

Abb. 3. a) Integralverhältnisse der Kreuzpeaks aus FAST-NOESY-,  $I_{ij}^F(RD)$ , und NOESY-Experimenten mit  $I_{ij}(RD = 5\text{ s})$ , in %. Eine Konturliniendarstellung mit einem Faktor zwei zwischen den Konturlinien wurde gewählt, um die Zahl der Integrale innerhalb eines gegebenen Prozentbereichs abzubilden. Ein einmalig vorkommender  $I_{ij}^F(RD)/I_{ij}(5\text{ s})$  Wert ist durch genau eine Konturlinie dargestellt, ein  $n$ -fach vorkommender durch  $\text{trunc}(\lg_2 n)$ . Es wurden nur die nichtüberlagerten Kreuzsignale ausgewertet. Insgesamt sind für jeden  $RD$ -Wert 46 Intensitäten aufgetragen. Die Integrale in den FAST-NOESY-Experimenten sind zum Teil bis auf 1/5 derer bei vollständiger Relaxation reduziert, was einem Fehler von  $\pm 15\%$  in den Abständen entspricht. b) Gleiche Darstellung wie in a), aber unter Berücksichtigung der unvollständigen Relaxation während  $RD + AQ$  gemäß Gleichung (c). Die Abweichungen der Integrale sind jetzt nur noch  $\pm 10\%$ , was einem Fehler in den Abständen von  $\pm 2\%$  entspricht.

stimmung gegenüber NOESY-Spektren bei voller Relaxation ermöglicht eine rationellere Nutzung der Spektrometerzeit und damit eine Beschleunigung der Stukturbestimmung. Bei einer Verkürzung der Wiederholungsintervalle des Experiments ( $RD + AQ$ ) bis zur oder unter die Relaxationszeit  $T_2$  sollte man  $B_0$ -Gradienten in  $RD$  verwenden.

Eingegangen am 16. August 1993 [Z 6287]

- [1] a) R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. Clarendon, Oxford, **1987**; b) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507–554; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536.
- [2] a) J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546–4553; b) S. Macura, Y. Huang, D. Suter, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1981**, *43*, 259–281.

- [3] a) A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren, R. W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 811–813; b) A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, *63*, 207–213; c) C. Griesinger, R. R. Ernst, *ibid.* **1987**, *75*, 261–271.
- [4] D. Canet, G. C. Levy, I. R. Peat, *J. Magn. Reson.* **1975**, *18*, 199–204.
- [5] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH, New York, **1989**.
- [6] J. Bremer, G. L. Mendz, W. J. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4691–4696.
- [7] a) H. L. Eaton, N. H. Andersen, *J. Magn. Reson.* **1987**, *74*, 212–225; b) N. H. Andersen, H. L. Eaton, X. Lai, *Magn. Reson. Chem.* **1989**, *27*, 515–528.
- [8] a) R. Boelens, T. M. G. Koning, R. Kaptein, *J. Mol. Struct.* **1988**, *173*, 299–311; b) R. Boelens, T. M. G. Koning, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, R. Kaptein, *J. Magn. Reson.* **1989**, *82*, 290–308.
- [9] M. Köck, C. Griesinger, Vortrag beim 5th Chianti Workshop on Magnetic Resonance, 1993, Pisa, Italien; eine Veröffentlichung ist in Vorbereitung.
- [10] M. Reggelin, H. Hoffmann, M. Köck, D. F. Mierke, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3272–3277.
- [11] Die Spektren wurden mit 16 Scans und 384 reellen Punkten in  $t_1$  (TPPI) und 4 K Punkten in  $t_2$  mit einer spektralen Breite von 3846.15 Hz aufgenommen und auf  $1\text{ K} \times 2\text{ K}$  Punkte prozessiert. Vor der Fourier-Transformation wurde eine Apodisierung mit einer quadrierten Cosinusfunktion, nach ihr eine Basislinienkorrektur mit einem Polynom 5. Grades durchgeführt.

## Selektive Messung der Zeitabhängigkeit des transienten Overhauser-Effekts in NMR-Spektren; Anwendung auf Oligonucleotide\*\*

Sébastien J. F. Vincent, Catherine Zwahlen und Geoffrey Bodenhausen\*

Seit Anil Kumar, Wagner, Ernst und Wüthrich<sup>[1]</sup> mit zweidimensionalen NOESY-Spektren<sup>[2]</sup> Kreuzpeakamplituden  $a_{AX}$  als Funktion der Mischzeit  $\tau_m$  bestimmt haben, ist bekannt, daß Kreuzrelaxation in Makromolekülen irreführend sein kann und daß die korrekte Interpretation von NOESY-Spektren Spindiffusionseffekte berücksichtigen muß<sup>[3–6]</sup>. Spindiffusion kann bei sehr kurzen Mischzeiten  $\tau_m$  vermieden werden, aber in diesem Fall sind die weitreichenden Overhauser-Effekte, die von entscheidender Bedeutung sind, um Strukturinformationen abzuleiten, zu schwach, um beobachtet zu werden. Wählt man längere Mischzeiten, um schwächere Wechselwirkungen zu erkennen, so werden die stärksten Dipol-Dipol-Kopplungen so dominant, daß die Magnetisierung sofort zwischen den nächsten Nachbarn durch Spindiffusion übertragen wird. Eine korrekte Interpretation ist nur möglich, wenn man den Gesamteffekt aller Kreuzrelaxationsgeschwindigkeiten  $\sigma_{ij}$  in Betracht zieht, so daß alle direkten und indirekten Transfers der longitudinalen Magnetisierung angemessen berücksichtigt werden. Diese Beschreibung ist als Methode der vollen Relaxationsmatrix bekannt geworden<sup>[7]</sup>. Obwohl einige Autoren<sup>[8–10]</sup> glauben, daß ein einziges NOESY-Spektrum von hoher Qualität, das mit einer passend ausgesuchten Mischzeit erhalten wurde, ausreicht, scheint die Mehrheit der Forscher überzeugt, daß nur die Aufnahme umfassender Aufbauplots sinnvolle Vergleiche zwischen Molekülmodellen und Experimenten ermöglicht. Kürzlich wurde gezeigt, daß durch die „Linear-prediction“-Methode und die Einzelwertzerlegung<sup>[11]</sup> eine Aufbaukurve, die einem

