

Tabelle 2. Thermodynamische Daten der Duplexierung aus UV-Schmelzkurven (aus Kurvenanpassung und Auftragung von  $T_m^{-1}$  gegen  $\ln c$  [14]) in 10 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, 1 M NaCl; geschätzte Fehler  $\leq \pm 5\%$ .

	Kurvenanpassung [a]		$T_m^{-1}$ gegen $\ln c$	
	$\Delta H$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S$ [cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta H$ [kcal mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S$ [cal K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
1 · d(A <sub>10</sub> )	-55.7	-160	-56.1	-161
2 · d(T <sub>10</sub> )	-64.9	-177	-53.3	-141
1 · 2	-63.2	-169	-61.1	-164
d(A <sub>10</sub> ) · d(T <sub>10</sub> )	-66.3	-191	-61.8	-176

[a] Mittel aus sechs Messungen bei sechs verschiedenen Konzentrationen im Bereich von  $c_T = 1-30 \mu\text{M}$ .

Hinweis darauf sein, daß das „Alles-oder-Nichts“-Paarungsmodell, auf welchem die Ermittlung der thermodynamischen Daten beruht, in diesem Fall nicht zutrifft. Die Verringerung des Enthalpieterms in den Hybridduplexen kann durch teilweise nicht komplementäre Paarungsgeometrie oder durch Spannung innerhalb des Bicyclo-DNA-Stranges erklärt werden. Die Reduktion des Entropieterms dürfte dem weniger flexiblen Zuckerphosphatrückgrat des DNA-Analogs zuzuschreiben sein, wobei jedoch Beiträge anderer Art, insbesondere Unterschiede in Duplex- oder Einzelstrangsolvation, ebenfalls eine wichtige Rolle spielen können.

Zur Überprüfung des Resistenzverhaltens von Oligo(bicyclonucleotiden) gegenüber Phosphodiesterasen wurde das Decamer **1** mit Phosphodiesterase aus Schlangengift (SVP), Nuclease S1 und Phosphodiesterase aus Kalbsmilz (CSP) behandelt und seine Stabilität im Vergleich zu denjenigen von natürlichem d(T<sub>10</sub>) bestimmt<sup>[16]</sup>. Während **1** gegenüber SVP (3'-Exonuclease) eine dreifach höhere Stabilität aufweist, wurde gegenüber CSP (5'-Exonuclease) ein Stabilitätsfaktor von  $1.4 \times 10^3$  und gegenüber Nuclease S1 (Endo- und Exonuclease) einer von 100 ermittelt.

Das Konzept der Verringerung der Paarungsentropie in bimolekularen Duplexierungen durch Reduktion der konformativen Flexibilität des Zuckerphosphatrückgrats, welches sich aus den Beobachtungen von Eschenmoser et al.<sup>[17]</sup> über die Paarungseigenschaften von Oligo-2'-3'-didesoxy- $\beta$ -D-glucopyranonucleotiden (Homo-DNA) ableiten läßt, kann auch auf Oligonucleotidstrukturen übertragen werden, die gezielt auf die Komplexierung komplementärer natürlicher DNA ausgerichtet sind und somit neue Wege in der „Antisense“-Forschung eröffnen.

Eingegangen am 12. März,  
ergänzte Fassung am 1. Juli 1993 [Z 5915]

- [1] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 280-284; M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *ibid.* **1978**, *75*, 285-288.
- [2] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [3] G. Felsenfeld, D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2023-2024; H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645-650; J.-C. Françoise, T. Saison-Behmoaras, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11431-11440; N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697-723; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666-690; M. Cooney, G. Czernuszewicz, E. H. Postel, S. J. Flint, M. E. Hogan, *Science* **1988**, *241*, 456-459; P. A. Beal, P. B. Dervan, *ibid.* **1991**, *251*, 1360-1363.
- [4] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543-584; J. Goodchild, *Bioconjugate Chem.* **1990**, *1*, 165-187; J. Engels, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, *39*, 1250-1254. U. Englich, D. Gauss, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 629-646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 613-629.
- [5] M. Tarköy, M. Bolli, B. Schweizer, C. Leumann, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 481-510.
- [6] M. H. Caruthers, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 278-284.
- [7] Kristallines DMTr- $^3\text{CF}_3\text{SO}_3^-$  (82%) wurde durch Reaktion des entsprechenden Chlorids mit  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Ag}$  in THF erhalten; befriedigende C,H,F,S-Analyse für  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{F}_3\text{S}$ .
- [8] M. J. Gait, *Oligonucleotide Synthesis - a Practical Approach*, IRL Press, Oxford, **1984**.
- [9] Die Oligonucleotidsynthese erfolgte an einem Pharmacia Gene Assembler Plus® in Ansätzen von 0.6-1.3  $\mu\text{mol}$ . Gegenüber der Synthese natürlicher

Oligonucleotide wurden im Syntheseprotokoll als einzige Parameter die Detritylierungszeit (60 s) und die Kupplungszeit (6 min) geändert. Alle Synthesen wurden mit der Entfernung der 5'-terminalen Tritylschutzgruppe beendet (trityl off mode).

