

- Pichota, A. K. Beck, A. B. Pinkerton, T. Litz, J. Karjalainen, V. Gramlich, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 55–58.
- [7] Die Enantiomerenreinheit der Liganden wurde durch Mischen des *R,R*- und des *S,S*-Derivats eingestellt.
- [8] Nichtlineare Effekte in asymmetrischen Katalysen wurden eingehend beschrieben: a) D. Guillaneux, S.-H. Zhao, O. Samuel, D. Rainford, H. B. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9430–9439; b) M. Reggelin, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1997**, *45*, 392–396; c) C. Girard, H. B. Kagan, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3088–3127; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2923–2959.
- [9] D. M. Knotter, G. van Koten, H. L. van Maanen, D. M. Grove, A. L. Spek, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 351–352; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 341–342.
- [10] Ausgewählte Beispiele mehrkerniger Kupferkomplexe mit Thiolatliganden: a) W. Clegg, C. D. Garner, J. R. Nicholson, P. R. Raithby, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1983**, *39*, 1007–1009; b) D. M. Knotter, A. L. Spek, G. van Koten, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1738–1740; c) B. Becker, W. Wojnowski, K. Peters, E. M. Peters, H. G. von Schnering, *Polyhedron* **1990**, *9*, 1659–1666; d) D. M. Knotter, H. L. van Maanen, D. M. Grove, A. L. Spek, G. van Koten, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 3309–3317; e) D. M. Knotter, D. M. Grove, W. J. J. Smeets, A. L. Spek, G. van Koten, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3400–3410; f) Übersichtsartikel über Cu^I-Verbindungen: C. E. Holloway, M. Melnik, *Rev. Inorg. Chem.* **1995**, *15*, 147–387.
- [11] P. Stilbs, *Prog. Nucl. Magn. Reson.* **1987**, *19*, 1–45.
- [12] Für alle Diffusionsmessungen wurde die Stejskal-Tanner-Sequenz^[18] benutzt (400 MHz, [D₆]THF, 20°C). Die Form der Gradienten war rechteckig und ihre Stärke wurde im Verlauf des Experiments variiert. Die Pulslänge betrug 5 ms und die Zeit zwischen den Gradienten, Δ, 75 ms.
- [13] Bestimmung der Aggregation von Organokupfer-Verbindungen in Lösung durch andere Methoden: a) R. G. Pearson, C. D. Gregory, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 4098–4104; b) E. C. Ashby, J. J. Watkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5312–5317; c) A. Gerold, J. T. B. H. Jastrzebski, C. M. P. Kronenburg, N. Krause, G. van Koten, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 778–780; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 755–757; d) H. Huang, C. H. Liang, J. E. Penner-Hahn, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1628–1630; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1564–1566; e) B. H. Lipshutz, J. Keith, D. J. Buzard, *Organometallics* **1999**, *18*, 1571–1574.
- [14] Anwendungen an Übergangsmetallkomplexen: a) P. S. Pregosin, R. Salzmann, *Coord. Chem. Rev.* **1996**, *155*, 35–68; b) P. S. Pregosin, G. Trabesinger, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1998**, 727–734.
- [15] Es ist anzunehmen, dass die Deprotonierung der OH-Gruppe unter Bildung einer Mg^{II}-Alkoholatgruppe wichtig für den stereochemischen Verlauf der Reaktion ist.
- [16] SAINT, Version 4, Siemens Analytical X-ray Systems, Inc., Madison, WI (USA).
- [17] a) SADABS, G. Sheldrick, Göttingen, **1997**; b) SHELXTL-Programmpaket, Version 5.1, Bruker AXS, Inc., Madison, WI (USA).
- [18] E. O. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, *42*, 288–292.

Die Acetylierung des O-spezifischen Caryans des Lipopolysaccharids aus *Pseudomonas (Burkholderia) caryophylli* führt zu Blockmustern**

Antonio Molinaro, Cristina De Castro, Bent O. Petersen, Jens Ø. Duus, Michelangelo Parrilli und Otto Holst*

Die Mehrzahl der O-spezifischen Polysaccharide der Lipopolysaccharide (LPS) aus Gram-negativen Bakterien sind Heteropolysaccharide, die aus Wiederholungseinheiten von 2–8 Monosacchariden bestehen.^[1] In solchen O-spezifischen Polysacchariden wurde eine große Vielfalt an Monosaccharidbausteinen identifiziert, die zusätzlich phosphoryliert, methyliert, acetyliert oder mit einer Aminosäure substituiert sein können. Insbesondere Acetylreste wurden häufig als Modifikation identifiziert, immer in nicht-stöchiometrischen Verhältnissen. Die Acetylierung findet in späteren Schritten der Biosynthese der O-spezifischen Polysaccharide statt und wird als mikroheterogene Eigenschaft der LPS angesehen. In einigen LPS wurden Homopolymeren als O-spezifische Polysaccharide nachgewiesen, die sehr häufig aus N- und/oder O-acylierten (Amino-)Desoxyzuckern bestehen. Somit liegen hier relativ hydrophobe Moleküle vor.^[2, 3] Der Einfluss von Acetylgruppen auf die Konformation von O-spezifischen Polysacchariden im Allgemeinen und die Bildung von konformativen Epitopen im Besonderen ist bislang nicht untersucht worden.

Es sind derzeit nur wenige Bakterien identifiziert, deren LPS zwei unterschiedliche O-spezifische Polysaccharide enthalten. Dieses Phänomen ist insbesondere für die Gattung *Burkholderia* charakteristisch,^[3] die sowohl human- als auch pflanzenpathogene Spezies umfasst. *Pseudomonas (Burkholderia) caryophylli* ist ein pflanzenpathogenes Bakterium, das bei Nelken ein frühzeitiges Welken verursacht.^[4] Das LPS dieser Spezies enthält zwei verschiedene lineare Homopolysaccharide als O-spezifische Polysaccharide, die jeweils aus einem neuartigen und eher ungewöhnlichen Zuckerbaustein aufgebaut sind. Ein Großteil der LPS enthält das Polysac-

[*] Prof. Dr. O. Holst
Forschungszentrum Borstel
Parkallee 22
23845 Borstel (Deutschland)
Fax: (+49) 4537-188419
E-mail: oholst@fz-borstel.de

Dr. A. Molinaro, Dr. C. De Castro, Prof. Dr. M. Parrilli
Dipartimento di Chimica Organica e Biologica
Università di Napoli „Federico II“
via Mezzocannone 16
80134 Napoli (Italien)
B. O. Petersen, Dr. J. Ø. Duus
Carlsberg Laboratory
Gamle Carlsberg Vej 10
2500 Copenhagen (Dänemark)

[**] Diese Arbeit wurde im Rahmen des VIGONI-Programms vom Deutschen Akademischen Austauschdienst (O.H.) und von der Conferenza Permanente dei Rettori delle Università Italiane (M.P., C.D.C., A.M.) gefördert. Die 750-MHz-NMR-Spektren wurden mit einem Varian-Unity-Inova-Spektrometer des Danish Instrument Center for NMR Spectroscopy of Biological Macromolecules gemessen.

charid Caryophyllan, das aus α -(1→7)-gebundener Caryophyllose (3,6,10-Tridesoxy-4-C-(D-glycero-1-hydroxyethyl)-D-*erythro*-D-*gulo*-decose) besteht.^[5–7] Der kleinere Teil der LPS enthält das O-spezifische Polysaccharid Caryan, das aus β -(1→7)-gebundener Caryose (4,8-Cyclo-3,9-didesoxy-L-*erythro*-D-*ido*-nonose) aufgebaut ist.^[7,8] Diese O-spezifischen Polysaccharide spielen vermutlich bei Wechselwirkungen zwischen den Bakterien und der Wirtspflanze eine wichtige Rolle, womit sie bedeutende Virulenzfaktoren wären. Wir berichten hier über die Identifizierung eines ungewöhnlichen Acetylierungsmusters des Caryans, das für die Wechselwirkungen zwischen dem LPS und der Pflanzenoberfläche wichtig sein könnte.

Das Lipoid-A-freie Caryan (Molekulmasse 38 kDa) wurde nach milder saurer Hydrolyse und Reinigung durch Gelperméationschromatographie erhalten. Das 1D-¹H-NMR-Spektrum dieses Präparates (Abbildung 1) belegt deutlich die Anwesenheit von O-Acetylgruppen (Signale bei δ = 2.17 und 2.18) und damit eine Modifikation dieses Polysaccharids, die zuvor noch nicht nachgewiesen worden war. Um sowohl die Wanderung als auch den Verlust von Acetylgruppen ausschließen zu können, wurden mildere Bedingungen zur Hydrolyse der LPS angewandt, entweder durch eine Verkürzung der Reaktionsdauer in 1-proz. Essigsäure auf 1 h oder

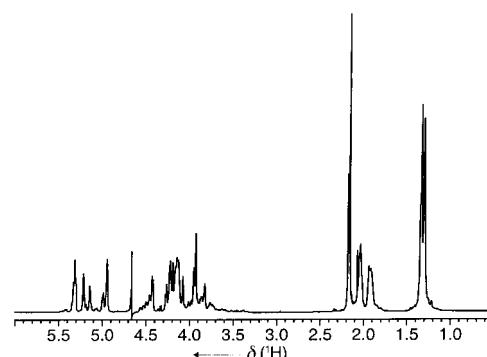


Abbildung 1. 1D-¹H-NMR-Spektrum des acetylierten Caryans aus LPS von *Pseudomonas (Burkholderia) caryophylli*. Das Spektrum wurde bei 750 MHz und 37 °C in D₂O aufgenommen.

durch Hydrolyse in 100 mM Acetatpuffer mit 1% SDS (pH 4.4, 100 °C, 2 h).^[9] Die 1D-¹H-NMR-Spektren bewiesen in beiden Fällen ein gleiches Acetylierungsmuster des Caryans. Bei der Methylierungsanalyse des Caryans wurde, in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen, ausschließlich 7-substituierte Caryose identifiziert.^[8]

Die in der NMR-Spektroskopie gemessenen Signale wurden mit zweidimensionalen homo- und heteronuklearen Experimenten bei 750 MHz (¹H) zugeordnet (Tabelle 1).

Tabelle 1. ¹H- und ¹³C-NMR-Daten für das O-desacylierte (D) und das acetylierte (A) Caryan aus dem LPS von *Pseudomonas (Burkholderia) caryophylli*.^[a]

Typ	chemische Verschiebung δ (¹ H/ ¹³ C)									
	1	2	3 _{ax}	3 _{äq}	4	5	6	7	8	9
D										
d-d-d	5.218 (96.2)	4.155 (64.6)	2.055 (30.4)	1.909 —	— (78.2)	4.271 (74.3)	4.219 (77.7)	3.953 (87.6)	— (78.7)	1.30 (15.7)
td	5.186	4.127	2.334	2.093	—	4.429	4.060	4.325	—	1.30
β -red	4.942	3.966	1.993	1.791	—	—	—	—	—	—
α -red	4.559	3.854	1.838	2.111	—	—	—	—	—	—
A										
1, a-a-a	4.944 (97.1)	4.127 (64.6)	2.036 (30.4)	1.933 —	— (78.6)	4.425 (73.7)	5.309 (79.4)	3.922 (87.0)	— (79.3)	1.32 (15.7)
2, a-a-d	5.144 (97.5)	4.162 (64.4)	2.042 (30.4)	1.944 —	— (78.6)	4.496 (73.7)	5.324 (79.4)	3.928 (87.0)	— (79.3)	1.32 (15.7)
3, d-a-a	4.953 (97.1)	4.131 (64.6)	2.036 (30.4)	1.933 —	— (78.6)	4.453 (73.8)	5.323 (79.4)	4.079 (85.9)	— (79.3)	1.30 (15.7)
4, d-a-d	5.144 (97.4)	4.162 (64.6)	2.042 (30.4)	1.944 —	— (78.6)	4.526 (73.8)	5.336 (79.4)	4.075 (85.9)	— (79.3)	1.30 (15.7)
5, d-d-d	5.218 (96.2)	4.152 (64.6)	2.051 (30.4)	1.911 —	— (78.2)	4.272 (74.3)	4.225 (77.7)	3.954 (87.6)	— (78.7)	1.30 (15.7)
6, d-d-a	4.985 (96.4)	4.111 (64.6)	2.029 (30.4)	1.898 —	— (78.2)	4.200 (74.3)	4.248 (77.7)	3.980 (87.6)	— (78.7)	1.30 (15.7)
7, a-d-d	5.207 (96.2)	4.148 (64.6)	2.044 (30.4)	1.905 —	— (78.2)	4.194 (74.2)	4.215 (77.7)	3.830 (89.1)	— (78.7)	1.34 (15.7)
8, a-d-a	5.000 (96.4)	4.116 (64.6)	2.029 (30.4)	1.898 —	— (78.2)	4.194 (74.2)	4.191 (77.7)	3.822 (89.1)	— (78.7)	1.34 (15.7)
td-d	5.186 (96.2)	4.127 (64.6)	2.334 (30.4)	2.099 —	— (72.1)	4.432 (76.8)	4.064 (78.1)	4.330 (78.1)	— (78.1)	1.32 (15.7)
ta-d	—	—	—	—	—	4.356	5.417	4.009	—	—
ta-a	—	—	—	—	—	4.420	5.436	4.012	—	—
β -red	4.942	3.966	1.993	1.791	—	—	—	—	—	—
α -red	4.466	3.824	1.794	2.079	—	—	—	—	—	—

[a] Die Spektren wurden bei 750 MHz (¹H) und 188.6 MHz (¹³C) und 37 °C in D₂O aufgenommen. Die ¹H-NMR-Daten sind für jeden Typ in der ersten Zeile, die ¹³C-NMR-Daten in der zweiten Zeile (in Klammern) angegeben. Die Kopplungskonstanten konnten nicht genau bestimmt werden, es waren nur die folgenden Abschätzungen möglich: $J_{\text{H}_1, \text{H}_2}$ klein, $J_{\text{H}_2, \text{H}_3\text{ax}}$ groß, $J_{\text{H}_2, \text{H}_3\text{äq}}$ klein, $J_{\text{H}_5, \text{H}_6}$ groß, $J_{\text{H}_6, \text{H}_7}$ mittel. Die im NMR-Spektrum betrachtete Caryoseeinheit ist durch Fettdruck gekennzeichnet. A = acetyliertes Caryan; a = 6-O-acetyliertes Monomer; α -red = α -konfiguriertes reduzierendes Ende; β -red = β -konfiguriertes reduzierendes Ende; D = O-desacyliertes Caryan; d = nichtacetyliertes Monomer; t = terminale Einheit. Signale der O-Acetylgruppe: ¹H-NMR: δ = 2.17 (a-a-a, a-a-d) und 2.18 (d-a-a, d-a-d); ¹³C-NMR: δ = 20.0 (a-a-a, a-a-d, d-a-a, d-a-d).

Im ^1H -NMR-Spektrum des nichtacetylierten Caryans bewies die kleine Kopplungskonstante (${}^3J_{\text{H}1,\text{H}2} < 4 \text{ Hz}$) eine synclinale Orientierung der Protonen H1 und H2 und damit die β -Konfiguration der glycosidischen Bindung. In der Caryose lassen sich zwei nicht miteinander verbundene Spinsysteme nachweisen, H1/H3 und H5/H7. Jedes dieser Spinsysteme kann anhand von 2D-COSY- und TOCSY-NMR-Spektren zugeordnet werden. Weiterhin existiert keine Spin-Spin-Kopplung zwischen den Protonen der Methylgruppe (H9) und irgendeinem der anderen Protonen. Beide separaten Spinsysteme sind jedoch über NOE-Kontakte und $^1\text{H}, {}^{13}\text{C}$ -Fernkopplungskonstanten miteinander verknüpft. Zur Interpretation der NOE-Kreuzsignale ist eine einfache Molecular-Modeling-Untersuchung erforderlich, die weiter unten im Detail für das acetylierte Polysaccharid beschrieben wird. Die Struktur der Wiederholungseinheit des Polysaccharids wird durch Fernkopplungskonstanten bestätigt, die die Verknüpfung beider ^1H -Spinsysteme durch Kopplungen von H9 mit C4 und C7 sowie von H_3aq mit C4 beweisen. Die Konfiguration der glycosidischen Bindung wird eindeutig durch Fernkopplungen zwischen H1 und C7 sowie zwischen C7 und H1 nachgewiesen. Die sehr gute Qualität der Hochfeld-NMR-Spektren ermöglicht ebenfalls die Identifizierung des nichtreduzierenden Endes des Polysaccharids, das durch die Signale bei $\delta = 4.060$ (H6) und 4.325 (H7) charakterisiert ist. Ein Vergleich mit den entsprechenden Signalen ($\delta = 4.219$ bzw. 3.953) der glycosylierten Caryose verdeutlicht den hier vorliegenden Glycosylierungseffekt. Die Intensitäten der Signale des nichtreduzierenden Endes betragen ca. 0.5% von denen der substituierten Caryose in der Kette. Dieser Wert stimmt mit der nachgewiesenen Molekülmasse von 38 kDa gut überein, die einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 180 Monosacchariden entspricht. Vom reduzierenden Ende lassen sich nur die Signale von H1, H2 und den beiden H3-Protonen zuordnen, mit einem Verhältnis $\alpha:\beta$ von ungefähr 2:3.

Die Strukturanalyse des acetylierten Polysaccharids stellt ein weitaus größeres Problem dar. Die Daten der NMR-Spektroskopie (Tabelle 1) zeigen, dass hier mehrere unterschiedliche Caryose-Einheiten auftreten, die sich voneinander in ihrer Position im Caryan und in ihrer Acetylsubstitution unterscheiden. Wie schon bei dem nichtacetylierten Caryan wurden auch hier für jeden Typ der Caryose zwei voneinander unabhängige Spinsysteme identifiziert (H1/H3 und H5/H7). In den 750-MHz- ^1H -NMR-Spektren des acetylierten Polysaccharids wurden acht solcher Spinsysteme nachgewiesen, die alle über aus einem NOESY-Experiment erhaltene Kreuzsignale miteinander in Beziehung gesetzt werden konnten (Tabelle 2), die aus dem engen Kontakt zwischen H_3ax und H5 herrührten. Auf ähnliche Weise konnte H9 anhand von Kreuzsignalen zwischen H7 und H9 zugeordnet werden. Diese Zuordnungen wurden in einem HMBC-Experiment durch ${}^{13}\text{C}, {}^1\text{H}$ -Fernkopplungen bestätigt. Anhand der Spinsysteme 1–8 (Tabelle 3) wurden acht verschiedene Caryose-Einheiten identifiziert, von denen vier an O6 acetyliert (Typ 1–4) und vier nichtacetyliert sind (Typ 5–8). Die Acetylierung an O6 wurde zum einen durch die Tieffeldverschiebung der Signale für H6 und C6 im Vergleich mit den entsprechenden Signalen der unsubstituierten Caryose nachgewie-

Tabelle 2. NOE-Kontakte im acetylierten Caryan.^[a]

Typ(en) Monomer(e) NOE-Kontakte^[b]

innerhalb eines Restes

1–4	-a-	H1-H2 (s), H2- H_3aq (s), H2-H3 _{ax} (s), H3 _{ax} -H5 (s), H3 _{ax} -H9 (s), ^[c] H3 _{aq} -H9 (s), H5-H6 (m), H5-H7 (m), H6-H7 (m)
5–8	-d-	H1-H2 (s), H2- H_3aq (s), H2-H3 _{ax} (s), H3 _{ax} -H5 (s), H3 _{ax} -H9 (s), ^[c] H3 _{aq} -H9 (s), H5-H7 (m), H6-H7 (m)
		<i>zwischen zwei Resten in Richtung des reduzierenden Endes</i>
1+3	-a-a	H1-H6a (s), H1-H7a (m), H3 _{ax} -H9 (s), ^[c] H5-H7a (m), H5-H9 (m)
6+8	-d-a	H1-H6a (s), H1-H7a (m), H3 _{ax} -H9 (s), ^[c] H5-H7a (m), H5-H9 (m)
2+4	-a-d	H1-H6a (s), H1-H7a (m), H3 _{ax} -H9 (s), ^[c] H5-H7a (m), H5-H9 (m)
5+7	-d-d	H1-H6a (s), H1-H7a (m), H3 _{ax} -H9 (s), ^[c] H5-H7a (m), H5-H9 (m)
		<i>zwischen zwei Resten in Richtung des nichtreduzierenden Endes</i>
1+2	a-a-	H6-H1a (s), H7-H1a (m), H7-H5a (m), H9- H_3ax a (s), ^[c] H9-H5a (m)
7+8	d-a-	H6-H1a (s), H7-H1a (m), H7-H5a (m), H9- H_3ax a (s), ^[c] H9-H5a (m)
3+4	a-d-	H6-H1a (s), H7-H1a (m), H7-H5a (m), H9- H_3ax a (s), ^[c] H9-H5a (m)
5+6	d-d-	H6-H1a (s), H7-H1a (m), H7-H5a (m), H9- H_3ax a (s), ^[c] H9-H5a (m)

[a] Die NOE-Kontakte sind eingeteilt in stark (s), mittel (m) und schwach (w). a = 6-O-acetyliertes Monomer; d = nichtacetyliertes Monomer.

[b] Bei den NOE-Kontakten zwischen zwei Resten gehört das erste ^1H zum fettgedruckten Monomer. [c] Summe der NOE-Kontakte innerhalb eines und zwischen zwei Resten.

Tabelle 3. Im acetylierten Caryan identifizierte Spinsysteme.

Typ	Spinsystem ^[a]	Typ	Spinsystem ^[a]
1	a-a-a (25 %)	5	d-d-d (20 %)
2	a-a-d (12 %)	6	d-d-a (10 %)
3	d-a-a (12 %)	7	a-d-d (10 %)
4	d-a-d (6 %)	8	a-d-a (5 %)

[a] Die prozentualen Anteile, basierend auf der Integration der NMR-Signale, sind in Klammern angegeben. a = 6-O-acetyliertes Monomer; d = nichtacetyliertes Monomer. Das im NMR-Spektrum betrachtete Monomer ist durch Fettdruck gekennzeichnet.

sen, zum anderen durch ${}^{13}\text{C}, {}^1\text{H}$ -Fernkopplungen zwischen H6 der Caryose und dem Carbonyl-C-Atom der Acetatgruppe.

Die Zuordnung der Bindungen zwischen den acht Typen wurde anhand der 750-MHz-NMR-Spektren durchgeführt. Durch die in einem NOESY-Experiment beobachteten Dipol-Dipol-Korrelationen wurde die Reihenfolge der einzelnen Einheiten identifiziert (Abbildungen 2 und 3, Tabelle 2). Dabei sind die NOE-Kontakte zwischen H1 des Glycosyl-Donors und H6 und H7 des glycosylierten Zuckers wesentlich. Das NOESY-Spektrum in Abbildung 2a zeigt, dass im Typ 1 (**a-a-a**, a = acetylierte Caryose; die betrachtete Zuckereinheit ist fettgedruckt) eine acetylierte Caryose mit einer anderen acetylierten Caryose verknüpft ist (Kreuzsignal zwischen H1 der betrachteten Zuckereinheit und H7 eines anderen acetylierten Restes). Ebenso ergibt der Kontakt von H1 einer Einheit vom Typ 2 (**a-a-d**, d = nichtacetylierte Caryose) mit einer nichtacetylierten Caryose ein entsprechendes NOE-Kreuzsignal. Für beide Typen, 1 und 2, wurde aufgrund von NOE-Kontakten zwischen H1 des terminalen

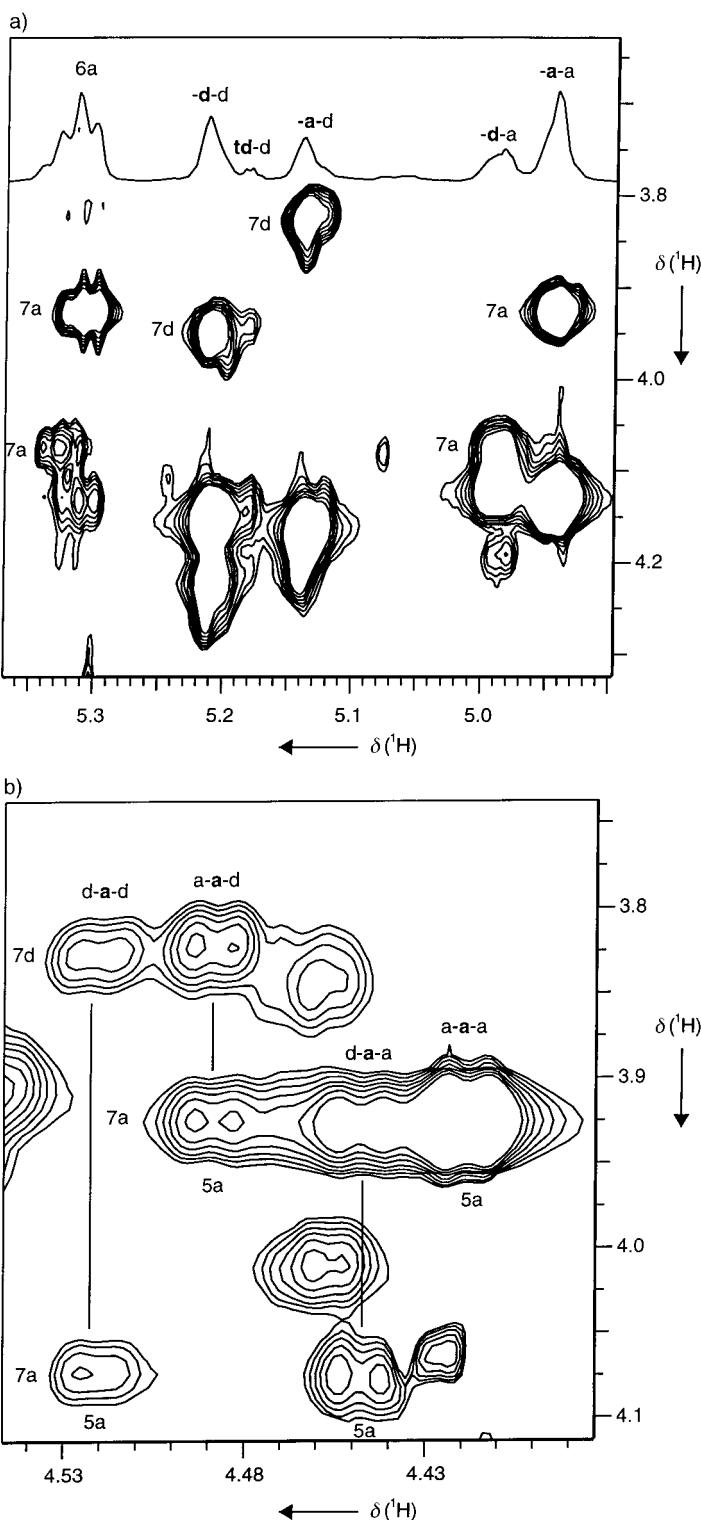


Abbildung 2. Ausschnitte des NOESY-Spektrums (40 ms) des acetylierten Caryans. a) Bereich der Kopplungen zwischen dem anomeren H1 und H7 des benachbarten Zuckerrestes. b) Bereich der NOE-Kontakte innerhalb eines Restes oder zwischen benachbarten Resten für H5 der acetylierten Caryose und H7 einer benachbarten Caryose-Einheit. Die NOE-Kontakte zwischen H1 und H6 sind in diesem Ausschnitt nicht gezeigt. – td = terminales nichtacetyliertes Monomer.

und H6 und H7 des glycosylierten Zuckers eine acetylierte Caryose als nichtreduzierendes Ende identifiziert. Die Typen 3–8 wurden in analoger Weise zugeordnet. In Abbil-

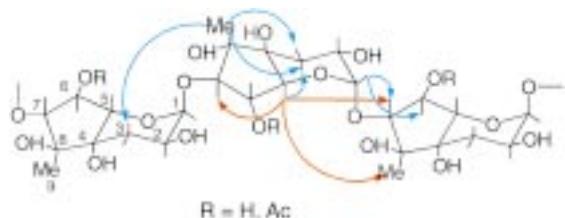


Abbildung 3. Trisaccharidstrukturen, die die Typen 1–8 repräsentieren, mit Angabe wichtiger NOE-Kontakte. Es sind nur die NOE-Kontakte der mittleren Zuckereinheit gezeigt. Triviale NOE-Kontakte zwischen vicinalen ^1H -Paaren sind nicht dargestellt. Die wichtigen NOE-Kontakte zwischen H5 und anderen Protonen sind in Rot dargestellt.

dung 2b wird gezeigt, dass die Zuordnung der Sequenzen der acetylierten Typen 1–4 zusätzlich noch durch den Nachweis von NOE-Kontakten zwischen H5 des Glycosyl-Donors und H7 des glycosylierten Zuckers gelang. Es sollte dazu erwähnt werden, dass mit einem TOCSY-Experiment das intramolekulare NOE-Signal zwischen H5 und H7 deutlich von dem Signal zwischen zwei Resten unterschieden werden konnte.

Die durch die identifizierten NOE-Kontakte erhaltenen Informationen zur Sequenz wurden durch in einem HMBC-Experiment beobachtete $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -Fernkopplungen bestätigt. Für die meisten der acht Typen waren die Signale für C7 deutlich abgegrenzt, wodurch die Zuordnung von Fernkopplungen mit H1 des Glycosyl-Donors möglich war. Nach dem Verhältnis der acht identifizierten Einheiten zu urteilen, das durch Integration der 1D- ^1H -NMR-Spektren abgeschätzt wurde, liegen im Caryan ungefähr gleich viele acetylierte und nichtacetylierte Caryose-Einheiten vor.

Die Identifizierung der Sequenz der verschiedenen Caryose-Einheiten war nur deshalb möglich, weil die Acetylgruppe an O6 nicht nur eine Verschiebung der Signale für H6 und die benachbarten Kerne H5 und H7 bewirkt, sondern auch des Signals für H1 im Glycosyl-Donor (vgl. die entsprechenden chemischen Verschiebungen z.B. der Typen 1 und 2 (a-a-a bzw. a-a-d) und 5 und 6 (d-d-d bzw. d-d-a)). Derartig wirkungsvolle Through-Space-Wechselwirkungen sind für Carbonyl/Ester-Funktionen, die einen starken anisotropen Einfluss auf chemische Verschiebungen haben, gut belegt. Für ^{13}C -Signale werden im Allgemeinen kleinere Effekte beobachtet.

Ebenso wie im Falle des nichtacetylierten Caryans konnten die NMR-Daten der terminalen Zuckereinheiten zugeordnet werden. Für die unsubstituierte nichtreduzierende Caryose, die eine andere nichtacetylierte Caryose substituiert, war eine komplett Zuordnung möglich. Für die terminalen Reste der anderen Typen konnten die chemischen Verschiebungen aufgrund von Signalüberlagerungen nur teilweise zugeordnet werden.

Das starke NOE-Signal zwischen H₃_{ax} und H9, das für die Bestimmung der Konfiguration des Caryose-Monosaccharids von Bedeutung ist, könnte zu einer falschen Zuordnung der Konfiguration des Zuckers im Polysaccharid führen, da es eine diaxiale Anordnung der beiden Protonen andeutet. Gleichzeitig ist jedoch ein starker NOE-Effekt zwischen H₃_{aq} und H9 zu beobachten, der eine äquatoriale Orientierung von H9 anzeigen. Dieser Widerspruch kann durch Molecular Modeling einer größeren Struktureinheit mit einer äquatorialen Orientierung von H9 aufgelöst werden, bei der

eine recht kurze Distanz zwischen H9 und H3_{aq} des benachbarten Zuckers auftritt. Damit beinhaltet der beobachtete NOE-Kontakt zwischen H9 und H3_{aq} die Summe von NOE-Signalen zwischen Protonen in derselben und in verschiedenen Zuckereinheiten. Zudem ist dieser Effekt in Übereinstimmung mit einer äquatorialen Orientierung von H9 und damit mit der zuvor publizierten Konfiguration des isolierten Monomers.^[8]

In Abbildung 4 ist die energetisch günstigste Konformation einer acetylierten Trisaccharideinheit abgebildet. Man erkennt deutlich, dass die Acetylierung von O6 einen starken Einfluss auf die chemische Verschiebung von H1 der als

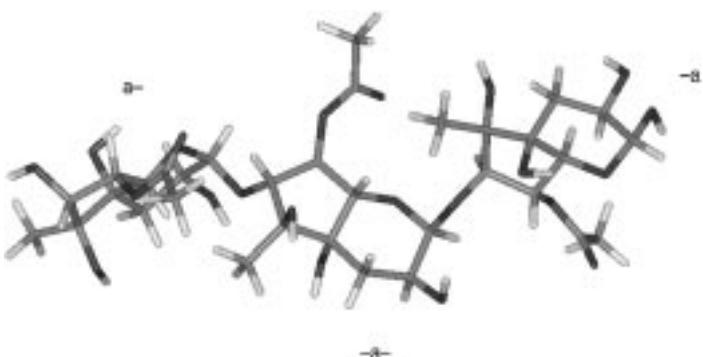


Abbildung 4. Stab-Darstellung der Konformation des acetylierten Trisaccharids a-a-a mit minimaler Energie, basierend auf den identifizierten NOE-Kontakten, die im Text beschrieben und in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Glycosyl-Donor fungierenden Caryose hervorruft. Molecular-Modeling-Studien von größeren Struktureinheiten zeigten, dass die lineare Sequenz der Zucker zu keinen nennenswerten Fernwechselwirkungen führt. Somit wird die gesamte Konformation durch lokale Wechselwirkungen zwischen benachbarten Zuckereinheiten bestimmt. Daher ist es vermutlich nicht möglich, die Länge der Ketten der einzelnen Typen 1–8 über NMR-Spektroskopie zu bestimmen. Überraschenderweise ergab ein Vergleich der Konformationen von acetylierten und nichtacetylierten Ketten (als Trisaccharid-Sequenzen simuliert) nur kleine Unterschiede, was darauf hinweist, dass sich die Konformationen beider Polysaccharide kaum unterscheiden.

Wir haben das Acetylierungsmuster des O-spezifischen Caryans des LPS aus *Pseudomonas (Burkholderia) caryophylli* charakterisiert. Unter Berücksichtigung der relativen Mengen der Typen 1–8 schlagen wir ein Modell für eine Wiederholungseinheit des Caryans vor, das kleinere Bereiche sowohl von acetylierten als auch von nichtacetylierten Caryosen beinhaltet (Abbildung 5). Somit führt die Acetylierung zu einem Blockmuster. Die Biosynthese eines Polysaccharids mit einem solchen Acetylierungsmuster und dessen Einfluss auf die biologischen Eigenschaften des Caryans werden derzeit noch nicht verstanden. Die Acetylierung sollte jedoch die hydrophoben Eigenschaften des Polysaccharids verstärken, was für die Wechselwirkungen zwischen den Bakterien und der Oberfläche der Wirtspflanze von Bedeutung sein könnte.

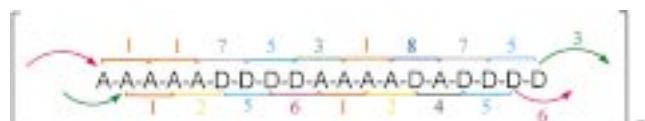


Abbildung 5. Vorgeschlagene Struktur einer Wiederholungseinheit des Caryans aus *Pseudomonas (Burkholderia) caryophylli*. Die Wiederholungseinheit ist aus 19 Caryosemolekülen aufgebaut. Das Muster der Acetylierung/Nichtacetylierung spiegelt das Vorkommen der Typen 1–8 wider, wie in Tabelle 3 gezeigt ist. Zum besseren Verständnis sind die Typen 1–8 in unterschiedlichen Farben dargestellt. Auf acetylierte Bereiche (A) folgen nichtacetylierte (D), in beiden Fällen sind die Ketten jedoch nicht sehr lang und umfassen ca. 4–5 Caryosemoleküle. Ebenso findet eine „irrtümliche“ Acetylierung statt, die zu den Typen 4 und 8 führt.

Experimentelles

Allgemeines: Der Gehalt an Caryose und Caryophyllose wurde über die entsprechenden Alditolacetate oder acetylierten Methylglycoside mit GC und GC-MS nachgewiesen. Die Methylierung des Caryans wurde nach Hakomori durchgeführt.^[10] Die Methylierungsanalyse wurde mit GC-MS durchgeführt (Hewlett-Packard 5890, SPB-5-Kapillarsäule (0.25 mm × 30 m, Supelco). Temperaturprogramm: 5 min bei 150 °C, dann mit 5 °C min⁻¹ auf 300 °C), nach der Hydrolyse des methylierten Caryans, Reduktion mit NaBD₄ und Acetylierung mit Acetanhydrid in Pyridin (120 °C, 20 min).

Isolierung des acetylierten Caryans: 100 mg der LPS-Mischung wurden auf einer Sephadex-G-100-Säule (3 × 100 cm, Pharmacia) aufgetragen und mit einer wässrigen Lösung von 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 0.25% (v:v) Natriumdesoxycholat und 0.02% (w:v) NaN₃ in Wasser eluiert.^[7] Mit einem Refraktometer (Knauer) wurden drei Fraktionen nachgewiesen, von denen jede zuerst gegen 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl und 0.02% (w:v) NaN₃ in Wasser (drei Tage), dann gegen 0.2 M NaCl in Wasser (drei Tage) und schließlich gegen Wasser (drei Tage) dialysiert wurde. Nach Lyophilisierung wurden die Fraktionen zunächst mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE, 10-proz. Trenngel) analysiert: Die erste Fraktion (4 mg, 4% der LPS) bestand aus einem Polysaccharid, das mit SDS-PAGE nicht detektiert werden konnte und dessen Struktur derzeit untersucht wird, und die beiden anderen Fraktionen, 2 (63 mg, 63% der LPS) und 3 (27 mg, 27% der LPS), bestanden aus unterschiedlichen Anteilen der beiden LPS, von denen eines das Caryophyllan und das andere das Cayan-O-Antigen enthält. Aufgrund der Säurelabilität der glycosidischen Bindung der Caryophyllose wurden die vereinigten Fraktionen 2 und 3 (90 mg) unter schonenden Bedingungen hydrolysiert (2 mL 1-proz. wässr. Essigsäure, 100 °C, 2 h). Das dabei abgespaltene Lipoid A (Sediment) und die Mischung aus Cayan und Hydrolyseprodukten (Überstand) wurden nach Ultrazentrifugation (100 000 × g, 4 °C, 1 h) erhalten. Der Überstand wurde lyophilisiert (Ausbeute: 50 mg, 50% der LPS) und anschließend durch Säulenchromatographie (3 × 50 cm, Sephadex G-50 (Pharmacia), Elution mit Pyridin/Essigsäure/Wasser (4:10:1000, v:v:v), pH 4.5) aufgetrennt, wobei mit einem Refraktometer detektiert wurde. Die beim Ausschlussvolumen der Säule eluierte Fraktion enthielt reines Cayan (10 mg, 10% der LPS), während später eluierte Fraktionen hauptsächlich Caryophyllose-Oligomere enthielten.

Desacetylierung des Caryans: 5 mg des Caryans wurden in 1 mL 10 mM NaOH gelöst und 16 h bei 20–22 °C inkubiert. Die Lösung wurde mit Dowex 50WX8 (H⁺) neutralisiert und dann lyophilisiert (Ausbeute: 4.1 mg, 82%).

Bestimmung der Molekülgröße: 1 mg Cayan wurde in 0.5 mL 50 mM NH₄HCO₃ gelöst und über Chromatographie an einer Sephadryl-S-300-HR-Säule (1 × 30 cm (Pharmacia), Elution mit 50 mM NH₄HCO₃, Flussgeschwindigkeit 0.4 mL min⁻¹) getrennt. Die Detektion erfolgte mit einem Refraktometer. Die Säule war zuvor unter Verwendung von Dextranen verschiedener Molekülmassen (670, 150, 80, 12 und 5 kDa) kalibriert worden.

NMR-Spektroskopie: Die NMR-Spektroskopie wurde bei 500 und 750 MHz mit Varian-UNITY-INOVA-500 und -750-Spektrometern durchgeführt. Die Proben wurden jeweils in 0.6 mL D₂O aufgenommen und bei

37°C vermessen. Die chemischen Verschiebungen sind relativ zu Aceton angegeben ($\delta = 2.225$ für ^1H und 31.4 für ^{13}C). Homo- und heteronukleare Experimente wurden wie beschrieben ausgeführt,^[11] mit der Ausnahme, dass NOESY-Daten bei einer Mischzeit von 40 ms erhalten wurden.

Molecular Modeling: Molecular-Modeling-Untersuchungen wurden unter Verwendung des im Discover-Programm implementierten CVFF-Kraftfelds durchgeführt.^[12] Das Caryosemodell wurde unter der Annahme von Standard-Bindungslängen und -winkeln mit dem InsightII-Programm (MSI, San Diego) konstruiert. Moleküldynamik-Simulationen wurden für ein Trisaccharidfragment in einer Wasserbox mit 40 Å Seitenlänge bis zu 400 ps lang und mit einer Schrittzeit von 1 fs durchgeführt. Die Koordinaten wurden alle 2 ps gespeichert.

Eingegangen am 26. Mai 1999,
veränderte Fassung am 20. September 1999 [Z13465]

- [1] U. Mamat, U. Seydel, D. Grimmecke, O. Holst, E. T. Rietschel in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Vol. 3 (Hrsg.: D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, B. M. Pinto), Elsevier, Oxford, **1998**, S. 179.
- [2] Y. Y. Knirel, N. K. Kochetkov, *Biochemistry (Engl. Transl.)* **1994**, *59*, 1325–1383.
- [3] P.-E. Jansson in *Endotoxin in Health and Disease* (Hrsg.: H. Brade, D. C. Morrison, S. Opal, S. Vogel), Marcel Dekker, New York, **1999**, S. 155.
- [4] L. K. Jones, *Phytopathology* **1941**, *31*, 199.
- [5] M. Adinolfi, M. M. Corsaro, C. De Castro, R. Lanzetta, M. Parrilli, A. Evidente, P. Lavermicocca, *Carbohydr. Res.* **1995**, *267*, 307–311.
- [6] M. Adinolfi, M. M. Corsaro, C. De Castro, A. Evidente, R. Lanzetta, L. Mangoni, M. Parrilli, *Carbohydr. Res.* **1995**, *274*, 223–232.
- [7] C. De Castro, A. Evidente, R. Lanzetta, P. Lavermicocca, E. Manzo, A. Molinaro, M. Parrilli, *Carbohydr. Res.* **1998**, *307*, 162–172.
- [8] M. Adinolfi, M. M. Corsaro, C. De Castro, A. Evidente, R. Lanzetta, A. Molinaro, M. Parrilli, *Carbohydr. Res.* **1996**, *284*, 111–118.
- [9] M. Caroff, A. Tacken, L. Szabo, *Carbohydr. Res.* **1988**, *175*, 273–282.
- [10] S. Hakomori, *J. Biochem.* **1964**, *51*, 205–208.
- [11] E. V. Vinogradov, B. O. Petersen, J. E. Thomas-Oates, J. Ø. Duus, H. Brade, O. Holst, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28122–28131.
- [12] A. T. Hagler, S. Lifson, R. Dauber, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5122–5130.

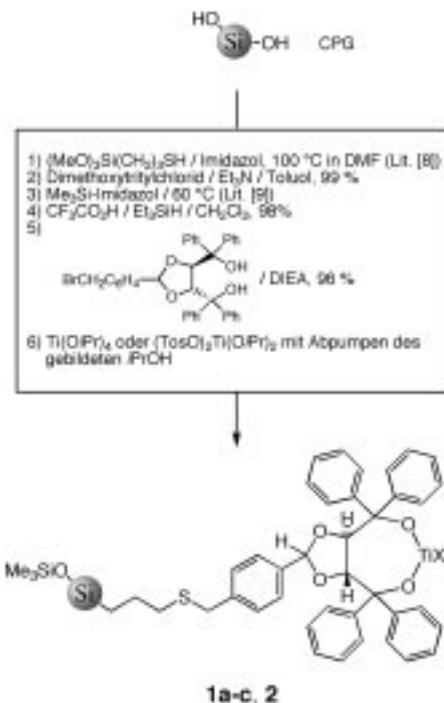
Verankerung von TADDOL auf porösem Kieselgel mit hoher Beladung und erste Anwendungen in der enantioselektiven Katalyse**

Alexander Heckel und Dieter Seebach*

Die Verankerung organischer Verbindungen für die Festphasensynthese und für die Katalyse (auch mit Enzymen)^[1] auf (oder in) hochporösem SiO_2 anstelle von organischen Polymeren (z.B. durch quervernetzende Copolymerisationen)^[2–4] ist mit folgenden Vorteilen verbunden:^[5, 6] Die erhaltenen

Materialien sind formstabil und quellen nicht in Lösungsmitteln, weshalb sie bei höheren und tieferen Temperaturen, aber auch bei hohen Drücken verwendbar sind; die Beladung mit funktionellen Gruppen kann je nach Porosität hoch sein; die SiO_2 -Oberfläche kann hydrophobiert werden; das Trägermaterial ist – außer gegen starke Alkalien oder Fluorid – chemisch inert.

Zum Vergleich mit TADDOL-Liganden, die an Merrifield-Harz verankert oder in Polystyrol eingebettet sind,^[3, 4] haben wir jetzt ein TADDOL-Derivat auf künstliches CPG („controlled-pore glass“)^[7] verschiedener Porengröße aufgepropft, die SiO_2 -Oberfläche hydrophobiert, die TADDOL-Einheiten titaniert (Schema 1, Tabelle 1) und den Einsatz der resultierenden Materialien (**1a–c** und **2**) in der Lewis-Säure-vermittelten enantioselektiven Addition von Et_2Zn an Benzaldehyd und der (3+2)-dipolaren Cycloaddition von Diphenylnitron an *N*-Crotonoyl-1,3-oxazolidin-2-on^[12] getestet (beides sind Reaktionen mit linearer Beziehung zwischen der



Schema 1. Herstellung der CPG-gebundenen TADDOL-Derivate **1a–c** und **2** ($X = \text{OTos}$, $\text{O}i\text{Pr}$). Die quantitative Reaktionskontrolle erfolgte durch den Nachweis der freien SH-Gruppen^[10] oder durch Abspalten und anschließenden quantitativen Nachweis des stabilen Dimethoxytrityl-Kations.^[11] Zur semiquantitativen Kontrolle der Hydrophobierung wurde eine Lösung von Methylrot in Benzol verwendet.^[5] Die angegebenen Ausbeuten beziehen sich auf die Herstellung des 200-Å-Materials, das verwendete TADDOL-Derivat ist in Lit. [3] beschrieben. – DIEA = Diisopropylethylamin (Hünig-Base); Tos = Toluol-4-sulfonyl.

Tabelle 1. Spezifikation der auf CPG immobilisierten TADDOL-Derivate **1** und **2**.

Verb.	X	Beladung [mmol g ⁻¹]	Poredurchmesser [Å]
1a	$\text{O}i\text{Pr}$	0.32	200
1b	$\text{O}i\text{Pr}$	0.08	200
1c	$\text{O}i\text{Pr}$	0.12	500
2	OTos	0.32	200

[*] Prof. Dr. D. Seebach, Dipl.-Chem. A. Heckel
Laboratorium für Organische Chemie der
Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich
ETH-Zentrum, Universitätstrasse 16, 8092 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 1-632-11-44
E-mail: seebach@org.chem.ethz.ch

[**] Wir danken der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der chemischen Industrie e.V. (Frankfurt) und dem BMBF für ein Kekulé-Stipendium (A.H.) sowie den Firmen Grace und Witco GmbH für großzügige Hochschullieferungen von CPG bzw. Et_2Zn .