[\*] Prof. Dr. G. Bodenhausen, S. J. F. Vincent, C. Zwahlen  
Section de Chimie, Université de Lausanne  
Rue de la Barre 2, CH-1005 Lausanne (Schweiz)  
Telefax: Int. + 21/316-3728

[\*\*] Wir danken Dr. Philip Bolton (Wesleyan, Connecticut) und Dr. Jane Withka (Pfizer, New London, Connecticut) für eine DNA-Probe, anregende Diskussionen und Berechnungen. Diese Arbeit wurde vom Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) und von der Commission pour L'Encouragement de la Recherche Scientifique (CERS) gefördert.

einigen Kreuzpeak entspricht, analysiert und die Einhüllende in ihre exponentiellen Komponenten zerlegt werden kann<sup>[12]</sup>. Diese vielversprechende Methode erfordert ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis und eine große Zahl von  $\tau_m$ -Inkrementen. Leider sind umfangreiche zweidimensionale NOESY-Experimente sehr zeitintensiv und stellen strenge Anforderungen an die Stabilität sowohl der Probe als auch des Geräts. Es gibt außerdem die Tendenz, die Aufgabe, eine Vielzahl von Aufbaukurven aufzunehmen, zu meiden, da mehrere Arten der 3D-Spektroskopie<sup>[13]</sup> attraktiver erscheinen. Deshalb schlagen wir eindimensionale Methoden vor, die die Informationen ergänzen, die aus zweidimensionalen NOESY-Spektren erhalten wurden und einen Einblick in das Verhalten der Aufbaukurven einiger weniger, strategisch ausgewählter Kreuzpeaks geben.

Abbildung 1 zeigt die Pulssequenz eines eindimensionalen Experiments, die für eine selektive Messung der Zeitabhängigkeit transients Overhauser-Effekte bestimmt ist und die zur selektiven Messung des Abfalls der longitudinalen Magnetisierung (siehe später) angepaßt werden kann. Die Pulssequenz be-

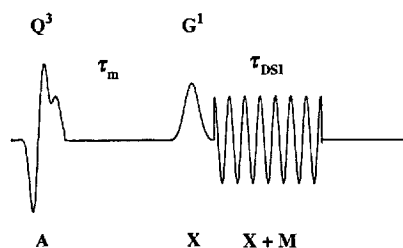


Abb. 1. Sequenz für die selektive Messung des Aufbaus transienter Overhauser-Effekte. Für Einzelheiten siehe Text. Die Methode kann leicht zur Messung der  $\tau_m$ -Abhängigkeit der Amplitude  $a_{AA}$  eines Diagonalpeaks angepaßt werden, indem man den  $G^1$ -Puls auf A wirken läßt und den Magnetisierungstransfer von A auf M' mit  $\tau_{DSI} \approx 1/J_{AM'}$  bewirkt.

ginnt mit einer selektiven Inversion der longitudinalen Magnetisierung eines ausgewählten Ausgangsspins A, d.h.  $\langle I_z^A \rangle \rightarrow \langle -I_z^A \rangle$ , indem eine Gaußsche  $Q^3$ -Kaskade<sup>[14]</sup> auf die chemische Verschiebung  $\Omega_A$  des Spins A angewendet wird. Die longitudinale Magnetisierung von A (genauer, die Abweichung vom thermischen Gleichgewicht) darf im Intervall  $\tau_m$  durch Kreuzrelaxation frei im System wandern. Das Kreuzrelaxationsverhalten in unserem Experiment ist *genau dasselbe* wie im NOESY-Experiment<sup>[12]</sup>. Ein Teil der Magnetisierung wandert vom Ausgangsspin A zu einem Zielspin X, d.h.  $\langle I_z^A \rangle^{2\pi\tau_m} \rightarrow \langle I_z^X \rangle$ . Im Prinzip, d.h. wenn es keine Überlappung zwischen Kreuzpeaks im NOESY-Spektrum gibt, sollte es möglich sein, die Magnetisierung des X-Spins direkt zu beobachten. In der Praxis wird dies jedoch durch die Grenzen in der Genauigkeit der Differenzspektroskopie erschwert.

