

KONFORMATIONSANALYSE MODIFIZIERTER TETRASACCHARID-SEQUENZEN VOM TYP DER *N*-GLYCOPROTEINE — ZUM PROBLEM DER α -(1→6)-GLYCOSIDISCHEN BINDUNG*

HANS PAULSEN, THOMAS PETERS, VOLKER SINNWELL

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, Carl-von-Ossietzky-Str. 9; D-2900 Oldenburg (Bundesrepublik Deutschland)

(Eingegangen am 10. Juni 1986; angenommen am 21. Juli 1986)

ABSTRACT

The conformational analysis of the recently synthesized tetrasaccharides α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]-4-deoxy- β -D-lyx-hexp-(1→4)-D-GlcNAc (2) and α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]- β -D-Talp-(1→4)-D-GlcNAc (3) will be described. The preferred solution conformation of 2 and 3 is a *gt*-conformation, which is nearly identical with the preferred conformation of the naturally occurring tetrasaccharide α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]- β -D-Manp-(1→4)-D-GlcNAc (1). The main structural feature is the backfolding of the α -(1→6)-linked D-Man to the reducing D-GlcNAc unit. Conformational analysis of the tetrasaccharides α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]- β -D-Manp-(1→4)-1,6-anhydro- β -D-GlcNAc (4), α -D-Manp-(1→3)- α -D-Manp-(1→6)-[4-deoxy- β -D-lyx-hexp-(1→4)-1,6-anhydro- β -D-GlcNAc (5), and α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]- β -D-Talp-(1→4)-1,6-anhydro- β -D-GlcNAc (6) gave additional proof for this backfolding. The substitution of the reducing unit leads to a smaller amount of *gt*- and a greater amount of *gg*- conformers. The method used for conformational analysis of 2–6 is a combination of n.m.r.-experiments and HSEA-calculations with the program GESA. Concerning the application of new 2D-techniques, the COLOC-experiment turned out to be extremely useful in sequencing oligosaccharides.

ZUSAMMENFASSUNG

Für die von uns synthetisierten Tetrasaccharide α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]-4-desoxy- β -D-lyx-hexp-(1→4)-D-GlcNAc (2) und α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]- β -D-Talp-(1→4)-D-GlcNAc (3) wird eine detaillierte Konformations-

* XXVII. Mitteilung der Serie "Konformationsanalyse". XXVI. Mitteil., siehe Zit. 1.

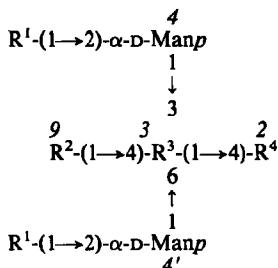
analyse durchgeführt. Es zeigt sich, daß 2 und 3 bevorzugt eine *gt*-Konformation aufweisen, wie sie auch für das natürlich vorkommende Tetrasaccharid α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]- β -D-Manp-(1→4)-D-GlcNAc (**1**) gefunden wird. Dabei ist die α -(1→6)-glycosidisch gebundene D-Man zur reduzierenden D-GlcNAc-Einheit zurückgefaltet. Eine Bestätigung der Rückfaltung ergibt die Konformationsanalyse der Tetrasaccharide α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]- β -D-Manp-(1→4)-1,6-anhydro- β -D-GlcNAc (**4**), α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Manp-(1→6)]-4-desoxy- β -D- α -x-hexp-(1→4)-1,6-anhydro- β -D-GlcNAc (**5**) und α -D-Manp-(1→3)-[α -D-Man-(1→6)]- β -D-Talp-(1→4)-1,6-anhydro- β -D-GlcNAc (**6**), bei denen durch Austausch der reduzierenden Einheit der Anteil an *gt*-Konformation verringert und der an *gg*-Konformation erhöht wird. Die Konformationsanalyse der Sequenzen **2** bis **6** erfolgt durch N.m.r.-spektroskopische Experimente und HSEA-Berechnungen mit dem Programm GESA. Bei der Anwendung neuer 2D-Techniken erweist sich das COLOC-Experiment für die Sequenzierung von Oligosaccharidketten als besonders wertvoll.

EINFÜHRUNG

In vorangehenden Mitteilungen haben wir über die Konformationsanalyse des Tetrasaccharids **1** und davon abgeleiteter Oligosaccharidsequenzen berichtet¹⁻³. Derartige Strukturen repräsentieren den Kohlenhydrateil in *N*-Glycoproteinen. Das besondere Problem bei der Konformationsanalyse dieser Sequenzen ist die Orientierung der α -(1→6)-glycosidisch gebundenen Seitenkette. Im Tetrasaccharid **1** wie auch im Octasaccharid **7** liegt bevorzugt eine *gt*-Konformation* vor, in der die α -(1→6)-glycosidisch gebundene D-Mannose-Einheit **4'** zur reduzierenden 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose-Einheit **2** zurückgefaltet ist^{2,3}. Im Gegensatz dazu ist die D-Man-Einheit **4'** im sogenannten "bisected" Pentasaccharid **8** bevorzugt so orientiert, daß in einer *gg*-Konformation eine Nachbarschaft zur bisecting β -D-GlcNAc-Einheit **9** auftritt¹. Dies kann durch die Beobachtung interglycosidischer n.O.e.'s zwischen den Einheiten **9** und **4'** experimentell bestätigt werden. Brisson und Carver⁴ gelangen bei ihren Untersuchungen zu ähnlichen Ergebnissen. Die Resultate von Biswas *et al.*⁵, nach deren Berechnungen die bevorzugte Konformation der (1→6)-gebundenen α -D-Mann-Einheit unabhängig vom Vorhandensein einer "bisecting" β -D-GlcNAc-Einheit sein soll, müssen daher kritisch beurteilt werden.

In der vorliegenden Arbeit werden die kürzlich von uns synthetisierten⁶ Tetrasaccharide **2** und **3** hinsichtlich ihrer bevorzugten Konformation in wässriger Lösung untersucht. Bei diesen Strukturen ist im Vergleich zur Sequenz **1** die zentrale β -D-Man-Einheit an C-4 modifiziert: eine Desoxygenierung an dieser Position führt zu **2**, eine Konfigurationsumkehr zu **3**. Die Sequenzen **2** und **3** sollen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit als kompetitive Inhibitoren bei der Wechselwirkung z. B. von Lectinen⁷ mit dem natürlich vorkommenden Tetrasaccharid **1** oder als Substrate für die GlcNAc-Transferase I^{8,9} untersucht werden. Ziel ist es dabei, einerseits die Bedeu-

* *gr*: $\omega = 60^\circ$; *gg*: $\omega = 60^\circ$; *tg*: $\omega = 120^\circ$; ω : O-5-C-5-C-6-O-6. (siehe Zit. 1-3).



