

die Regioselektivität auswirkt. Die Erfahrung, daß $\text{NaCH}(\text{CO}_2\text{Me})_2$ vor dem Substrat zugegeben werden sollte, wurde auch mit $\text{W}(\text{bpy})$ -Katalysatoren gemacht (Lit.[5b]).

[9] $[\text{W}(\text{CO})_3(\text{CH}_3\text{CN})_3]$ reagiert mit **2a** (laut ^1H - und ^{31}P -NMR-Spektrum, in $[\text{D}_6]\text{THF}$) zu einem Gemisch von **1c**, **1d** und $[(\text{2a})_2\text{W}(\text{CO})_3]$, dessen Zusammensetzung vom Verhältnis der Edukte abhängt (Lit.[6]). **1d** zeigt keine katalytische Aktivität.

[10] Die Substrate **5a–e** wurden aus den entsprechenden aromatischen Aldehyden hergestellt: 1) $\text{CH}_2=\text{CHMgCl}$, THF, 25°C , 60–83%; 2) Ac_2O , Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , 25°C , 86–96%; 3) $[\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2]$ (1 Mol-%), THF, 25°C , 68–97%; 4) MeOH , K_2CO_3 (kat), 25°C , 47–81%; 5) $(\text{EtO})_2\text{POCl}$, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, DMAP, CH_2Cl_2 , 25°C , 50–80%.

[11] P. von Matt, Dissertation, Universität Basel, 1993.

[12] D. P. Tate, W. R. Knipple, J. M. Augl, *Inorg. Chem.* **1962**, *1*, 433.

Modifizierte Tripelresonanz-NMR-Experimente mit erhöhter Empfindlichkeit für schnell austauschende Protonen**

Wolfgang Jahnke und Horst Kessler*

Die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie hat sich zur führenden Methode entwickelt, um Molekülstrukturen in Lösung hochaufgelöst zu bestimmen. Bei der Entwicklung neuer Pulssequenzen muß besonders auf eine hohe Empfindlichkeit der NMR-Experimente geachtet werden^[1]. Die schwächsten Signale in einem NMR-Spektrum stammen häufig von Amidprotonen, die schnell mit Protonen des Lösungsmittels Wasser austauschen, und oft sind bei der Untersuchung von Proteinen gerade diese schwachen Signale der Engpaß bei der Signalzuordnung und der Strukturaufklärung. Die Signale solcher schnell austauschender Amidprotonen können verstärkt werden, wenn das Wassersignal während der Pulssequenz nicht gesättigt wird^[2–4]. Wir beschreiben hier eine Modifizierung von Tripelresonanzexperimenten, bei der dieses Prinzip mit einer Protonenentkopplung durch Composite-pulse-Sequenzen kombiniert wird. Solche modifizierten Pulssequenzen verstärken die sonst schwachen Signale schnell austauschender Amidprotonen bis zu 50%.

Biologische Makromoleküle wie Proteine oder Nucleinsäuren werden meist in wäßriger Lösung und unter semiphysiologischen Bedingungen, d. h. bei etwa neutralem pH, untersucht. Unter diesen Bedingungen tauschen Protonen der untersuchten Substanz (z. B. ein Protein) und des Lösungsmittels Wasser aus. Neben den Protonen ionisierbarer Gruppen in den Seitenketten tauschen Amidprotonen des Proteinerückgrates mit den Wasserprotonen aus, wobei die Austauschgeschwindigkeit von reziproken Millisekunden bis reziproken Monaten reicht. Der Protonenaustausch war das Thema zahlreicher Studien^[5, 6], und es ist abzusehen, daß dieses dynamische Phänomen zum besseren Verständnis der Struktur und Dynamik von Proteinen und Nucleinsäuren beitragen kann. Protonenaustausch hat jedoch auch seine schlechten Seiten. Sehr rasch austauschende Protonen, z. B. von Hydroxygruppen der Proteinseitenketten und Amidprotonen am N-Terminus eines Proteins, sind in der Regel im

Spektrum unsichtbar, und auch die Signale anderer Amidprotonen können durch Vorsättigung abgeschwächt werden.