Deshalb weichen wir auf ein komplizierteres Schema aus, das insofern mit der 3D-Spektroskopie verwandt ist, als es zwei aufeinanderfolgende Mischvorgänge gibt. Am Ende der Mischperiode wird die longitudinale Komponente  $\langle I_z^X \rangle$  des Zielspins X mit einem selektiven  $270^\circ$ -Gauß- $G^1$ -Puls<sup>[15]</sup> in  $\langle I_z^M \rangle$  umgewandelt und dann auf einen skalar gekoppelten „Spionkern“ M übertragen, d.h.  $\langle I_z^X \rangle \rightarrow \langle I_z^M \rangle$ . Dieser Transfer kann durch einen doppelt selektiven, homonuclearen Hartmann-Hahn-Effekt<sup>[16]</sup> während einer Einstrahlung,  $\tau_{DSI}$  (DSI = doubly selective irradiation), erreicht werden. Die Amplitudenmodulation des Radiofrequenzfeldes, die für den Magnetisierungstransfer benötigt wird, kann leicht verwirklicht werden<sup>[17]</sup>, und die Dauer der Doppeleinstrahlung kann empirisch im Bereich von  $\tau_{DSI} \approx 1/J_{MX}$  optimiert werden (kleinere  $\tau_{DSI}$ -Werte sind ratsam, wenn die Re-

laxation schnell ist). Wenn der Transfer nicht mit 100% Effizienz abläuft, wirkt sich dies nur auf die Empfindlichkeit des Experiments, nicht aber auf die Genauigkeit der Aufbau- und Abfallkurven aus. Es werden zwei Experimente durchgeführt, eines mit und eines ohne den Inversionspuls zu Beginn, und das Differenzspektrum berechnet. Für größere  $\tau_m$ -Werte gehen die Signalintensitäten daher wie bei NOESY gegen Null, während sie beim Inversion-Recovery-Experiment<sup>[18]</sup> asymptotisch einen nicht verschwindenden Gleichgewichtswert erreichen. Anders als bei der gewöhnlichen NOESY-Technik treten bei dieser Methode weder Artefakte auf, die auf Nullquantenkohärenzen ( $J$ -Kreuzpeaks)<sup>[19]</sup> zurückzuführen sind, noch kann sie durch longitudinale Zwei-Spin-Ordnung<sup>[20]</sup> beeinflusst werden.

In vielen Arbeiten über Austausch- und Relaxationseffekte in der multidimensionalen NMR-Spektroskopie wurde betont, daß es nützlich sein könnte, die Amplituden der Diagonalpeaks aufzuzeichnen<sup>[5, 9, 21]</sup>. Insbesondere Mirau<sup>[9]</sup> hat darauf hingewiesen, daß die Amplituden aller Kreuzpeaks in einem Spektrum normiert werden könnten, wenn der Amplitudenabfall eines oder einiger Diagonalpeaks genau gemessen werden könnte. Leider ist es in den meisten NOESY- und anderen 2D-Spektren schwierig, Amplituden von teilweise überlappenden Diagonalpeaks quantitativ zu messen<sup>[22]</sup>. Obwohl die 3D-Spektroskopie<sup>[13]</sup> im Prinzip hilfreich sein kann, führt dort die begrenzte digitale Auflösung dazu, daß die Integration der Peakvolumina unzuverlässig wird. Unsere 1D-Techniken können helfen, diese Einschränkung zu überwinden. Es genügt, am Ende des  $\tau_m$ -Intervalls den  $270^\circ$ -Gauß- $G^1$ -Puls auf den Spin A anzuwenden und dann die A-Magnetisierung auf einen Spionspin M' durch eine skalare Kopplung  $J_{AM'}$  zu übertragen, d.h.  $\langle I_z^A \rangle \rightarrow \langle I_z^{M'} \rangle$ . Ein Differenzspektrum wird wieder durch die Subtraktion eines Spektrums, das ohne Inversionspuls aufgenommen wurde, erhalten.

Wir haben unsere Methode an Oligonucleotiden geprüft, weil diese Systeme für starke Spindiffusionseffekte bekannt sind<sup>[4]</sup> und Aufbaukurven deshalb von besonderem Interesse sind<sup>[23]</sup>. Hier berichten wir über Messungen an dem Cytosin-9-Rest 1 im Dimer des selbstkomplementären DNA-Dodecamers d(CGCGAATTCGCG). Dieses System, das oft als Dickersons Dodecamer bezeichnet wird, war Gegenstand umfassender Röntgenbeugungs-<sup>[24]</sup>, NMR-<sup>[25, 26]</sup> und Moleküldynamik-Studien<sup>[10, 26–28]</sup>.

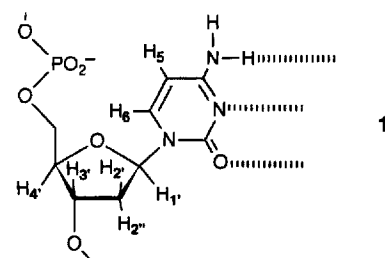


Abbildung 2 zeigt Aufbauplots für ausgewählte Protonenpaare von 1. Dabei dienten nacheinander C9-H1' und C9-H3' des Desoxyribose-Rings sowie C9-H5 des Pyrimidinrings als Ausgangsspins, während der Zielspin der Kreuzrelaxation immer C9-H6 des Pyrimidinrings war. Die Magnetisierung von C9-H6 wurde zur Beobachtung durch einen doppelt selektiven, homonuclearen Hartmann-Hahn-Transfer auf C9-H5 übertragen, das somit als Spionspin fungierte. Dieses Verfahren kann nur bei Cytosin angewendet werden, das zwei skalar gekoppelte aroma-

