

tionen mit Beteiligung von Fe-, O- und H-Atomen wird die Barrierrhöhe um ungefähr 1 kcal mol^{-1} gegenüber den experimentellen Daten und um $5.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ gegenüber dem CASPT2-Ergebnis unterbewertet, wobei allerdings in der CASPT2-Rechnung die Barriere überschätzt wird.^[17]

[17] M. Filatov, S. Shaik, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 3835.

Eine durch Rinder- β 1,4-Galactosyl-Transferase katalysierte Reaktion zu β -D-Galactopyranosyl-(1-3)-verknüpften Disacchariden von L-Zuckern**

Yoshihiro Nishida,* Hideaki Tamakoshi,
Yuki Kitagawa, Kazukiyo Kobayashi* und
Joachim Thiem

Die β 1,4-Galactosyl-Transferase (β 1,4-GalTase) aus Rindern gehört hinsichtlich der Substratspezifität zu den am besten untersuchten Glycosyl-Transferasen von Säugetieren.^[1] Das Enzym katalysiert den Galactosyltransfer von UDP-Galactose auf die 4-OH-Position von *N*-Acetyl-D-glucosamin (p-GlcNAc) sowie in Gegenwart von α -Lactalbumin (α -LA) auf D-Glucose. Auch andere Reaktionen des Enzyms sind bekannt, z. B. die Übertragung von *N*-Acetyl-D-galactosamin auf p-GlcNAc bei hohen α -LA-Konzentrationen.^[2] Die β 1,4-GalTase-katalysierte Reaktion wurde lange als regiospezifisch für die 4-OH-Stellung der Acceptorzucker angesehen; wir entdeckten jedoch auch einen anderen Reaktionstyp, bei dem ein Galactosyltransfer auf die β -anomere Position von *N*-Acetylkannosamin (3-Acetamido-3-desoxy-D-glucose),^[3] *N*-Acetylgentosamin (3-Acetamido-3-desoxy-D-xylose)^[4] und D-Xylose^[5] katalysiert wird. Hier berichten wir über die erste β 1,4-GalTase-Reaktion mit L-Zuckern als Acceptorsubstraten. Bei dieser neuen Reaktion wird zudem die ungewöhnliche Galactosylübertragung auf die 3-OH-Position der L-Zucker katalysiert, es handelt sich demnach um einen β 1,3-Galactosyltransfer.

Die von uns beschriebenen β 1,1-Transferreaktionen der 3-Acetamido-3-desoxyzucker sind ein überzeugender Hinweis darauf, dass die 3-NAc-Gruppe eine Schlüsselrolle bei der Enzym-Substrat-Bindung spielt und die ungewöhnliche

Übertragung steuert.^[4] Sollte dies zutreffen, könnte das Enzym mit Acceptorsubstraten, die eine NAc-Gruppe an verschiedenen Positionen tragen, unterschiedliche Glycosylbindungen knüpfen. Wir führten daher in die β -anomere Position von L-Glucose, L-Xylose und ihren D-Isomeren eine NAc-Gruppe ein und untersuchten dann den Einfluss auf die enzymatische Reaktion.

Die Einführung der NAc-Gruppe gelang durch Umsetzen des jeweiligen reduzierenden Zuckers mit Ammoniumhydrogencarbonat in Wasser und nachfolgende Acetylierung mit Acetanhydrid in Methanol.^[6] Die 1-NAc-Derivate wurden in einem Enzym-Assay^[7] sowohl mit als auch ohne α -LA untersucht. Ihre Reaktivität wurde anhand der relativen Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (r) bei Substratkonzentrationen von 1 und 10 mM mit der der reduzierenden Zucker verglichen (Abbildung 1).