- $$\begin{aligned}
 1\ R^1 &= H, R^2 = H, R^3 = \beta\text{-D-Manp}, R^4 = \text{D-GlcNAc} \\
 2\ R^1 &= H, R^2 = H, R^3 = 4\text{-desoxy-}\beta\text{-D-lyx-hexp}, R_4 = \text{D-GlcNAc} \\
 3\ R^1 &= H, R^2 = H, R^3 = \beta\text{-D-Talp}, R^4 = \text{D-GlcNAc} \\
 4\ R^1 &= H, R^2 = H, R^3 = \beta\text{-D-Manp}, R^4 = 1,6\text{-anhydro-}\beta\text{-D-GlcNAc} \\
 5\ R^1 &= H, R^2 = H, R^3 = 4\text{-desoxy-}\beta\text{-D-lyx-hexp}, R^4 = 1,6\text{-anhydro-}\beta\text{-D-GlcNAc} \\
 6\ R^1 &= H, R^2 = H, R^3 = \beta\text{-D-Talp}, R^4 = 1,6\text{-anhydro-}\beta\text{-D-GlcNAc} \\
 7\ R^1 &= \beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 4\text{)-}\beta\text{-D-GlcNAc}, R^2 = H, R^3 = \beta\text{-D-Man}, R^4 = \text{D-GlcNAc} \\
 8\ R^1 &= H, R^2 = \beta\text{-D-GlcNAc}, R^3 = \beta\text{-D-Manp}, R^4 = \text{D-GlcNAc}
 \end{aligned}$$

tung der Hydroxylfunktion und des Wasserstoffatoms an C-4 der zentralen β -D-Man-Einheit in 1 für die entsprechende Receptorreaktion zu klären. Andererseits ergibt sich die Frage, ob durch diese Variation die Konformation der (1 \rightarrow 6)-gebundenen Seitenkette beeinflußt wird.

Ferner werden die 2-Acetamido-1,6-anhydro-2-desoxy-D-glucose enthaltenden Tetrasaccharide **4**, **5** und **6** einer genaueren Konformationsanalyse unterzogen. Im Hinblick auf die in **1** beobachtete Rückfaltung der α -(1 \rightarrow 6)-glycosidisch gebundenen D-Man-Einheit sind bei diesen Strukturen durch die 2-Acetamido-1,6-anhydro-2-desoxy-D-glucose-Einheit bedingt Störungen der bevorzugten Konformation an der (1 \rightarrow 6)-Bindung im Vergleich zu den Sequenzen **1**, **2** und **3** zu erwarten. Die Numerierung der Monosaccharideinheiten in den Oligosacchariden **1** bis **8** folgt dem Vorschlag von Vliegenthart und Mitab¹⁰ und Montreuil¹¹.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Methode der Konformationsanalyse ist in den vorhergehenden Mitteilungen¹⁻³ ausführlich beschrieben worden. Aufbauend auf einer möglichst weitgehenden Zuordnung der ¹H- und ¹³C-Resonanzen mit Hilfe moderner 2D-N.m.r.-Techniken können n.O.e.-Experimente und T_1 -Messungen durchgeführt und Änderungen der chemischen Verschiebungen sowie die Werte von Kopplungskonstanten interpretiert werden. Durch Vergleich der experimentell gewonnenen Daten mit den Ergebnissen der HSEA-Berechnungen¹² wird ein Modell der bevorzugten Konformation der betreffenden Oligosaccharidsequenz in wäßriger Lösung gewonnen. Für die HSEA-Berechnungen wird das Programm GESA¹³ angewandt. Relative n.O.e.'s werden — wie in der vorangegangenen Mitteilung¹ ausführlich beschrieben — nach dem iterativen Verfahren von Noggle und Schirmer¹⁴ berechnet. Bei diesem Verfahren werden auch die Effekte der indirekten Polarisierung erfaßt. Die Berechnung

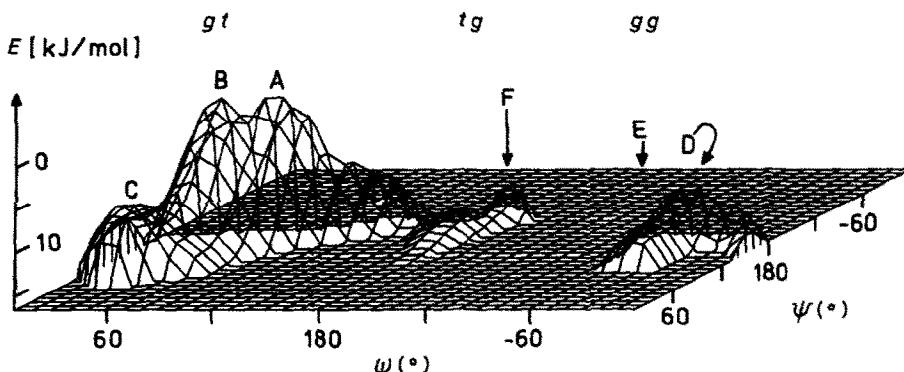


Abb. 1. Energiehyperfläche für die α -(1 \rightarrow 6)-glycosidische Bindung in 3.

relativer ^1H - T_1 -Werte erfolgt ebenfalls wie bereits beschrieben.

α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]-4-desoxy- β -D-lyx-hexp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc (**2**) und α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 6)]- β -D-Talp-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc (**3**). — Ausgehend von bestimmten Startkonformationen werden mit dem GESA-Programm energetisch günstige Konformere berechnet. Die Konformation an glycosidischen Bindungen, an denen nur sekundäre Hydroxylgruppen beteiligt sind, wird maßgeblich durch den *exo*-anomeren Effekt bestimmt, und eine geeignete Startgeometrie für das GESA-Programm ist daher leicht zu finden. Die α -(1 \rightarrow 6)-glycosidisch gebundene D-Mann-Einheit in **2** und **3** weist jedoch wie in **1** bezüglich der Diederwinkel ψ und ω an der (1 \rightarrow 6)-Bindung eine erhebliche Flexibilität auf. Mit Hilfe des GESA-Programms wird eine Energiefläche für die Tetrasaccharide **2** und **3** in Abhängigkeit von den Diederwinkeln ψ und ω errechnet. Die Winkel ψ und ω werden dabei jeweils in 10° -Schritten von 0° - 360° inkrementiert. Für jede ψ / ω -Kombination werden die Diederwinkel an den übrigen glycosidischen Bindungen in **2** und **3** optimiert, bis ein Minimum erreicht ist. Abb. 1 zeigt die für das Tetrasaccharid **3** erhaltene Hyperfläche. Die entsprechenden Energieflächen für **1** und **2** unterscheiden sich nur unwesentlich von der auf Abb. 1 gezeigten. In alle Fällen wird das globale Minimum durch eine *gt*-Anordnung (Abb. 1; A,B,C) an der C-5-C-6-Bindung der zentralen Verzweigungseinheit repräsentiert. Die *tg*-Orientierung (Abb. 1; F) ist den Berechnungen zufolge auch in den Sequenzen **2** und **3** ohne Gewicht. Diese Befunde sind gut mit jüngsten Ergebnissen von Nishida *et al.*¹⁵ und Bock¹⁶ bei Untersuchungen an D-Galactose vereinbar. Danach soll in D-Galactose die *gt*-Anordnung der Hydroxymethylgruppe stark bevorzugt werden, während die *tg*-Konformation nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die mit GESA optimierten Konformationen A-F für die Tetrasaccharide **2** und **3** sind in Tab. I zusammengestellt. Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit den entsprechenden Werten für die Sequenz **1**. Insgesamt ist also auch für **2** und **3** ein *gt* (A,B,C) \rightleftharpoons *gg*(D,E)-Konformerengleichgewicht an der α -(1 \rightarrow 6)-glycosidischen Bindung zu erwarten, in dem stark die *gt*-Form überwiegt.