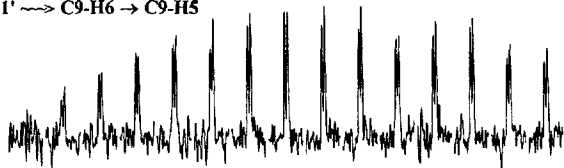
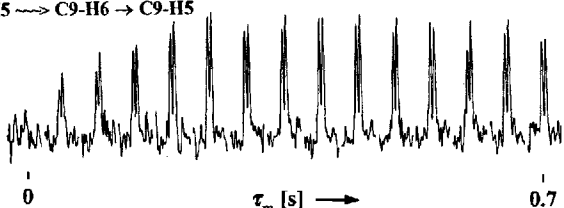
C9-H1'  $\rightarrow$  C9-H6  $\rightarrow$  C9-H5C9-H3'  $\rightarrow$  C9-H6  $\rightarrow$  C9-H5C9-H5  $\rightarrow$  C9-H6  $\rightarrow$  C9-H5

Abb. 2. Aufbauplots für NOEs in  $d(CGCGAATTCGCG)_2$ , gelöst in  $D_2O$ , bei  $pH = 7.0$  und  $T = 303\text{ K}$ ;  $3\text{ mM } d(CGCGAATTCGCG)$ ,  $100\text{ mM}$  Natriumchlorid und  $10\text{ mM}$  Posphatpuffer;  $\tau_{DSI} = 131.7\text{ ms}$ . Die Mischzeit  $\tau_m$  wurde in  $50\text{ ms}$ -Schritten von  $0$  auf  $0.7\text{ s}$  erhöht. Die Experimente wurden mit einem Bruker-MSL-300-Spektrometer durchgeführt, das mit einer Einheit zur selektiven Anregung von Oxford Research Systems ausgerüstet war. Für weitere Einzelheiten siehe Text.

tische Protonen enthält. Purin- und Thyminreste mit nur einem aromatischen Proton können nicht auf die gleiche Art behandelt werden. In diesen Fällen kann jedoch die gleiche Information durch die Beobachtung der Kreuzrelaxation (NOE) in umgekehrter Richtung erhalten werden, d.h. von der aromatischen Base auf die Desoxyribose.

Es ist bekannt, daß symmetrieäquivalente Kreuzpeaks in NOESY-Spektren gleiche Amplituden haben sollten<sup>[29]</sup>. Diese Regel gilt für zweidimensionale Experimente, die mit einem nichtselektiven Anregungspuls beginnen und eine Mischperiode enthalten, die symmetrisch bezüglich einer Zeit- und Phasenumkehr ist. Auf den ersten Blick könnte man meinen, daß unsere selektiven 1D-Experimente, die im Zeitbereich inhärent asymmetrisch sind, nicht notwendigerweise dieser Symmetrieregeln folgen. Tatsächlich bleibt die Symmetrie jedoch erhalten, weil die physikalischen Prozesse, die während der Mischzeit ablaufen, die gleichen sind wie in herkömmlichen NOESY-Experimenten. Abbildung 3 zeigt zwei Aufbaukurven, hervorgerufen durch Kreuzrelaxation zwischen C9-H2' und C9-H6 von 1, die

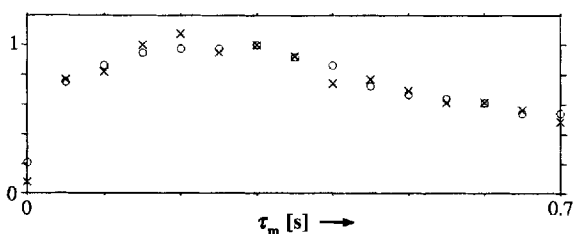


Abb. 3. Selektive Messung symmetrieäquivalenter transienter Overhauser-Effekte zwischen den Protonen C9-H6 und C9-H2' im Duplex  $d(CGCGAATTCGCG)_2$ . Kreise: NOE von C9-H2' auf C9-H6 mit Magnetisierungstransfer auf C9-H5 ( $\tau_{DSI} = 131.7\text{ ms}$ ). Kreuze: NOE von C9-H6 auf C9-H2' mit Magnetisierungstransfer auf C9-H1' ( $\tau_{DSI} = 64.8\text{ ms}$ ). Die zwei Reihen von Experimenten ergaben nach der Normierung der vertikalen Skala ( $I_{ei} = 1$  für  $\tau_m = 300\text{ ms}$ ) ähnliche Aufbaukurven. Alle experimentellen Parameter waren wie bei Abbildung 2 angegeben.

Transfers in entgegengesetzter Richtung entsprechen. Da wir zwei verschiedene Protonen mit unterschiedlichen Multipllettstrukturen beobachteten und da die Hartmann-Hahn-Transfers unterschiedlich effizient sein könnten, wurden die vertikalen Skalen der beiden Aufbaukurven normiert, um die Ähnlichkeit der symmetrieäquivalenten Kreuzrelaxationsvorgänge zu belegen.