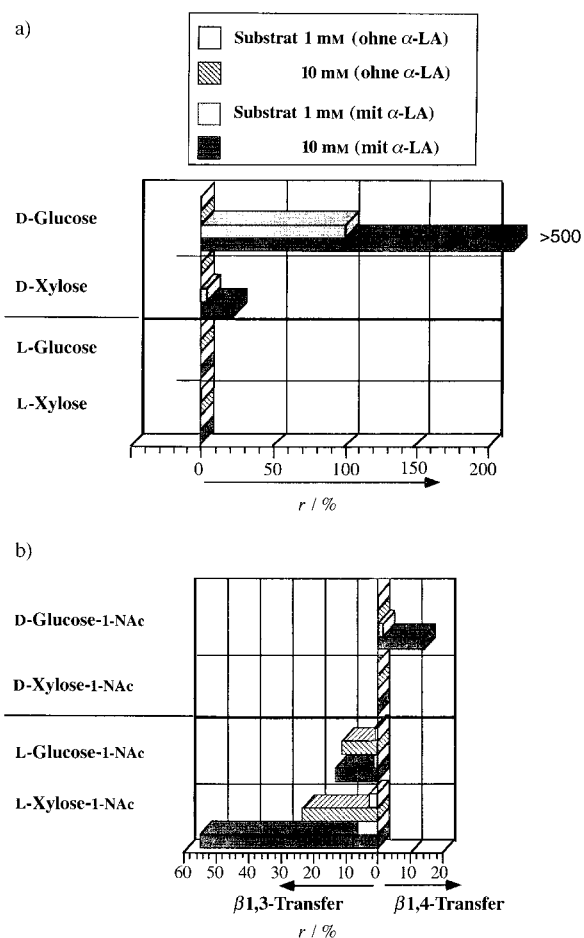


Abbildung 1. Relative Geschwindigkeiten (r) für die Reaktion von Rinder- β 1,4-Galactosyl-Transferase mit enantiomeren Glucosen und Xylosen (a) sowie ihren 1-NAc-Derivaten (b). Die Assays wurden mit jedem Acceptorsubstrat bei Konzentrationen von 1 und 10 mM sowie mit und ohne Rinder- α -Lactalbumin (0.1 mg mL^{-1}) durchgeführt. Die Art des Galactosyltransfers in (b) wurde $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch bestimmt (siehe Text).

Der Enzym-Assay bestätigte den signifikanten Einfluss der 1-NAc-Gruppe von D- und L-Zuckern auf die enzymatische Reaktion. Dieser Effekt äußert sich bei D- und L-Enantiomeren in entgegengesetzter Weise: Die NAc-Gruppe macht

[*] Prof. Dr. Y. Nishida, Prof. Dr. K. Kobayashi, H. Tamakoshi, Y. Kitagawa
Department of Molecular Design and Engineering
Graduate School of Engineering, Nagoya University
Chikusa-ku, Nagoya 464-8603 (Japan)
Fax: (81) 52-789-2528
E-mail: nishida@mol.nagoya-u.ac.jp, kobayash@mol.nagoya-u.ac.jp
Prof. Dr. J. Thiem
Institut für Organische Chemie der Universität
Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg

[**] Diese Arbeit wurde vom japanischen Ministerium für Wissenschaft und Technologie und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

L-Glucose und L-Xylose zu reaktiven Substraten, während sie die Reaktivität der D-Isomere erheblich zurückdrängt. Die Reaktivität der 1-NAc-L-Zucker ist ähnlich wie die von D-Xylose in Gegenwart von α -LA. D-Glucose-1-NAc reagiert nur in Gegenwart von α -LA, während D-Xylose-1-NAc selbst dann nicht reaktiv ist. Diese Ergebnisse deuten auf ein neuartiges Phänomen hin, wonach die anomere NAc-Gruppe die Enantiomerenunterscheidung durch das Enzym von einer Art für D-Zucker auf eine andere für L-Zucker umschaltet.

Mit den reaktiven Substraten L-Glucose-1-NAc, L-Xylose-1-NAc und D-Glucose-1-NAc führten wir die enzymatische Reaktion – ähnlich wie bei unseren früheren Untersuchungen^[3–5] – in präparativem Maßstab (ca. 30 mg) durch. Jedes Disaccharidprodukt wurde in ca. 15–20% Ausbeute isoliert; ihre ¹H-NMR-Spektren zeigten, dass bei jeder Transferreaktion regiospezifisch nur ein Disaccharid entstanden war (Tabelle 1). Bei einem Disaccharid aus D-Glucose-1-NAc sind die ¹H-NMR-Signale des Substrats wegen der Galactosylverknüpfung an O-4 in der Reihenfolge H-4 > H-5 > H-3 > H-6 > H-2 > H-1 entschirmt. Dagegen führt die Entschirnung bei Disacchariden aus L-Glucose-1-NAc und β -L-Xylose-1-NAc zu einer Verschiebung in der Reihenfolge H-3 > H-4 > H-2 > H-1 > H-5 > H-6. Dies entspricht einer Galactosylverknüpfung an O-3. Die Per-O-Acetylierung des Disaccharids aus L-Xylose-1-NAc führte zu starker Entschirnung und Verschiebung der Signale von H-2 ($\Delta\delta = 1.14$) und H-4 ($\Delta\delta = 0.56$), nicht aber der von H-3 ($\Delta\delta = 0.05$), und spricht damit ebenfalls für einen Galactoserest an O-3.

