

beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

- [10] A. Bondi, *J. Phys. Chem.* **1964**, 68, 441–451.
- [11] Die Ga-C- und Ga-N-Abstände von  $[3 \cdot 2\text{Py}]$  weichen nur unwesentlich von entsprechenden Abständen in anderen und am Galliumzentrum sterisch nicht gespannten Verbindungen des Typs  $[\text{R}_3\text{Ga} \cdot \text{N-Donor}]$  ab. Die C-Ga-C-Winkelsumme ist in derartigen Verbindungen jedoch um ca.  $6-8^\circ$  kleiner. Siehe z. B.: a) H.-S. Sun, X.-M. Wang, X.-Z. You, *Polyhedron* **1995**, 14, 2159–2163; b) A. M. Bradford, D. C. Bradley, M. B. Hursthouse, M. Motevalli, *Organometallics* **1992**, 11, 111–115; c) H. Krause, K. Sille, H.-D. Hausen, J. Weidlein, *J. Organomet. Chem.* **1982**, 235, 253–264.
- [12] Ein Indiz dafür, dass die Pyramidalisierung an den Galliumzentren Ursache für die Verdrillung und die übrigen Verzerrungen des  $\text{fc}_3\text{Ga}_2$ -Fragments ist, ist die Tatsache, dass der Komplex  $[3 \cdot 2\text{Et}_2\text{O}]$ , den wir aus **2** und  $\text{Et}_2\text{O}$  herstellen konnten, an den Galliumzentren weniger pyramidalisiert (C-Ga-C-Winkelsumme:  $357^\circ$ ) und weniger stark verdrillt ist ( $\alpha_T = 4.7^\circ$  (Mittelwert)). Darüber hinaus ist der Ga-Ga-Abstand kürzer (3.73 Å), sodass man annehmen kann, dass in der donorfreien Verbindung **3** ein noch kleinerer Ga-Ga-Abstand vorliegt. Aufgrund eines schlechten *R*-Wertes der Strukturanalyse sind die angegebenen Werte unter Vorbehalt zu sehen. Ob sich die  $\text{Ga}(\text{C}_5\text{H}_4)_3$ -Einheiten in dieser Verbindung jedoch parallelplanar mit einem Ga-Ga-Abstand von unter 3.4 Å (Cp-Cp-Abstand in Ferrocen) anordnen können, sollen theoretische Rechnungen zeigen (W. W. Schoeller, noch unveröffentlichte Ergebnisse).
- [13] Die elektrochemischen Experimente wurden mit einem Potentiostat/Galvanostat PAR-Model 273A und der entsprechenden Software (Model 270) durchgeführt. Eine Drei-Elektroden-Anordnung wurde verwendet, wobei die Arbeitselektrode aus einer Platinscheibe (2 mm Durchmesser), die Gegenelektrode aus einem Platindraht und die Pseudoreferenzelektrode aus einem Silberdraht bestand. Bei jeweils einer weiteren Messung der ansonsten identischen Probe wurde Decamethylferrocen  $[\text{FcPz}^*]$  als interner Standard zugegeben. Die gemessenen Redoxpotentiale wurden später umgerechnet und auf Ferrocen/Ferrocenium  $([\text{FcPz}_2]/[\text{FcPz}_2]^+)$  bezogen ( $E([\text{FcPz}_2^*]) = -480 \text{ mV}$  (in DMSO) vs.  $[\text{FcPz}_2]/[\text{FcPz}_2]^+$ ; eigene Messung). Als Solvens wurde eine 0.1M Lösung des Leitsalzes  $\text{NBu}_4\text{PF}_6$  in DMSO verwendet. Alle angegebenen Potentiale wurden sowohl durch Cyclovoltammetrie (Durchfahrgeschwindigkeit  $100 \text{ mV s}^{-1}$ ) als auch durch Square-Wave-Voltammetrie (Frequenz 5 Hz) bestimmt.
- [14] M. B. Robin, P. Day, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.* **1967**, 10, 247–422.
- [15] Vergleiche hiermit die Koordinationschemie der zu **2** analogen Borverbindungen: M. Grosche, E. Herdtweck, F. Peters, M. Wagner, *Organometallics* **1999**, 18, 4669–4672.
- [16] Siehe hierzu: S. Leininger, B. Olenyuk, P. J. Stang, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 853–907.
- [17] Übersicht zu Charge-Transfer-Komplexen: J. S. Miller, A. J. Epstein, W. M. Reiff, *Chem. Rev.* **1988**, 88, 201–220.
- [18] Siehe hierzu: „Künstliche molekulare Maschinen“: V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo, J. F. Stoddart, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3484–3530; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3348–3391.

## Hochgradige Markierung von DNA: Herstellung und Charakterisierung des Substrats für eine Einzelmolekül-Sequenzierung\*\*

Susanne Brakmann\* und Sylvia Löbermann

Die Einzelmoleküldetektion ist das ultimative analytische Werkzeug, da sie lediglich Konzentrationen im Zepto- bis Femtomol-Bereich ( $10^{-21}$  bzw.  $10^{-15}$ ) benötigt. Im Extremfall kann die Empfindlichkeit von Einzelmolekültechniken sogar die Yoktomol-Grenze ( $10^{-24}$ ) erreichen<sup>[1–5]</sup> und damit Einblicke in das chemische Verhalten und Schicksal individueller Moleküle geben sowie kleinste Veränderungen auf molekularer Ebene, die möglicherweise das chemische Reaktionsverhalten beeinflussen, widerspiegeln.<sup>[6–10]</sup> Bei Anwendung der klassischen Methoden bleiben diese Effekte durch Mittelung über das Teilchen-Ensemble verborgen.

Die Annahme, dass die Sequenzierung von DNA und RNA durch Verwendung von Einzelmoleküldetektion und -analyse beschleunigt werden könnte, war ein weiterer Impuls für die Forschung in diesem Bereich.<sup>[3, 11, 12]</sup> Die DNA- und RNA-Sequenzierungen basieren auf der Tatsache, dass einzelne fluoreszierende Moleküle innerhalb von Millisekunden identifiziert werden können,<sup>[13]</sup> und sie kombinieren die sequentielle enzymatische Hydrolyse von einzelnen Molekülen mit der Identifizierung der frei gewordenen Monomere anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften – Wellenlänge, Fluoreszenz-Lebensdauer oder beides.<sup>[14, 15]</sup> Da natürliche Nucleotide bei Raumtemperatur kaum fluoreszieren, ist eine vollständige und verlässliche Markierung der einzelnen DNA- oder RNA-Moleküle mit fluoreszierenden Farbstoffen erforderlich, wobei jeder Farbstoff exakt eine der vier Basen (A, G, C oder T/U) markieren muss. Das Modifizieren von DNA mit Fluorophoren kann durch eine enzymatische Markierung oder eine Markierung nach der Synthese erreicht werden. Da die chemische Anbindung auch nur eines einzelnen Farbstoffmoleküls an Oligomer-DNA keine hundertprozentige Ausbeute an modifiziertem Produkt ergibt, würde die Einführung von Farbstoffen nach der Synthese zu Substraten für die Sequenzierung führen, auf die man sich nicht verlassen kann. Alternativ kann Fluorophor-markierte DNA durch eine Polymerase-vermittelte Inkorporation fluoreszenzmarkierter Nucleotidanaloga enzymatisch synthetisiert werden. Nucleinsäure-Polymerasen aus einer Vielzahl an Organismen können für die Synthese von komplementärer, fluoreszenzmarkierter DNA durch Nick-Translation, Primer-Extension, reverse

[\*] Dr. S. Brakmann  
Evotec Biosystems AG  
Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 551-201-1435  
E-mail: sbrakma@gwdg.de

S. Löbermann  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
Am Fassberg, 37077 Göttingen (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft, dem BMBF gemeinsam mit Roche Diagnostics (Förderungs-Nr. 0311003) und der DFG (Förderungs-Nr. Ei 411/1-1) unterstützt. Wir danken Dr. Dmitri Czerny, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, für die elektronenmikroskopische Aufnahme.

Transkription oder PCR verwendet werden. Jedoch sprachen erste von uns durchgeführte Versuche dafür, dass die meisten natürlichen und kommerziell verfügbaren DNA-Polymerasen keine Substrate akzeptieren, die durch Fluoreszenzfarbstoffe stark verändert worden sind (unveröffentlichte Ergebnisse). Experimente anderer Gruppen<sup>[16, 17]</sup> und Hinweise der Lieferanten von Farbstoff-markierten Nucleotiden<sup>[18]</sup> bestätigten, dass nur maximal 28 % aller möglichen Positionen durch PCR markiert werden können und dass durch Nick-Translation nur 18 % Austausch erreicht werden kann.<sup>[19]</sup>

Mit einem Assay für das Screening nach Polymerase-Aktivität mit Farbstoff-markierten Nucleotiden, der auf der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) basiert,<sup>[3]</sup> beobachteten wir, dass sowohl der Wildtyp als auch das Exonuclease-defiziente Klenow-Fragment der *Escherichia coli*-DNA-Polymerase I in der Lage sind, 55 aufeinander folgende Fluorophor-markierte Desoxyribonucleotide durch Verlängerung einer synthetischen Primer-Matrize einzubauen (100 % Inkorporation).<sup>[20]</sup> Obwohl dieses Ergebnis überraschend war, widerspricht es den weiter oben zitierten Ergebnissen nicht, da die Markierung durch Replikation in einer einzigen Runde, d.h. ohne Amplifizierung, und unter Verwendung einer künstlichen poly(dA)-Matrize erreicht wurde; zum Nachweis des polymeren Produkts diente die hochempfindliche FCS-Technik. Diese ermöglichte auch einen näheren Einblick in die enzymatische Inkorporation von Fluorophoren, da die Fluoreszenzintensität und die Diffusionszeit der einzelnen Molekülararten parallel bestimmt wurden. Unter optimalen Bedingungen, d.h. bei Abwesenheit von Fluoreszenzlöschung und mit Molekülararten von vergleichbarer linearer Gestalt, erbringt eine FCS-Messung Angaben über die Zahl an Fluorophoren, die in ein spezifisches Molekül eingebaut worden sind, sowie Informationen über die relative Länge des polymeren Produkts, die eindeutig von der Länge der jeweiligen Primer-Matrize unterschieden werden kann.

Um die Markierung von langen Fragmenten für die Einzelmolekül-Sequenzierung zu erreichen, wendeten wir die Primer-Extension durch Klenow-Polymerase auf ein natürliches DNA-Fragment von 2.7 Kilobasenpaaren (kb) an, welches aus dem Genom des Bakteriophagen T7 stammte. Zunächst ersetzten wir dTTP vollständig durch sein fluoreszierendes Analogon Tetramethylrhodamin-4-dUTP (TMR-dUTP (FluoroRed), Amersham Pharmacia) und erhielten ein nichtfluoreszierendes Reaktionsprodukt mit der erwarteten elektrophoretischen Mobilität und einem Absorptionsspektrum, welches demjenigen natürlicher DNA ähnelte, nur dass sein Maximum von 260 nm nach ca. 275 nm (Abbildung 1) verschoben war.

Die vollständige Aufnahme einer zweiten Fluoreszenzmarkierung gelang, als nicht nur TMR-dUTP, sondern zusätzlich das dCTP-Analogon Rhodamin-110-dCTP (R110-dCTP, Applied Biosystems) verwendet wurde. Die Primer-Extension der gleichen Matrize ergab wieder ein Produkt mit der erwarteten elektrophoretischen Mobilität, das nicht fluoreszierte. Bei optischen Absorptionsmessungen in wässriger Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7.5) trat eine starke Lichtstreuung aufgrund der Aggregation der Produktmoleküle auf. Dagegen konnte das Produkt in H<sub>2</sub>O/Dioxan vollständig gelöst werden und lieferte nun ein Absorptionsspektrum,

