

KONFORMATIONSANALYSE DER VERZWEIGTEN PENTASACCHARID-SEQUENZ DER “BISECTED” STRUKTUR VON N-GLYCOPROTEINEN*

HANS PAULSEN, THOMAS PETERS, VOLKER SINNWELL, MATTHIAS HEUME

*Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6; D-2000 Hamburg
13 (Bundesrepublik Deutschland)*

UND BERND MEYER

*Fachbereich Chemie der Universität Oldenburg, Ammerländer Heerstraße 67; D-2900 Oldenburg
(Bundesrepublik Deutschland)*

(Eingegangen am 30. Dezember 1985; angenommen am 2. Februar 1986)

ABSTRACT

In the conformational analysis of the pentasaccharide α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)]-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc, which represents the essential core structure within the bisected type of N-glycoproteins, n.m.r. experiments and GESA calculations indicated that a *gg* conformation is preferred for the (1 \rightarrow 6)-glycosidic linkage. This is in contrast to the results obtained for the tetrasaccharide α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc, which indicated that a *gt* conformation with the (1 \rightarrow 6)-linked α -D-mannose group folded back is preferred. The conformations of the remaining glycosidic linkages in the tetra- and penta-saccharide are similar.

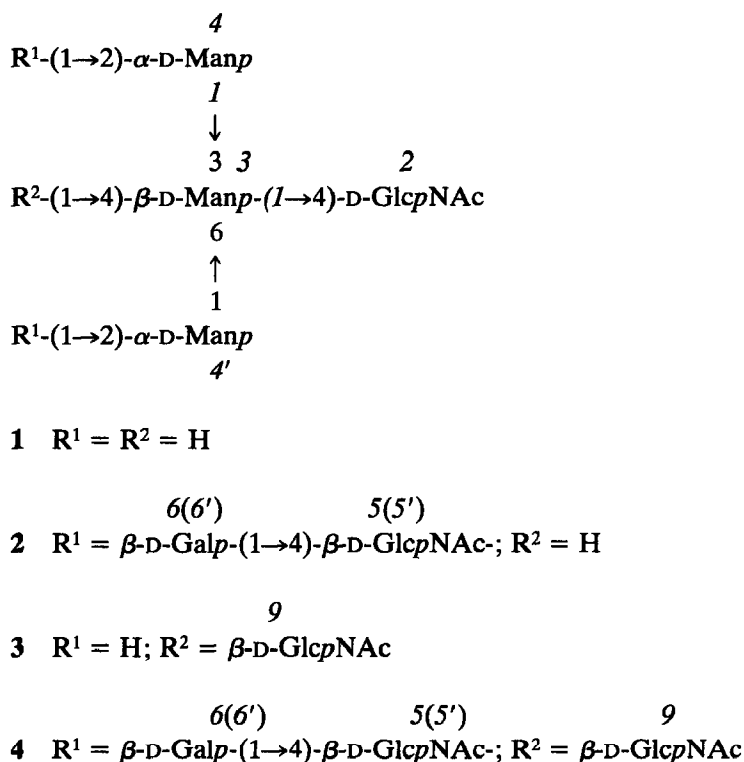
ZUSAMMENFASSUNG

Für das Pentasaccharid α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-[β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)]-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc, das das essentielle Verzweigungsglied der “bisected” Struktur von N-Glycoproteinen darstellt, wird eine Konformationsanalyse durchgeführt. N.m.r.-spektroskopische Untersuchungen und GESA-Berechnungen führen zu dem Ergebnis, daß bezüglich der (1 \rightarrow 6)-glycosidischen Bindung eine *gg*-Konformation bevorzugt ist. Dieses Verhalten weicht von dem des Tetrasaccharides α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Manp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc ab, bei dem für die (1 \rightarrow 6)-glycosidische Bindung die Bevorzugung einer *gt*-Konformation mit Rückfaltung der (1 \rightarrow 6)-glycosidisch gebundenen α -D-Mannose beobachtet wird. Die Konformationen an den übrigen glycosidischen Verknüpfungen im Tetra- und Pentasaccharid sind ähnlich.

*XXVI. Mitteilung der Serie “Konformationsanalyse”. XXV. Mitteil., siehe Zit. 1.

EINFÜHRUNG

In vorhergehenden Arbeiten hatten wir die bevorzugte Konformation des Tetrasaccharides **1** und des Octasaccharides **2** in Lösung untersucht^{1,2}. Beide Verbindungen enthalten das verzweigte Strukturelement, das in den komplexen Saccharidketten der *N*-Glycoproteine vorkommt. Die Analyse ergab, daß die bevorzugten Konformationen von **1** und **2** recht ähnlich sind. Man beobachtet eine bevorzugte "backbone"-Konformation für den Teil des Moleküls, der nur Glycosid-Verknüpfungen mit sekundären Hydroxylgruppen enthält. Es ist dies der (1→3)-glycosidisch an die zentrale β -D-Mannose geknüpfte Arm, der in **1** die Saccharid-Einheiten 4, 3 und 2 und in **2** die Einheiten 6, 5, 4, 3 und 2 umfaßt. Der (1→6)-glycosidisch an die β -D-Mannose geknüpfte Arm ist dagegen der flexible Teil des Moleküls, da die (1→6)-Verknüpfung infolge der zusätzliche Beweglichkeit um die C-5-C-6-Bindung mehrere Minima liefern kann. Die Flexibilität bezieht sich auf die Einheit 4' in **1** und die Sequenz 6', 5' und 4' in **2**.



Scheme 1. Numerierung der Saccharideinheiten nach Michalski *et al.*⁴ und Vliegenthart *et al.*^{3,5}. Die nicht eingezeichnete Einheit I ist an Asn gebunden.

Es wurde gefunden, daß in **1** und in **2** für den (1→6)-Arm eine *gt*-Konformation bevorzugt ist, bei der dieser so orientiert ist, daß sich die 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit **2** und die D-Mannose-Einheit **4'** nahe kommen. Die Bevorzugung dieser Konformation konnte experimentell abgesichert werden, da bei **2** in der α - und β -Form unterschiedliche selektive Entschirmungseffekte auftreten, die auf eine Wechselwirkung zwischen den Einheiten **2** und **4'** zurückgeführt werden müssen. Die gebogene *gt*-Konformation für den (1→6)-Arm dürfte für **1** und **2** vorherrschend sein.

Es sei darauf hingewiesen, daß wir einen Vergleich der bevorzugten Konformation von **2** in Lösung mit einer Konformation im Kristall durchführen konnten^{2,6}. Die Kristallstruktur liegt vom Immunglobulin IgG₁ vor⁷⁻⁹, das im Fc-Fragment zwei sich gegenüberliegende *N*-glycosidische Kohlenhydratketten besitzt, die die Struktur enthalten. Es zeigt sich, daß die "backbone"-Konformationen der Einheiten **6**, **5**, **4**, **3** und **2** in Lösung und im Kristall recht ähnlich sind. Der (1→3)-Arm dürfte den hydrophilen Teil der Kette repräsentieren. Der (1→6)-Arm besitzt jedoch im Kristall, gegenüber der Konformation in Lösung, eine vollständig andere Anordnung. Der (1→6)-Arm liegt mit seiner hydrophoben Seite auf hydrophoben Teilen der Proteinkette. Dies dient offensichtlich der Stabilisierung der Proteinkette des Fc-Fragmentes.

Die Konformation des flexiblen (1→6)-Arms ist somit das interessierende Problem. Wir haben jetzt zum Vergleich die Konformation des Pentasaccharides **3** untersucht. Dieses Pentasaccharid enthält das Verzweigungselement der sogenannten "bisected" Struktur **4**. In **3** und **4** ist zusätzlich in (1→4)-glycosidischer Verknüpfung eine 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit gebunden. Diese Einheit dürfte die Konformation des (1→6)-Arms erheblich beeinflussen und diese gegenüber **1** wesentlich verändern¹⁰. Ein Vergleich von **1** und **3** ist auch deshalb von Interesse, da bekannt ist, daß die Einführung der zusätzlichen "bisected" Gruppe an der β -D-Mannose-Einheit **3** den weiteren biochemischen Aufbau der *N*-Glycoproteinketten zum Lactosamin-Typ unterbindet¹¹. Eine Konformationsänderung des (1→6)-Armes könnte hierbei von Bedeutung sein.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Detail wurde die angewandte Methode der Konformationsanalyse in den vorhergehenden Mitteilungen beschrieben^{1,2}. Es wird zunächst eine Berechnung der energetisch günstigsten Konformeren nach dem HSEA-Verfahren mit dem Programm GESA¹² durchgeführt. Dabei werden die Saccharideinheiten als starr angenommen und die Koordinaten Röntgenstruktur- oder Neutronenbeugungsanalysen entnommen. Für die Berechnung der Konformationen werden van-der-Waals Wechselwirkungsenergien sowie der *exo*-anomere Effekt zugrunde gelegt. Mit dem GESA-Programm lassen sich die Minimum-Konformationen von großen Molekülen, wie **2** und **4**, unter Einschluß aller glycosidischen Bindungen direkt berechnen. Die gewonnenen Vorstellungen über die dreidimensionale

Struktur der Kohlenhydratkette ist dann durch N.m.r.-Experimente in wässriger Lösung zu überprüfen. Hierzu ist eine vollständige Analyse des ^1H -N.m.r.-Spektrums notwendig. Für die Zuordnung ist die Zuhilfenahme ^1H , ^1H - und ^{13}C , ^1H -korrelierter 2D-N.m.r.-Spektren^{13,14} erforderlich. In der vorliegenden Untersuchung wurde zusätzlich die Relayed-Spektroskopie^{15–17} und das phasensensitive COSY-Experiment^{18,19} eingesetzt. Im Anschluß erlauben sorgfältig durchgeführte n.O.e.-Experimente eine detaillierte Konformationsanalyse^{20–23}. Aus beobachteten interglycosidischen n.O.e.-Daten können Abstände zwischen Protonen unterschiedlicher Saccharideinheiten festgestellt werden, die wiederum Aufschlüsse über die Konformation erlauben. Durch Beobachtung von speziellen Entschirmungen können diese Ergebnisse gestützt werden.