Damit ist erwiesen, dass L-Glucose und L-Xylose durch eine 1-NAc-Gruppe zu ungewöhnlichen β 1,4-GalTase-Substraten werden und eine Galactosylübertragung auf die 3-OH-Position ermöglichen. Von Bedeutung dürfte auch sein, dass sowohl das D- als auch das L-Enantiomer von Glucose-1-NAc als Substrat eingesetzt werden kann, was β 1,4- bzw. β 1,3-verknüpfte Disaccharide liefert. Um diese Ergebnisse zu erklären, schlagen wir drei entscheidende Wechselwirkungen in den Bereichen A-1, A-2 und N vor (Abbildung 2). Der Locus A-1 sorgt nach Kajihara et al.^[8] für die wichtige polare Wechselwirkung^[9] mit einer reaktiven Hydroxygruppe des Acceptorsubstrats. Man nimmt an, dass die Erkennung eines der 1,2-trans-Diole mit linksgerichteter Helicität (z. B.

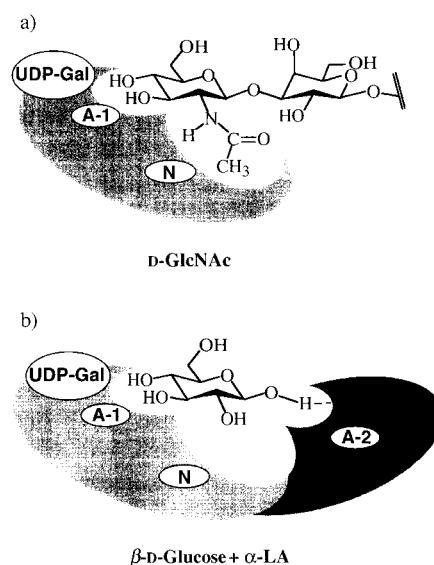


Abbildung 2. Angenommene Enzym-Substrat-Wechselwirkungen bei Reaktionen von Rinder- β 1,4-GalTase mit natürlichen Acceptorsubstraten. In Abwesenheit von α -LA sorgen ein katalytischer (A-1) und ein NAc-bindender Bereich (N) für die entscheidenden bindenden Wechselwirkungen zu terminalen D-GlcNAc-Resten von Oligosacchariden (a). α -LA bindet an das Enzym in Nachbarschaft zu einer Acceptorbindungsstelle von D-Glucose und induziert eine zusätzliche Wechselwirkung an A-2, die der Schlüssel für die Reaktion von D-Glucose zu Lactose ist (b).

OH-3/OH-4 in D-GlcNAc und OH-2/OH-3 in L-Glucose-1-NAc) in diesem Bereich ähnlich erfolgt wie durch die D-Glucose/D-Mannose-bindenden Lectine (z. B. Concanavalin A).^[10] Obwohl die Bindung an A-1 für die enzymatische Reaktion essentiell ist, nimmt man an, dass die Wechselwirkung selbst bei Reaktionen unter physiologischen Bedingungen unterhalb einer Substratkonzentration von 10 mM nicht stark genug ist. Die enzymatische Reaktion benötigt demnach eine ergänzende Bindung entweder am A-2- oder am N-Locus. Die von Berliner et al.^[11] vorgeschlagene Bindungsstelle für NAc-Gruppen (N-Locus) soll für eine wichtige Wechselwirkung mit D-GlcNAc und anderen NAc-haltigen Substraten sorgen (Abbildung 2a). Eine weitere wichtige Wechselwirkung an A-2 wird durch α -LA induziert, das in

Tabelle 1. Chemische Verschiebungen (¹H-NMR; 500 MHz, D₂O) der Disaccharidprodukte der β 1,4-Galactosyl-Transferase-Reaktionen mit N-Acetyl- β -D- und N-Acetyl- β -L-Glycopyranosylaminen.^[a]

