

Unterschiede zwischen den Konformationen von O- und C-Glycosiden im proteingebundenen Zustand: Ricin B, ein Galactose-bindendes Protein, erkennt unterschiedliche Konformationen von C-Lactose und dessen O-Analogon**

Juan-Félix Espinosa, F. Javier Cañada, Juan Luis Asensio, Hansjörg Dietrich, Manuel Martín-Lomas, Richard R. Schmidt und Jesús Jiménez-Barbero*

Professor Manuel Bernabé zum 60. Geburtstag gewidmet

Das Interesse an der Chemie von C-Disacchariden als Strukturanaloga von O-Glycosiden nimmt stetig zu^[1], da diese kohlenstoffverbrückten Verbindungen als kompetitive Inhibitoren zu den natürlichen Verbindungen auf die Aktivität von Glycosidasen wirken sollten. Aus diesem Grunde ist es außerordentlich wichtig, daß beide Verbindungen, sowohl das natürliche Substrat als auch dessen C-glycosidisches Analogon gleichartig vom Enzym erkannt werden. Gewöhnlich geht man davon aus, daß die Konformation freier C-Glycoside dieselbe ist wie die der entsprechenden O-verknüpften Verbindungen^[2]. Wir konnten jedoch unlängst zeigen, daß dies zumindest bei O- und C-Lactosen nicht der Fall ist^[3].

Soweit wir wissen, ist bislang nicht bekannt, ob diese beiden Verbindungen durch ein kohlenhydratbindendes Protein in derselben Konformation erkannt werden. Neben der Anwesenheit essentieller wechselwirkender Gruppen im nichtnatürlichen Substrat wäre dies eine wesentliche Voraussetzung für eine inhibitorische Aktivität. Um darüber mehr zu erfahren, haben wir die Komplexierung von C-Lactose **1** durch Ricin B, ein Galactose-bindendes Protein^[5], mit Hilfe von 2D-Transfer-NOE(TR-NOESY)- und -Transfer-ROE(TR-ROESY)-Experimenten^[4] analysiert und vergleichen unsere Resultate mit denjenigen für die Komplexierung von natürlicher Lactose^[6]. TR-NOE(TR-ROE)-Experimente wurden bereits zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von proteingebundenen Kohlenhydraten eingesetzt^[7], wobei die Größe der Lectine von Vorteil war, da man sich auf die leicht detektierbaren NMR-Signale des freien Liganden konzentrieren konnte.

Abbildung 1 zeigt das C-Lactosid **1** und sein O-Analogon, das Methyl- α -lactosid **2**, mit der jeweiligen Atomnumerierung. Die glycosidischen Diederwinkel sind als Φ (H1'-C1'-O1'(C₂)-C4) und Ψ (C1'-O1'(C₂)-C4-H4) definiert. Über die NMR-spek-

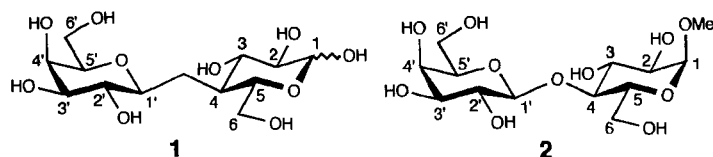


Abb. 1. Ansicht der C-Lactose **1** und des Methyl- α -lactosids **2** mit der jeweiligen Atomnumerierung.

[*] Dr. J. Jiménez-Barbero, J.-F. Espinosa, Dr. F. J. Cañada, Dr. J. L. Asensio, Dr. H. Dietrich, Prof. Dr. M. Martín-Lomas
Grupo de Carbohidratos, Instituto Química Orgánica, C. S. I. C.
Juan de la Cierva 3, E-28006 Madrid (Spanien)
Telefax: Int. +1/5644853
E-mail: IQOJJ01@pinar1.csic.es
Prof. Dr. R. R. Schmidt
Fakultät für Chemie der Universität
Postfach 5560 M 725, D-78434 Konstanz

[**] Diese Arbeit wurde von der Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT, PB93-0127) gefördert. J.-F. E. dankt dem Ministerio de Educación y Ciencia (M. E. C.) für ein FPU-Stipendium.

