

- [3] IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3040(w), 2950(s), 2880(w), 2840(s), 2810(sh), 2740(w), 2670(w), 1450(s), 1390(m), 1360(vw), 1290(m), 1270(s), 1210(w), 1120(s), 1070(w), 1010(s), 910(w), 870(m), 730(m), 550(m), 520(m) \text{ cm}^{-1}$.
- [4] Vergleiche z. B. *N*-Methylmorpholin in C. J. Pouchert: *The Aldrich Library of FT-IR Spectra*, Vol. 1, 1. Aufl. 1985, S. 382.
- [5] Hierfür hätte man prinzipiell auch den Ausdruck „ring whizzing“ verwenden können. Dieser bezieht sich jedoch auf ein zweidimensionales Phänomen, während es sich im hier beschriebenen Fall um ein dreidimensionales Phänomen auf einem sphärischen Molekül handelt.
- [6] a) A. P. ter Borg, H. Kloosterziel, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 82 (1963) 741; b) D. S. Glass, R. S. Boikess, S. Winstein, *Tetrahedron Lett.* 1966, 999; c) R. W. Roth, *Justus Liebig's Ann. Chem.* 671 (1964) 25.
- [7] Aufgrund dieser Experimente konnten wir eindeutig die C_{60} -H- und C_{60} -D-Streckschwingungen bei 3040 bzw. 2240 cm^{-1} zuordnen.
- [8] P.-M. Allemand, A. Koch, F. Wudl, Y. Rubin, F. Diederich, M. M. Alvarez, S. J. Anz, R. L. Whetten, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 1050.

HETLOC, eine effiziente Methode zur Bestimmung heteronuclearer Weitbereichskopplungen mit dem Heterokern in natürlicher Häufigkeit**

Von Michael Kurz, Peter Schmieder und Horst Kessler*

Heteronucleare Weitbereichskopplungen wie $^3J(C,H)$ und $^3J(N,H)$ gehören zu den wichtigsten NMR-Parametern bei der Konformations- und Konfigurationsbestimmung^[1]. Ihrer intensiven Nutzung stand bisher jedoch ihre schwere Zugänglichkeit entgegen. Die existierenden Bestimmungsmethoden^[2] haben entweder den Nachteil zu geringer Empfindlichkeit oder der Beschränkung auf gut aufgelöste Protonenspektren. Wir schlagen hier ein Verfahren vor, das für Kopplungen zu protonen tragenden Heteroatomen beide Nachteile umgeht und ohne mühsame Anreicherung des Heterokerns (^{13}C , ^{15}N) auskommt.

Eine effiziente Methode zur Bestimmung dieser Weitbereichskopplungen sollte folgenden Anforderungen genügen: höchste Empfindlichkeit, Anwendbarkeit auch bei überlagerten Protonen- oder Kohlenstoffsignalen und Messung der Kopplungskonstante in der Detektionszeit (Dimension mit der besseren Auflösung). Diese Bedingungen werden alle durch die Methode von Montelione et al.^[3] erfüllt, bei der herkömmliche TOCSY- oder NOESY-Spektren isotopenangereicherter Proteine ein E.COSY-Muster^[4] erhalten. Die Kreuzsignale zeigen in der inkrementierten Dimension ($F1$ in 2D-, $F2$ in 3D-Spektren) die direkte, große Kopplung zum Heterokern ($^1J(C,H)$, $^1J(N,H)$) und in der detektierten Dimension ($F2$ in 2D-, $F3$ in 3D-Spektren) die gewünschte heteronucleare Weitbereichskopplung zum gleichen Heterokern durch die Verschiebung der Multipletts. Damit lassen sich Kopplungskonstanten bestimmen, die kleiner als die Linienbreite sind.