Es ist auch möglich, NOEs zwischen Protonen des gleichen Zuckerrests zu messen. Abbildung 4 zeigt einen Aufbauplot, der Kreuzrelaxationsvorgänge zwischen zwei geminalen Protonen des Desoxyribosering von 1 offenbart. C9-H2' spielte die Rolle des Ausgangsspins, C9-H2' war der Zielspin und C9-H1' der Spionspin. Der Erfolg dieser Verfahren hängt vom Unterschied

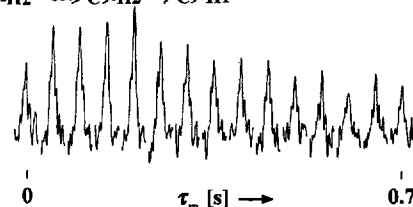
C9-H2'  $\rightarrow$  C9-H2'  $\rightarrow$  C9-H1'

Abb. 4. Selektive Messung eines transienten Overhauser-Effekts ähnlich wie in Abbildung 2. Der Spin des Ausgangsprotons C9-H2' von 1 wurde selektiv invertiert und der NOE am benachbarten Zielproton C9-H2' durch Magnetisierungstransfer auf den Spionspin C9-H1' ( $\tau_{DSI} = 64.8\text{ ms}$ ) verfolgt. Alle anderen Parameter waren wie bei Abbildung 2 angegeben.

in den chemischen Verschiebungen der untersuchten Protonen ab. Schließt man Beinahe-Entartung aus, so ist es nicht besonders schwierig, Protonen des gleichen Desoxyribosering zu verwenden. Abbildung 5 zeigt zwei Beispiele von „Diagonalpeak-Messungen“ am Duplex  $d(CGCGAATTCGCG)_2$ , die mit der zuvor beschriebenen modifizierten Pulssequenz gemäß Abbildung 1 durchgeführt wurden. Die Magnetisierung wurde in Abbildung 5a vom aromatischen Proton C9-H6 auf C9-H5 und in Abbildung 5b vom Desoxyribose-Proton C9-H2' auf C9-H1' übertragen.

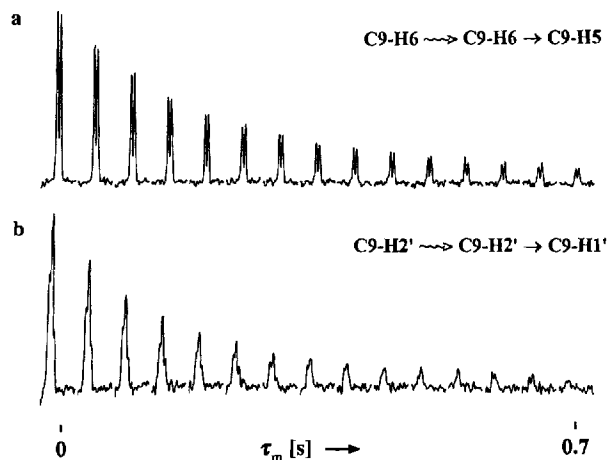


Abb. 5. Selektive Messung der  $\tau_m$ -Abhängigkeit der Diagonalpeak-Intensität von a) C9-H6 und b) C9-H2' im Duplex  $d(CGCGAATTCGCG)_2$ . Die Magnetisierung wurde zur Beobachtung in a) von C9-H6 auf C9-H5 ( $\tau_{DSI} = 131.7\text{ ms}$ ) und in b) von C9-H2' auf C9-H1' ( $\tau_{DSI} = 64.8\text{ ms}$ ) übertragen. Alle anderen Parameter waren wie bei Abbildung 2 angegeben.

Die Amplituden von Aufbauplots wie denen in Abbildung 2 können direkt mit den Aussagen aus Moleküldynamik(MD)-Si-

mulationen von Withka et al.<sup>[28]</sup> verglichen werden. Anhand der fünf Aufbaukurven in Abbildung 6a konnten wir die Güte der sechs vorgeschlagenen Modelle<sup>[28]</sup> beurteilen. Die „elektrostatische Simulation“, die auf der Standardfunktion für die potentielle Energie in GROMOS86<sup>[30]</sup> basiert, ist nicht zufriedenstellend. Eine viel bessere Übereinstimmung wird erreicht, wenn harmonische Zwänge für die Wasserstoffbrücken, die an der Watson-Crick-Paarung beteiligt sind, eingeführt werden<sup>[28]</sup>. Die Annahme isotropen Taumelns mit einer einzigen Korrelationszeit  $\tau_c = 6$  ns kann auf der Basis unserer Experimente ebenfalls verworfen werden. Es bleibt jedoch schwierig, zwischen den zwei Withka-Modellen zu unterscheiden, die beide die Gesamtbewegung als anisotrop betrachten, aber einmal interne Bewegungen ausschließen und einmal zulassen. Die Aufbaukurven zum kompliziertesten Modell von Withka et al.<sup>[28]</sup> sind in Abbildung 6b wiedergegeben. Verglichen mit unseren experimentellen Befunden (Abb. 6a) bleibt eine signifikante Abweichung für den Transfer  $C9-H1' \rightsquigarrow C9-H6$ , der als annähernd so schwach wie der Transfer  $C9-H3' \rightsquigarrow C9-H6$  vorhergesagt wurde, in unseren Experimenten aber viel stärker war.