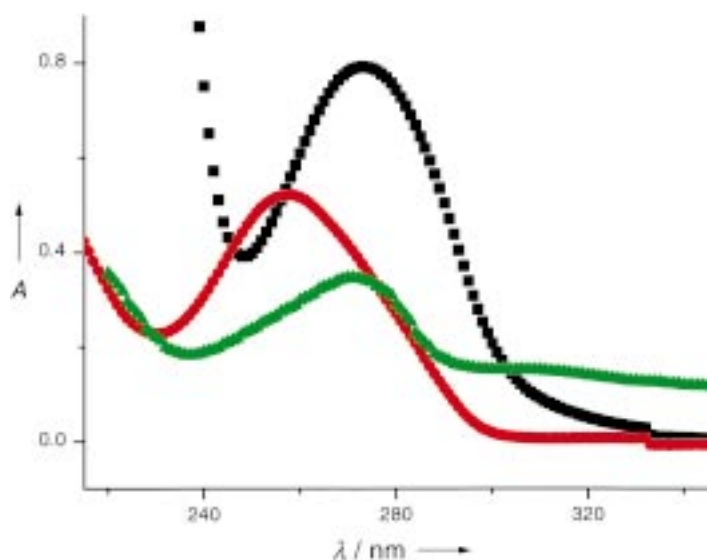


Abbildung 1. Vergleich der Absorptionsspektren von natürlicher und fluoreszenzmarkierter DNA. Die Spektren der nichtmarkierten (rot) und der mit TMR-dUTP markierten DNA (schwarz) wurden in wässriger Lösung (10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl (Tris-HCl), pH 7.5) aufgenommen, das der mit TMR-dUTP und R110-dCTP markierten DNA (grün) in H<sub>2</sub>O/Dioxan (50/50, v/v; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5).

welches demjenigen des TMR-markierten DNA-Derivats mit einem Maximum bei ca. 275 nm ähnelte (Abbildung 1).

DNA, die mit TMR-dUTP oder mit TMR-dUTP und R110-dCTP markiert war, zeigte eine zunehmende Neigung, in wässriger Lösung Aggregate zu bilden. Dies machte sich zuerst bei der Aufnahme der Absorptionsspektren bemerkbar und wurde besonders deutlich bei Versuchen, das Produkt des Farbstoffeinbaus sichtbar zu machen: Kraftmikroskopie offenbarte sehr große Aggregate markierter DNA (ca. 400 nm im Querschnitt, ca. 50 nm hoch) auf der polaren Oberfläche von Glimmer, die die optische Differenzierung einzelner Molekülstrukturen verhinderten (T. Schäffer, Göttingen, persönliche Mitteilung). Dagegen ermöglichte die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) auf einer nicht-polaren Graphitoberfläche die Visualisierung von TMR-dUTP/R110-dCTP-markierter DNA (Abbildung 2). Das Re-

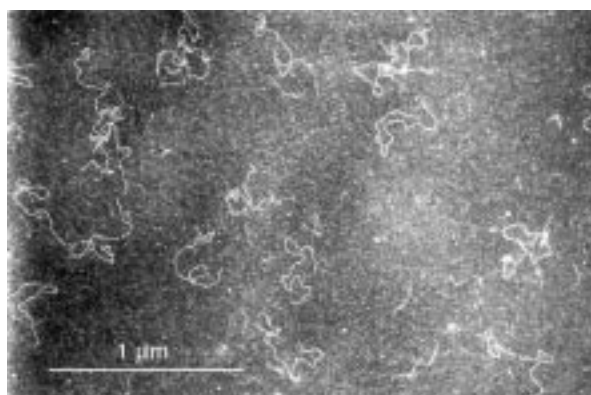


Abbildung 2. TEM-Aufnahme von dsDNA, die mit TMR-dUTP und R110-dCTP markiert ist (Graphitoberfläche; Färbung mit Uranylacetat). Die Längen der DNA-Strukturen wurden mit der Software analySIS (Soft Imaging System GmbH, Münster) bestimmt.

aktionsprodukt liegt in Form gleichmäßig verteilter Einzelmoleküle vor, die eine ähnliche Form wie natürliche Doppelstrang(ds)-DNA und eine Länge von ca. 1  $\mu\text{m}$  haben, wie sie für ein 2.7-kb-Fragment zu erwarten war. Obwohl strukturelle Details, z.B. die Helix-eigenschaften des Farbstoff-markierten Produkts, elektronenmikroskopisch nur begrenzt zugänglich sind, kann man folgern, dass dsDNA von voller Länge das Hauptprodukt ( $\geq 90\%$ ) ist, da fast keine Einzelstrang-DNA nachzuweisen war.

Fluoreszenzmarkierte DNA zeigte außerdem nicht das kooperative Schmelzverhalten, das natürliche DNA auszeichnet (D. Pörschke, Göttingen, persönliche Mitteilung). Jedoch wurden bei 30 min Erhitzen einer Lösung von trockener dsDNA in reinem Dimethylsulfoxid (DMSO) auf 50 °C ca. 90% der Doppelstränge in Einzelstränge umgewandelt (laut MPLC (Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie) an Sepharose). Wir wandten dieses Verfahren auf doppelt markierte dsDNA an, die mit Hilfe eines biotinylierten Primers erzeugt worden war, und prüften, ob der modifizierte Strang als Matrize für weitere Polymerasereaktionen dienen konnte: Die nach Immobilisierung der biotinylierten, Farbstoff-markierten dsDNA und Abtrennung des nichtmarkierten Strangs erfolgende PCR-Amplifizierung (unter Verwendung von natürlichen Nucleotiden und korrekturlesender *Pfu*-DNA-Polymerase) zeigte, dass der markierte Strang als Matrize für die PCR diente. Die Subklonierung des PCR-Produkts, die Bestimmung der Sequenz (*Taq*-DyeDeoxy-Terminator-Methode; Applied Biosystems) und die Interpretation der Sequenzdaten (ca. 10000 bp sequenziert) deckten keine Veränderung der ursprünglichen T7-Sequenz auf. Folglich wurde bei der Farbstoffmarkierung durch Primer-Extension mit Exonuclease-defizienter Klenow-Polymerase eine Fehlerrate von  $10^{-4}$  nicht überschritten.

Die vollständige Fluoreszenzmarkierung der Pyrimidinreste eines Strangs der dsDNA durch Farbstoffe vom Rhodamin-Typ scheint eine drastische Konformationsänderung zu bewirken: Die CD-Spektren von TMR-dUTP-modifizierter oder TMR-dUTP- und R110-dCTP-modifizierter DNA haben das umgekehrte Vorzeichen wie das Spektrum des natürlichen 2.7-kb-Fragments (Abbildung 3). Dies könnte bedeuten, dass die Doppelhelix durch die Inkorporation sehr vieler Rhodaminmoleküle eine Umwandlung von der rechtsgängigen B-Form (natürliche DNA) in die linksgängige Z-Form (markierte DNA) erfährt. Eine Inversion des CD-Spektrums war erstmals bei der Z-DNA festgestellt worden.<sup>[21]</sup>

Zwar konnte bisher noch nicht bewiesen werden, dass ein einzelnes, vollständig markiertes DNA-Molekül sukzessiv durch eine Exonuclease abgebaut und so dessen Sequenz bestimmt werden kann, doch legen erste Ergebnisse nahe, dass doppeltmarkierte DNA als Matrize, z.B. für Exonuclease III aus *Escherichia coli*, dient (unveröffentlichte Ergebnisse). In Bezug auf die Sequenzierung einzelner Moleküle kann gefolgert werden, dass eine Fluoreszenzmarkierung pro Basenpaar ausreicht, wenn beide Komplementärstränge der dsDNA kreuzweise markiert und unter zeitaufgelöster Detektion abgebaut werden können (Zweifarbkonzept).<sup>[14]</sup> Wie bei der traditionellen automatischen Sequenzierung könnten

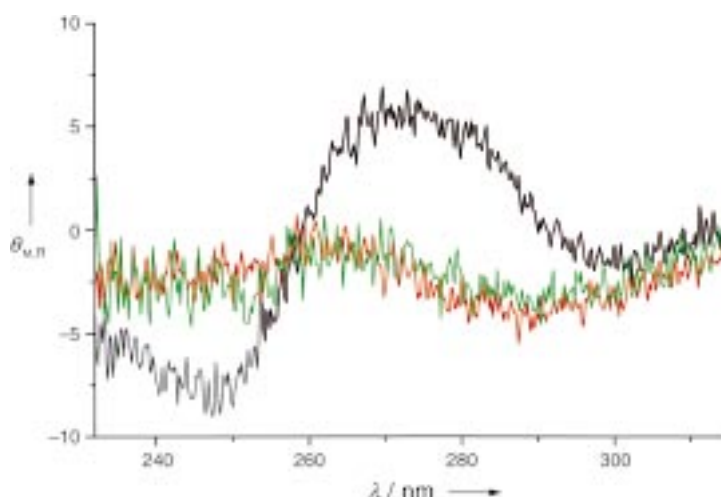


Abbildung 3. CD-Spektren von natürlicher und fluoreszenzmarkierter DNA (molare Elliptizität pro Rest  $\theta_{M,R}$  in  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ). Schwarz: nichtmarkierte DNA; rot: mit TMR-dUTP markierte DNA; grün: mit TMR-dUTP und R110-dCTP markierte DNA.

beide Stränge eines bestimmten Fragments durch die Verwendung von zwei flankierenden Primern und getrennte Primer-Extension in Farbstoff-markierte DNA kopiert werden. Dieser Vorgang benötigt keine Markierung des zweiten Strangs ausgehend vom ersten markierten Strang. Durch Verwendung beider Farbstoff-markierter Tochterstränge in getrennten Abbauexperimenten könnte die Sequenz der Basenpaare prinzipiell bestimmt werden, solange der exonucleolytische Abbau sowohl hoch prozessiv als auch reproduzierbar ist. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Doppelmarkierung des A:T-Paares mit Tetramethylrhodamin und des G:C-Paares mit Rhodamin-110 möglicherweise eine erste Lösung zur vollständigen Markierung von DNA für die Einzelmolekül-Sequenzierung bietet.

### Experimentelles

Eine Lösung von 2.5 pmol dsDNA-Matrize (2.7 kb; Gen-1-Fragment des Bakteriophagen T7, das für T7-RNA-Polymerase kodiert<sup>[21]</sup>) und 10 pmol Primer 5'-GGCGTTAGTGATGGTGATGGTGATGCGCGAACGCGAGAGTCCGACTCTAAG-3' in 80  $\mu\text{L}$  50 mM Tris-HCl, pH 7.5, wurde 5 min auf 100 °C erhitzt und anschließend innerhalb von 30 min auf 25 °C abgekühlt (Hybridisierung). Primer-Extension und Doppelmarkierung wurden durch die Zugabe von jeweils 5 nmol dATP, dGTP, TMR-dUTP und R110-dCTP sowie von 50 U Klenow-Exo<sup>-</sup>-Polymerase (New England Biolabs) in 420  $\mu\text{L}$  eines 10 mM Tris-HCl-Puffers mit pH 7.5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 7.5 mM Dithiothreitol und 10% DMSO erreicht. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 20  $\mu\text{L}$  0.5 M EDTA gestoppt und das Produkt durch Agarosegelelektrophorese gereinigt (1.2% Agarose). Die markierte DNA wurde durch Elektroelution und Fällung mit Ethanol gereinigt und üblicherweise in  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$  (90/10) gelöst.

Eingegangen am 10. November 2000 [Z16071]

- [1] T. Hirschfeld, *Appl. Opt.* **1976**, 15, 2965–2966.
- [2] N. J. Dovichi, J. C. Martin, J. H. Jett, R. A. Keller, *Science* **1982**, 219, 845–847.
- [3] M. Eigen, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5740–5747.
- [4] D. Y. Chen, N. J. Dovichi, *J. Chromatogr. B* **1994**, 657, 265–269.
- [5] R. A. Keller, W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, J. C. Martin, M. Wu, *Appl. Spectrosc.* **1996**, 50, 12A–32A.
- [6] Q. Xue, E. S. Yeung, *Nature* **1995**, 373, 681–683.

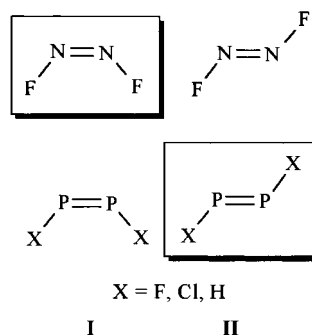
- [7] D. B. Craig, E. Arriaga, J. C. Y. Wong, H. Lu, N. J. Dovichi, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 39A–43A.
- [8] L. Edman, Z. Földes-Papp, S. Wennmalm, R. Rigler, *Chem. Phys.* **1998**, *247*, 11–22.
- [9] J. J. La Clair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1623–1628.
- [10] L. Edman, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8266–8271.
- [11] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. H. Jett, M. E. Johnson, J. C. Martin, B. L. Marrone, J. A. Schecker, C. W. Wilkerson, R. A. Keller, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 1535–1542.
- [12] D. C. Nguyen, R. A. Keller, J. H. Jett, J. C. Martin, *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2158–2161.
- [13] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, P. Kask, *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22*, 169–175.
- [14] K. Dörre, S. Brakmann, M. Brinkmeier, K.-T. Han, K. Riebeseel, P. Schwill, J. Stephan, T. Wetzel, M. Lapczynska, M. Stuke, R. Bader, M. Hinz, H. Seliger, J. Holm, M. Eigen, R. Rigler, *Bioimaging* **1997**, *5*, 139–152.
- [15] J. Stephan, K. Dörre, S. Brakmann, T. Winkler, T. Wetzel, M. Lapczynska, M. Stuke, B. Angerer, W. Ankenbauer, Z. Földes-Papp, R. Rigler, M. Eigen, *J. Biotechnol.* **2001**, im Druck.
- [16] H. Yu, J. Chao, D. Patek, R. Mujumdar, S. Mujumdar, A. S. Waggoner, *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*, 3226–3232.
- [17] V. Folsom, M. J. Hunkeler, A. Haces, J. D. Harding, *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 309–314.
- [18] *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Eugene, OR, **2000**.
- [19] Z. Zhu, J. Chao, H. Yu, A. S. Waggoner, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 3418–3422.
- [20] „Aufbau eines Assays zur evolutiven Optimierung einer Polymerase für die Generierung hochgradig fluoreszenzmarkierter DNA“: P. Runzheimer, Dissertation, Technische Universität Braunschweig, Deutschland, **1999**.
- [21] F. M. Pohl, T. M. Jovin, *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 375–396.
- [22] P. Davanloo, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, F. W. Studier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 2035–2039.

## Die komplexchemische Stabilisierung von Dichlordiphosphenen\*\*

Ulf Vogel, Gregor Stöber und Manfred Scheer\*

Professor Hansgeorg Schnöckel zum 60. Geburtstag gewidmet

Kleine Moleküle mit Mehrfachbindungen zwischen Hauptgruppenelementen üben nach wie vor eine starke Faszination aus. So ist Distickstoffdifluorid mit seiner um 12.6 kJ mol<sup>-1</sup> stabileren *cis*-Konfiguration **I** gegenüber dem *trans*-Isomer **II** seit langem Bestandteil unseres Lehrbuchwissens (Schema 1).<sup>[1]</sup> Während die Phosphoranaloga P<sub>2</sub>X<sub>2</sub> bislang nicht experimentell zugänglich waren, belegen Ab-initio-SCF-Rechnungen für X = F die um 5.9 kJ mol<sup>-1</sup> gegenüber der *cis*-Konfiguration **I** stabilere *trans*-Konfiguration **II** als Grundzustand für ein solches Singulett-Molekül.<sup>[2]</sup> Bei Di-