roskopisch gestützten Studien zur Konformation von **1** und **2** haben wir kürzlich berichtet^[3,8], weshalb an dieser Stelle nur die wesentlichen Ergebnisse erwähnt werden sollen: Beide Verbindungen nehmen die *exo*-anomere Konformation um die glycosidische Bindung ein. Die Konformationen um die aglyconischen Bindungen unterscheiden sich hingegen deutlich. Bei **2** befinden sich etwa 90 % der Moleküle im zentralen Bereich niedriger Energie (Minimum A, Φ/Ψ 54/18), und ca. 10 % der Population haben zwar die gleichen Φ -Werte, jedoch Ψ -Werte um 180° (Minimum B, Φ/Ψ 36/180). Diese beiden um die aglyconische Bindung unterschiedlichen Anordnungen werden als *syn* bzw. *anti* bezeichnet (siehe Abb. 3)^[9a]. Bei **1** dagegen nehmen etwa 55 % der Moleküle die *anti*- und ca. 40 % die *syn*-Konformation ein. Die experimentellen Daten weisen zudem darauf hin, daß das Minimum C (Φ/Ψ 180/0) ebenfalls besetzt ist (zu ca. 5 %). C-Lactose ist deshalb strukturell wesentlich flexibler als sein O-Analogon. In Tabelle 1 sind die NOEs zusammengefaßt, die exklusiv die einzelnen Konformationsbereiche von **1** charakterisieren^[9b].

Tabelle 1. Experimentell ermittelte normierte NOESY- und TR-NOESY-Intensitäten [%] von **1** bei 30 °C in D₂O (Varian, 500 MHz). Die Mischzeiten für die NOESY- und TR-NOESY-Experimente betrugen 700 bzw. 300 ms.

Protonenpaar	NOE [%]	
	frei	gebunden
H ^{pro} -R/H3	5.7	0.0
H ^{pro} -S/H5	3.0	0.0
H ^{pro} -S/H6 [a]	2.7	0.0
H1'/H4	2.1	-1.2
H1'/H3	5.9	-3.1
H ^{pro} -R/H6 [a]	5.1	-5.4

[a] Diese Werte wurden durch Addition der Beiträge beider H6-Protonen erhalten.

Die bei der Anbindung von **2** an Ricin B auftretenden Konformationsänderungen wurden in TR-NOESY- und TR-ROESY-Experimenten untersucht^[6a]. Es ergab sich, daß der gebundene Zustand von der *exo*-anomeren Anordnung in Richtung kleinerer Φ -Winkel leicht abweicht, wohingegen die aglyconische Bindung ausschließlich *syn* orientiert vorliegt. Die wesentlichen Proton-Proton-Abstände (H1'-H4 ca. 2.2–2.3 Å) stimmen mit den für Ricin-gebundenes Methyl- β -lactosid gefundenen überein^[6b].

Bei der C-Lactose **1** sind die in Gegenwart von Ricin B beobachteten NOEs negativ, was auf Anbindung schließen läßt. Die NOESY-Spektren von **1** (Abb. 2), aufgenommen mit und ohne Zusatz des Lectins, unterscheiden sich deutlich: Zum einen belegt das Auftreten beider Kreuzsignale, des H1'/H3- und des H^{pro}-R/H6-Signals, die das Ausmaß der Besetzung des Minimums B definieren, daß das Protein anders als bei **2**^[6] die *anti*-Konformation erkennt. Des weiteren treten im Komplex insgesamt vier NOEs nicht auf, die bei freiem **1** gefunden werden (Tabelle 1, Abb. 3). Der NOE zwischen H4 und H2' (ein NOE exklusiv für die Region um das Minimum C) ist nicht vorhanden, was bedeutet, daß Moleküle mit dieser Konformation nicht gebunden werden. Außerdem fehlen drei für die *syn*-Konformation exklusive NOEs (H^{pro}-R/H3, H^{pro}-S/H5 und H^{pro}-S/H6) im TR-NOESY-Spektrum (Abb. 2), was bedeutet, daß die *syn*-Konformation vom Lectin nicht erkannt wird. Das Auftreten des H1'/H4-Kreuzsignals scheint dem zu widersprechen. Eine sorgfältige Analyse des Spektrums ergab jedoch, daß beim Komplex der NOE zwischen H1' und H^{pro}-S (ca. -3 %) wesentlich intensiver ist als der zwischen H1' und H4 (ca. -1 %), wohingegen in freiem **1** diese Kreuzsignale die gleiche Intensi-