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5 _{ax}	H-5 _{eq}	H-6 _{proR}	H-6 _{proS}	NHAc
β -D-Glc-1-NAc	5.070	3.516	3.678	3.547	3.643		3.846	4.000	2.200
β -L-Glc-1-NAc	5.070	3.516	3.678	3.547	3.643		4.000	3.846	2.200
β -D-Gal-(1-4)- β -D-Glc-1-NAc									
β -D-Glc-1-NAc	5.085	3.552	3.790	3.730	3.790		3.923	4.041	2.200
β -D-Gal	4.572	3.668	3.784	4.041	3.836		3.913	3.869	
β -D-Gal-(1-3)- β -L-Glc-1-NAc									
β -L-Glc-1-NAc	5.117	3.634	3.951	3.772	3.790		4.010	3.865	2.206
β -D-Gal	4.825	3.745	3.819	4.073	3.867		3.932	3.897	
β -L-Xyl-1-NAc	4.989	3.508	3.617	3.746	3.499	4.055			2.190
β -D-Gal-(1-3)- β -L-Xyl-1-NAc									
β -L-Xyl-1-NAc	5.031	3.626	3.891	3.953	3.533	4.070			2.190
β -D-Gal	4.824	3.735	3.815	4.065	3.855		3.928	3.888	

[a] Die Zuordnungen aller Ringprotonen basieren auf ¹H-¹H-COSY-Spektren, die der prochiralen C-6-Protonen auf Spektren der in Lit. [15] beschriebenen (6S)-(6-²H₁)-D-Glucosid- und (6S)-(6-²H₁)-D-Galactosidderivate.

Nachbarschaft zu einer Substratbindungsstelle einen 1:1-Enzymkomplex bildet.^[11, 12] Da die Reaktivität von D-Glucose und D-Xylose bei Substitution der anomeren OH-Gruppe durch einen NAc- oder OMe-Rest^[11] signifikant unterdrückt wird, ist von einer Wechselwirkung zwischen dem **A-2**-Locus und der anomeren Hydroxygruppe auszugehen (Abbildung 2b).

Obwohl L-Glucose und L-Xylose als solche der doppelten Wechselwirkung an **A-1** und **A-2** nicht entsprechen (Abbildung 3a), ermöglicht die Einführung der 1-NAc-Gruppe die Besetzung der **A-1**- und **N**-Loci (Abbildung 3b). In diesem Fall wird die 3-OH-Gruppe bei **A-1** galactosyliert, wie tatsächlich beobachtet wurde. 1-NAc-Derivate von D-Zuckern können hingegen keine ergänzende Wechselwirkung am **N**- oder **A-2**-Locus eingehen. Stattdessen kann D-Xylose-1-NAc eine andere Bindung zu den **A-2**- und **N**-Loci bilden, wobei sich keine reaktive OH-Gruppe bei **A-1** befindet (Abbildung 3c). Bei der in Gegenwart von α -LA reaktiven D-Glucose-1-NAc kann die exocyclische Hydroxymethylgruppe an C-5 diese Bindung stören (Abbildung 3d). Nach der höheren Reaktivität von D-Glucose gegenüber D-Xylose zu urteilen (Abbildung 1a), könnte zudem eine periphere bindende Wechselwirkung um die C-5-Gruppe von D-Glucose vorliegen und zu der normalen β 1,4-Transferreaktion beitragen.

Wir konnten nachweisen, dass eine anomere NAc-Gruppe nichtnatürliche L-Glucose und L-Xylose in Acceptorsubstrate für Rinder- β 1,4-GalTase umwandelt. Die Transferreaktion

verläuft regiospezifisch an der 3-OH-Position und ist damit die erste β 1,3-Übertragung mit diesem Enzym. Dieses Ergebnis und unsere früheren Untersuchungen zeigen, dass durch ein einziges Enzym unterschiedliche nichtnatürliche Glycosylbindungen geknüpft werden können. Dies geht über die allgemeinen Konzepte „Ein Glycosylenzym/eine Glycosylbindung“^[13] und „biologische Homochiralität“^[14] hinaus, die Ausdruck für die hohe Substrat- und Enantiospezifität von enzymatischen Reaktionen in Biosynthesewegen sind.