- [10] Rohes **1** und **2** wurden durch Anionenaustausch-Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt (Säule: Nucleogen 60 DEAE von Macherey-Nagel; Elution mit einem linearen Gradienten von KCl in 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 6.0,  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$  4:1). Die Einheitlichkeit der so erhaltenen Produktfraktionen wurde durch Umkehrphasen-HPLC überprüft (Säule: Aquapore Rp 300 von Brownlee; Elution mit einem linearen Gradienten von  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 0.1 M wässriger  $\text{Et}_3\text{NHOAc}$ , pH 7.0). Zur Massenanalyse von **1** und **2** ( $\text{NH}_4^+$ -Form) diente ein Laser-Desorptions-Flugzeit-Massenspektrum von Matrix-gebettem **1** bzw. **2** ( $m/z$  3240.8 (**1**), 3330.8 (**2**)).
- [11] Während **2** · poly(U) bei einem Basenverhältnis von 1:1 unter den Pufferbedingungen bei der Aufnahme der UV-Schmelzkurven als Duplex vorliegt, disproportioniert  $d(\text{A}_{10}) \cdot \text{poly}(\text{U})$  zum (U-dA-U)-Triplex und zu ungepaartem  $d(\text{A})_{10}$ . Dieser Befund ist im Einklang mit früheren Beobachtungen über die Komplexierung von poly(dA) mit poly(U) (M. Riley, B. Maling, M. J. Chamberlin, *J. Mol. Biol.* **1966**, *20*, 359-389).
- [12] P. Job, *Anal. Chim. Acta* **1928**, *9*, 113-134.
- [13] D. S. Pilch, C. Levenson, R. H. Shafer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1942-1946.
- [14] L. A. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, *26*, 1601-1620.
- [15] Thermodynamische Daten zur Duplexierung von **2** und  $d(\text{T}_{10})$  sowie von  $d(\text{A}_{10})$  und  $d(\text{T}_{10})$  wurden auch durch Differentialkalorimetrie (DSC) an einem Microcal MC-2D-Instrument (1 M NaCl) ermittelt. Auch hier tritt eine (betragsmäßige) Reduktion des Entropieterms um 23% im Falle des ersten relativ zum zweiten Duplex auf.
- [16] Die relativen Hydrolysegeschwindigkeiten von **1** und  $d(\text{T}_{10})$  wurden durch partielle Verdauung mit dem entsprechenden Enzym abgeschätzt. Das Verhältnis von nicht umgesetztem Oligomer zur Summe aller Spaltprodukte wurde durch Umkehrphasen-HPLC (Quantifizierung durch Peakintegration) ermittelt. Stabilitätsfaktoren wurden als Quotienten der beschriebenen Edukt/Produkt-Verhältnisse für **1** und für  $d(\text{T}_{10})$  errechnet.
- [17] A. Eschenmoser, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1991**, *39*, 795-806; *Nova Acta Leopold.* **1992**, *67*, 201-233; A. Eschenmoser, E. Loewenthal, *Chem. Soc. Rev.* **1992**, *21*, 1-16; A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, *75*, 218-259; M. Böhringer, H.-J. Roth, J. Hunziker, M. Göbel, R. Krishnan, A. Giger, B. Schweizer, J. Schreiber, C. Leumann, A. Eschenmoser, *ibid.* **1992**, *75*, 1416-1477; J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *ibid.* **1993**, *76*, 259-352.

## Kohärenzselektion durch Gradienten ohne Empfindlichkeitsverlust; Anwendung auf 3D-HNCO-Experimente\*\*

Von Jürgen Schleucher, Michael Sattler und Christian Griesinger\*

Gepulste Feldgradienten, d.h. definierte, kurzzeitige Inhomogenitäten des statischen Magnetfeldes  $B_0$ , werden seit einiger Zeit in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie eingesetzt<sup>[1]</sup>. In mehrdimensionalen NMR-Experimenten führen sie im allgemeinen zu einer Reduktion von Artefakten und können Phasencyclen ersetzen. Somit können Spektren immer dann schneller aufgenommen werden, wenn nicht das Signal/Rausch-Verhältnis, sondern die Auflösung und/oder die Unterdrückung unerwünschter Kohärenztransferwege die Dauer des Experiments bestimmen. In heteronuclearen Experimenten kann man durch Anwendung

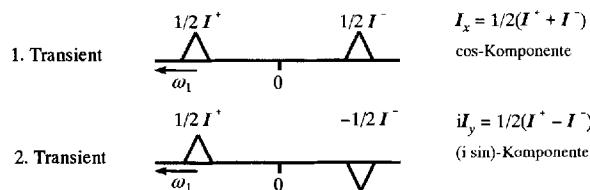
[\*] Prof. Dr. C. Griesinger, Dipl.-Chem. J. Schleucher, Dipl.-Chem. M. Sattler Institut für Organische Chemie der Universität Marie-Curie-Straße 11, D-60439 Frankfurt Telefax: Int. + 69/5800-9128

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie, vom Graduiertenkolleg Gk Eg 52/3-3, vom Land Hessen und vom Bundesministerium für Bildung und Wissenschaft gefördert. Die Autoren danken Prof. Dr. E. Carafoli, Dr. J. Krebs (ETH Zürich), Dr. T. Vorherr (Hofmann-La Roche, Basel) und P. Schulte (Frankfurt) für die Überlassung des Calmodulin/C20W-Komplexes sowie Dr. R. Kerssebaum und Dr. W. Bermel, BRUKER Analytische Meßtechnik, für die Unterstützung in der Anfangsphase des Projekts.