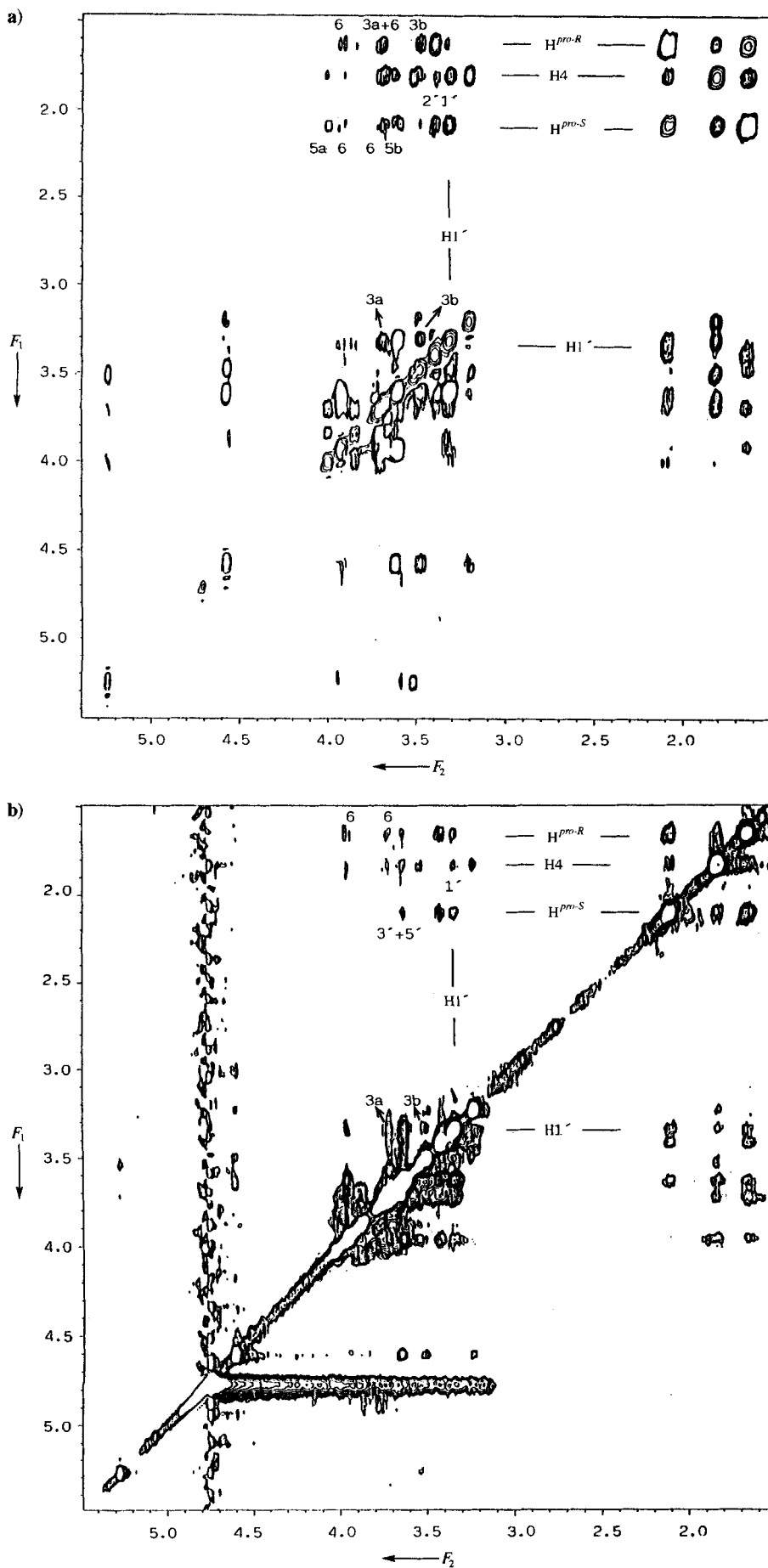


Abb. 2. 2D-NOESY- ^1H -NMR-Spektren (Varian, 500 MHz, 30 $^\circ\text{C}$, D_2O) von **1** ohne (a) und mit Zusatz von Protein (b). Die Ricin-B-Proben wurden nach wiederholtem Austausch mit deuteriertem Natriumphosphat eingeengt und in ein Meßröhrchen gegeben. Der pH-Wert betrug 6.5 bei einer Konzentration von 0.12 mM und einem C-Lactose/Ricin-B-Molverhältnis von 20/1. Dabei wurden Mischzeiten von 700 und 300 ms für freies bzw. gebundenes **1** eingestellt. Die TR-NOESY-Experimente wurden zudem mit Mischzeiten von 120, 400 und 500 ms durchgeführt.