Um Kopplungen zu Kernen in natürlicher Häufigkeit bestimmbar zu machen, müssen die Signale der Protonen, die an keinen magnetisch aktiven Heterokern gebunden sind, unterdrückt werden. Wir schlagen hierfür die Verwendung eines ω_1 -Heterohalbfilters^[5] vor, der über den Phasencyclus solche Kerne in $F1$ selektiert, die direkt an den Heterokern gebunden sind. Die Pulssequenzen sind in Abbildung 1 dargestellt. Durch BIRD-Vorsättigung^[6] der an ^{12}C gebundenen Protonen erreicht man eine schnelle Pulsfolge^[7] (ca. 2 Scans pro Sekunde). Die erhaltenen 2D-Spektren sind

TOCSY-Spektren, in denen die Kreuzsignale das gewünschte „E.COSY“-Muster zeigen. Die Pulssequenz von Abbildung 1b ist die dreidimensionale Variante^[8], in der die chemische Verschiebung zusätzlich evolviert wird. Diese Technik ist besonders bei Überlagerungen anzuwenden.

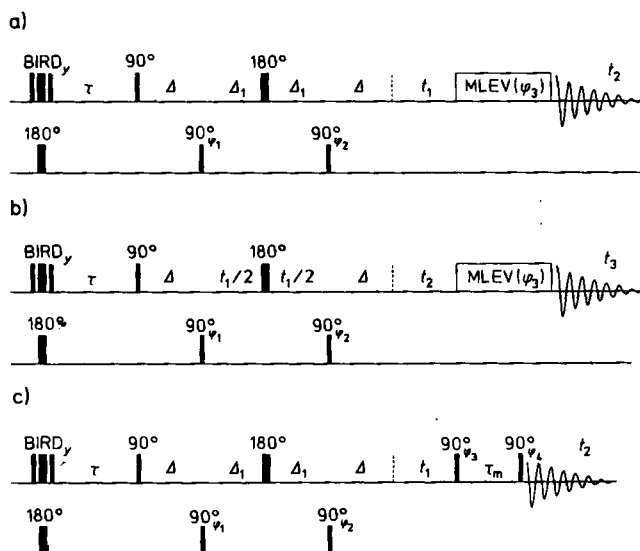


Abb. 1. Pulssequenzen der im Text angesprochenen NMR-Verfahren. a) ω_1 -Heterohalbfilters TOCSY ohne heteronucleare Entkopplung (HETLOC, Determination of Heteronuclear Long Range Couplings). b) 3D-HMQC-TOCSY ohne heteronucleare Entkopplung. c) ω_1 -Gefiltertes NOESY ohne heteronucleare Entkopplung. Der BIRD-Puls dient in allen Sequenzen zur Unterdrückung der Signale an ^{12}C gebundener Protonen und ermöglicht eine schnelle Ausführung des Experiments mit zwei Wiederholungen pro Sekunde. Die Wartezeiten sind $\Delta = 3.57 \text{ ms}$, $\Delta_1 = 3 \mu\text{s}$; τ muß für jede Verbindung extra optimiert werden. Der Phasencyclus ist $\varphi_1 = x, -x, x, -x$, $\varphi_2 = x, x, -x, -x$, Empfänger = $+, -, -, +$. Bei (c) entspricht der Phasencyclus der Phasen φ_1 und φ_4 dem im herkömmlichen NOESY-Experiment. Im Falle des TOCSY-Transfers wird MLEV-17 als Mischsequenz verwendet.

Das hier vorgeschlagene Verfahren ist aber auf Systeme beschränkt, in denen der Heterokern an ein Proton gebunden ist, das dem gleichen Spinsystem angehört wie das mit $^nJ(H,X)$ koppelnde Proton. Ist das nicht der Fall, so kann man NOE-Kreuzsignale mit der Pulssequenz von Abbildung 1c nutzen, z. B. zwischen dem Amidproton einer Aminosäure und dem H^α der vorhergehenden Aminosäure. Allerdings ist bei kleinen Molekülen die Empfindlichkeit durch die geringe Effizienz des NOE-Mischprozesses eingeschränkt.