Eingegangen am 24. September 1999,
veränderte Fassung am 31. Januar 2000 [Z14064]

- [1] a) 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; b) M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Trends Glycosci. Glyco-technol.* **1996**, *8*, 37–49.
- [2] K.-Y. Do, S.-I. Do, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18447–18451.
- [3] Y. Nishida, T. Wiemann, V. Sinnwell, J. Thiem, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2536–2537.
- [4] a) Y. Nishida, T. Wiemann, J. Thiem, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 8043–8046; b) Y. Nishida, T. Wiemann, J. Thiem, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2905–2906.
- [5] T. Wiemann, Y. Nishida, V. Sinnwell, J. Thiem, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6744–6747.
- [6] L. M. Likhoshesterov, O. S. Novikova, V. A. Derevitskaja, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **1986**, *146*, C1–C5.
- [7] D. K. Fitzgerald, B. Colvin, R. Marval, K. E. Ebner, *Anal. Biochem.* **1970**, *36*, 43–61.

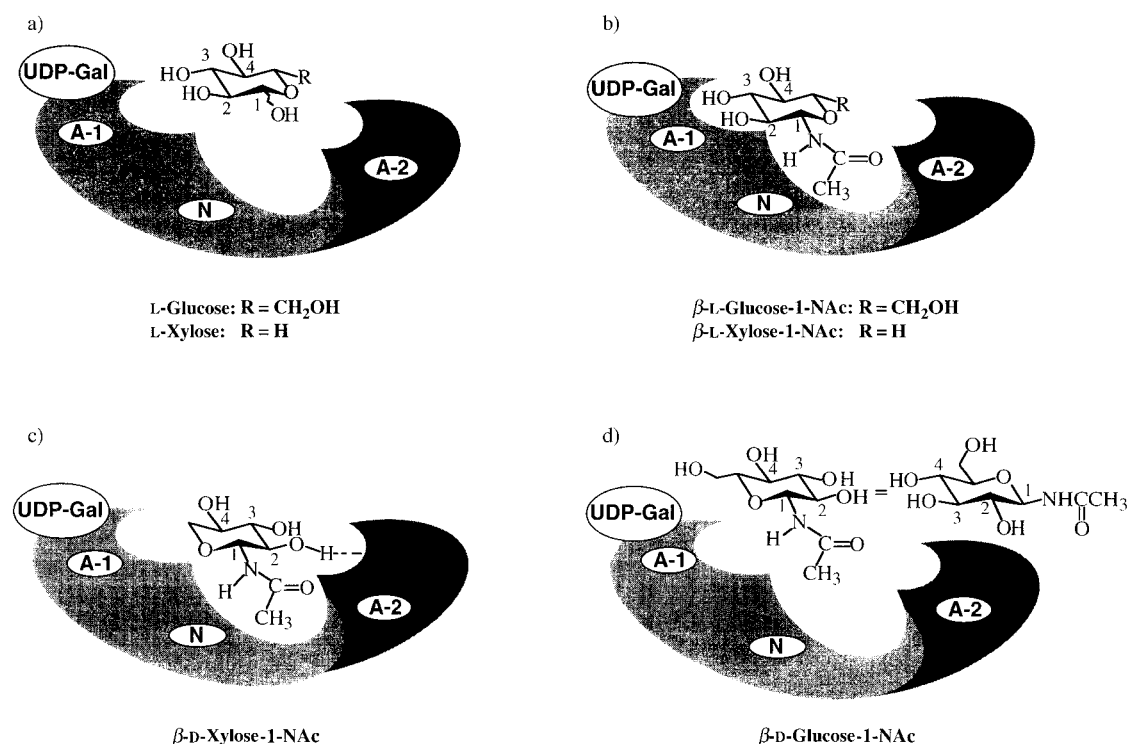


Abbildung 3. Mögliche Funktionen der 1-NAc-Gruppe von D- und L-Zuckern bei β 1,4-GalTase-Reaktionen. L-Glucose und L-Xylose sind inaktiv, da sie keine OH-Gruppen gleichzeitig an den Bereichen **A-1** und **A-2** anordnen können (a). Die 1-NAc-Gruppe ermöglicht diesen Zuckern eine Wechselwirkung am **N**-Locus, die zum Galactosyltransfer auf die 3-OH-Position führt (b). D-Glucose-1-NAc und D-Xylose-1-NAc können weder mit **A-1** + **N** noch mit **A-1** + **A-2** wechselwirken. Stattdessen könnte mit D-Xylose-1-NAc eine alternative Bindung an die Loci **N** und **A-2** möglich sein, bei der die Reaktionsstelle **A-1** nicht besetzt ist (c). Die exocyclische 5-CH₂OH-Gruppe von D-Glucose-1-NAc stört die Bindung an **N** und **A-2**. Sie sorgt stattdessen für eine periphere bindende Wechselwirkung und ermöglicht so die natürliche β 1,4-Transferreaktion (d).