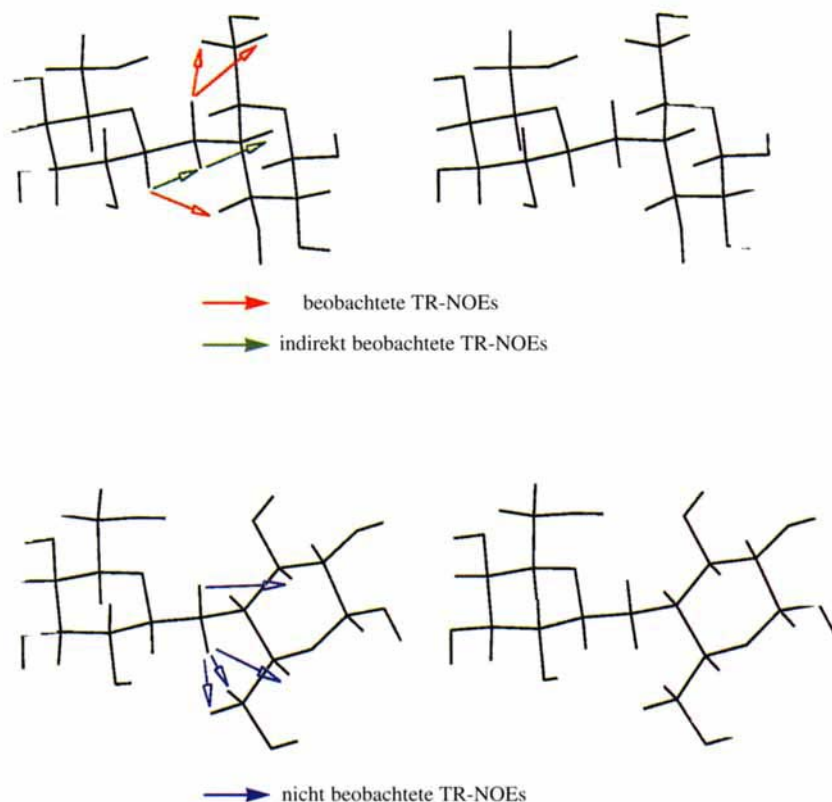


Abb. 3. Stereodarstellung unten der *syn*- (Minimum A, Φ/Ψ 54/18) und oben der *anti*-Konformation von **1** (Minimum B, Φ/Ψ 36/180) mit Kennzeichnung der jeweils exklusiven NOEs.

tät aufweisen. Da Spindiffusion in einem molekularen Komplex dieser Größe außerordentlich effizient ist^[10], liegt der Schluß nahe, daß der NOE zwischen H1' und H4 aus einem indirekten Effekt im Komplex resultiert. Tatsächlich eröffnen die beiden Methylenprotonen in **1** wichtige Diffusionswege, weshalb ein indirektes Kreuzsignal zwischen H1' und H4 via H^{pro-S} erwartet werden darf. Zur Bestätigung dieser Hypothese und zur Unterscheidung direkter NOE-Effekte von Spindiffusioneffekten sind TR-ROESY-Experimente notwendig^[6a, 10], da unter Spinlockbedingungen direkte und Drei-Spin-Effekte entgegengesetzte Vorzeichen haben. Der wesentliche Nachteil der TR-ROESY-Technik liegt darin, daß die Kreuzrelaxation des freien Liganden nicht vernachlässigt werden kann und deshalb separat gemessen werden muß. Die experimentell erhaltenen Daten zeigen, daß der ROE zwischen H1' und H3 in Gegenwart des Proteins etwa dreimal intensiver ist als im Spektrum von freiem **1**, aufgenommen mit der gleichen Mischzeit. Im Gegensatz dazu hat der NOE zwischen H1' und H4 in beiden Fällen dieselbe Größe, was belegt, daß das im Komplex aus **1** und dem Lectin gemessene TR-NOESY-Kreuzsignal aus einem indirekten Effekt resultiert. Das Auftreten des H1'/H4-Kreuzsignals im TR-ROESY-Experiment ist offensichtlich durch im Überschuß vorhandenen freien Liganden bedingt. Weitere Unterschiede zwischen den TR-NOESY- und TR-ROESY-Spektren ergeben sich für die H1'/H4'-, H^{pro-S} /H3' + H5'- und H^{pro-R} /H3' + H5'-Kreuzsignale. Diese Signale verschwinden im TR-ROESY-Spektrum^[11]. Unsere Resultate bestätigen somit neuere Berichte, nach denen in Transfer-NOE-Studien