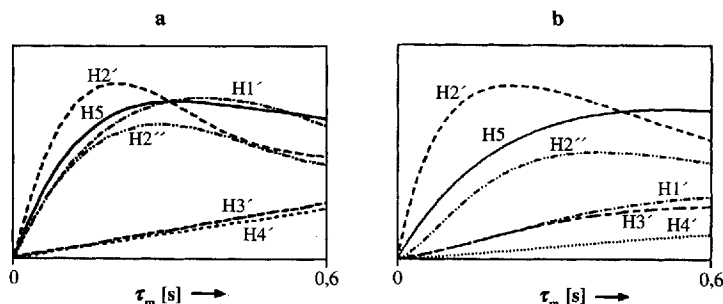


Abb. 6. a) Selektive Messung der Aufbaukurven für die NOEs im Duplex  $d(CGCGAATTCGCG)_2$ , an denen C9-H6 von 1 als Zielspin beteiligt ist. Die Ausgangsspins C9-H1', C9-H2', C9-H2'', C9-H3' und C9-H5 von 1 wurden selektiv nacheinander invertiert; experimentelle Bedingungen wie bei Abbildung 2 angegeben. b) Entsprechende theoretische Kurven aus der Arbeit von Withka et al. [28], die mit dem kompliziertesten MD-Modell, das Anisotropie der Gesamtbewegung und interne Bewegungen, wie im Text beschrieben, berücksichtigt, erhalten wurden.

Wie mit dem letzten Beispiel in Abbildung 2 gezeigt wurde, ist es möglich, Experimente durchzuführen, in denen die Ausgangs- und Spionspins identisch sind. Auf den ersten Blick scheint dies paradox, aber dank der Möglichkeit, Differenzspektroskopie und Phasenalternierung zu kombinieren, liegt doch kein Widerspruch in dieser Doppelfunktion. Das Fehlen von Nullquantenkohärenzen ermöglicht es, nominelle  $\tau_m$ -Werte von Null zu verwenden. Wenn jedoch die Kreuzrelaxation sehr schnell ist (wie zwischen den Abbildung 4 zugrundeliegenden Protonen) und wenn das Spektrum so überfüllt ist, daß der Inversionspuls ziemlich lang sein muß, um selektiv genug zu sein, wird Kreuzrelaxation zum Teil während dieses Inversionspulses einsetzen. In diesem Fall beobachtet man ein nicht verschwindendes Signal bei  $\tau_m = 0$ . Um sicher zu sein, daß sich sogar die schwächsten Overhauser-Effekte vom Grundrauschen abheben, wurden alle dargestellten Signale mit 512 Transienten im Abstand von 1.5 s erhalten, so daß jedes Multipllett 13 Minuten beanspruchte und jede der vollständigen Aufbaukurven, die im Bereich von  $\tau_m = 0$  bis 0.7 s aus 15 Inkrementen bestanden, 3.2 Stunden erforderte. Um ähnliche Informationen aus herkömmlichen zweidimensionalen Austausch-NOESY-Spektren zu extrahieren, müßte man 15 hochauflösende NOESY-Spektren aufnehmen und dabei Vorkehrungen zur Unterdrückung von  $J$ -Kreuzpeaks treffen, was ungefähr eine Woche

Spektrometerzeit beanspruchte. In der gleichen Zeit könnte man mehr als 50 Aufbaukurven des in Abbildung 3 gezeigten Typs aufnehmen. Natürlich sind unsere eindimensionalen Methoden vom Wesen her selektiv und liefern nur Informationen über die Wechselwirkung zwischen einem einzigen Protonenpaar, während ein Satz von NOESY-Spektren Informationen über alle Paare liefert. Doch wir glauben, daß einige geschickt ausgewählte Signalaare genügend Material liefern, um wesentliche Vorhersagen aus MD-Rechnungen zu überprüfen<sup>[10, 26–28]</sup>.

Die in dieser Veröffentlichung vorgestellten Techniken ermöglichen die Messung von Aufbau- und Abfallkurven, die ausgewählten Peaks in NOESY-Spektren entsprechen. Sie können dazu dienen, die Ergebnisse von Standard-2D-NOESY-Experimenten zu verfeinern. Ihr Auflösungsvermögen ist dem dreidimensionalen Methoden ähnlich. Mit ihnen kann der Aufbau von Overhauser-Effekten unter Bedingungen verfolgt werden, die mit denen von 2D-NOESY-Experimenten identisch sind, nur daß keine  $J$ -Kreuzpeaks und keine longitudinale Zwei-Spin-Ordnung stören. Im allgemeinen kann man die Kerne beliebig auswählen, solange man darauf achtet, daß die Kopplung  $J_{MX}$  zwischen dem Zielspin X und dem Spionspin M nicht Null ist und daß die beiden Spins nichtentartete chemische Verschiebungen haben. Die Schnelligkeit, mit der die Amplituden individueller Kreuzpeaks in einem NOESY-Übersichtsspektrum quantifiziert werden können, regte uns an, unser Experiment „quantitative unravelling of intensities for corroborating knowledge in nuclear Overhauser effect spectroscopy (QUICK-NOESY)“ zu nennen. Das Experiment ist sowohl auf Proteine und andere makromolekulare Systeme, inklusive Protein/DNA-Komplexe, wie auch auf kleine Moleküle, entweder isoliert oder an große Rezeptoren gebunden, anwendbar.