- [8] Y. Kajihara, H. Kodama, T. Endo, H. Hashimoto, *Carbohydr. Res.* **1998**, 306, 361–378.
- [9] a) R. U. Lemieux, *Chem. Soc. Rev.* **1989**, 18, 347–374; b) M.-H. Du, U. Spohr, R. U. Lemieux, *Glycoconjugate J.* **1994**, 11, 443–461.
- [10] a) K. Drickamer, *Nature* **1992**, 360, 183–186; b) K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 9557–9560.
- [11] L. J. Berliner, M. E. Davies, K. E. Ebner, T. A. Bayer, J. E. Bell, *Mol. Cell. Biochem.* **1984**, 62, 37–42.
- [12] J. A. Grobler, M. Wang, A. C. W. Pike, K. Brew, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 5106–5114.
- [13] S. Natsuka, J. B. Lowe, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 683–691.
- [14] a) V. V. Avetisov, V. I. Goldanskii, *BioSystems* **1991**, 25, 141–150; b) J. M. Bailey, *FASEB J.* **1998**, 12, 503–507.
- [15] H. Ohrui, Y. Nishida, H. Itoh, H. Hori, H. Meguro, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 1726–1731.

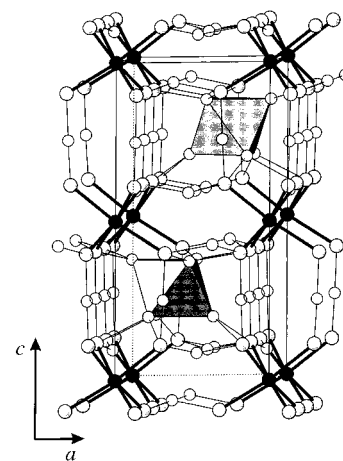


Abbildung 1. Projektion der Kristallstruktur von $\text{PtIn}_7\text{F}_{13}$ mit der Elementarzelle. Kleine schwarze Kreise repräsentieren Pt, graue Kreise In und offene Kreise F. Eingezeichnet sind kurze Pt-In-Abstände innerhalb der $[\text{PtIn}_6]$ -Oktaeder (dicke Linien) und In-F-Abstände (< 260 pm). Graphisch hervorgehoben sind $[\text{In}(1)\text{F}_6]$ -Oktaeder in der Polyederdarstellung.

$[\text{PtIn}_6]^{10+}$ -Oktaeder in $\text{PtIn}_7\text{F}_{13}$: die erste Verbindung einer neuen Klasse von Metallcluster-Fluoriden

Jürgen Köhler* und Jen-Hui Chang

Fluoride mit niedervalentem In sind weitgehend unbekannt und alle Versuche zur Reduktion von InF_3 mit H_2 oder elementarem In, die bis in die dreißiger Jahre zurückreichen,^[1] scheiterten. Bei unseren eigenen Versuchen, InF_3 mit In in Pt-Ampullen zu reduzieren, entstanden oftmals zartgelbe Produkte, deren Röntgenpulverdiagramme keiner bislang bekannten Phase zugeordnet werden konnten. Da das hypothetische „ InF^+ “ isoelektronisch zu SnO ist und sich das jüngst entdeckte $\text{Ru}_3\text{Sn}_{15}\text{O}_{14}$ ^[2] formal als „ $\text{Ru}_3\text{Sn} \cdot 14\text{SnO}^+$ “ beschreiben lässt, lag es nahe, gezielt nach entsprechenden niedervalenten In-Fluoriden zu suchen. Durch Zugabe von Pt-Pulver zu dem mehrfach untersuchten System In-InF_3 gelang uns schließlich die Herstellung des neuen Fluorids $\text{PtIn}_7\text{F}_{13}$ in Form reiner Pulverproben und Kristalle (siehe *Experimentelles*), anhand derer die Kristallstruktur aufgeklärt und die Strukturparameter verfeinert werden konnten.^[3,4]