Spindiffusion eine wesentliche Rolle spielt^[10]. Es wurde versucht, die für C-Lactose/Ricin B erhaltenen TR-NOE-Daten durch Simulation des TR-NOESY-Spektrums unter Verwendung der vollen Relaxationsmatrix^[12] quantitativ zu analysieren. Es gelang jedoch nicht, die experimentellen Daten mit einem starren Modell des im aktiven Zentrum gebundenen Liganden vollständig zu reproduzieren^[13]. Diese Tatsache bestätigt, daß **1** sogar im Bindungszentrum noch Beweglichkeit aufweist, so daß mehrere Konformere innerhalb des durch das Minimum B definierten *anti*-Tals möglich sind.

Von größerer Bedeutung ist, daß Ricin B unterschiedliche Konformere von **1** (*anti*) und dessen O-Analogon **2** (*syn*) auswählt (Abb. 4). Dieser unerwartete Befund wird durch die experimentellen Ergebnisse eindeutig bestätigt (Abb. 2).

Kristallographische Untersuchungen und Bindungsstudien am Ricin B/Lactose-Komplex^[5c] haben ergeben, daß das Lectin zwei nichtkooperative β -Galactose-Bindungsstellen aufweist^[5d]. Zur Bestimmung der relativen Bindungsaffinitäten von **1** und **2** wurden kompetitive TR-NOESY-Experimente mit unterschiedlichen 1:2-Verhältnissen durchgeführt. Mit zunehmender Menge an **2** im Meßröhrchen trat eine Abnahme der negativen NOE-Kreuzsignalintensitäten von **1** auf. Beim Erreichen eines 1:1-Verhältnisses wur-

den die NOEs von **1** positiv, wohingegen für **2** stark negative NOEs auftraten. Zwei Schlüsse lassen sich aus diesen Beobachtungen ziehen: a) Beide Liganden konkurrieren um dieselbe Bindungsstelle am Lectin, und b) die Affinitätskonstante von **1** ist kleiner als die des O-Analogons **2**.

Die kristallographische Analyse der Struktur des Komplexes aus Ricin B und Lactose liefert keine eindeutige Erklärung für den Konformationswechsel beim Übergang von **1** zu **2**. Eine mögliche Erklärung dafür, daß das Lectin die *anti*-Konformation von **2** nicht erkennt, könnte die sterische Wechselwirkung der Hydroxymethylgruppe der Glucose-Einheit mit dem Protein sein^[6a]. Es kann auch darüber spekuliert werden, ob die höhere Flexibilität und der größere Abstand zwischen den Pyranoseringen das Erkennen der *anti*-Konformation im C-Lactose-Fall ermöglichen. Ein überzeugender und eindeu-