Im folgenden soll gezeigt werden, wie mit diesem Verfahren der Winkel ϕ in Peptiden, der Diederwinkel zwischen den beiden Carbonyl-C-Atomen entlang der Peptidkette, ermittelt werden kann. Abbildung 2 zeigt, daß die $^3J(H^N, C^\beta)$ -

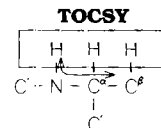


Abb. 2. Schematische Darstellung der Situation bei der Bestimmung von $^3J(H^N, C^\beta)$ in einem Peptid. H^N ist mit H^α durch den TOCSY-Transfer verbunden. Werden für das Experiment an ^{13}C gebundene H^β selektiert, zeigt H^N die Weitbereichskopplung zu C^β .

Kopplung ebenso wie die homonucleare $^3J(H^N, H^\alpha)$ -Kopplung über eine Karplus-Beziehung mit dem Winkel ϕ korreliert ist. Die relevanten Karplus-Bystrov-Beziehungen sind die Gleichungen (a) und (b)^[9]. Eine graphische Darstellung ist in Abbildung 3 gezeigt.

* Prof. Dr. H. Kessler, Dipl.-Chem. M. Kurz, Dipl.-Chem. P. Schmieder Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München Lichtenbergstraße 4, W-8046 Garching

** Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Peter Schmieder dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Stipendium.

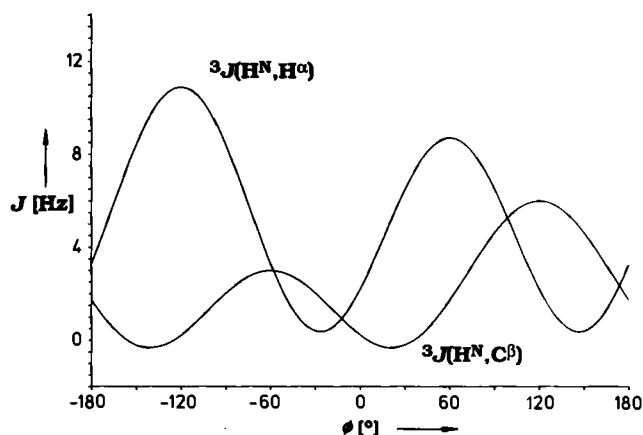


Abb. 3. Graphische Darstellung der Karplus-Bystrov-Beziehungen (a) und (b). Die gezeigten Kurven sind jeweils als Mitte eines erlaubten Bereichs zu verstehen.

$$^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{H}^{\alpha}) = 9.4 \cos^2(\phi - 60) - 1.1 \cos(\phi - 60) + 0.4 \quad (\text{a})$$

$$^3J(\text{H}^{\text{N}}, \text{C}^{\beta}) = 4.7 \cos^2(\phi + 60) - 1.5 \cos(\phi + 60) - 0.2 \quad (\text{b})$$

Am Beispiel des cyclischen Pentapeptids *cyclo*-(Ala¹-Ala²-Ala³-Pro⁴-Pro⁵-), das in zwei Konformationen vorliegt (53 und 47 %), soll die Vorgehensweise verdeutlicht werden. Abbildung 4a zeigt die H^N,H^β-Region des ω¹-heterohalbgefilterten TOCSY- oder HETLOC-Spektrums. Das Kreuzsi-