Das Prinzip der Kristallstruktur von $\text{PtIn}_7\text{F}_{13}$ geht aus Abbildung 1 hervor. Charakteristische Baugruppen sind die erstmals beobachteten $[\text{PtIn}_6]$ -Oktaeder, welche zusammen mit $[\text{InF}_6]$ -Oktaedern alternierend längs $[001]$ gestapelt sind. Pt ist von sechs In-Atomen nahezu oktaedrisch koordiniert, und die Pt-In-Abstände erstrecken sich von 253.0 bis 254.7 pm (Abbildung 2). Sie sind damit deutlich kleiner als bei intermetallischen Phasen mit sechsfach koordiniertem Pt, wie LaPtIn_3 ^[5] mit $d_{\text{Pt-In}} = 269$ pm oder $\text{Sr}_2\text{Pt}_3\text{In}_4$ ^[6] mit $d_{\text{Pt-In}} = 265$ pm. Die In-In-Abstände innerhalb der $[\text{PtIn}_6]$ -Cluster

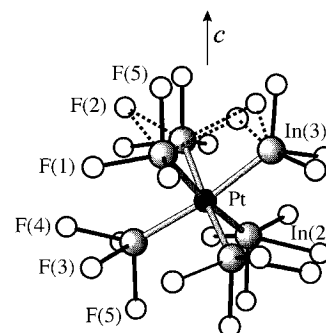


Abbildung 2. Projektion eines $[\text{PtIn}_6\text{F}_{24}]$ -Clusters mit dreizähliger Symmetrie in $\text{PtIn}_7\text{F}_{13}$ zusammen mit den verwendeten Atomnummierungen. Ausgewählte Bindungslängen [pm]: Pt-In(2) 254.7(1), Pt-In(3) 253.0(1), In(2)-In(2) 378.0(1), In(2)-In(3) 360.5(1), In(3)-In(3) 344.2(1), In(2)-F(5) 207.9(12), In(2)-F(4) 209.4(2), In(2)-F(3) 237.5(6), In(3)-F(5) 198.0(12), In(3)-F(1) 206.5(3), In(3)-F(2) 254.6(10).

sind mit 344–378 pm nur wenig größer als in elementarem In ($d_{\text{In-In}} = 325$ ($4 \times$) bis 338 pm ($8 \times$)) oder in molekularen In-Clustern wie $\text{In}_8(2,6\text{-Mes}_2\text{C}_6\text{H}_3)_4$ ($\text{Mes} = 2,4,6\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_2$).^[7] Zum Vergleich seien noch die $[\text{In}_2\text{In}(1)_4]^{7+}$ -Tetraeder in $\text{Na}_{23}\text{In}_5\text{O}_{15}$ ^[8] erwähnt, die kurze In(1)-In(2)-Abstände von 275 pm und relativ lange In(1)-In(1)-Kanten von 445 pm aufweisen.

Die $[\text{PtIn}_6]$ -Oktaeder sind von insgesamt 24 F-Liganden in Abständen von 198 bis 255 pm umgeben. Ein solcher $[\text{PtIn}_6\text{F}_{24}]$ -Cluster ist einzigartig, denn man kennt keine Fluoride mit ähnlichen Einheiten. Nur bei den höheren Homologen der Halogene gibt es einige Verbindungen mit diskreten oktaedrischen Clustern, in deren Zentren sich ein Übergangsmetall befindet, z.B. $\text{Cs}_4\text{Pr}_6\text{OsI}_{13}$ ^[9] und $\text{Bi}_{34}\text{Ir}_3\text{Br}_{37}$.^[10] Die In(2)-Atome sind ausschließlich terminal von vier F-Atomen umgeben, wohingegen die In(3)-Atome terminal von drei F-Atomen, zusätzlich aber noch von zwei weiteren F(2)-Atomen koordiniert sind, die über den In(3)-In(3)-Kanten liegen. Die In(3)-F(2)-Abstände sind mit 255 pm relativ lang und bemerkenswerterweise sind entsprechende μ_2 -verbrückende F-Liganden bei molekularen Metall-

[*] Priv.-Doz. Dr. J. Köhler, J.-H. Chang
Max-Planck-Institut für Festkörperforschung
Heisenbergstraße 1, 70569 Stuttgart (Deutschland)
Fax: (+49) 711-689-1642
E-mail: JKOEH@simaix.mpi-stuttgart.mpg.de