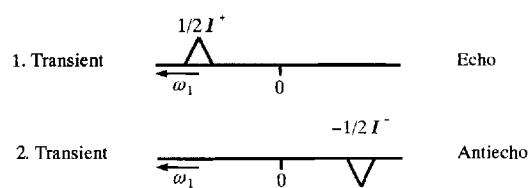
eines  $B_0$ -Gradienten während der Evolutionszeit der Magnetisierung des Heterokerns und zum Beginn der Detektionszeit ein heteronucleares Gradientenecho<sup>[2]</sup> erzeugen<sup>[3]</sup>. Dabei werden die Signale von Protonen, die nicht an den NMR-aktiven Heterokern gebunden sind, insbesondere von Lösungsmittelprotonen, so effizient unterdrückt, daß man in Proben mit natürlicher  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit bei Konzentrationen im mm-Bereich Protonensignale unter dem Wassersignal beobachten kann.

Die gute Unterdrückung des Wassersignals durch heteronucleare Gradientenechos ist bei Standardpulssequenzen mit einer Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses verbunden, wie im folgenden erläutert wird. In amplitudenmodulierenden NMR-Experimenten, also bei allen mehrdimensionalen Standardpulssequenzen, tragen zwei Kohärenztransferwege jeweils mit relativer Intensität  $\frac{1}{2}$  zum Signal bei<sup>[4]</sup>, von denen einer als Echotransferweg ( $p(t_1) = 1 \rightarrow p(t_2) = -1$ ), der andere als Antiechotransferweg ( $p(t_1) = -1 \rightarrow p(t_2) = -1$ ) bezeichnet wird ( $p$ : Kohärenzordnung) (Abb. 1a). In den beiden Transienten, die aufgenommen werden, um (z.B. nach States, Haberkorn und Ruben<sup>[5]</sup>) reine Phasen zu erhalten, wird also die Signalintensität  $4 \times \frac{1}{2} = 2$  akkumuliert. Zugleich steigt das Rauschen durch Addition der zwei Transienten und Faltung bei  $\omega_1 = 0$  auf das  $\sqrt{4}$ fache. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist also  $2/2 = 1$ .

a) Die States-Haberkorn-Ruben-Methode liefert in amplitudenmodulierenden Experimenten reine Phasen und eine Unterscheidung der Frequenzen nach ihren Vorzeichen.



b) Echo- und Antiechoselektion durch Gradienten ergibt in amplitudenmodulierenden Experimenten reine Phasen mit reduzierter Empfindlichkeit.



c) Echo- und Antiechoselektion durch Gradienten ergibt in phasenmodulierenden Experimenten reine Phasen mit erhöhter Empfindlichkeit.

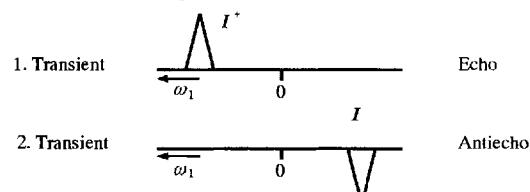


Abb. 1. Schematische Darstellung der in verschiedenen NMR-Experimenten in der Evolutionszeit erhaltenen Signale: a) Signale bei Quadraturdetektion nach States, Haberkorn und Ruben in einer amplitudenmodulierenden Pulssequenz; b) Signale, die bei der Anwendung von Gradienten in einer Evolutionszeit und vor der Detektionszeit einer amplitudenmodulierenden Sequenz selektiert werden; c) Signale, die mit einer phasenmodulierenden Pulssequenz erhalten werden.

Feldgradienten selektieren im Verlauf einer Pulssequenz Kohärenzordnungen  $p$  gemäß der Bedingung  $\sum_i p_i \gamma_i G_i = 0$