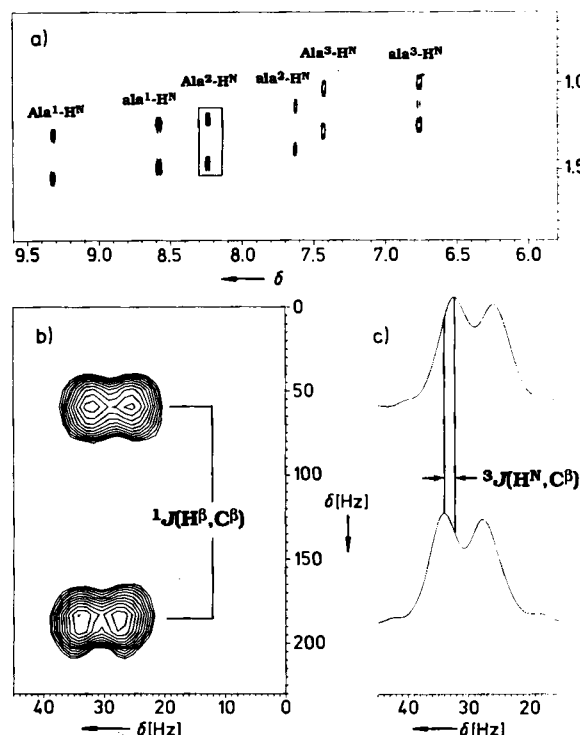


Abb. 4. Anwendung der in Abbildung 1a gezeigten Pulssequenz auf das cyclische Pentapeptid *cyclo*-(Ala¹-Ala²-Ala³-Pro⁴-Pro⁵-). Die Probe enthält 10 mg Peptid in 0.5 mL [D₆]DMSO (ca. 25 mM pro Konformation), gemessen wurde bei 300 K mit einem Bruker-AMX-500-Spektrometer. Es wurden 512 t₁-Inkrementen mit je 128 Wiederholungen durchgeführt (τ = 198 ms, φ₃ = x); die gesamte Meßzeit betrug 9.5 Stunden. 4096 Punkte wurden in der Akquisitionsdimension aufgenommen; das Spektrum wurde in beiden Dimensionen mit einer um 90° verschobenen quadratischen Sinusfunktion apodisiert und hatte nach der Rechnung die Größe von 8192 × 1024 reellen Punkten. a) Bereich der H^N,H^β-Kreuzsignale des ¹³C-ω₁-gefilterten TOCSY-Spektrums. b) Kreuzsignal von Ala²; das E.COSY-Muster ist deutlich zu erkennen. c) Zwei Reihen durch das Kreuzsignal von (b); die extrahierten Reihen wurden invers Fourier-transformiert, mit Nullen aufgefüllt und wieder Fourier-transformiert. Die Verschiebung der Signale gegeneinander ergibt die heteronucleare Weitbereichskopplung.

Tabelle 1. Kopplungskonstanten [Hz] und korrespondierende Winkel [°] für die drei Alanine in *cyclo*-(Ala¹-Ala²-Ala³-Pro⁴-Pro⁵-) in der stärker und der schwächer populierte Konformation (Ala bzw. ala).

	³ J(H ^N ,H ^α) → Winkel	³ J(H ^N ,C ^β) → Winkel	MD-Winkel [a]
Ala ¹	8.0 -153, -87, 44, 76	2.0 -90, -30, 63, 177 [b]	63
Ala ²	6.7 -160, -80, 32, 88	3.0 -60, 73, 167 [c]	-99
Ala ³	6.6 -161, -79, 31, 89	2.5 -81, -39, 68, 172 [c]	-67
ala ¹	9.6 -141, -99 [d]	0.2 -160, -120, 0, 40	-95
ala ²	5.6 -167, -73, 24, 96	2.6 -79, -41, 69, 171 [c]	-51
ala ³	10.0 -137, -103 [d]	0.4 -163, -117, -3, 43	-100

