

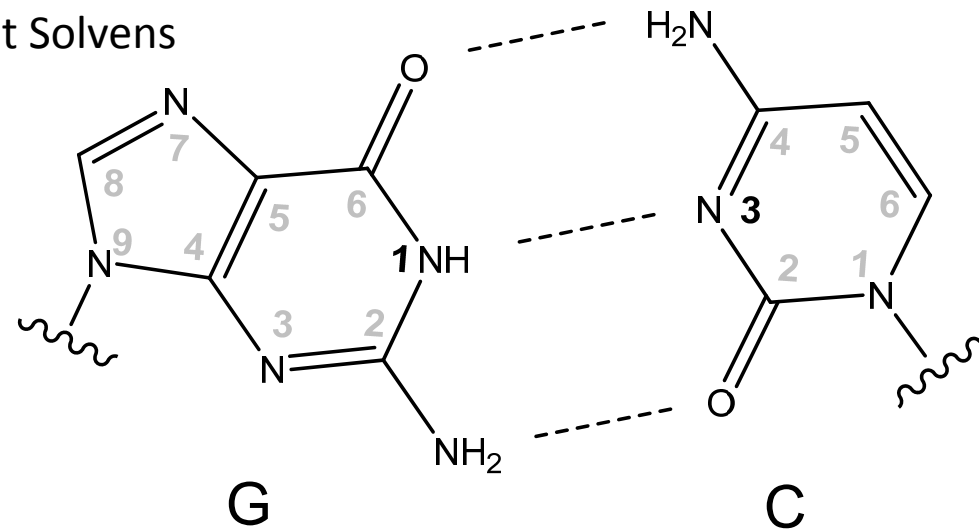
*Direct Observation of Hydrogen Bonds in  
Nucleic Acid Base Pairs by Internucleotide  
 $^2J_{NN}$  Couplings*

**Andrew J. Dingley and Stephan Grzesiek**

J.Am.Chem.Soc.(1998) 120, 8293-97

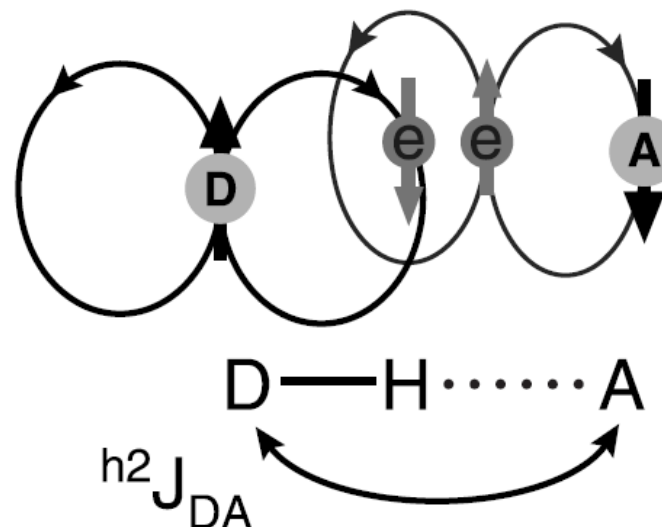
# Wasserstoffbrückenbindungen

- Wechselwirkung zwischen Wasserstoff und freiem Elektronenpaar eines Donors (N,O)
- Essentiell für diverse biologische Systeme (typisch: 2 – 20 kJ/mol)
- Detektion in NMR meist indirekt:
  - Reduzierte Austauschraten mit Solvens
  - Chemische Verschiebung



# Skalare Kopplung in H-Brückenbindungen

- Skalare Wechselwirkung benötigt chemische Bindung
- Anhand der skalaren Kopplung lässt sich auf Bindungssituation schließen
- Drei grundlegende Mechanismen nach Ramsey:
  - *Electron orbital term*
  - *Electron spin term*
  - ***Fermi contact term***