Eingegangen am 13. August,  
veränderte Fassung am 11. Oktober 1993 [Z 6280]

- [1] Anil Kumar, G. Wagner, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3654.
- [2] Anil Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1; S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1980**, *41*, 95; K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, Chichester, **1986**; D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH, Weinheim, **1989**.
- [3] A. Kalk, H. J. C. Berendsen, *J. Magn. Reson.* **1976**, *24*, 343; E. T. Olejniczak, R. T. Gampe, Jr., S. W. Fesik, *ibid.* **1986**, *67*, 28; A. N. Lane, *ibid.* **1988**, *78*, 425.
- [4] W. Masselink, Jr., A. G. Redfield, *J. Magn. Reson.* **1988**, *78*, 150.
- [5] J. W. Keepers, T. L. James, *J. Magn. Reson.* **1984**, *57*, 404.
- [6] S. G. Hyberts, G. Wagner, *J. Magn. Reson.* **1989**, *81*, 418; J. D. Baleja, J. Moul, B. D. Sykes, *ibid.* **1990**, *87*, 375.
- [7] B. A. Borgias, M. Gochin, D. J. Kerwood, T. L. James, *J. Magn. Reson.* **1986**, *67*, 28; R. Boelens, T. M. G. Koning, R. Kaptein, *J. Mol. Struct.* **1988**, *173*, 299; B. A. Borgias, T. L. James, *J. Magn. Reson.* **1988**, *79*, 493; R. Boelens, T. M. G. Koning, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, R. Kaptein, *ibid.* **1989**, *82*, 290; B. A. Borgias, M. Gochin, D. J. Kerwood, T. L. James, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1990**, *22*, 83.
- [8] J. E. Mertz, P. Güntert, K. Wüthrich, W. Braun, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 257.
- [9] P. A. Mirau, *J. Magn. Reson.* **1988**, *80*, 439.
- [10] K. Kaluarachchi, R. P. Meadows, D. G. Gorentein, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8785.
- [11] H. Barkhuijsen, R. de Beer, W. M. M. J. Bovée, D. van Ormondt, *J. Magn. Reson.* **1985**, *61*, 465.
- [12] T. E. Malliavin, M. A. Delsuc, J. Y. Lallemand, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 349; C. Reisdorf, T. E. Malliavin, M. A. Delsuc, *Biochimie* **1990**, *87*, 375.
- [13] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7227; S. W. Fesik, E. R. P. Zuiderweg, *J. Magn. Reson.* **1988**, *78*, 588; G. W. Vuister, P. de Waard, R. Boelens, J. F. G. Vliegthart, R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 772; D. Marion, L. E. Kay, S. W. Sparks, D. A. Torchia, A. Bax, *ibid.* **1989**, *111*, 1515.
- [14] L. Emsley, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **1992**, *97*, 135.
- [15] L. Emsley, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **1989**, *82*, 211.
- [16] R. Konrat, I. Burghardt, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9135;

- C. Zwahlen, S. J. F. Vincent, G. Bodenhausen, *Proc. Int. Sch. Phys. Enrico Fermi* **1993**, im Druck.
- [17] L. Emsley, I. Burghardt, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **1990**, *90*, 214; Berichtigung: *ibid.* **1991**, *94*, 448.
- [18] B. Boulat, R. Konrat, I. Burghardt, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5412; B. Boulat, G. Bodenhausen, *J. Biomol. NMR* **1993**, *3*, 335.
- [19] S. Macura, Y. Huang, D. Suter, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1981**, *43*, 259.
- [20] G. Bodenhausen, G. Wagner, M. Rance, O. W. Sørensen, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1984**, *59*, 542.
- [21] C. L. Perrin, R. K. Gipe, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4036.
- [22] H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* **1986**, *70*, 106.
- [23] C. Zwahlen, S. J. F. Vincent, L. Di Bari, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.*, im Druck.
- [24] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 2179; P. E. Pjura, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.* **1987**, *197*, 257; M. Teng, N. Usman, C. A. Frederick, A. H.-J. Wang, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 2671.
- [25] D. J. Patel, A. Pardi, K. Itakura, *Science* **1982**, *216*, 581; D. R. Hare, D. E. Wemmer, S.-H. Chou, G. P. Drobny, B. R. Reid, *J. Mol. Biol.* **1983**, *171*, 319; J. M. Withka, S. Swaminathan, J. Srinivasan, D. L. Beveridge, P. H. Bolton, *Science* **1992**, *255*, 597.
- [26] W. Nerdal, D. R. Hare, B. R. Reid, *Biochemistry* **1989**, *28*, 10008; J. A. Parkinson, J. Barber, B. A. Buckingham, K. T. Douglas, G. A. Morris, *Magn. Reson. Chem.* **1992**, *30*, 1064.
- [27] G. Ravishankar, S. Swaminathan, D. L. Beveridge, R. Lavery, H. Sklenar, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *6*, 669; J. Srinivasan, J. M. Withka, D. L. Beveridge, *Biophys. J.* **1990**, *58*, 533; S. Swaminathan, G. Ravishankar, D. L. Beveridge, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5027.
- [28] J. M. Withka, S. Swaminathan, D. L. Beveridge, P. H. Bolton, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5041.
- [29] C. Griesinger, C. Gemperle, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1987**, *62*, 295.
- [30] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, GROMOS86: Groningen Molecular Simulation System, Universität Groningen, Niederlande, **1986**.