Kürzlich wurde darauf hingewiesen^[2, 3], daß die Signale schnell austauschender Amidprotonen nicht nur durch Vorsättigung, sondern auch durch andere Methoden der Wassersignal-Unterdrückung, wie Spin-lock-Pulse^[7] oder gepulste Feldgradienten^[8], abgeschwächt werden, sofern das Wassersignal vor der Akquisition gesättigt wird. Wasserprotonen haben eine deutlich längere T_1 -Relaxationszeit (4–5 s) als Proteinprotonen. Da die Wartezeit zwischen zwei Scans auf Proteinprotonen-Relaxationszeiten optimiert ist, können die Wasserprotonen nicht annähernd zum thermischen Gleichgewicht relaxieren und verbleiben in einem semigesättigten Zustand, in dem die Magnetisierung vor dem nächsten Scan typischerweise weniger als 30% der Gleichgewichtsmagnetisierung beträgt.

Zur Lösung dieses Problems sind mehrere Methoden beschrieben worden, die eine Sättigung des Wassersignals umgehen, es aber dennoch unterdrücken. Diese Methoden verwenden selektive Pulse auf die Wasserresonanz^[2], einen verbesserten Phasencyclus für die Protonenpulse^[3, 4] oder Strahlungsdämpfung als konstruktiven Baustein der Pulssequenz^[4]. Alle Methoden führen dazu, daß die Wassermagnetisierung vor oder kurz nach der Akquisition entlang der z -Achse wieder nahe dem thermischen Gleichgewicht ist. Selektive Pulse können wegen ihres Anregungsprofils unerwünscht sein^[9], und keine der beiden anderen Methoden beschreibt die Möglichkeit, Protonen über eine Composite-pulse-Sequenz zu entkoppeln, wenn der gewünschte Kohärenztransfer auf Kohlenstoff oder Stickstoff ist. Eine solche Art der Entkopplung ist wegen des günstigeren Relaxationsverhaltens zu bevorzugen^[10]. Allerdings ist nicht sofort einsichtig, wie eine Composite-pulse-Sequenz angewendet werden kann, wenn die Wassermagnetisierung vor der Akquisition in einem definierten Zustand (d. h. auf der $+z$ -Achse) enden soll: Zum einen muß scheinbar die Entkopplungszeit ein ganzzahliges Vielfaches eines Entkopplungszyclus sein. Dies ist aber nicht praktikabel, wenn die Entkopplungszeit eine inkrementierte Wartezeit, z. B. die t_1 -Zeit, enthält. Zum anderen stören B_0 -Feldgradienten die Entkopplung und können nicht zur gleichen Zeit angewendet werden.

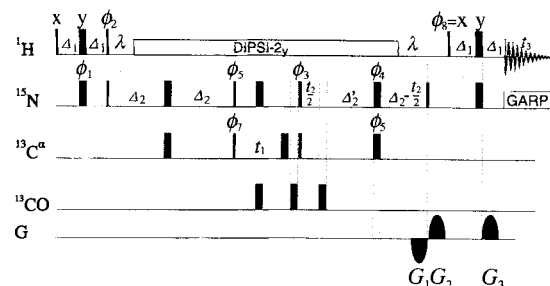
Die von uns hier vorgeschlagene Pulssequenzmodifizierung ermöglicht die Verwendung von Composite-pulse-Sequenzen beliebiger Länge, während die Empfindlichkeitssteigerung für schnell austauschende Amidprotonen beibehalten wird, weil die Wassermagnetisierung vor der Akquisition zurück ins thermische Gleichgewicht gebracht wird. Die Modifizierung wird am Beispiel des HNCA- und des HN(CO)CA-Experiments^[11, 12] in Abbildung 1 erläutert, kann aber auch auf eine Vielfalt anderer NMR-Experimente angewendet werden.