( $i$  ist der Laufindex der in einer Pulssequenz vorkommenden Gradienten,  $\gamma_i$  und  $p_i$  sind das gyromagnetische Verhältnis bzw. die Kohärenzordnung des oder der Kerne, auf die dieser  $i$ -te Gradient wirkt, und  $G_i$  ist seine Stärke). Wendet man in amplitudenmodulierenden NMR-Sequenzen einen Gradienten in einer Evolutionszeit an, dessen dephasierende Wirkung durch einen Gradienten in der Detektionszeit kompensiert wird, so führt nur ein Transferweg zu einem Gradientenecho, und zwar je nach dem relativen Vorzeichen der Gradienten der Echo- oder der Antiechotransferweg (Abb. 1b). Man erhält also bei dieser Art der Anwendung von Gradienten zur Kohärenzselektion in amplitudenmodulierenden NMR-Sequenzen ein phasenmoduliertes Signal. Die akkumulierte Signalintensität ist  $2 \times \frac{1}{2} = 1$ , das Rauschen steigt durch Addition der Transienten auf  $\sqrt{2}$ ; es ergibt sich ein Signal/Rausch-Verhältnis von  $1/\sqrt{2}$ , also ein Verlust von  $\sqrt{2}$  im Vergleich zur amplitudenmodulierenden Sequenz ohne Gradienten. Die Anwendung von Gradienten in festen Zeiten, in denen zwei Kohärenzordnungen mit gleichem Betrag und unterschiedlichem Vorzeichen vorliegen (z.B. in der Mischzeit einer Relayed-COSY- oder einer DQF-COSY-Sequenz), führt sogar zu einer Verschlechterung des Signal/Rausch-Verhältnisses um den Faktor zwei gegenüber der Sequenz ohne Gradienten, da in solchen Experimenten die in Abbildung 1a skizzierten Signale selektiert werden, allerdings mit abermals halbierter Intensität.

Dieser wesentliche Nachteil der amplitudenmodulierenden NMR-Experimente, in denen in einer Evolutionszeit und in der Detektionszeit Gradienten angewendet werden, wird in phasenmodulierenden Experimenten überwunden, in denen nur eine Kohärenzordnung zum Signal beiträgt. Diese Kohärenz kann ohne Verlust an Signalintensität – d.h. mit Intensität 1 – durch die Anwendung von Gradienten während der Evolutionszeit selektiert werden (Abb. 1c). In einem solchen Experiment wird in zwei Transienten Signal der Intensität  $2 \times 1 = 2$  akkumuliert, unter Berücksichtigung des Rauschens von  $\sqrt{2}$  ergibt sich das optimale Signal/Rausch-Verhältnis von  $1/\sqrt{2}$ . Während fast alle konventionellen Korrelationsexperimente amplitudenmodulierte Zeitsignale liefern, kann der genannte Vorteil phasenmodulierender Sequenzen in den 1991 eingeführten „Sensitivity-enhanced“-HSQC-Experimenten<sup>[6]</sup> genutzt werden. Bei diesen Experimenten erhält man in heteronuclearen Korrelationen für X-H-Spinsysteme (X: Heterokern) schon ohne Anwendung von Gradienten ein phasenmoduliertes, zweidimensionales Zeitsignal. Aus einem solchen Datensatz mit einem Echo- und einem Antiechosignal läßt sich ein amplitudenmoduliertes Signal im States-Haberkorn-Ruben-Format rekonstruieren und damit das Spektrum mit reinen Phasen berechnen<sup>[6]</sup>. Weitere Maßnahmen zur Vorzeichenunterscheidung in  $\omega_1$  wie TPPI<sup>[7]</sup> oder nach States, Haberkorn und Ruben<sup>[5]</sup> sind nicht notwendig.

Eine erstes Beispiel für ein HSQC-Experiment mit Gradienten ohne Signalintensitätsverlust ist kürzlich publiziert worden<sup>[8]</sup>. Wir demonstrieren die Anwendung dieses Prinzips auf heteronucleare mehrdimensionale Experimente am Beispiel eines HNCO-Experiments<sup>[9]</sup>, eines zur sequentiellen Zuordnung der Signale der Kerne im Rückgrat vollständig markierter Proteine verwendeten dreidimensionalen NMR-Experiments. In diesem Experiment wird über  $^1\text{J}$ -Kopplungen Kohärenz von den Amidprotonen auf die direkt gebundenen Amidstickstoffatome und von dort auf die Carbonylkohlenstoffatome der vorhergehenden Aminosäure übertragen. Nach Evolution der chemischen Verschiebung der Carbonylkohlenstoffatome ( $t_1$ ) erfolgt Rücktransfer auf die Amidstickstoffatome („Constant-Time“-Evolutionszeit  $t_2$ ) und zurück auf die detektierten Amidprotonen. Die Pulssequenzen des konventionellen CT-HNCO-(Constant-time-HNCO-),

des Gradienten-CT-HNCO- und des Sensitivity-enhanced-Gradienten-CT-HNCO-Experiments sind in Abbildung 2 angegeben. In den beiden letztgenannten Experimenten wird Kohärenzselektion durch Gradienten während der  $^{15}\text{N}$ -Evolutionszeit  $t_2$  und vor  $t_3$  erreicht.