## Konkurrierende Bildung von C-H- und C-Si-Bindungen bei reduktiver Eliminierung: Silametallacyclen durch Metallierung von Silylliganden\*\*

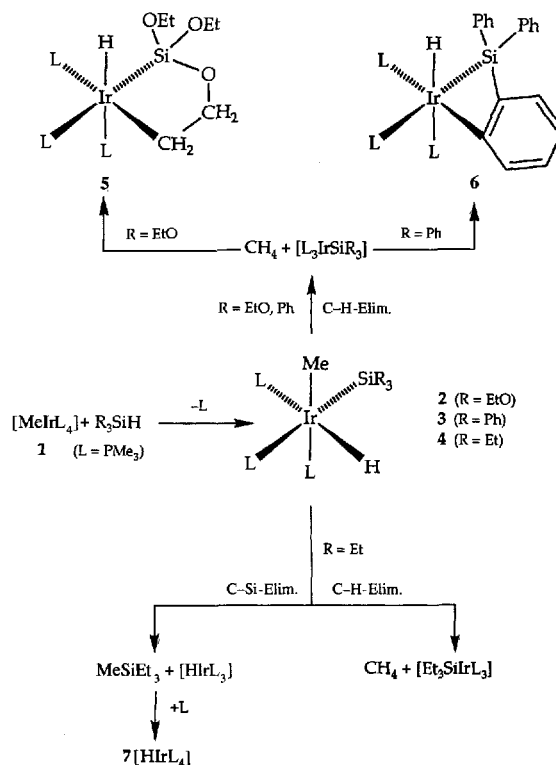
Michael Aizenberg und David Milstein\*

Bei Übergangsmetall-katalysierten Umwandlungen von Organosiliciumverbindungen<sup>[1]</sup> werden manchmal im produktbildenden Schritt C-Si- oder C-H-Bindungen geknüpft. Für die präparativ wichtige Hydrosilylierung von Alkenen beispielsweise wird oft der Chalk-Harrod-Mechanismus<sup>[2]</sup> diskutiert<sup>[1,3]</sup>, nach dem sich die Produkte durch reduktive C-Si-Eliminierung bilden sollen. Ein alternativer Mechanismus, der auf Wrighton zurückgeht<sup>[4]</sup>, beinhaltet die Wanderung von Silylgruppen zum koordinierten Alken und Freisetzung des Produkts durch reduktive C-H-Eliminierung. Ein Katalysezyklus für die Rh-katalysierte Hydrosilylierung von Olefinen, an dem Intermediate mit zwei koordinierten Si-Einheiten beteiligt sind, wurde kürzlich von Perutz et al.<sup>[5]</sup> vorgeschlagen. Dieser beinhaltet ebenfalls eine C-H-Eliminierung, die gegenüber einer C-Si-Eliminierung bevorzugt sein soll. Beispiele für die Bildung von C-H-Bindungen

durch reduktive Eliminierung gibt es viele<sup>[6]</sup>, sehr selten sind dagegen Beispiele für die Bildung von C-Si-Bindungen über den gleichen Weg<sup>[7-11]</sup>. Von besonderem Interesse hierbei ist die Frage der Konkurrenz von C-H- und C-Si-Eliminierung. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Entstehung von Methan bei der Reaktion von  $[\text{MeCo}(\text{CO})_4]$  mit  $\text{Me}_3\text{SiH}$ <sup>[4]</sup> und bei der Reaktion von  $[\text{MeRh}(\text{PMe})_3,4]$  mit  $\text{HSiPh}_3$ <sup>[8]</sup>, obwohl die bei einer oxidativen Addition zu erwartenden Intermediate nicht beobachtet werden konnten und die relative Anordnung der Hydrido-, Methyl- und Silylliganden in diesen Komplexen nicht bekannt ist. Umsetzungen von  $[\text{MPhCl}(\text{CO})(\text{PPh}_3)_2]$  (M = Ru, Os) mit Silanen ergeben Benzol<sup>[12]</sup>; auch in diesen Fällen konnten keine Intermediate detektiert werden.

Wir berichten nun erstmals über die Reaktivität vollständig charakterisierter Komplexe mit der zur Untersuchung konkurrierender Reaktionswege notwendigen all-*cis*-Anordnung der Hydrido-, Silyl- und Methylgruppen. Je nach den elektronischen Eigenschaften des Silylliganden können die reduktive C-Si- und die reduktive C-H-Eliminierung miteinander in Konkurrenz treten. Wir fanden auch seltene Beispiele für Metallierungen von Silylliganden, darunter die Metallierung von  $\text{sp}^3$ -C-H-Bindungen.

Die facialis Hydrido-Methyl-Silyl-Iridiumkomplexe **2–4**<sup>[13]</sup> entstehen glatt, wenn man bei 25 °C ein Äquivalent des entsprechenden Silans zu einer Lösung von  $[\text{MeIr}(\text{PMe}_3)_4]$  **1**<sup>[14]</sup> in Benzol gibt (Schema 1); dabei können Ausbeuten von über 90% erzielt werden. Bei Raumtemperatur sind diese Komplexe stabil,



Schema 1.

wenn man sie jedoch im geschlossenen Gefäß einen Tag lang in  $\text{C}_6\text{D}_6$  auf 100 °C erhitzt, findet quantitative Eliminierung statt. Die Komplexe **2** und **3** gehen dabei ausschließlich eine reduktive C-H-Eliminierung ein, und es bildet sich quantitativ Methan, wie  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch und gaschromatographisch gezeigt werden kann. Bei den gebildeten Iridium(I)-Komplexen, die nicht beobachtet werden konnten, treten dabei unge-

[\*] Prof. Dr. D. Milstein, Dr. M. Aizenberg  
Department of Organic Chemistry  
The Weizmann Institute for Science  
Rehovot 76100 (Israel)  
Telefax: Int. + 8/344-142

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Basic Research Foundation, verwaltet von der Israel Academy of Sciences and Humanities, gefördert. Wir danken Dr. S. Cohen, Hebrew University (Jerusalem), für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse.