

Lars Herfurth, Thomas Weimar und Thomas Peters*

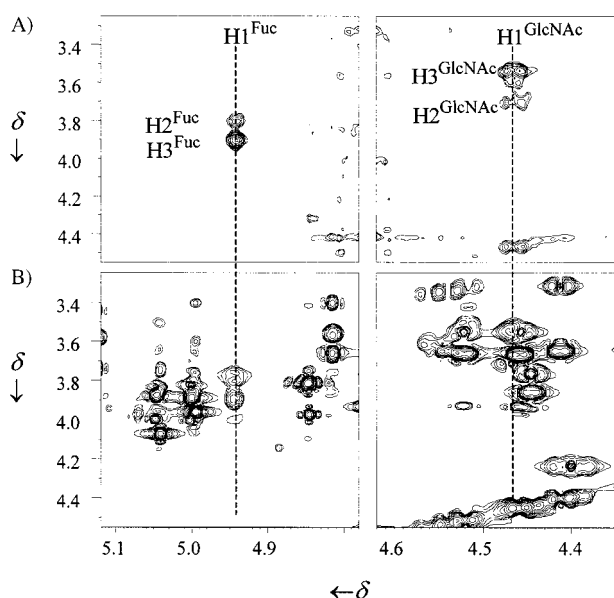
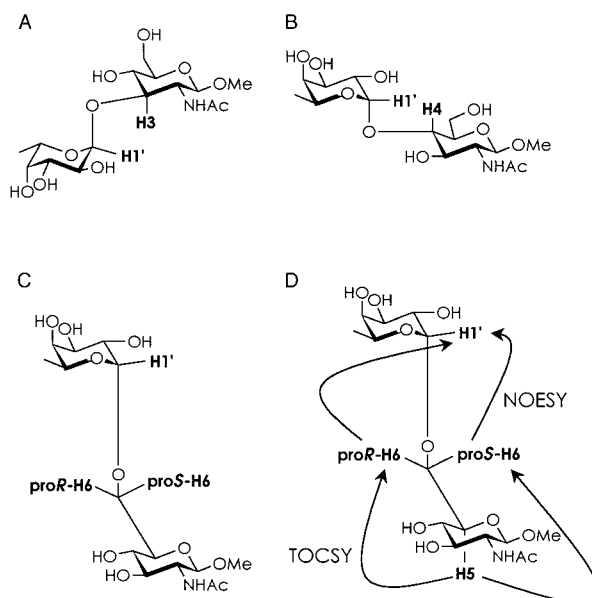


Abbildung 1. Vergleich der Regionen der anomeren Protonen $H1^{Fuc}$ (links) und $H1^{GlcNAc}$ (rechts) im TOCSY- (B) und im STD-TOCSY-Spektrum (A) der Oligosaccharid-Bibliothek in Gegenwart von AAA. In B) sind nur Kreuzsignale der an das Protein bindenden Substanz 1 zu sehen.

und positive Kreuzsignale nicht auslöschen. Anhand der chemischen Verschiebungen und der Kopplungskonstanten war es möglich, die STD-TOCSY-Kreuzsignale α -L-Fucose (Fuc) und β -D-N-Acetylglucosamin (GlcNAc) zuzuordnen. Charakteristische spektroskopische Informationen lieferten dabei die C6-Methylgruppe der Fucose, die O-Methylgruppe, die N-Acetylgruppe und die anomeren Protonen. Aus trNOESY-Spektren wurde deutlich, dass die O-Methylgruppe an der anomeren Position von GlcNAc positioniert war. Nur der Typ der Verknüpfung der Monosaccharideinheiten blieb unbekannt. Einem STD-TOCSY-Spektrum konnte diese Information nicht entnommen werden, da homonucleare skalare Kopplungen über die glycosidische Bindung hinweg sehr klein sind. Allerdings liefern Interglycosid-NOE- sowie -trNOE-Effekte die gewünschte Information (Schema 2). Üblicherweise lassen sich trNOEs den trNOESY-Spektren entnehmen, doch in diesem Fall kommt es zur Überlagerung der Signale von Protonen des Fuc- und des GlcNAc-Restes, sodass eine Unterscheidung zwischen Inter- und Intraglycosid-NOEs unmöglich wird. Das $H2^{Fuc}$ -Signal überlappt beispielsweise mit dem von $proS-H6^{GlcNAc}$ und das $H3^{Fuc}$ -Signal mit dem von $proR-H6^{GlcNAc}$, sodass eine eindeutige Zuordnung der trNOEs zu $H1^{Fuc}$ ausgeschlossen ist. Signalüberlagerungen können generell durch Einführung weiterer Dimensionen überwunden werden. Daher wurde ein 3D-TOCSY-trNOESY-Experiment^[6] durchgeführt. In diesem Experiment werden die Protonen während des TOCSY-Schritts aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Spinsystemen gekennzeichnet. Der trNOESY-Schritt liefert dann die notwendigen Informationen über die Interglycosid-trNOEs.

Das 3D-TOCSY-trNOESY-Spektrum der Bibliothek in Gegenwart von AAA zeigt trNOEs zwischen $H1^{Fuc}$ und Protonen, die mit einem Proton mit $\delta \approx 3.5$ skalar koppeln. Den chemischen Verschiebungen zufolge gehörten diese



Schema 2. Interglycosid-trNOEs in Abhängigkeit des Verknüpfungstyps zwischen Fuc und GlcNAc. Die Protonen, zwischen denen große trNOEs bestehen, sind fett gedruckt. A) (1→3)-Verknüpfung. B) (1→4)-Verknüpfung. C) (1→6)-Verknüpfung. D) Durch Kombination von TOCSY- und trNOE-Transferwegen kann der Verknüpfungstyp eindeutig identifiziert werden. Die den in Abbildung 2 gezeigten Kreuzsignalen entsprechenden Magnetisierungswege sind durch Pfeile dargestellt.

Protonen nicht zum Fuc-Rest. Fuc gibt, von der C6-Methylgruppe abgesehen, keine Protonensignale mit $\delta < 3.6$. Außerdem bestand zwischen zwei der Protonen, die trNOEs zu $H1^{Fuc}$ geben, eine skalare Kopplung. Diese Information war ausreichend, um den Verknüpfungstyp zwischen Fuc und GlcNAc zu bestimmen. Abbildung 2 zeigt den ω_1/ω_2 -Schnitt bei der Frequenz des $H1^{Fuc}$ -Signals ($\omega_3 = 4.95$). Alle Kreuzsignale in diesem Schnitt stammen von Protonen, die einen trNOE zu $H1^{Fuc}$ aufweisen. Skalar koppelnde Partner können einfach identifiziert werden, da der ω_1/ω_2 -Schnitt TOCSY-Transferwege beinhaltet. Wie in Abbildung 2 zu sehen ist, wurde das Muster der skalaren Kopplungen den Protonen $proR-H6^{GlcNAc}$, $proS-H6^{GlcNAc}$ und $H5^{GlcNAc}$ zugeordnet. Es muss betont werden, dass die Intraglycosid-trNOEs zwischen $H2^{Fuc}$ und $H3^{Fuc}$ ebenfalls in diesem Spektrum präsent sind

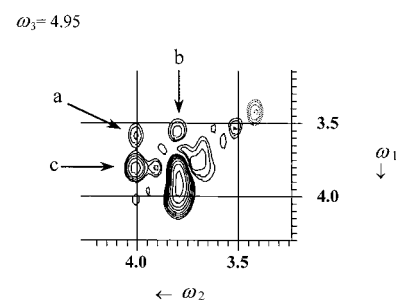


Abbildung 2. ω_1/ω_2 -Schnitt aus dem 3D-TOCSY-trNOESY-Spektrum. ω_3 entspricht der Resonanzfrequenz des anomeren Protons des Fucoseres, $H1^{Fuc}$ ($\delta = 4.95$). Der Schnitt zeigt die Konnektivitäten durch skalare Kopplung (TOCSY, erster Transferschritt) und durch dipolare Kreuzrelaxation (NOESY, zweiter Transferschritt). Alle Kreuzsignale sind das Ergebnis einer über folgende Wege auf $H1^{Fuc}$ übertragenen Magnetisierung: a) $H5^{GlcNAc} \rightarrow proS-H6^{GlcNAc} \rightarrow H1^{Fuc}$, b) $H5^{GlcNAc} \rightarrow proR-H6^{GlcNAc} \rightarrow H1^{Fuc}$; c) $proR-H6^{GlcNAc} \rightarrow proS-H6^{GlcNAc} \rightarrow H1^{Fuc}$.

und mit dem proR-H6^{GlcNAc}/proS-H6^{GlcNAc}-Muster überlappen. Jedoch koppelt keines der beiden Protonen mit dem H5^{GlcNAc}-Proton bei $\delta = 3.51$, sodass eine sichere Unterscheidung möglich war. Schema 2 zeigt, dass das erhaltene Kreuzsignalmuster nur mit einer (1 \rightarrow 6)-Verknüpfung der beiden Monosaccharideinheiten erklärt werden kann.

Ein 3D-TOCSY-trNOESY-Experiment ist somit gut geeignet, um die bioaktive Komponente einer Kohlenhydratbibliothek zu identifizieren, ohne dass etwas über die Identität der einzelnen Komponenten bekannt ist. Kohlenhydrate bilden ohne Frage eine wichtige Klasse biologischer Makromoleküle.^[7, 8] nichtsdestoweniger ist das beschriebene experimentelle Vorgehen aber auch für andere Verbindungsklassen geeignet.

Experimentelles

Alle Spektren wurden auf einem Bruker-DRX-500-MHz-Spektrometer mit einem 5-mm-TXI-Probenkopf bei 306 K aufgenommen. Die 2D-Spektren wurden mit 512 Inkrementen und 16 Transienten aufgenommen. Für die TOCSY-Experimente wurde ein 50-ms-MLEV-17-Spinlockfeld von 7.5 kHz verwendet. Sättigungstransferexperimente wurden mit 40 selektiven 270°-Pulsen von 50 ms Dauer und 10 ms Abstand bei 2.8 ppm (on-resonance) und bei 40 ppm (off-resonance) durchgeführt. Die Differenzbildung zwischen On- und Off-resonance-NMR-Spektrum wurde mit Hilfe des Phasencyclus vorgenommen.

Für das 3D-TOCSY-trNOESY-Experiment wurden 124, 256 und 1014 Datenpunkte in F1, F2 bzw. F3 mit jeweils acht Transienten aufgenommen. Die Akquisitionszeit betrug 127 ms, die gesamte Relaxationswartzeit 1.6 s, die Messzeit 5 d und die NOESY-Mischzeit 130 ms. Nullquantenkohärenzen wurden mit gleichzeitiger Anwendung eines Spinlockfeldes (2.5 ms, 7.5 kHz) und eines Gradienten (2.5 ms, ca. 5 G cm⁻¹) vor der NOESY-Mischzeit unterdrückt.^[9] Die Wasserunterdrückung gelang durch Vorsättigung des HDO-Signals mit einem schwachen Radiofrequenzfeld.

Eingegangen am 2. Februar 2000 [Z14634]

- [1] a) J. M. Moore, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 54–58; b) P. Keifer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 43–41; c) B. J. Stockman, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, *33*, 109–151.
- [2] a) P. J. Hajduk, T. Gerfin, J.-M. Boehlen, M. Haeberli, D. Marek, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2315–2317; b) S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531–1534.
- [3] a) P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257–12261; b) A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258–10259; c) M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8930–8931.
- [4] a) M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902–1906; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788; b) J. Klein, R. Meinicke, M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5336–5337.
- [5] a) B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 705–709; b) T. Peters, B. Meyer, WO-B 19649359, **1996**; c) D. Henrichsen, B. Ernst, J. L. Magnani, W.-T. Wang, B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 106–110; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 98–102.
- [6] a) C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 14–63; b) H. Oschkinat, C. Cieslar, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* **1990**, *86*, 453–469.
- [7] a) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130; b) A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7390–7397.
- [8] J. Jiménez-Barbero, J.-L. Asensio, F.-J. Cañada, A. Poveda, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 549–555.
- [9] a) A. L. Davis, G. Estcourt, J. Keeler, E. D. Laue, J. J. Titman, *J. Magn. Reson. A* **1993**, *105*, 167–183; b) T. Weimar, *Magn. Reson. Chem.*, im Druck.

NO-Erkennung durch einen Metallkomplex als Folge der selektiven Dissoziation eines Liganden**

Katherine J. Franz, Nisha Singh und
Stephen J. Lippard*

Angesichts der großen und ständig steigenden Zahl der biologischen Prozesse, für die eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid nachgewiesen wurde, besteht ein Bedarf an verbesserten Nachweismethoden für NO. Die derzeit verwendeten Verfahren basieren zumeist auf der Identifizierung von Abbauprodukten wie Nitrit und Nitrat oder weisen nicht die erwünschte Empfindlichkeit auf.^[1] Die Anwendung ratiometrischer Biosensoren^[2] sowie ultrakleiner amperometrischer Sensoren^[3–5] bietet Möglichkeiten für eine selektive und empfindliche Nachweismethode für NO in vivo. Fluoreszenzindikatoren haben ferner die wünschenswerte Eigenschaft, einen direkten Nachweis sowohl in räumlicher als auch in zeitlicher Auflösung in Echtzeit zu ermöglichen,^[6] wie im Fall von Ca^{II}-Sensoren nachgewiesen werden konnte.^[7] Obwohl auf dem Gebiet fluoreszierender NO-Sensoren intensiv geforscht wird, beruhen die Methoden bisher auf dem indirekten Nachweis reaktiverer NO_x-Spezies,^[8–10] beinhalten im Fall der Bindung von NO nur eine Abschwächung der Fluoreszenzintensität^[11] oder erfordern weitere Umsetzungen, um eine positive Fluoreszenzantwort zu erhalten.^[12, 13] Wir berichten hier über eine Strategie, in der durch die Bildung eines Übergangsmetallnitrosylkomplexes infolge der Bindung von NO ein Fluoreszenzsignal ausgelöst wird.

Das Design dieses NO-Sensors beruht auf der Fluoreszenzlöschung durch Übergangsmetallionen mit teilweise besetzten d-Zuständen. Wir haben einen Liganden mit einem Fluorophor synthetisiert, dessen Fluoreszenz vom Zentralatom, hier Co^{II}, in Abwesenheit von NO gelöscht wird, sodass im „Aus“-Zustand nur ein geringes Restsignal detektiert wird. In Gegenwart von NO wird durch die Bildung eines Metall-Nitrosyl-Addukts selektiv ein fluoreszierender Ligand abgespalten und somit aus der direkten Umgebung des Metallions entfernt, wodurch die Fluoreszenz „angeschaltet“ wird. Ein ähnlicher Ansatz wurde bereits für den Fe^{II}-Komplex eines an Chinolin gebundenen Cyclamrings beschrieben; dort sinkt die Fluoreszenzintensität jedoch in Gegenwart von NO.^[11] Eine analoge Ligandenaustauschstrategie wurde darüber hinaus im Fall eines pH-abhängigen Fluoreszenzsensors angewendet.^[14]

In dem neu entwickelten Liganden H₂DATI-4 **1** ist jeder Aminotroponiminat(ATI)-Ring an einem der Iminstickstoffatome mit einem Dansylfluorophor modifiziert und über das

[*] Prof. S. J. Lippard, K. J. Franz, N. Singh
Department of Chemistry
Massachusetts Institute of Technology
77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139 (USA)
Fax: (+1) 617-258-8150
E-mail: lippard@lippard.mit.edu

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation sowie durch ein Stipendium des Undergraduate Research Opportunity Program (MIT) für N.S. unterstützt. Wir danken Prof. Roger Tsien für anregende Diskussionen zu Beginn dieses Projekts.