[a] Aus einer eingeschränkten (restrained) MD-Simulation mit GROMOS [12] über 100 ps im Vakuum. Zur Anwendung kamen 18 und 17 Abstände für die stärker bzw. die schwächer populierte Konformation. [b] Die Alternative (-87°/-90°) kann wegen eines sehr intensiven Kreuzsignals zwischen dem Carbonyl-C-Atom der vorhergehenden Aminosäure und dem Ala¹-H^α ausgeschlossen werden. [c] Die Alternative mit positivem φ (88°/73°, 89°/68° bzw. 96°/69°) kann wegen des schwachen bzw. nicht vorhandenen Kreuzsignals zwischen dem Carbonyl-C-Atom der vorhergehenden Aminosäure und dem H^α der betrachteten Aminosäure ausgeschlossen werden. [d] Beide Winkel aus der Kopplungskonstante ³J(H^N,H^α) lassen sich mit dem halbfein hervorgehobenen Winkel aus der ³J(H^N,C^β)-Beziehung vereinbaren. Eine genauere Unterscheidung ist auch über die beiden anderen Weitbereichskopplungen [³J(H^N,C_{i-1}) und ³J(H^α,C_{i-1})] nicht möglich.

gnal von Ala²-H^N ist in Abbildung 4b zu sehen, wobei das E.COSY-Muster^[4] deutlich zu erkennen ist. Kopplungskonstanten können entweder direkt am Kreuzsignal oder analog zur DISCO-Prozedur^[10] an herausgelesenen Reihen (Abb. 4c) bestimmt werden.

In Tabelle 1 sind die aus beiden Kopplungen gewonnenen Winkel gegenübergestellt. Durch Kombination beider Beziehungen läßt sich die Zahl der möglichen Winkel auf eins oder zwei reduzieren. Zur endgültigen Unterscheidung können zwei zusätzliche Weitbereichskopplungen, ³J(H^N,C_{i-1}) und ³J(H^α,C_{i-1}), herangezogen werden, die aus einem selektiven HMBC-Experiment^[11] nur noch qualitativ bestimmt werden müssen. Die so ermittelten möglichen Winkel sind in Tabelle 1 halbfett hervorgehoben; sie stimmen mit den aus MD-Simulationen gewonnenen gut überein.

Abschließend sei gesagt, daß das hier vorgestellte Experiment eine einfache Methode zur Bestimmung heteronuclearer Kopplungskonstanten ist. Diese Kopplungskonstanten sind für die NMR-spektroskopische Bestimmung der Struktur in Lösung eine wertvolle Ergänzung zu den aus NOESY-Spektren gewonnenen Abständen.

Eingegangen am 7. Juni 1991 [Z 4682]

- [1] J. L. Marshall: *Carbon-Carbon and Carbon-Proton NMR couplings*, Verlag Chemie International, Deerfield Beach, FL, USA 1983; A. Demarco, M. Llinas, K. Wüthrich, *Biopolymers* 17 (1978) 2727-2742.
- [2] A. Bax, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 1099-1100; M. Ochs, S. Berger, *Magn. Reson. Chem.* 28 (1990) 994-997; R. C. Crouch, G. E. Martin, *J. Magn. Reson.* 92 (1991) 189-194; H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* 100 (1988) 507-554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 490-536, zit. Lit.
- [3] G. T. Montelione, M. E. Winkler, P. Rauenbuehler, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* 82 (1989) 198-204.
- [4] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* 75 (1987) 474-492.
- [5] G. Otting, H. Senn, G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 70 (1986) 500-505.
- [6] J. R. Garbow, D. P. Weitekamp, A. Pines, *Chem. Phys. Lett.* 93 (1982) 504-509.
- [7] A. Bax, S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* 67 (1986) 565-569.
- [8] G. Wider, D. Neri, G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* 85 (1989) 426-431; A. S. Edison, W. M. Westler, J. L. Markley, *ibid.* 92 (1991) 434-438; P. Schmieder, M. Kurz, H. Kessler, *J. Biomol. NMR*, eingereicht.
- [9] V. F. Bystrov, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 10 (1976) 41-81.
- [10] H. Kessler, A. Müller, H. Oschkinat, *Magn. Reson. Chem.* 23 (1985) 844-852.
- [11] W. Bermel, K. Wagner, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* 83 (1989) 223-232; H. Kessler, P. Schmieder, M. Köck, M. Kurz, *ibid.* 88 (1990) 615-618.
- [12] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Angew. Chem.* 102 (1990) 1020-1055; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 992-1017.