Die vollständige Interpretation der ^1H - und ^{13}C -N.m.r.-Spektren von **2** und **3**

TABELLE I

MIT GESA BERECHNETE DIEDERWINKEL UND KONFORMERENVERTEILUNG VON 2 UND 3.

Verb.	Kon-former	Diederwinkel ($^{\circ}$)						E (kJ/mol)	Anteil (%)		
		(1→6)-Bindung		(1→3)-Bindung		(1→4)-Bindung					
		ϕ	ψ	ϕ	ψ	ϕ	ψ				
2	A (gi)	-57	180	-52	-22	56	7	48	0.00	50	
	B (gt)	-49	-167	-52	-22	57	12	76	0.29	45	
	C (gt)	-47	90	-52	-23	58	-5	36	7.58	2	
	D (gg)	-53	-168	-52	-23	58	1	-55	9.00	2	
	E (gg)	-53	124	-52	-23	60	2	-49	11.72	0.5	
	F (ig)	-40	-105	-59	-32	56	3	180	12.39	0.5	
3	A (gt)	-49	-167	-51	-23	57	12	76	0.00	49	
	B (gt)	-57	180	-51	-20	56	8	49	0.08	47	
	C (gt)	-47	91	-52	-23	58	-5	36	7.95	2	
	D (gg)	-54	180	-52	-22	59	-2	-46	9.84	1	
	E (gg)	-54	126	-51	-22	60	1	-48	11.89	0.5	
	F (ig)	-40	-104	-59	-33	56	3	180	12.31	0.5	

gelingt mit Hilfe des H,H,H,-COSY-¹⁷⁻²⁰, des phasensensitiven H,H-COSY-^{21,22}, des H,C-COSY-²³⁻²⁵ und des COLOC-Experiments^{26,27}. Es zeigt sich dabei, daß das von Kessler *et al.*^{26,27} entwickelte COLOC-Experiment für die Detektion von Fernkopplungen $^nJ_{C,H}$ ($n > 1$) dem H,C-COSY-Experiment deutlich überlegen ist. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die kritische Zeit, in der Protonen-Spin-Spin-Relaxation stattfinden kann, in der COLOC-Impulssequenz [90° (1H) - $t_1/2$ - 180° (1H , ^{13}C) - ($\Delta_1 - t_1/2$) - 90° (1H , ^{13}C) - $\Delta_2 - t_2$ (BB)] von $t_1 + \Delta_1$ (H,C-COSY) auf Δ_1 reduziert worden ist. Es kann hier demonstriert werden, daß das Experiment besonders für die Sequenzanalyse von Oligosacchariden gut geeignet ist. Aus diesem Grund wird die Methode genauer beschrieben und auf Abb. 2 ein Beispiel gezeigt.

Der optimale Delay Δ_1 für eine bestimmte Fernkopplung J ist $\Delta_1 = (2J)^{-1}$. Δ_2 wird zu $\Delta_1/2$ gewählt. Es werden zwei COLOC-Spektren angefertigt, bei denen für die Kopplungen $^3J_{C,H}$ über glycosidische Bindungen hinweg Werte von 5 und 10 Hz zugrunde gelegt werden. Damit ergeben sich für die beiden Delays Δ_1 Zeiten von 100 ms und 50 ms. Abb. 2 zeigt die beiden erhaltenen COLOC-Spektren für 3. An der α -(1→3)- und der β -(1→4)-glycosidischen Bindung können die gewünschten Fernkopplungen $^3J_{C,H}$ wie auf Abb. 2 besonders hervorgehoben, detektiert werden. Für die α -(1→6)-glycosidische Bindung wird kein Kreuzsignal, das einer Kopplung über diese Bindung hinweg entspricht, beobachtet. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die übertragene Magnetisierung sich auf beide Protonen an C-6 der zentralen β -D-Man-Einheit verteilt und darüberhinaus die C-6-Signale im α - und β -Anomeren von 3 unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweisen (siehe Tab. II).

Die COLOC-Spektren lassen, wie auf Schema 1 zu sehen ist, viele andere

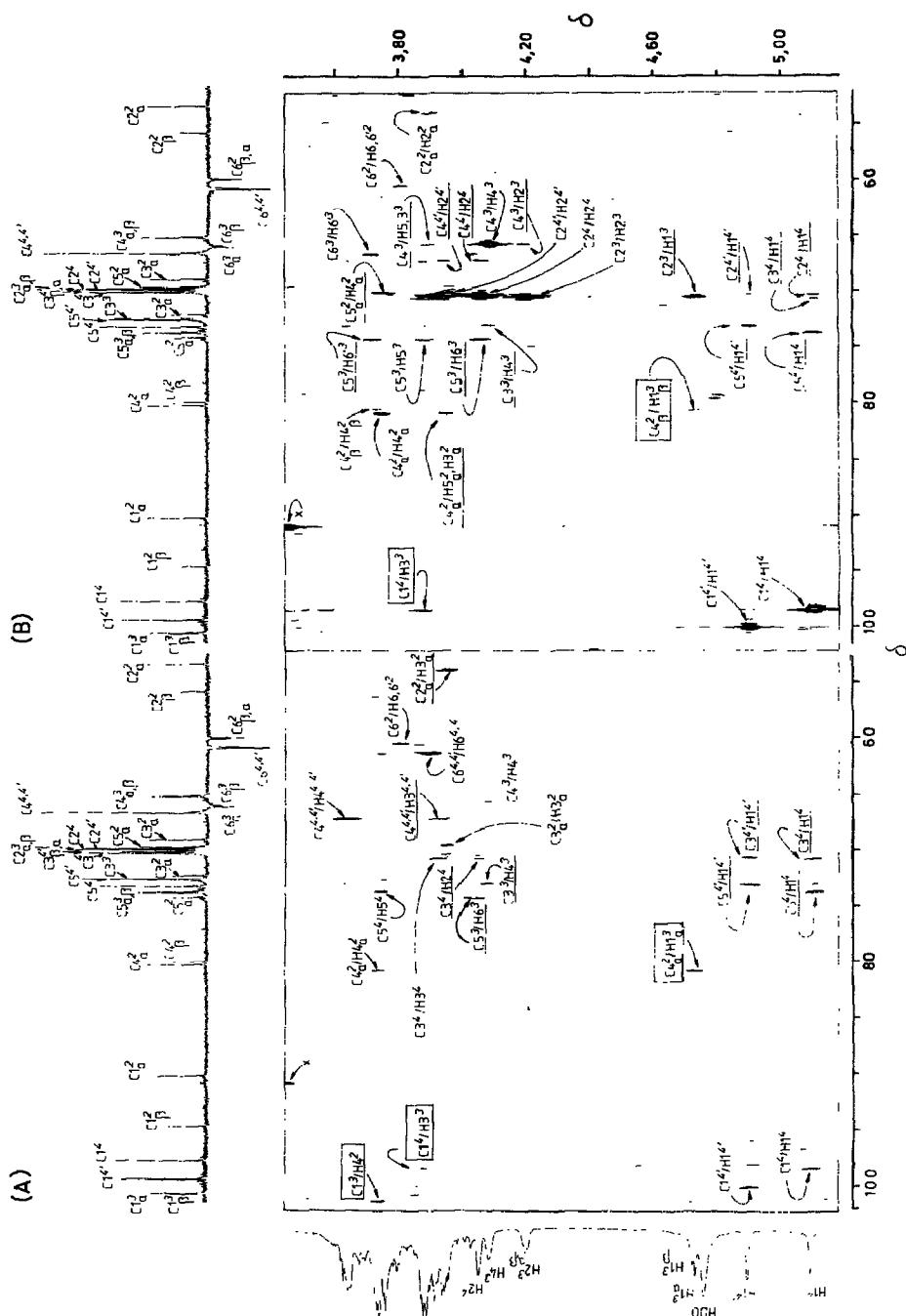


Abb. 2. H,C -COLOC-Spektren von 3. In Rahmen: Fernkopplungen $^3J_{C,H}$ über glycosidischen Bindungen hinweg. Unterstrichen: Fernkopplungen $^nJ_{C,H}$, $n > 1$. Nicht unterstrichen: direkte Kopplungen $^1J_{C,H}, X =$ eingefaltetes Kreuzsignal für die Kopplung $J_{C_1,2,H_1,2}$. (A): Aufnahme mit 64 Datenpunkten in t_1 und 2 k Datenpunkten in t_2 . Die Delays Δ_1 und Δ_2 wurden zu Δ_1 0.1 s und Δ_2 0.05 s gewählt. Bei 1140 Aufnahmen pro Experiment und einem Relaxationsdelay von 0.2 s ergab

sich eine totale Meßzeit von 11.92 h. Durch Zero-filling wurde eine Datenmatrix von 0.25 k (t_1) \times 2 k (t_2) erhalten. Die FIDs wurden vor der Fouriertransformation in beiden Dimensionen mit einer quadrierten Sinus-Funktion multipliziert. Die Spektrenbreite betrug 5376 Hz in F_2 und 704 Hz in F_1 . (B) Aufnahme mit 71 Datenpunkten in t_1 und 2 k Datenpunkten in t_2 . Die Delays Δ_1 und Δ_2 wurden zu Δ_1 0.05 s und Δ_2 0.025 s gewählt. Bei 800 Aufnahmen pro Experiment und einem Relaxationsdelay von 0.4 s ergab sich eine totale Meßzeit von 11.36 h. Für die übrigen Angaben siehe A.

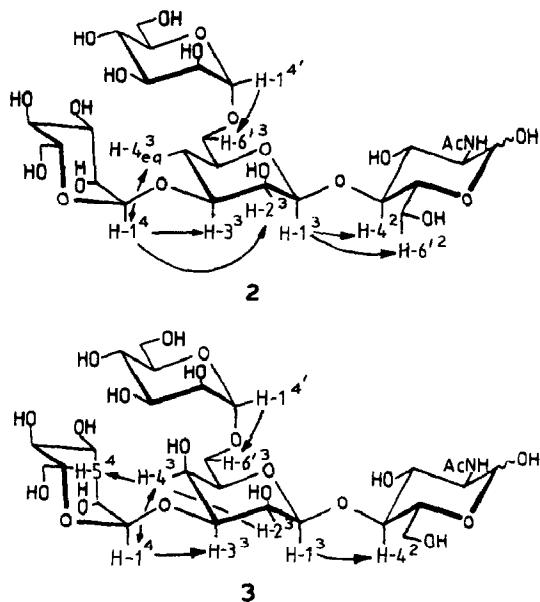
TABELLE II

 ^{13}C -N.M.R.-CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN (δ -WERTE) DER VERBINDUNGEN 2 - 6^a

<i>Verb.</i>	<i>Einheit</i>	<i>C-1</i>	<i>C-2</i>	<i>C-3</i>	<i>C-4</i>	<i>C-5</i>	<i>C-6</i>	<i>CO</i>	<i>CH₃</i>
2 (α -Anomer)	2	91.05	54.00	69.58	81.03	70.33	60.60	175.29	22.22
	3	101.46	69.10	73.85	25.92	71.34	69.05		
	4	99.31	70.46	70.94	67.36	73.76	61.55 ^b		
	4'	100.12	70.65	70.77	67.36	73.26	61.47 ^b		
3 (α -Anomer)	2	90.71	53.80	69.38	80.74	70.04	60.37	174.76	22.23
	3	101.15	70.44	72.19	65.60	74.16	66.49		
	4	98.25	70.28	70.60	67.06	73.60	61.29 ^b		
	4'	99.91	70.18	70.47	67.06	72.97	61.20 ^b		
4	2	100.35	52.24	69.68	78.28	74.70	65.33	173.90	22.16
	3	99.81	70.73	80.77	66.14	74.49	65.04		
	4	102.64	70.31	70.63	67.02	73.93	61.22		
	4'	99.54	70.15	70.81	67.02	72.57	61.22		
5	2	100.45	52.43	69.83	78.45	74.86	65.43	173.88	22.23
	3	100.36	69.06	73.62	26.24	70.97	68.88		
	4	98.79	70.60	70.76	67.17 ^b	73.52	61.36		
	4'	99.52	70.25	70.85	67.13 ^b	73.08	61.31		
6	2	100.37	52.26	69.62	78.70	74.73	65.34	173.87	22.17
	3	100.43	70.70	72.79	65.75	73.91	66.28		
	4	98.09	70.32	70.64	67.08 ^b	73.61	61.28 ^b		
	4'	99.64	70.20	70.75	67.03 ^b	73.05	61.21 ^b		

^aIn D₂O (innerer Standard: Aceton, δ 30.50; 305° K; 100.63 MHz). ^bDiese Werte können jeweils vertauscht sein.

interessante Fernkopplungen erkennen. So ist z. B. die eindeutige Zuordnung der Signale C-5⁴ und C-5^{4'} möglich, da die Fernkopplungen $^3J_{\text{C},\text{H}}$ zu H-1⁴ und H-1^{4'} detektiert werden können. Der Vergleich der beiden COLOC-Spektren zeigt auch, wie empfindlich die Intensität der Kreuzsignale von der Größe des Delays Δ_1 abhängt. Sollen spezielle Zuordnungsprobleme gelöst werden, so empfiehlt es sich daher, die in Frage kommenden Kopplungskonstanten $^nJ_{\text{C},\text{H}}$ ($n > 1$) vorher mit Hilfe eines INEPT-Spektrums zu bestimmen. Trotzdem kann die Aufnahme mehrerer COLOC-Spektren erforderlich sein. Die ermittelten ¹H-N.m.r.-chemischen Verschiebungen sind in Tab. III, die ¹³C-N.m.r.-chemischen Verschiebungen in Tab. II aufgeführt.



Schema 1. Interglycosidische n.O.e.'s in **2** und **3**.

Die n.O.e.-Experimente für **2** müssen bei 400 MHz und einer Temperatur von 270° K in einem Lösungsmittelgemisch D₂O-CD₃CD₂OD (3:1) durchgeführt werden. Es werden dann negative n.O.e.'s beobachtet. Beim Tetrasaccharid **3** ist die Beobachtung positiver n.O.e.'s bei Raumtemperatur und einer Spektrometerfrequenz von 270 MHz möglich. Das qualitative Ergebnis der Messungen für **2** und **3** ist auf Schema 1 zusammengefaßt. Dabei werden die von den GESA-Berechnungen vorhergesagten n.O.e.'s beobachtet.

Der quantitative Vergleich relativer beobachteter und relativer berechneter n.O.e.'s führt für die (1→4)- und (1→3)-glycosidische Bindung in **2** und **3** zu einer befriedigenden Übereinstimmung. Bei Sättigung von H-1³ in **2** findet man als Ergebnis für die (1→4)-Bindung: n.O.e. (H-4²/H-3³) 1.86 (beob.); berechnet für Konformationen A-F: 2.57 (A), 2.12 (B), 2.39 (C), 3.07 (D), 2.74 (E), 3.31 (F). Entsprechend ergibt sich bei **3**: n.O.e. (H-4²/H-3³, H-5³) 0.74 (beob.); berechnet für A-F: 0.67 (A), 0.88 (B), 0.97 (C), 1.14 (D), 0.88 (E), 1.30 (F). Die Sättigung von H-1⁴ führt nur für das Tetrasaccharid **2** zu einem quantitativ auswertbaren Ergebnis: n.O.e. (H-4³_{eq}/H-3³) 0.50 (beob.); berechnet für A-F: 0.62 (A), 0.59 (B), 0.64 (C), 0.56 (D), 0.64 (E), 1.53 (F). Für eine Abschätzung der Lage des *gt*↔*gg*-Konformerengleichgewichts an der (1→6)-glycosidischen Bindung in **2** und **3** wäre der relative n.O.e. H-6³/H-2⁴ von Interesse. Da H-2⁴ sowohl in **2** als auch in **3** ein System höherer Ordnung mit H-3⁴ bildet, ist eine quantitative Abschätzung jedoch eingeschränkt.

Die beobachteten relativen *T*₁-Werte *T*₁ (H-1⁴) / *T*₁ (H-1⁴) in **2** und **3** stützen die Befunde über die Lage des *gt*↔*gg*-Konformerengleichgewichts, wie es durch die

TABELLE III

¹H-N.M.R.-CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN (δ -WERTE) UND KOPPLUNGSKONSTANTEN J [Hz]^a DER VERBINDUNGEN 2 - 6^b.

Verb.	Einheit	H-1	H-2	H-3	H-4	H-4'	H-5	H-6	H-6'	NAc	
2 ^c (α -Anomer)	2	5.22 (3.3)		3.96-3.84		3.68 (10.0)		3.94		3.83-3.76	2.07
	3	4.66 (0.6)	4.17 (3.1)	4.02	1.89 (4.9)	1.63 (12.2)	3.89	3.82 (8.2)		3.65 (3.0)	
	4	5.04 (1.5)	3.95 (3.4)	3.86 (9.8)	3.65 (9.8)			3.72-3.78		3.90	
	4'	4.90 (1.5)		3.96-3.87		3.67		3.61	3.90	3.76 (6.0) (12.0)	
3 ^d (α -Anomer)	2	5.22 (3.3)		3.89-3.95		3.73 (10.0)		3.96		3.85-3.76	2.07
	3	4.73 (0.6)	4.21 (3.0)	3.87 (3.0)	4.09 (1.0)			3.88	4.07 (8.5) (11.0)	3.70 (4.0)	
	4	5.10 (1.5)	4.06 (3.2)	3.93 (9.7)	3.65 (9.5)			3.75	3.89	3.76	
	4'	4.90 (1.6)		3.95-3.92		3.63		3.65	3.89	3.77	
4 ^e	2	5.44 (1.6)	3.82	3.92	3.84		4.76	4.20 (1.1) (8.0)	3.79 (6.0)	2.04	
	3	4.88 (0.9)	4.22 (2.8)		3.79-3.73		3.58	3.94 (6.1) (11.9)	3.80 (2.5)		
	4	5.12 (1.8)	4.08 (3.4)	3.91 (9.9)	3.67 (9.9)		3.74	3.61			
	4'	4.91 (1.9)	3.96 (3.5)	3.82 (9.6)	3.67		3.62	3.88 (3.6) (12.2)	3.75 (6.5)		
5 ^e	2	5.44 (1.6)	3.81	3.93	3.83		4.76	4.19 (1.1) (8.0)	3.79 (6.0)	2.04	
	3	4.75 (0.9)	4.11 (2.8)	4.00	1.88 (5.0) (12.0)	1.63 (12.0)		3.78-3.81		3.67	
	4	5.04 (1.8)	3.96 (3.4)	3.87 (9.7)	3.66 (9.8)		3.74	3.78	3.89 (6.0) (13.0)		
	4'	4.90 (1.8)	3.94 (3.4)	3.81 (9.5)	3.67		3.62	3.88 (6.5) (12.2)	3.74 (6.5)		
6 ^d	2	5.44 (1.5)	3.82	3.98	3.88		4.77	4.21 (1.0) (8.0)	3.80 (5.8)	2.04	
	3	4.83	4.19	3.88	4.09		3.82	3.98	3.75		

TABELLE III (*continued*)

	(0.6)	(3.0)	(3.2)	(1.5)		(4.1)	(7.5)
					(10.8)		
4	5.12 (1.6)	4.07 (3.4)	3.95 (9.8)	3.68 (9.6)	3.77	↔-----→	3.66
4'	4.91 (1.7)	3.95 (3.4)	3.79 (9.5)	3.67	3.62	3.88 (2.5)	3.74 (5.8) (12.0)

^aIn Klammern. ^bIn D₂O (innerer Standard: Aceton, δ 2.225). ^c300° K; 500.13 MHz, ^d305° K; 400.13 MHz, ^e310° K; 400.13 MHz.

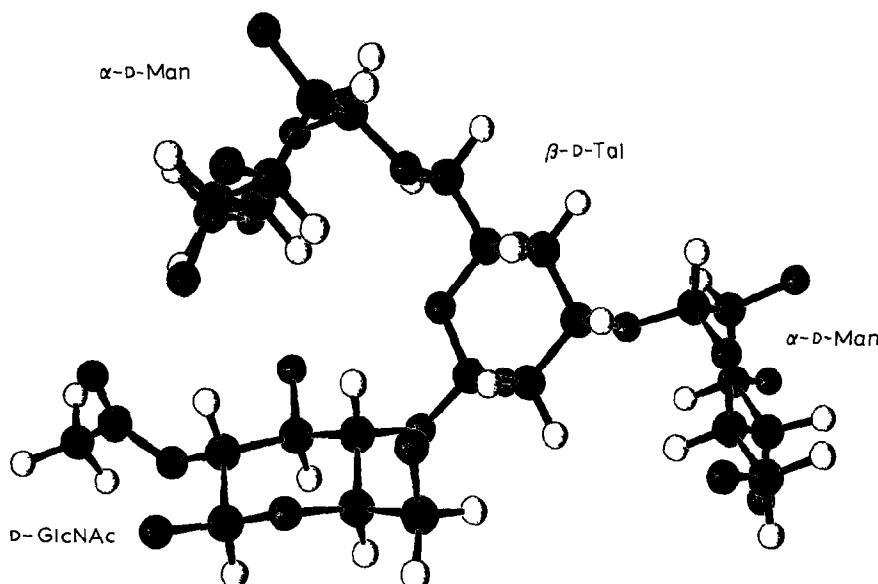
GESA-Berechnungen vorhergesagt wird. Für **2** findet man: T_1 (H-1^{4'})/ T_1 (H-1⁴) 1.17 (beob.); berechnet für A-F: 1.26 (A), 1.25 (B), 0.85 (C), 1.31 (D), 1.06 (E), 0.92 (F). Für **3** ergibt sich: T_1 (H-1^{4'})/ T_1 (H-1⁴) 1.07 (beob.); berechnet für A-F: 1.20 (A), 1.21 (B), 0.82 (C), 1.17 (D), 1.01 (E), 0.91 (F).

Den GESA-Berechnungen zufolge sollen die *gt*-Konformeren (z.B. A,B,C) im Konformerengleichgewicht deutlich überwiegen (vgl. Tab. I). Von erheblichem Interesse sind daher die Kopplungskonstanten $J_{H-5^3, H-6^3}$ und $J_{H-5^1, H-6^1}$ in **2** und **3**. Sie können mit Hilfe eines phasensensitiven H,H-COSY-Experiments bestimmt werden. Die Kopplungskonstanten betragen für **2** $J_{H-5^3, H-6^3}$ 8.2 und $J_{H-5^1, H-6^1}$ 3.0 Hz. Für **3** findet man $J_{H-5^3, H-6^3}$ 8.5 und $J_{H-5^1, H-6^1}$ 4.0 Hz. Diese Werte sprechen dafür, daß im Konformerengleichgewicht an der (1→6)-glycosidischen Bindung tatsächlich — wie berechnet — ein hoher Anteil an *gt*-Konformeren vorliegt.

Von Interesse ist ferner ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der anomeren C-Atome C-1⁴ in den Sequenzen **1**, **2** und **3**. Es fällt auf, daß C-1⁴ in **2** und **3** gegenüber **1** deutlich zu höherem Feld verschoben ist (**2**: 2.49 p.p.m., **3**: 4.15 p.p.m.). Bock²⁸ konnte für α-D-Glucoside und α-D-Galactoside einen nahezu linearen Zusammenhang zwischen chemischer Verschiebung des anomeren C-Atoms und der Summe der Absolutbeträge der Diederwinkel φ und ψ an der betreffenden glycosidischen Bindung aufzeigen. Danach kann die beobachtete Hochfeldverschiebung der C-Atome C-1⁴ in **2** und **3** auf eine Vergrößerung des Absolutbetrages φ + ψ an der (1→3)-glycosidischen Bindung zurückzuführen sein. Ein Vergleich der Diederwinkel φ und ψ in **1**, **2** und **3** (vgl. Tab. I) ergibt die Summen φ + ψ: 61° (**1**), 74° (**2**), 74° (**3**).

Insgesamt sprechen die experimentellen Befunde dafür, daß die Sequenzen **2** und **3** in wässriger Lösung ein sehr ähnliches konformatives Verhalten wie das Tetrasaccharid **1** aufweisen. Schema 2 zeigt das energetisch günstige Konformere A des Tetrasaccharides **3** in einer Kugel-Stab-Darstellung.

α-D-Manp-(1→3)-[α-D-Manp-(1→6)]-β-D-Manp-(1→4)-1,6-anhydro-β-D-GlcNAc (**4**) α-D-Manp-(1→3)[α-D-Manp-(1→6)]-4-desoxy-β-D-lyx-hexp-(1→4)-1,6-anhydro-β-D-GlcNAc (**5**) und α-D-Manp-(1→3)-[α-D-Manp-(1→6)]-β-D-Talp-(1→4)-1,6-anhydro-β-D-GlcNAc (**6**). — Für die Tetrasaccharide **1** (Zit. 3), **2** und **3** sowie das Octasaccharid **7** (Zit. 2) ergab sich, daß die α-(1→6)-glycosidisch gebundene D-Man-Einheit in der bevorzugten Konformation zur reduzierenden 2-Aceta-



Schema 2. Das energetisch günstigste Konformere 3A (Plot-Programm SCHAKAL).

mido-2-desoxy-D-glucose-Einheit zurückgefaltet ist. Es ist daher zu erwarten, daß die Substitution der reduzierenden Einheit durch die in inverser Ringkonformation vorliegende 2-Acetamido-1,6-anhydro-2-desoxy- β -D-glucopyranose-Einheit die Konformation der α -(1 \rightarrow 6)-gebundenen D-Man-Einheit deutlich beeinflussen müßte.

Die Berechnung der von den Strukturen 1, 2 und 3 abgeleiteten Tetrasaccharide 4, 5 und 6 führt zu Energieflächen $E = f(\psi, \omega)$ für die (1 \rightarrow 6)-glycosidische Bindung, aus denen hervorgeht, daß das gg-Minimum im Vergleich zu den Sequenzen 1, 2 und 3 deutlich größere Anteile aufweist. Nach wie vor bilden allerdings gt-Konformationen das globale Minimum. Abb. 3 zeigt die Hyperfläche für das Tetrasacchar-

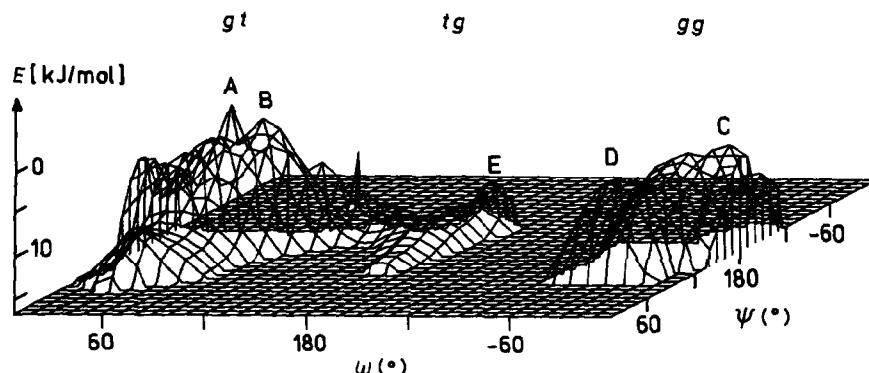
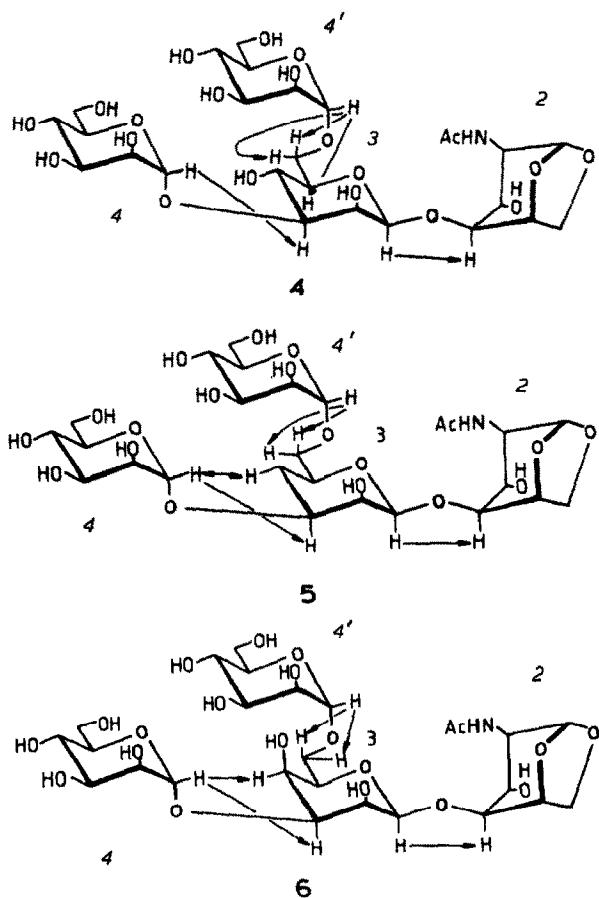


Abb. 3. Energiehyperfläche für die α -(1 \rightarrow 6)-glycosidische Bindung in 6.



Schema 3. Interglycosidische n.O.e.'s in 4, 5 und 6.

rid **6**, aus der dieser Tatbestand hervorgeht. Die entsprechenden Energieflächen für **4** und **5** weichen kaum von der auf Schema 3 gezeigten Fläche ab. Tab. IV faßt die gefundenen günstigen Konformationen für **4**, **5** und **6** zusammen.

Die ^1H - und ^{13}C -N.m.r.-Spektren der Tetrasaccharide **4**, **5** und **6** lassen sich mit Hilfe der zweidimensionalen Techniken vollständig zuordnen. Die ^1H -chemischen Verschiebungen sind in Tab. III, die ^{13}C -chemischen Verschiebungen in Tab. II zusammengefaßt. Mit Hilfe von n.O.e.-Experimenten kann für die (1 \rightarrow 3)- und (1 \rightarrow 4)-glycosidischen Bindungen in **4**, **5** und **6** gezeigt werden, daß die berechneten Konformationen mit den beobachteten n.O.e.'s qualitativ und auch quantitativ gut übereinstimmen. Die quantitative Auswertung der n.O.e's über die (1 \rightarrow 6)-glycosidischen Bindung hinweg läßt — wie auch bei den Sequenzen **1**, **2** und **3** — nur eingeschränkte Angaben über die Lage des $gt \rightleftharpoons gg$ -Konformerengleichgewichts zu. Daher wird auf eine quantitative Diskussion²⁹ der beobachteten und berechneten n.O.e.'s in **4**, **5** und **6** hierzu verzichtet. Das qualitative Ergebnis der Messungen zeigt Schema 3.