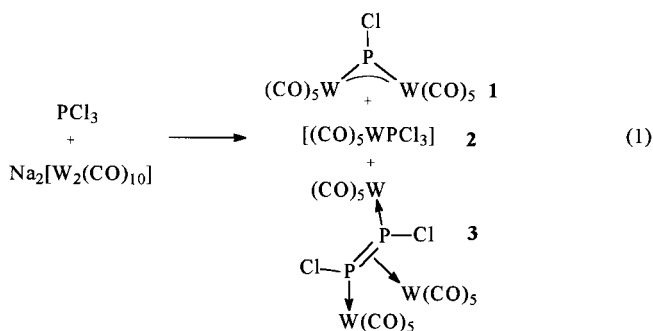


Schema 1. *cis*- und *trans*-Isomere von N<sub>2</sub>F<sub>2</sub> und P<sub>2</sub>X<sub>2</sub> (die thermodynamisch bevorzugte Konfiguration ist umrahmt).

phosphenen, P<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, welches bei der Pyrolyse von Diphosphan, P<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, experimentell nachgewiesen wurde,<sup>[3]</sup> ist die *trans*-Konfiguration **II** sogar um 15 kJ mol<sup>-1</sup> stabiler als die entsprechende *cis*-Anordnung **I**.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen unsere CCSD(T)-Rechnungen<sup>[4]</sup> zur Stabilität von Dichlordiphosphenen, P<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, die die *trans*-Anordnung (C<sub>2h</sub>-Symmetrie: *d*(P–P) = 2.066 Å, *d*(P–Cl) = 2.100 Å, ∠(Cl–P–P) = 97.5°) um 7 kJ mol<sup>-1</sup> gegenüber der *cis*-Konfiguration (C<sub>2v</sub>-Symmetrie: *d*(P–P) = 2.072 Å, *d*(P–Cl) = 2.073 Å, ∠(Cl–P–P) = 108.7°) bevorzugt. Da sich die Dihalogendiphosphene bisher einem experimentellen Nachweis entziehen, berichten wir im Folgenden über die komplexchemische Stabilisierung von Dichlordiphosphenen in der Koordinationssphäre von Wolframcarbonylen.

Die Extraktion des bei der Umsetzung von PCl<sub>3</sub> mit Na<sub>2</sub>[W<sub>2</sub>(CO)<sub>10</sub>] in THF entstehenden Feststoffs mit *n*-Pentan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> liefert eine tief violett gefärbte Lösung. Diese enthält entsprechend den <sup>31</sup>P-NMR-Untersuchungen den Chlorphosphinidenkomplex **1** als Hauptkomponente, sowie etwas **2**<sup>[5]</sup> und den Dichlordiphosphenenkomplex **3** [Gl. (1)].<sup>[6]</sup> Während sich **1** und **2** bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung an Kieselgel zersetzen, gelingt es, **3** als roten Feststoff in 17% Ausbeute zu isolieren.



Das <sup>31</sup>P-NMR-Spektrum von **1** zeigt ein Singulett bei δ = 868 mit einer <sup>183</sup>W,<sup>31</sup>P-Kopplungskonstante von 200 Hz, was in Übereinstimmung mit den NMR-Daten von Phosphinidenkomplexen steht, die durch organische Gruppen substituiert sind. Die <sup>31</sup>P-NMR-Verschiebungen dieser Verbindungen treten generell bei sehr tiefem Feld auf (z. B. [MesP{W(CO)<sub>5</sub>}]<sub>2</sub>: δ = 961, <sup>1</sup>J<sub>W,P</sub> = 176 Hz;<sup>[7]</sup> Mes = 2,4,6-Me<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>). Diese Charakteristika werden gemeinsam mit den π-π\*-

[\*] Prof. Dr. M. Scheer, Dipl.-Chem. U. Vogel, Dipl.-Chem. G. Stöber  
Institut für Anorganische Chemie der Universität Karlsruhe  
76128 Karlsruhe (Deutschland)  
Fax: (+49) 721-661921  
E-mail: mascheer@achibm6.chemie.uni-karlsruhe.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.