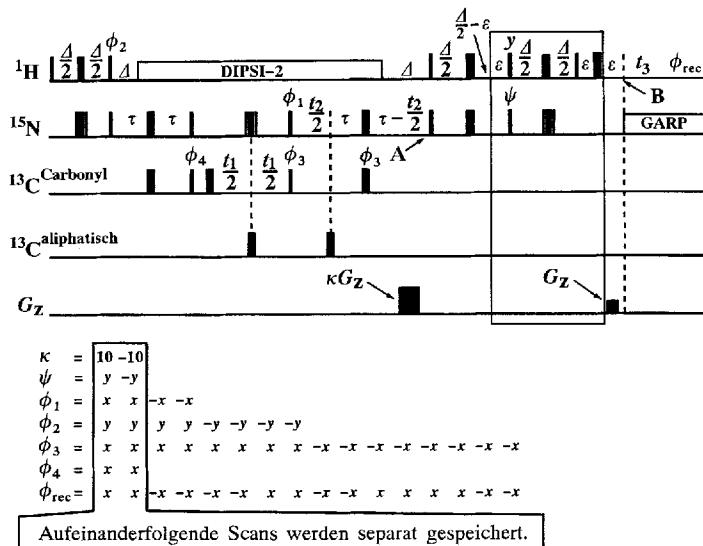


Abb. 2. Pulssequenz des Sensitivity-enhanced-Gradienten-CT-HNCO-Experiments. 90°-Pulse sind durch schmale, 180°-Pulse durch breite Striche angegeben. Die Pulse haben Phase  $x$ , falls nichts anderes angegeben ist. Simultane Akquisition komplexer Datenpunkte während  $t_3$  wird verwendet. Die Evolution der Stickstoffverschiebung muß direkt vor dem  $\text{N} \rightarrow \text{H}$ -Transfer erfolgen, um die Anwendung von Sensitivity Enhancement zu ermöglichen. Die Amplitude des Gradienten für die Stickstoffkerne und die Phase  $\psi$  werden von Scan zu Scan invertiert, die jeweiligen FIDs werden getrennt gespeichert. Aus den so erhaltenen Echo- und Antiechosignalen wird durch folgende Prozessierung ein amplitudenmodulierter Signalsatz erzeugt: Für jeden  $t_1, t_2$ -Wert werden Echo- und Antiecho-FID addiert (FID1) sowie voneinander subtrahiert und um 90° phasengeschoben (FID2). FID1 und FID2 sind dann im States-Haberkorn-Ruben-Format und können normal Fourier-transformiert werden. Der Zustand des Spinsystems an den Stellen A und B ist im Text beschrieben. Die Experimente wurden an einem mit einem Gradienten-Tripelresonanzkopf ausgestatteten Bruker-AMX600-Spektrometer durchgeführt.  $^{13}\text{C}$ -Pulse wurden mit einem BSV-10-Versärker mit nachgeschaltetem Linearverstärker BLKX-300W erzeugt.  $^{13}\text{CO}$ -Pulse wurden als selektive G4- (Pulsdauer 400  $\mu\text{s}$ ) oder G3-Pulse (Pulsdauer 250  $\mu\text{s}$ ) [11] bei 176 ppm angewendet, selektive Inversion der Signale aliphatischer Kohlenstoffatome wurde mit einem phasenmodulierten G3-Puls (Pulsdauer 250  $\mu\text{s}$ , Modulationsfrequenz 20 000 Hz) erreicht. Bloch-Siegert-Effekte 0. und 1. Ordnung während  $t_1$  und Evolution von  $^{13}\text{CO}$ -chemischer Verschiebung für  $t_1 = 0$  wurden durch eine Korrektur von  $\phi_1$  und Einfügen eines Delays vor dem  $^{13}\text{CO}$ -180°-Puls vor  $t_1$  kompensiert. Die Delays sind:  $\varepsilon = 2.2 \text{ ms}$ ,  $\Delta = 5.0 \text{ ms}$ ,  $\tau = 14.7 \text{ ms}$ . Es wurden  $40(t_1) \times 36(t_2) \times 768(t_3)$  komplexe Punkte mit acht Scans aufgenommen; die Akquisitionszeiten betrugen 9.75 ( $t_1$ ), 9.5 ( $t_2$ ) und 192 ms ( $t_3$ ); die gesamte Meßdauer war 20 h. Weglassen der Pulse und Delays im eingezeichneten Kasten führt zu einer Gradienten-CT-HNCO-Pulssequenz; zusätzliches Weglassen der Gradienten und statt dessen Vorsättigung der Wasserresonanz führt zu einem konventionellen HNCO-Experiment [9c].  $G_z$  steht für einen gepulsten Feldgradienten entlang des statischen Magnetfelds  $B_0$  der Länge 2 ms.

Wir verwenden Produktoperatoren zur Beschreibung des Rücktransfers von  $^{15}\text{N}$  auf  $^1\text{H}$ . Operatoren, die auf Stickstoff wirken, werden mit  $N$ , solche, die auf Protonen wirken, mit  $H$  bezeichnet. Wir verwenden für die transversalen Operatoren die Einelementoperatorbasis,  $H^-, N^-, N^+$ , für die longitudinalen Operatoren die kartesische Basis  $H_z$ . Durch den doppelten INEPT-Rücktransfer wird heteronukleare Einquanten Kohärenz  $2N^-H_z$  oder  $2N^+H_z$  am Ende von  $t_2$  vollständig in detektierbare Protonenkohärenz vom Typ  $H^-$  verwandelt: Im ersten Transienten eines  $t_2$ -Inkrementen wird durch einen Gradientenpuls der relativen Stärke 10 (allgemein  $|\gamma_H/\gamma_X|$ ) während der Evolutionszeit der Stickstoffatome in Verbindung mit einem Gradientenpuls der Stärke 1 auf die Protonen vor Beginn der Detektionszeit der Echotransfer-