Die Pulssequenz des Constant-time(CT)-HNCA-Experiments (Abb. 1a) beginnt mit einer Anregung der Amidprotonen, deren Magnetisierung im darauffolgenden INEPT-Schritt auf ^{15}N übertragen wird. Während der Wartezeit, die zur Entwicklung der Kopplung von ^{15}N zu $^{13}\text{C}^*$ benötigt wird, refokussiert die Kopplung von ^{15}N zu ^1H und ist nach $1/2 J(\text{N}, \text{H})$, ungefähr 5.5 ms, vollständig refokussiert. Nach dieser Zeit sollte die Protonenentkopplung starten. Die Entkopplungsphase ist für die Proteinprotonen irrelevant, ist aber entscheidend, um die Wassermagnetisierung in einem definierten Zustand zu halten. Diese wurde durch den ersten 90° -Puls mit Phase x auf die $-y$ -Achse gebracht und verbleibt dort, weil ihre Resonanz der Sendefrequenz entspricht und durch die sich anschließenden Protonenpulse mit Phase y oder $-y$ nicht beeinflusst wird. Protonenentkopplung kann jetzt mit einer Entkopplungssequenz durchgeführt werden, die Pulse nur entlang einer Achse, nämlich der y -Achse, anwendet. Die DIPSI-2-Sequenz^[13] beispielsweise

[*] Prof. Dr. H. Kessler, Dipl.-Chem. W. Jahnke
Institut für Organische Chemie und Biochemie der
Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Telefax: Int. + 89/3209-3210

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie (H. K.) sowie durch ein Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes (W. J.) unterstützt. Wir danken Dr. Gerd Gemmecker für anregende Diskussionen.

a) CT-HNCA



b) CT-HN(CO)CA

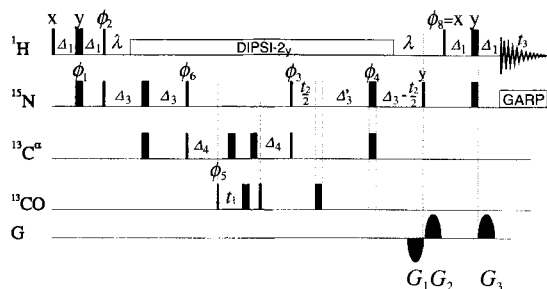


Abb. 1. Modifizierte Pulssequenzen des a) CT-HNCA- und b) CT-HN(CO)CA-Experiments. Die Stärke des B_1 -Feldes war 8.3 kHz. Dicke und dünne Balken symbolisieren 90° - bzw. 180° -Pulse. Die Pulsphasen sind: a) $\phi_1 = x, -x; \phi_2 = y, -y; \phi_3 = x; \phi_4 = 4(x), 4(y), 4(-x), 4(-y); \phi_5 = 16(x), 16(-x); \phi_6 = 2(x), 2(-x);$ Empfänger = $2(x, -x, -x, x, -x, x, x, -x), 2(-x, x, x, -x, x, -x, -x, x)$. b) $\phi_1 = x, -x; \phi_2 = y, -y; \phi_3 = x; \phi_4 = 4(x), 4(y), 4(-x), 4(-y); \phi_5 = 2(x), 2(-x); \phi_6 = y, -y; \phi_7 = 4(x), 4(y), 4(-x), 4(-y); \phi_8 = 2(x), 2(-x);$ Empfänger = $2(x), 4(-x), 2(x)$. Alle anderen Pulse haben die Phase x . Die gepulsten Feldgradienten sind sinusförmig und haben eine Dauer von 1.5 ms inklusive einer Wartezeit von 500 μ s. Ihre relative Stärke ist $G_1 = -39.6, G_2 = 39.6$ und $G_3 = 4$, wobei eine relative Stärke von 100 etwa 50 G cm^{-1} im Zentrum des Gradienten entspricht. G_2 muß für ein optimales Rephasieren der Wassermagnetisierung sorgfältig kalibriert werden. Die Wartezeiten sind: $\Delta_1 = 2.25, \lambda = 5.5, \Delta_2 = 11 \text{ ms}; \Delta'_2 = \Delta_2 - \tau_{180}(^{13}\text{CO}), \Delta_3 = 10 \text{ ms}; \Delta'_3 = \Delta_3 - \tau_{180}(^{13}\text{CO}); \Delta_4 = 6 \text{ ms}$.