Berechnung der energetisch günstigen Konformeren. — Die begünstigte Konformation des Pentasaccharides **3** wird nach dem HSEA-Verfahren berechnet. Mit Hilfe des Programms GESA ist es möglich, ausgehend von bestimmten Startkonformationen, sämtliche Diederwinkel ϕ und ψ an den glycosidischen Bindungen sowie die Diederwinkel ω an den C-5–C-6-Bindungen nach dem Newtonschen Näherungsverfahren zu optimieren, bis ein Minimum erreicht ist. Da meist Nebenminima existieren, muß durch eine geeignete Wahl der Startgeometrie dafür gesorgt werden, daß das Hauptminimum optimiert wird. Für glycosidische Bindungen, an denen nur sekundäre Hydroxylgruppen beteiligt sind, liegen die Nebenminima mehr als 10 kJ/mol über dem Hauptminimum und spielen deshalb keine Rolle. Die Konformation an diesen glycosidischen Bindungen wird deutlich durch den *exo*-anomeren Effekt beeinflusst, und eine geeignete Startgeometrie ist daher leicht zu bestimmen. Für die aus den Saccharideinheiten 2, 3, 4 und 9 gebildete Tetrasaccharid-Teilstruktur in **3** dürfte damit eine Anordnung bevorzugt sein, wie sie ähnlich auch in **1** gefunden wird.

Wie beim Tetrasaccharid **1** ist auch bei **3** die Frage der Konformation an der (1→6)-glycosidischen Bindung das besondere Problem. Der Diederwinkel ϕ wird hauptsächlich durch den *exo*-anomeren Effekt bestimmt und ist deshalb nur in einem begrenzten Bereich variabel. Die Größen der Diederwinkel ψ und ω sind nicht ohne weiteres vorhersagbar. Bezüglich des Diederwinkels ω kann grob zwischen drei möglichen Konformeren unterschieden werden, die man als *gg*-($\omega - 60^\circ$), *gt*-($\omega 60^\circ$) und *tg*-($\omega 180^\circ$) Konformere bezeichnet.

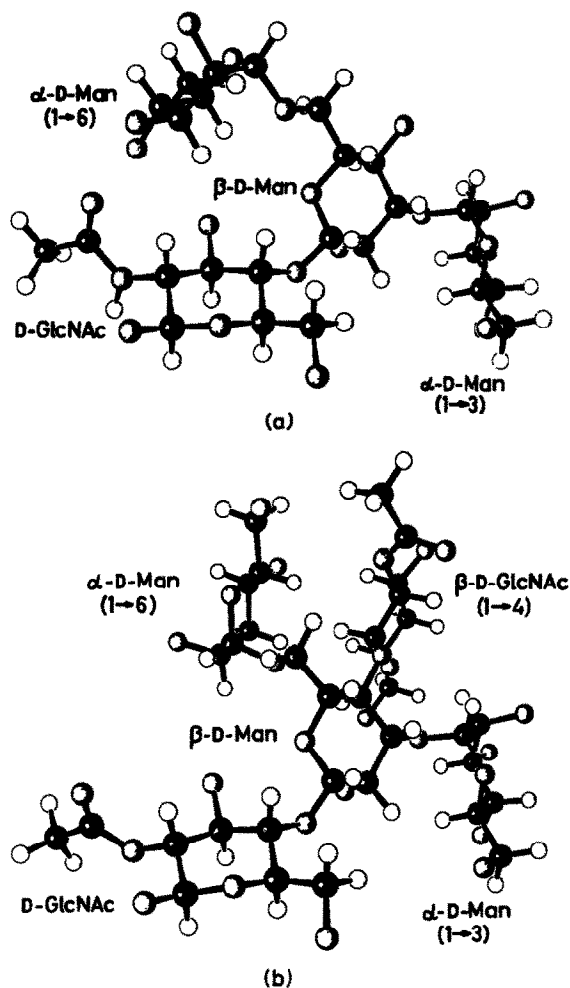
Um geeignete Anfangswerte für die Diederwinkel ω und ψ zu erhalten, werden bei **3** diese beiden Winkel jeweils in 10° -Schritten von 0 bis 360° inkrementiert. Für jede ψ - ω -Kombination werden die übrigen Diederwinkel optimiert, bis ein Energieminimum erreicht ist. Von den so erhaltenen Strukturen werden diejenigen, die weniger als 10 kJ/mol über der energetisch günstigsten Startkonformation liegen, optimiert.

Es ergeben sich dann für **3** drei energiearme Konformere A, B und C, deren Diederwinkel in Tab. I zusammengefaßt sind. A und B sind *gg*-Konformere, C ist ein *gt*-Konformer. Die beiden *gg*-Konformeren sind ähnlich und unterscheiden sich geringfügig in der Orientierung der (1→3)-glycosidisch gebundenen α -D-Mannose-

TABELLE I

DIEDERWINKEL IN DEN MIT GESA BERECHNETEN ENERGETISCH GÜNSTIGSTEN KONFORMEREN A, B UND C

Bindung									Relative Energie [kJ/mol]	Konformer
4'-(1→6)-3		9-(1→4)-3		4-(1→3)-3		3-(1→4)-2		C-5-C-6 β-D-Man ω		
φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ	φ	ψ			
-59	152	58	3	-48	-15	59	-2	-66	0.00	A (gg)
-58	155	61	-4	-42	2	58	-2	-67	0.21	B (gg)
-57	179	57	-3	-41	5	56	7	48	1.80	C (gt)

Abb. 1. Die energetisch günstigsten Konformationen von (a) 1 und (b) 3 als Kugel-Stab-Darstellung (Plot-Programm SCHAKAL³⁴).

Einheit. Die Tab. I zeigt, daß im Pentasaccharid **3** die *gg*-Konformationen A und B beide eine niedrige Energie aufweisen.

Die (1→6)-glycosidisch gebundene α -D-Mannose-Einheit in **3** sollte damit bevorzugt eine *gg*-Konformationen einnehmen. Somit unterscheidet sich **3** deutlich von **1**, das eine *gt*-Konformation bevorzugt, bei der eine Rückfaltung der α -D-Mannose-Einheit 4' zur reduzierenden 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit **2** auftritt. Der Unterschied der beiden Konformationen wird beim Vergleich der Molekülmodelle für die günstigsten Konformationen von **1** (Abb. 1a) und **3** (Abb. 1b) besonders deutlich.

Für eine detaillierte Analyse ist auch die Form der Energieminima von Bedeutung. So ergibt ein flaches Minimum im Vergleich zu einem mehr steilen Minimum unterschiedliche Anteile der Konformeren an der betreffenden Bindung. Dies ist besonders für (1→6)-glycosidische Bindungen von Bedeutung, da hier Anteile unterschiedlicher Konformeren auftreten. Daher ist es sinnvoll, die Form des *gg*- wie des *gt*-Minimums bei **3** näher zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden die Energiehyperflächen, die sich durch Variation der Diederwinkel ψ und ω an der (1→6)-glycosidischen Bindung ergeben, in der Umgebung des *gg*- und des *gt*-Minimums errechnet. Wie oben beschrieben, werden die übrigen Diederwinkel für jede ψ - ω -Kombination optimiert. Die Hyperfläche (Abb. 2a) beschreibt das *gg*-Minimum. Diederwinkel ψ nimmt in 5°-Schritten Werte von 130 bis 215° an. Diederwinkel ω überdeckt, ebenfalls in 5°-Inkrementen, einen Bereich von -100

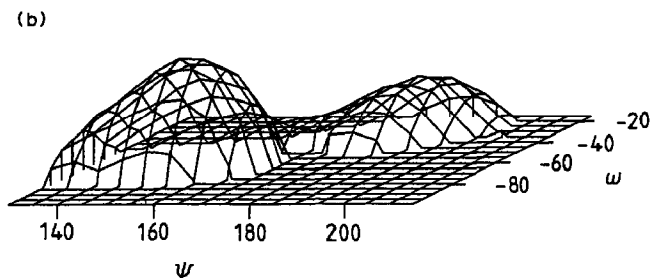
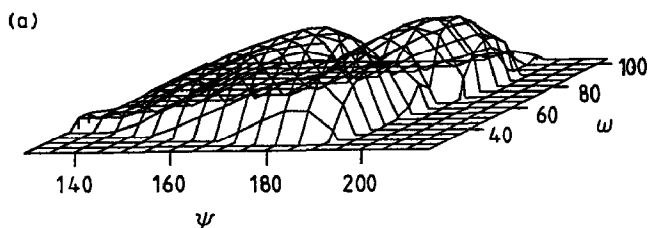


Abb. 2. (a) Das *gt*-Minimum in Abhängigkeit von den Diederwinkeln ψ und ω ; (b) das *gg*-Minimum in Abhängigkeit von den Diederwinkeln ψ und ω .

bis -15° . Die Hyperfläche (Abb. 2b) zeigt das *gt*-Minimum. Diederwinkel ψ liegt wieder zwischen 130 und 215° , Diederwinkel ω nimmt Werte von 20 bis 105° an. Die Schrittweite beträgt ebenfalls 5° . Es zeigt sich, daß die beiden Energieflächen ähnliche Ausdehnungen aufweisen. In grober Näherung kann man daher die Energieinhalte des *gg*- und des *gt*-Minimums zu einer Abschätzung des *gg:gt*-Konformerenverhältnisses heranziehen. Hierbei ergibt sich ein Wert von *gg:gt* $\approx 7:3$. Mit Hilfe der nachfolgend beschriebenen N.m.r.-Experimente lassen sich die so gewonnenen Befunde gut bestätigen.

Analyse des ^1H - und ^{13}C -N.m.r.-Spektrums von 3. Anwendung des Relayed-COSY- und des phasensensitiven COSY-Experimentes. — Das Pentasaccharid 3 liegt als α,β -Anomerengemisch vor ($\alpha:\beta$ wie $3:1$). Die folgenden Angaben beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf das α -Anomere von 3. Die anomeren Protonen der 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheiten lassen sich aufgrund ihrer charakteristischen Kopplungskonstanten $J_{1,2}$ ($\alpha \sim 3.0$, $\beta \sim 8.0$ Hz) eindeutig zuordnen. Problematisch ist die Zuordnung der anomeren Protonen der drei Mannose-Einheiten mit den Kopplungskonstanten $J_{1,2} \sim 1.5$ Hz für α - und β -Verknüpfung. Auch die chemischen Verschiebungen der anderen Protonen erlauben keine sichere Differenzierung. Die später beschriebenen n.O.e.-Experimente bestätigen die durch COSY-Experimente getroffene Zuordnung.

Ausgehend von den anomeren Protonen liefert das $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experiment¹³ die chemischen Verschiebungen der Protonen H-2 und teilweise auch H-3 von β -D-Mannose- 3 und α -D-Mannose-Einheit 4. Eine weitergehende Interpretation ist mit Hilfe des einfachen $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrums nicht möglich. Als sehr gut geeignet erweisen sich hierzu Relayed-COSY-Experimente¹⁵⁻¹⁷.

Nach Eich *et al.*¹⁵ bietet das ^1H -Relayed $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Experiment die Möglichkeit, nicht nur direkt miteinander koppelnde Protonen zu korrelieren, sondern durch Magnetisierungstransfer über ein sogenanntes Relay-Proton eine Korrelation von Protonen zu erreichen, die als gemeinsamen Partner dieses Relay-Proton besitzen. Grundsätzlich ist es möglich, Magnetisierung über mehrere Relay-Protonen zu transferieren. Mit Hilfe des TOCSY (Totally Correlated Spectroscopy)-Experimentes²⁴ lassen sich sogar alle miteinander koppelnden Protonen gemeinsam anregen.

Der limitierende Faktor bei diesen Experimenten ist die Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 . Dies soll kurz erläutert werden. Die beim Relayed-COSY-Experiment angewandte Impulsfolge (I)

$$90^\circ - t_1 - 90^\circ - \pi/2 - 180^\circ - \pi/2 - 90^\circ - t_2 \quad (I)$$

beinhaltet als kritischen Parameter die Zeit τ . Da die Intensität I eines Relay-Cross-Peaks für ein AMX-System mit $J_{AX} = 0$ Hz, wie es bei Sacchariden häufig zu finden ist, durch die Proportionalität (2) gegeben ist¹⁷, läßt sich leicht nachvollziehen, daß

$$I \sim \sin(\pi J_{AM} \tau) \sin(\pi J_{MX} \tau) \exp(-\tau/T_2) \quad (2)$$

die optimale Wahl für τ bei $J_{AM}, J_{MX} \gg T_2^{-1}$ sich nach Bax¹⁷ (Gleichung 3) ergibt.

$$\tau = (J_{AM} + J_{MX})^{-1} \quad (3)$$

Für Oligosaccharide wie das Pentasaccharid **3** sind J_{AM} und J_{MX} von der Größenordnung T_2^{-1} . Nach Bax¹⁷ liefern dann τ -Werte, die 10–30% kleiner als die durch Gleichung (3) bestimmten Werte sind, optimale Ergebnisse. Dies läßt sich auch bei unseren Experimenten mit **3** bestätigen. Zu beachten ist, daß bei kurzen Spin-Spin-Relaxationszeiten T_2 die Intensität der Relay-Cross-Peaks nach (2) stark abnimmt, so daß lange Meßzeiten erforderlich werden können. Besonders bei Korrelation über 2 oder 3 Relay-Protonen kann dies zu einem erheblichen Aufwand an Meßzeit führen. Bei der Optimierung des Parameters τ für ein Relayed-COSY-Experiment am Pentasaccharid **3** sollen möglichst die Kopplungskonstanten berücksichtigt werden, die eine Zuordnung der Protonen H-3 und H-4 der Pyranoseringe ermöglichen. Für das vorliegende Experiment wurden die Modell-Kopplungskonstanten $J_{2,3}$ (Mannose) 3.5 Hz und $J_{3,4}$ (Mannose) 9.5 Hz für die Berechnung von τ ausgewählt. Nach (3) ergibt sich für τ damit ein Wert von 73 ms. Wie oben beschrieben, liegt der optimale τ -Wert für das Pentasaccharid **3** 10–30% unter dem so bestimmten Wert, so daß das Experiment mit einer Zeit τ 66 ms durchgeführt wurde. Abb. 3 zeigt das Ergebnis der Messung.

Es fällt auf, daß auch für die Spinsysteme, für die die ausgewählten Kopplungskonstanten keinen optimalen Magnetisierungstransfer gewährleisten, wie z.B. die Protonen H-1⁹, H-2⁹ und H-3⁹ der "bisecting" 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit, deutliche Relay-Cross-Peaks zu beobachten sind.

Mit Hilfe des Relayed-COSY-Experimentes (Abb. 3) lassen sich für H-3², H-3³, H-3⁴, H-4⁴ und alle Protonen der Einheit 9 Zuordnungen treffen. Abb. 3 zeigt weiter, daß auch schwache Cross-Peaks zu beobachten sind, die einem Magnetisierungstransfer über zwei Relay-Protonen entsprechen. So ist z.B. eine Korrelation zwischen dem anomeren Proton H-1⁹ und dem Proton H-4⁹ sichtbar. Die Ursache für diesen doppelten Magnetisierungstransfer liegt in der Imperfektion des 180°-Impulsen in Sequenz¹⁷ (I).

Aufbauend auf den so gewonnenen Informationen gelingt die vollständige Zuordnung aller Protonen mit Hilfe eines phasensensitiven ¹H,¹H-COSY-Experimentes. Für die Aufnahme dieses Spektrums wird die TPPI (Time Proportional Phase Increment)-Methode nach Marion und Wüthrich angewandt¹⁹. Man erhält so Cross-Peaks, die keinen Dispersionsanteil mehr aufweisen und deshalb phasenkorrigiert werden können. Durch geeignete Wahl der spektralen Breite wird eine digitale Auflösung von 0.9 Hz/Pt erreicht, die es ermöglicht, anhand der Cross-Peaks Kopplungskonstanten zu analysieren. Durch genaue Analyse aller Cross-Peaks gelingt die eindeutige Zuordnung aller Protonen im Pentasaccharid **3**. Abb. 4 zeigt einen Ausschnitt aus dem phasensensitiven ¹H,¹H-COSY-Spektrum, in dem die Cross-Peaks zugeordnet sind.

