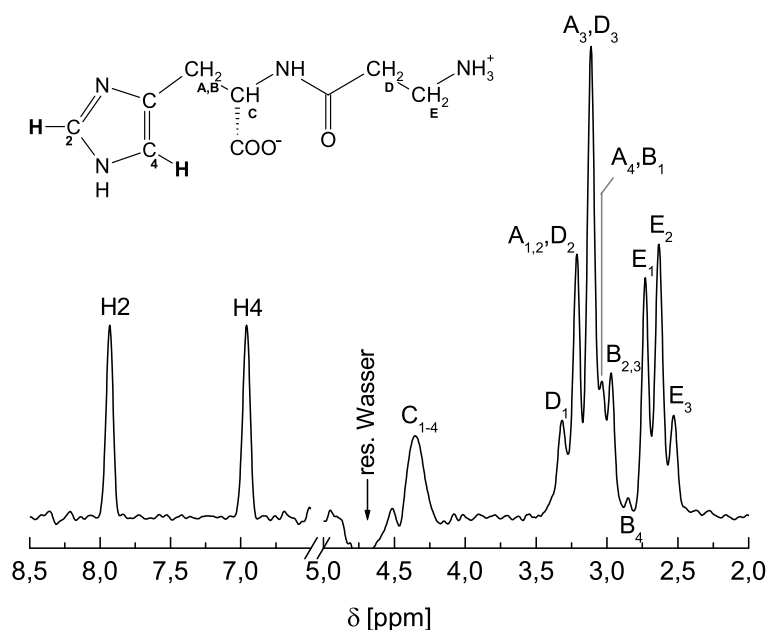


Abb. 8.14: ^1H -NMR-Spektrum einer 50 mM Modell-Lösung von Cs unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert = 7,07). Die Strukturformel des Moleküls mit der Nomenklatur der unterschiedlichen Protonen ist angegeben (STEAM mit $TR = 2$ s, $TE = 10$ ms, $TM = 15$ ms, $NEX = 256$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

8.3.2 Identifikation der detektierbaren NH-Gruppe

In früheren Arbeiten wurde von einer zusätzlichen Resonanz des Cs in *In-vivo*-Spektren berichtet, die bei ca. 8 ppm auftritt und damit mit dem H2-Signal überlagert. Dieses Signal wurde zunächst dem Proton an der Peptid-Bindung [Aru86], später aber der NH-Gruppe des Imidazol-Rings zugeordnet [Alo90]. Eine eindeutige Zuordnung läßt sich durch zwei einfache Kontroll-Experimente durchführen: Die NH-Gruppe des Rings tritt natürlich auch in der einen Peptid-Hälfte des Cs, also im Histidin auf. Das Proton der Peptid-Bindung läßt sich in sehr ähnlicher Struktur in *N*-Acetyl-Aspartat (NAA) wiederfinden. Abb. 8.15 verdeutlicht die Parallelen in den Strukturen der drei Moleküle.

Die NH-Gruppen sind normalerweise aufgrund ihres raschen chemischen Austauschs schwer detektierbar. Um dies zu umgehen, wurden die Modell-Lösungen unterschiedlich stark angesäuert. Der Datensatz für die Messungen an Cs ist in Abb. 8.16 gezeigt. Bereits bei pH = 6 tritt auf der Hochfeld-Flanke des H2-Signals ein Dublett in Erscheinung, dessen Position pH-Wert-abhängig ist. In stark saurer Lösung fällt es mit dem Signal dieses Ring-Protons zusammen und erweckt somit bei geringer Auflösung den Eindruck unterschiedlicher Signale der beiden Ring-Protonen. Ein hoher Protonierungsgrad am Cs-Molekül verfälscht also das Verhältnis der Intensitäten H2 : H4. Die Aufspaltung des Dubletts entspricht einer Kopplungskonstanten von $J = (7,6 \pm 0,4)$ Hz; sie ändert sich nicht erkennbar mit dem pH-Wert. Bei der H4-Resonanz kommt es für niedrige pH-Werte zu einer Überlagerung mit dem breiten Signal der terminalen NH_3^+ -Gruppe des Alanins. Das Signal dieser austauschenden Protonen erschwert teilweise die Baseline-Korrektur.

Der Kontroll-Versuch mit der NAA-Lösung zeigte ein sehr ähnliches Dublett bei ca. 8 ppm. Die Kopplung zwischen Amid- und Methin-Gruppe beträgt $J = (7,1 \pm 0,4)$ Hz. Auch dieses Signal verschiebt sich mit steigender Protonen-Konzentration zu höheren Frequenzen (es ist außerdem bekannt, daß das Signal temperaturabhängig ist [Aru85]). Am rechten Rand in Abb. 8.17(a) erscheint teilweise die breite Resonanz der austauschbaren Carboxyl-Protonen. Abgesehen davon, daß das Dublett im NAA-Spektrum im Gegensatz zum Cs-Experiment schon bei der neutralen Lösung auftaucht, spricht dieses Ergebnis sehr dafür, daß im Cs bei steigendem Protonierungsgrad die NH-Gruppe der Peptid-Bindung sichtbar

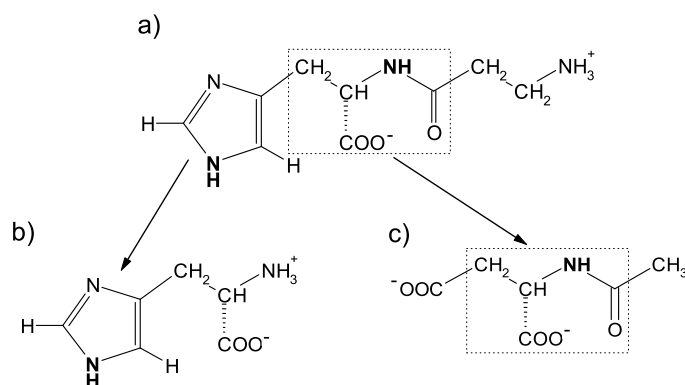


Abb. 8.15: Strukturformeln der Moleküle *L*-Carnosin (a), *L*-Histidin (b) und *N*-Acetylaspartat (c). Die beiden Typen von NH-Gruppen des Cs treten einzeln in den beiden anderen Substanzen auf: Die NH-Gruppe des Imidazol-Rings kann am His untersucht werden. Gemeinsame Strukturbereiche von Cs und NAA sind umrandet dargestellt, so daß die NH-Gruppe an der Peptid-Bindung des Cs in ähnlicher Weise in NAA auftaucht.

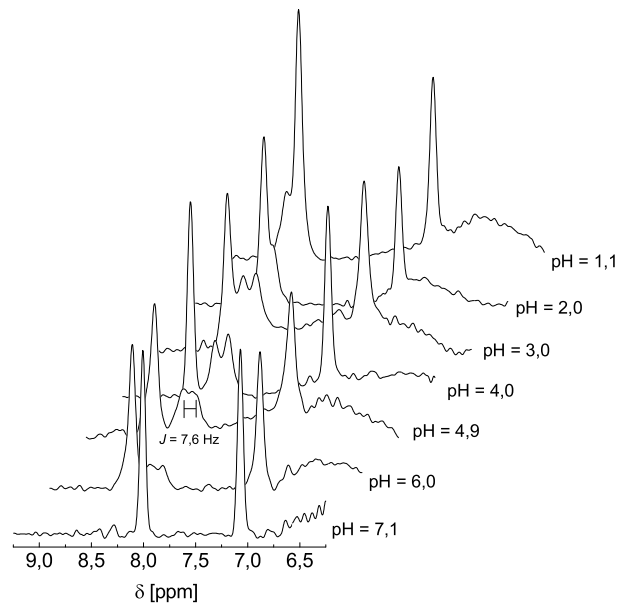


Abb. 8.16: Aromatischer Bereich des ^1H -NMR-Spektrums einer 50 mM Cs-Modell-Lösung bei verschiedenen pH-Werten. Die zunehmende Ansäuerung läßt auf der Hochfeld-Seite der H2-Resonanz ein Dublett in Erscheinung treten, dessen Position pH-Wert-abhängig ist. Eine breite Resonanz der weiterhin schnell austauschenden NH_3^+ -Protonen erscheint am rechten Rand und erschwert die Baseline-Korrektur (STEAM mit $TR = 2\text{ s}$, $TE = 10\text{ ms}$, $TM = 15\text{ ms}$, $NEX = 256$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

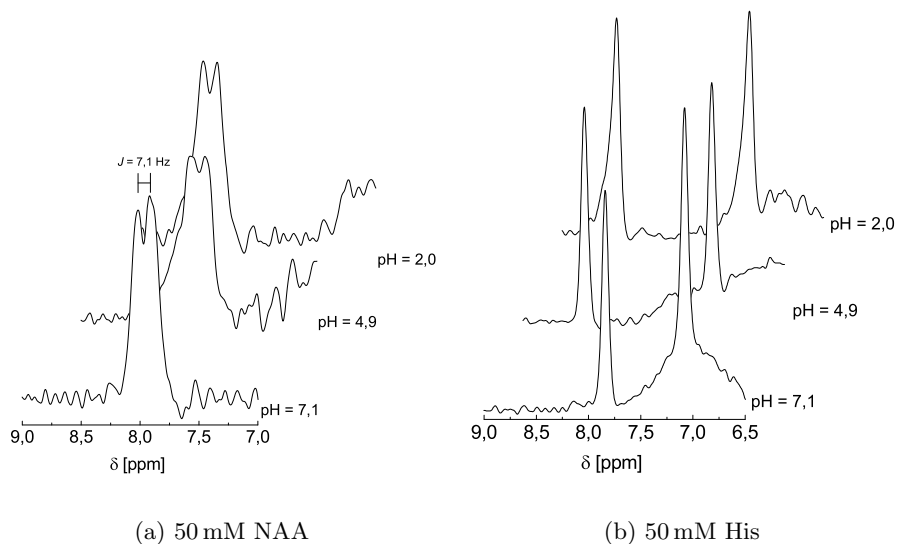


Abb. 8.17: ^1H -NMR-Signal der NH-Gruppen von NAA und His bei verschiedenen pH-Werten. In a) tritt bereits für die neutrale Lösung ein Dublett auf. Die Linienaufspaltung aufgrund der Wechselwirkung mit der CH-Gruppe ähnelt der in Abb. 8.16. Eine breite Resonanz der austauschenden Carboxyl-Protonen ist am rechten Rand der Spektren in (a) zu erkennen. Dagegen verursacht die Ansäuerung in b) nur eine Verschiebung der Signale von H2 und H4 (STEAM mit $TR = 2\text{ s}$, $TE = 10\text{ ms}$, $TM = 15\text{ ms}$, $NEX = 256$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

wird.

Diese These wird auch durch das aufgenommene His-Spektrum gestützt (Abb. 8.17(b)), bei dem kein Dublett im aromatischen Bereich zu beobachten ist. Die Absenkung des pH-Werts verursacht lediglich die bekannte Verschiebung der Resonanzen H2 und H4. Demnach war die ursprüngliche Zuordnung einer *in vivo* sichtbaren weiteren Resonanz des Cs richtig. Die Ursache für die *in vivo* auftretende unerwartet hohe Protonierung an der Peptid-Bindung wird später diskutiert werden.

8.3.3 Einfluß der Komplexierung mit Cu^{2+}

Cs bildet in Anwesenheit von Cu^{2+} -Ionen Komplexe aus. Diese sind so strukturiert, daß die paramagnetischen Eigenschaften des Kations vor allem die Relaxation der Signale H2 und H4 beeinflussen. Um zu untersuchen, ob dies Einfluß auf das Intensitätsverhältnis H2:H4 hat, wurden zu einer 50 M Cs-Modell-Lösung schrittweise Cu^{2+} -Ionen (in Form einer 1 M CuSO_4 -Lösung) gegeben. Das Verhältnis $[\text{Cu}^{2+}]:[\text{Cs}]$ wurde dabei von $1:10^4$ auf $7:10^4$ erhöht.

Die aufgenommenen Spektren bestätigen die Vermutung, daß beide Resonanzen in gleichem Ausmaß von dem paramagnetischen Kation in ihrer Relaxation beeinflußt werden. Abb. 8.18 zeigt deutlich die auftretende Linienverbreiterung und die damit verbundene verkürzte Transversalrelaxation in einer neutralen ($\text{pH} = 7,05$) 50 mM Cs-Modell-Lösung bei zunehmender Konzentration $[\text{Cu}^{2+}]$. Bei einem Verhältnis von $7:10^4$ sind nach der Echozeit von 10 ms praktisch keine Signale mehr zu erkennen.

Die aliphatischen Resonanzen des Cs werden dagegen kaum von der Komplexbildung beeinflußt. Geringe Konzentrationen von Cu^{2+} -Ionen machen sich demnach nur durch Komplexbildung über die paramagnetische Wirkung in der unmittelbaren Nähe der Koordinationsstellen bemerkbar. Für die anderen Protonen des Moleküls ist der Effekt des

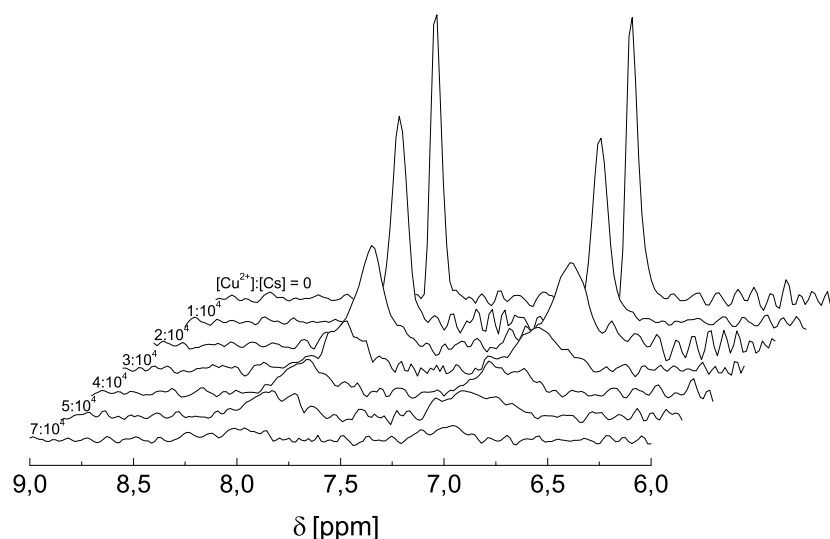


Abb. 8.18: Einfluß von Cu^{2+} -Ionen auf die aromatischen Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum einer 50 mM Cs-Modell-Lösung ($\text{pH} = 7,05$). Die Komplexbildung mit dem Kation führt zu einer deutlichen Beschleunigung der T_2 -Relaxation. Beide Resonanzen sind in gleichem Ausmaß von dem Effekt betroffen (STEAM mit $TR = 2\text{ s}$, $TE = 10\text{ ms}$, $TM = 15\text{ ms}$, $NEX = 256$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$)

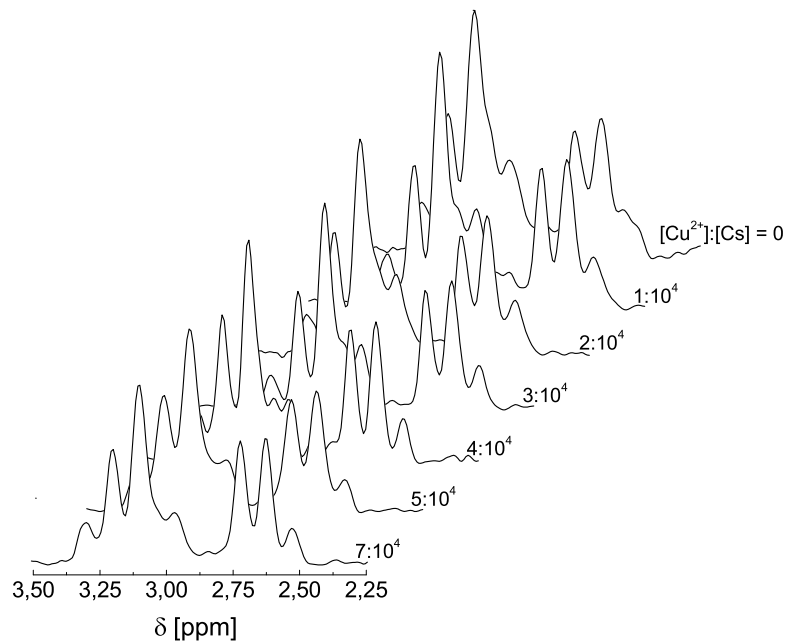


Abb. 8.19: Einfluß von Cu^{2+} -Ionen auf die aliphatischen Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum einer 50 mM Cs-Modell-Lösung ($\text{pH} = 7,05$). Eine signifikante Veränderung ist nicht zu erkennen. Die Störung durch das paramagnetische Ion scheint sich demnach nur in der unmittelbaren Nähe der Koordinationsstellen bemerkbar zu machen. (STEAM mit $TR = 2\text{ s}$, $TE = 10\text{ ms}$, $TM = 15\text{ ms}$, $NEX = 256$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$)

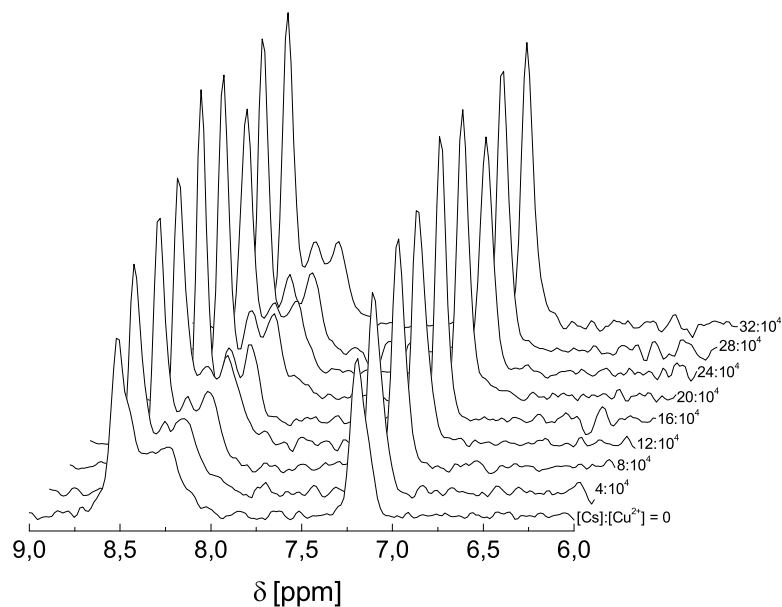


Abb. 8.20: Einfluß von Cu^{2+} -Ionen auf die aromatischen Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum einer 50 mM sauren Cs-Modell-Lösung mit $\text{pH} = 3,02$. Selbst hohe Konzentrationen des paramagnetischen Ions führen zu keiner Signalverminderung. Dies deutet auf eine Unterbindung der Komplexbildung hin (STEAM mit $TR = 2\text{ s}$, $TE = 10\text{ ms}$, $TM = 15\text{ ms}$, $NEX = 256$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$)

Signalrückgang sehr stark abgeschwächt (s. Abb. 8.19).

In starkem Kontrast zu den Effekten der Ionen auf die Imidazol-Signale in neutraler Lösung steht die Beobachtung im Fall einer Ansäuerung. Abb. 8.20 zeigt die aromatischen Resonanzen von Cs bei pH = 3,02 für verschieden starke Konzentrationen $[\text{Cu}^{2+}]$. Der Paramagnetismus der Ionen führt diesmal selbst für hohe Werte von $[\text{Cu}^{2+}]$ nicht zu einer Auslöschung der Signale, sondern aufgrund der verkürzten T_1 -Relaxation sogar zu einem leichten Signalanstieg mit zunehmender Cu^{2+} -Konzentration. Dies deutet darauf hin, daß die Komplexbildung am Imidazol-Ring durch die Ansäuerung unterbunden ist.

8.4 Ionische Bindungen *in vitro*: Taurin mit Phospholipiden

Wegen der osmoregulativen Funktion von Tau vermutet man, daß es ionisch an die Phospholipide der Zellmembran, also Phosphatidyl-Serin, -Ethanolamin und -Cholin, gebunden ist. Es wurde daher geprüft, ob sich in den NMR-Spektren der hydrophilen Köpfe dieser Moleküle einige Resonanzen bei Zugabe von Tau verschieben, weil eventuell die ionische Bindung die Elektronenhülle ausreichend beeinflusst.

Der hydrophile Teil des Phosphatidyl-Cholins ist identisch mit Phosphorylcholin, das als Ca^{2+} -Salz gut wasserlöslich ist. Nun ist Ca^{2+} aber neben K^+ und Na^+ ein Antagonist der Bindung von Tau an die Zellmembran, so daß auch die Ionenbindung mit Phosphorylcholin behindert sein könnte [Bre01]. In *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektren besteht das Problem, daß die Resonanz der $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe (TMA) sehr dominant gegenüber dem sehr dicht daneben liegenden Tau-Signal ist, so daß die Protonen-Spektroskopie an diesem Molekül nicht geeignet ist, um Veränderungen der chemischen Verschiebung festzustellen.

Es wurden daher ^{31}P -NMR-Spektren von Phosphorylcholin (50 mM) mit und ohne Tau aufgenommen. Der Einfluß des Zwitterions ist allerdings nicht signifikant: bei Zugabe im Verhältnis 1:1 verschiebt sich die Resonanz von $\delta = 7,2$ ppm auf $\delta = 7,4$ ppm (relativ zur Resonanz des anorganischen Phosphats; der pH-Wert betrug in beiden Lösungen 7,05). Entweder ist die Wechselwirkung zwischen beiden Molekülen tatsächlich durch das Kation unterbunden, oder der Einfluß auf die chemische Verschiebung ist zu gering, um so detektiert zu werden.

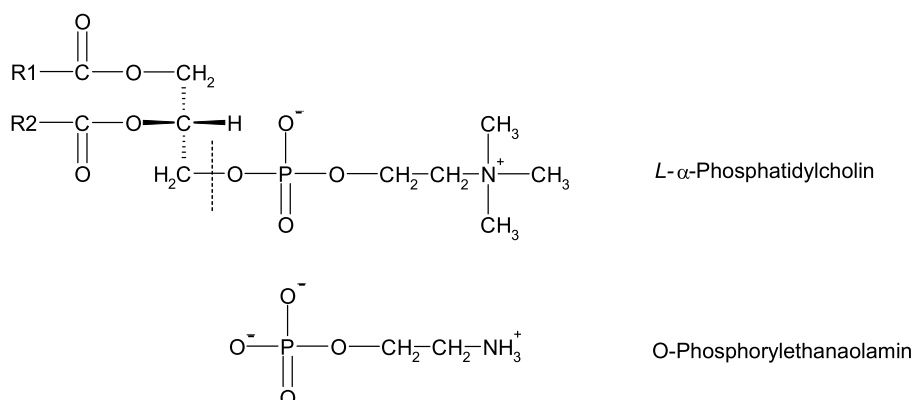


Abb. 8.21: Strukturformel des Phospholipids *L*- α -Phosphatidylcholin und des O-Phosphorylethanolamin, das das Phosphorylcholin als hydrophilen Kopf (Abgrenzung durch getrichelte Linie) ersetzen kann. Die Reste R1 und R2 sind verschiedene Fettsäuren (hauptsächlich Linolat und Palmitoleat).

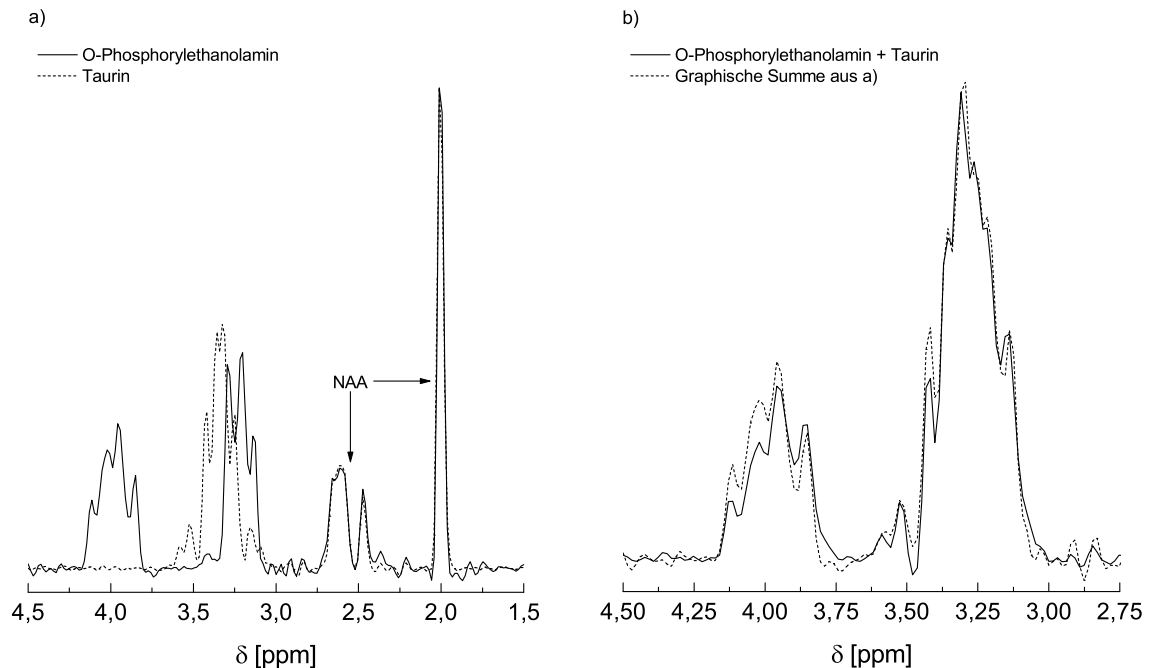


Abb. 8.22: ^1H -NMR-Spektren von Modell-Lösungen aus 50 mM O-Phosphorylethanolamin bzw. 50 mM Tau (a). Beiden Lösungen ist als Referenz 25 mM NAA zugesetzt (Signal der Methyl-Gruppe bei 2,00 ppm). (b) Die graphische Addition der beiden Spektren im Bereich der Methylen-Signale ist dem Spektrum einer Lösung aus 50 mM Tau und 50 mM O-Phosphorylethanolamin (+ 25 mM NAA) sehr ähnlich. Der pH-Wert betrug jeweils 7,05 (STEAM mit $TE = 10$ ms, $TM = 15$ ms, $TR = 2$ s, $NEX = 256$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

Einfacher ist die Untersuchung an O-Phosphorylethanolamin (PE), das ebenfalls in Abb. 8.21 abgebildet ist. Dieses Molekül ist bis auf das Phosphor-Atom identisch mit Tau, so daß sich die Zwitterionen immer wechselseitig aneinander binden könnten. Das Signal des an die Sulfonat-Gruppe gebundenen Methylen im Tau ist gegenüber der an den Phosphat-Rest gebundenen CH_2 -Gruppe des PE deutlich zu niedrigeren Frequenzen verschoben, so daß die Effekte einer starken Kopplung bei Tau deutlicher ausgeprägt sind.

Abb. 8.22 zeigt vergleichend die ^1H -NMR-Spektren zweier Lösungen von PE und Tau sowie einer Lösung mit beiden Substanzen im Verhältnis 1 : 1. Die Addition der Einzel-Spektren unterscheidet sich hinsichtlich der Linienpositionen nicht signifikant vom Spektrum der Lösung mit Tau und PE. Die Ausbildung einer Ionenbindung läßt sich also auch hier nicht mit einem Einfluß auf die chemische Verschiebung nachweisen.

Ein besserer Hinweis auf eine Wechselwirkung von Tau mit Phospholipiden ließ sich durch die Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren einer Tau-Modell-Lösung mit und ohne Phospholipide erzielen. Dazu wurden 100 mg/ml Phospholipon[®] 90 H (Fa. Nattermann, Köln) gelöst. Die Substanz besteht zu 95% aus Phosphatidylcholin, das nur die beiden Fettsäuren Stearat (85%) und Palmitoleat (15%) enthält.

Die Vesikel-Ausbildung führt zu einer makromolekular-ähnlichen Relaxation, so daß die Signale des Phospholipons selber im Spektrum nicht erkennbar sind. Ein Vergleich zwischen Tau-Spektren mit und ohne Phospholipon zeigt jedoch, daß die Signalintensität bei Anwesenheit des Makromoleküls geringer ist. Der Rückgang auf ca. 89% des Ausgangssignals (das NAA-Signal geht sogar auf ca. 76% zurück) ist stärker als die Varianz von ca. 5% in den Signalintensitäten bei Kontroll-Messungen an der Modell-Lösung ohne das

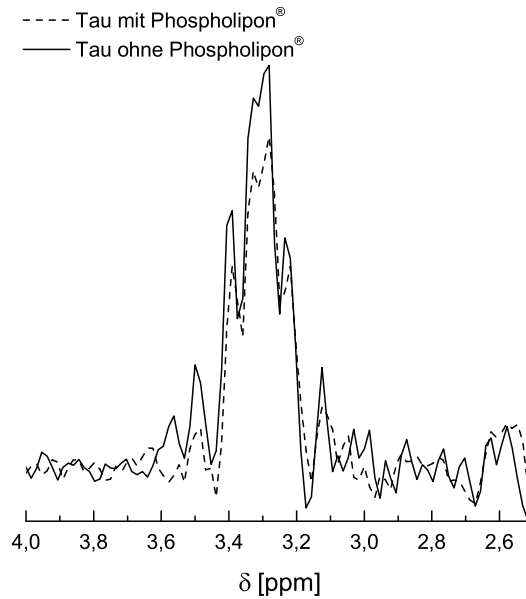


Abb. 8.23: ^1H -NMR-Spektrum einer 25 mM Tau-Modell-Lösung mit und ohne Zugabe von Phospholipon[®] 90 H (100 mg/ml). Als Chemical-Shift-Referenz war beiden Lösungen 10 mM NAA zugesetzt (pH = 7,06) (STEAM mit $TR = 2\text{ s}$, $TE = 10\text{ ms}$, $TM = 15\text{ ms}$, $NEX = 256$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

Phospholipid. Dies deutet darauf hin, daß ein Teil der Tau-Moleküle durch die Ausbildung einer ionischen Bindung zum Lipid immobilisiert und damit MR-unsichtbar wird. Bei Bindung des Moleküls an frei hydrophile Köpfe (z.B. O-Phosphorylethanolamin) ist dagegen eine ausreichende Beweglichkeit der Gesamt-Struktur vorhanden, und es kommt zu keinen Signal-Verlusten.

Veränderungen in der chemischen Verschiebung (NAA als Referenz) lassen sich nicht erkennen. Die Wechselwirkung verrät sich also nur über die veränderte Dynamik einiger Moleküle.

Kapitel 9

Untersuchung gekoppelter Systeme *in vivo*

9.1 Untersuchte Muskelgewebe

Skelett-Muskulatur lässt sich je nach Faser-Zusammensetzung in verschiedene Typen klassifizieren. Diese unterscheiden sich sowohl in ihren kontraktilen Eigenschaften (schnell und langsam), als auch in ihrem Stoffwechsel (aerob oder anaerob). Darüber hinaus verlaufen die kontraktilen Aktin-Myosin-Filamente nur innerhalb eines Muskelstranges relativ parallel. Die verschiedenen Muskeln der Wade haben abhängig von der Bewegungsfunktion eine Orientierung, die nicht unbedingt parallel zur Tibia verläuft.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Fasern des Typs I (slow twitch fibres) und II (fast twitch fibres). In letzteren findet anaerober Stoffwechsel statt, der unter Belastung eine schnelle Laktat-Bildung zur Folge hat. Dies ist bei den Typ-I-Fasern nicht der Fall. Für die Detektion residueller dipolarer Kopplungen von Protonen *in vivo* ist außerdem die Ausbildung einer Anisotropie im Gewebe von Bedeutung. Stark ausgeprägte Spindelformen sowie eine durch die Befestigung der Muskeln am Skelett verursachte starke Verdrillung führen zu einer großen Variation des Winkels θ und somit zu einem zunehmenden Verschwinden der sichtbaren Linienaufspaltungen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Gewebetypen untersucht, die sich folgendermaßen in ihren Eigenschaften unterscheiden:

- M. gastrocnemius:
zwei spindelförmige Lappen (caput laterale und caput mediale), deren Fasern am Septum wie ein leicht geöffnetes V zusammenlaufen; überwiegend Typ-II-Fasern, die ca. 20° gegen die Tibia verdreht sind [Ver02, Ver03];
- M. soleus:
leichte Spindelform, aber Verdrillung von proximal lateral nach distal medial; die Fasern bilden einen Winkel von $40\text{--}50^\circ$ mit der Tibia; fast ausschließlich Muskelfasern des Typs I.

Bisherige Studien zeigen, daß im M. soleus bei paralleler Ausrichtung der Wade zum Grundfeld erwartungsgemäß eine deutlich kleinere Aufspaltung zu sehen ist als im M. gastrocnemius. Die beiden Muskeln bieten also die Möglichkeiten, residuale Kopplungen in unterschiedlicher Stärke zu untersuchen.

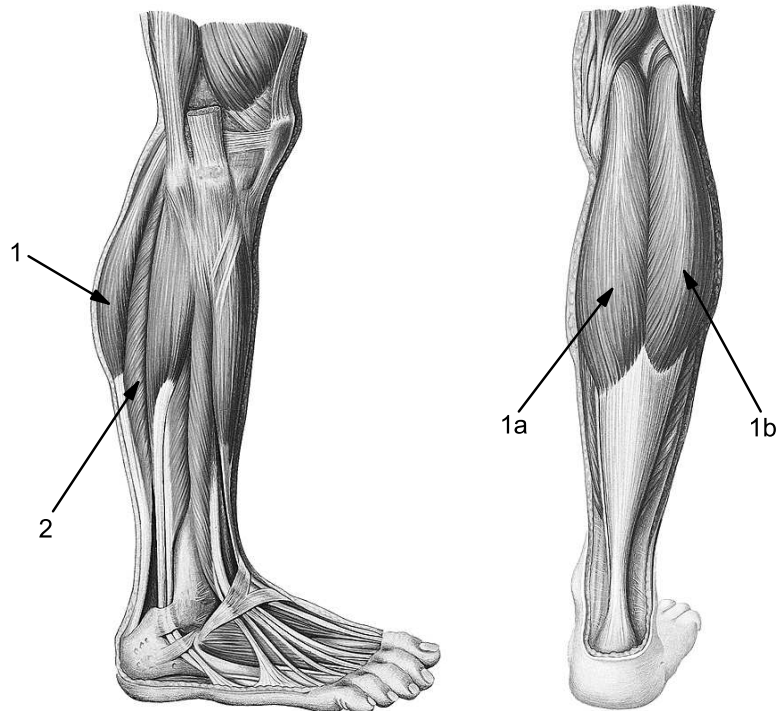


Abb. 9.1: Lage der untersuchten Muskeln am Beispiel des rechten Unterschenkels (Darstellung aus [Sob00]). 1: M. gastrocnemius (1a: caput mediale M. gastrocnemii, 1b: caput laterale M. gastrocnemii), 2: M. soleus

9.2 Dipolare Kopplung im Phosphokreatin

9.2.1 Sichtbare Linienaufspaltungen

Hochaufgelöste, lokalisierte Protonen-Spektroskopie der Wadenmuskulatur von Probanden wurde mit der beschriebenen optimierten STEAM-Sequenz durchgeführt. Die Wasser- und Fett-Signalunterdrückung war so effektiv, daß die residualen H_2O - und Lipid-Signale in den nachbearbeiteten Spektren schwächer als die der untersuchten Metaboliten waren.