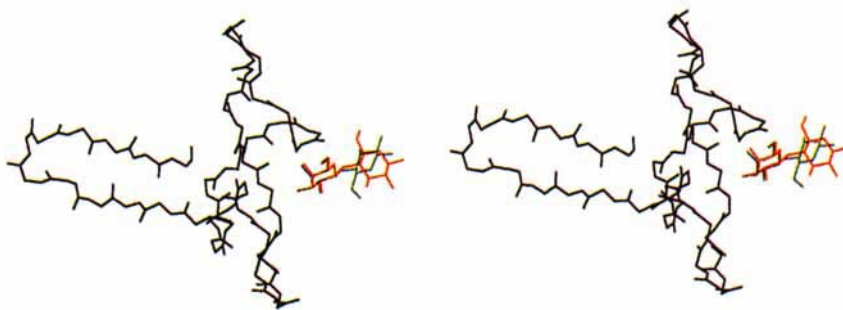


Abb. 4. Stereodarstellung der mit kristallographischen Koordinaten [5c] modellierten Ricin-B-1 α -Untereinheit einschließlich der in ihr angedockten Verbindungen **1** (rot) und **2** (grün). Beide Liganden wurden mit der vom Protein jeweils ausgewählten Konformation angedockt, und zwar so, daß es zu dem im Kristall beobachtete H-Brückenbindungsmuster der Galactose-Einheit paßt. Beide Komplexe wurden mit dem CVFF-Programm wie beschrieben [6a] minimiert. Da die Protein-Kohlenhydrat-Kontaktpunkte experimentell nicht ermittelt wurden, sollte diese Abbildung lediglich als Modell für die Konformationen beider Liganden im Bindungszentrum von Ricin B gesehen werden.

tiger Grund für das ausschließliche Anbinden eben dieser Konformation an das Protein konnte jedoch noch nicht gefunden werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich nicht nur die dreidimensionale Struktur eines C-Glycosids von der des entsprechenden O-Glycosids im freien Zustand unterscheiden kann, sondern daß auch ein kohlenhydratbindendes Protein in der Lage ist, unterschiedliche Konformationen der beiden Verbindungstypen auszuwählen. Auch wenn der hier gezeigte Fall nicht verallgemeinert werden kann, sollte man beim Design kompetitiver, C-glycosidischer Glycosidase-Inhibitoren daran denken, daß sich diese Verbindungen in ihrer Gestalt von den natürlichen Substraten unterscheiden können.

Eingegangen am 3. August,
veränderte Fassung am 20. Oktober 1995 [Z8278]

Stichworte: C-Glycoside · Kohlenhydrate · Lectine · Molekulare Erkennung · NMR-Spektroskopie

- [1] a) H. Dietrich, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 975–981, zit. Lit.; b) A. Wei, A. Haudrechy, C. Audin, J. Hyuk-Sang, N. Haudrechy-Bretel, Y. Kishi, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2160–2169, zit. Lit.
- [2] a) Y. Wang, P. G. Goekjian, D. V. Ryckman, W. H. Miller, S. A. Babirad, Y. Kishi, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 482–489; b) C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 569–593; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 521–546.
- [3] J.-F. Espinosa, M. Martín-Pastor, J. L. Asensio, H. Dietrich, M. Martín-Lomas, R. R. Schmidt, J. Jiménez-Barbero, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6329–6332.
- [4] a) G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1982**, 48, 402–417; b) A. P. Campbell, B. D. Sykes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, 22, 99–122.
- [5] a) Ricin B wurde von Sigma bezogen. b) S. Olsnes, A. Pihl, *The molecular actions of toxins and viruses*, Elsevier Biomedical Press, New York, **1982**, S. 52–105; c) E. Rutenber, J. D. Robertus, *Proteins* **1991**, 10, 260–269; d) D. Solis, P. Fernandez, T. D. Mauriño, J. Jiménez-Barbero, M. Martín-Lomas, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 214, 677–683.
- [6] a) J. L. Asensio, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 618–630; b) V. L. Bevilacqua, D. S. Thomson, J. H. Prestegard, *Biochemistry* **1990**, 29, 5529–5537.
- [7] a) T. Weimar, T. Peters, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 79–82; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 88–91; b) D. R. Bundle, N. M. Young, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, 2, 655–660.
- [8] J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, *Biopolymers* **1995**, 35, 55–73.
- [9] a) J. Dabrowski, T. Kozár, H. Grosskurth, N. E. Nifant'ev, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5534–5539; b) L. Poppe, C. W. von der Lieth, J. Dabrowski, *ibid.* **1990**, 112, 7762–7771.
- [10] S. R. Arepalli, C. P. J. Glaudemans, G. D. Daves, P. Kovac, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1995**, 106, 195–198.
- [11] Wahrscheinlich beruhen sie auf indirekten Effekten, die durch H3'/H5' im ersten und H1' in den beiden letzten Fällen übertragen werden.
- [12] R. E. London, M. E. Perlman, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1992**, 97, 79–98.
- [13] Die Korrelationszeiten für den gebundenen Zustand und die Austauschgeschwindigkeiten, die zu allen Intra-Galactose-NOEs passen, konnten nicht mit allen intra- und interglycosidischen NOEs, an denen die Glucose-Einheit beteiligt ist, in Einklang gebracht werden. Bei 2/Ricin B hingegen konnten alle experimentell ermittelten TR-NOEs durch einen einfachen Satz von Parametern modelliert werden [6a].