Die vollständige Interpretation des ¹³C-N.m.r.-Spektrums von **3** gelingt mit

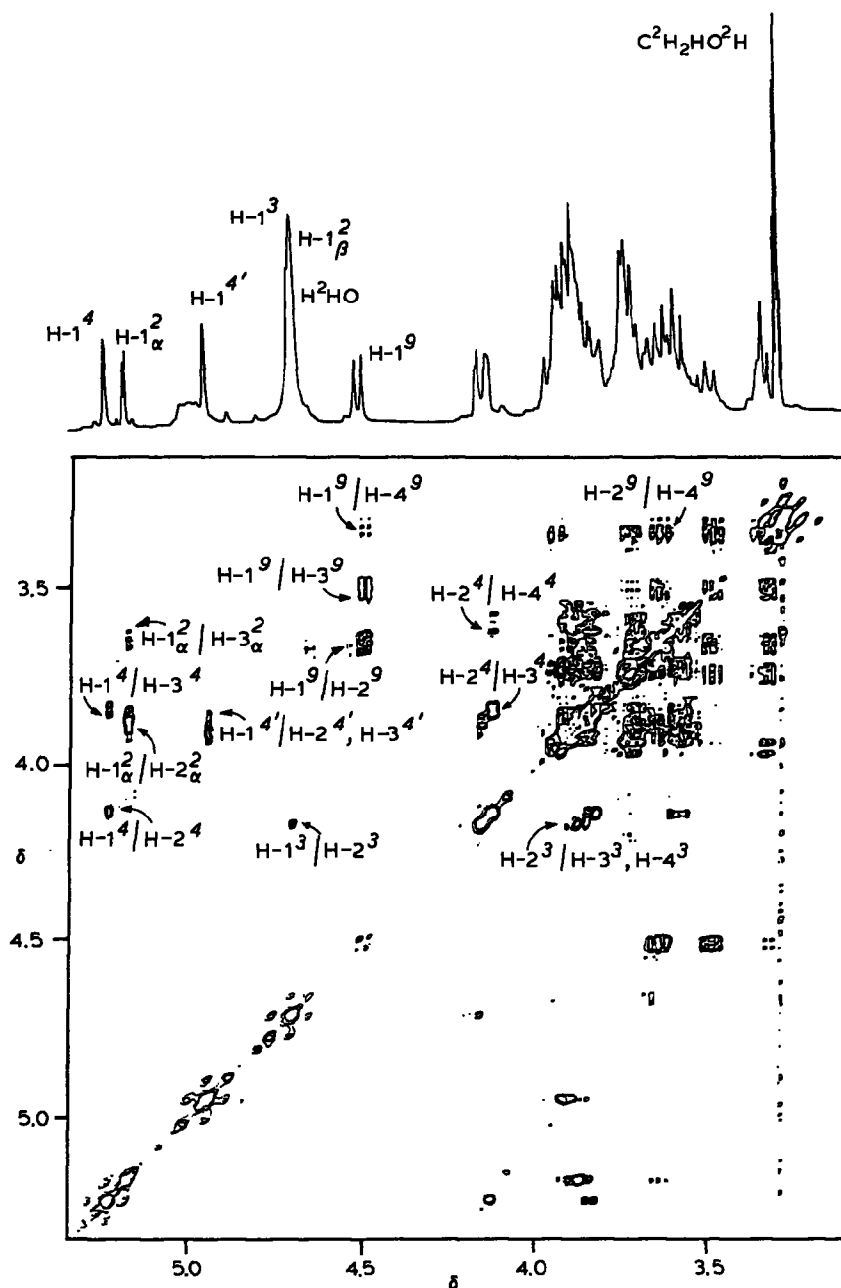


Abb. 3. 400 MHz-Relayed-COSY-Spektrum von 3. Angewandte Impulssequenz: $90^\circ - t_1 - 90^\circ - D2 - 180^\circ - D2 - 90^\circ - t_2$. Die Aufnahme erfolgte mit 512 Inkrementen in t_1 und 2 k Datenpunkten in t_2 . Durch Zerofilling wurde eine Datenmatrix von $1K(t_1) \times 2K(t_2)$ erhalten. Die Spektrenbreite betrug 1773 Hz in $F1$ und $F2$. Die Delay-Zeit $D2$ wurde zu 33 ms gewählt. Vor der Fouriertransformation wurde eine sine-bell-Multiplikation in t_1 und t_2 durchgeführt.

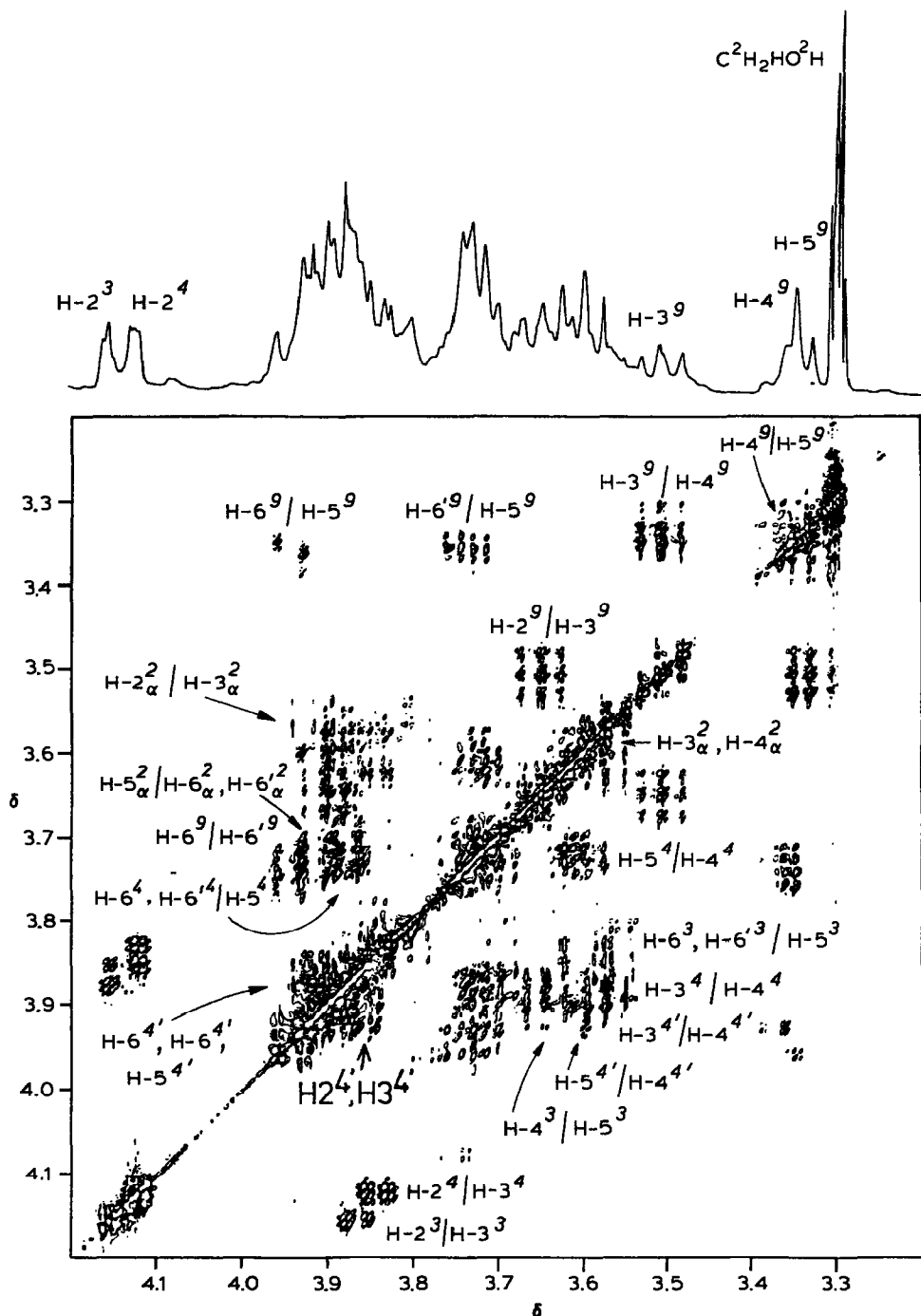


Abb. 4. 400 MHz-Phasensensitives COSY-Spektrum von 3. Angewandte Impulssequenz: $90^\circ - t_1 - 90^\circ - t_2$. Es wurde die TPPI-Methode¹⁹ angewandt. Die Aufnahme erfolgte mit 512 Inkrementen in t_1 und 2 k Datenpunkten in t_2 . Durch Zerofilling erhält man eine Datenmatrix von $2K(t_1) \times 2K(t_2)$. Eine Spektralbreite von 917 Hz in F_1 und F_2 ergibt eine digitale Auflösung von 0.89 Hz/Punkt. Vor der Fouriertransformation wurde eine sine-bell-Multiplikation in t_1 und t_2 durchgeführt.

Hilfe eines ^1H , ^{13}C -COSY-Experimentes¹⁴. Zur Analyse des ^1H , ^{13}C -COSY-Spektrums werden die ^1H -N.m.r.-Daten von **3** sowie tabellierte ^{13}C -chemische Verschiebungen verwandter Verbindungen^{1,2} herangezogen. In Tab. II sind die vollständigen ^1H -N.m.r.-Daten, in Tab. III die ^{13}C -N.m.r.-Daten für das Pentasaccharid **3** zusammengefaßt.

n.O.e.-Experimente und Diskussion chemischer Verschiebungen. — n.O.e.-Experimente ermöglichen es, das durch HSEA-Berechnungen gewonnene Modell für die Konformation von **3** in wässriger Lösung zu überprüfen. Unter der Voraussetzung, daß die Molekülbewegung isotrop ist und hauptsächlich Relaxation über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen erfolgt, können relative n.O.e.-Werte nach Gleichung (4) berechnet werden²⁵, in der

$$\text{n.O.e.}_d(s) = K \cdot r_{ds}^{-6}/2 \cdot \sum_{i \neq d} r_{di}^{-6} - K' \cdot \sum_{n \neq d} (r_{dn}^{-6} \cdot \text{n.O.e.}_n(s))/2 \cdot \sum_{i \neq d} r_{di}^{-6} \quad (4)$$

mit d = beobachtetes Proton, s = gesättigtes Proton, n = Zahl der Protonen, die bei Sättigung von s ebenfalls n.O.e.-Werte aufweisen, i = Zahl aller Protonen, über die ein Abbau des n.O.e.-Wertes erfolgt, r = Abstand und K, K' = Konstanten, die für die Berechnung relativer n.O.e.-Werte gleich 1 gesetzt werden können. Gleichung (4) ist die grundlegende Beziehung für die Berechnung relativer

TABELLE II

^1H -CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN (δ) UND KOPPLUNGSKONSTANTEN J [Hz]^a VON **3** IN $^2\text{H}_2\text{O}$ - $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$, 3:1^b

Saccharid-einheit	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	H-6'	NHCOCH ₃
<i>α-Anomeres von 3</i>								
2	5.14 (2.9)	3.86 (10.5)	3.61–3.62		3.94	3.77–3.70		2.03 ^c
3	4.69 (1.0)	4.15 (3.0)	3.87–3.92 (9.6)		3.55	3.86–3.80		
4	5.19 (1.2)	4.12 (3.4)	3.84 (9.6)	3.60 (8.4)	3.72	4.00–3.89		
4'	4.92 (1.3)	3.92 (5.6)	3.88 (9.6)	3.57 (8.4)	3.89	4.00–3.89		
9	4.49 (8.2)	3.65 (10.4)	3.51 (8.4)	3.39–3.32		3.94 (3.4)	3.74 (5.5) (13.2)	2.02 ^c
<i>β-Anomeres von 3</i>								
2	4.64 (8.3)	3.69–3.66						2.03 ^c
3 ^d	4.68 (1.0)	4.15 (3.0)	3.87 (9.6)	3.92	3.55	3.86–3.80		

^aIn Klammern. ^bInnerer Standard: Aceton, δ 2.225, T 305 K. ^cDiese Werte können vertauscht sein. ^dFür 4, 4' und 9 werden gleiche chemische Verschiebungen wie bei dem α -Anomeren gefunden.

TABELLE III

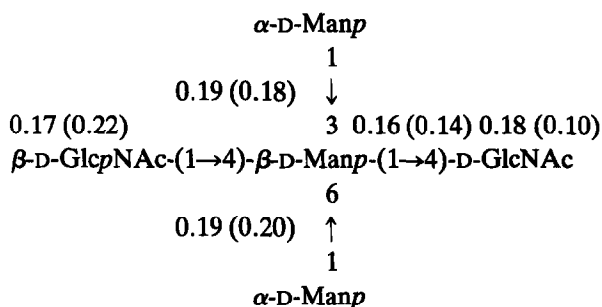
 ^{13}C -CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN (δ) VON **3** IN $^2\text{H}_2\text{O}-\text{C}^2\text{H}_5\text{O}^2\text{H}$, 3:1^a

Saccharid-einheit	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	CO	CH ₃
<i>α-Anomeres von 3</i>								
2	91.66	55.01	74.48	81.33	74.88	61.37	174.87 ^b	23.16 ^b
3	101.33	71.54	78.84	70.31	75.87	66.72		
4	103.19	71.18	71.67	68.39	74.80	62.61 ^c		
4'	101.11	71.35	71.60	68.46	71.18	62.72 ^c		
9	102.33	57.51	74.89	71.66	77.79	62.61	174.68 ^b	22.92 ^b
<i>β-Anomeres von 3</i>								
2 ^d	96.29		73.45	80.89	75.87	61.37	174.87 ^b	23.16 ^b

^aInnerer Standard: Aceton δ 30.50, T 305 K. ^{b,c}Diese Werte können vertauscht sein. ^dFür 3, 4, 4' und 9 werden gleiche chemische Verschiebungen wie bei dem α -Anomeren gefunden.

n.O.e.-Werte in starren Molekülen. Der erste Term in Gleichung (4), der die direkte Wechselwirkung zwischen dem Spin des beobachteten Protons d und dem Spin des gesättigten Protons s beschreibt, ist deutlich größer als der zweite Term, der die indirekte Polarisierung repräsentiert, die durch die Spinwerte der Protonen n hervorgerufen wird. Daher läßt sich Gleichung (4) für die iterative Berechnung von n.O.e.-Werten heranziehen. Dabei wird nach Noggle und Schirmer²⁵ folgendermaßen verfahren: Zunächst werden alle n.O.e.-Werte, die bei Sättigung des Spins s auftreten, näherungsweise unter Verwendung des ersten Terms in Gleichung (4) berechnet. Mit den so erhaltenen Ergebnissen werden nach Gleichung (4) die n.O.e.-Werte neu berechnet. Dieser Zyklus läßt sich beliebig fortsetzen, indem die verbesserten Ergebnisse immer wieder in Gleichung (4) eingesetzt werden. Dabei konvergieren die berechneten n.O.e.-Werte gegen die Werte, die unter Einbeziehung des Effektes der indirekten Polarisierung zu erwarten sind.

Es soll anhand der experimentellen Ergebnisse gezeigt werden, daß der erste Term in Gleichung (4) schon sehr gute Näherungswerte für die relativen n.O.e.-Werte liefert^{26,27}. Wenn man für die beobachteten n.O.e.-Werte eine geschätzte Genauigkeit von $\pm 10\%$ annimmt, liegen die Abweichungen zwischen den nach dem iterativen Verfahren bestimmten Ergebnissen und den unter Verwendung des ersten Terms in Gleichung (4) errechneten Werten im allgemeinen innerhalb dieser Fehlergrenze. Der Effekt der indirekten Polarisierung sollte bei kleineren Molekülen, für die eine genauere Integration der n.O.e.-Werte möglich ist, eine Rolle spielen²⁸. Mit Hilfe einer $^{13}\text{C}-T_1$ -Messung läßt sich zeigen, daß die für die Verwendung von Gleichung (4) wichtige Vorbedingung einer isotropen Molekülbewegung erfüllt ist^{1,2,20}. Die NT_1 -Werte in **3** sind nahezu konstant (siehe Schema 2).



Schema 2. NT_1 -Werte [s] für **3**. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus den NT_1 -Daten für die Pyranosering-C-Atome C-1–C-5 der jeweiligen Saccharideinheit. In Klammern sind die NT_1 -Werte der C-6-Atome der betreffenden Einheiten angegeben.

Das Pentasaccharid **3** zeigt in wässriger Lösung bei Spektrometerfrequenzen von 270 und 400 MHz in einem Temperaturbereich von 285–315° K keine quantitativ auswertbaren n.O.e.-Werte. Die Zugabe von ($^2\text{H}_4$)Methanol zur wässrigen Lösung von **3** ermöglicht eine Erniedrigung der Meßtemperatur und damit verbunden eine Vergrößerung der Korrelationszeit^{2,25} τ_c . Optimale Bedingungen findet man bei 400 MHz und einer Meßtemperatur von 270° K. Durch Vergrößerung der Korrelationszeit τ_c ist man so in einem Bereich, in dem starke negative n.O.e.-Werte beobachtet werden. Dabei ist durch geeignete Wahl der Bestrahlungsdauer dafür Sorge zu tragen, daß es nicht zu "Spin-Pumping"-Effekten²⁵ kommt. Die bei Temperaturen unterhalb von 270° K einsetzende Linienverbreiterung infolge der zunehmenden Viskosität der Lösung macht eine Durchführung von n.O.e.-Experimenten bei noch tieferen Temperaturen nicht möglich. Abb. 5 zeigt alle im Pentasaccharid **3** zu beobachtenden n.O.e.-Werte anhand der zugehörigen Differenzspektren. In Tab. IV sind die beobachteten relativen n.O.e.-Werte zusammengefaßt. Sie werden dort mit den berechneten relativen n.O.e.-Werten verglichen, die nach der oben beschriebenen Methode erhalten werden.

Aus den für die Konformationsanalyse relevanten n.O.e.-Werten lassen sich die folgenden Befunde ableiten. Bei Sättigung des anomeren Protons H-1³ der zentralen Mannose-Einheit **3** wird eine interglycosidische n.O.e.-Abschwächung des Protons H-4² der reduzierenden 2-Acetamido-2-desoxy-glucose-Einheit beobachtet. Der Vergleich berechneter und beobachteter relativer n.O.e.-Werte zeigt (Tab. IV), daß die für die $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{4)-glycosidische}$ Bindung zwischen Man-3 und GlcNAc-2 berechnete Konformation (Tab. I) die Verhältnisse in wässriger Lösung sehr gut beschreibt. Die beste Übereinstimmung zwischen berechneten und beobachteten relativen n.O.e.-Werten ist für das Konformer B unter Einbeziehung des Effektes der indirekten Polarisierung zu finden.

Bezieht man jedoch einen geschätzten Meßfehler von $\pm 10\%$ für die beobachteten n.O.e.-Werte in die Betrachtung mit ein, so ergibt sich z.B. für den beobachteten relativen n.O.e. H-4²/H-2³ ein Wertebereich von $\sim 1.2\text{--}1.7$. Somit kann bei der Berechnung des relativen n.O.e.-Wertes die Vereinfachung durch Verwendung nur des ersten Terms in Gleichung (4) als hinreichend angesehen wer-

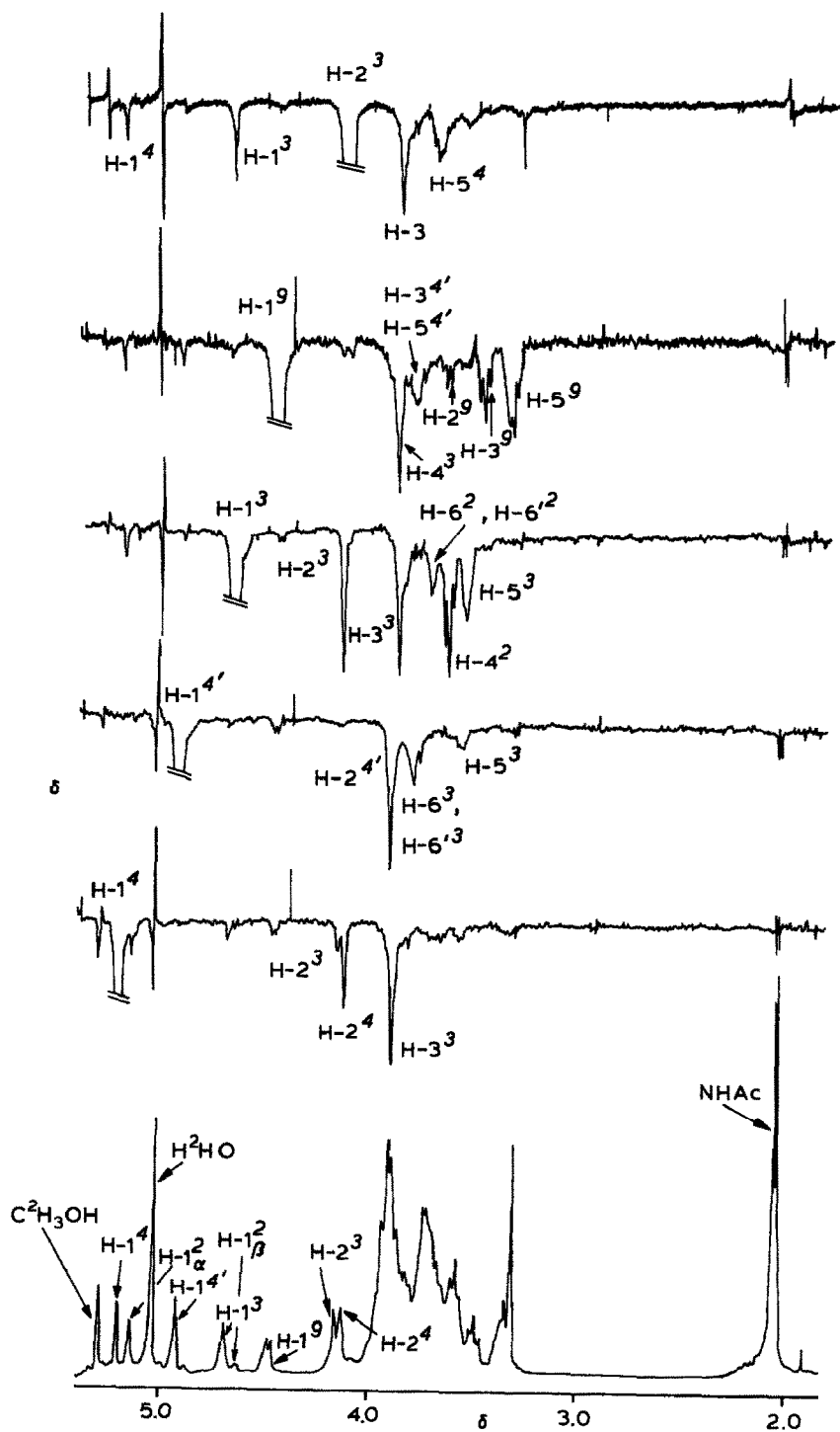


Abb. 5. 400 MHz-n.O.e.-Differenzspektren von 3.

TABELLE IV

RELATIVE BEOBSACHTETE UND BERECHNETE n.O.e.-WERTE IN 3^a

Sättigung von	Relativer n.O.e.-Wert	Beobachtet	Berechnet		
			A	B	C
H-1 ³	H-4 ² /H-2 ³	1.43	1.31 (1.38)	1.38 (1.45)	1.12 (1.17)
	H-3 ³ /H-2 ³	0.57	0.66 (0.50)	0.61 (0.45)	0.60 (0.44)
	H-5 ³ /H-2 ³	0.80	0.84 (0.82)	0.88 (0.86)	0.97 (0.96)
H-2 ³	H-5 ⁴ /H-1 ³	2.78	1.92 (2.04)	2.06 (2.16)	2.24 (2.37)
H-1 ⁴	H-3 ³ /H-2 ⁴	1.04	1.03 (1.02)	1.57 (1.58)	1.58 (1.59)
	H-2 ³ /H-2 ⁴	0.24	0.00 (0.00)	0.08 (-0.12)	0.05 (-0.07)
	H-2 ⁹ /H-2 ⁴	0.00	0.74 (0.72)	0.29 (0.24)	0.21 (0.16)
H-1 ⁴	H-6 ³ , H-6 ³ /H-2 ⁴	0.33	0.44 (0.32)	0.44 (0.33)	0.35 (0.25)
	H-5 ³ /H-2 ⁴	0.07	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
H-1 ⁹	H-3 ⁴ , H-5 ⁴ /H-3 ⁹	2.26	2.82 (3.37)	2.72 (3.24)	0.00 (0.00)
	H-4 ³ /H-3 ⁹	2.16	2.03 (2.61)	1.95 (2.49)	1.69 (2.17)
	H-5 ⁹ /H-3 ⁹	1.51	1.03 (1.13)	1.05 (1.18)	1.05 (1.23)
	H-2 ⁹ /H-3 ⁹	0.80	0.68 (0.78)	0.70 (0.80)	0.67 (0.77)

*Die n.O.e.-Werte wurden nach dem ersten Term in Gleichung (4) berechnet. In Klammern sind die Werte angegeben, die man nach dem iterativen Verfahren unter Verwendung von Gleichung (4) erhält. A, B und C sind die drei Minimumkonformationen von Tab. I.

den. Die für das Konformer C berechnete Konformation mit einem positiven ψ -Winkel (Tab. I) an der β -D-(1 \rightarrow 4)-glycosidischen Bindung sollte in einem Konformerengleichgewicht A, B, C eine geringe Rolle spielen.

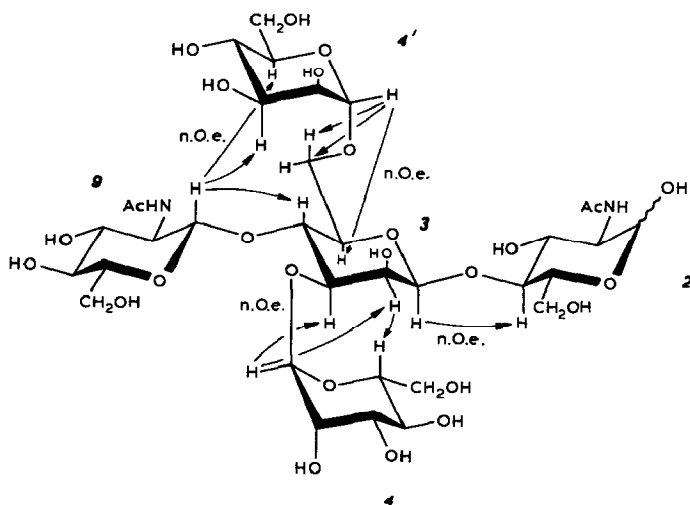
In allen drei Konformeren A, B, C sollte die α -(1 \rightarrow 3)-glycosidisch gebundene α -D-Mannose-Einheit 4 so orientiert sein, daß sich auch ein kurzer Abstand zwischen H-2³ und H-5⁴ ergibt²⁹. Eine deutliche n.O.e.-Abschwächung von H-5⁴ bei Sättigung von H-2³ bestätigt dies. Beim Vergleich des beobachteten relativen n.O.e.-Wertes H-5⁴/H-1³ mit den berechneten Werten (Tab. IV) muß beachtet werden, daß eine selektive Sättigung von H-2³ nahezu unmöglich ist. Da das H-2⁴-Signal gegenüber dem H-2³-Signal nur um 0.03 p.p.m. zu höherem Feld verschoben ist, ist kaum auszuschließen, daß auch H-2⁴ eine teilweise Sättigung erfährt. Daher ist es verständlich, daß der quantitative Vergleich nicht zu einer vollständigen Übereinstimmung zwischen Beobachtung und Berechnung führt. Zudem muß auch beachtet werden, daß geringfügige Variationen der Diederwinkel ϕ und ψ an der α -D-(1 \rightarrow 3)-glycosidischen Bindung beträchtliche Änderungen des Abstandes H-2³ zu H-5⁴ zur Folge haben können. Weiterhin wurde für die Berechnung des relativen n.O.e.-Wertes H-5⁴/H-1³ eine *gt*-Anordnung an der C-5⁴-C-6⁴-Bindung der α -D-Mannose-Einheit 4 zugrunde gelegt, obwohl auch ein *gt* \rightleftharpoons *gg* Konformerengleichgewicht möglich ist. Die entsprechende Berechnung für eine *gg*-Anordnung an dieser Bindung führt aber zu niedrigeren Werten für den berechneten relativen n.O.e.-Wert H-5⁴/H-1³.

Weiteren Aufschluß über die Konformation an der α -D-(1 \rightarrow 3)-glycosidischen Bindung erhält man durch Sättigung des anomeren Protons der α -D-Mannose-

Einheit 4. Man findet, wie erwartet, eine n.O.e.-Abschwächung von H-3. Der beobachtete relative n.O.e.-Wert $H-3^3/H-2^4$ weist eine sehr gute Übereinstimmung mit dem für das Konformere A berechneten relativen n.O.e.-Wert auf (Tab. IV). Es ist zu beachten, daß $H-3^3$ und $H-4^3$ ein System höherer Ordnung bilden und Gleichung (4) streng genommen nur bedingt gilt. Es zeigt sich, daß der Effekt der indirekten Polarisierung hier nahezu keinen Einfluß auf die Berechnung des relativen n.O.e.-Wertes hat.

Neben der n.O.e.-Abschwächung von $H-3^3$ wird auch eine geringere Abschwächung von $H-2^3$ beobachtet. Den Berechnungen mit GESA zufolge sollte dieser n.O.e.-Wert nicht auftreten bzw. sehr klein sein (s. Tab. IV). Andererseits lassen die GESA-Rechnungen eine erhöhte Flexibilität bezüglich des ψ -Winkels an der α -D-(1 \rightarrow 3)-glycosidischen Bindung vermuten, so daß möglicherweise eine leicht variierte Konformation eingenommen werden kann, in der ein kurzer $H-1^4 \cdots H-2^3$ -Abstand möglich ist.

Eine vorhergesagte dipolare Wechselwirkung zwischen $H-1^4$ und $H-2^9$ wird nicht beobachtet. Dies ist erklärbar, wenn man bedenkt, daß der Abstand $H-1^4$ zu $H-2^9$ nicht nur von der Konformation an der α -D-(1 \rightarrow 3)-glycosidischen Bindung, sondern ebenfalls von der Orientierung der β -D-(1 \rightarrow 4)-glycosidisch gebundenen "bisecting" 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit 9 abhängt. Die erheblichen Schwankungen bei der Berechnung des relativen n.O.e.-Wertes $H-2^9/H-2^4$ in den Konformeren A, B, C zeigen, daß kleine Änderungen der Diederwinkel an den beiden betrachteten glycosidischen Bindungen drastische Auswirkungen auf den zu erwartenden n.O.e.-Wert haben. Berücksichtigt man weiter, daß die Konformeren A, B und C Minima repräsentieren, die für alle glycosidischen Bindungen eine gewisse Ausdehnung in ϕ - und ψ -Richtung aufweisen, so ist das Ausbleiben einer dipolaren Wechselwirkung zwischen $H-1^4$ und $H-2^9$ verständlich.



Schema 3. Interglycosidische n.O.e.-Werte in 3.

Das Hauptproblem bei der Konformationsanalyse von **3** ist die Frage der Orientierung der α -(1 \rightarrow 6)-glycosidisch gebundenen α -D-Mannose-Einheit 4'. Die Sättigung der anomeren Protonen der α -D-Mannose-Einheit 4' und der "bisecting" 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit 9 führt zur Beobachtung besonders interessanter interglycosidischer n.O.e.-Werte. So ergibt sich bei Sättigung von H-14' eine eindeutige n.O.e.-Abschwächung der Protonen H-6³, H-6'³ sowie eine sehr geringe bei H-5³. Da H-6³ und H-6'³ ein System höherer Ordnung bilden, ist auch hier die Anwendung von Beziehung (4) für die Berechnung der relativen n.O.e.-Werte mit gewissem Vorbehalt zu betrachten. Die für den relativen n.O.e. H-6³, H-6'³/H-24' berechneten Werte korrespondieren sehr gut mit dem beobachteten n.O.e.-Wert. Eine Aussage über eine Bevorzugung einer Konformation an der α -D-(1 \rightarrow 6)-glycosidischen Bindung ist hieraus jedoch nicht möglich, da die berechneten Werte in den Konformeren A, B, C sich kaum voneinander unterscheiden. Eine Bestimmung des Konformerengleichgewichtes aus den Kopplungskonstanten $J_{H-5^3, H-6^3}$ und $J_{H-5^3, H-6'^3}$ ist nicht möglich, da, wie das ¹H, ¹³C-COSY-Experiment und das n.O.e.-Experiment zeigen, H-6³ und H-6'³ ein System höherer Ordnung darstellen.

Die sehr schwache n.O.e.-Abschwächung von H-5³ bei Sättigung von H-14' ist nicht zu erwarten. Sie sollte in keinem der konformeren A, B oder C auftreten. Die α -D-(1 \rightarrow 6)-glycosidische Bindung besitzt, wie schon gezeigt, eine besondere Flexibilität bezüglich der Diederwinkel ψ und ω , so daß möglicherweise neben A, B und C in geringerem Maße noch Konformere eine Rolle spielen, in denen eine dipolare Wechselwirkung zwischen H-14' und H-5³ möglich ist. Ebensogut kann es sich bei der geringen n.O.e.-Abschwächung von H-5³ um einen Spin-Pumping-Effekt handeln.

Bei Sättigung des anomeren Protons der "bisecting" 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit H-19 wird zum einen eine n.O.e.-Abschwächung des Protons H-4³ über die β -D-(1 \rightarrow 4)-glycosidische Bindung beobachtet. Die Übereinstimmung zwischen dem beobachteten relativen n.O.e.-Wert H-4³/H-39 und den berechneten Werten für die Konformeren A, B und C ist sehr gut und bestätigt so die für die β -D-(1 \rightarrow 4)-glycosidische Bindung berechnete Konformation. Zum anderen wird eine für die Konformationsanalyse von **3** besonders aufschlußreiche n.O.e.-Abschwächung der Protonen H-34' und H-54' der α -D-(1 \rightarrow 6)-glycosidisch gebundenen α -D-Mannose-Einheit 4' beobachtet. Diese Wechselwirkung ist nur in den *gg*-Konformeren A und B, nicht jedoch im *gt*-Konformeren C möglich. Vergleicht man den beobachteten relativen n.O.e.-Wert H-34', H-54'/H-39 mit den für die beiden Konformeren A und B berechneten Werten, so ergibt sich, daß der beobachtete Wert leicht unter den berechneten Ergebnissen liegt. Dies läßt sich ausgezeichnet mit dem Vorliegen eines Konformerengleichgewichtes $A \rightleftharpoons B \rightleftharpoons C$, wie es von den GESA-Berechnungen vorhergesagt wird, erklären.

Die verschiedenen n.O.e.-Experimente liefern somit eindeutig Hinweise darauf, daß das durch GESA-Berechnungen gewonnene Modell für die bevorzugte Konformation von **3** in wässriger Lösung realistisch ist. Weitere qualitative Bes-

tätigkeiten für die berechnete Konformation von **3** ergeben sich aus der Auswertung der ^1H -chemischen Verschiebung. Vergleicht man die chemischen Verschiebungen der Protonen und ^{13}C -Kerne im Tetrasaccharid **1** mit denen im Pentasaccharid **3**, so ist im wesentlichen eine gute Übereinstimmung zu registrieren. Abweichungen bis ~ 0.1 p.p.m. können dem Zusatz von ($^2\text{H}_4$)Methanol zur wässrigen Lösung von **3** zugeschrieben werden.

Sehr auffällig ist aber eine deutliche Tieffeldverschiebung der Signale der Protonen H-4^3 und H-5^4 im Spektrum von **3**. Das H-4^3 -Signal der zentralen β -D-Mannose-Einheit wird um 0.17 p.p.m. und das H-5^4 -Signal der (1 \rightarrow 6)-gebundenen α -D-Mannose-Einheit um 0.25 p.p.m. zu tiefem Feld verschoben. Bei H-4^3 ist dieser Effekt auf einen geringen Abstand zum Ringsauerstoff O-5^9 der "bisecting" β -D-2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit zurückzuführen. Die noch ausgeprägtere Tieffeldverschiebung von dem H-5^4 -Signal ist einer Wechselwirkung der (1 \rightarrow 6)-gebundenen α -D-Mannose-Einheit mit der "bisecting" β -D-2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit zuzuschreiben. Für die Abstände $\text{H-5}^4 \cdots \text{N}^9$ und $\text{H-5}^4 \cdots \text{O-1}^9$ findet man in den *gg*-Konformeren Werte von ~ 2.8 Å bzw. ~ 3.5 Å. Somit bestätigt diese spezielle Abschirmung das Vorliegen der *gg*-Konformeren A und B.

Ergebnis. — Die experimentell für **3** ermittelten N.m.r.-Daten sind mit dem auf Abb. 1b dargestellten berechneten Modell der bevorzugten Konformation von **3** gut vereinbar. Für die (1 \rightarrow 4)-Bindung von β -D-Man-3 mit D-GlcNAc-2 und β -D-GlcNAc-9 mit β -D-Man-3 beobachtet man n.O.e.-Werte, wie man sie nach dem Modell Abb. 1b erwarten muß. Bei der Bindung von α -D-Man-4 mit β -D-Man-3 ist eine leichte Abweichung von der Konformation in Abb. 1b möglich. Besonders wichtig ist, daß n.O.e.-Werte und spezielle Abschirmungs eindeutig für eine Bevorzugung der *gg*-Konformation der (1 \rightarrow 6)-Bindung zwischen α -D-Man-4' und β -D-Man-3 sprechen. Durch Energieberechnung ist ein Verhältnis *gg:gt* 7:3 abschätzbar.

Durch die Anwesenheit der "bisected" Einheit unterscheidet sich somit die bevorzugte Konformation von **3** grundlegend von der von **1**, bei der eine Bevorzugung einer *gt*-Konformation beobachtet wird. In dieser *gt*-Konformation von **1** erfolgt eine Rückfaltung der (1 \rightarrow 6)-gebundenen α -D-Man-4', wobei sich die Einheiten α -D-Man-4' und D-GlcNAc-2 nahe kommen. Diese Anordnung von **1** wird auch in der um Lactosamineinheiten verlängerten Verbindung **2** gefunden. Es steht daher zu erwarten, daß die in **3** gefundene Bevorzugung der *gg*-Konformation auch in der um Lactosamineinheiten entsprechend verlängerten Verbindung **4** anzutreffen ist.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die N.m.r.-Spektren wurden mit einem Bruker-WM-400-Spektrometer aufgenommen. Die Spektrometerfrequenz für Protonen betrug 400.13 MHz und für ^{13}C -Kerne 100.63 MHz. Die Spektrenbreite für das ^1H -N.m.r.-Spektrum betrug

1773 Hz und führte bei 32 k Datenpunkten zu einer digitalen Auflösung von 0.108 Hz/Punkt. ^{13}C -N.m.r.-Spektren wurden breitbandentkoppelt und nach dem DEPT-Verfahren³⁰ aufgenommen. Dabei ergab sich bei einer Spektrenbreite von 26316 Hz und 32 k Datenpunkten eine digitale Auflösung von 1.606 Hz/Punkt. Die Probenkonzentration betrug 15 mg in 1 mL $^2\text{H}_2\text{O}$ -($^2\text{H}_4$)Methanol (3:1; 16mm). Das Pentasaccharid wurde mehrmals in $^2\text{H}_2\text{O}$ aufgenommen und gefriergetrocknet, bevor es in hochreinem $^2\text{H}_2\text{O}$ -($^2\text{H}_4$)Methanol (99.96% ^2H) gelöst wurde.

Die n.O.e.-Spektren wurden mit Hilfe der Differenzspektren-Methode³¹ ausgewertet. Die Meßtemperatur betrug 270° K. Eine Spektrenbreite von 2128 Hz bei 8 k Datenpunkten führte zu einer digitalen Auflösung von 0.519 Hz/Punkt. Die Spin-Gitter-Relaxationszeiten wurden nach der "Nonselective-inversion-recovery-Methode"³² (für Protonen) und nach der "Nonselective-fast-inversion-recovery-Methode"³³ (für ^{13}C -Kerne) bestimmt. Die 2-D-Messungen wurden mit Bruker-Meßprogrammen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einem ASPECT-2000-Computer. Die HSEA-Berechnungen wurden mit dem Programm GESA¹² durchgeführt. Die Molekülmodelle wurden mit dem Plot-Programm SCHAKAL³⁴ gezeichnet. Alle Berechnungen erfolgten im Rechenzentrum Hamburg auf einer Siemens-7.882-Großrechenanlage.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die Unterstützung der Untersuchungen gedankt. T. Peters dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Promotionsstipendium.

LITERATUR

- 1 H. PAULSEN, T. PETERS, V. SINNWELL, R. LEBUHN UND B. MEYER, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1985) 489-509.
- 2 H. PAULSEN, T. PETERS, V. SINNWELL, R. LEBUHN UND B. MEYER, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1984) 951-976
- 3 J. F. G. Vliegenthart, H. van Halbeek und L. Dorland, *Pure Appl. Chem.*, (1981) 45-77.
- 4 J.-C. Michalski, G. Strecker, H. van Halbeek, L. Dorland und J. F. G. Vliegenthart, *Carbohydr. Res.*, 100 (1982) 351-363.
- 5 J. F. G. Vliegenthart, L. Dorland und H. van Halbeek, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41 (1983) 209-374.
- 6 B. MEYER, *Abstr. Eur. Symp. Carbohydr.*, 3., (1985) A.3-60; B. MEYER, H. PAULSEN, T. PETERS und V. SINNWELL, *Abstr. Int. Carbohydr. Symposium*, 12., D 6.4; T. PETERS, B. MEYER, V. SINNWELL, J. DEISENHOFER, R. HUBER und H. PAULSEN, *ibid.*, D 6.5; B. MEYER, R. HUBER, J. DEISENHOFER, H. PAULSEN und T. PETERS, unveröffentlicht.
- 7 J. DEISENHOFER, P. M. COLMAN und R. HUBER, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357 (1979) 1421-1434.
- 8 R. HUBER, *Klin. Wochenschr.*, 58 (1980) 1217-1231.
- 9 J. DEISENHOFER, *Biochemistry*, 20 (1981) 2361-2370.
- 10 J.-R. BRISSON und J. P. CARVER, *Biochemistry*, 22 (1983) 3671-3680; J.-R. BRISSON und J. P. CARVER, *ibid.*, (1983) 3680-3686.
- 11 N. HARPAZ und H. SCHACHTER, *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 4894-4902.
- 12 B. MEYER, *Abstr. Int. Carbohydr. Symp.*, 11, II/25.

- 13 A. BAX, R. FREEMAN UND G. MORRIS, *J. Magn. Reson.*, 42 (1981) 164–168; A. BAX UND R. FREEMAN, *ibid.*, 44 (1981) 542–561; R. BAUMANN, G. WIDER, R. R. ERNST UND K. WÜTHRICH, *ibid.*, 44 (1981) 402–406; K. NAGAYAMA, A. KUMAR, K. WÜTHRICH UND R. R. ERNST, *ibid.*, 40 (1980) 321–334; K. NAGAYAMA UND K. WÜTHRICH, *Eur. J. Biochem.*, 114 (1981) 365–374.
- 14 R. FREEMAN, G. A. MORRIS UND D. L. TURNER, *J. Magn. Reson.*, 26 (1977) 373–378; G. BODENHAUSEN, R. FREEMAN, G. A. MORRIS UND D. L. TURNER, *ibid.*, 28 (1977) 17–28; A. BAX, *ibid.*, 53 (1983) 517–520.
- 15 G. EICH, G. BODENHAUSEN UND R. R. ERNST, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 3731–3732.
- 16 G. KING UND P. WRIGHT, *J. Magn. Reson.*, 54 (1983) 328–332; G. WAGNER, *ibid.*, 55 (1983) 151–156.
- 17 A. BAX UND G. DROBNY, *J. Magn. Reson.*, 61 (1985) 306–320.
- 18 D. J. STATES, R. A. HABERKORN UND D. J. RUBEN, *J. Magn. Reson.*, 48 (1982) 286–292; P. BACHMANN, W. P. AUE, L. MÜLLER UND R. R. ERNST, *ibid.*, 28 (1977) 29–39.
- 19 D. MARION UND K. WÜTHRICH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113 (1983) 967–974.
- 20 K. BOCK, B. MEYER, H. THØGENSEN UND R. U. LEMIEUX, *Can. J. Chem.*, 60 (1982) 44–57.
- 21 K. BOCK, M. MELDAL, D. R. BUNDLE, T. IVERSEN, P. J. GAREGG, T. NORBERG, A. A. LINDBERG UND S. B. SVENSON, *Carbohydr. Res.*, 130 (1984) 23–34.
- 22 K. BOCK, M. MELDAL, D. R. BUNDLE, T. IVERSEN, B. M. PINTO, P. J. GAREGG, J. KVANSTRÖM, T. NORBERG, A. A. LINDBERG UND S. B. SVENSON, *Carbohydr. Res.*, 130 (1984) 35–53.
- 23 R. U. LEMIEUX UND K. BOCK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 221 (1983) 125–134.
- 24 L. BRAUNSCHWEILER UND R. R. ERNST, *J. Magn. Reson.*, 53 (1983) 521–528.
- 25 J. H. NOGGLE UND R. E. SCHIRMER, *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic Press, New York, 1971.
- 26 R. U. LEMIEUX UND K. BOCK, *Jpn. J. Antibiot.*, XXXII Suppl., (1979) 163–177.
- 27 K. BOCK, *Pure Appl. Chem.*, (1983) 605–622.
- 28 J.-R. BRISSON UND J. P. CARVER, *Biochemistry*, 22 (1983) 1362–1368.
- 29 S. W. HOMANS, R. A. OWER, D. L. FERNANDES UND T. W. RADEMACHER, *FEBS Lett.*, 150 (1982) 503–506; *ibid.*, 164 (1983) 231–235.
- 30 D. M. DODDRELL, D. T. PEGG UND M. R. BENDALL, *J. Magn. Reson.*, 48 (1982) 323–327; D. T. PEGG UND M. R. BENDALL, *ibid.*, 53 (1983) 229–234; M. R. BENDALL, D. T. PEGG UND D. M. DODDRELL, *ibid.*, 52 (1983) 407–423.
- 31 R. RICHARZ UND K. WÜTHRICH, *J. Magn. Reson.*, 30 (1978) 147–150; J. K. M. SANDERS UND J. D. MERSH, *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 15 (1982) 353–400.
- 32 R. L. VOLD, J. S. WAUGH, M. P. KLEIN UND D. E. PHELPS, *J. Chem. Phys.*, 48 (1968) 3831–3832.
- 33 G. C. LEVY, J. R. PEAT UND D. CANET, *J. Magn. Reson.*, 18 (1975) 199–204; G. C. LEVY UND J. R. PEAT, *ibid.*, 18 (1975) 500–521; D. J. CRAIK UND G. C. LEVY, *Top. ¹³C Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 4 (1984) 239–275.
- 34 E. KELLER, SCHAKAL-Plot-Programm, *Chem. Unserer Zeit*, 14 (1980) 56–60.