Sämtliche bisher bekannten Linienaufspaltungen konnten daher zweifelsfrei im M. gastrocnemius detektiert werden: Das Signal der CH_2 -Gruppe spaltet in ein Dublett, das der Methyl-Gruppe in ein Triplett auf. Die Aufspaltungen des in Abb. 9.2 gezeigten Spektrums betragen 14,0 Hz bzw. 7,6 Hz. Das Triplett überlagert sich teilweise mit dem Signal der Trimethylamid-Gruppe der Cholin-enthaltenden Substanzen (Cho) bei ca. 3,2 ppm. Da der Abstand der Protonen in beiden Gruppen identisch ist, deutet die kleinere meßbare Linienaufspaltung auf eine höhere Beweglichkeit der CH_3 -Gruppe hin.

In einem Experiment war die spektrale Auflösung hinreichend groß, um eine Anpassung der Meßpunkte durch drei $(\text{P})\text{Cr}3$ -Signale durchzuführen und somit in dem Bereich von 2,8 ppm – 3,5 ppm das Cho-Singulett vom Tau-Dublett und $(\text{P})\text{Cr}3$ -Triplett getrennt darzustellen (s. Abschnitt über Tau und Abb. 9.8). Auf eine Bestimmung der Kopplungskonstanten für die CH_2 -Gruppe aus der Linienaufspaltung soll hier nicht weiter eingegangen werden, da dies schon in anderen Arbeiten getan wurde [Kre94, Sch01].

Im M. soleus fallen die Effekte deutlich schwächer aus. Im Vergleich zum M. gastrocnemius sind hier beide $(\text{P})\text{Cr}$ -Multipletts zu breiten Singulett kollabiert. Dadurch wird

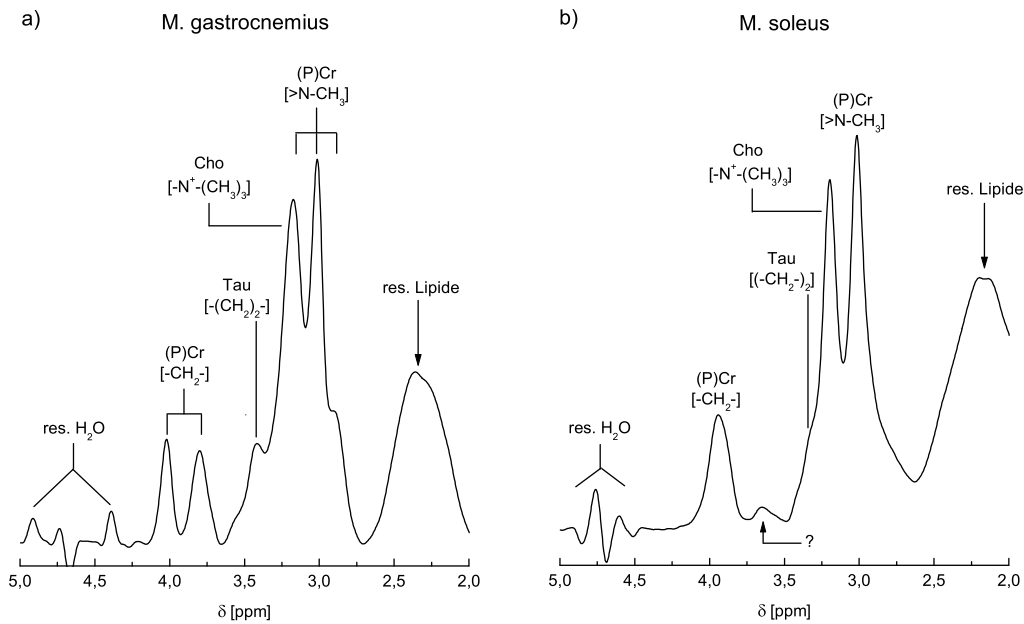


Abb. 9.2: *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektren des *M. gastrocnemius* (a) und des *M. soleus* (b) im Bereich der (P)Cr-Signale. Residuale dipolare Kopplungen sind in a) deutlich stärker ausgeprägt: eine Aufspaltung des Methylen- und des Methyl-Signals von (P)Cr (3,39 ppm bzw. 3,03 ppm) ist deutlich sichtbar. Weiterhin treten die Resonanz der Trimethylamid-Gruppe Cholin-enthaltender Substanzen (Cho) sowie ein Signal der Tau- CH_2 -Gruppen auf. Geringe residuale Fett- und Wasser-Signale zeigen die Effektivität der verwendeten CHES-Pulse (STEAM mit $TR = 2\text{ s}$, $TE = 20\text{ ms}$, $TM = 15\text{ ms}$, $NEX = 500$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

bei ca. 3,65 ppm ein Signal sichtbar, das bislang nicht zugeordnet werden konnte (der $>\text{NCH}_3$ -Gruppe des Anserins wird zwar eine pH-abhängige Resonanz im Bereich von $\delta = 3,84 - 3,62\text{ ppm}$ zugeordnet [Aru86], aber menschlicher Muskel enthält nahezu kein Anserin [Har90]).

9.2.2 Bestimmung der Faserorientierung

Um für weitere Untersuchungen dipolarer Kopplungen einen Anhaltspunkt über die Faserorientierung bei jedem einzelnen Experiment zu bekommen, wurde die Linienaufspaltung der (P)Cr-Methylen-Resonanz bei 3,9 ppm herangezogen. Ihre Winkelabhängigkeit wurde in [Kre94] genau untersucht und genügt der Beziehung (3.21) mit $SD_0 = 4,92\text{ Hz}$.

Tab. 9.1: Bestimmung der Faserorientierung θ aus der Linienaufspaltung des (P)Cr-Methylen-Signals (Nomenklatur der Resonanzen wie in [Kre94]). Die Linienpositionen sind in Hz relativ zu TMS bei 0 ppm angegeben; Linienaufspaltungen konnten auf 0,7 Hz genau bestimmt werden.

Studie #	δ X1 [Hz]	δ X2 [Hz]	$\Delta\nu$ [Hz]	θ [°]
1	254,9	244,7	10,2	$26,99 \pm 1,15$
2	254,6	241,2	13,4	$14,35 \pm 2,20$
3	257,7	243,4	14,3	$8,29 \pm 2,76$
4	256,0	240,5	15,5	$\approx 0 \pm 4,97$
5	255,6	243,6	12,0	$20,68 \pm 1,48$

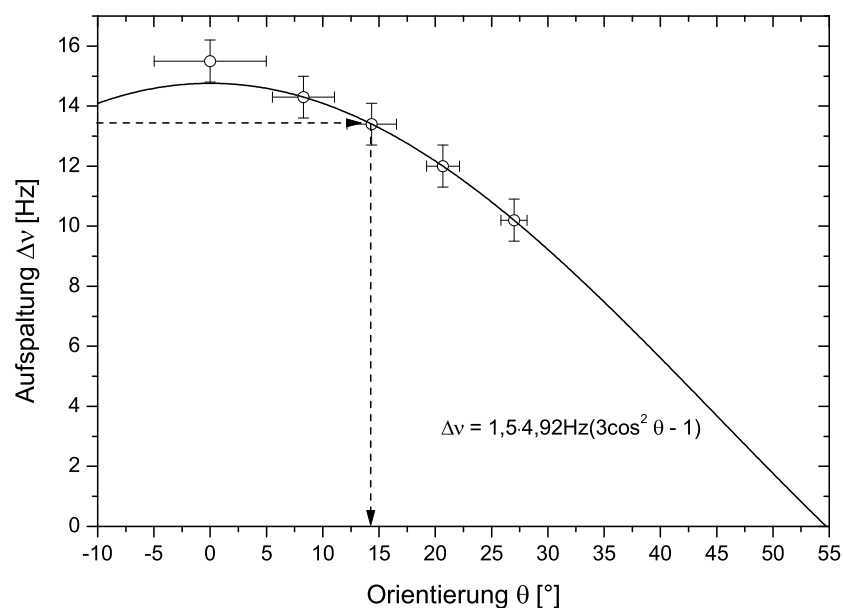


Abb. 9.3: Bestimmung der Faserorientierung aus den Linienaufspaltungen des (P)Cr-Methylen-Dubletts. Der Frequenzabstand der beiden Resonanzen wurde auf die Funktion $\Delta\nu_{vivo} = 3/2 \cdot SD_0(3 \cos^2 \theta - 1)$ mit dem in [Kre94] ermittelten Wert $SD_0 = 4,92$ Hz aufgetragen.

Dabei wurde gezeigt, daß eine Euler-Transformation für die Orientierung θ der Kernverbindungsachse \vec{r}_{IS} vom molekularen Koordinatensystem ins Laborsystem nicht notwendig ist, da die Verkipfung beider Systeme gegeneinander nur minimal ist. Somit kann die Orientierung der Faserstruktur direkt aus der Linienaufspaltung abgelesen werden. Die Meßwerte sind in Tab. 9.1 angegeben.

Bei Studie #4 war der Meßwert größer als die mit $SD_0 = 4,92$ Hz maximale theoretische Aufspaltung. Daher wurde hier eine parallele Orientierung von 0° angenommen. Aufgrund der nicht linearen Beziehung zwischen θ und $\Delta\nu$ kommt es zu unterschiedlich großen Fehlern bei der Winkelbestimmung. Die Aufspaltungen konnten auf 0,7 Hz genau bestimmt werden. Mit (3.17) ergeben sich dann kleine Fehler bei großen Winkeln und große Unsicherheiten für annähernd parallele Ausrichtung der Fasern.

9.2.3 Phasenmodulation des Methylen-Dubletts

Die Phasenmodulation des Methylen-Dubletts wurde bereits in [Sch01] untersucht, damals aber noch nicht in allen Details dargestellt. Daher sollen ergänzend zum theoretischen Hintergrund, der in Kap. 5.3 die Ausnutzung der Modulation eines A_2 -Systems beschreibt, auch noch einmal die Meßdaten aufgeführt werden.

Außerdem wurde die Bestimmung der Faserorientierung bei der damaligen Auswertung anders durchgeführt. Dies wurde nun folgendermaßen getan: Aus der bei der kürzesten Echo-Zeit $TE = 36$ ms sichtbaren Linienaufspaltung $\Delta\nu_{obs}$ wurde θ analog zu Abschnitt 9.2.2 errechnet (in [Kre94] wurde SD_0 ebenfalls aus der sichtbaren Linienaufspaltung abgeleitet; eine Phase der Resonanzen wurde nicht berücksichtigt). Für den zweiten Datensatz war die Aufspaltung wieder etwas größer als der mit $SD_0 = 4,92$ Hz maximal erreichbare Wert. Daher wurde hier wieder $\theta = 0^\circ$ angenommen.

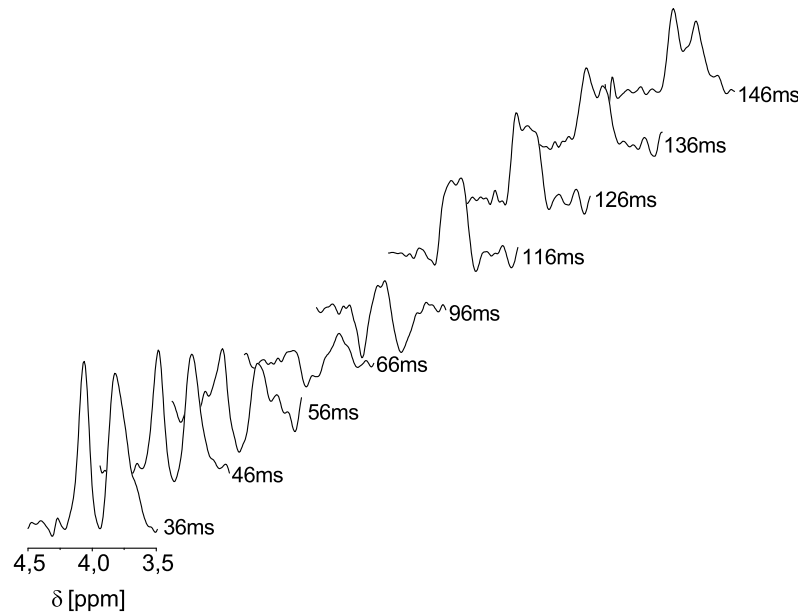


Abb. 9.4: Modulation des (P)Cr-Methylen-Dubletts in *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektren im M. gastrocnemius eines Probanden. Die unterschiedlichen Echo-Zeiten sind rechts angegeben. (PRESS mit $TR = 2\text{ s}$, $NEX = 150$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

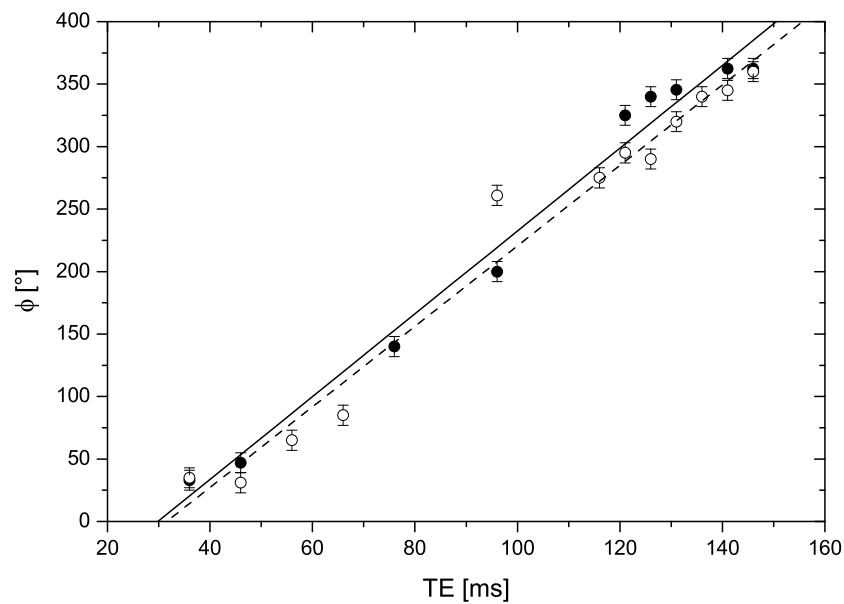


Abb. 9.5: Linearer Verlauf der Phase für das (P)Cr-Methylen-Dublett aus zwei Probanden-Messungen. Der Spektren aus Abb. 9.4 entsprechen dem Datensatz mit den offenen Symbolen.

Bei den mit der PRESS-Lokalisationstechnik aufgenommenen Spektren wurde die Echo-Zeit in 10 ms-Schritten zwischen 36 und 146 ms variiert. Eine Modulation des Signals mit TE ist in Abb. 9.4 deutlich zu erkennen. Die Bestimmung der Phasen erfolgte manuell unter LUISE (s. [Sch01]) und bestätigte für die Studien an zwei Probanden eindeutig den erwarteten linearen Verlauf (Abb. 9.5). Die Anpassung einer linearen Funktion ergab die

Tab. 9.2: Ergebnis der Anpassung eines linearen Verlaufs nach Gl (5.13) an die Phasen-Modulation. θ wurde mit (3.21) mit $SD_0 = 4,92$ Hz aus [Kre00] und der bei der kürzesten Echo-Zeit $TE = 36$ ms sichtbaren Linienaufspaltung $\Delta\nu_{\text{obs}}$ bestimmt. Die Fehler von SD_0 beinhalten nur den Fehler von Δ aus der linearen Anpassung; die Unsicherheit in der sichtbaren Linienaufspaltung wurde nicht weiter berücksichtigt (s. Text).

Studie #	Δ [Hz]	α [°]	$\Delta\nu_{\text{obs}}$ [Hz]	θ [°]	SD_0 [Hz]
1	$17,90 \pm 0,34$	-101 ± 7	13,6	13,2	$6,5 \pm 0,2$
2	$18,42 \pm 0,38$	-99 ± 8	15,2	0,0	$6,1 \pm 0,1$
Mittel					$6,3 \pm 0,1$

in Tab. 9.2 aufgeführten Werte.

Es wird deutlich, daß die der Phasenmodulation entsprechende Frequenz Δ größer als die sichtbare Aufspaltung $\Delta\nu_{\text{obs}}$ ist. Daraus ergeben sich residuale Kopplungsstärken von über 6 Hz. Da nur Meßwerte von zwei verschiedenen θ vorhanden waren und somit die Winkelabhängigkeit nicht näher abgetastet wurde, sind in den Fehlern von SD_0 nur die Genauigkeiten von Δ aus der linearen Anpassung berücksichtigt.

Die sich gleichenden konstanten Phasen α ergeben sich aus der vor der Baseline-Korrektur eingestellten konstanten Phase des Gesamt-Spektrums. Da sich das Dublett recht dicht an der Hochfeld-Flanke des residualen Wassersignals befindet, muß für eine zufriedenstellende Baseline-Korrektur in diesem Bereich eine konstante Phase von ca. $100^\circ \approx -\alpha$ benutzt werden, so daß der Fitparameter α nur die Kompensation dieses Wertes widerspiegelt und keine weitere Bedeutung hat.

9.2.4 Kopplungskonstante der (P)Cr-Methylgruppe

KREIS et al. beobachteten, daß das (P)Cr3-Triplett zusammen mit dem (P)Cr2-Dublett kollabiert, wenn die Fasern am magischen Winkel ausgerichtet sind. Auf die Veränderungen der Winkelabhängigkeit bei Rotation der CH_3 -Gruppe wurde in der Theorie eingegangen: die charakteristische Orientierung des Methyl-Restes wird durch die R–C-Achse und den zugehörigen Winkel η mit \vec{B}_0 bestimmt. Die Beobachtung ist also ein Hinweis darauf, daß die Rotationsachse des CH_3 -Rotors im zeitlichen Mittel eine ähnliche Vorzugsrichtung wie der internukleare Vektor der CH_2 -Protonen hat. Die Linienaufspaltung $\Delta\nu_{\text{vivo}\Delta}(\eta)$ des Triplettts kann also mit (3.29) unter Benutzung der in 9.2.2 ermittelten Orientierungen analysiert werden, um SD_0 der Methylengruppe zu bestimmen.

Tab. 9.3: Ermittelte Multiplett-Aufspaltungen $\Delta\nu$ für das (P)Cr3-Signal im *M. gastrocnemius* aus dem Abstand der Resonanzen (P)Cr3 und X4 (Linienpositionen sind in Hz relativ zu TMS bei 0 ppm angegeben). Die Faserorientierung θ ist angegeben.

Studie #	δ (P)Cr3 [Hz]	δ X4 [Hz]	Aufspaltung $\Delta\nu$ [Hz]	Orientierung η [°]
1	194,0	188,1	5,9	27,0
2	190,6	182,3	8,3	14,4
3	191,4	183,4	8,0	8,3
4	192,8	183,9	8,9	0,0
5	195,6	187,9	7,7	20,7

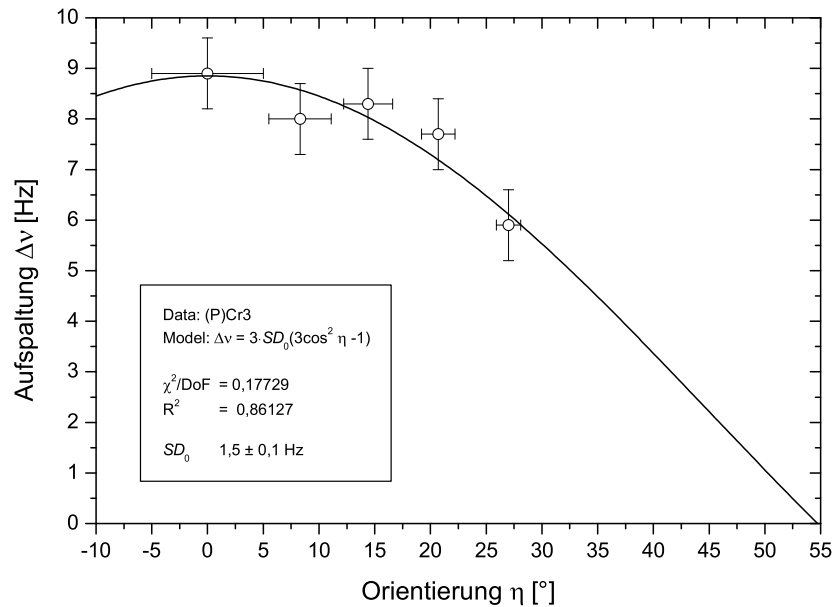


Abb. 9.6: Ermittlung der Kopplungskonstanten der (P)Cr3-Methylgruppe aus der winkelabhängigen Linienaufspaltung eines CH₃-Rotors

In Arbeiten, die bisher über das (P)Cr3-Triplett berichtet haben, wurde nicht näher auf die residuale Kopplungsstärke eingegangen. Es ist lediglich ein Zahlenwert für eine Gesamtbreite des Triplets von ca. 22,4 Hz genannt worden [Han99]. Die Linienaufspaltung läßt sich über den Abstand des rechten Satelliten X4 zur Zentral-Resonanz abschätzen. Mit Hilfe der Auswertesoftware Luise können die Linienpositionen direkt in Hz (relativ zur fiktiven TMS-Resonanz bei 0 ppm) abgelesen werden. Die Daten aus fünf Experimenten sind in Tab. 9.3 angegeben.

Das Ergebnis der Anpassung ist in Abb. 9.6 gezeigt. Die Gültigkeit einer Übertragung der Faserorientierungen θ auf die Ausrichtung η des CH₃-Rotors wird qualitativ durch die Anpassung von (3.29) gestützt. Die anhand von Abb. 9.2 gestellte Vermutung einer relativ kleinen Linienaufspaltung wird durch den gesamten Datensatz bestätigt. Trotz des gleichen Protonen-Abstands wie in der Methylengruppe ist der Wert ca um 40% geringer. Unter Berücksichtigung der Rotation ergibt sich mit $SD_0 = (1,5 \pm 0,1)$ Hz ein Wert, der auf eine hohe Beweglichkeit hindeutet.

9.3 Dipolare Kopplungen im Taurin

Die Messungen an der Tau-Modell-Lösung haben gezeigt, daß die Spektren dieses Metaboliten bei 1,5 T bereits starke Abweichungen von der X-Näherung zeigen. Mit der bei *In-vivo*-Experimenten erreichbaren spektralen Auflösung ist somit nur noch ein gemeinsames Signal beider Methylengruppen zu erwarten. Dieses sollte in der Mitte zwischen den aus Hochfeld-Messungen angegebenen Positionen von $\delta = 3,42$ und $\delta = 3,25$ ppm liegen. Der Vergleich der in Abb. 9.2 gezeigten Spektren ergibt für die Tau-Resonanz im M. gastrocnemius gegenüber denen im M. soleus eine Verschiebung hin zu höheren ppm-Werten. Das bei ca. 3,35 ppm erwartete Signal ist nur im M. soleus zu identifizieren. Dies deutet auf eine Linienaufspaltung im M. gastrocnemius hin, wie sie auch schon an Ratten bei

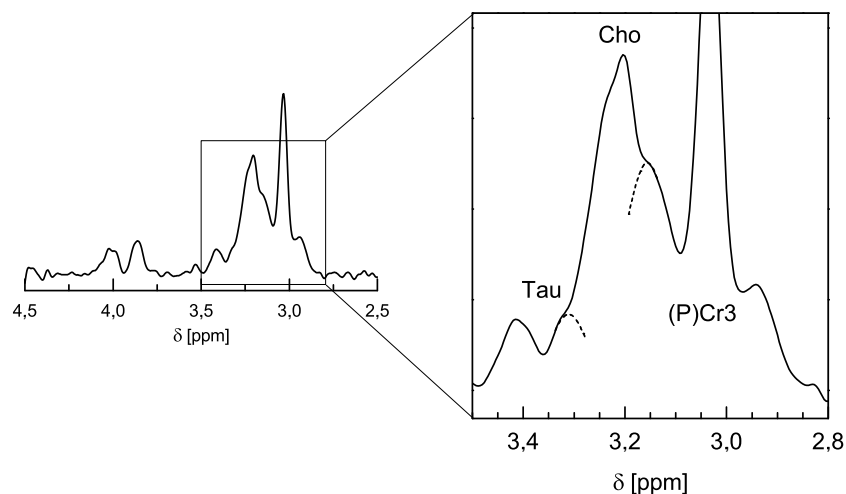


Abb. 9.7: Vergrößerung eines *In-vivo*-¹H-NMR-Spektrums aus dem *M. gastrocnemius* im Bereich der CH₂- und CH₃-Signale. Die Verschiebung des Zentrums des verwendeten Gauss-Filters auf 200 ms läßt die durch dipolare Kopplung verursachten Multipletts von Tau und (P)Cr3 erahnen (STEAM mit $TR = 2$ s, $TE = 20$ ms, $TM = 15$ ms, $NEX = 500$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

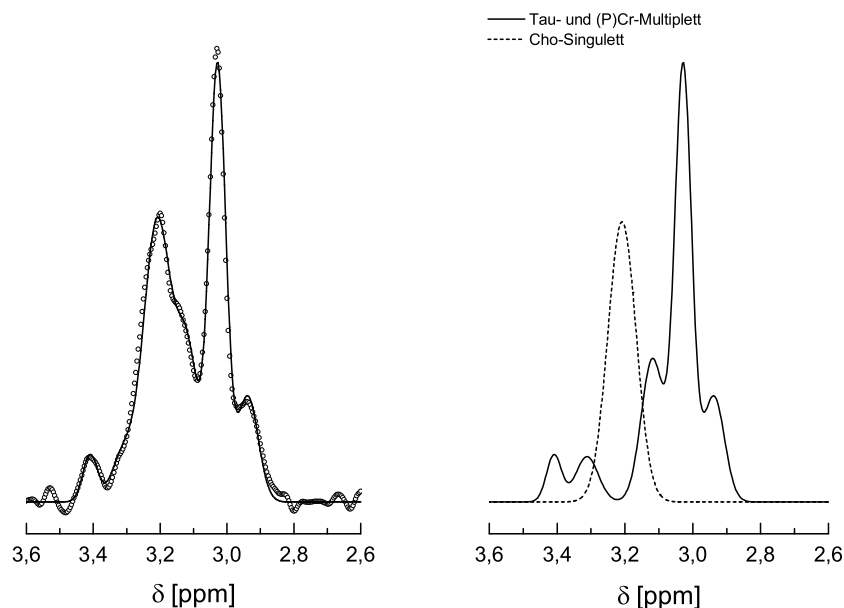


Abb. 9.8: Anpassung der Datenpunkte eines *In-vivo*-¹H-NMR-Spektrums des *M. gastrocnemius* im Bereich der überlappenden Resonanzen um 3,2 ppm (a). Die einzelnen Komponenten von Tau, Cho und (P)Cr lassen sich eindeutig voneinander trennen (b) (STEAM mit $TR = 2$ s, $TE = 20$ ms, $TM = 15$ ms, $NEX = 500$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

4,7T beobachtet wurde [Zan00]. Bei einer Verschiebung des Mittelpunkts des in der Nachverarbeitung verwendeten Gauss-Filters von 0 auf 200 ms läßt sich die zweite Hälfte des so erzeugten Tau-Dubletts auf der Schulter des Cho-Peaks erahnen (s. Abb. 9.7). Gleichzeitig wird auch das (P)Cr₃-Triplet besser erkennbar.

Bei dieser Messung war die spektrale Auflösung so hoch, daß eine Anpassung der Meßwerte mit Gauss-Linien möglich war, um die einzelnen Multipletts getrennt voneinander

Tab. 9.4: Abschätzung der Linienaufspaltung $\Delta\nu$ im M. gastrocnemius für das Tau-Signal, welche sich aus dem doppeltem Abstand zwischen der Resonanz X3 und dem Minimum zwischen X3 und dem Cho-Signal ergibt.

Studie #	δ X3 [Hz]	δ Minimum [Hz]	Aufspaltung $\Delta\nu$ [Hz]	Orientierung θ [°]
1	215,5	212,8	5,40	27,0
2	216,8	212,6	8,40	14,4
3	216,9	212,9	8,00	8,3
4	219,8	215,4	8,80	0,0
5	221,0	217,2	7,60	20,7

darzustellen. Das Ergebnis ist in Abb. 9.8 gezeigt und ergibt eine Linienaufspaltung von $0,097 \text{ ppm} \approx 6,2 \text{ Hz}$ für Tau und $0,090 \text{ ppm} \approx 5,7 \text{ Hz}$ für (P)Cr3. Es verdeutlicht, daß um $3,2 \text{ ppm}$ mehrere Resonanzen überlappen, die oft zu einem breiten Signal unterschiedlicher Metaboliten verschmelzen.

Bei allen anderen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des M. gastrocnemius konnte nur die linke Hälfte des Tau-Dubletts sowie der rechte Satellit der (P)Cr3-Resonanz aufgelöst werden. Diese beiden Resonanzen wurden in früheren Arbeiten mit X3 bzw. X4 bezeichnet. Eine Abschätzung der Linienaufspaltung für Tau ist über den Abstand des Signals X3 zu dem bei ca. $3,35 \text{ ppm}$ sichtbaren Minimum möglich. Diese entspricht ungefähr dem Zentrum des Dubletts und damit der eigentlichen Resonanzfrequenz des Tau-Signals (wie es auch im M. soleus auftritt). Die Zusammenstellung der Werte ist in Tab. 9.4 gezeigt.

Die Auftragung der so ermittelten Aufspaltung $\Delta\nu$ gegen die in Abschnitt 9.2.2 bestimmten Faserorientierungen (Abb. 9.9) ermöglicht eine Anpassung der Funktion (3.17) und liefert eine Kopplungskonstante von $SD_0 = (2,9 \pm 0,1) \text{ Hz}$; dieser Wert ist ca. 40% geringer als der der Methylgruppe von (P)Cr.

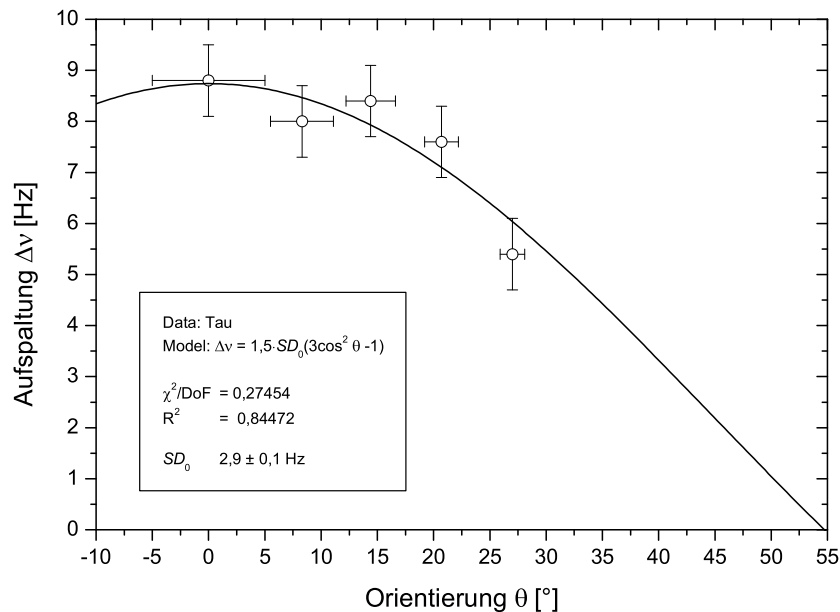


Abb. 9.9: Ermittlung der Kopplungskonstanten von Tau aus der winkelabhängigen Linienaufspaltung.

9.4 Dipolare Kopplung im Carnosin

Das im *M. gastrocnemius* aufgenommene ^1H -NMR-Spektrum weicht deutlich von dem der Modell-Lösung ab. In den fünf Studien traten neben den Resonanzen bei 7 ppm bzw. 8 ppm vier weitere Satelliten (X1–X4) auf. Ein Beispiel dafür ist in Abb. 9.10 gezeigt. Es wird auch deutlich, daß die Abstände X1–X2 und X3–X4 sehr ähnlich sind, was auf eine Kopplung hindeuten könnte. Die Annahme, daß es sich hierbei um zwei Dubletts handelt, wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß X1 und X2 gegen die Hauptresonanz H2 nach links und X3 und X4 entsprechend gegenüber H4 nach rechts verschoben sind. Dies führt zu der Annahme, daß für einen Teil der Cs-Moleküle eine residuale dipolare Kopplung auftritt, die diese zusätzlichen Resonanzen verursacht.

Betrachtet man den T_2 -Zerfall (Abb. 9.11), so wird die Diskrepanz zwischen den Intensitäten von H2 und H4 immer deutlicher. Da dieser Effekt in der Modell-Lösung nicht auftritt, muß er auch mit der spezifischen Muskelstruktur zusammenhängen. Entweder weisen die beiden Resonanzen deutliche Unterschiede im Relaxationsverhalten auf, oder es befindet sich bei 8 ppm außer dem Signal des Ringprotons H4 noch eine weitere Resonanz. Ungleiche Transversalrelaxationen, die durch Komplexbildung mit Cu^{2+} verursacht sein könnten, wurden in den *In-vitro*-Experimenten ausgeschlossen. Vielmehr sprechen die Ergebnisse dafür, daß die NH-Gruppe der Peptid-Bindung von Cs in diesem Gewebe sichtbar wird.