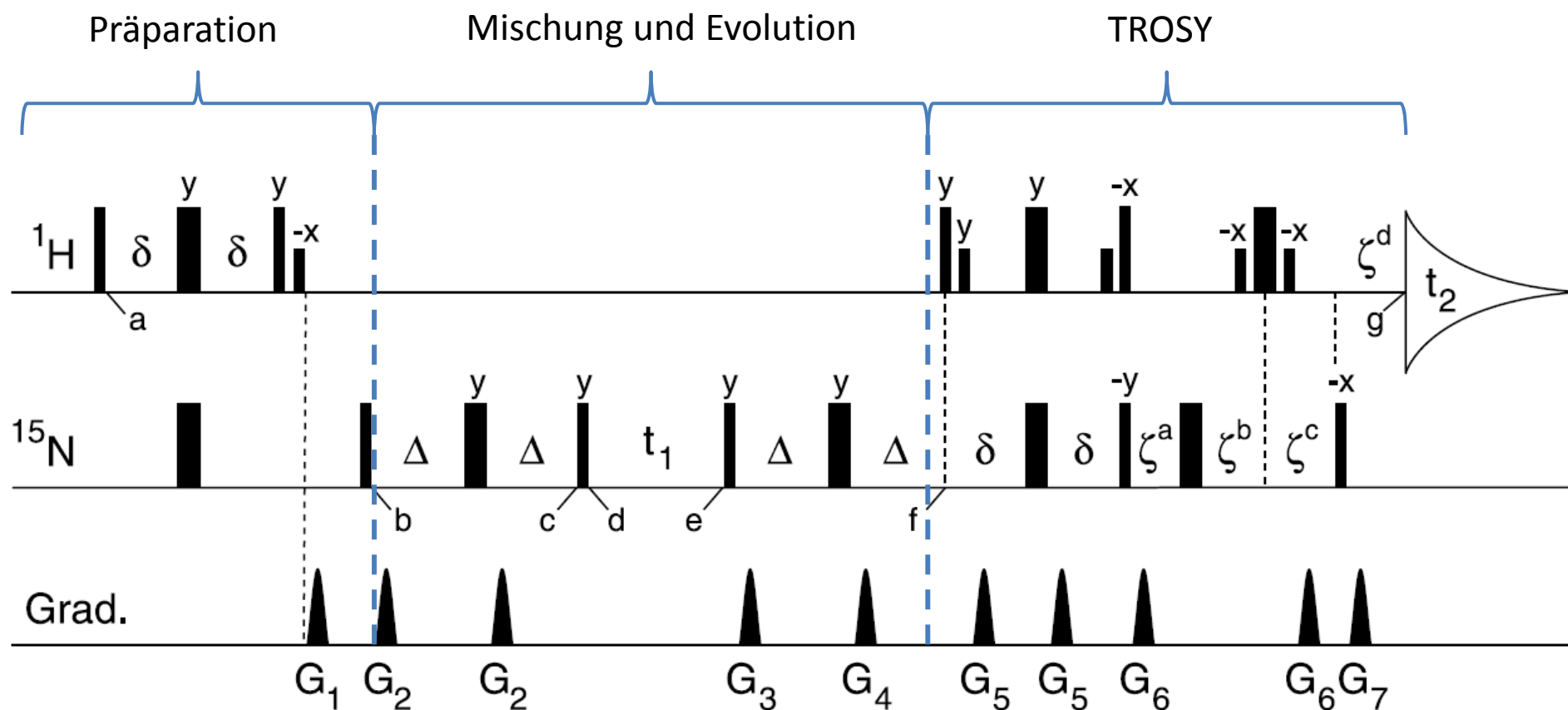


# HNN COSY Experiment

---

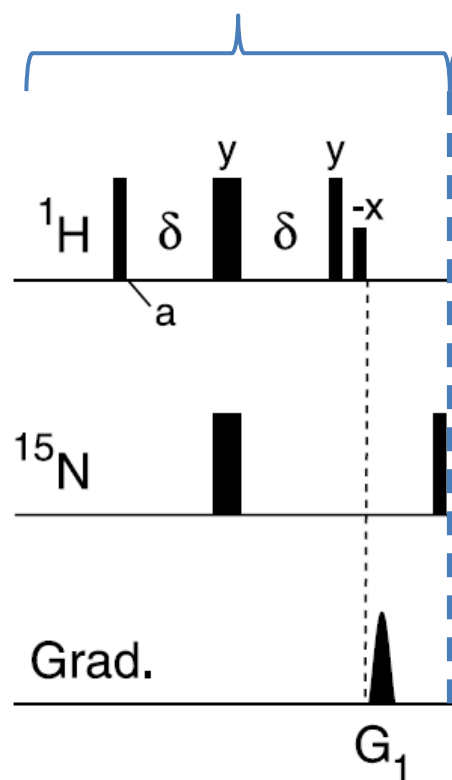
- Einzelnes N-homonukleares COSY Experiment bestimmt:
    - Chemische Verschiebung der drei Kerne
    - $^2J_{\text{NN}}$  Kopplungskonstante
  - Ermöglicht Zuordnung von (sequenziell stark separierten) Basenpaaren
  - Voraussetzung:  $^{15}\text{N}$  isotopenmarkierte DNA
-

# Pulssequenz

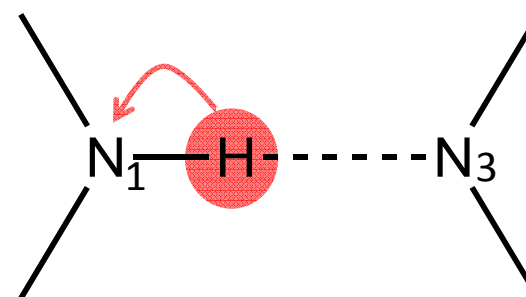


# Präparation: H-N-INEPT

Präparation

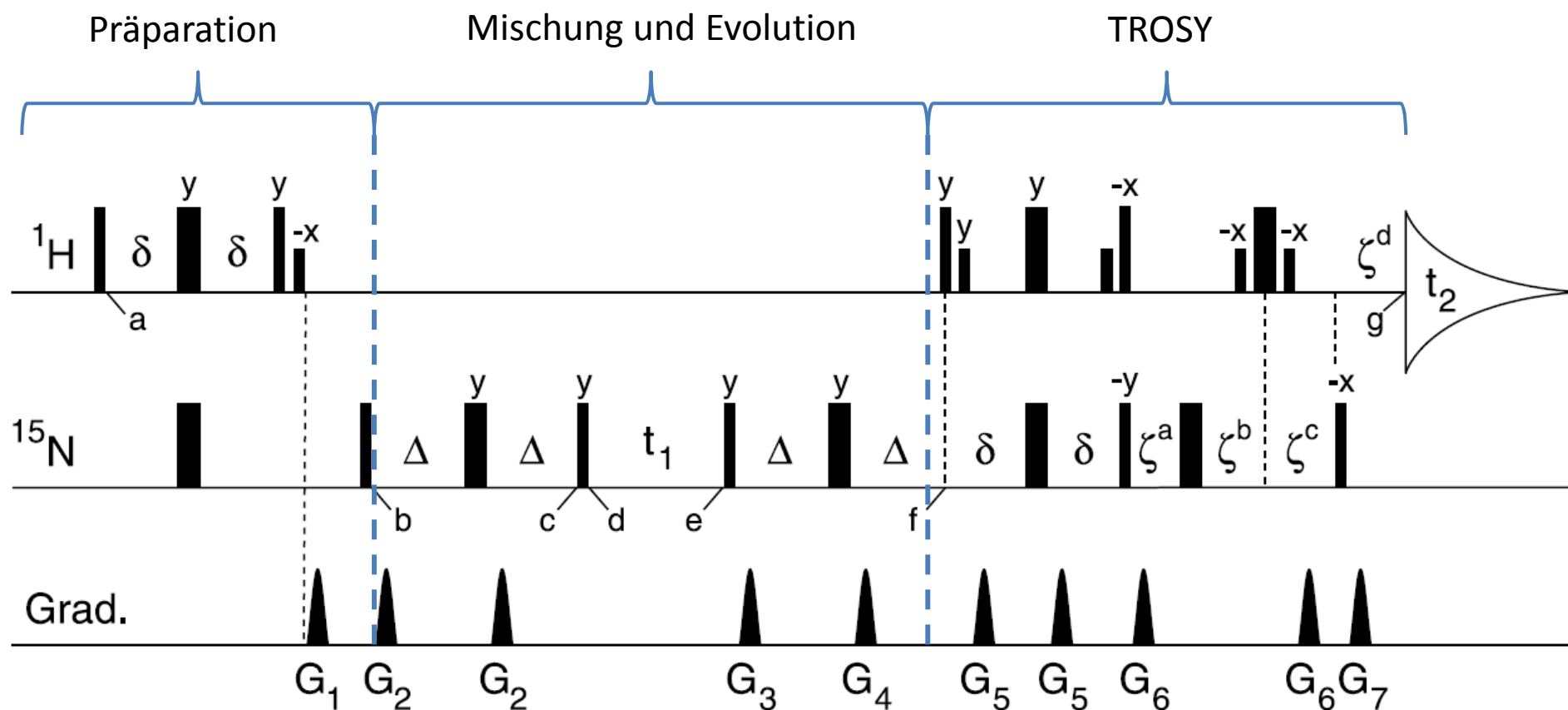


- Magnetisierungstransfer von Proton zu kovalent gebundenem Stickstoffatom

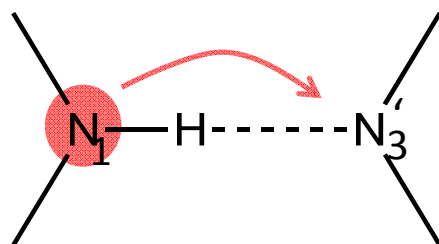


$$\longrightarrow 2H_z N_y$$

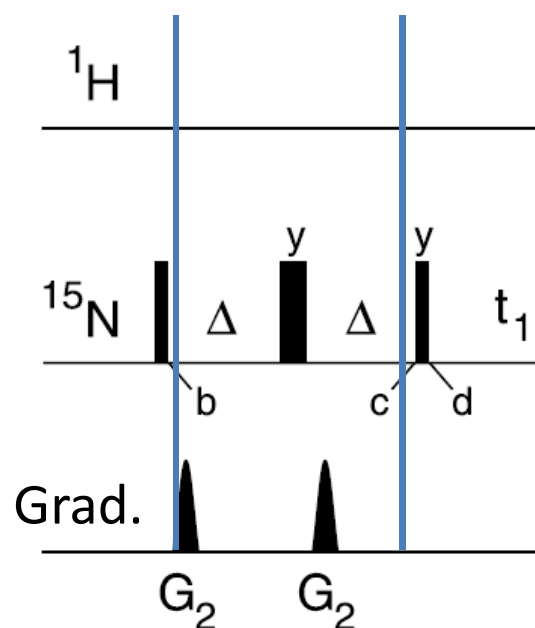
# Pulssequenz



# Mischung und Evolution: N-N-COSY



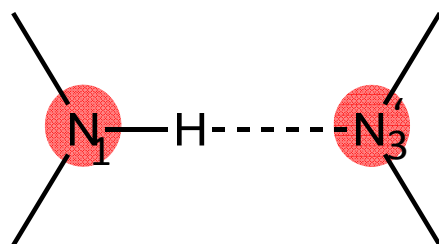
- Teile der Magnetisierung von kovalent gebundenem Stickstoff (N<sub>1</sub>) zu Akzeptor (N<sub>3</sub>)



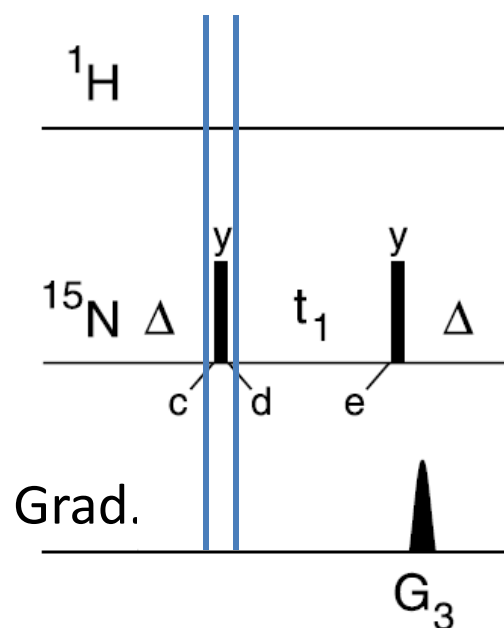
$$2H_z N_y \xrightarrow{2\pi J_{NN} N_z N'_z \Delta} \xrightarrow{180^\circ N_y, 180^\circ N'_y} \xrightarrow{2\pi J_{NN} N_z N'_z \Delta} 2H_z N_y \cos(2\pi J_{NN} \Delta) - 4H_z N_x N'_z \sin(2\pi J_{NN} \Delta)$$



# Mischung und Evolution: N-N-COSY



- COSY Mischungspuls rotiert den Antiphaseterm:

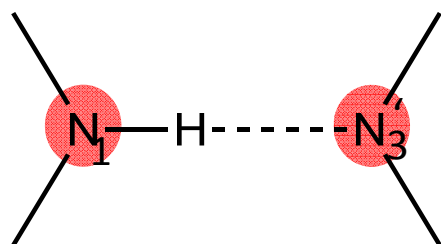


$$2H_z N_y \cos(2\pi J_{NN} \Delta) - 4H_z N_x N'_z \sin(2\pi J_{NN} \Delta)$$

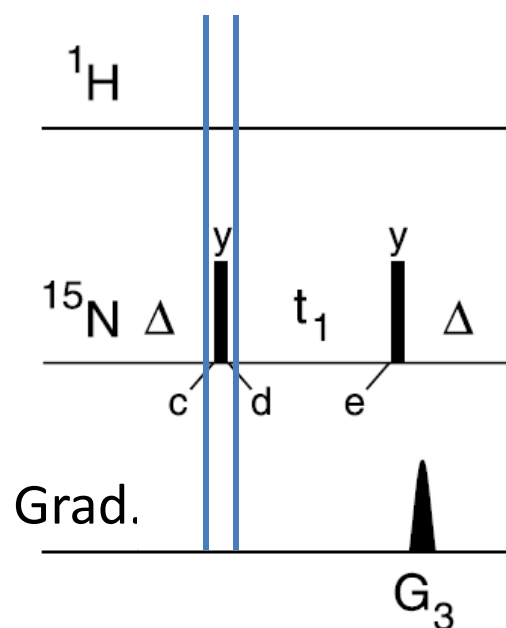
$$\xrightarrow{90^\circ N_y, 90^\circ N'_y}$$

$$2H_z N_y \cos(2\pi J_{NN} \Delta) + 4H_z N_x N'_z \sin(2\pi J_{NN} \Delta)$$

# Mischung und Evolution: N-N-COSY



- COSY Mischungspuls rotiert den Antiphaseterm:

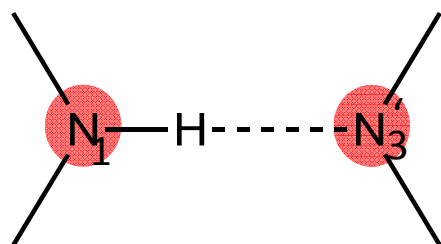


$$2H_z N_y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) - 4H_z N_x N'_z \sin(2\pi J_{NN}\Delta)$$

$\xrightarrow{90^\circ N_y, 90^\circ N'_y}$

$$2H_z N_y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) + 4H_z N_x N'_z \sin(2\pi J_{NN}\Delta)$$

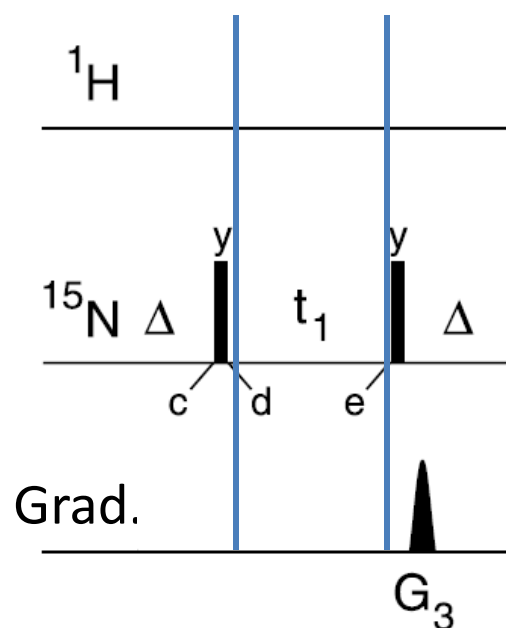
# Mischung und Evolution: N Evolution



- Beide Stickstoffatome entwickeln chemische Verschiebung:

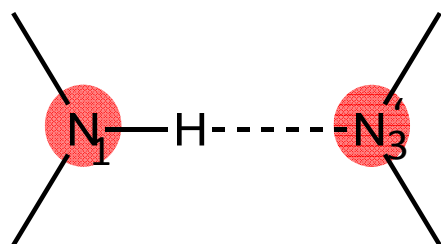
$$2H_Z N_Y \cos(2\pi J_{NN} \Delta) - 4H_Z N_X N'_Z \sin(2\pi J_{NN} \Delta)$$

$$\xrightarrow{\omega_N N_Z t_1, \omega_N N'_Z t_1}$$



$$\begin{aligned} & 2H_Z N_Y \cos(2\pi J_{NN} \Delta) \cos(\omega_N t_1) \\ & - 2H_Z N_X \cos(2\pi J_{NN} \Delta) \sin(\omega_N t_1) \\ & + 4H_Z N_Z N'_X \sin(2\pi J_{NN} \Delta) \sin(\omega_N t_1) \\ & + 4H_Z N_Z N'_Y \sin(2\pi J_{NN} \Delta) \sin(\omega_N t_1) \end{aligned}$$

# Mischung und Evolution: N Evolution



- Beide Stickstoffatome entwickeln chemische Verschiebung:

$$2H_Z N_Y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) - 4H_Z N_X N'_Z \sin(2\pi J_{NN}\Delta)$$

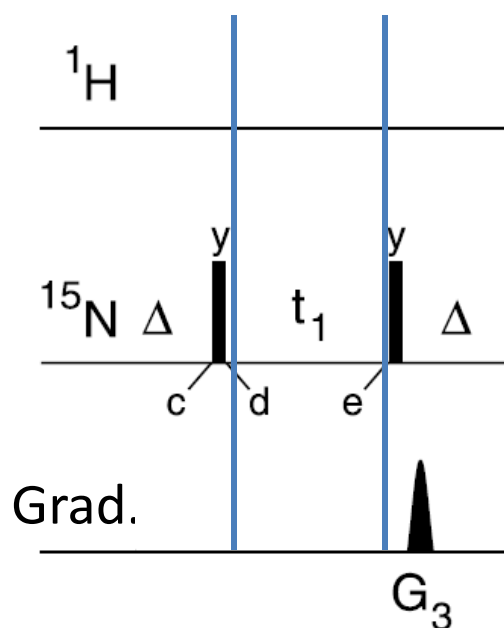
$$\xrightarrow{\omega_N N_Z t_1, \omega_N N'_Z t_1}$$

$$2H_Z N_Y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1)$$

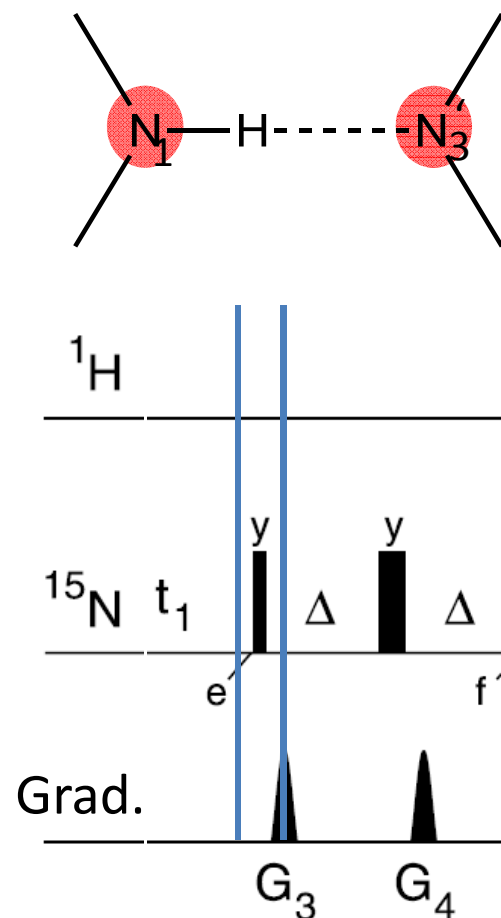
$$-2H_Z N_X \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

$$+ 4H_Z N_Z N'_X \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N, t_1)$$

$$+ 4H_Z N_Z N'_Y \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N, t_1)$$



# Mischung und Evolution: N-N-COSY

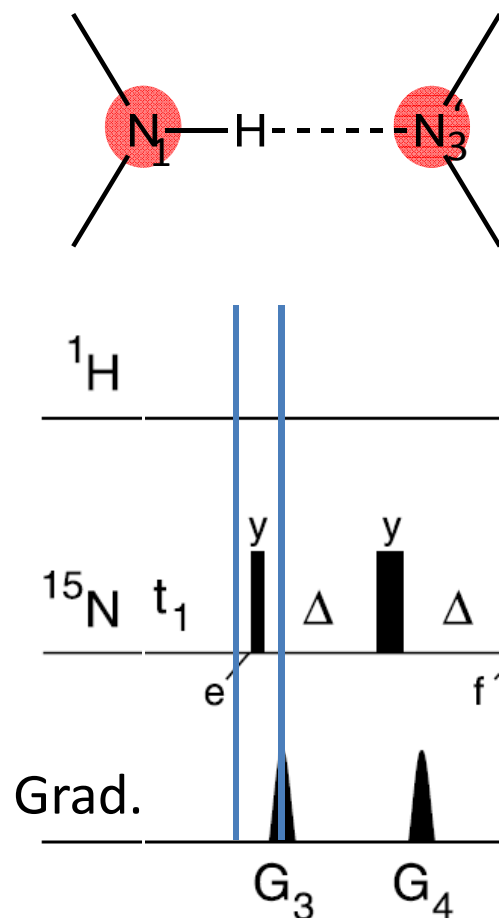


- COSY Mischungspuls rotiert den Antiphaseterm:

$$2H_z N_y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1) \\ -4H_z N_z N'_x \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1) \\ \xrightarrow{90^\circ N_y, 90^\circ N'_y}$$

$$2H_z N_y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1) \\ -4H_z N_x N'_z \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

# Mischung und Evolution: N-N-COSY



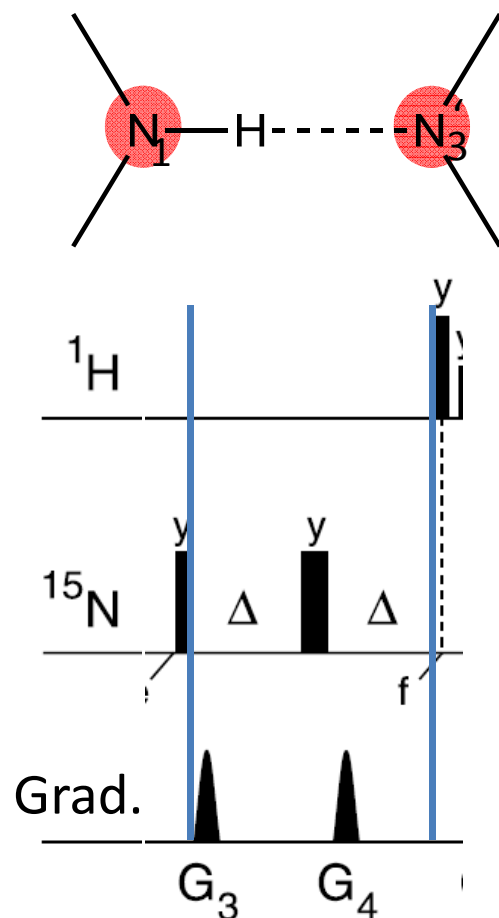
- COSY Mischungspuls rotiert den Antiphaseterm:

$$2H_z N_y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1) - 4H_z N_z N'_x \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

$\xrightarrow{90^\circ N_y, 90^\circ N'_y}$

$$2H_z N_y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1) - 4H_z N_x N'_z \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

# Mischung und Evolution: N-N-COSY



- COSY Refokussierungsperiode:

$$2H_Z N_Y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1)$$

$$-4H_Z N_X N'_Z \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

$$\xrightarrow{2\pi J_{NN} N_Z N'_Z \Delta} \xrightarrow{180^\circ N_Y, 180^\circ N'_Y} \xrightarrow{2\pi J_{NN} N_Z N'_Z \Delta}$$

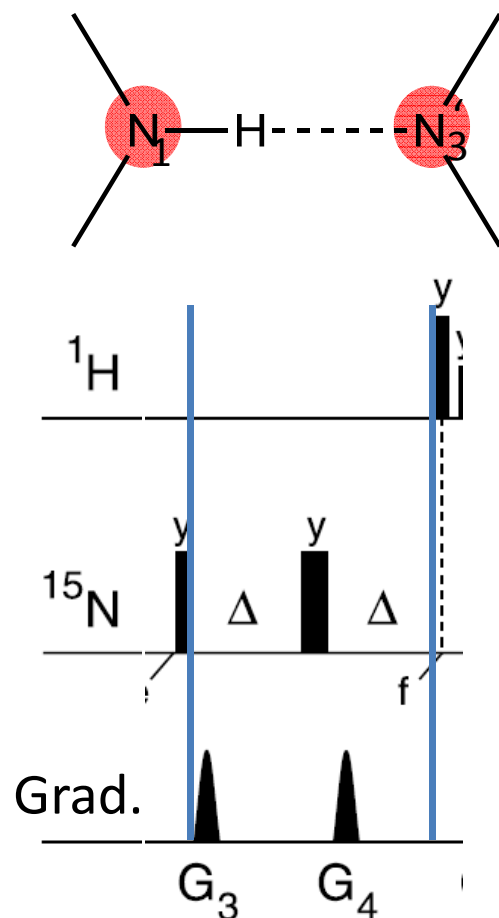
$$2H_Z N_Y \cos^2(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1)$$

$$-4H_Z N_X N'_Z \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

$$-4H_Z N_X N'_Z \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

$$-2H_Z N_Y \sin^2(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1)$$

# Mischung und Evolution: N-N-COSY



- COSY Refokussierungsperiode:

$$2H_Z N_Y \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1)$$

$$-4H_Z N_X N'_Z \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

$$\xrightarrow{2\pi J_{NN}N_Z N'_Z \Delta} \xrightarrow{180^\circ N_Y, 180^\circ N'_Y} \xrightarrow{2\pi J_{NN}N_Z N'_Z \Delta}$$