weg  $2N^-H_z$  (Position A in Abb. 2)  $\rightarrow H^-$  (Position B) selektiert. Das Antiechosignal  $2N^+H_z$  (A)  $\rightarrow H^-$  (B) wird im zweiten Transienten eines  $t_2$ -Inkrementen mit einem Gradienten der relativen Stärke -10 in der Evolutionszeit der Stickstoffatome in Verbindung mit einem Gradientenpuls der Stärke 1 auf die Protonen vor Beginn der Detektionszeit selektiert. Man beachte die vertauschte Definition von Echo und Antiecho aufgrund des negativen Quotienten  $\gamma_H/\gamma_N$ . Da in den Sensitivity-enhanced-Sequenzen die Selektion von  $2N^-H_z$  oder  $2N^+H_z$  durch Inversion der Phase  $\psi$  des letzten  $90^\circ(^{15}\text{N})$ -Pulses erreicht wird, müssen bei der Verwendung von Gradienten in Sensitivity-enhanced-Sequenzen diese Phasenänderung und der Vorzeichenwechsel der Gradienten synchron erfolgen. Die Transferamplituden ( $t_2, t_3$ ) der beiden getrennt gespeicherten FIDs für die konventionsgemäße Detektion von  $H^-$  sind in Schema 1 gegeben.

1. Transient (Echo):  $\exp(-i\Omega_N t_2) \exp(i\Omega_H t_3)$
2. Transient (Antiecho):  $\exp(i\Omega_N t_2) \exp(i\Omega_H t_3)$

Schema 1. Transferamplitudendefinition.

Durch Addition und Subtraktion der beiden phasenmodulierten Signale und anschließende Phasenkorrektur des durch Subtraktion erhaltenen FIDs um  $90^\circ$  erhält man zwei amplitudenmodulierte Signale (Schema 2). Komplexe Fourier-Transformation dieser Signale führt zu einem Spektrum mit reinen Phasen in  $\omega_2$  und  $\omega_3$ .

1. FID1 (Addition):  $\cos(\Omega_N t_2) \exp(i\Omega_H t_3)$
2. FID2 (Subtraktion und Phasenkorrektur um  $90^\circ$  in  $t_3$ ):  $\sin(\Omega_N t_2) \exp(i\Omega_H t_3)$

Schema 2. Von phasenmodulierten zu amplitudenmodulierten Signalen.

Abbildung 3 zeigt Spuren aus dem ersten  $\omega_2, \omega_3$ -Spektrum ( $t_1 = 0$ ) a) für ein konventionelles (amplitudenmodulierendes) CT-HNCO-Experiment mit Gradienten zur Kohärenzselektion in  $t_2$  (Abb. 2 ohne den eingeklammerten Teil der Pulssequenz), b) für ein konventionelles CT-HNCO-Experiment [9c] (vgl. Legende zu Abb. 2) und c) für ein phasenmodulierendes CT-HNCO-Experiment mit Gradienten zur Kohärenzselektion

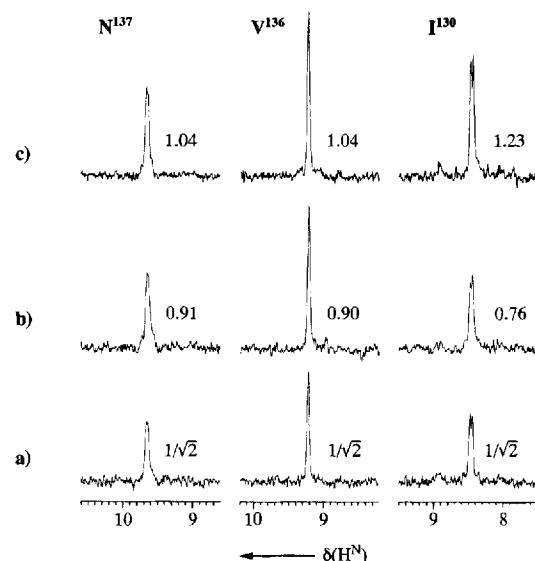


Abb. 3. Eindimensionale Schnitte aus den ersten  $\omega_2, \omega_3$ -Spektren ( $t_1 = 0$ ): a)–c) siehe Text. Die Zahlen geben das Signal/Rausch-Verhältnis bezogen auf Experiment a wieder. Die Meßzeit für alle Experimente war gleich.