9.4.1 Nachweis der dipolaren Kopplung H2-H4

Um die dipolare Kopplung zwischen den beiden Ringprotonen nachzuweisen, wurden die Asymmetrien der einzelnen Spektren quantifiziert und getestet, ob sie mit der beobachteten Linienaufspaltung konsistent sind. Dazu wurden zunächst für jeden Datensatz die Abstände X1–X2 und X3–X4 ermittelt. Wie Tab. 9.5 zeigt, sind diese Werte paarweise sehr ähnlich. Anschließend konnte dann zusammen mit dem Abstand $\Delta\omega$ der Breit-Rabi-

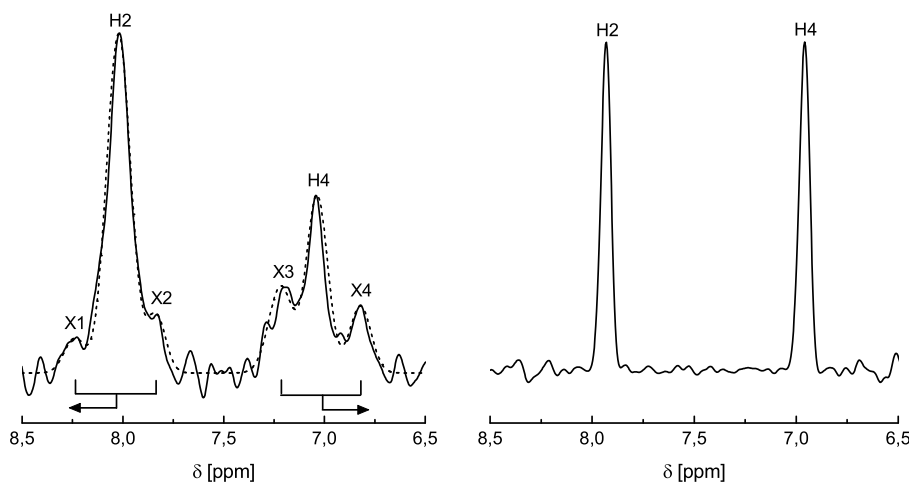


Abb. 9.10: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren aus dem *M. gastrocnemius* und der Modell-Lösung mit physiologischem pH-Wert. Es sind vier zusätzliche Resonanzen zu erkennen, die paarweise nach außen verschoben sind. Die sechs Signale lassen sich durch Gauss-Linien anpassen (gestrichelt dargestellt; STEAM mit $TE = 17$ ms, $TD = 10$ ms, $TR = 2$ s, $NEX = 500$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

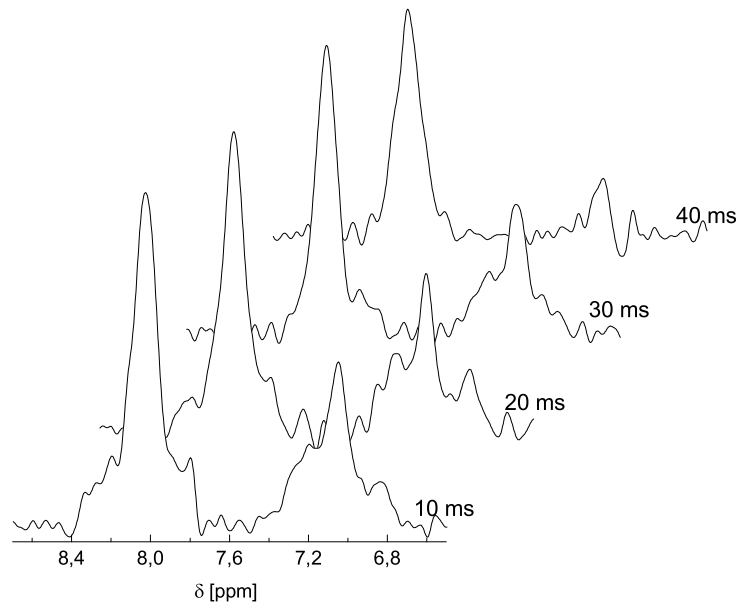


Abb. 9.11: T_2 -Zerfall der Resonanzen von Cs in *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektren des *M. gastrocnemius*. Der Unterschied zwischen der in Abb. 9.10 als H4 bezeichneten Resonanz und dem Signal H2 wird mit zunehmender Echo-Zeit immer stärker (STEAM mit $TD = 10\text{ ms}$, $TR = 2\text{ s}$, $NEX = 500$, Voxel-Größe: $(2\text{ cm})^3$).

Parameter x bestimmt werden, für den sich nach Gl. (5.2) eine bestimmte Verschiebung in Einheiten von Sk ergibt.

Nach Umrechnung in Einheiten von [ppm] läßt sich dieser Wert dann mit der Asymmetrie vergleichen, die sich aus der Verschiebung der Dubletts gegenüber den Hauptresonanzen H2 und H4 ergibt; Tab. 9.6 stellt diese Werte gegenüber. Innerhalb der bei *In-vivo*-Messungen erreichbaren Genauigkeit sind die beobachteten Asymmetrien mit den Aufspaltungen konsistent. Somit ist ein Nachweis der residualen dipolaren Kopplung H2-H4 in 1D Spektren möglich, und zwar ohne die charakteristische Winkelabhängigkeit der Linienaufspaltung auszunutzen. Diese wäre nämlich durch eine eventuell notwendige Eulertransformation so verändert, daß sie nicht der Funktion $(3 \cos^2 \theta - 1)$, sondern nur deren transformierter Version (s. [Kre94]) genügen würde. Man könnte dann auf Anhieb nicht

Tab. 9.5: Linienpositionen der sechs aromatischen Resonanzen in *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektren des *M. gastrocnemius* (Referenz: TMS bei $\delta = 0\text{ ppm}$). Die Auflösung nach Zero-Filling betrug $0,004\text{ ppm}$. Die Auswerte-Software Luise gibt die Werte auf drei Nachkommastellen an. Alle abgeleiteten Werte wurden auf $0,01\text{ ppm}$ gerundet. $\Delta\nu_{1,2}$ und $\Delta\nu_{3,4}$ sind die Linienaufspaltungen der Dubletts X1, X2 bzw. X3, X4. θ gibt die in Abschnitt 9.2.2 ermittelten Faserorientierungen an.

Studie #	δ X1 [ppm]	δ H2 [ppm]	δ X2 [ppm]	δ X3 [ppm]	δ H4 [ppm]	δ X4 [ppm]	$\Delta\nu_{1,2}$ [ppm]	$\Delta\nu_{3,4}$ [ppm]	θ [°]
1	8,235	8,023	7,837	7,220	7,040	6,832	0,40	0,39	27,0
2	8,210	7,945	7,720	7,190	6,985	6,720	0,49	0,47	14,4
3	8,410	8,060	7,830	7,325	7,100	6,815	0,58	0,51	8,3
4	—	8,020	7,820	7,370	7,120	6,825	—	0,55	0,0
5	8,250	8,005	7,780	7,270	7,060	6,830	0,47	0,44	20,7

Tab. 9.6: Vergleich der beobachteten Asymmetrien der Dubletts (X1, X2) und (X3, X4) relativ zu den Haupt-Resonanzen (H2 und H4) von Cs der *In-vivo*-¹H-NMR-Spektren des M. gastrocnemius mit den aus den Linienaufspaltungen Sk erwarteten Werten für A_P^D .

Studie #	Asym. 1,2 [ppm]	Asym. 3,4 [ppm]	Sk/h [ppm]	x [$2h\Delta\nu/Sk$]	erw. A_P [Sk]	erw. A_P [ppm]
1	+0,01	-0,01	0,40	5,00	$\pm 0,025$	$\pm 0,01$
2	+0,02	-0,03	0,48	4,00	$\pm 0,031$	$\pm 0,02$
3	+0,06	-0,03	0,55	3,52	$\pm 0,035$	$\pm 0,02$
4	—	-0,02	0,55	3,30	$\pm 0,037$	$\pm 0,02$
5	+0,01	-0,01	0,46	4,15	$\pm 0,030$	$\pm 0,01$

sagen, ob die Veränderungen durch die Transformation kommen oder die Variation der Aufspaltung gar nicht auf eine dipolare Kopplung zurückzuführen ist.

Da die Konsistenz der verschiedenen, aus den Linienpositionen ermittelten Größen aber auf eine Spin-Spin-Kopplung hindeutet, läßt sich nun SD_0 aus $\Delta\nu(\theta)$ für anisochrone Spins ermitteln. Es ist bekannt, daß sich die Cs-Resonanzen analog zum Verhalten des (P)Cr2-Dubletts für eine Orientierung der Fasern am magischen Winkel vereinfachen [Kre00]. Auch die Unterschiede zwischen den Spektren aus M. gastrocnemius und M. soleus (s. u.) sprechen dafür, daß die in 9.2.2 ermittelten Winkel direkt für eine Anpassung von $\Delta\nu = SD_0(3\cos^2\theta - 1)$ herangezogen werden können. Trägt man also die Aufspaltungen Sk/h (Tab. 9.6) gegen die Orientierungen θ (Tab. 9.5) auf, so sollte die charakteristische Winkelabhängigkeit der dipolaren Kopplung erkennbar sein. In Abb. 9.12 ist das Ergebnis der Anpassung gezeigt, die einen Wert von $SD_0 = (17,7 \pm 0,3)$ Hz ergibt.

Die Auswertung der aus dem M. soleus akquirierten Spektren zeigen im aromatischen Bereich eine deutlich schwächer ausgeprägte Kopplung. Analog zum Kollaps der Multipletts

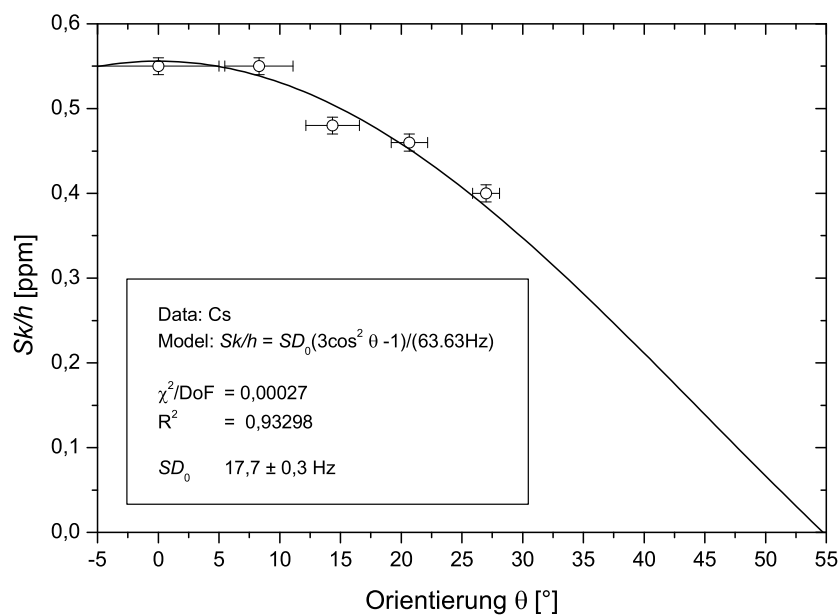


Abb. 9.12: Winkelabhängigkeit der Linienaufspaltung der den Cs-Ringprotonen H2 und H4 zugeordneten Resonanzen. Deutlich ist der dipolare Charakter zu erkennen.

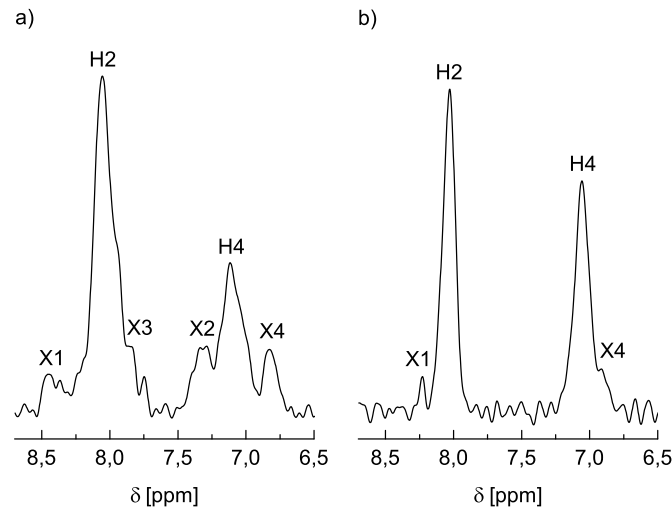


Abb. 9.13: Vergleich der *In-vivo*- ^1H -NMR-Resonanzen von Cs im *M. gastrocnemius* (a) und *M. soleus* (b). Die residuale dipolare Kopplung ist in (b) deutlich schwächer.

von (P)Cr und Tau im aliphatischen Teil (Abb. 9.2) kommt es auch hier zu einer Vereinfachung: Durch die kleinere Aufspaltung fallen nun die Satelliten X2 und X3 mit den Haupt-Resonanzen zusammen, und die beiden äußeren Peaks X1 und X4 rücken näher an diese heran (Abb. 9.13). Gleichzeitig ist der Intensitätsunterschied zwischen H2 und H4 nicht mehr so ausgeprägt wie im *M. gastrocnemius*. Diese Effekte stimmen mit der Tatsache überein, daß die Faserorientierung in den beiden Muskeln unterschiedlich ist und daher bei annähernd paralleler Ausrichtung der Wade zum Grundfeld die Effekte im *M. soleus* deutlich schwächer auftreten.

Die Gegenüberstellung zeigt auch, daß die Gesamt-Intensität der Cs-Resonanzen im *M. gastrocnemius* höher zu sein scheint als im *M. soleus* ((P)Cr-Signale sind in beiden Messungen vergleichbar). Diese Beobachtung läßt sich mit dem unterschiedlichen Metabolismus in diesen beiden Geweben erklären (s. Diskussion).

9.4.2 Alternative Bestimmung der Kopplungskonstanten aus den Asymmetrien

Die residuale Kopplungsstärke SD_0 kann auch aus den Asymmetrien der Linienpositionen bestimmt werden. Nach Bestimmung des Mischungswinkels α_P kann wegen des bekannten Abstands $\Delta\omega$ der nicht koppelnden Protonen direkt Sk für eine bestimmte Faserorientierung ermittelt werden.

Zunächst wurden also aus den fünf Studien die Verschiebungen der Dubletts ermittelt. Dazu wurde der Mittelwert aus den Up- und Downfield-Shifts aus Tab. 9.6 gebildet, um zusammen mit dem Frequenzunterschied $\Delta\nu$ der Resonanzen H2 und H4 (ermittelt aus Tab. 9.5) α zu bekommen. Dazu wurde (3.32) in eine Beziehung umgeformt, in der nur Frequenzen auftauchen¹:

$$\alpha_P = \frac{1}{2} \arccos \frac{\Delta\nu}{2A_P^D + \Delta\nu} \quad (9.1)$$

¹ $\Delta\nu$ ist hierbei keine Dublett-Aufspaltung, sondern der Frequenzabstand von H2 und H4!

Tab. 9.7: Gemessene Kopplungsstärken Sk/h für Cs im M. gastrocnemius, abgeleitet mit (9.1) und (9.2) aus den Asymmetrien der Dubletts X1,X2 und X3,X4. $\Delta\nu$ (hier der Frequenzunterschied H2-H4) wurde mit der Genauigkeit der Linienpositionen aus Tab. 9.5 angegeben; alle anderen abgeleiteten Größen wurden auf 0,01 ppm genau angegeben.

Studie #	A_P [ppm]	$\Delta\nu$ [ppm]	α_P [°]	Sk/h [ppm]	θ [°]
1	0,01	0,983	5,73	0,40	27,0
2	0,03	0,960	9,87	0,69	14,4
3	0,05	0,960	12,54	0,90	8,3
4	0,02	0,900	8,39	0,54	0,0
5	0,01	0,945	5,84	0,39	20,7

Die so bestimmten Mischungswinkel sind in Tab. 9.7 angegeben. Die Transformation von (3.5) in Frequenz-Einheiten [Hz] liefert die meßbare Kopplungsstärke

$$Sk/h = 2\Delta\nu \tan 2\alpha_P. \quad (9.2)$$

Die entsprechenden Werte sind zusammen mit den Orientierungen θ aus Abschnitt 9.2.2 in Tab. 9.7 rechts angegeben. Nimmt man für die aus den Linienpositionen abgeleiteten Größen eine Genauigkeit von 0,01 ppm an, so ergibt sich mit Fehlerfortpflanzung für (9.1) ein Fehler von ca. $0,1^\circ$ in den Mischungswinkeln. Für die mit (9.2) bestimmten Werte ist der Fehler, der auf dem steilen Verlauf der tan-Funktion beruht, dominant. Man erhält für die gemessenen Kopplungsstärken Sk/h einen Fehler von ca. 0,4 ppm!

Wie Abb. 9.14 zeigt, liefert die Anpassung der Winkelabhängigkeit dennoch mit $SD_0 = (21,5 \pm 2,7)$ Hz einen Wert, der qualitativ mit der Bestimmung aus der Linienaufspaltung im vorigen Abschnitt übereinstimmt.

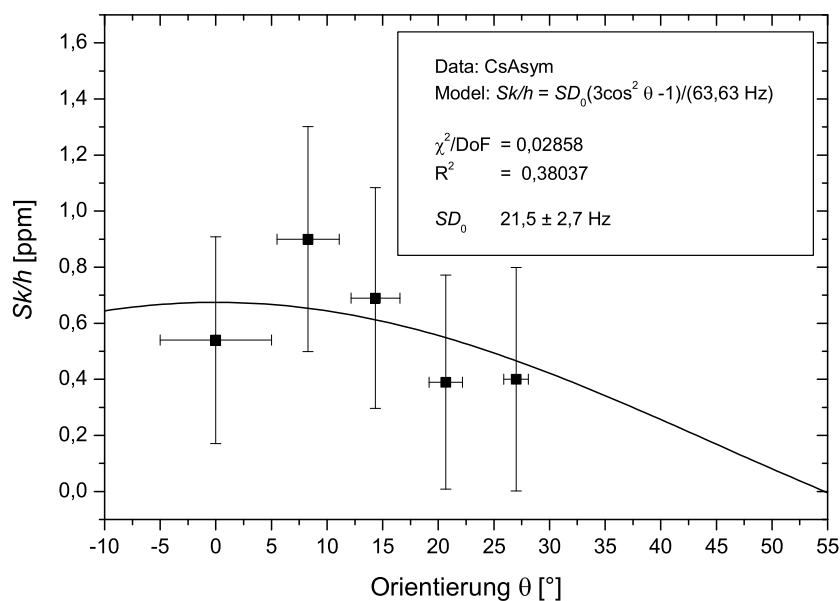


Abb. 9.14: Winkelabhängigkeit der Kopplungsstärke H2-H4 aus den gemessenen Asymmetrien. Die Ungenauigkeit dieser Methode ist deutlich höher.

9.5 Molekulardynamik: Vergleich der Kopplungsstärken

Aus den gemessenen Kopplungsstärken SD_0 lassen sich mit Kenntnis der Kernabstände und den Beziehungen (3.21), (3.29) und (3.22) die Ordnungsparameter S für die verschiedenen Systeme CH_2 , CH_3 und $\text{H}_2\text{-H}_4$ bestimmen. Unterschiede in den Ordnungsparametern lassen dann qualitative Aussagen über die Molekulardynamik zu.

In Tab. 9.8 sind die für S relevanten Daten der in dieser Arbeit untersuchten gekoppelten Spin-Systeme aufgeführt. Für die $\text{H}_2\text{-H}_4$ -Kopplung des Cs sind die beiden Ergebnisse aus den hier durchgeführten alternativen Auswertungen gegenübergestellt. Ebenso lagen für das (P)Cr-Methylen-Dublett mehrere Bestimmungen von SD_0 vor. Die zwei Zahlenwerte aus früheren Arbeiten [Kre94, Kre96] liegen etwas unter dem mittels der Phasenmodulation bestimmten Wert.

Die mit Abstand stärkste residuale Wechselwirkung liegt im Cs vor, obwohl dieses 2-Protonen-System eindeutig den größten Abstand hat. Dieses Molekül ist demnach sehr effektiv in seiner Mobilität innerhalb der Muskelfasern eingeschränkt. Alle anderen Systeme haben einen relativ geringen Kern-Abstand von 0,178 nm. Hiervon hat die Methylen-Gruppe von (P)Cr die stärkste Bewegungseinschränkung; die des Tau sind etwas mobiler. Die größte Bewegungsfreiheit hat der CH_3 -Rotor des (P)Cr, dessen nach außen gerichtete R-C-Achse relativ unabhängig vom Rest des Moleküls einer schnellen Reorientierung unterliegt.

9.6 Skalare Kopplung im ATP

Die beschriebene CSI-Sequenz mit Doppelresonanz-Technik lieferte auch bei *In-vivo*-Experimenten hochaufgelöste ^{31}P -NMR-Spektren. Ein Beispiel ist in Abb. 9.15 gezeigt. Neben der deutlich dominanten Resonanz von PCr sind die ATP-Multipletts, P_i , UDP und Phosphodiester (PDE) zu erkennen. Die Auflösung war auch hier groß genug, um auf eine Filterung des Zeit-Signals zu verzichten.

Bei richtiger Phasenkorrektur des Spektrums ist deutlich der Dach-Effekt in allen ATP-Multipletts zu erkennen. Das in Abb. 9.15 gezeigte Spektrum wurde auf zwei Arten ausgewertet: Zunächst wurden wie bei den Phantom-Messungen aus den Linienaufspaltungen die Kopplungskonstanten bestimmt und dann mit den Linienpositionen (welche deutlich

Tab. 9.8: Bestimmung der Ordnungsparameter aus *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektren für verschiedene Systeme gekoppelter Protonen. Unterschiedliche Methoden: ¹ Ausnutzung der Linienaufspaltung; ² Ausnutzung der Asymmetrien; ³ Ausnutzung der Phasenmodulation; ⁴ von Kreis et al. aus der Linienaufspaltung bestimmt [Kre94]; ⁵ entspricht der von Kreis et al. angegebenen Nullquanten-Modulation von 120 ms [Kre96].

Konnektivität	r_{HH} [nm]	D_0 [kHz]	SD_0 [Hz]	S [10^{-4}]
H2-H4 in Cs	0,425	1,564	$17,7 \pm 0,3$ ¹	113 ± 2
			$21,5 \pm 2,7$ ²	137 ± 17
			$6,3 \pm 0,1$ ³	$3,0 \pm 0,1$
CH_2 in (P)Cr	0,178	21,294	$4,92$ ⁴	2,3
			$5,56$ ⁵	2,6
CH_3 in (P)Cr	0,178	21,294	$1,5 \pm 0,1$ ¹	$0,7 \pm 0,05$
CH_2 in Tau	0,178	21,294	$2,9 \pm 0,1$ ¹	$1,4 \pm 0,1$

Tab. 9.9: Berechnung der Korrekturfaktoren und CGK von ATP bei 1,5 T ($\omega_0 = 25,757$ MHz) *in vivo* für das in Abb. 9.15 gezeigte Spektrum.

	δ [ppm]	$J_{i,\beta}$ [Hz]	α [°]	Korrekturterm $ \sin 2\alpha $	CGK	
					$\cos \alpha$	$\sin \alpha$
γ -ATP	-2,39	17,7	-1,448	$x = 0,051$	0,99968	-0,02528
α -ATP	-7,47	16,2	-2,116	$y = 0,074$	0,99932	-0,03692
β -ATP	-15,97	—	—	$\Sigma = 0,125$	—	—

schwächer durch die leichte Abweichung von der X-Näherung betroffen sind als die Intensitäten) die Korrekturfaktoren x, y und Σ bestimmt. Sie sind zusammen mit den entsprechenden CGK in Tab. 9.9 angegeben. Wie bei der Modell-Lösung liegen die Korrekturterme der beiden Dubletts bei 5% bzw. 7%. Bildet man Σ aus den gerundeten Werten, so stimmt auch dieser Wert mit dem der Modell-Lösung überein.

Das Ergebnis der Anpassung von Lorentz-Linien im Bereich zwischen $-0,5$ ppm und -18 ppm mit den so ermittelten Korrekturfaktoren ist in Abb. 9.16(a) gezeigt. Der kumulierte Dach-Effekt mit einem Intensitätsverhältnis von $1,12 : 2 : 0,88$ gibt die experimentelle Form des β -ATP-Signals gut wieder.

Für die zweite Auswertemethode wurden der Software keine Vorgaben gemacht. Alle Resonanzen wurden als Singulets ohne jegliche Zusammenhänge definiert. Da sich dadurch die Zahl der Freiheitsgrade erhöht, wird die Anpassung unsicherer und auch ungenauer. Abb. 9.16(b) zeigt deutlich, daß das residuale Signal nach Abzug der angepaßten Lorentz-Linien größer als bei der ersten Methode ist. Die Anpassung für die beiden Dubletts verschlechtert

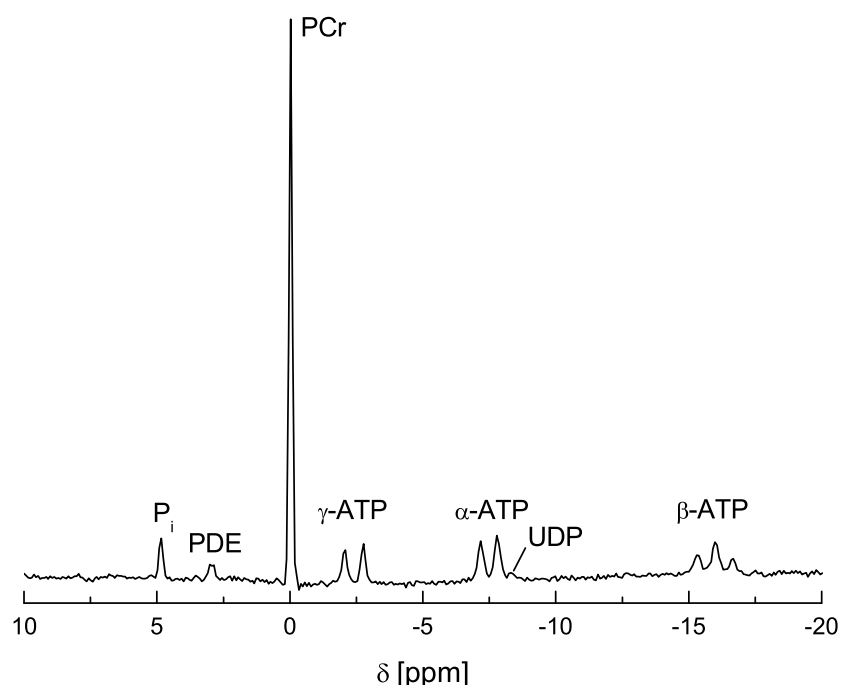


Abb. 9.15: *In-vivo*- ^{31}P -NMR-Spektrum der menschlichen Wade (CSI 8x8 Voxel auf $250 \times 250 \times 30$ mm³, $TR = 1100$ ms, mit NOE und ^1H -Entkopplung).

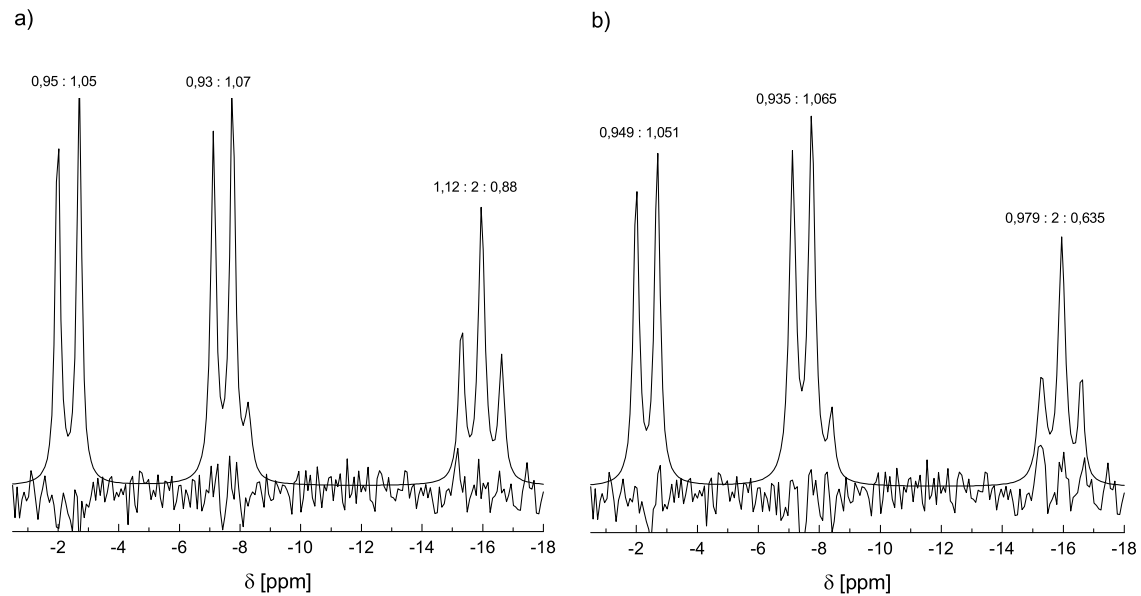


Abb. 9.16: Vergleich der verschiedenen Anpassungen an einen Ausschnitt des in Abb. 9.15 gezeigten Spektrums. Die Differenz zum gemessenen Spektrum ist mit angegeben.

sich nicht wesentlich, aber für den kumulierten Dach-Effekt ist das Intensitätsverhältnis eindeutig nicht korrekt wiedergegeben.

Die erste Methode ist also besser zur quantitativen Auswertung geeignet. Die Mittelwerte der Korrekturterme und CGK aus fünf Messungen sind in Tab. 9.10 angegeben.

9.7 Skalare Kopplung im Citrat

Zum Vergleich mit dem AMX-System des ATP wurden auch noch *In-vivo*-Spektren der stark koppelnden Cit-Protonen aufgenommen. Dies ist das einzige im lebenden Gewebe auflösbare AB-System, denn bei Tau geht die Multipllett-Struktur der skalaren Kopplung *in vivo* verloren.

Abb. 9.17 zeigt einen Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum der menschlichen Prostata. Da die Nachbearbeitung des CSI-Datensatzes nicht mit Luise erfolgte, wurde mit Origin[®] eine Integration über das gesamte Spektrum durchgeführt. Die Integrations-Kurve $\int I(\nu)d\nu$ für den Bereich $\delta = 2 - 3$ ppm ist ebenfalls in Abb. 9.17 dargestellt. Um daraus die Intensitäten der einzelnen Signal-Anteile zu bestimmen, wurde das Cit-Signal in drei

Tab. 9.10: Mittelwerte der quantenmechanischen Korrekturterme des Dach-Effekts und daraus resultierender CGK für ATP *in vivo* bei 1,5 T ($\omega_0 = 25,757$ MHz)

	δ [ppm]	$J_{i,\beta}$ [Hz]	α [°]	Korrekturterm $ \sin 2\alpha $	CGK	
					$\cos \alpha$	$\sin \alpha$
γ -ATP	-2,34(8)	17,7	-1,450(7)	$x = 0,0506(2)$	0,999680(3)	-0,0253(1)
α -ATP	-7,40(9)	16,2	-2,116(1)	$y = 0,07378(4)$	0,9993182(7)	-0,03692(2)
γ -ATP	-15,90(9)	—	—	$\Sigma = 0,1244(2)$	—	—

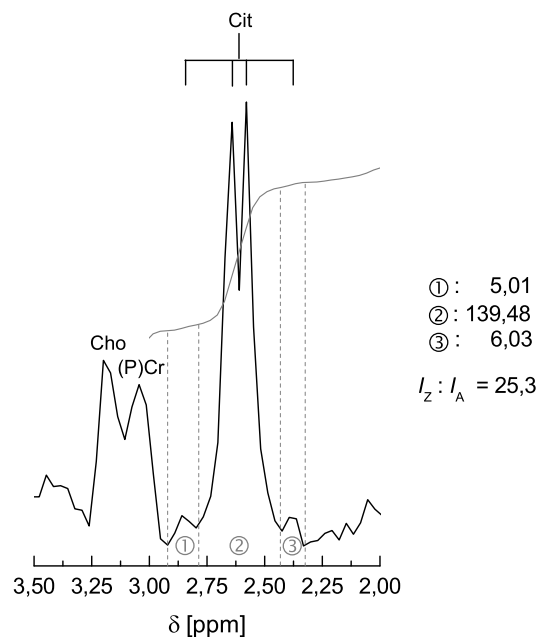


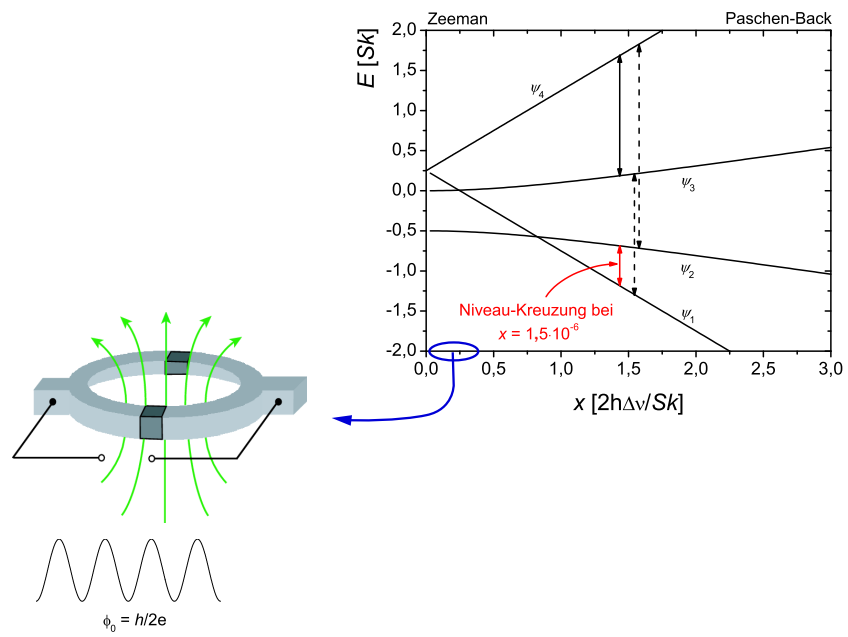
Abb. 9.17: Ausschnitt eines *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektrums der menschlichen Prostata. Der Dach-Effekt von Cit ist im Vergleich zum FID-Spektrum der Modell-Lösung etwas abgeschwächt. Das Cit-Signal wurde in drei Bereiche unterteilt, um mittels der Integrationskurve (grau) die Intensitäten der einzelnen Signal-Anteile zu bestimmen (Spin-Echo-CSI-Sequenz mit Wasser- und Fett-signal-Sättigung: $\text{VOI} = (45 \times 40 \times 55) \text{mm}^3$ mit $16 \times 16 \times 8$ Voxeln (interpoliert); $TR = 1,3 \text{ s}$, $TE = 120 \text{ ms}$, $NEX = 4$).

Bereiche unterteilt und es wurden aus den Veränderungen innerhalb dieser Intervalle die Signalintensitäten bestimmt.

Das Verhältnis $I_Z : I_A$ beträgt im Mittel 25,3 und weist somit auf einen im Vergleich zum in Abb. 8.1 gezeigten Spektrum verstärkten Dach-Effekt hin. Dies hängt mit der komplexen Phasenmodulation des AB-Systems zusammen, die zu einem verringerten Integral der äußeren Satelliten führt. Für das *In-vivo*-Spektrum wurde eine CSI-Sequenz benutzt, die im Gegensatz zu der für ^{31}P -Messungen benutzten Technik kein FID-Signal, sondern ein Spin-Echo ortskodiert (dafür wird im Prinzip die in Abb. 7.5 gezeigte Sequenz durch zwei 180° -Pulse erweitert; dazwischen sind selektive Inversionspulse zur Signalunterdrückung von Wasser und Lipiden geschaltet [Sie02]). Bei $TE = 120 \text{ ms}$ hat bereits eine deutliche Phasenmodulation stattgefunden (für die äußeren Signale ca. eine volle Periode), so daß die beiden Signale höherer Intensität getrennt aufgelöst werden können.