kann dazu erfolgreich verwendet werden. Nach einer Markierung mit der ^{13}C -chemischen Verschiebung in t_1 unter Entkopplung von ^{15}N und ^{13}CO , einem 180° -CO-Puls zur Kompensation der Bloch-Siegert-Verschiebung und CT- ^{15}N -Markierung in t_2 wird die Kohärenz zurück zu den Amidprotonen transferiert und dort refokussiert und detektiert. Die Gradienten G_1 und G_3 dienen zur Selektion des gewünschten Kohärenzweges.

Die Wassermagnetisierung wird durch die DIPSI-Entkopplung auf der $-y$ -Achse festgehalten und vom Gradienten G_1 dephasiert. Das Dephasieren der Wassermagnetisierung kann nicht vermieden werden, indem G_1 auf zwei gleich große Teile mit unterschiedlichem Vorzeichen zu beiden Seiten des ^{15}N - 180° -Pulses aufgeteilt wird, weil einer der beiden Gradienten während der Entkopplungssequenz angewendet werden müßte. Statt dessen wird die Wassermagnetisierung mit einem Gradienten G_2 zu einem Zeitpunkt rephasiert, zu dem die Proteinmagnetisierung in einem $I_z S_z$ -Zustand vorliegt, die Wassermagnetisierung sich aber in der transversalen Ebene befindet. Nach dem rephasierenden Gradienten G_2 ist sie entlang der $-y$ -Achse orientiert. Durch den 90° -Protonenpuls mit Phase $\phi_8 = x$ wird sie zur $-z$ -Achse und sofort darauf durch den 180° -Protonenpuls zurück zur $+z$ -Achse gebracht. Ein eindimensionales Experiment zeigt, daß die longitudinale Wassermagnetisierung nach der Sequenz wieder bis zu 80% der Gleichgewichtsmagnetisierung entspricht. Austauschende Amidprotonen erhalten also beinahe die volle longitudinale Magnetisierung von Wasser;

ihre Signale sind daher nicht a priori durch den Austauschprozeß abgeschwächt. Der Teil der Wassermagnetisierung, der durch nicht perfekte Pulse oder Strahlungsdämpfung nicht zurück zur $+z$ -Achse gebracht wird, wird durch den Gradienten G_3 dephasiert, der damit eine exzellente Wassersignal-Unterdrückung gewährleistet.

Die modifizierte Pulssequenz wurde an einer vollständig ^{15}N - und ^{13}C -markierten 2 mm Probe der IIA^{Man}-Domäne von Manose-Permease^[14] bei 310 K und pH = 7.5 getestet. Dieses Homodimer enthält eine Reihe schnell austauschender Amidprotonen^[6], für die ein beträchtlicher Intensitätsgewinn zu erwarten ist, wenn die Wassermagnetisierung vor der Akquisition zurück zur z -Achse gebracht wird. Abbildung 2 zeigt überlagerte Reihen durch die ersten 2D-Ebenen von mit mehreren Versionen