Catenan-Chamäleons: von der Umgebung abhängige Translationsisomerie amphiphiler Benzylamid-[2]Catenane **

David A. Leigh*, Karen Moody, John P. Smart, Karen J. Watson und Alexandra M. Z. Slawin

Der Zusammenschluß von zwei oder mehreren amphiphilen Molekülen zu oligomeren oder polymeren Ensembles wie Micellen, inversen Micellen oder Lipid-Doppelschichten^[1,2] ist ein spektakuläres Beispiel für die molekulare Selbstorganisation. Diese führt zu supramolekularen Strukturen, die sowohl von der Natur (zum Beispiel in Zellmembranen^[3]), aber auch durch den Menschen (zum Beispiel bei Detergentien^[4]) oder Systemen zur gezielten Übertragung und Freisetzung von Medikamenten^[5,6]) genutzt werden. Wir berichten hier über Synthese, Struktur und Eigenschaften einer neuen Klasse von konstitutionell zwar einfachen, aber topologisch anspruchsvollen Verbindungen, in denen amphiphile Einheiten über nichtkovalente Wechselwirkungen zu Catenanen verbrückt sind^[7–14]. Diese bemerkenswerten, als diskrete Moleküle vorliegenden Verbindungen zeigen in Lösung konformative und dynamische Eigenschaften, die an das Verhalten von Micellen und inversen Micellen aus klassischen amphiphilen Systemen erinnern, die aus einer Vielzahl von Molekülen aufgebaut sind. Beispielsweise ordnen sich die amphiphilen Einheiten der Catenane in polaren Lösungsmitteln so an, daß sich die polaren Gruppen auf der Oberfläche der supramolekularen Struktur befinden, wo sie Wasserstoffbrücken mit dem Lösungsmittel ausbilden können. Die lipophilen Strukturelemente sind in das Innere gerichtet, um dadurch ihre Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel zu minimieren. In unpolaren Medien ist das Verhalten umgekehrt. Die Catenane zeigen also Translationsisomerie und nehmen, wie ein Chamäleon, je nach der lokalen Umgebung eine andere supramolekulare Konformation ein. Die an einem der Catenane röntgenographisch bestimmte Struktur im Kristall stimmt mit seiner Vorzugskonformation in unpolaren Lösungsmitteln überein: Einer der Makrocyclen des Catenans (der „Wirt“^[15]) nimmt eine Konformation ein, in der diese Bindungsstellen für Wasserstoffbrücken konvergieren. Beim anderen Makrocyclen (der „Gast“) sind diese Bindungsstellen divergent angeordnet. Im Festkörper treten zwischen Wirt und Gast zwei außergewöhnliche, gegabelte Wasserstoffbrückenbindungen auf, die zusammen mit den polarophoben Kräften auch in Lösung die supramolekulare Konformation der amphiphilen Catenane bestimmen.

Wir haben kürzlich^[16,17] über die Synthese einer Familie von Benzylamid-Catenanen berichtet, die in Abhängigkeit von sterischen und elektronischen Faktoren ein interessantes dynamisches Verhalten zeigt^[17]. In diesen Systemen tritt eine durch das Lösungsmittel beeinflussbare Rotation des Makrocyclen auf, deren Frequenz von der Stärke der intermakrocyclischen Wasserstoffbrückenbindung abhängt. Die Röntgenstrukturanalyse eines dieser Catenane^[16] belegt die Bildung von sechs intramolekularen, intercyclischen Wasserstoffbrückenbindungen pro

[*] Dr. D. A. Leigh, K. Moody, Dr. J. P. Smart, Dr. K. J. Watson
Department of Chemistry
University of Manchester Institute of Science and Technology
Sackville Street, GB-Manchester M60 1QD (Großbritannien)
Telefax: Int. +1 61/2 00-45 39
A. M. Z. Slawin
Department of Chemistry
Loughborough University of Technology (Großbritannien)

[**] Diese Arbeit wurde teilweise von der EPSRC Innovative Polymer Synthesis Initiative (GR/J88579) gefördert.