$$2H_Z N_Y \cos^2(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1)$$

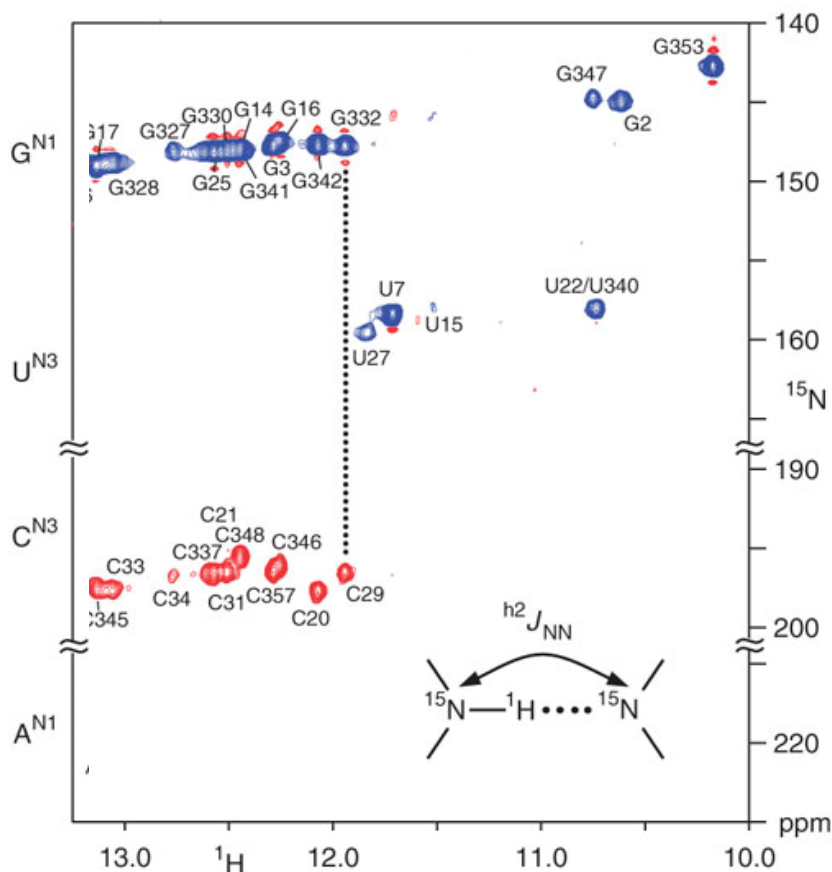
$$-4H_Z N_X N'_Z \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

$$-4H_Z N_X N'_Z \cos(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(2\pi J_{NN}\Delta) \sin(\omega_N t_1)$$

$$-2H_Z N_Y \sin^2(2\pi J_{NN}\Delta) \cos(\omega_N t_1)$$



# HNN COSY Spektrum



- HNN COSY Spektrum (totale Experimentzeit 13 h)
- Diagonalpeaks in blau (Bsp. G332)
- Kreuzpeaks in rot (Bsp. C29)

potato spindle tuber viroid (PSTVd) T1 RNA Domäne  
(Mutante U18C/A344G)

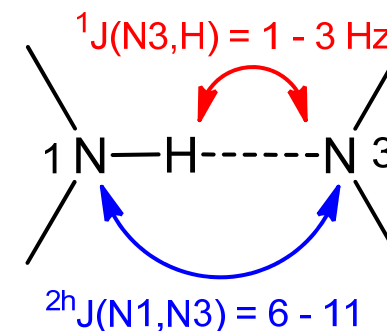
# ${}^{2h}J_{\text{NN}}$ Kopplungskonstanten

- Aus Intensitätsverhältnis von Diagonal- und Kreuzpeak:

$$\frac{I_c}{I_d} = -\sin^2(2\pi {}^{2h}J_{\text{NN}}\Delta) / \cos^2(2\pi {}^{2h}J_{\text{NN}}\Delta)$$

$$|{}^{2h}J_{\text{NN}}| = \arctan\left(\frac{(-I_c/I_d)^{1/2}}{2\pi\Delta}\right)$$

- Nur Absolutwert bestimmbar
- Bei PSTVd T1 Domäne:
  - Bei A-U und G-C Basenpaaren näherungsweise 7 Hz



Graph entnommen aus: Andrew J. Dingley and Stephan Grzesiek, *Journal of the American Chemical Society*

1998, 120, 8293-97

- HNN COSY liefert:
    - Chemische Verschiebungen von  $N_1$ ,  $N_3$ , und H
    - $^2J_{NN}$  Kopplungskonstanten aus den Intensitätsverhältnissen der Kreuz- und Diagonalpeaks
  - Langreichweitiges, eher sensibles Experiment: Zuordnung von sequenziell separierten Nukleotiden
  - Diverse Modifikationen in der Literatur bekannt (Anwendung für Nicht-Watson-Crick-Basenpaare und Proteine, Pulssequenz von Kohlenstoff starten)
-