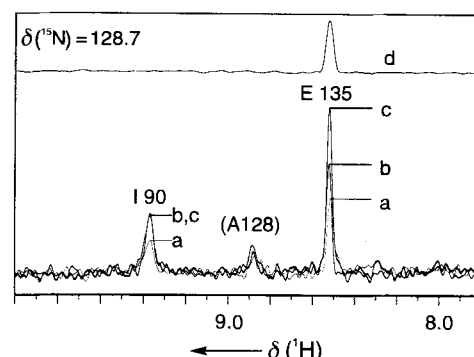


Abb. 2. ^1H -Reihen aus den ersten 2D-Ebenen von CT-HNCA-Spektren bei einer ^{15}N -Resonanzfrequenz von 128.7 pm. Die Aminosäuren A 128 und E 135 unterscheiden sich geringfügig in der ^{15}N -Resonanzfrequenz. Alle Spektren wurden unter denselben Bedingungen mit einem Bruker-AMX600-Spektrometer mit Tripelresonanzausrüstung und gepulsten Feldgradienten aufgenommen und mit denselben Parametern prozessiert. Für jedes der 80 t_1 -Inkremente wurden 256 Scans durchgeführt. Die Wartezeit zwischen ihnen inklusive der Akquisitionszeit betrug 1.1 s.

des HNCA-Experiments aufgenommenen Spektren: dem CT-Experiment mit Protonenentkopplung durch 180° -Pulse^[11] (Kurve a), dem CT-Experiment mit Protonenentkopplung durch eine Composite-pulse-Sequenz und Sättigung des Wassersignals ($\phi_8 = y$ in Abb. 1 a)^[11] (Kurve b) und dem in Abbildung 1 a beschriebenen CT-Experiment mit Protonenentkopplung durch eine Composite-pulse-Sequenz ohne Sättigung des Wassersignals (Kurve c). Zusätzlich ist die gleiche Reihe aus einem MEXICO-Spektrum^[6] gezeigt, in dem nur schnell austauschende Amidprotonen Signale verursachen (Kurve d). Wie für ein Protein dieser Größe zu erwarten^[10], ist die Empfindlichkeit des Experiments größer, wenn eine Composite-pulse-Sequenz (Kurve b) anstatt eines 180° -Pulses (Kurve a) zur Protonenentkopplung verwendet wird. Eine zusätzliche, beträchtliche Empfindlichkeitssteigerung für schnell austauschende Amidprotonen wird erreicht, wenn das Wassersignal vor Beginn der Akquisition nicht gesättigt wird. Dies ist in Kurve c für die Aminosäure E 135 zu sehen, die ein schnell austauschendes Amidproton enthält (Kurve d): Dieses Signal ist ungefähr 50% stärker, wenn die Wassermagnetisierung vor der Akquisition zurück zur $+z$ -Achse gebracht wird. Die Aminosäure E 135 befindet sich nahe dem C-Terminus im flexiblen Endstück des Proteins und gibt deshalb auch ohne besondere Maßnahmen trotz des schnellen Austauschs ein starkes Signal. Es sollte aber beachtet werden, daß schnell austauschende Amidprotonen in der Regel wesentlich schwächere Signale liefern, so daß eine Empfindlichkeitssteigerung gerade für diese Protonen von äußerster Bedeutung ist.

In Verbindung mit der Möglichkeit, Composite-pulse-Sequenzen zur Protonenentkopplung zu verwenden, kann die Technik, die Wassermagnetisierung vor der Akquisition zurück ins thermische Gleichgewicht zu bringen, ohne Kompromisse auf eine Vielzahl von NMR-Experimenten angewendet werden. Da sie hauptsächlich auf die schwachen Signale wirkt, d. h. dort, wo ein Empfindlichkeitsgewinn am dringendsten ist, ist zu erwarten, daß durch sie die Zuordnung von NMR-Spektren deutlich erleichtert wird.

Eingegangen am 12. August 1994 [Z 7235]

Stichworte: NMR-Spektroskopie · Proteine · Strukturaufklärung

- [1] A. G. Palmer, J. Cavanagh, P. E. Wright, M. Rance, *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 151–170; J. Schleucher, M. Sattler, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1518–1521; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1489–1492; L. E. Kay, P. Keifer, T. Saarinen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10663–10665.
- [2] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12593–12594.
- [3] J. Stonehouse, G. L. Shaw, J. Keeler, E. D. Laue, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, *107*, 178–184.
- [4] W. Jahnke, H. Kessler, *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 735–740.

- [5] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience, New York, **1986**; E. Liepinsh, G. Otting, K. Wüthrich, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 447–465; R. Baldwin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 84–91; C. K. Woodward, *ibid.* **1994**, *4*, 112–116; S. W. Englander, L. Mayne, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 243–265; C. Chyan, C. Wormald, C. Dobson, P. Evans, J. Baum, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5681–5691; C. A. Rohl, R. L. Baldwin, *ibid.* **1994**, *33*, 7760–7767; N. J. Skelton, J. Kördel, M. Akke, W. J. Chazin, *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 1100–1117; M. H. Werner, D. E. Wemmer, *ibid.* **1992**, *225*, 873–889; J. Czaplicki, C. Arrowsmith, O. Jardetzky, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 349–361; S. Spera, M. Ikura, A. Bax, *ibid.* **1991**, *1*, 155–165; S. Grzesiek, A. Bax, *ibid.* **1993**, *3*, 627–638.
- [6] G. Gemmecker, W. Jahnke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11620–11621.
- [7] B. A. Messerle, G. Wider, G. Otting, C. Weber, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 608–613.
- [8] A. Bax, P. G. De Jong, A. F. Mehlkopf, J. Smidt, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 567–570; R. E. Hurd, *J. Magn. Reson.* **1990**, *87*, 422–428.
- [9] R. Freeman, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1397–1412; H. Kessler, S. Mronga, G. Gemmecker, *Magn. Reson. Chem.* **1991**, *29*, 527–557.
- [10] A. Bax, M. Ikura, L. E. Kay, D. A. Torchia, R. Tschudin, *J. Magn. Reson.* **1990**, *86*, 304–318.
- [11] G. Grzesiek, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 432–440.
- [12] B. T. Farmer, R. A. Venters, L. D. Spicer, M. G. Wittekind, L. Müller, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 195–202.
- [13] A. J. Shaka, C. J. Lee, A. Pines, *J. Magn. Reson.* **1988**, *77*, 274–293.
- [14] S. Seip, J. Balbach, S. Behrens, H. Kessler, K. Flükiger, R. de Mayer, B. Erni, *Biochemistry* **1994**, *33*, 7174–7183.

Shabarova, Z. A. / Bogdanov, A. A.

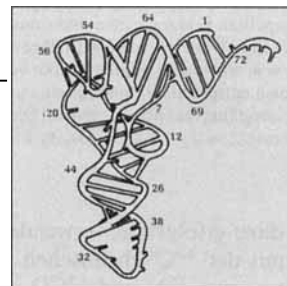
Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids

1994. XV, 588 pages with 141 figures and 36 tables. Hardcover. DM 248.-/öS 1934.-/sFr 230.-. ISBN 3-527-29021-4 (VCH, Weinheim)

Sequencing, cloning, transcription – these are but a few key techniques behind the current breathtaking advances in molecular biology and biochemistry. As these methods continuously diversify, biochemists need a sound chemical understanding to keep the pace. Chemists beginning working in the molecular biology lab need an introduction to this field from their point of view. This book serves both: it describes most of the known chemical

reactions of nucleosides, nucleotides, and nucleic acids in sufficient detail to provide the desired background, and additionally, the fundamental relations between sequence, structure and functionality of nucleic acids are presented.

The first edition of this book, which was published in Russian, has immediately become a recognized standard reference. This second, thoroughly revised and updated edition, now published in English, is likely to achieve a similar position in the international scientific community.



To order please contact your local bookseller or:

VCH, P.O. Box 10 11 61,
D-69451 Weinheim,
Fax 0 62 01 - 60 61 84

VCH, Hardstrasse 10, P.O. Box,
CH-4020 Basel

VCH, 8 Wellington Court,
Cambridge CB1 1HZ, UK

VCH, 220 East 23rd Street,
New York, NY 10010-4606, USA

VCH, Eikow Building,
10-9 Hongo 1-chome, Bunkyo-Ku,
Tokyo 113, Japan