tion in  $t_2$  (Abb. 2). Die Experimente an einem Komplex aus vollständig  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem Calmodulin und C20W, einer Calmodulinerkennungssequenz der Plasmamembran-Calciumpumpe<sup>[10]</sup>, wurden mit gleicher Meßzeit durchgeführt. Wir wählten als Bezugspunkt für das Signal/Rausch-Verhältnis Experiment a mit  $1/\sqrt{2}$  (entsprechend Abb. 1 b). Bei Mittelung über elf 1D-Spuren findet man für Experiment b (entsprechend Abb. 1 a) ein relatives Signal/Rausch-Verhältnis von 0.78 und für c (entsprechend Abb. 1 c) eines von 1.1. Der Verstärkungsfaktor für Experiment b gegenüber a von 1.10 ist gegenüber dem erwarteten Wert von  $\sqrt{2}$  zu klein. Daß der theoretische Faktor nicht erreicht wird, liegt daran, daß im Experiment b Signalintensität durch Sättigungstransfer auf die Amidprotonen während der Wasservorsättigung verloren geht, Experiment a dagegen ohne Wasservorsättigung auskommt. Auch Experiment c erreicht mit einem relativen Signal/Rausch-Verhältnis von 1.55 nicht den theoretischen Verstärkungsfaktor von 2 gegenüber Experiment a, weil die Sequenz c länger ist und somit Signalintensität durch Relaxation verlorengeht. Immerhin ist c mit Abstand das empfindlichste Experiment. Im Vergleich zum nächst empfindlicheren Experiment b ist für ein gleiches Signal/Rausch-Verhältnis eine Meßzeitreduktion um 50 % möglich.

Wir haben eine phasenmodulierende 3D-Triple-resonanz-NMR-Sequenz mit  $B_0$ -Gradienten ausgestattet und am Beispiel eines Sensitivity-enhanced-Gradienten-CT-HNCO-Experiments an einem Protein-Peptid-Komplex die Empfindlichkeit der Methode demonstriert. Der phasenmodulierende heteronukleare Rücktransfer kann in alle gängigen 3D-Sequenzen mit  $\text{H}^N$ -Detektion eingebaut werden und ermöglicht optimale Empfindlichkeit bei wirkungsvollstem Einsatz von Gradientenpulsen zur Unterdrückung von Artefakten.

Eingegangen am 6. April,  
ergänzte Fassung am 5. Juni 1993 [Z 5984]

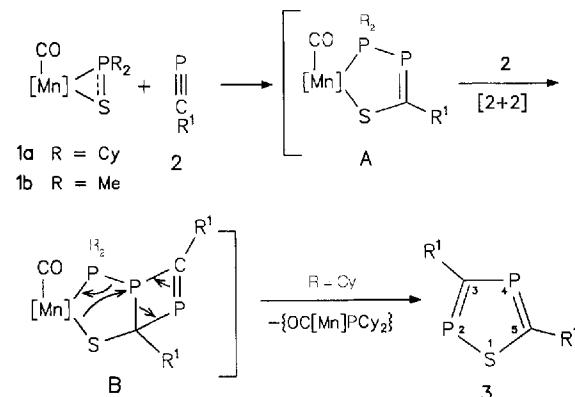
- [1] a) A. Bax, P. G. De Jong, A. F. Mehlkopf, J. Smidt, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 567–570; b) P. Barker, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1985**, *64*, 334–338; c) R. E. Hurd, *ibid.* **1990**, *87*, 422–428; d) A. L. Davis, E. D. Laue, J. Keeler, D. Moskau, J. Lohman, *ibid.* **1991**, *94*, 637–644; e) B. K. John, D. Plant, S. L. Heald, R. E. Hurd, *ibid.* **1991**, *94*, 664–669; f) G. W. Vuister, R. Boelens, R. Kaptein, M. Burgering, P. C. M. van Zijl, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 301–305.
- [2] A. A. Maudsley, A. Wokaun, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1978**, *55*, 9–14.
- [3] a) R. E. Hurd, B. K. John, *J. Magn. Reson.* **1990**, *91*, 648–653; b) G. W. Vuister, R. Boelens, R. Kaptein, R. E. Hurd, B. K. John, P. C. M. van Zijl, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9688–9690; c) A. L. Davis, J. Keeler, E. D. Laue, D. Moskau, *J. Magn. Reson.* **1992**, *98*, 207–216; d) J. R. Tolman, J. Chung, J. H. Prestegard, *ibid.* **1992**, *98*, 462–467; e) J. Boyd, N. Soffe, J. Boban, D. Plant, R. E. Hurd, *ibid.* **1992**, *98*, 660–664; f) J. Ruiz-Cabello, G. W. Vuister, C. T. W. Moonen, P. van Geldern, J. S. Cohen, P. C. M. van Zijl, *ibid.* **1992**, *100*, 282–302; g) A. L. Davis, R. Boelens, R. Kaptein, J. Biomol. NMR **1992**, *2*, 395–400.
- [4] G. Bodenhausen, H. Kogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1984**, *58*, 370–388.
- [5] D. J. States, R. A. Haberkorn, D. J. Ruben, *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 286–292.
- [6] a) J. Cavanagh, A. G. Palmer III, P. E. Wright, M. Rance, *J. Magn. Reson.* **1991**, *91*, 429–436; b) A. G. Palmer III, J. Cavanagh, P. E. Wright, M. Rance, *ibid.* **1991**, *93*, 151–170; c) O. W. Sørensen, *ibid.* **1992**, *100*, 431–436.
- [7] D. Marion, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *113*, 967–974.
- [8] L. E. Kay, P. Keifer, T. Saarinen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10663–10665.
- [9] a) M. Ikura, L. E. Kay, A. Bax, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4659–4667; b) L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 496–514; c) S. Grzesiek, A. Bax, *ibid.* **1992**, *96*, 432–440.
- [10] a) T. Vorherr, P. James, J. Krebs, A. Enyedi, D. J. McCormick, J. T. Penniston, E. Carafoli, *Biochemistry* **1990**, *29*, 355–365; b) M. Kataoka, J. F. Head, T. Vorherr, J. Krebs, E. Carafoli, *ibid.* **1990**, *30*, 6247–6251; c) M. Sattler, P. Schulte, R. Wechselberger, T. Vorherr, J. Krebs, E. Carafoli, C. Griesinger, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [11] L. Emsley, G. Bodenhausen, *Chem. Phys. Lett.* **1990**, *165*, 469–576.