Teil IV

Diskussion und Zusammenfassung



NMR is still a nice tool - **and TOY!**

Kapitel 10

Diskussion der Ergebnisse

10.1 Stark gekoppelte Systeme wie Citrat und Taurin

Diese Moleküle wurden untersucht, um Systeme mit stark gemischten Eigenzuständen und deutliche Abweichungen vom Paschen-Back-Effekt zu demonstrieren. Das Feld B_0 des Tomographen reicht nicht aus, um die Spin-Spin-Kopplung vollständig aufzubrechen, so daß die Abweichungen von der X-Näherung deutlich zu Tage treten. Eine Quantifizierung der Metaboliten *in vivo* wird dadurch unter bestimmten Umständen vereinfacht.

10.1.1 Vorwissen aus den *In-vitro*-Studien

Die Effekte der Superposition von Eigenzuständen sind für Cit besonders stark. Hier entspricht die Kopplung bei 1,5 T einem Breit-Rabi-Parameter von $x = 0,52$, mit anderen Worten: die Wechselwirkungsenergie der Kerne ist ca. doppelt so groß wie der Einfluß der Elektronenhülle, und die J -Kopplung stellt somit den größeren Störoperator dar ($x = \frac{\hbar\Delta\omega}{J_{12}} < 1$). Die chemische Verschiebung erscheint sozusagen unterdrückt. Dies wird auch an Abb. 10.1 deutlich:

Für schwache Kopplungen ($\alpha \approx 0$) ist der aus der chemischen Verschiebung stammende und im Zeeman-Operator enthaltene Störterm mit dem Vorfaktor $\Delta\omega$ dominant. Mit wachsender Kopplungsstärke entwickelt sich die Spin-Spin-Kopplung zum dominanten Störterm, weil einerseits der Term $\cos\alpha$ gegen Null geht, aber auch der zugehörige Vorfaktor $\Delta\omega$ klein gegen den Vorfaktor der Kopplung wird.

Der nun dominante Flip-Flop-Operator ist auch für die Asymmetrien in den Spektren (Abb. 10.2) entscheidend. Die durch das aufkommende Interkombinationsverbot begünstigten Resonanzen werden in Richtung der ursprünglichen Resonanzfrequenzen ω_1 bzw. ω_2 verschoben. Da sich diese nicht mehr stark unterscheiden ($\Delta\omega \rightarrow 0$), entsteht im Fall des Cit eine intensive Zentral-Resonanz und zwei sehr schwache Satelliten. Der Effekt hat ähnliche Wirkung wie eine heteronukleare Entkopplung zur Vereinfachung von Spektren in Doppelresonanz-Experimenten: Es kommt zu einer Konzentration des Signals in einem schmalen spektralen Bereich. Man könnte von einer Art "Entkopplung" vom Einfluß der Elektronenhülle sprechen. Für Cit ergibt sich aus x mit (5.1) eine Verschiebung von $A_p^J \approx 0,304 \cdot J_{12} = 0,072$ ppm. Die Mittelpunkte im gemessenen Spektrum sind um 0,068 ppm bzw. 0,070 ppm nach außen verschoben. Innerhalb der erreichbaren Genauigkeit von 0,004 ppm stimmen also Theorie und Experiment überein.

Bei Tau ist dagegen mit $x = 1,64$ der Einfluß der Elektronenhülle gegenüber der Wech-

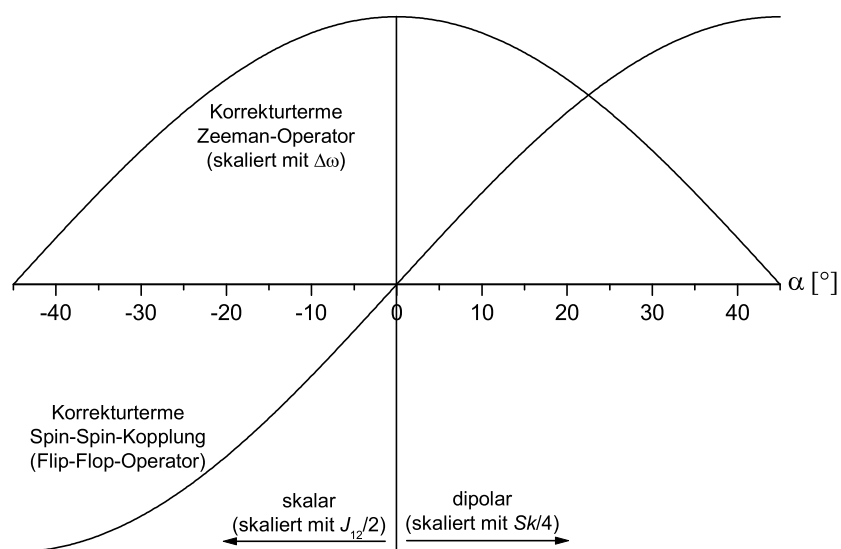


Abb. 10.1: Variation der winkelabhängigen Korrekturterme für die Eigenzustände ψ_2 und ψ_3 in gekoppelten Spin-Systemen

selwirkung der Kerne dominant. Daher ist die "Entkopplung" nicht ganz so effektiv, weil einerseits das Interkombinationsverbot noch nicht so ausgeprägt ist und andererseits die Multipletts nicht ganz so dicht nebeneinander liegen. Es ist noch eindeutig eine breite Multiplett-Struktur aufzulösen. Genauso wie bei Cit sind die Asymmetrien aufgrund der verhältnismäßig kleinen Breit-Rabi-Parameter im Vergleich zur residualen dipolaren Kopplung des Cs ($A_P^D \leq 0,01$ ppm) aber immer noch stärker ausgeprägt. So liegen die Mittelpunkte der beiden Multiplett-Hälften des Tau bei ca. 3,195 ppm bzw.

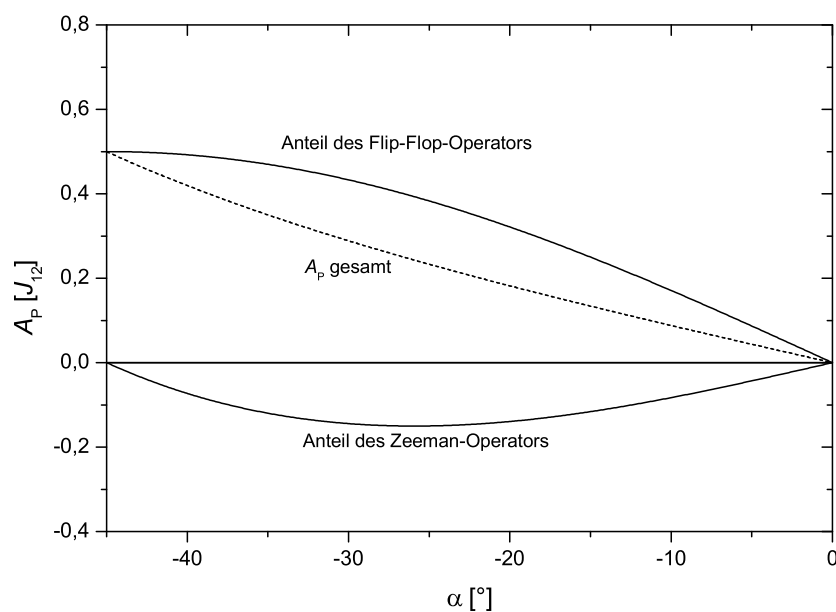


Abb. 10.2: Zusammensetzung des Asymmetrie-Parameters nach Gl. (2.19) aus den Anteilen der chemischen Verschiebung im Zeeman-Operator und des Flip-Flop-Operators der Spin-Spin-Kopplung.

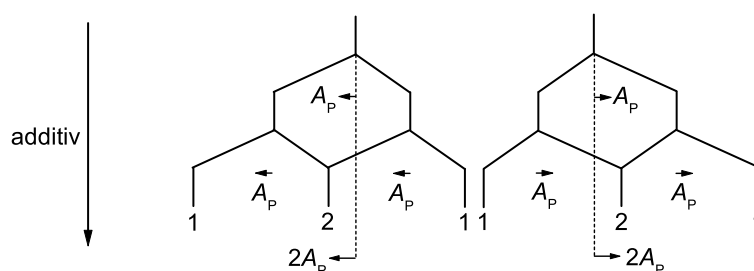


Abb. 10.3: Einfachste Form der Näherung für eine kumulierte Asymmetrie am Beispiel zweier Tripletts koppelnder Methylengruppen.

3,463 ppm. Sie sind damit im Mittel um ca. 0,049 ppm nach außen gegen die Resonanzfrequenzen verschoben, die man mit einem Hochfeld-Spektrometer beobachten würde. Der theoretische Wert, der sich zunächst direkt aus x ergibt, beträgt $A_P^J \approx 0,140 \cdot J_{12} = 0,015$ ppm. Nun muß jedoch berücksichtigt werden, daß es sich nicht mehr um Dubletts handelt. Näherungsweise kann die Asymmetrie des Tripletts durch eine konsekutive Aufspaltung mit additiver Asymmetrie (ähnlich dem kumulierten Dach-Effekt) beschrieben werden. Abb. 10.3 verdeutlicht, daß die Kopplung mit einem der Protonen aus der benachbarten Methylen-Gruppe zunächst ein Dublett mit der erwarteten Asymmetrie erzeugt. Die Linienaufspaltung durch das zweite Proton spaltet das asymmetrische Dublett erneut mit einer Verschiebung nach außen auf, so daß sich die Asymmetrie des gesamten Multipletts zu $2A_P$ addiert.

Diese sehr starke Näherung gilt natürlich nur, solange die Entartung der Übergänge noch nicht deutlich aufgehoben ist, also zusätzlich zu den zwei Tripletts auftretende Signale vernachlässigt werden können. Bei Tau ist jedoch schon eindeutig in jeder Signal-Gruppe eine vierte Resonanz zu sehen. Damit wird sicherlich die Bestimmung von A_P erschwert. Es kommt hinzu, daß die während TE stattfindende Phasenmodulation einzelne Signale immer auf der dem Zentrum zugewandten Flanke beeinflusst und der Linienabstand somit größer erscheint, als er in Wirklichkeit ist. Insofern erklärt der Wert von $2A_P$ noch nicht die experimentelle Beobachtung, aber mit Abb. 10.3 wird deutlich, daß Multipletts höherer Ordnung eine stärkere Asymmetrie aufweisen.

Die Experimente zeigen für beide Spin-Systeme, daß die Intensitäten weitaus stärker von den Abweichungen der X-Näherung als die Linienpositionen betroffen sind. Wie die Simulation verdeutlichte, kommt es aufgrund der realen Linienbreite und der Diskretisierung des Spektrums zu einer Abweichung von dem Intensitätsverhältnis, das sich direkt mit (2.20) und (2.21) aus dem Mischungswinkel ergibt: der Effekt wird etwas abgeschwächt, ist aber dennoch auf jeden Fall immer größer als die Veränderung in den Linienpositionen. Damit läßt sich abschätzen, daß für schwächere Wechselwirkungen, wie etwa im ATP, zunächst nur die quantenmechanische Korrektur der Linienintensitäten zu berücksichtigen ist und die Verschiebung der Resonanzen u. U. vernachlässigt werden kann.

Die Ausbildung einer ionischen Bindung von Tau mit den hydrophilen Anteilen der Phospholipide war mit der NMR leider nur andeutungsweise möglich. Die chemische Verschiebung wurde offensichtlich nicht durch eine mögliche ionische Bindung beeinflusst, sondern höchstens die zu einem Signalverlust führende Moleküldynamik. Weitere Messungen mit verschiedenen Konzentrationen des Lipids zur zunehmenden Ausbildung eines immobilen Tau-Kompartiments könnten hier für Klärung sorgen. Die chemischen Strukturen lassen

den hier erhaltenen Hinweis auf eine Bindung an die Zellmembran aber durchaus plausibel erscheinen, so daß für Tau im Gegensatz zu Cit eine Kombination aus dipolaren und skalaren Kopplungen *in vivo* zu berücksichtigen ist.

10.1.2 Auswirkungen der Effekte *in vivo*

Die erwarteten spektralen Muster im Bereich des Zeeman-Gebiets bestehen für Cit aus zwei Dubletts bzw. zwei Triplets für Tau. Zwar kommt es aufgrund der Abweichung von der X-Näherung bei 1,5 T zur Aufhebung der Entartungen der Übergänge im A_2B_2 -System des Tau und damit zu einer höheren Multiplett-Struktur, die erreichbare Linienbreite und die spektrale Auflösung lassen aber *in vivo* nur die Detektion einer Signal-Gruppe bei 3,35 ppm zu. Für Cit besteht das Phänomen zusätzlich auftretender Signale nicht, aber auch hier kommt es zu einer Konzentration der Signalintensität. Dies erleichtert die Detektion bei relativ schwachen *In-vivo*-Konzentrationen. Hochfeld-MR-Tomographen würden zwar zu einer verbesserten spektralen Auflösung führen, der Übergang zu reinen Zeeman-Spektren würde das Signal der Metaboliten aber zunehmend auf eine größere spektrale Breite (in Hz) verteilen.

Für Tau besteht im menschlichen Muskelgewebe das Problem, daß (im Gegensatz z. B. zur Ratte) das dominante Cho-Signal bei 3,2 ppm die Auflösung der Tau-Resonanz erschwert. Hier ist die residuale dipolare Kopplung von Vorteil, die sich durch die Fixierung des Moleküls an den hochgradig anisotrop orientierten Zellmembranen erklären ließe. Sie führt zwar zu einer Aufspaltung, aber gleichzeitig zu einer deutlichen Unterscheidung vom Cho-Signal. Würde die starke skalare Kopplung nicht zunächst ein einzelnes breites Signal erzeugen, so würden in Verbindung mit der dipolaren Kopplung insgesamt vier verhältnismäßig schwache Resonanzen *in vivo* auftreten. Die Kombination aus den quantenmechanischen Effekten beider Wechselwirkungen vereinfacht somit die Analyse der Spektren. Das Cit-Spektrum ist dagegen nur durch die skalare Kopplung geprägt. Die Frage nach einem möglichen Mechanismus der Immobilisierung (wie etwa bei Tau durch Wechselwirkungen mit Makromolekülen) ist insofern schwer zu klären, als daß Cit im hochgradig strukturierten Skelettmuskel nicht detektierbar ist. Prostata-Gewebe als "Matrix" zur Untersuchung auf residuale dipolare Kopplungen ist aufgrund seiner unzureichend ausgeprägten Anisotropie nicht geeignet (hinzu kommen erschwerend Bewegungsartefakte im Bauchraum).

Das mit der CSI-Sequenz aufgenommene *In-vivo*- ^1H -NMR-Spektrum von Cit weist aufgrund der Lokalisationsmethode leichte Abweichungen vom mit FID-Technik aufgenommenen Spektrum auf. Durch die Phasenmodulation verändert sich sowohl scheinbar die spektrale Auflösung als auch das Ausmaß des Dach-Effekts. Die komplexe Phasenmodulation des AB-Systems führt dazu, daß die kleinen Satelliten bereits mehr als eine komplette Periode durchlaufen haben. Die Modulation der intensitätsreichen Signale erfolgt dagegen bei 1,5 T verlangsamt. Außerdem bewirkt der Einfluß der Echozeit, daß die Zentralresonanz bei PRESS-Lokalisation ab ca. 50 ms als Dublett aufgelöst werden kann. Somit entspricht das in Abb. 9.17 dargestellte Spektrum den in früheren Arbeiten untersuchten Verläufen für $TE = 120$ ms [Gra99]. Der Dach-Effekt wurde dabei nicht näher quantifiziert, aber aufgrund der Phasenmodulation scheint ein überproportional starker Signal-Verlust bei den Satelliten vorzuliegen. Daher ist das Verhältnis $I_Z : I_A$ höher als bei der FID-Messung an der Modell-Lösung. Wegen der deutlichen Veränderungen des Signal-Verlaufs während TE kommen für eine *In-vivo*-Untersuchung nur bestimmte Zeit-Intervalle in Frage. In Verbin-

derung mit einer eventuellen Detektion von Lactat wurde daher $TE = 135$ ms vorgeschlagen [Hee97].

10.2 Feinstruktur des ATP-Spektrums

Das Phänomen des Dach-Effekts findet zwar in der analytischen Chemie hinreichend Beachtung, in der *In-vivo*-NMR-Spektroskopie ist es jedoch bislang weitgehend vernachlässigt worden. Dies liegt daran, daß bei 1,5 T auch in Modell-Lösungen die spektrale Auflösung nur für zwei Metaboliten ausreichend ist, um den Effekt quantitativ zu untersuchen: Cit und ATP. Für ersteren ist er so stark ausgeprägt, daß *in vivo* die äußeren Satelliten nicht immer zu erkennen und die Unterstruktur der Zentral-Resonanz auch nur für $TE > 50$ ms und hoher Auflösung zu beobachten ist. Es reicht daher oft, für die Quantifizierung mittels Anpassung von Gauss-Linien von nur einem Signal auszugehen.

Anders ist dies bei ATP, das auch *in vivo* drei aufgelöste Multipletts zeigt. Hier wurde der Effekt bisher völlig vernachlässigt, und aktuelle Auswerte-Methoden gehen für die Dubletts fälschlicherweise von einem Intensitätsverhältnis von 1 : 1 aus [Van01]. Für qualitativ hochwertige Spektren ist es jedoch möglich, eine bessere Linienanpassung durch entsprechendes Vorwissen über den Dach-Effekt zu erreichen.

10.2.1 Vorwissen aus den *In-vitro*-Studien

Die Messungen an den ATP-Modell-Lösungen haben gezeigt, daß die Abweichung von der X-Näherung für ATP bei 1,5 T nicht sehr ausgeprägt ist. Zusammen mit den Erkenntnissen über die stark gekoppelten Systeme ist daher klar, daß die quantenmechanischen Korrekturen vor allem für die Linienintensitäten zu berücksichtigen sind.

Generell lassen sich Veränderungen in der Linienposition aus den vier Resonanzen $a - d$ eines AM- oder AB-Systems erkennen, indem man den Abstand der Dublett Mittelpunkte

$$\Delta\nu' = \frac{1}{2}((\nu_a - \nu_b) - (\nu_c - \nu_d))$$

mit dem wahren Abstand

$$\Delta\nu = \sqrt{|(\nu_a - \nu_d)(\nu_b - \nu_c)|}$$

vergleicht [Fri98]. Diese Methode versagt hier aber wegen der multiplen Aufspaltung der β -Resonanz. Veränderungen können daher nur über den Mischungswinkel nach Analyse der Intensitäten abgeschätzt werden: Der Mischungswinkel wird nicht kleiner als $-2,1^\circ$ (dies entspricht einem Breit-Rabi-Parameter $x = 13,6$), weshalb die Asymmetrie stets kleiner als $A_P^J = 0,018 \cdot J_{i\beta}$ ist. Die maximalen Kopplungskonstanten betragen 20 Hz, also gilt $A_P^J/h \leq 0,36$ Hz (ca. 0,014 ppm). Da dies unterhalb der Auflösungsgrenze liegt, ist es gerechtfertigt, als Linienposition die Dublett-Mitte anzunehmen.

Der Einfluß der Drehung im Hilbert-Unterraum auf die Intensitäten beträgt unter diesen Bedingungen maximal 7% für ein einzelnes Dublett. Daher kann man auch die in der Theorie angeführte Näherung einer Addition der Korrekturfaktoren für die Beschreibung des kumulierten Dach-Effekts benutzen.

Die Digitalisierung der Spektren führt dazu, daß die Spitzen der Resonanzen nicht immer optimal mit den angepaßten Lorentz-Linien übereinstimmen. In den meisten Bereichen ist jedoch eine sehr genaue Anpassung möglich gewesen, so daß die theoretisch erwartete Asymmetrie der Intensitäten experimentell bestätigt wurde. Die Beeinflussungen des

Dach-Effekts durch Ansäuerung oder Komplexbildung des Moleküls mit Mg(II)-Ionen hat einen ähnlichen Effekt: beide Maßnahmen führen zu einer Abschwächung der Korrekturfaktoren und somit zu einer geringeren effektiven Kopplungsstärke. Der Versuch einer Erklärung der Effekte ist jedoch schwierig. In beiden Experimenten spielt die Wechselwirkung mit Kationen eine Rolle, aber der Einfluß auf die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten ist unterschiedlich. Es ist auch bekannt, daß der Einfluß einer Komplexbildung auf die ATP-Signale schwer vorhersagbar ist. Dazu gehört u.a. das Phänomen, daß die Resonanzen, die am stärksten auf die Komplexbildung reagieren, nicht unbedingt zu den Kernen gehören, die als Liganden fungieren [Jaf78]. Die Details der Komplexbildung von ATP sind also noch nicht vollständig geklärt.

Es bleibt festzuhalten, daß Korrekturen in der Feinstruktur des Spektrums am deutlichsten in neutraler Lösung ohne Kationen auftreten. Damit liegt eine Abschätzung für das Ausmaß des Effektes *in vivo* vor, und die angesprochenen Näherungen können auch für die Auswertung der an Probanden aufgenommenen Spektren gemacht werden.

10.2.2 Auswirkungen der Effekte *in vivo*

Die Vernachlässigung des Dach-Effekts in Spektren aus lebendem Gewebe macht sich oft schon in einer unzureichenden Phasenkorrektur bemerkbar. Diese werden teilweise so dargestellt, daß der kumulierte Effekt, der eigentlich der stärkere ist, gar nicht sichtbar ist. Dies liegt daran, daß besonders das β -ATP-Signal aufgrund seines großen Abstandes zum PCr-Signal eine hinreichend starke lineare Phasenkorrektur benötigt. Abb. 10.4 verdeutlicht, daß eine zu kleine lineare Phase die Intensitätsverhältnisse des dublierten Dubletts nicht adäquat wiedergibt. Eine genaue Nachbearbeitung der Spektren ermöglicht aber die Darstellung der auch bei diesen Spektren schon sichtbaren quantenmechanischen Feinstruktur.

Für die Auswertung der fünf Probanden-Messungen ergab sich im Mittel eine lineare Phasenkorrektur von $(-160,0 \pm 4,6)^\circ / 10$ ppm. Mit dem Vorwissen aus den *In-vitro*-Studien wurde A_P vernachlässigt. Die Linienaufspaltungen waren unerwartet konstant und zeigten bei den fünf Probanden keine statistische Varianz. Interindividuelle Änderungen der Korrekturfaktoren x, y und Σ sind daher nur auf Variationen in den Linienpositionen zurückzuführen.

Da auch diese mit guter Genauigkeit bestimmt werden konnten (ca. 0,09 ppm), liegt der Fehler der Korrekturfaktoren bei höchstens $2 \cdot 10^{-4}$, also zwei Größenordnungen unter der Genauigkeit der Auswerte-Software. Als Vorwissen für die Auswertung von *In-vivo*-Spektren kann man daher mit folgenden Werten für ATP bei 1,5 T arbeiten: $x = 5\%$, $y = 7\%$ und $\Sigma = 12\%$.

Diese Werte liegen recht dicht an denen der neutralen Modell-Lösung ohne Mg²⁺-Ionen. Zwar ist durch die Komplexbildung von ca. 70% des ATP im Muskelgewebe [Bac95] die Kopplungskonstante geringer, die β -ATP-Resonanz ist *in vivo* aber zu noch höheren Frequenzen verschoben, als sie das in der sauren Lösung mit $[\text{MgATP}]^{2+}$ war. Dadurch ist der Dach-Effekt trotzdem recht stark ausgeprägt und sollte bei der Analyse hochaufgelöster Spektren nicht vernachlässigt werden. Die Qualität der Anpassung von Lorentz-Linien an das gemessene Spektrum läßt sich durch die Berücksichtigung der Korrekturfaktoren verbessern, und es wird dadurch eine genauere Quantifizierung ermöglicht.

Die Bestimmung des kumulierten Dach-Effekts als direkte Summe $\Sigma = x + y$ der Asymmetrien in den Dublett-Signalen ist aus folgendem Grund zulässig: Die β -Resonanz stammt

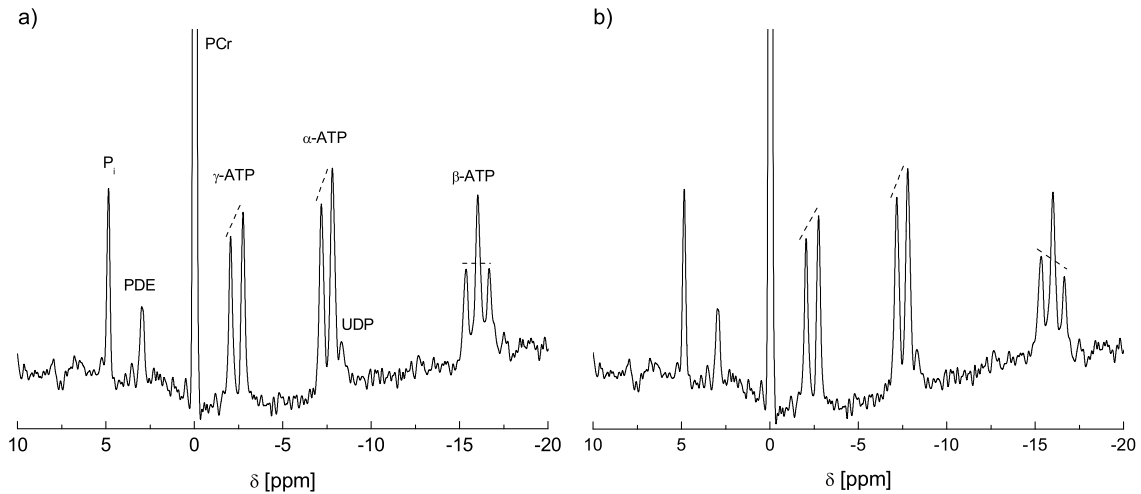


Abb. 10.4: Vernachlässigung des Dach-Effekts aufgrund einer unzureichenden Phasenkorrektur in *In-vivo*- ^{31}P -NMR-Spektren der Wadenmuskulatur. In (a) beträgt die lineare Phase $-150^\circ/10\text{ ppm}$. Der kumulative Dach-Effekt wird dadurch praktisch unsichtbar. (b) Eine lineare Phase von $-160^\circ/10\text{ ppm}$ gibt die Feinstruktur der Resonanzen richtig wieder.

nur von ATP, zu den Dubletts trägt jedoch auch ADP bei. Das 2-Spin-System zeigt zwar vergleichbare Kopplungskonstanten, aber $\Delta\omega$ beträgt nur noch ca. 5 ppm, so daß es zu einer stärkeren Drehung des Hilbert-Unterraums und somit zu einem stärkeren Dach-Effekt kommt. Allerdings ist *in vivo* das Gleichgewicht der Kreatin-Kinase-Reaktion so verschoben (s. Kap. 6.1), daß das Verhältnis $[\text{ATP}]:[\text{ADP}]$ ca. 1:308 beträgt [Str90]. Die ADP-Signale machen so nur ca. 3,25‰ der Dubletts aus und können daher vernachlässigt werden. Der beobachtete Dach-Effekt ist dann praktisch ausschließlich auf das AMX-System des ATP zurückzuführen, für das die in der Theorie genannten Näherungen zulässig sind.

Die CGK konnten mit unterschiedlicher Präzision bestimmt werden. Prinzipiell ist der Koeffizient $\sin 2\alpha$ wegen des steileren Verlaufs der sin-Funktion um $\alpha = 0$ stärker fehlerbehaftet als das Komplementär $\cos \alpha$. Außerdem ist von beiden Resonanzen der Mischungswinkel für den α - ^{31}P -Kern genauer bestimmbar als für das andere Dublett. Die Unsicherheit in den CGK schwankt zwischen $7 \cdot 10^{-7}$ und $1 \cdot 10^{-4}$. Die Unterschiede zu den symmetrisierten Wellenfunktionen sind sehr gering, aber da die CGK für die Kopplung α - γ stärker von 1 bzw. 0 abweichen, wird deutlich, daß dies trotz der kleineren Kopplungs-

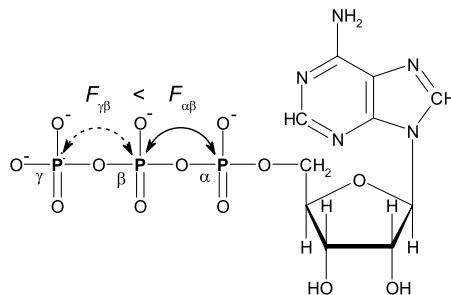


Abb. 10.5: Unterschiede der residualen ^{31}P -Gesamt-Spins F im ATP-Molekül

konstante die effektivere Wechselwirkung ist. Der Gesamt-Spin F ist bei diesem System weniger stark durch die Kopplung an das Grundfeld aufgebrochen (Abb. 10.5).

10.2.3 Konsequenzen einer leichten Drehung der Eigenbasis

Die Experimente an ATP zeigen, daß die Linienintensitäten immer in stärkerem Ausmaß von den Abweichungen von der X-Näherung betroffen sind als die Übergangsfrequenzen und daß daher bei leichten Drehungen der Eigenbasis die Korrekturen für die Linienpositionen vernachlässigt werden können. Dies wird auch durch folgende Abschätzung leicht verständlich:

Die Verschiebung der Linienpositionen ist durch die Kopplungsstärke beeinflusst, weshalb A_P^J mit J_{12} skaliert ist (s. (2.19)). Abb. 5.3 verdeutlicht, daß der Asymmetrie-Parameter aber maximal $\frac{1}{2}J_{12}$ betragen kann. In AX-Systemen ist $J_{12} \ll \Delta\omega$, also ist der Fehler in $\Delta\omega$ bei kleinen Mischungswinkeln klein gegenüber dem Wert, der sich in einer ersten Abschätzung aus der Mitte der Multipletts ergibt, und die Verschiebung der Linienpositionen kann vernachlässigt werden.

Für das Beispiel ATP gilt z. B. (bei pH = 7 und ohne Mg) selbst für die stärkere der beiden Kopplungen $J_{\alpha\beta} \approx 20$ Hz und $\Delta\omega \approx 10,7$ ppm (bei der hier benutzten Feldstärke also 274,3 Hz). Im Vergleich zu den Multipllett-Mittelpunkten läge die Position des α -Dubletts also höchstens 10 Hz weiter rechts, die des β -"Tripletts" ca. 20 Hz weiter links (kumulativer Effekte durch sukzessive Aufspaltung). Demnach würde sich der Frequenz-Abstand um 30 Hz verkleinern, und der Extremfall $\frac{20 \text{ Hz}}{244,3 \text{ Hz}}$ entspräche einem Mischungswinkel $\alpha \approx 4,7^\circ$. Daraus ergibt sich aber eine maximale Verschiebung von $A_P^J = 0,041 \cdot J_{12}$, also 0,8 Hz bzw. 0,03 ppm. Dies liegt eindeutig unter der spektralen Auflösung.

Die Änderung der Intensitäten ist dagegen nicht durch einen Wert wie J_{12} oder Sk skaliert und kann bis zu 100% des ursprünglichen Wertes betragen. Daher bewirken auch schon kleine Mischungswinkel einen sichtbaren Effekt.

10.3 Erklärung des Carnosin-Spektrums

Die Unterschiede zwischen den ^1H -NMR-Spektren einer neutralen Cs-Modell-Lösung und den aus dem *M. gastrocnemius* aufgezeichneten Spektren sind eklatant. Die besonderen Verhältnisse *in vivo* führen zu markanten Effekten, die sich auf die Faser-Struktur des Gewebes zurückführen lassen und somit einen aufschlußreichen Vergleich zwischen der Molekulardynamik in wäßriger Lösung und im lebenden Gewebe ergeben.

10.3.1 Skalare Kopplungen und detektierbare Protonen in den *In-vitro*-Studien

Die skalaren Kopplungen, die sich aus den ^1H -NMR-Spektren der Modell-Lösungen ergeben, treten nur im aliphatischen Bereich auf. Für den Imidazol-Ring ist keine signifikante J -Kopplung zu erkennen – weder über eine Linienaufspaltung noch über eine Phasenmodulation. Dies entspricht auch der Erwartung, denn obwohl die π -Elektronen des Rings prinzipiell eine Kopplung begünstigen, ist der Abstand zwischen den Ringprotonen H2 und H4 zu groß (vier Bindungen), und es kann angenommen werden, daß eine Kopplung des Typs 4J die beobachteten Linienaufspaltungen nicht verursachen kann.

Das einzig aufgelöste Multipllett sind die Signale der äußeren Ala-CH₂-Gruppe (E_{1-3}). Sie zeigt bereits ein Spektrum 2. Ordnung mit $x = 5,87$ (entspricht $\alpha = -4,83^\circ$). Die

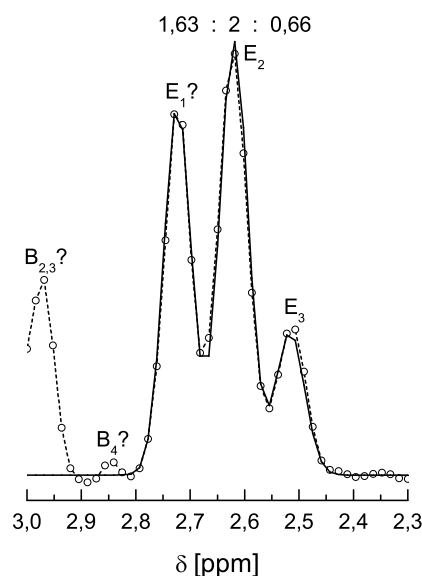


Abb. 10.6: Anpassung von Gauss-Linien an das Triplet der mit E bezeichneten Methylen-Gruppe in Cs (Ausschnitt aus dem Spektrum in Abb. 8.14). Die Intensitätsverhältnisse entsprechen nicht vollständig den erwarteten Werten. Mögliche Ursache ist eine nicht korrekte Zuordnung der Resonanzen.

Abweichung von der X-Näherung ist also stärker als beim ATP, aber noch nicht so ausgeprägt wie bei Tau. Dies sieht man auch daran, daß die Entartung der Übergänge noch weitgehend erhalten ist, denn es können keine zusätzlichen Signale aufgelöst werden. Der Korrekturfaktor für die Intensitäten beträgt in der ersten Stufe 17%. Durch den kumulativen Effekt müßten die Intensitätsverhältnisse im Triplet dann $1,34 : 2 : 0,66$ betragen. Eine Anpassung des Multipletts mit drei Gauss-Linien ergibt jedoch ein Verhältnis von $1,63 : 2 : 0,66$ (Abb. 10.6). Während also auf der Hochfeld-Seite die Resonanzen im erwarteten Verhältnis stehen, ist das Signal am linken Rand unerwartet hoch. Dies deutet darauf hin, daß die Zuordnung der Resonanzen B_{1-4} falsch sein könnte und E_1 mit einem Teil des B-Multipletts zusammenfällt (das kleine Signal links vom Triplet wäre dann nicht B_4). Dieses Problem verdeutlicht, daß Kenntnisse über den Dach-Effekt helfen können, die Analyse eines Spektrums mit vielen Überlappungen bei geringen Feldstärken aufzuklären. Eine genauere Analyse der einzelnen Multipletts ist in diesem Zusammenhang jedoch wenig ergiebig.

Von den austauschbaren Protonen sind unter physiologischen Bedingungen keine scharfen Resonanzen zu erkennen. Entweder sind die entsprechenden Stellen bei $\text{pH} = 7,08$ nicht ausreichend protoniert, oder die chemische Austauschrate ist zu hoch. Erst eine Ansäuerung liefert bei 8 ppm ein Signal, das mit Hilfe des NAA-Spektrums dem Proton der Peptid-Bindung zugeordnet werden kann. Die geringe Differenz in der Dublett-Aufspaltung (0,5 Hz) ist auf strukturelle Unterschiede des Moleküls zurückzuführen.

10.3.2 Nachweis residueller dipolarer Kopplung *in vivo*

Die im aromatischen Bereich des Spektrums beobachteten Satelliten X1–X4 geben Anlaß zu der Vermutung, daß eine residuale dipolare Kopplung zwischen den Ringprotonen H2 und H4 vorhanden ist. Der Nachweis dieser Wechselwirkung kann aufgrund der schwachen

Cs-Resonanzen und der damit verbundenen langen Meßzeiten jedoch nicht über die sonst übliche Drehung der Wade im Grundfeld nachgewiesen werden. Auch kommt erschwerend hinzu, daß die kurzen T_2 -Zeiten [Bru91] (H4 verschwindet nach ca. 40 ms) einen Nachweis möglicher Kopplungen im aromatischen Bereich mittels der Phasenmodulation unmöglich machen. Ebenso sind 2D-Spektroskopien wegen der langen Meßzeit ungeeignet für Untersuchungen an Probanden. Es mußte daher eine andere Methode ausgenutzt werden, die die Spektren auf die Charakteristika dieser Wechselwirkung untersucht.

Bevor eine Quantifizierung der zum Nachweis geeigneten Effekte vorgenommen wurde, ist es sinnvoll zu prüfen, inwieweit dieses Molekül überhaupt von solch einer Kopplung betroffen sein kann bzw. welche alternativen Erklärungen für die Satelliten herangezogen werden könnten.

In einer aktuellen Arbeit wurden zusätzliche Signale auf der Niederfeld-Seite der aromatischen Cs-Resonanzen beobachtet [Dam03]. Als Erklärung wurde dabei die unterschiedliche Ansäuerung verschiedener Muskelfaser-Typen nach Kontraktion angeführt. Dieser Effekt kann für das Auftreten von X1–X4 als Ursache aus zwei Gründen ausgeschlossen werden: Erstens wurden Spektren im Ruhezustand aufgenommen, so daß der pH-Wert konstant bleibt, und zweitens traten die Satelliten auf beiden Seiten von H2 und H4 auf, während bei sinkendem pH-Wert nur Signale auf der Niederfeld-Seite beobachtet wurden.

Aus zahlreichen Arbeiten ist bekannt, daß bei *In-vivo*-Studien die Anisotropie der Muskelfaser-Struktur zur orientierungs-abhängigen Effekten in ^1H -NMR-Spektren von (P)Cr [Kre94, Kre96, Kre97, Ntz97], Tau [Zan00] und Lactat [Asl99] führt. Diese Phänomene konnten als residuale dipolare Kopplungen identifiziert werden. Gleichzeitig wurden strukturbedingte Suszeptibilitäts-Variationen als Erklärung ausgeschlossen [Asl99, Kre96]. Demnach erscheint es für Cs plausibel, daß ein Teil der Moleküle einer eingeschränkten Bewegung unterliegt und die Satelliten durch eine residuale direkte Spin-Spin-Kopplung verursacht werden. Die beiden Haupt-Resonanzen bei 7 ppm und 8 ppm stammen von einem frei beweglichen Anteil an Molekülen.

Eine ähnliche Beobachtung – zwei Kompartimente, bei dem eines nur skalare, das andere skalare und dipolare Kopplung aufweist – wurde für Lactat berichtet und einem intra- bzw. extrazellulären Anteil dieses Metaboliten zugeschrieben [Asl99]. Cs besitzt dagegen aufgrund seiner Eigenschaft als Zwitterion eine schlechte Permeabilität bezüglich der Zellmembran und kann daher als rein intrazelluläre Substanz angesehen werden. Die sich in der Mobilität unterscheidenden Kompartimente könnten im Bereich zwischen Myofibrillen und an anderen Stellen im Cytoplasma lokalisiert sein.

Verschiedene Proton-Proton-Wechselwirkungen können die beobachtete Linienaufspaltung verursachen. ALONSO et al. beobachteten *ex vivo* Cross-Peaks in zweidimensionalen Spektren von Cs, die auf eine Korrelation zwischen H2 und H4 hindeuten [Alo89, Alo90]. Interessanterweise beobachteten sie außerdem eine skalare Wechselwirkung in Modell-Lösungen [Alo89]. Deren Kopplungskonstante muß jedoch unter 2 Hz liegen, denn bei einer solchen spektralen Auflösung wurden in einer anderen Arbeit nur Kopplungen im aliphatischen Bereich beobachtet [Bro79b]. Eine signifikante skalare Kopplung H2-H4 kann daher in Übereinstimmung mit der in unseren Experimenten nicht beobachteten Phasenmodulation ausgeschlossen werden. Ebenso kann eine J -Kopplung der beiden Ringprotonen mit der benachbarten N^3H -Gruppe ausgeschlossen werden, denn dieses Proton unterliegt einem raschen chemischen Austausch und ist nicht detektierbar (s. u.; für His geht man für die Kopplung mit N^1H von $J \approx 1$ Hz aus [Gov00]). Insgesamt können J -Kopplungen die Resonanzen X1–X4 in den lokalisierten ^1H -NMR-Spektren des *M. gastrocnemius* nicht

Tab. 10.1: Negative Cross-Peaks (ROE-Peaks) in HOHAHA-Experimenten an intaktem *M. gastrocnemius* von Fröschen nach [Alo90]. >NH bezeichnet das Amino-Proton des Imidazol-Rings, alle anderen Bezeichnungen entsprechend Abb. 8.14.

	H2	H4	>NH	A,B	D	E
H2		1				
H4	1			2		
>NH					3	4
A,B		2				
D			3			
E			4			

erklären.

Spektren von exzidiertem, intaktem Gewebe des *M. gastrocnemius* von Fröschen zeigten im Vergleich zu Gewebe-Extrakt oder Modell-Lösungen zusätzliche Resonanzen in homonuklearen Hartmann-Hahn (HOHAHA) Experimenten [Alo90]. Die einzige Erklärung hierfür ist Overhauser-Verstärkung im rotierenden Koordinatensystem (ROE); die entsprechenden Konnektivitäten sind in Tab. 10.1 angegeben. ROE-Peak #4 ist eine Konsequenz der skalaren Kopplung ($J \approx 6,3$ Hz) zwischen den Protonen D und E in Kombination mit ROE-Peak #3. Beide wurden in der Original-Arbeit der NH-Gruppe des Imidazol-Rings zugeordnet (welche normalerweise nicht detektiert werden kann). Außer der Wechselwirkung zwischen H4 und den Histidinyll- β -CH₂-Protonen (A, B) besteht demnach auch eine direkte Kopplung zwischen den zwei Ringprotonen H2 und H4.

ROE-Peaks haben nur für den Fall langer Korrelationszeiten τ_c gleiche Intensitäten wie HOHAHA Kohärenz-Transfer-Resonanzen. Aus diesem Grund muß die Bewegung von Cs *in vivo* eingeschränkt sein (in [Alo90] wird eine Bindung von Cs mit einem Protein an den Myofibrillen vorgeschlagen). Deshalb sollte auch eine Linienaufspaltung oder zumindest -verbreiterung in 1D-Spektren sichtbar sein.

Auf diese Weise kann die Analyse der ROE-Peaks bei der Erklärung der beobachteten Satelliten hilfreich sein. Die Verschiebung des angenommenen Dubletts X1, X2 zu niedrigeren Feldern (relativ zu H2) deutet auf eine Konnektivität der Resonanz bei $\delta = 8$ ppm mit einer Resonanz auf der Hochfeld-Seite hin. Dies steht in Übereinstimmung mit ROE-Peak #1. In diesem Fall resultieren die Satelliten X1, X2 aus der Wechselwirkung zwischen H2 und H4 – ein Argument, welches auch durch die ähnlichen Linienaufspaltungen $\Delta\nu_{1,2}$ und $\Delta\nu_{3,4}$ (Tab. 9.5) und die komplementäre Verschiebung von X3 und X4 unterstützt wird. Demnach bliebe nur die beobachtete Diskrepanz zwischen den Intensitäten von H2 und H4 noch zu klären. ROE-Peaks #3 und #4 sind in diesem Zusammenhang insofern informativ, als daß sie implizieren würden, daß das Amino-Proton des Histidin-Rings keinem schnellen Austausch unterliegt und deshalb ein zusätzliches Signal *in vivo* auftreten sollte. Zunächst identifizierten ARÚs et al. ein Signal nahe der H2-Resonanz mit dem Amid-Proton der Cs-Peptid-Bindung [Aru86]. Später wurden die ROE-Peaks #3 und #4 bei $\delta = 8$ ppm den Konnektivitäten zwischen den Alanyl-CH₂-Gruppen und der NH-Gruppe des Imidazol-Rings zugeordnet (Tab. 10.1). Der internukleare Abstand für die letzte Konnektivität ist jedoch relativ groß, so daß es wahrscheinlicher ist, daß das wesentlich nähere Proton der Peptid-Gruppe die Ursache für diese ROE-Peaks ist. Diese Vermutung wurde durch die vergleichenden Experimente mit NAA und His in saurer Lösung bestätigt. Unter *In-vivo*-Bedingungen ist das NH-Dublett des NAA relativ breit und schlecht aufgelöst

($J = 6,4 \text{ Hz}$, [Gov00]). Der Intensitätsunterschied von H2 und H4 ist also nur scheinbar und läßt sich mit dem Auftreten einer durch verlangsamten Austausch *in vivo* detektierbaren Resonanz erklären.

Zusätzliche Resonanzen um $\delta = 7 \text{ ppm}$ können durch die Konnektivitäten #1 und #2 verursacht werden, aber ihre Verschiebung gegenüber H4 hin zu Niederfeld-Seite ist ein Indiz dafür, daß nur die ROE-Peak #1 entsprechende Kopplung effektiv ist. Eine zu ROE-Peak #2 gehörende Wechselwirkung würde eine eingeschränkte Rotation um die C_{β} - C_{imidazol} -Einfachbindung erfordern. Demgegenüber sind Kopplungen innerhalb des steifen Imidazol-Rings immer relativ stark. Davon abgesehen kann die Konnektivität zu ROE-Peak #2 nicht weiter untersucht werden, denn das Signal der Histidiny- CH_2 -Protonen würde – wenn es detektierbar wäre – *in vivo* mit den Resonanzen von (P)Cr und Cho zusammenfallen. Obwohl die beobachteten Asymmetrien bereits auf eine Kopplung H2-H4 hinweisen und obwohl die Rotation um die C_{β} - C_{imidazol} -Einfachbindung relativ frei zu erfolgen scheint [Bro79b], muß über die molekulare Beweglichkeit mit Hinblick auf eine mögliche makromolekulare Fixierung von Cs generell nachgedacht werden. Erst ein solcher Prozeß würde die angesprochenen Konnektivitäten durch Immobilisierung spezifischer Gruppen des Moleküls ermöglichen oder sogar eine Bewegungseinschränkung des gesamten Moleküls zur Folge haben und damit der Unterdrückung dipolarer Kopplungen entgegenwirken.

Arbeiten über die Bindung von Cs an bovinem Albumin-Serum [Bro79b] bzw. Komplexbildung mit Ca^{2+} [Gag90] zeigten, daß der Ring von der aliphatischen Struktur abgewinkelt ist und die Histidiny-Methylen-Gruppe vom Ring wegzeigt (Abb. 10.7(a)). Bei den Experimenten mit Albumin stellten sich H2, H4, A und B als Binding-Sites heraus. Es ist bekannt, daß diese Stellen von der Funktion abhängen, in die das Molekül eingebunden ist [Bro79b]. Die hier vorgestellten Ergebnisse sprechen hauptsächlich für eine Bewegungseinschränkung des Imidazol-Rings und der Peptid-Gruppe; Auswirkungen auf die Protonen A und B können nicht ausgeschlossen werden, scheinen aber von geringerer Bedeutung zu sein.

Die Studien zur Komplexbildung von Cs mit Ca^{2+} in wäßriger Lösung zeigten, daß jeweils zwei Cs-Moleküle durch zwei $\text{Ca}(\text{II})$ -Ionen verbunden werden können (Abb. 10.7(b)). Für hohe Konzentrationen von $[\text{Ca}^{2+}]$ (jenseits derer *in vivo*) wurde eine sehr effektive Verklumpung beobachtet, die prinzipiell die Wechselwirkung H2-H4 ermöglicht. Da Cs mutmaßlich in bedeutender Weise an der Aktivierung der Ca-Ionenkanäle und der anschließen-

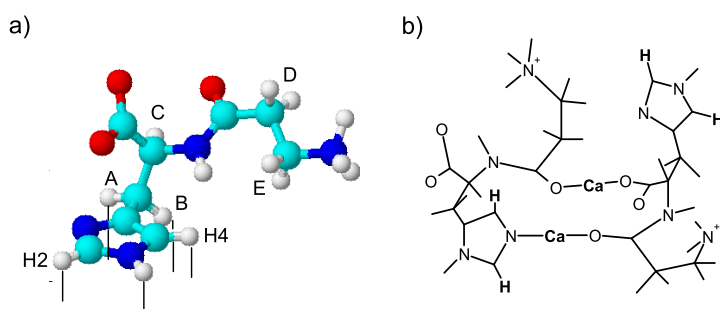


Abb. 10.7: (a) 3D-Struktur von Cs in wäßriger Lösung nach Ergebnissen von GAGGELLI et al. (adaptiert von Abb. 3 in [Gag90]; zur Bezeichnung der Protonen s. Abb. 8.14). Der Imidazol-Ring ist abgewinkelt von der aliphatischen Struktur, welche ihrerseits leicht gebogen ist. Die Striche geben die Binding-Sites mit bovinem Albumin-Serum entsprechend [Bro79b] an. (b) Skizze des Dreiding-Modells des Ca^{2+} -Komplexes von Cs in wäßriger Lösung (adaptiert von Abb. 7 in [Gag90]). H2 und H4 sind explizit angegeben.

den Muskel-Kontraktion beteiligt ist [Rub01], ist eine spezifische Bindung des Moleküls denkbar, und sogar die *In-vivo*-Konzentrationen dieses Kations könnten die Kopplung H2-H4 ermöglichen. Außerdem ist zu erwähnen, daß selbst durch extrem hohe Werte von $[Ca^{2+}]$ nicht alles Cs komplexiert wurde und dementsprechend ein gewisser Anteil an mobilem Cs im Gewebe existieren muß – ganz in Übereinstimmung mit den hier beobachteten dominanten Resonanzen frei beweglicher Moleküle.

Insgesamt kann man feststellen, daß in vitalem Muskelgewebe Bedingungen existieren, die eine residuale dipolare Kopplung von 1H -Spins des Cs ermöglichen. Abgesehen davon, daß dieser Effekt für (P)Cr, Tau und Lactat bereits bekannt ist, sprechen im Fall des Cs noch weitere Aspekte für eine solche Interpretation der Daten:

Erstens wurden orientierungsabhängige Effekte der aromatischen Cs-Resonanzen *in vivo* beobachtet [Kre00], die bereits auf eine residuale dipolare Kopplung für dieses Spin-System hinwiesen. Solche Effekte können für verschiedene Metaboliten im M. gastrocnemius beobachtet werden, verschwinden aber nahezu im M. soleus für eine parallele Ausrichtung der Wade mit dem Grundfeld. Nach VERMATHEN et al. kann dies mit der unterschiedlichen Orientierung der Muskel-Fasern erklärt werden [Ver01, Ver02]. Der sog. "pennation angle" θ beträgt ca. 20° im M. gastrocnemius und $40-50^\circ$ im M. soleus für parallele Ausrichtung der Wade relativ zu B_0 .

Das gleichzeitige Auftreten zusätzlicher Signale von (P)Cr und Cs in einem Muskel und das Verschwinden oder die Abschwächung dieses Effekts in anderem Gewebe spricht für eine gemeinsame physikalische Erklärung des Phänomens bei beiden Metaboliten.

Zweitens muß für die Analyse dipolar gekoppelter Systeme mit Unterschieden in der chemischen Verschiebung von nur ca. 1 ppm bei 1,5 T schon das Auftreten von Spektren zweiter Ordnung berücksichtigt werden. Die beobachteten Asymmetrien in den *In-vivo*- 1H -NMR-Signalen von Cs entsprechen den theoretischen Erwartungen. Nicht alle Spektren, die an Probanden aufgenommen wurden, konnten durch Anpassung mit Gauss-Linien quantitativ ausgewertet werden, und aufgrund der geringen Signalintensitäten der Satelliten (Phasenmodulation kommt erschwerend hinzu) konnte auch der in der Theorie beschriebene inverse Dach-Effekt nicht näher untersucht werden. In allen Spektren wurden jedoch ähnliche Verschiebungen der Satelliten beobachtet, die qualitativ die erwarteten Asymmetrien bestätigen.

Die hier durchgeführten Probanden-Messungen decken nur einen kleinen Bereich der winkelabhängigen Linienaufspaltung ab. Für $\alpha < 30^\circ$ konnte dabei die Charakteristik der $(3 \cos^2 \theta - 1)$ -Funktion gut bestätigt werden, und auch die Unterschiede zwischen den Spektren aus M. gastrocnemius und M. soleus passen in das Bild der dipolaren Kopplung. Aber auch hier wäre die Aufnahme von Datenpunkten bis hin zum magischen Winkel hilfreich, um zu klären, ob genau wie bei (P)Cr eine Euler-Transformation zwischen Labor- und molekularem Koordinatensystem vernachlässigt werden kann [Kre94]. Erste Anzeichen deuten in der Tat darauf hin, denn für eine Ausrichtung der Wade auf den magischen Winkel verschwanden die Effekte, für die eine residuale dipolare Kopplung als Ursache vermutet wurde [Kre00].

10.3.3 Hinweise auf eine großräumige Fixierung des Moleküls *in vivo*

Neben dem Auftreten einer residualen dipolaren Kopplung, die per se für eine gewisse Bewegungseinschränkung des Moleküls spricht, liefert das Auftreten einer weiteren Resonanz *in vivo* Anhaltspunkte für eine Fixierung des Cs-Moleküls, die über den Imidazol-Ring hin-

ausgeht.

Prinzipiell kommen für eine variable Protonierung mehrere Stellen in Frage: die beiden Stickstoffe des Imidazol-Rings (von denen immer einer in neutraler Lösung protoniert ist, s. u.), die Carboxyl-Gruppe, die terminale Amino-Gruppe sowie die Peptid-Bindung. Die pK -Werte sind bis auf den der NH-Gruppe an der Peptid-Bindung bekannt [Bar00], und die Protonierung findet in folgender Reihenfolge statt: die Amino-Gruppe ist mit $pK > 9$ die schwächste Säure und damit auch in neutraler Lösung protoniert. Danach wird der Stickstoff N³ des Rings vor der Carboxyl-Gruppe protoniert. Rascher chemischer Austausch kann jedoch weiterhin eine klare Signal-Detektion in den Spektren unterbinden. Der Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von Cs, His und NAA in saurer Lösung zeigte, daß das mit der H2-Resonanz zusammenfallende Signal bei 8 ppm der NH-Gruppe der Peptid-Bindung zuzuordnen ist.

Da dieses Proton in der Modell-Lösung bei $pH > 7$ nicht sichtbar ist, muß die Austauschrate *in vivo* herabgesetzt sein. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Ausbildung einer Wasserstoff-Brückenbindung mit einem Makromolekül sein. Dies hätte wiederum eine weitere, sehr effektive Fixierung des Cs zur Folge, und das Molekül wäre im Vergleich zu (P)Cr "großräumig" bewegungsgehemmt.

Für die Erklärung des anscheinenden Signalunterschieds H2/H4 wurde in früheren Studien auch eine unterschiedliche T_2 -Relaxation der beiden Ringprotonen in Folge der Komplexbildung mit Cu^{2+} in Erwägung gezogen [Pan88]. In der Tat ist die Rolle dieser Metall-Ionen *in vivo* nicht zu vernachlässigen: Im Rahmen der physiologischen Bedeutung von Cs wurde diskutiert, ob dieser Metabolit bei der Aufhebung einer durch Cu^{2+} -Ionen verursachten Blockierung der Glykolyse eine Rolle spielt [Bro79a]. Das Kation wird durch Komplexbildung mit Cs praktisch inaktiviert. Dabei findet eine Isomerisation des Imidazol-Rings statt. Freies Cs liegt in der N³-H-Form vor (Abb. 10.8(a)). Um als Ligand für Metall-Ionen aktiv zu werden, wird das andere Stickstoff-Atom protoniert, es bildet sich also das Tautomer mit der N¹-H-Form aus.

Der für physiologische Bedingungen ($[Cu]^{2+} \ll [Cs]$) bedeutsame Komplex ist in Abb. 10.9(b) dargestellt. Cu(II) hat die Koordinationszahl 6, bildet also einen oktaedrischen Koordinationspolyeder aus. Ein typisches Beispiel ist das $[Cu(NH_3)_4(OH_2)_2]^{2+}$ -Ion (Abb. 10.9(a)). Analog bildet sich *in vivo* ein Komplex aus, bei dem der unprotonierte Imidazol-Stickstoff N³ an eine der vier äquatorialen Koordinationsstellen des Ions bindet. Wie die ¹H-NMR-Spektren zeigten, sind nur die Protonen in der unmittelbaren Umgebung dieser Koordinationsstellen von dem paramagnetischen Einfluß des Ions betroffen. Da der Effekt in saurer Lösung verschwindet, kann man davon ausgehen, daß die Komplexbildung ausbleibt. Der Imidazol-Ring ist vollständig protoniert, und somit sind die beiden potentiellen Liganden blockiert. Obwohl die Austauschrate der Protonen so hoch ist, daß keine

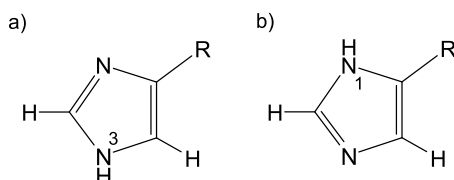


Abb. 10.8: Tautomere des Imidazol-Rings für freies Cs (a) und als Ligand für Metall-Ionen auftretendes Cs (b).

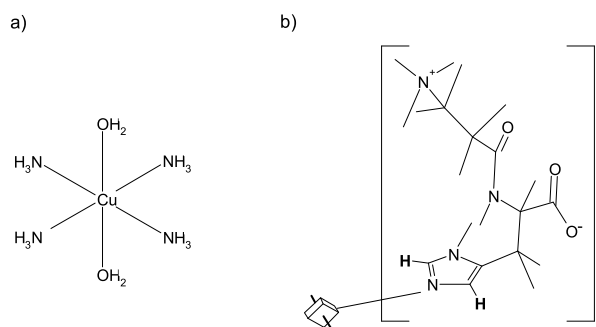


Abb. 10.9: Komplexbildende Eigenschaften von Cu(II)-Ionen: Bei der Ausbildung des Koordinations-Oktaeders des $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ -Ions treten N-Atome als Liganden in der Äquatorial-Ebene auf; die restlichen zwei Koordinationsstellen werden durch Wasser besetzt (a). Analog kann auch das unprotonierte N^3 -Atom des Imidazol-Rings im Cs einer der Liganden sein (b) (Darstellung in Anlehnung an Abb. 1 in [Bro79a]).

zusätzliche Resonanz im Spektrum erscheint, läßt sich die vollständige Protonierung also indirekt über das Verhalten in Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen nachweisen.

Da das Spektrum der His-Modell-Lösung bei Ansäuerung keine weiteren Signale erkennen läßt, ist dies ein weiteres Indiz dafür, daß trotz der vollständigen Protonierung des Rings nur H2 und H4 detektierbar sind und daß das mit der H2-Resonanz bei 8 ppm zusammenfallende Signal nicht vom Ring kommen kann. Der Nachweis, daß es sich um das Dublett des Protons an der Peptid-Bindung handelt, wird dadurch bekräftigt.

10.4 Bestimmung der residualen Kopplungsstärken

Grundlage für die Quantifizierung aller residualen Kopplungsstärken ist die Bestimmung der Faserorientierung aus der Linienaufspaltung des (P)Cr2-Dubletts. Aufgrund der hohen Qualität der Spektren konnten die Positionen beider Resonanzen mit hoher Genauigkeit ($\delta(\Delta\nu) = 0,7 \text{ Hz}$) bestimmt werden. Einziges Problem war die in Studie #4 sichtbare Linienaufspaltung, die über dem maximalen theoretischen Wert liegt, den die Daten aus [Kre94] zulassen. Leider wurde damals kein Fehler für die Kopplungskonstante angegeben; aber alleine $\delta(\Delta\nu)$ reicht schon fast aus, damit der Datenpunkt innerhalb seiner Varianz $\theta = 0$ zugeordnet werden kann. Außerdem sind interindividuelle Schwankungen der Kopplungsstärke nicht auszuschließen.

Die Form der Winkelabhängigkeit bewirkt, daß kleine Werte von θ mit relativ großen Fehlern behaftet sind. Ab ca. 20° sind die Werte bis zum magischen Winkel alle ungefähr gleich fehlerbehaftet. In diesem Bereich wären also prinzipiell genauere Messungen möglich, aber stattdessen besteht das Problem, daß der Proband die Wade nicht lange genug verdreht halten kann (abgesehen davon wird auch der Shim schlechter).

Die Bestimmung von SD_0 des (P)Cr2-Dubletts aus der Phasenmodulation liefert einen etwas höheren Wert als die konventionelle, in [Kre94] angewandte Methode. Gleich zu Beginn fällt auf, daß Δ größer als die sichtbare Linienaufspaltung ist. Die Phasenmodulation hat bei $TE = 36 \text{ ms}$ sicher bereits Einfluß auf den Verlauf des Dubletts, aber man würde das Gegenteil erwarten: Dadurch, daß das Dublett während der Modulation zunächst in der Mitte "nach unten gezogen" wird, müßte eigentlich $\Delta\nu_{\text{obs}}$ größer als der wahre Wert der Kopplung erscheinen, der sich direkt in Δ widerspiegelt. Eine Erklärung kann hierfür

nicht gegeben werden. Der lineare Verlauf nach Gl. (5.13) ist aber eindeutig zu erkennen und liefert eine Kopplungsstärke, die qualitativ mit den Werten aus anderen Bestimmungen übereinstimmt.

Für die residualen Kopplungsstärken der Spin-Systeme von Tau und das des (P)Cr-Methyl-Rotors läßt die Auswertung der Meßwerte mit (3.21) bzw. (3.29) qualitativ die Aussage zu, daß die Orientierungen θ und η mit der Faserorientierung übereinstimmen. Gleiches wurde auch für Lactat berichtet [Asl99]. Die Korrelationskoeffizienten für die Anpassung der Meßwerte des (P)Cr3-Tripletts und des Tau-Dubletts sind vergleichbar. Dies ist ein Anzeichen dafür, daß die Abschätzung der Dublett-Mitte aus dem Minimum links neben der Cho-Resonanz eine vergleichbare Qualität hat wie die Bestimmung der Triplet-Aufspaltung, die direkt aus den Position der aufgelösten Resonanzen (P)Cr3 und X4 möglich ist. Die Methode scheint also ausreichend zu sein, um alle Signalgruppen in diesem Bereich richtig zu charakterisieren.

Die unerwartet starke residuale dipolare Kopplung der Ringprotonen im Cs läßt zusammen mit den bereits beobachtbaren Asymmetrien eine Klassifizierung als AM-System zu. Die Bestimmung von SD_0 aus den Linienaufspaltungen war unter allen Messungen die mit der höchsten Genauigkeit. Der hohe Korrelationskoeffizient von $R^2 = 0,93$ für die Anpassung der Daten an Gl. (3.22) deutet sehr stark darauf hin, daß auch die Vorzugsrichtung der Kernverbindungslinie H2–H4 im Mittel streng mit der Faserrichtung korreliert. Bei der Auswertung der beobachteten Asymmetrien in den Linienpositionen zur alternativen Bestimmung von SD_0 wurde klar, daß diese Methode wesentlich fehlerbehafteter ist. Zwar konnte der Wert von ca. 18 Hz qualitativ bestätigt werden, aber aufgrund der in die Bestimmung eingehende tan-Funktion ist der Fehler von Sk/h verhältnismäßig groß.

Die aus den Kopplungsstärken ermittelten Ordnungsparameter S der verschiedenen Spin-Systeme decken einen Bereich von mehr als zwei Größenordnungen ab und lassen damit zumindest qualitative Aussagen über signifikante Unterschiede in der Molekulardynamik zu. Mögliche Prozesse, die dabei eine Rolle spielen, sollen nun diskutiert werden.

10.5 Phospholipide als möglicher Schlüssel zum Verständnis der Molekulardynamik *in vivo*

Die unterschiedliche Ausprägung der residualen dipolaren Kopplungen deckt starke Unterschiede in der Molekulardynamik der hier untersuchten Metaboliten *in vivo* auf. Dabei spielen zwei Effekte zusammen, die nur in der Summe das sonst übliche Kollabieren der Multipletts unterbinden: die Bewegungseinschränkung der Moleküle und die Anisotropie des umgebenden Gewebes, also sozusagen die "Matrix", in die die Spin-Systeme eingebettet sind.

Das Auftreten der Kopplung in Form einer Linienaufspaltung ist per se ein Anhaltspunkt für eine deutliche Einschränkung in der Beweglichkeit der Moleküle. Im Rahmen der biochemischen Eigenschaften der Metaboliten wurde gezeigt, daß es verschiedene Anhaltspunkte für eine zumindest zeitweise Fixierung der Moleküle *in vivo* gibt. In Frage kommen hier einerseits enzymatische Bindungen wie etwa an ATP- oder Citrat-Synthase bzw. Aconitase, andererseits können Wechselwirkungen mit der äußeren Zellmembran, den Membranen der subzellulären Elemente oder Interaktionen mit den Actin-/Myosin-Filamenten stattfinden. Diese Mechanismen reichen jedoch ohne eine ausgeprägte Vorzugs-Orientierung der fixierenden Einheit nicht aus, um im daran befindlichen Molekül direkte

Spin-Spin-Kopplungen zu beobachten.

So ist z. B. für die Prostata die Detektion einer direkten Spin-Spin-Kopplung innerhalb großer Voxel nicht zu erwarten, weil dieses Gewebe in sich keine deutliche Vorzugsrichtung wie etwa die Skelett-Muskulatur aufweist (hier könnte höchstens eine Verkleinerung des Voxels an Hochfeld-Tomographen klären, ob in der zum Großteil aus Muskelgewebe bestehenden Prostata zumindest über kleine Bereich solche Effekte zu beobachten sind). Selbst wenn es zu einer effektiven Fixierung des Metaboliten kommen würde, ist nicht zwangsläufig davon auszugehen, daß die Moleküle alle annähernd gleich ausgerichtet sind. Für Cit sind daher nur die Effekte einer starken J -Kopplung zu beobachten.

Die Effektivität enzymatischer Bindungen muß im Rahmen der direkten Spin-Spin-Kopplungen aber generell als zu gering eingestuft werden, denn im Vergleich zur Auslese-Zeit eines NMR-Experiments ist der Umsatz des Enzyms zu hoch, und die Fixierung dauert nicht lange genug an. Außerdem ist selbst für den Muskel anzuzweifeln, ob alle Enzyme räumlich ähnlich orientiert sind. Nur eine großräumige Struktur, die in direktem Zusammenhang zur Vorzugsrichtung der Muskelfasern steht, sollte diesen Effekt haben. So ist verständlich, daß die ATP-Synthase zu keiner Fixierung des ATP führt, die eine zusätzliche, winkelabhängige Linienaufspaltung zur Folge hat.

10.5.1 Substruktur der Muskelzelle, Eigenschaften von Membranen

In der Struktur von Muskelzellen lassen sich mehrere Elemente finden, die für eine Fixierung von Metaboliten in Frage kommen. Abb. 10.10 zeigt den schematischen Aufbau, der verschiedene, streng orientierte Unterstrukturen erkennen läßt.

Die Zelle ist von einer Membran, dem Sarkolemma, umgeben, die wie bei anderen Zellen auch aus einer Phospholipiddoppelschicht besteht. Außerdem ist ein ausgeprägtes Longitudinal- und Transversalsystem zu erkennen. Letzteres ist ein Röhrensystem (T-System genannt), das sich durch unzählige Einstülpungen des Sarkolemmas in den Zellinnenraum ergibt. Parallel zu den Sarkomeren und deren Unterstruktur aus Actin-/Myosin-Filamenten erstreckt sich zwischen den transversalen Tubuli das Longitudinalsystem der sarkoplasmatischen Retikula (SR). Es dient u.a. als Speicher für die zur Aktivierung der Kontraktion benötigten Ca^{2+} -Ionen, die über die terminalen Zisternen (am T-System anliegend) ausgeschüttet werden.

Parallel zu den Fasern orientiert befinden sich noch weitere Organellen wie z. B. Mitochon-

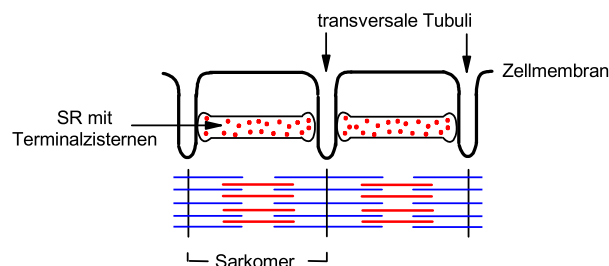


Abb. 10.10: Schematische Darstellung der Substruktur einer Muskelzelle. Die aus den kontraktile Filamenten (Actin: blau; Myosin: rot) gebildeten Sarkomere erstrecken sich längs zur Faserrichtung. Einstülpungen der Zellmembran bilden ein System transversaler Tubuli; dazwischen erstreckt sich ein Longitudinalsystem aus sarkoplasmatischen Retikula, die über ihre terminalen Zisternen $\text{Ca}(\text{II})$ -Ionen (rot) ausschütten können.

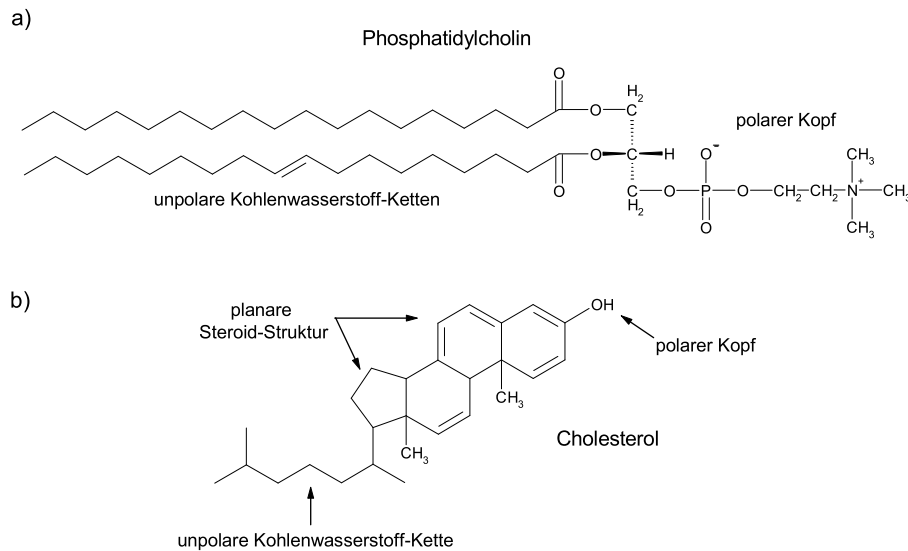


Abb. 10.11: Struktur von Phosphatidylcholin (a) und Cholesterol (b). Im unpolaren Schwanz des Lipids ist meist eine ungesättigte Fettsäure enthalten. Sie führt zu einer abgewinkelten Konformation der Kohlenwasserstoff-Kette. Cholesterol besteht ebenfalls aus einem unpolaren Anteil und einem hydrophilen Kopf.

drien und Lipid-Einlagerungen im Cytosol. SR und Mitochondrien sind ebenfalls von einer Membran umgeben. Besonders erstere sind neben dem Sarkolemma aufgrund ihrer streng an den Faserverlauf gebundenen Struktur ein interessanter Kandidat für die Immobilisierung der hier untersuchten Metaboliten.

Die Konformation der Lipiddoppelschichten wird einerseits durch die Art der unpolaren Fettsäuren und andererseits durch elektrostatische Eigenschaften der hydrophilen Köpfe bestimmt. Ketten aus gesättigten Kohlenwasserstoffen haben eine lineare Struktur und bilden aufgrund der Tatsache, daß sie dicht gepackt werden können, ein recht festes Ensemble. In Zellmembranen ist jedoch von den beiden unpolaren Kohlenwasserstoff-Ketten meistens eine ungesättigt (Abb. 10.11(a)). Eine *cis*-Doppelbindung führt zu einer geknickten Struktur und damit zu einer weniger dicht gepackten Membran. Reine Doppelschichten haben deshalb die Eigenschaften einer hochflüssigen Phase, in denen die Partialladungen der Köpfe zu einer gegenseitigen Wechselwirkung führen. Bei Phosphatidylcholin z.B. ist der polare Kopf mit dem $P^- - N^+$ -Dipol so gegen die Oberfläche der Membran geneigt (Abb. 10.12(a)), daß die Dipol-Achse nahezu parallel (innerhalb 30°) zur Oberfläche verläuft

Tab. 10.2: Lipid-Zusammensetzung subzellulärer Membranen der Ratten-Leber (in Massen-%, nach [Leh82])

Membrantyp	Phospholipide	Cholesterol	Glycolipide	Cholesterol-Ester
Plasma	57	15	6	22
Golgi	57	9	0	34
ER	85	5	0	10
Mitochondrien	92	0	0	8
Kern	85	5	0	10

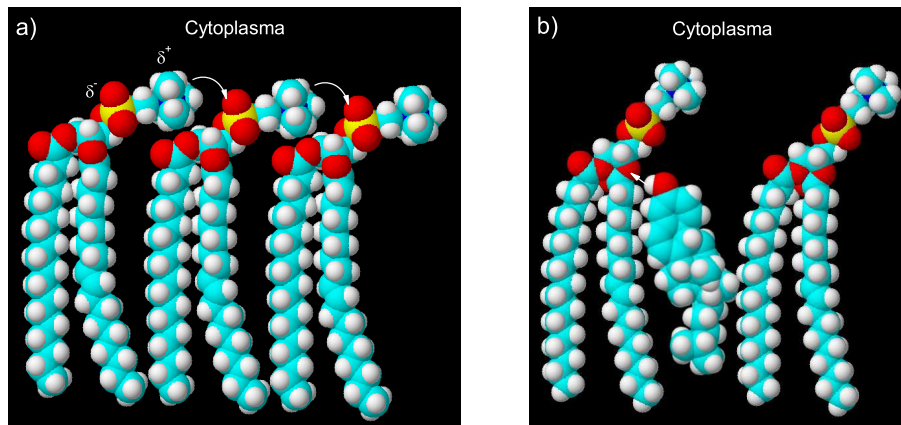


Abb. 10.12: Konformation von Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren. (a) Die durch *cis*-Doppelbindungen verursachten Knicke in einem Teil der Kohlenwasserstoffketten führen zu einer ungeordneten Packung im unpolaren Kern der Doppelschicht (hier nur obere Hälfte dargestellt). Gleichzeitig kommt es zu einer intermolekularen Wechselwirkung der Phosphorylcholin-Einheiten. (b) Einlagerung von Cholesterol führt zu einer reduzierten Membranfluidität und zu einem Trennen der polaren Köpfe.

[See87]. Die dadurch ermöglichte Anlagerung der positiven Partiaalladung des Stickstoffs an die negative Partiaalladung der Phosphatgruppe stabilisiert die Membran.

In vivo wird die Membranfluidität über das Steroid Cholesterol (Abb. 10.11(b)) gesteuert. Es kommt in relativ großen Mengen in der äußeren Zellmembran vor (s. Tab. 10.2) und lagert sich mit seiner polaren Hydroxyl-Gruppe über eine Wasserstoffbrücke an das Carbonyl-Sauerstoffatom des Phospholipids an. Wie Abb. 10.12(b) zeigt, befinden sich die steife Ring-Struktur und der Kohlenwasserstoffschwanz dabei im unpolaren Kern der Doppelschicht, so daß das Molekül mit seiner langen Achse senkrecht zur Membranoberfläche orientiert ist. Dadurch werden größere Bewegungen der Ketten sterisch gehemmt. Gleichzeitig wird die intermolekulare Wechselwirkung zwischen Phosphat und Me_3N^+ -Gruppen geschwächt (meßbar durch einen verminderten ^{31}P - ^1H -NOE, [Yea77]), und es entstehen vergrößerte Zwischenräume, die zu einer erhöhten Beweglichkeit der Phosphorylcholin-Gruppen führen.

Dabei kommt es einerseits zu einer erhöhten Hydratation der polaren Köpfe [Yea77], aber zusätzlich besteht auch die Möglichkeit zur Anlagerung anderer geladener oder polarisierter Teilchen.

10.5.2 Interaktion von Taurin und Phospholipiden als Ausgangspunkt

Eine konkretere Vorstellung über die Ursache der dipolaren Kopplungen im Tau-Molekül liefern die hier gewonnenen Erkenntnisse in Zusammenhang mit den biochemischen Eigenschaften dieses Metaboliten. Die orientierungsabhängige Aufspaltung des Tau-Signals zeigt (wie bei den anderen Metaboliten) für parallel zum Feld ausgerichtete Fasern ein Maximum und läßt von der Qualität der Anpassung der $(3 \cos^2 \theta - 1)$ -Funktion her einen Kollaps des Dubletts für $\theta \approx 55^\circ$ durchaus plausibel erscheinen. Somit ist eine Euler-Transformation vernachlässigbar, und die CH_2 -Gruppen müssen im Mittel so orientiert sein, daß die Verbindungsachse der Protonen parallel zur Faserrichtung verläuft.

Die Vermutung, daß Tau mit der Zellmembran interagiert, indem es stabilisierend an diese bindet [Bre01], würde eine passende Erklärung dafür liefern. Die hydrophilen Köpfe der

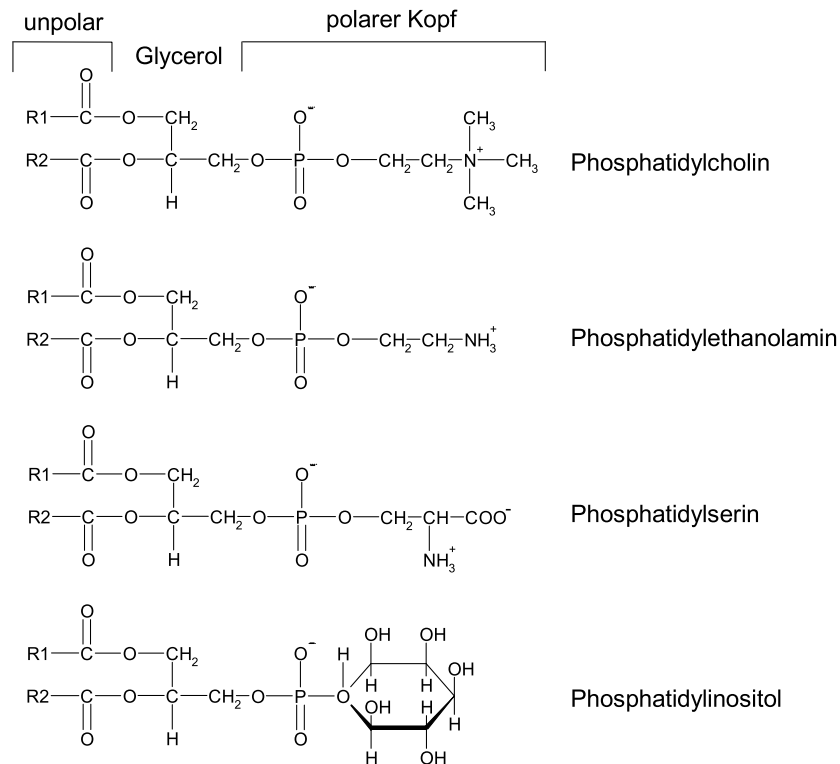


Abb. 10.13: Darstellung der Phospholipide, die auf Wechselwirkungen mit Tau untersucht wurden. Das Zwitterion bindet ionisch an den polaren Kopf der Lipide, der über eine Glycerol-Brücke mit den unpolaren Fettsäure-Ketten verbunden ist. Die Stärke der Bindung von Tau hängt von der positiven Partiaalladung am Kopf ab und ist daher bei Phosphatidylcholin am größten; Phosphatidylinositol kann dagegen kein Tau binden [Seb86].

Phospholipiddoppelschicht haben ein elektrisches Dipolmoment, das (je nach Cholesterolgehalt mehr oder weniger schräg) in die Membran hineinzeigt. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen über die Bindung von Tau an die polaren Köpfe der Lipide interessant [Seb86]. SEBRING et al. stellten fest, daß Tau unterschiedlich stark an die verschiedenen in Membranen vorkommenden Strukturen bindet. Die untersuchten Moleküle sind in Abb. 10.13 dargestellt. Tau hat im Vergleich zu anderen Molekülen die seltene Eigenschaft, daß seine basische Gruppe durch eine extrem saure Sulfonat-Gruppe ($pK_S = 1,5$; Abb. 10.14(a)) kompensiert wird. Substitution dieses Anteils durch eine Carboxyl-Gruppe ergibt β -Alanin, das einen höheren pK_S -Wert hat und nicht die bindenden Eigenschaften

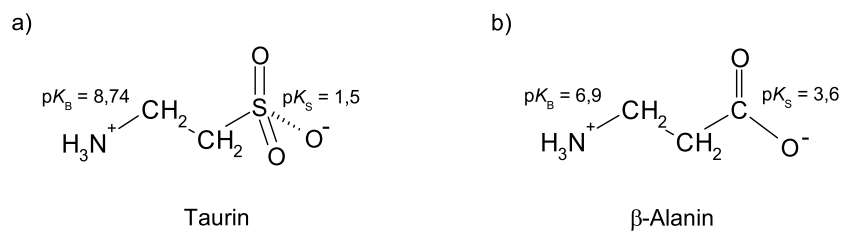


Abb. 10.14: Vergleich von Tau (a) und seinem Carboxyl-Analogen β -Alanin (b). Für die Wechselwirkung mit den Phospholipid-Köpfen ist der pK_S -Wert von Bedeutung.

mit der Membran zeigt.

Die Stärke der Bindung hängt eindeutig von den basischen Eigenschaften des Lipid-Stickstoffs ab. Diese sind bei Phosphatidylcholin durch die angrenzenden Methyl-Gruppen am stärksten ausgeprägt und führen somit bei Vesikeln dieses Phospholipids zur stärksten Bindung von Tau. Die Amino-Gruppe des Phosphatidylethanolamins ist eine schwache Base ($pK_B = 9,5$) und bindet Tau schwächer. Bei Phosphatidylserin ($pK_B = 9,15$) verringert die angrenzende Carboxyl-Gruppe ($pK_S = 2,25$) den Effekt noch einmal etwas. Im Phosphatidylinositol ist die Phosphat-Gruppe direkt an den Zucker gebunden, so daß keine positive Ladung vorhanden ist, an die die Sulfonat-Gruppe binden könnte.

Neben der offensichtlich wichtigen Bedeutung dieser Gruppe fällt auch die starke strukturelle Ähnlichkeit zwischen Tau und den Köpfen auf, die (aus sterischen Gründen) ebenfalls eine wichtige Rolle spielen könnte. Das Dipolmoment des Zwitterions könnte sich antiparallel zu dem der Köpfe ausrichten und damit die Membran stabilisieren. Hierfür wurden in [Seb86] ebenfalls Hinweise gefunden:

Eine ionische Wechselwirkung des Tau mit dem Stickstoff neutralisiert teilweise die positive Netto-Ladung des Lipids. Dies hätte wiederum eine Verstärkung der negativen Netto-Ladung im Bereich der Phosphoryl-Gruppe zur Folge. Damit wird jedes positiv geladene Teilchen vom Lipid-Phosphat angezogen. SEBRING et al. erklärten hiermit zunächst die

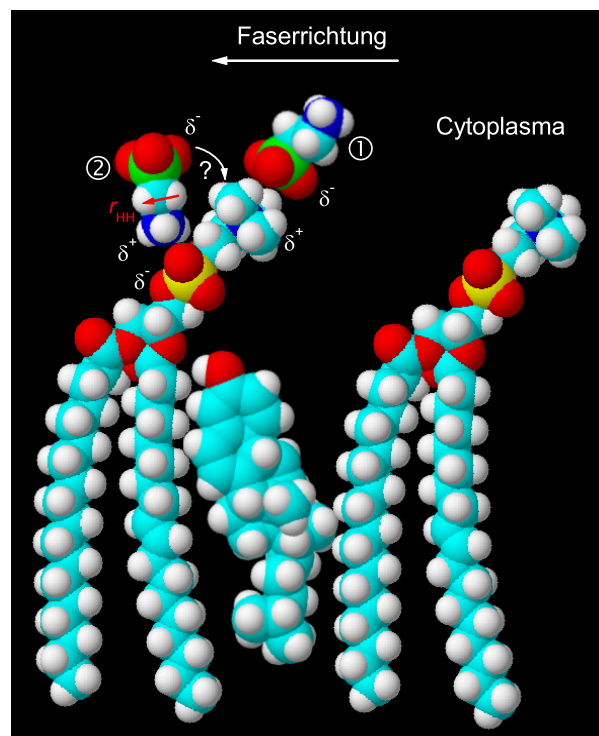


Abb. 10.15: Modell einer möglichen Anlagerung von Tau an die Zellmembran am Beispiel der Wechselwirkung mit Phosphatidylcholin. Nach [Seb86] lagert sich zunächst ein Molekül mit der Sulfonat-Gruppe an die TMA-Gruppe an. Ein zweites Molekül kann sich mit der NH_3^+ -Gruppe ans Phosphat anlagern; dabei könnte sich auch die zweite Sulfonat-Gruppe zum terminalen Stickstoff ausrichten. Sollte das Molekül aufgrund elektrostatischer Kräfte an beiden Enden fixiert sein, wäre auch die Rotation der Methylene-Gruppen um die Einfachbindungen eingeschränkt. Dann könnte die Verbindungslinie der Protonen jeder Methylene-Gruppe (stehen hintereinander in dieser Darstellung) weitgehend parallel zur Faserrichtung laufen.

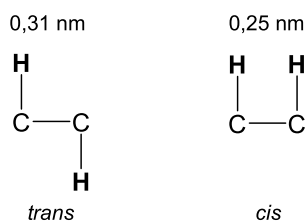


Abb. 10.16: Abstände der Protonen in *trans*- und *cis*-Stellung in den benachbarten Methylen-Gruppen des Tau.

durch Tau gesteigerte Bindung von Ca^{2+} an das Sarkolemma von Herz-Muskelzellen; sie erwähnten aber auch, daß jedes Molekül mit ausreichender positiver Ladung an diese Stelle binden könnte, wenn sie nicht durch $\text{Ca}(\text{II})$ -Ionen blockiert ist. In Abwesenheit von Kationen werden nämlich zwei Tau-Moleküle pro Phospholipid gebunden [Seb86]. In diesem Zusammenhang wurde folgender Prozeß diskutiert: Die Bindung eines ersten Tau-Moleküls mittels der Sulfonat-Gruppe an die Membran-Oberfläche könnte die Lokalisation eines zweiten Tau-Moleküls zwischen den Lipid-Köpfen nach sich ziehen. Abgesehen von der Argumentation über die antiparallelen Dipol-Momente wäre dieses Molekül vermutlich auch aus sterischen Gründen mit der Längsachse parallel zur Oberflächennormale der Membran orientiert. Diese Situation ist in Abb. 10.15 dargestellt.

Um die Längsachse wäre eine Rotation möglich, aber die Spektren implizieren eine solche Orientierung, bei der die Kernverbindungsachse zwischen den Protonen der CH_2 -Gruppen im Mittel noch eine leichte Vorzugsrichtung parallel zur Hauptachse der Zellen (und damit zur Faserrichtung) hat. Der geringe Ordnungsparameter (kleiner als für das (P)Cr2-Dublett) deutet auf eine hohe Beweglichkeit hin. Es könnte jedoch sein, daß die elektrostatischen Kräfte die beiden geladenen terminalen Gruppen in ihrer Dynamik so weit einschränken, daß keine freie Rotation der CH_2 -Gruppen mehr um die Einfachbindungen erfolgen kann und somit ein wichtiger Freiheitsgrad blockiert wäre.

Die auftretenden Bewegungen scheinen eine Kopplung zwischen den benachbarten CH_2 -Gruppen zu unterbinden. Von den Atomabständen her (0,25 nm bzw. 0,31 nm, s. Abb. 10.16) wäre eine residuale Wechselwirkung durchaus vorstellbar, so daß man kein dipolares A_2Z_2 -, sondern ein A_2M_2 oder zumindest ein A_2X_2 -System erwarten würde.

Es ist aber auch möglich, daß sich die Unterstruktur des Spektrums *in vivo* nicht auflösen läßt, denn für die Inter-Methylen-Wechselwirkung ist der internukleare Abstand mindestens um den Faktor 1,4 größer als innerhalb der einzelnen Gruppen; demnach ist eine solche Kopplung $(1,4)^3 \approx 2,7$ mal geringer. Die entspricht nur noch einer Stärke von $Sk/h \approx 1,6$ Hz. Allerdings konnte auch bei Studien an Ratten eine weitere Unterstruktur der Tau-Multipletts nicht eindeutig aufgelöst werden [Zan00]. Außerdem stimmt dies mit den Beobachtungen an zwei benachbarten CH_2 -Gruppen in 1,2-Dichlorethan überein, bei dem die Wechselwirkung zwischen den Gruppen ebenfalls nur einen geringen Anteil liefert (s. Kap. 3.6.1).

10.5.3 Übertragung des Modells auf Kreatin

Im Falle des (P)Cr liegen bislang keine konkreten Anhaltspunkte für die Lokalisation der weitgehend immobilisierten Moleküle vor. Nachdem andere (Makro-)Moleküle als Ursache für die Signale ausgeschlossen werden konnten [Kre97], wurden in früheren Arbeiten noch

zwei Erklärungsmodelle für die Immobilisation diskutiert [Boe99]:

- ein Einschluß der Moleküle in längliche Strukturen wie die Actin-/Myosin-Filamente, das SR oder die Mitochondrien,
- Bindung an Makromoleküle, die ihrerseits in den Zellen einen hohen Grad an Ordnung besitzen.

Für das letzte Modell wurde zunächst die Kreatin-Kinase (CK) favorisiert, aber mit Experimenten an transgenen Mäusen wurde diese Idee widerlegt [Zan00]. Daher scheint die erste Theorie der beste Ansatzpunkt zu sein, denn da die meisten Metaboliten von Bewegungseinschränkung betroffen sind, ist eine allgemeine Erklärung wahrscheinlicher als eine spezifische Bindung an bestimmte Enzyme.

Untersuchungen zur Diffusions-Anisotropie von (P)Cr haben gezeigt, daß die starke Restriktion in Transversalrichtung der Zelle nicht auf die Filamente zurückgeführt werden kann [Kin99]. Es kommt nur eine größere Struktur wie das SR oder die Mitochondrien in Frage (die äußere Zellmembran [Sarkolemma] ist schon wieder zu großräumig). Beide Elemente sind wie die Zelle von einer Phospholipid-Membran umschlossen, die für das geladene (P)Cr undurchlässig ist. Daher könnte man vermuten, daß auch diese Moleküle sich zwischen den polaren Köpfen ansiedeln. PCr besitzt zwei terminale negative Ladungen und eine positive Ladung an der NH_2 -Gruppe. Letztere könnte sich wie ein Kation

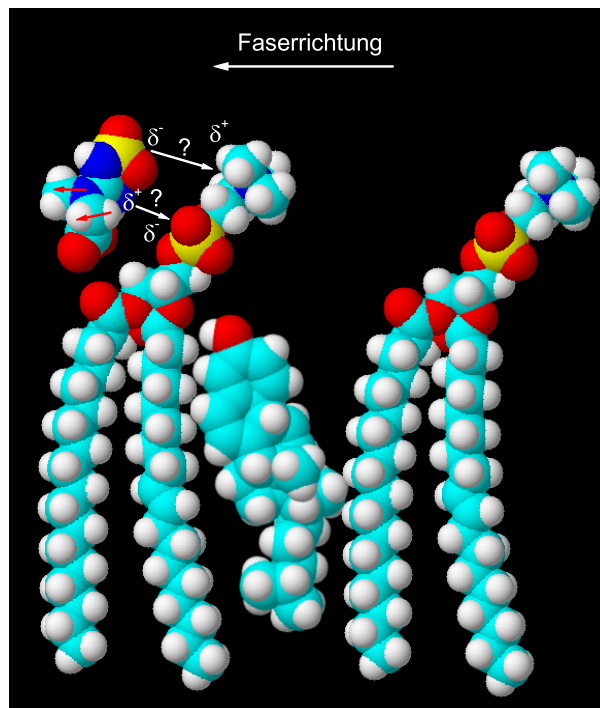


Abb. 10.17: Modell einer möglichen Anlagerung von PCr an die Zellmembran am Beispiel der Wechselwirkung mit Phosphatidylcholin. Die positiv geladene NH_2 -Gruppe könnte sich an das Phosphat des Lipids anlagern. Inwieweit das Phosphat des PCr in Wechselwirkungen mit dem positiv geladenen Lipid-Kopf einbezogen ist, ist unklar. Die ermittelte Struktur des PCr-Moleküls (Abb. 10.18) würde es ermöglichen, daß sich sowohl \vec{r}_{IS} der Methylen-Gruppe als auch die $\text{N}-\text{C}$ -Achse des Methyl-Rotors (rote Pfeile) annähernd parallel zur Faserrichtung orientieren.

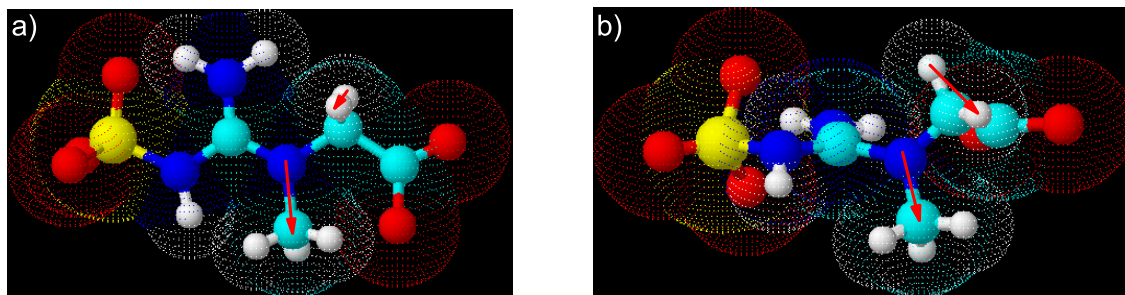


Abb. 10.18: Strukturen von PCr ohne (a) und mit (b) der Berücksichtigung interatomarer Kräfte (MM2-Algorithmus). Bei der energetisch bevorzugten Form (b) sind die Achse des Methyl-Rotors und \vec{r}_{IS} der Methylen-Gruppe (rote Pfeile) annähernd parallel orientiert.

an die Phosphat-Gruppe des Lipids anlagern. Für die beiden entgegengesetzt gerichteten elektrischen Dipolmomente des PCr ist die Frage, ob sich eines antiparallel zu dem Moment der Lipide ausrichten wird. Für dasjenige zur Phosphorylgruppe spricht, daß sich bei seiner Ausrichtung die Phosphat-Gruppe nicht zum Membran-Innenraum orientieren würde. Dieser Aspekt ist deshalb von Bedeutung, als daß die schmale Resonanz im ^{31}P -NMR-Spektrum gegen eine Mobilitätseinschränkung dieser Gruppe spricht. Die umgekehrte Orientierung mit der Phosphat-Gruppe im tieferen Bereich der Membran ist eher unwahrscheinlich. Abb. 10.17 zeigt die diskutierte Anordnung der Moleküle und verdeutlicht, daß bei dieser Anordnung entsprechend den gemessenen Orientierungsabhängigkeiten sowohl die Rotationsachse des Methyl-Restes als auch internuklearer Vektor der Methylen-Gruppe im Mittel eine bevorzugte Orientierung in Faserrichtung haben könnten.

Cr hat dagegen nur die eine negative Ladung an der Carboxyl-Gruppe, so daß sich dieses Molekül umgekehrt orientieren würde, wenn die Dipole entscheidend sind. Unabhängig von der Frage, welcher Teil des Moleküls in Richtung Cytoplasma zeigt, ist es durch die länglich Anordnung zwischen den Lipid-Köpfen möglich, daß die CH_2 -Gruppe sich wie beim Tau orientiert und eine Euler-Transformation für die Quantifizierung der Kopplung zwischen den Protonen vernachlässigt werden kann.

Die durchgeführte Anpassung von (3.29) an die Daten des Methyl-Tripletts bestätigte qualitativ die schon vorher gemachte Beobachtung, daß die Achse des CH_3 -Rotors ähnlich orientiert sein muß wie der internukleare Vektor der Methylen-Gruppe. Daß sich θ und η nicht groß unterscheiden, läßt sich mit der Struktur des PCr-Moleküls erklären. Bei dem zunächst mit ACD/3D dargestellten Molekül, für das nur die Tetraederwinkel der Bindungen berücksichtigt werden, stehen die beiden Achsen fast senkrecht aufeinander (Abb. 10.18(a)). Eine Berechnung der Struktur unter Berücksichtigung der molekularen Mechanik unter Chem3D[®] Ultra 8.0 (Quelle: [Cam]; Benutzung des MM2-Algorithmus nach Allinger [All]) ist in Abb. 10.18(b) dargestellt. Für diese Struktur unterscheiden sich die beiden Orientierungen nicht wesentlich (allerdings kann der Einfluß des Wassers unter *In-vivo*-Bedingungen nicht berücksichtigt werden).

Von den isochronen Systemen ist die (P)Cr-Methylen-Gruppe diejenige mit dem größten Ordnungsparameter. Im Vergleich zu Tau scheint sie eine stärkere Bewegungseinschränkung zu erfahren. Dies könnte daran liegen, daß die nach außen gerichteten Gruppen $-\text{CH}_3$ und $-\text{NH}_2^+$ eine Bewegung der Methylen-Gruppe um die Einfachbindungen $\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}$ erschweren. Simulationen der Molekulardynamik mit Chem3D Ultra zeigen auch, daß die

N–C-Achse des Methylen-Rotors eine recht große Beweglichkeit hat und daher S für dieses Spin-System am kleinsten ist.

Es fällt auf, daß im Gegensatz zum Cs im *M. gastrocnemius* nur ein immobiles Kompartiment vorzuliegen scheint, denn als Signal der Methylen-Gruppe tritt nur ein Dublett auf; ein von mobilen Molekülen ohne residuale dipolare Kopplung stammendes Singulett ist nicht zu beobachten.

Besonders bei (P)Cr bleiben viele Aspekte der Dynamik ungeklärt. So gibt es widersprüchliche Ergebnisse, die einerseits darauf hindeuten, daß das Dublett bei 3,9 ppm nur von PCr stammen kann [Kre99, Boe99], andererseits diese Hypothese aber widerlegen [Zan00]. Außerdem ist es fraglich, ob das Dublett nur durch PCr, das Triplett aber durch PCr und Cr verursacht wird.

10.5.4 Anhaltspunkte für die Dynamik von Carnosin an Membranen

Neben den bereits erwähnten Prozessen, die zu einer Bewegungseinschränkung von Cs-Molekülen führen (Wechselwirkungen mit Albumin und Ca^{2+} -Ionen), gibt es auch hier Anhaltspunkte für eine Interaktion mit den Phospholipiden. Lange Zeit wurde vermutet, daß Cs nur als Puffer für das bei Muskelaktivität anfallende Lactat fungiert; abgesehen davon, daß dies keinen Anhaltspunkt für eine veränderte Mobilität gibt, geht man inzwischen davon aus, daß Cs noch weitere wichtige Funktionen hat.

Aktuelle Studien zeigen, daß Moleküle mit aromatischen Strukturen sich ebenfalls in Phospholipiddoppelschichten einlagern [Gae03]. Dabei konnte über chemische Verschiebungen und NOE-Experimente nachgewiesen werden, daß die Ringstrukturen sich vorzugsweise auf Höhe der Glycerol-Gruppe und der oberen Acyl-Kette anlagern. Die Stärke der Wechselwirkung (mit NOE gemessen) nimmt mit steigender Polarität des Moleküls oder des Phospholipid-Kopfes zu. Es spielen also elektrostatische Anziehungen eine Rolle. Dabei dringen Moleküle mit kleinen elektrischen Dipolen tiefer in die Membran ein, während stark polare Moleküle von den unpolaren Ketten zum Kopf hin wandern. ^2H -NMR-Experimente mit deuterierten aromatischen Verbindungen zeigten außerdem, daß sich die Ringe parallel zur Oberflächennormale der Membran ausrichten.

Diese Orientierung impliziert, daß die Ober- und Unterseite eines Rings für die Wechselwirkung mit den Phospholipiden in Frage kommen und daher die π -Elektronen eine besondere Rolle spielen könnten. Einerseits kann es daher zur Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen kommen, andererseits aber auch zu der sehr viel effektiveren Kation- π -Wechselwirkung. Diese dient in vielen Fällen als treibende Kraft für die Rezeptor-Erkennung quartärer Ammonium-, Sulfonium- und Guanidinium-Kationen [Mec96]. Für diese bildet sich in Folge des negativen Ringstroms über dem Benzol-Ring eine Potentialmulde aus, in der sie sich in einem gebundenen Zustand befinden können. Die Form dieser Mulde hängt besonders bei Hetero-Ringen von der jeweiligen Struktur ab.

Im Fall des Imidazol-Rings sind die elektrostatischen Bedingungen aber etwas komplizierter. Abb. 10.19 zeigt, daß Stickstoff unterschiedliche Auswirkungen auf die Potentiale aromatischer Strukturen haben kann. Die NH-Gruppen von Indol und Pyrrol bewirken eine leichte Verschiebung der Potentialmulde von den Stickstoff-Atomen weg. Die großräumige Doppelring-Struktur kann z. B. ein Na^+ -Ion mit 32,6 kcal/mol binden. Für Pyrrol ist die Bindung etwas schwächer. Auch im Imidazol-Ring ist das Zentrum der Mulde von der NH-Gruppe abgewendet. Hinzu kommt aber noch, daß das freie Elektronenpaar an der einzig nicht protonierten Stelle des Rings (N^3) stark nucleophil ist und daher dort die

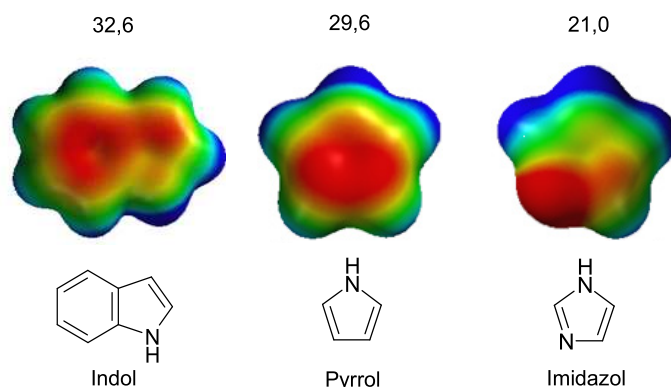


Abb. 10.19: Elektrostatistische Potentialoberflächen verschiedener Aromaten für die Bindung eines Na^+ -Ions. Rot entspricht einer Bindungsenergie von mindestens -25 kcal/mol, blau einer abstoßenden Energie von 25 kcal/mol oder mehr. Außerdem sind die Bindungsenergien für ein Na-Ion in der Potentialmulde durch die Wechselwirkung mit den π -Elektronen in kcal/mol angegeben (entnommen aus [Dou]).

größte Affinität für Kationen ist. Na^+ kann zwar mit $21,0$ kcal/mol oberhalb des Ringes binden, befindet sich dann aber in einer instabilen Konformation und wird sich an das Heteroatom anlagern. Die Bindungsenergie hierfür beträgt $39,5$ kcal/mol [Mec96] und stellt damit das wirkliche Minimum der Potentialoberfläche dar. Nebenbei erklärt dies auch, warum Cu(II) -Ionen nur mit unprotonierten N-Atomen einen Komplex ausbilden; in allen anderen Bereiche der Kante des Benzol-Rings herrscht ein repulsives Potential (in Abb. 10.19 blau dargestellt).

Das unprotonierte N-Atom könnte sich also an die positiv geladene TMA-Gruppe anlagern. Durch die Freiheit der Drehung um die Einfachbindung der Kettenstruktur könnte die NH-Gruppe der Peptid-Bindung mit der Phosphat-Gruppe die vermutete Wasserstoff-Brückenbindung ausbilden. Das Molekül wäre dann mehrfach in der Bewegung eingeschränkt.

Es ist nicht auszuschließen, daß eine solche Immobilisierung der Cs-Moleküle außer im Sarkolemma noch in weiteren Zellmembranen auftritt. Man vermutet, daß Cs eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Ryanodin-Rezeptoren spielt [Rub01], welche in den Terminalzisternen des SR lokalisiert sind und als Ca-Ionenkanal fungieren (Abb. 10.20). Diese Art der Aktivierung würde für eine Interaktion des Cs mit dem Rezeptor selber

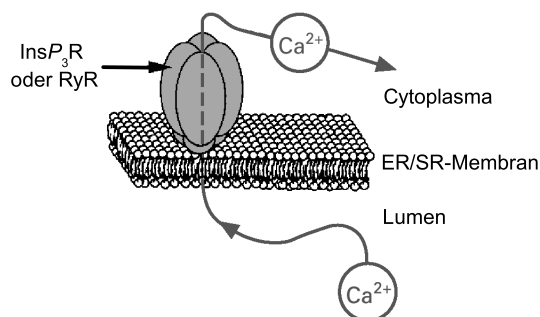


Abb. 10.20: Transport von Ca^{2+} -Ionen durch Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptoren (InsP₃R) oder Ryanodin-Rezeptoren (RyR) aus dem Lumen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) in das Zellinnere (Darstellung in Anlehnung an Abb. 1 in [Mac99]).

oder vielleicht auch mit der Membran in seiner unmittelbaren Nähe sprechen. Studien zum Severin-Effekt zeigten, daß die SR-Ca-Pumpen durch Cs (und Ans) vor Lipid-Peroxidation geschützt werden [Bol00]. Auf jeden Fall bestünde über die longitudinale Ausrichtung der SR ein strenger Zusammenhang mit der Faserrichtung. Da die Membran des SR jedoch weniger Cholesterin als das Sarkolemma enthält (Tab. 10.2) könnte dieses fixierende System andere dynamische Eigenschaften haben als im Fall der Wechselwirkung zwischen Tau und dem Sarkolemma. Die Ordnungsparameter sprechen jedoch eher für eine recht effektive Fixierung.

Weitere Hinweise auf eine Immobilisierung von Cs liefern Beobachtungen bezüglich einer verlangsamten Zellalterung. Hierbei ergeben sich teilweise interessante Parallelitäten zum biochemischen Verhalten von Tau, die sich eventuell auch auf (P)Cr übertragen lassen. Auf diese Aspekte soll nun genauer eingegangen werden.

10.6 Reaktivität von Carbonyl-Gruppen bei der Glycation und Fixierung aminohaltiger Metaboliten

Ein Prozeß der Alterung ist die sog. Glycation, die nicht-enzymatische Glycolyse von Proteinen. Der Prozeß wird durch Aldehyde oder Ketone (z. B. reduzierende Zucker) ausgelöst und hat im Endeffekt eine Ausbildung von Protein-Protein- und Protein-DNA-Cross-Links zur Folge. Haupt-Angriffspunkt sind die ϵ -Amino-Gruppen eines Lysin-Residuums der Makromoleküle [Hip98], die z. B. mit Glucose zu einer Schiffsbasis reagieren (Abb. 10.21). Diese stellt das primäre Glycations-Produkt dar, das durch intramolekulare Umordnung in ein stabileres Amadori-Produkt (intermediäres Glycations-Produkt) umgewandelt wird. In einer irreversiblen Folge von Reaktionen entstehen dann "advanced glycation endproducts" (AGEs) wie z. B. FFI (2-2(Furoyl)-4(5)-(2-Furanyl)-1H-Imidazol) [Bie98]. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß auch die Amino-Gruppen der Phospholipi-

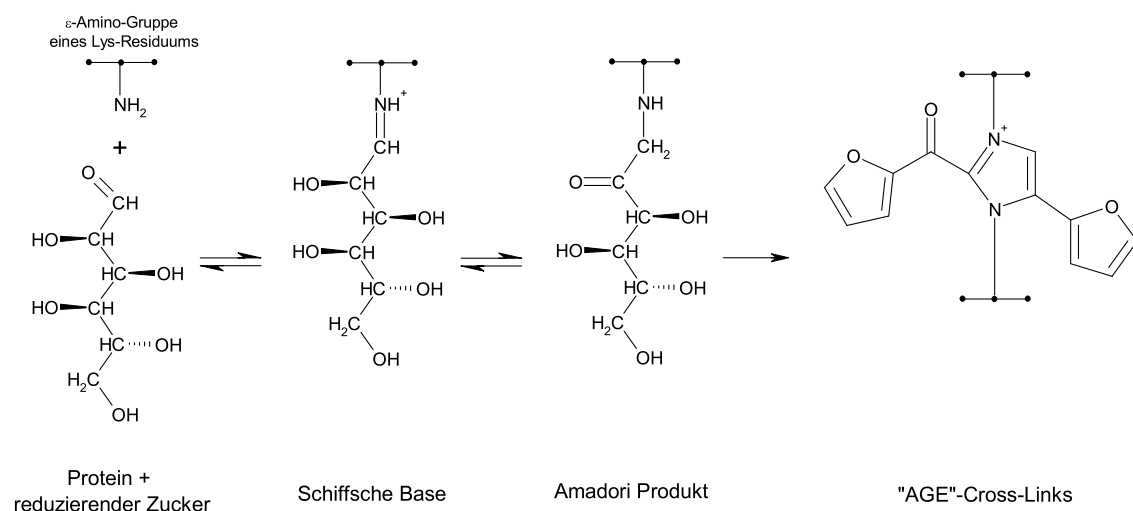


Abb. 10.21: Entstehung von "AGE"-Cross-Links in Proteinen in der Maillard-Reaktion. Zunächst reagiert die Amino-Gruppe eines Proteins reversibel mit einem reduzierenden Zucker zu einer Schiffsbasis. Intramolekulare Umordnungen führen zum chemisch stabileren Amadori-Produkt, das durch weitere Umordnungen, Dehydratationen und Kondensationen irreversibel zu einem "advanced glycation endproduct" (AGE) umgewandelt wird. Diese Produkte können zu einer Verkettung von Amino-Gruppen führen [Bie98].

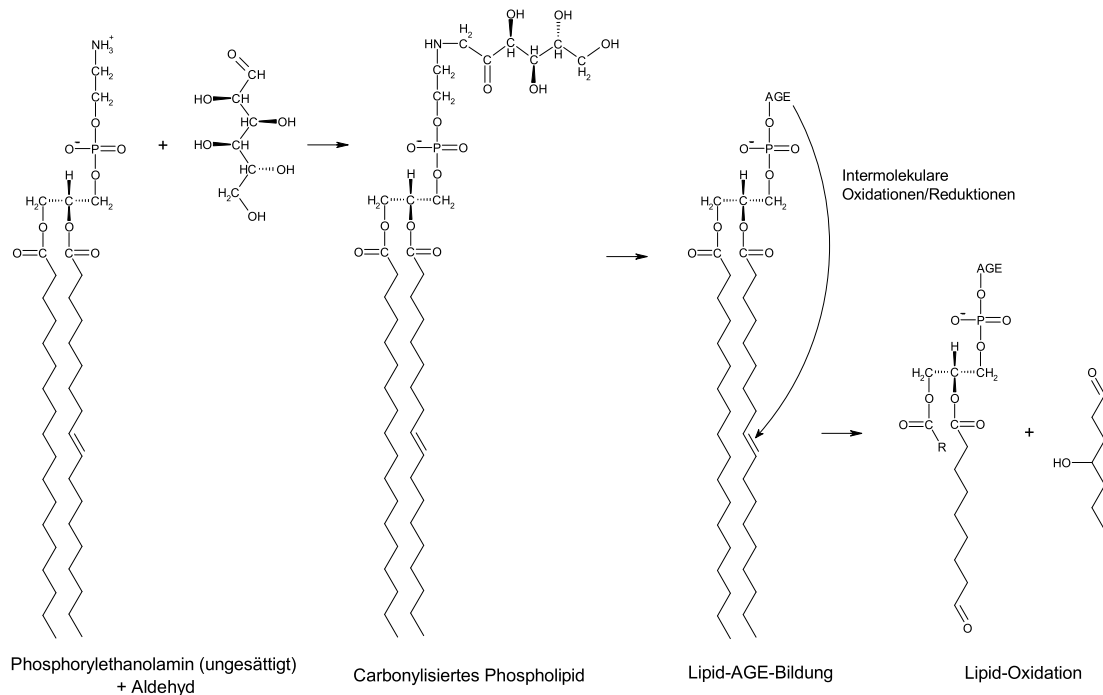


Abb. 10.22: Lipid-AGE-Bildung am Beispiel des Phosphatidylethanolamins und dadurch induzierte Lipid-Oxidation mit Zerfall des Phospholipids (in [Bie98] vorgestellter Ablauf).

de von der Glycation betroffen sein können. Analog zu Abb. 10.21 kann das Aldehyd mit der Amino-Gruppe von z.B. Phosphatidylethanolamin reagieren und so wie bei Proteinen eine Carbonylierung des Makromoleküls durchführen. Im Unterschied zum Prozeß in Abb. 10.21 kommt es aber nicht zu einer Polymerisation, sondern im Anschluß an die AGE-Bildung zu einer Oxidation ungesättigter Fettsäuren [Bie98]. Der Prozeß, der den Zerfall des Phospholipids zur Folge hat, ist in Abb. 10.22 dargestellt.

10.6.1 Bedeutung von Cs bei der Glycation

Es ist bekannt, daß der größte Teil des endogenen Cs *in vivo* mit Proteinen assoziiert ist [Bol00] und daher die Funktion als mobiler pH-Puffer als Haupt-Aufgabe angezweifelt werden muß. Die Mechanismen der Glycation liefern hier Aufschluß über die Zusammenhänge der Immobilisierung durch Assoziation mit Makromolekülen.

Cs hat einen protektiven Effekt für die Makromoleküle, der in verschiedenen Studien untersucht wurde und bei dem es auf zwei verschiedene Arten wirksam ist:

- Reaktion mit der Carbonyl-Gruppe des Makromoleküls; dieser Prozeß wird als Carnosinylierung bezeichnet [Hip00] und unterbindet die AGE-Bildung.
- Reaktion mit Aldehyden/Ketonen oder Hypochlorit, bevor diese die Amino-Gruppe des Makromoleküls angreifen und die Carbonylierung induzieren.

Die Hypothese einer wichtigen Funktion von Cs in Zusammenhang mit der Glycation wird dadurch untermauert, daß das Dipeptid in glykolytischen Geweben in hoher Konzentration vorkommt. Für die Reaktion mit den Protein-Aldehyden geht man davon aus,

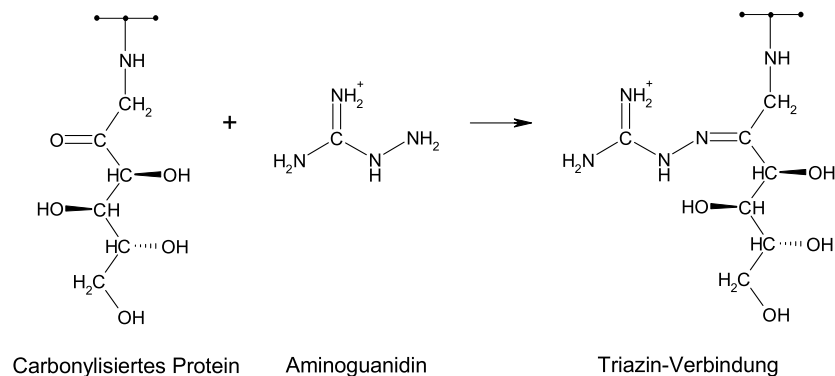


Abb. 10.23: Inhibition von AGE-Cross-Links durch Aminoguanidin. Die resultierende Triazin-Verbindung wird über den Urin ausgeschieden [Bie98].

daß die terminale Cs-Amino-Gruppe unter Abspaltung des Sauerstoffs an den Kohlenstoff der Carbonyl-Gruppe bindet. Das "carnosylierte" Molekül ist in seiner Reaktivität so verändert, daß kein Cross-Linking mehr stattfindet. Untersuchungen über den Ablauf der Reaktion liegen bislang nur *in vitro* vor [Hip00], aber es ist bekannt, daß AGE-Bildung *in vivo* durch Aminoguanidin unterbunden wird [Bie98]. Der Mechanismus dieser Reaktion (Abb. 10.23), bei dem das Endprodukt über den Urin ausgeschieden wird, läßt darauf schließen, daß Carnosinylierung auch *in vivo* stattfinden könnte. Als mögliche Kandidaten für geordnete Proteine, die mittels dieser Reaktion Cs immobilisieren, kommen natürlich die Actin-/Myosin-Filamente in Frage. Aber auch das in [Hip00] vorgeschlagene Modell

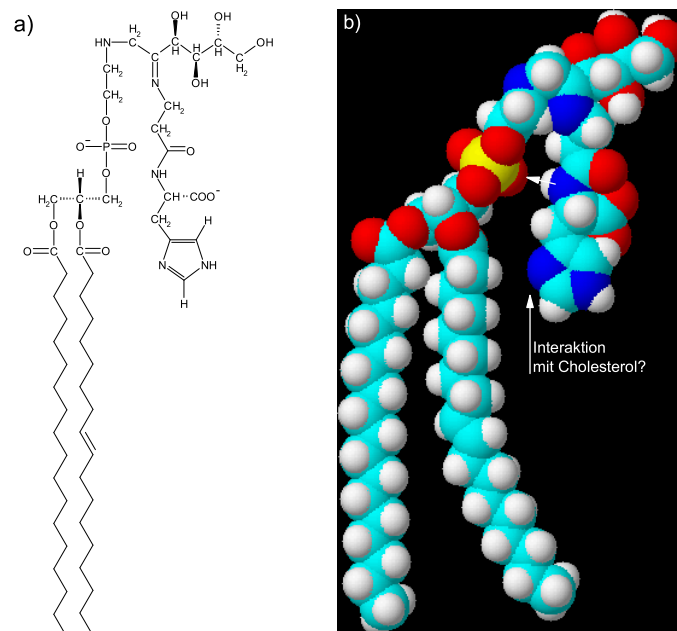


Abb. 10.24: Struktur eines carnosylierten Lipids (a). Das räumliche Modell (b) würde die Möglichkeit einer Wasserstoff-Brücke an der Peptid-Bindung (s. Pfeil) bestätigen und die hier gemessene Resonanz bei 8 ppm *in vivo* erklären. Der Ring könnte außerdem über das N³-Atom fixiert sein, beispielsweise über eine Wasserstoff-Brücke mit der Hydroxyl-Gruppe des Cholesterols.

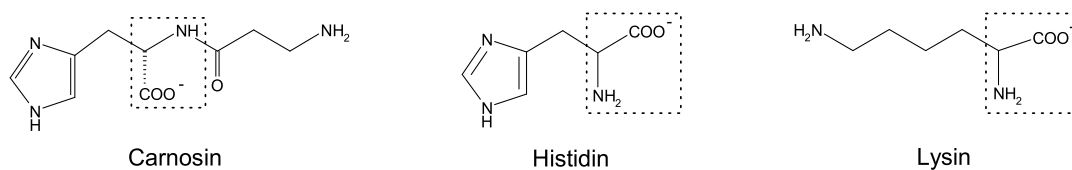


Abb. 10.25: Struktur von Cs im Vergleich zu den Aminosäuren Lys und His, den beiden bevorzugten Residuen bei Carbonylierung von Proteinen: jedes Molekül enthält eine Amino-Gruppe mit proximaler Carboxyl-Gruppe.

eines carnosinylierten Lipids ist interessant. Abb. 10.24 verdeutlicht, daß eine solche Konformation durchaus in Übereinstimmung mit der im vorigen Abschnitt erwähnten Lokalisation aromatischer Strukturen auf Höhe der Glycerol-Brücke und der oberen Acyl-Kette und der in dieser Arbeit vermuteten Ausbildung einer Wasserstoff-Brückenbindung an der NH-Gruppe der Peptid-Bindung steht. Eine Fixierung des Rings könnte noch über das stark nucleophile, unprotonierte N³-Atom stattfinden (z.B. mit der Hydroxyl-Gruppe des Cholesterols). Diese Kombination aus verschiedenen Wechselwirkungen inklusive kovalenter Bindungen könnte eine sehr effektive Immobilisierung des Moleküls verursachen und stünde daher in Übereinstimmung mit den aus den NMR-Spektren gewonnenen Kenntnissen.

Die zweite Art der Protektion hat einen präventiven Charakter. Einerseits kann es aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen Cs, His und Lysin sein, daß Cs anstelle dieser beiden Aminosäure-Residuen eines Proteins von den reaktiven Stoffen an der NH-Gruppe der Peptid-Bindung carbonyliert wird [Hip98]. Alle drei Moleküle besitzen nämlich eine Amino-Gruppe mit proximaler Carboxyl-Gruppe (Abb. 10.25). Hinzu kommt, daß ein Imidazol-Ring, der sich in räumlicher Nähe zu dem Reaktionszentrum befindet, die Amadori-Umordnung katalysiert [Shi91] – eine Voraussetzung, die also auch bei Cs gegeben ist. Es könnte aber auch sein, daß die Reaktion wie bei Phosphatidylethanolamin in Abb. 10.22 an der terminalen Amino-Gruppe abläuft. Diese ist auch im Zusammenhang mit der beobachteten Funktion als Hypochlorit-Radikalquencher [Hip98] interessant, denn analog zu Tau könnte sich hierdurch ein Chloramin-Derivat bilden.

Im Rahmen der Carnosinylierung sollte noch kurz auf das sog. Carnosinase-Paradoxon eingegangen werden. Dieses Enzym ermöglicht die Spaltung des Dipeptids in His und Ala. Da Cs eine der schwächsten toxischen Verbindungen ist, stellt die hohe Konzentration des Enzyms (intrazellulär und im Serum) ein bisher ungelöstes Rätsel dar. Es wurde daher spekuliert, ob das Molekül, das bei der Reaktion mit Carbonyl-Gruppen *in vivo* eine Rolle spielt, nicht His ist [Hip00]. Dabei wurde auch das Argument angeführt, daß eine Verbindung aus Formaldehyd und His im Urin nachweisbar ist. Aufgrund der Toxizität von His wäre es demnach denkbar, daß Cs nur als Speicherform auftritt und über Carnosinase an den benötigten Stellen freigesetzt wird, um eine Anlagerung von His an Protein-Carbonyl-Gruppen zu bewirken. Angeborene Insuffizienz des Enzyms führt zu mentaler Retardierung, was auch auf die Notwendigkeit einer Freisetzung der beiden Peptid-Hälften hindeutet [Hip00].

10.6.2 Erweiterung des Modells auf andere Metaboliten

Zwischen Cs und Tau gibt es strukturell die Gemeinsamkeit des Ethylamin-Restes, aber auch Gemeinsamkeiten bei der Eigenschaft als Hypochlorit-Radikalquencher sind auffällig.

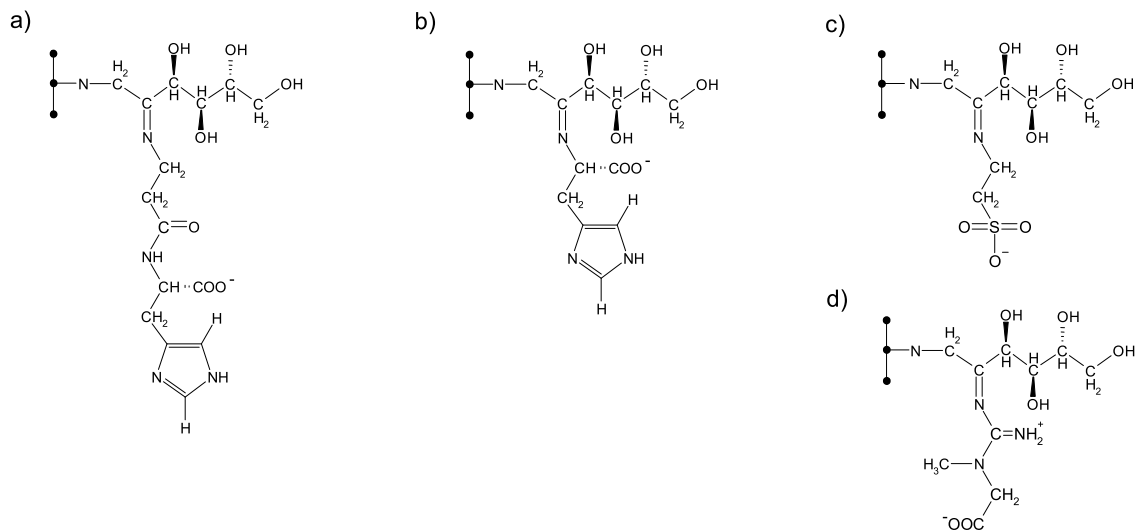


Abb. 10.26: Denkbare Umwandlungen carbonylierter Makromoleküle: (a) Endstadium der bereits untersuchten Carnosinylierung [Hip00]. (b) Die Anlagerung nur des His-Residuums könnte ein Hinweis zum Verständnis des Carnosinase-Paradoxons sein. Aufgrund der Analogien zu Cs bzw. Aminoguanidin könnten auch Tau (c) bzw. Cr (d) über ihre terminalen Amino-Gruppen die vollständige Maillard-Reaktion verhindern.

Es kann also spekuliert werden, ob ein der Carnosinylierung analoger Mechanismus nicht auch mit Tau möglich ist.

Ob Tau außer mit HOCl ähnlich wie Cs auch noch mit Ketonen und Aldehyden reagiert, um eine Carbonylierung von vornherein zu unterbinden, ist wegen des fehlenden katalysierenden Imidazol-Rings fraglich. Makromoleküle, die aber bereits zu einem intermediären Glycations-Produkt umgewandelt wurden, könnten jedoch auch mit Tau an der Carbonyl-Gruppe reagieren und so das Fortschreiten der Maillard-Reaktion verhindern.

Ebenso sollte in Betracht gezogen werden, ob nicht auch Cr mit seiner Amino-Gruppe eine ähnliche Reaktion auslösen könnte, denn die strukturelle Ähnlichkeit zu Aminoguanidin könnte ein Hinweis dafür sein, daß die Carbonyl-Gruppen von Makromolekülen im frühen Stadium der Glycation allgemein mit Amino-Gruppen reagieren (s. auch diskutierte Reaktion mit His als Alternative zur Carnosinylierung). Abb. 10.26 zeigt die möglichen Produkte dieser Reaktionen. Die Beweglichkeit der so an einem Makromolekül fixierten Cr- und Tau-Reste könnte innerhalb der Zwischenräume der Lipid-Köpfe höher sein als die des größeren Cs-Restes. Somit wäre verständlich, daß der Ordnungsparameter für das System H2–H4 am größten ist.

Es liegen also mehrere Anhaltspunkte dafür vor, daß die verschiedenen Metaboliten nicht nur aus sterischen Gründen und über elektrostatische Kräfte in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sind, sondern es kommen auch durchaus kovalente Bindungen mit orientierten Strukturen wie etwa den kontraktile Filamenten oder zellulären Membranen in Frage.

Kapitel 11

Résumé und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß bei 1,5 T die NMR-Spektren einiger gekoppelter Spin-1/2-Systeme eine Feinstruktur aufweisen, die Abweichungen vom Paschen-Back-Effekt veranschaulichen. Linienposition und -intensitäten zeigen Veränderungen, die auf eine nicht-verschwindende Superposition der Produkt-Eigenzustände zurückzuführen sind. Für eine genaue quantitative und qualitative Analyse hochaufgelöster Spektren sind diese Effekte unbedingt zu berücksichtigen.

Die Effekte sind gleichermaßen bei skalaren und dipolaren Kopplungen zu beobachten. Erstere treten *in vivo* deutlicher auf und haben den Vorteil, daß sie leicht *in vitro* unter ähnlichen Bedingungen zu untersuchen sind. Der aus der chemischen Analytik wohlbekannte Dach-Effekt, dessen Bedeutung bei der Identifikation gekoppelter Spin-Systeme durch die Methoden der mehrdimensionalen Spektroskopie etwas gesunken ist, konnte mit geeigneten Modell-Lösungen von ATP ausführlich untersucht und damit für hochaufgelöste ^{31}P -NMR-Spektren der Wadenmuskulatur mit hoher Genauigkeit quantifiziert werden. Dieses Vorwissen kann in die verbesserte Auswertung von klinisch erhobenen Daten einfließen.

Durch die Übertragung der von Breit und Rabi entwickelten Darstellung der feldabhängigen Hyperfeinstruktur war es möglich, eine allgemeine Formel für die dipolare Interaktion zweier anisochroner Protonen-Spins zu bekommen und den verhältnismäßig raschen Übergang vom Zeeman- zum Paschen Back-Effekt zu demonstrieren. So konnte die Existenz einer langreichweitigen Wechselwirkung im Cs nachgewiesen werden. Die theoretischen Betrachtungen zeigten die Unterschiede zwischen skalarer und dipolarer Kopplung auf und machten insbesondere für die direkte Wechselwirkung klar, daß die Drehung des Hilbert-Unterraums Konsequenzen für die Klassifizierung der Systeme in schwache, starke und pseudo-starke Kopplungen hat.

Experimente an skalar gekoppelten Systemen zeigten, daß die Veränderungen in den Linienintensitäten deutlich ausgeprägter sind und bei hohem S/N-Verhältnis als erstes auf Abweichungen von der X-Näherung hinweisen. Beim dipolaren AM-System des Cs konnte wegen der geringen Intensität der Signale und der teilweisen Überlagerung mit anderen Resonanzen nur eine Quantifizierung der Asymmetrie in den Linienpositionen durchgeführt werden. Abb. 11.1 zeigt, daß die hier untersuchten Spin-Systeme einen weiten Bereich an Breit-Rabi-Parametern abdecken. Von den starken Wechselwirkungen wie Cit und Tau bis zu den schwachen Interaktionen des ATP wird deutlich, daß bei Experimenten an Ganzkörper-Tomographen ein unterschiedlich starker residualer Gesamt-Spin definiert

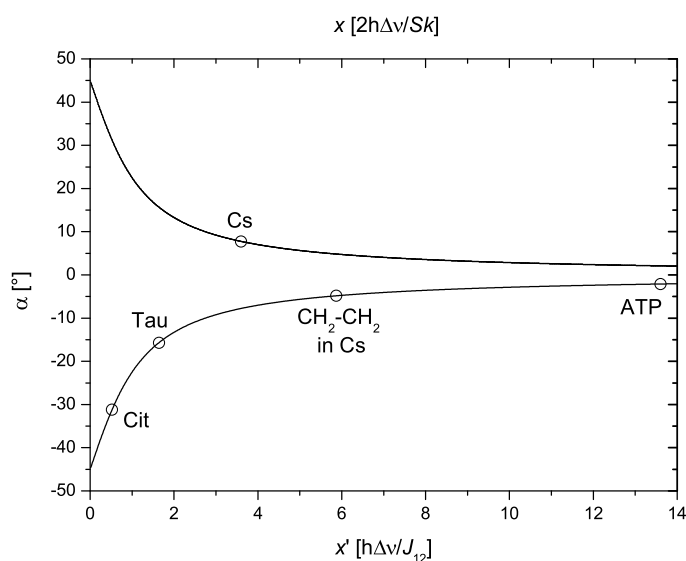


Abb. 11.1: Darstellung der unterschiedlich starken Mischungswinkel für die Überlagerung von Quantenzuständen verschiedener Spin-1/2-Systeme bei 1,5 T (für dipolare Kopplungen bezieht sich x auf die maximal mögliche Linienaufspaltung bei $\theta \approx 0^\circ$).

werden kann. Beim System der Cs-Ringprotonen ist der Gesamt-Spin durch das Grundfeld schon deutlich stärker aufgebrochen als bei den AB-Systemen Cit und Tau. Trotzdem liegt dieses System noch dichter am Zeeman-Bereich als die ^{31}P -Kerne im ATP. Diese werden wegen des bereits auftretenden Dach-Effekts als AMX-System gekennzeichnet, so daß sich Cs durchaus als AM-System klassifizieren läßt. Die pseudo-starken isochronen Systeme nehmen eine Sonderrolle ein, da es bei ihnen immer zur maximalen Mischung der Eigenzustände kommt. Ihr Phänomen der residualen dipolaren Kopplung ist daher deutlich von dem des Cs zu unterscheiden.

Da die quantenmechanische Feinstruktur nur beobachtet werden kann, wenn der residuale Gesamt-Spin noch ausreichend definiert ist, werden die hier beschriebenen Effekte bei Hochfeld-Tomographen ($B_0 \geq 3 \text{ T}$) nur noch abgeschwächt oder gar nicht mehr auftreten. Die Vereinfachung der Spektren durch eine Art Entkopplung mittels des gesteigerten Grundfeldes geht mit einem Informationsverlust einher, der u. a. die Identifikation koppelter Spins erschwert.

Experimente bei kleinen x -Werten sind also prinzipiell aufschlußreicher, was die Untersuchung der Feinstruktur angeht, weisen aber aufgrund der Boltzmann-Verteilung das Problem der geringen Spinpolarisation auf. Aktuelle Fortschritte auf dem Gebiet der μT -NMR geben jedoch Anlaß zu der Überlegung, residuale dipolare Kopplungen in Bereichen $x \ll 1$ zu untersuchen. Breit und Rabi klassifizierten bei der Hyperfeinwechselwirkung den Bereich $x < 0,1$ als starke Wechselwirkung; wie die Verallgemeinerung der Breit-Rabi-Gleichung jedoch zeigte, muß für Protonen von einem deutlich kleineren Wert ausgegangen werden, damit der steile Anstieg der Eigenwerte für die nicht veränderten Eigenzustände ψ_1 und ψ_4 nicht dominant wird.

In diesem Zusammenhang ist die Methode der Niveau-Kreuzungs-Spektroskopie (level crossing, LC) interessant, die 1959 von COLEGROVE et al. vorgeschlagen wurde, um die atomare Feinstruktur präzise zu untersuchen [Col59]. Wird das äußere Feld so eingestellt,

daß sich im Breit-Rabi-Diagramm zwei Niveaus kreuzen, so verschwindet der zugehörige Übergang. Wie Abb. 11.2 zeigt, kreuzen sich (von hohen Feldern kommend) zunächst ψ_1 und ψ_2 . Da x mit $\hbar\Delta\omega$ skaliert ist, muß die benötigte Feldstärke sehr klein sein. In diesem Bereich ist E_2 noch konstant $-0,5Sk$, so daß der steile Anstieg von $E_1(x)$ zur Niveau-Kreuzung bei $x = 1,5 \cdot 10^{-6} = 2\hbar\Delta\omega/Sk$ führt. Mit $SD_0 = 17,7 \text{ Hz}$ und $\Delta\omega \approx 1 \text{ ppm}$ für Cs erhält man für das benötigte externe Feld einen Wert von $0,624 \mu\text{T}$. Dies ist schwächer als das Erdmagnetfeld, aber die Weiterentwicklung aktuell verfügbarer Methoden [McD02] könnte in Zukunft die Untersuchung einer solchen Niveau-Kreuzung bei residualer dipolarer Kopplung mit SQUIDS möglich machen.

Weitere Experimente zum Nachweis der Kopplung H2-H4 sollten die Winkelabhängigkeit des Effekts untersuchen. Zwar wurde in dieser Arbeit durch leicht veränderte Lagerung der Probanden ein Bereich bis $\theta \approx 30^\circ$ abgedeckt und die Tendenz eines Multiplett-Kollapses für $\theta \rightarrow 55^\circ$ auch durch die Auswertung der Spektren aus dem M. soleus bestätigt, die Aufnahme der gesamten Winkelabhängigkeit wurde jedoch noch nicht durchgeführt. Wegen der mit der notwendigen hohen Auflösung verknüpften langen Meßzeit von ca. 16 min pro Spektrum ist es für die Probanden nicht möglich, die Wade dauerhaft gegen das Feld verdreht zu halten. Ein verbessertes S/N eines Hochfeld-Tomographen wäre eine geeignete Möglichkeit, um den charakteristischen $(3 \cos^2 \theta - 1)$ -Verlauf zu messen und die Notwendigkeit einer Euler-Transformation zu untersuchen.

Da mit den Ringprotonen des Cs erstmalig ein anisochrones Spin-System vorliegt, könnten auch NOE-Experimente weiterführende Ergebnisse liefern: selektive Sättigung der einen Resonanz mit anschließender Beobachtung der Signalveränderung des anderen Signals würde einen alternativen Zugang zur Kopplungsstärke darstellen.

Mit der verallgemeinerten Breit-Rabi-Formel und den zugehörigen Asymmetrie-Parametern stehen Beziehungen zur Verfügung, um *In-vivo*-NMR-Spektren auf weitere anisochrome Wechselwirkungen zu untersuchen. Die Quantifizierung der Kopplungskonstante mittels der beobachteten Multiplett-Verschiebung erwies sich im Fall des Cs als weniger genau als die Methode über die Linienaufspaltung; dennoch kann A_P (und unter bestimmten

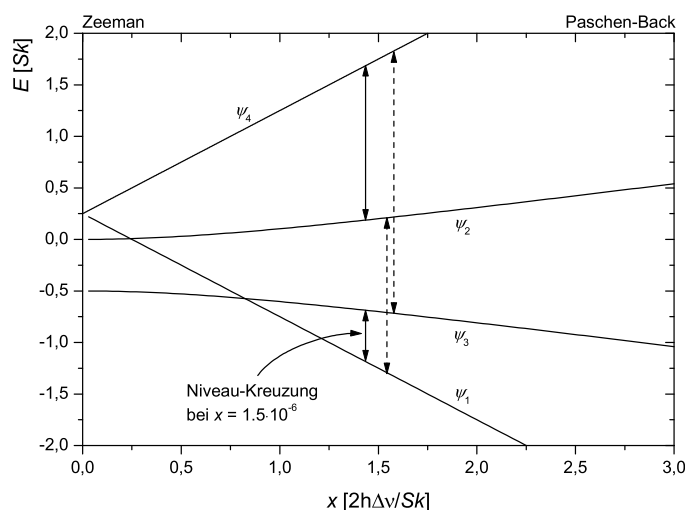


Abb. 11.2: Breit-Rabi-Diagramm dipolar gekoppelter Protonen zur Illustration der Niveau-Kreuzung für sehr niedrige Felder. Bei $x = 1,5 \cdot 10^{-6}$ verschwindet der Übergang $1 \leftrightarrow 2$. Die residuale Kopplungsstärke der Imidazol-Protonen von Cs impliziert diesen Effekt bei $0,624 \mu\text{T}$.

Umständen auch A_1) herangezogen werden, um Wechselwirkungen von Spins nachzuweisen. Experimente an ^{13}C wären ein interessantes Gebiet, um zu prüfen, ob Hinweise auf Fixierungen weiterer Untereinheiten der Moleküle vorliegen.

Die Mechanismen dieser Immobilisierung sind immer noch nicht endgültig aufgeklärt. Viele Ergebnisse sprechen für eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen den Metaboliten und einer ausgerichteten Struktur (in diesem Zusammenhang wurden die Proteinfilamente favorisiert [Asl99, Asl03, Ell94]), aber auch chemische Prozesse mit der Ausbildung kovalenter Bindungen sind ein mögliches Modell. Als Kandidaten für die bindende Struktur werden momentan die kontraktile Filamente oder Zellmembranen diskutiert. Zur Klärung dieser Frage sollten zukünftige Projekte auch die Wechselwirkung mit Phospholipiden untersuchen, da diese für die NMR-Spektroskopie leicht in den benötigten Mengen für *In-vitro*-Experimente zugänglich sind. Bislang liegt nur eine Studie über die Immobilisierung von (P)Cr in Doppelschichten vor [Vil00]. Die Präparation isolierter Filamente, um *in vitro* eine Wechselwirkung mit Membranen auszuschließen, dürfte nur schwer durchführbar sein.

Unabhängig von der noch ausstehenden Erklärung der genauen Umstände der Molekulardynamik in hochgradig strukturierten Geweben stellt sich für quantitative Messungen erneut das Problem MR-sichtbarer und -unsichtbarer Kompartimente: Ist Cs nicht vollständig immobilisiert, so sollten aliphatische Resonanzen sichtbar sein und somit bislang nicht berücksichtigte Beiträge unterhalb der (P)Cr- und Cho-Signale liefern. Wären die Signale der Cs-Methylen-Gruppen andererseits wirklich nicht detektierbar, so würde auch wieder die Frage auftauchen, welcher Anteil dieser leichten Metaboliten überhaupt detektierbar ist.

Literaturverzeichnis

- [Abe00] H. Abe
Role of Histidine-Related Compounds as Intracellular Proton Buffering Constituents in Vertebrate Muscle
Biochemistry (Mosc.) **65**(7), 891-900, (2000)
- [All] N. L. Allinger
Allinger's Molecular Mechanics Research Lab
<http://europa.chem.uga.edu/>
- [Alo89] J. Alonso, C. Arús, W. M. Westler, J. L. Markley
Two-Dimensional Correlated Spectroscopy (COSY) of Intact Frog Muscle: Spectral Pattern Characterization and Lactate Quantitation
Magn. Res. Med. **11**, 316-330, (1989)
- [Alo90] J. Alonso, C. Arús, W. M. Westler, J. L. Markley
Two-Dimensional spectra of Intact Tissue: Homonuclear Hartmann-Hahn Spectroscopy Provides Increased Sensitivity and Information Content as Compared to COSY
Magn. Res. Med. **15**, 142-151, (1990)
- [And50] E. R. Andrew, R. Bersohn
Nuclear Magnetic Resonance Line Shape for a Triangular Configuration of Nuclei
J. Chem Phys. **18**(2), 159-161, (1950)
- [Aru85] C. Arús, Y.-C. Chang, M. Bárány
N-Acetylaspartate as an Intrinsic Thermometer for ^1H NMR of Brain slices
J. Magn. Res. **63**, 376-379, (1985)
- [Aru86] C. Arús, M. Bárány
Application of high-field ^1H -NMR spectroscopy for the study of perfused amphibian and excised mammalian muscles
Biochem. Biophys. Acta **886**, 411-424, (1986)
- [Asl99] I. Asllani, E. Shankland, T. Pratum, M. Kushmerick
Anisotropic Orientation of Lactate in Skeletal Muscle Observed by Dipolar Coupling in ^1H NMR Spectroscopy
J. Magn. Res. **139**, 213-224, (1999)
- [Asl03] I. Asllani, E. Shankland, T. Pratum, M. Kushmerick
Effects of pH and molecular charge on dipolar coupling interactions of solutes in skeletal muscle observed by DQF, ^1H NMR spectroscopy
J. Magn. Res. **163**, 124-132, (2003)

- [Bac95] P. Bachert
Multinukleare *in vivo* Doppelresonanz- und Mehr-Quanten-Kohärenz-NMR-Spektroskopie am Ganzkörper-Tomographen
*Habilitationsschrift, Fakultät für Physik und Astronomie
Universität Heidelberg, (1995)*
- [Bar00] E. J. Baran
Metal Complexes of Carnosine
Biochemistry (Mosc.) **65**(7), 789-790, (2000)
- [Ber57] H. J. Bernstein, J. A. Pople, W. G. Schneider
The Analysis of Nuclear Magnetic Resonance Spectra - I. Systems of Two and Three Nuclei
Can. J. Chem. **35**, 65-81, (1957)
- [Bie98] A. Bierhaus, M. A. Hoffmann, R. Ziegler, P. P. Nawroth
AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept
Cardiovas. Res. **37**, 586-600, (1998)
- [Blo46] F. Bloch
Nuclear Induction
Phys. Rev. **70**, 460-474, (1946)
- [Boe99] C. Boesch, R. Kreis
Dipolar coupling and ordering effects observed in magnetic resonance spectra of skeletal muscle
NMR Biomed. **14**, 140-148, (1999)
- [Bol00] A. A. Boldyrev
Problems and Perspectives in Studying the Biological Role of Carnosine
Biochemistry (Mosc.) **65**(7), 884-890, (2000)
- [Bot84] P. A. Bottomley
PRESS
U. S. Patent, (1984)
- [Bre31] G. Breit, I. I. Rabi
Measurement of nuclear spins
Phys. Rev. **31**, 2082, (1931)
- [Bre01] M. Bretz
Taurin – Chemie, Biochemie, Anwendung
*Seminararbeit, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie,
Universität Würzburg, (2001)*
www.pzlc.uni-wuerzburg.de/files/taurin.pdf
- [Bro79a] C. E. Brown, W. E. Antholine
Chelation Chemistry of Carnosine. Evidence that Mixed Complexes May Occur *in Vivo*
J. Phys. Chem. **83**(26), 3314-3319, (1979)
- [Bro79b] C. E. Brown, F. L. Margolis, T. H. Williams, R. G. Pitcher, G. J. Elgar
Carnosine Binding: Characterization of Steric and Charge Requirements for Ligand Recognition
Arch. Biochem. Biophys. **193**(2), 529-542, (1979)

- [Bru91] H. Bruhn, J. Frahm, M. L. Gyngell, K. D. Merboldt, W. Hänicke, R. Sauter
Localized Proton NMR Spectroscopy Using Stimulated Echoes: Applications to Human Skeletal Muscle *in Vivo*
Magn. Res. Med. **17**, 82-94, (1991)
- [Cam] CambridgeSoft®
ChemOffice Ultra 2004 Trial Version
<http://chemstore.cambridgesoft.com/software/category.cfm?group=free>
- [Col59] F. D. Colegrove, P. A. Franken, R. R. Lewis, R. H. Sands
Novel Method of Spectroscopy with Applications to Precision Fine Structure Measurement
Phys. Rev. Lett. **3**, 420-422, (1959)
- [Cos00] L. C. Costello, R. B. Franklin, Y. Liu, M. C. Kennedy
Zinc causes a shift toward citrate at equilibrium of the m-aconitase reaction of prostate mitochondria
J. Inorg. Biochem. **78**(2), 161-165, (2000)
- [Dam03] B. M. Damon, A. C. Hsu, H. J. Stark, M. J. Dawson
The Carnosine C-2 Proton's Chemical shift Reports Intracellular pH in Oxidative and Glycolytic Muscle Fibers
Magn. Res. Med. **49**, 233-240, (2003)
- [Dou] D. Dougherty
Molecular Recognition in Aqueous Media. The Cation- π Interaction
<http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/molrec.html>
- [Dun97] M. Dunnett, R. C. Harris, M. Z. Soliman, A. A. Suwar
Carnosine, Anserine and Taurine Contents in Individual Fibres from the Middle Gluteal Muscle of the Camel
Res Vet Sci, 62(3), 213-216, (1997)
- [Ell94] G. F. Elliott, C. R. Worthington
How muscle may contract
Biochem. Biophys. Acta **1200**, 109-116, (1994)
- [Ems75] J. W. Emsley, J. C. Lindon
NMR Spectroscopy Using Liquid Crystal Solvents
Pergamon-Press, Oxford, (1975)
- [Ern97] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun
Principles in Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions
Clarendon Press, Oxford, (1997)
- [Fra87] J. Frahm, K. Merboldt, W. Hänicke
Localized Proton Spectroscopy Using Stimulated Echoes
J. Magn. Res. **72**, 502-508, (1987)
- [Fri98] H. Friebolin
Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy
Wiley-VCH, Weinheim, (1998)
- [Gae03] H. C. Gaede, W.-M. Yau, K. Gawrisch
Interaction between Aromatic Compounds and Phospholipids in Bilayers
Poster PH 348, 44th Experimental NMR Conference, Savannah, GA, (2003)

- [Gag90] E. Gaggelli, G. Valensin
 ^1H and ^{13}C NMR Relaxation Investigation of the Calcium Complex of β -Alanyl-L-Histidine (Carnosine) in Aqueous Solution
J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 , 401-406, (1990)
- [Gen93] P.-G. de Gennes, J. Prost
 The Physics of liquid Crystals, 2nd ed.
Clarendon Press, Oxford, (1993)
- [Gov00] V. Govindaraju, K. Young, A. A. Maudsley
 Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites
NMR Biomed. **13**, 129-153, (2000)
- [Gra98] R. A. de Graaf
In vivo NMR spectroscopy; Principles and techniques
John Wiley & Sons, Chichester, (1998)
- [Gra99] M. van der Graaf, H. J. van den Boogert, G. J. Jager, J. O. Barentsz, A. Heerschap
 Human Prostate: Multiselection Proton MR Spectroscopic Imaging with a Single Spin-Echo Sequence – Preliminary Experience
Radiology **213**, 919-925, (1999)
- [Gut50] H. S. Gutowsky, G. E. Pake
 Structural Investigation by Means of nuclear Magnetism. II. Hindered Rotation in Solids
J. Chem Phys. **18**(2), 162-170, (1950)
- [Hae03] U. Haeberlen
 Persönliche Mitteilung
- [Hak96] H. Haken, H. C. Wolf
 Atom- und Quantenphysik: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen
 6. Aufl., *Springer-Verlag, Heidelberg*, (1996)
- [Han99] C. C. Hanstock, R. B. Thompson, M. E. Trump, D. Gheorghiu, P. W. Hochachka, P. S. Allen
 Residual Dipolar Coupling of the Cr/PCr Methyl Resonance in Resting Human Medial Gastrocnemius muscle
Magn. Res. Med. **42**, 421-424, (1999)
- [Har86] R. K. Harris
 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
Longman Scientific & Technical, Essex, (1986)
- [Har90] R. C. Harris, D. J. Marlin, M. Dunnett, D. H. Snow, E. Hultmann
 Muscle Buffering Capacity and Dipeptide Content in the Thoroughbred Horse, Greyhound Dog and Man
Comp. Biochem. Physiol. **97A**(2), 249-251, (1990)
- [Hip98] A. R. Hipkiss, V. C. Worthington, D. T. J. Himsworth, W. Herwig
 Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malodialdehyde and hypochlorite
Biochem. Biophys. Acta **1380**, 46-54, (1998)
- [Hip00] A. R. Hipkiss
 Carnosine and Protein Carbonyl Groups: A Possible Relationship
Biochemistry (Mosc.) **65**(7), 907-916, (2000)

- [Hee97] A. Heerschap, G. J. Jager, M. van der Graaf, J. O. Barentsz, S. H. J. Ruijs
Proton MR Spectroscopy of the Normal Human Prostate with an Endorectal Coil and
a Double Spin-Echo Pulse Sequence
Magn. Res. Med. **37**, 204-213, (1997)
- [Jaf78] E. K. Jaffe, M. Cohn
³¹P Nuclear Magnetic Resonance Spectra of the Thiophosphate Analogues of Adenine
Nucleotides; Effects of pH and Mg²⁺ Binding
Biochemistry **17**(4), 652-657, (1978)
- [Jun96] W.-I. Jung, S. Widmaier, U. Seeger, M. Bunse, A. Staubert, L. Sieverding, K. Strau-
binger, F. van Erckelens, F. Schick, G. Dietze, O. Lutz
Phosphorus *J* Coupling Constants of ATP in Human Myocardium and Calf Muscle
J. Magn. Res. B **110**, 39-46, (1996)
- [Kin99] S. T. Kinsey, B. R. Locke, B. Penke, T. S. Moerland
Diffusional anisotropy is induced by subcellular barriers in skeletal muscle
NMR Biomed. **12**, 1-7, (1999)
- [Kre94] R. Kreis, C. Boesch
Liquid-Crystal-like Structures of Human Muscle Demonstrated by *in Vivo* Observation
of Direct Coupling in Localized Proton Magnetic Resonance Spectroscopy
J. Magn. Res. B **104**, 189-192, (1994)
- [Kre96] R. Kreis, C. Boesch
Spatially Localized, One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy and *in Vivo* App-
lication to Human Muscle
J. Magn. Res. B **113**, 103-118, (1996)
- [Kre97] R. Kreis, M. Koster, M. Kamber, H. Hoppeler, C. Boesch
Peak Assignment in Localized ¹H MR Spectra of Human Muscle Based on Oral Creatine
Supplementation
Magn. Res. Med. **37**, 159-163, (1997)
- [Kre99] R. Kreis, B. Jung, J. Slotboom, J. Felblinger, C. Boesch
Effect of Exercise on the Creatine Resonances in ¹H MR Spectra of Human Skeletal
Muscle
J. Magn. Res. **137**, 350-357, (1999)
- [Kre00] R. Kreis, C. Boesch
Orientation Dependence is the Rule, Not the Exception in ¹H-MR Spectra of Skeletal
Muscle: the Case of Carnosine
ISMRM Proc. **8**, 31, (2000)
- [Kru99] M. J. Kruiskamp, R. A. de Graaf, G. van Vliet, K. Nicolay
Magnetic Coupling of Creatine/Phosphocreatine Protons in Rat Skeletal Muscle, as
studied by ¹H-Magnetization
Magn. Res. Med. **42**, 665-672, (1999)
- [Leh82] A. L. Lehninger
Principles of Biochemistry
Worth Publishers, New York, (1982)
- [Mac99] J. J. Mackrill
Protein-protein interactions in intracellular Ca²⁺-release channel function
Biochem. J. **337**(3), 345-361, (1999)

- [McD02] R. McDermott, A. H. Trabesinger, M. Mück, E. L. Hahn, A. Pines, J. Clarke
Liquid-state NMR and scalar couplings in microtesla magnetic fields
Science **295**, 2247-2249, (2002)
- [Mec96] S. Mecozzi, A. P. West jr., D. Dougherty
Cation- π interactions in aromatics of biological and medicinal interest: Electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 10566-10571, (1996)
- [Mul93] R. V. Mulkern, J. L. Bowers
Calculating Spectral Modulations of AB Systems During PRESS Acquisitions
Magn. Res. Med. **30**, 518-519, (1993)
- [Ntz97] V. Ntziachristos, R. Kreis, C. Boesch, B. Quistorff
Dipolar Resonance Frequency Shifts in ^1H MR Spectra of Skeletal Muscle: Confirmation in Rats at 4.7 T *in Vivo* and Observation of Changes Postmortem
Magn. Res. Med. **38**, 33-39, (1997)
- [Pan88] J. W. Pan, J. R. Hamm, D. L. Rothman, R. G. Shulman
Intracellular pH in human skeletal muscle by ^1H NMR
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 7836-7839, (1988)
- [Pop57] J. A. Pople, W. G. Schneider, H. J. Bernstein
The Analysis of Nuclear Magnetic Resonance Spectra - II. Two Pairs of Equivalent Nuclei
Can. J. Chem. **35**, 1060-1072, (1957)
- [Pre99] V. R. Preedy, V. B. Patel, M. E. Reilly, P. J. Richardson, G. Falkous, D. Mantle
Oxidants, Antioxidants and Alcohol: Implications for Skeletal and Cardiac Muscle
Frontiers in Bioscience **4**, e58-66, (1999)
- [Rei01] Hans J. Reich
WINDNMR-Pro Version 7.1.5
<http://www.chem.wisc.edu/areas/reich/plt/windnmr.htm>
- [Rub01] A. M. Rubtsov
Molecular Mechanisms of regulation of the Activity of Sarcoplasmic Reticulum Ca-Release Channels (Ryanodine Receptors), Muscle Fatigue, and Severin's Phenomenon
Biochemistry (Mosc.) **66**(10), 1132-1143, (2001)
- [Sch91] E. Schikaneder
Die Zauberflöte; 2. Aufzug, 30. Auftritt, 3. Einsatz des Monostatos
Verleger Ignaz Alberti, Wien, (1791)
- [Sch93] F. Schick, H. Bongers, S. Kurz, W.-I. Jung, M. Pfeffer, O. Lutz
Localized Proton MR Spectroscopy of Citrate *in Vitro* and of the Human Prostate *in Vivo* at 1.5 T
Magn. Res. Med. **29**, 38-43, (1993)
- [Sch01] L. Schröder
Flüssigkristallartiges Verhalten körpereigener Metaboliten in der ^1H -NMR-Spektroskopie
Diplomarbeit, Fakultät für Physik und Astronomie Universität Heidelberg, (2001)

- [See87] J. Seelig, P. M. Macdonald, P. G. Scherer
Phospholipid Head Groups as Sensors of Electric Charge in Membranes
Biochemistry **26**(24), 7535-7541, (1987)
- [Seb86] L. A. Sebring, R. J. Huxtable
Low affinity binding of taurine to phospholiposomes and cardiac sarcolemma
Biochem. Biophys. Acta **884**, 559-566, (1986)
- [Shi91] B. H. Shilton, D. J. Walton
Sites of Glycation of Human and Horse Liver Alcohol Dehydrogenase *in Vivo*
J. Biol. Chem. **266**(9), 5587-5592, (1991)
- [Sie02] Siemens AG, Medical Solutions
Application Guide Prostate CSI, (2002)
- [Sli89] C. P. Slichter
Principles of Magnetic Resonance, 3rd Edition
Springer Verlag, Heidelberg, (1989)
- [Sob00] J. Sobotta; Hrsg. R. Putz, R. Pabst
Atlas der Anatomie des Menschen, 21. Aufl.
Urban & Fischer, München, (2000)
- [Str90] L. Stryer
Biochemie
Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg, (1990)
- [Str95] K. Straubinger, F. Schick, O. Lutz
Computer-algebra calculations and measurements on AB spin systems for double-spin-echo sequences
MAGMA **3**, 109-118, (1995)
- [Van01] L. Vanhamme, T. Sundin, P. van Hecke, S. van Huffel
MR spectroscopy quantitation: a review of time-domain methods
NMR Biomed. **14**, 133-246, (2001)
- [Ver01] P. Vermathen, R. Kreis, C. Boesch
Mapping Fiber Orientation in Muscle by Short TE MRSI. Regional Variations of ^1H Spectra of Human Muscle Due to Orientation Dependent Dipolar Splittings
ISMRM Proc. **9**, 328, (2001)
- [Ver02] P. Vermathen, C. Boesch, S. E. Maier, R. Kreis
Comparison of Fiber Orientation in Human Muscle by Short TE MRSI Diffusion Weighted Imaging
ISMRM Proc. **10**, 173, (2002)
- [Ver03] P. Vermathen, C. Boesch, R. Kreis
Mapping Fiber Orientation in Human Muscle by Proton MR Spectroscopic Imaging
Magn. Res. Med. **49**, 424-432, (2003)
- [Vil00] S. J. De Vilder, M. J. Kruiskamp, R. Wechselberger, M. Czisch, K. Nicolay
Magnetically-oriented bicells as an *in vitro* tool to investigate the residual dipolar coupling of creatine and phosphocreatine protons in skeletal muscle
ISMRM Proc. **8**, 1007, (2000)

- [Web98] U. Weber, H. Thiele
NMR spectroscopy: modern spectral analysis
Wiley-VCH, Weinheim, (1998)
- [Wil95] A. H. Wilman, P. S. Allen
The Response of the Strongly Coupled AB System of Citrate to Typical ^1H MRS Localization Sequences
J. Magn. Res. B **107**, 25-33, (1995)
- [Yea77] P. L. Yeagle, W. C. Hutton, C.-H. Huang, B. R. Martin
Phospholipid Head-Group Conformations; Intermolecular Interactions and Cholesterol Effects
Biochemistry **16**(20), 4344-4349, (1977)
- [Yun65] J. Yun, C. J. Parker jr.
The Effect of Carnosine on Myofibrillar ATPase Activity
Biochimica et Biophysica Acta, **110**, 221-214, (1965)
- [Zan00] H. J. A. in 't Zandt, D. W. J. Klomp, F. Oerlemans, B. Wieringa, C. W. Hilbers, A. Heerschap
Proton MR Spectroscopy of Wild-Type and Creatine Kinase Deficient Mouse Skeletal Muscle: Dipole-Dipole Coupling Effects and Post-mortem Changes
Magn. Res. Med. **43**, 517-524, (2000)

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

- L. Schröder, P. Bachert
Residual Dipolar Couplings in ^1H MR spectra of intact Muscle *in vivo* reveal Information about Differences in Molecular Mobility of Carnosine and Creatine
MAGMA **15** (Suppl. 1), 270, (2002)
- L. Schröder, P. Bachert
Evidence for a Dipolar-Coupled AM System in Carnosine in Human Calf Muscle from *in vivo* ^1H NMR Spectroscopy
J. Magn. Res., available online 17 July 2003;
doi: 10.1016/S1090-7807(03)00205-2

Abbildungsverzeichnis

1.1	FID-Signal und FT	10
1.2	Erzeugung eines Spinechos	11
1.3	Signalverlauf beim Spinecho-Experiment	12
2.1	Übergang vom AX- zum A_2 -System	19
2.2	Energieniveaus für skalare AX- und A_2 -Systeme	22
2.3	Irreduzible Komponenten eines A_2 -Systems	24
2.4	Irreduzible Komponenten eines A_2X -Systems	24
2.5	Irreduzible Komponenten eines A_2B -Systems	25
2.6	Irreduzible Komponenten eines A_2B_2 -Systems	26
3.1	Energieniveaus für dipolare AX- und A_2 -Systeme	36
3.2	Rotation einer CH_2 -Gruppe	37
3.3	Struktur von 1,2-Dichloroethan	38
3.4	Energieniveaus einer CH_3 -Gruppe	39
3.5	Energiekorrekturen einer stationären CH_3 -Gruppe	40
3.6	1H -NMR-Spektren einer stationären Methyl-Gruppe	41
3.7	Energiekorrekturen einer rotierenden CH_3 -Gruppe	42
3.8	Struktur von 1,1,1-Trichlorethan und Acetonitril	43
3.9	Verlauf des Asymmetrie-Parameters $A_P(\alpha)$ für dipolare Kopplung	44
4.1	Breit-Rabi-Diagramm der 1H -Hyperfeinstruktur	49
4.2	Breit-Rabi-Diagramm für skalare Spin-Spin-Kopplung	51
4.3	Breit-Rabi-Diagramm für dipolare Spin-Spin-Kopplung	53
4.4	Breit-Rabi-Diagramm für ein skalar gekoppeltes A_2 -System	54
4.5	Breit-Rabi-Diagramm für ein dipolar gekoppeltes A_2 -System	55
4.6	Niveau-Kreuzungen und Hanle-Effekt am Beispiel von Cu	56
5.1	Dach-Effekt der skalaren Kopplung eines AM-Systems	60
5.2	Dach-Effekt der dipolaren Kopplung eines AM-Systems	60
5.3	Verlauf des Asymmetrie-Parameters $A_P(\alpha)$ für skalare und dipolare Kopplung	61
5.4	A_2 -Systeme als Extremfälle des Dach-Effekts	61
5.5	Darstellung der Asymmetrie-Parameters	62
5.6	Kumulierter Dach-Effekt eines AMX-Systems	63
5.7	Phasenmodulation für unterschiedlich stark gekoppelte Systeme	65
6.1	Strukturformel von Kreatin und Phosphokreatin	70
6.2	Strukturformel des Dipeptids <i>L</i> -Carnosin	71
6.3	Strukturformel des ATP	72
6.4	Funktionsweise der ATPase	73
6.5	Mögliche Komplexe von Mg^{2+} mit ATP	74
6.6	Überblick über die drei Stufen der Zellatmung	75

6.7	Bildung von Citrat aus Acetyl-CoA	75
6.8	Enzymatische Umwandlung zwischen Citrat und Iso-Citrat	76
6.9	Strukturformel von Taurin	77
6.10	Hauptpfad der Metabolisierung von Cystein	78
6.11	Tau als Hypochlorit-Radikalquencher	78
7.1	<i>In-vivo</i> - ¹ H-NMR-Spektrum ohne Anwendung von Sättigungspulsen	83
7.2	<i>In-vivo</i> - ¹ H-NMR-Spektrum mit Wassersignal-Sättigung	83
7.3	Aufbau einer PRESS-Sequenz	85
7.4	Aufbau einer STEAM-Sequenz	86
7.5	Aufbau einer ³¹ P-CSI-Sequenz mit NOE und Spin-Entkopplung	88
7.6	Benutzeroberfläche des Simulationsprogramms WinDNMR-Pro	89
8.1	¹ H-NMR-Spektren von Cit bei 1,5 T	94
8.2	Simulation eines hochaufgelösten ¹ H-NMR-Spektrums von Tau	95
8.3	¹ H-NMR-Spektrum von Tau bei 63,63 MHz	96
8.4	Simulierte ¹ H-NMR-Spektren von Tau bei 63,63 MHz	97
8.5	³¹ P-NMR-Spektrum von PCr und ATP bei pH = 7,04	98
8.6	ATP-Spektrum mit Anpassung der Datenpunkte durch Lorentz-Linien	99
8.7	³¹ P-NMR-Spektren von ATP bei verschiedenen pH-Werten	100
8.8	Anpassung von Lorentz-Linien an ³¹ P-NMR-Spektren von ATP	100
8.9	³¹ P-NMR-Spektren von ATP mit und ohne Komplexierung durch Mg ²⁺	101
8.10	³¹ P-NMR-Spektrum von MgATP bei physiologischem pH-Wert	102
8.11	³¹ P-NMR-Spektren von MgATP bei verschiedenen pH-Werten	103
8.12	Anpassung von Lorentz-Linien an ³¹ P-NMR-Spektren von MgATP	104
8.13	Variation der Korrekturfaktoren <i>x</i> und <i>y</i> für den Dach-Effekt	104
8.14	¹ H-NMR-Spektrum einer Cs-Modell-Lösung	105
8.15	Strukturformeln von <i>L</i> -Carnosin, <i>L</i> -Histidin und <i>N</i> -Acetylaspartat	106
8.16	Aromatischer Bereich des ¹ H-NMR-Spektrums von Cs bei verschiedenen pH-Werten	107
8.17	¹ H-NMR-Signal der NH-Gruppen von NAA und His bei verschiedenen pH-Werten	107
8.18	Einfluß von Cu ²⁺ -Ionen auf die aromatischen Resonanzen im Cs-Spektrum	108
8.19	Einfluß von Cu ²⁺ -Ionen auf die aliphatischen Resonanzen im Spektrum von Cs . .	109
8.20	Einfluß von Cu ²⁺ -Ionen auf die aromatischen Resonanzen im Spektrum einer sauren Cs-Modell-Lösung	109
8.21	Struktur von <i>L</i> - α -Phosphatidylcholin und O-Phosphorylethanolamin	110
8.22	¹ H-NMR-Spektren von Modell-Lösungen mit O-Phosphorylethanolamin und Tau .	111
8.23	¹ H-NMR-Spektrum einer Tau-Modell-Lösung mit und ohne Phospholipon® 90 H .	112
9.1	Darstellung der untersuchten Wadenmuskeln	114
9.2	<i>In-vivo</i> - ¹ H-NMR-Spektren des M. gastrocnemius und des M. soleus	115
9.3	Bestimmung der Faserorientierung mit Hilfe des (P)Cr-Methylen-Dubletts	116
9.4	Phasenmodulation des (P)Cr-CH ₂ -Dubletts in <i>In-vivo</i> - ¹ H-NMR-Spektren	117
9.5	Phasenverlauf des (P)Cr-Methylen-Dubletts	117
9.6	Winkelabhängige Linienaufspaltung des (P)Cr-Methyl-Signals	119
9.7	<i>In-vivo</i> - ¹ H-NMR-Spektrum im Bereich der CH ₂ - und CH ₃ -Signale	120
9.8	Auflösung der Tau-, Cho- und (P)Cr3-Signale	120
9.9	Winkelabhängige Linienaufspaltung von Tau	121
9.10	Vergleich der ¹ H-NMR-Spektren von Cs <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	122
9.11	<i>T</i> ₂ -Zerfall der Resonanzen von Cs in <i>In-vivo</i> - ¹ H-NMR-Spektren	123
9.12	Winkelabhängige Linienaufspaltung der Signale der Cs-Ringprotonen	124
9.13	Vergleich der <i>In-vivo</i> - ¹ H-NMR-Resonanzen von Cs in zwei Wadenmuskeln	125
9.14	Winkelabhängige Kopplungsstärke H2-H4 aus den Asymmetrien	126
9.15	<i>In-vivo</i> - ³¹ P-NMR-Spektrum der menschlichen Wade	128

9.16	Verschiedene Anpassungen an ein <i>In-vivo</i> - ³¹ P-NMR-Spektrum von ATP	129
9.17	<i>In-vivo</i> - ¹ H-NMR-Spektrum von Cit	130
10.1	Variation der winkelabhängigen Korrekturterme	134
10.2	Zusammensetzung des Asymmetrie-Parameters	134
10.3	Näherung für eine kumulierte Asymmetrie	135
10.4	Unzureichende Phasenkorrektur in <i>In-vivo</i> - ³¹ P-NMR-Spektren	139
10.5	Unterschiede der residualen ³¹ P-Gesamt-Spins <i>F</i> im ATP-Molekül	139
10.6	Analyse des Ala-CH ₂ -Tripletts	141
10.7	3D-Struktur von Cs und Modell des Ca ²⁺ -Komplexes von Cs	144
10.8	Tautomere des Imidazol-Rings	146
10.9	Komplexbildende Eigenschaften von Cu(II)-Ionen	147
10.10	Schematische Darstellung der Substruktur einer Muskelzelle	149
10.11	Struktur von Phosphatidylcholin und Cholesterol	150
10.12	Konformation von Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren	151
10.13	Phospholipide, die auf Wechselwirkungen mit Tau untersucht wurden	152
10.14	Vergleich von Tau und seinem Carboxyl-Analogen β -Alanin	152
10.15	Modell einer möglichen Anlagerung von Tau an die Zellmembran	153
10.16	Protonenabstände in den Methylen-Gruppen des Tau	154
10.17	Modell einer möglichen Anlagerung von PCr an die Zellmembran	155
10.18	Methyl- und Methylen-Gruppe im PCr	156
10.19	Elektrostatische Potentialoberflächen verschiedener Aromaten	158
10.20	Transport von Ca ²⁺ -Ionen durch Rezeptoren aus dem Lumen des SR	158
10.21	Entstehung von "AGE"-Cross-Links in Proteinen in der Maillard-Reaktion	159
10.22	Lipid-AGE-Bildung am Beispiel des Phosphatidylethanolamins	160
10.23	Inhibition von AGE-Cross-Links durch Aminoguanidin	161
10.24	Struktur eines carnosinylierten Lipids	161
10.25	Cs im Vergleich zu den Aminosäuren Lys und His	162
10.26	Denkbare Umwandlungen carbonylierter Makromoleküle	163
11.1	Mischungswinkel verschiedener Spin-1/2-Systeme bei 1,5 T	166
11.2	Niveau-Kreuzung im Breit-Rabi-Diagramm dipolar gekoppelter Protonen	167

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die auf sehr vielfältige Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn PD Dr. habil. Peter Bachert danke ich für Möglichkeit, die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Die unermüdliche Motivation, den anfangs unerwarteten Beobachtungen weiter nachzugehen, und das Interesse an ihrer theoretischen Beschreibung haben maßgeblich dazu beigetragen, daß in dieser Arbeit viele Aspekte der NMR-Spektroskopie behandelt wurden. Ebenso bin ich ihm für anregenden Diskussionen und die großzügige Freiheit, die er mir bei der Ausgestaltung einzelner Themenbereiche gab, sehr dankbar. In den vergangenen zwei Jahren wurde mir so die Forschung auf einem Gebiet mit sehr interdisziplinärer Ausrichtung ermöglicht.

Bei Herrn Prof. Dr. Josef Bille vom Kirchhoff-Institut für Physik bedanke ich mich ganz herzlich für die spontane Bereitschaft, das Zweitgutachten der Arbeit zu erstellen.

Herrn Prof. Dr. Dr. Semmler, Leiter der Abteilung Medizinische Physik in der Radiologie am DKFZ, bin ich für das Interesse am Fortschreiten der Arbeit und die Möglichkeit, die Ergebnisse bei verschiedenen Gelegenheiten – insbesondere beim 44. ENC in Savannah – präsentieren zu können, sehr dankbar.

Den Kollegen meiner Arbeitsgruppe danke ich neben der produktiven Zusammenarbeit für das überaus heitere Arbeitsklima, das sich auch oft nach Feierabend fortgesetzt hat. Insbesondere möchte ich mich bedanken bei

Herrn Dipl.-Chem. Christian Schmitz, der bis zu seinem Wechsel ans Physikalisch-Chemische Institut der Universität Heidelberg viele experimentelle und theoretische Ideen beigesteuert hat und ohne dessen außergewöhnliche Zusammenarbeit das Projekt nicht so ergiebig gewesen wäre;

Herrn Dipl.-Phys. Stefan Kirsch für die anregenden und hilfreichen Diskussionen über einzelne Meßergebnisse und den Erfahrungsaustausch bezüglich der Experimente an anisotropen Medien;

Herrn Dipl.-Phys. Ulrich Felzmann, der besonders bei der Bekämpfung einiger Hardware-Widrigkeiten unersetzlich war, und der stets bemüht war, das charakteristische Arbeitsklima der Gruppe zu erhalten;

den Kollegen Frau cand. phys. Marion Lang, Herrn cand. phys. Christian Schuster sowie Herrn cand. phys. Michael Wormit, die sich in der Endphase der Arbeit noch des öfteren als Probanden zur Verfügung gestellt haben;

den ehemaligen Kollegen Herrn Dr. Steffen Sammet und Herrn Dr. Thomas Wilhelm, die mir die Einarbeitung in die ^{31}P -NMR-Spektroskopie ermöglicht haben.

Für aufschlußreiche Gespräche über einige molekulardynamische Aspekte möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Haeberlen vom MPI für medizinische Forschung

bedanken.

Frau Port aus der Abteilung Perinatale Toxikologie danke ich für die Bereitstellung des Phospholipons® 90 H.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe NMR-Bildgebung danke ich für die nette Atmosphäre und die Einblicke auf dem Gebiet der bildgebenden Verfahren.

Bei den medizinisch-technischen Assistenten und den Ärzten der MR-Abteilung möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Probandenmessungen bedanken.

Ebenso bin ich allen dankbar, die sich freundlicherweise als Probanden zur Verfügung gestellt haben. Neben den Kollegen sind hier auch besonders die Zivildienstleistenden zu nennen, die mir durch ihre oft kurzfristige Bereitschaft zu Messungen eine große Flexibilität bei der Ausnutzung der Meßzeit ermöglicht haben.

Frau Realschullehrerin Barbara Kromer danke ich für die spontane Bereitschaft, die Arbeit Korrektur zu lesen und so für einen angemessenen orthographischen Rahmen zu sorgen. Durch ihr unschätzbare Engagement wurde die Fertigstellung der Arbeit in der Endphase erheblich beschleunigt.

Schließlich möchte ich noch dem Weingut Eugen Wehrheim für die großzügigen Zuwendungen während der Arbeit zum Begießen einiger freudiger Momente und Meilensteine auf dem Weg zur Promotion danken. Die guten Tropfen haben mir und den Mitarbeitern viele schöne Momente beschert.