## Sterisch kontrollierte, metallinduzierte Synthese eines 1-Thia-2,4-diphosphols\*\*

Von *Ekkehard Lindner\**, *Cornelius Haase*,  
*Hermann A. Mayer*, *Martin Kemmler*,  
*Riad Fawzi* und *Manfred Steimann*

*Professor Jochen Ellermann zum 60. Geburtstag gewidmet*

Cyclooligomerisierungen von Phosphaalkinen in der schützenden Koordinationsphäre von Übergangsmetallkomplexen sind gut untersucht<sup>[11]</sup>. Ein an  $[\text{Cp}_2\text{Zr}]$  gebundenes Diphosphabicyclobutan verwendeten Regitz et al. für die gezielte Synthese von cyclischen Phosphorverbindungen<sup>[2]</sup> und von Tetraphosphacuban<sup>[3]</sup>. Die thermische Cyclotetramerisierung von  $i\text{BuC}\equiv\text{P}$  verläuft dagegen wenig selektiv und liefert das Cuban nur in geringer Ausbeute<sup>[4]</sup>. Bei einer  $\text{AlCl}_3$ -unterstützten Spirocyclotrimerisierung von  $i\text{BuC}\equiv\text{P}$  isolierte die gleiche Arbeitsgruppe Derivate des Triphospha-Dewar-Benzols<sup>[5]</sup>. Die metallinduzierte, regioselktive Cyclocotrimerisierung der alkinähnlichen Anionen  $\text{R}_2\text{P}=\text{S}^-$  mit elektronenarmen Acetylenen führt zu sonst schwer zugänglichen Thiophenen, Phospholkomplexen und Furanen<sup>[6]</sup>. Uns ist es nun gelungen, durch Umsetzung des ( $\eta^2$ -Thiophosphinito)mangan-Komplexes **1a** mit *tert*-Butylphosphaacetylen **2** gezielt und direkt das 1-Thia-2,4-diphosphol **3** in hohen Ausbeuten herzustellen (Schema 1).



Schema 1.  $[\text{Mn}] = \text{Mn}(\text{CO})_3$ ,  $\text{R}^1 = i\text{Bu}$ .

Vor kurzem berichteten wir, daß bei der Einwirkung von **2** auf die sterisch stark belasteten Nickelkomplexe  $[(\eta^5\text{-C}_5\text{H}_5)\text{-Ni}(\eta^2\text{-R}_2\text{P}\cdots\text{S})]$  ( $\text{R} = m\text{-Xylol, Mesityl}$ ) vom Typ **1**, die  $\text{P}\cdots\text{S}$ -Bindung unter Bildung der zu **A** analogen, stabilen, röntgenographisch charakterisierten Nickelverbindungen gespalten wird<sup>[7]</sup>. Das Thiadiphosphol **3** entsteht dabei nur in Spuren. Reduziert man den sterischen Anspruch des Organometallrests in **1** durch Verwendung einer  $\text{Mn}(\text{CO})_4$ -Einheit in Verbindung mit Cyclohexylresten am Phosphor ( $\rightarrow \text{Aa}$ ), so ist anzunehmen, daß sich eine  $[2 + 2]$ -Cycloaddition zu **Ba** anschließt. Dieses zerfällt sich unter Abspaltung des thermodynamisch stabilen, als farblose Flüssigkeit anfallenden Heterocycles **3**<sup>[8]</sup> (Ta-

[\*] Prof. Dr. E. Lindner, Dipl.-Chem. C. Haase, Dr. H. A. Mayer, Dipl.-Chem. M. Kemmler, Dr. R. Fawzi, M. Steimann  
Institut für Anorganische Chemie der Universität  
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen  
Telefax: Int. + 7071/29-5246

[\*\*] Darstellung und Eigenschaften von und Reaktionen mit metallhaltigen Heterocyclen, 84. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Volkswagen-Stiftung und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Der BASF AG und der Schering AG danken wir für die Überlassung von Ausgangsmaterialien, Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Hahn, Universität Köln, für die Aufnahme von selektiv  $^{31}\text{P}$ -entkoppelten  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren. – 83. Mitteilung: [6d]