TABELLE IV

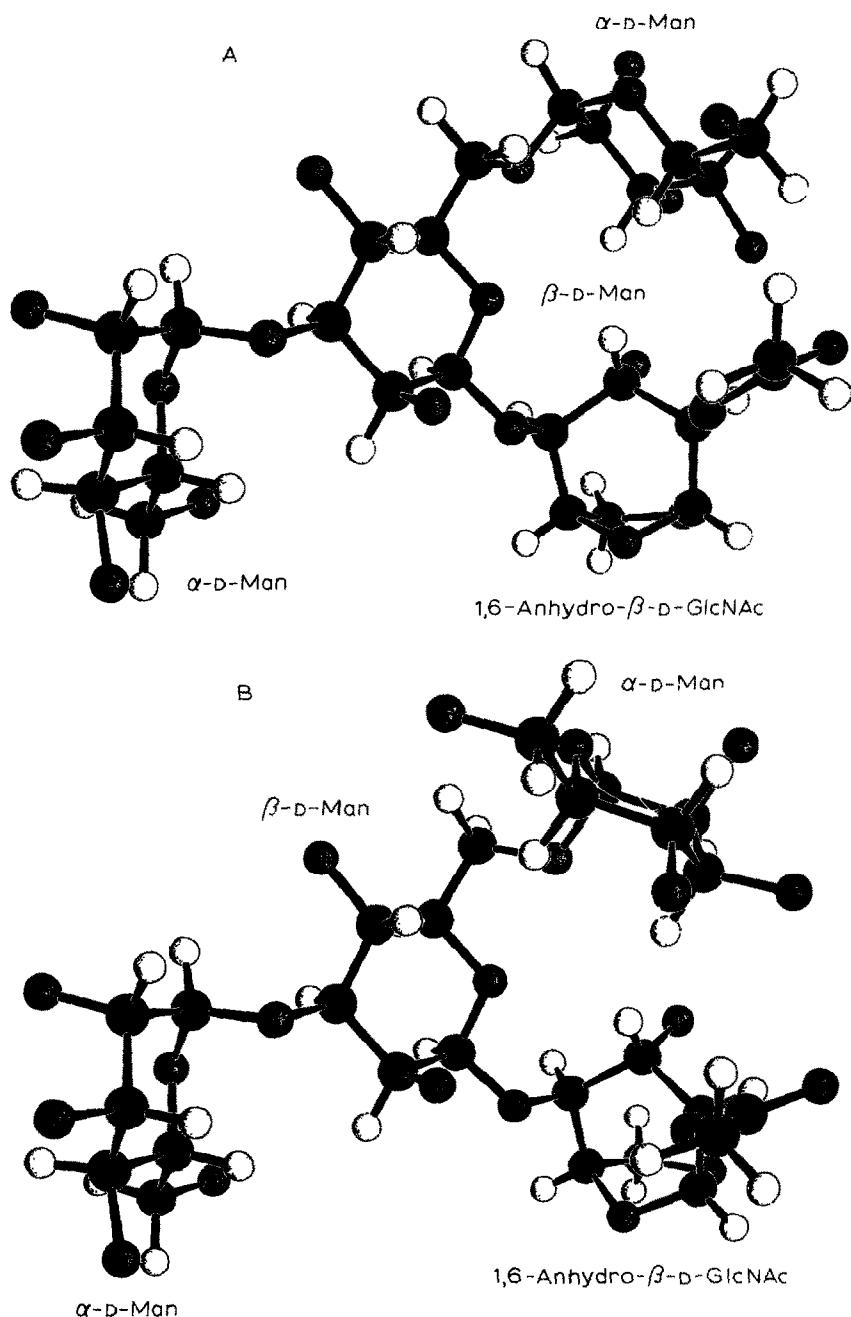
MIT GESA BERECHNETE DIEDERWINKEL UND KONFORMERENVERTEILUNG VON 4, 5 und 6.

Verb.	Kon. former	Diederwinkel ($^{\circ}$)						Rel. Energie (kJ/mol)	Anteil (%)		
		(1→6)- Bindung		(1→3)- Bindung		(1→4)- Bindung					
		ϕ	ψ	ϕ	ψ	ϕ	ψ				
4	A (gt)	-53	-175	-48	-13	39	-28	60	0.00	64	
	B (gt)	-47	-162	-48	-13	59	21	69	3.39	17	
	C (gg)	-51	-160	-48	-13	62	-24	-18	4.06	13	
	D (gg)	-41	115	-48	-13	56	-27	-46	5.48	6	
5	A (gt)	-54	-176	-52	-23	39	-28	61	0.00	59	
	B (gt)	-48	-162	-52	-23	59	20	71	3.01	18	
	C (gg)	-50	-160	-52	-23	62	-25	-19	3.52	14	
	D (gg)	-42	115	-52	-23	57	0	-45	4.94	8	
	E (tg)	-40	-105	-58	-32	60	-17	-179	11.93	1	
6	A (gt)	-54	-176	-52	-23	40	-28	62	0.00	62	
	B (gt)	-49	-162	-52	-23	59	20	71	2.93	19	
	C (gg)	-49	-172	-52	-23	60	-26	-11	4.56	10	
	D (gg)	-43	116	-51	-23	55	-27	-43	4.98	8	
	E (tg)	-41	-107	-56	-30	60	-17	-177	11.93	1	

Von erheblichem Interesse ist daher ein Vergleich der Kopplungskonstanten $J_{H-5^3, H-6^3}$ und $J_{H-5^3, H-6'^3}$ in den einander entsprechenden Tetrasaccharidsequenzen 1 und 4, 2 und 5 sowie 3 und 6. Dieser Vergleich lässt Rückschlüsse auf die Verschiebung des *gt*↔*gg*-Konformerengleichgewichts durch Einführung des 1,6-Anhydro- β -D-GlcNAc-Bausteins zu. Für die Tetrasaccharide 3 und 6 können die genannten Kopplungskonstanten durch phasensensitive H,H-COSY-Spektren ermittelt werden. Für die größere Kopplungskonstante findet man die Werte $J_{H-5^3, H-6^3}$ 8.5 in 3 und $J_{H-5^3, H-6'^3}$ 7.5 Hz in 6 (vgl. Tab. III). Diese Verringerung der Kopplungskonstanten um 1 Hz nach Einführung der 1,6-Anhydro-Einheit spricht deutlich für einen relativ größeren Anteil an *gg*-Konformeren im Tetrasaccharid 6 gegenüber der Sequenz 3. Somit lässt sich der berechnete Einfluß des 1,6-Anhydro-Ringes auf die Konformation an der (1→6)-glycosidischen Bindung und damit die enge Nachbarschaft zwischen (1→6)-gebundener α -D-Man- und reduzierender D-GlcNAc-Einheit in 1, 2 und 3 wie auch in 4, 5 und 6 experimentell direkt bestätigen. Schema 4 zeigt das *gt*(A)- und *gg*(C)-Konforme der vom natürlichen Tetrasaccharid 1 abgeleiteten Sequenz 4.

EXPERIMENTELLER TEIL

Konformationsberechnungen mit GESA. — Die HSEA-Berechnungen mit



Schema 4. Die energetisch günstigen Konformeren 4A (A) und 4C (B) (Plot-Programm SCHA-KAL).

dem Programm GESA wurden im Rechenzentrum Hamburg auf einer Fujitsu-M200 (Siemens-7.882)-Großrechenanlage durchgeführt.

Die Koordinaten für 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose, Methyl- β -D-mannopyranosid und Methyl- α -D-mannopyranosid sind Röntgenstruktur^{30,31} bzw. Neutronenbeugungsanalysen³² entnommen. β -D-Talose- und 4-Desoxy- β -D-lyxo-hexopyranose-Koordinaten werden aus dem Datensatz für β -D-Mannose gewonnen, indem an C-4 der β -D-Mannose die entsprechenden Substituenten mit Standardbindungsängen (C-O 1.43 Å; C-H 1.10 Å) und unter Annahme tetraedischer Symmetrie an C-4 mit Hilfe eines Computerprogramms erzeugt werden.

Aus Röntgenstrukturdaten für 1,6-Anhydro- β -D-glucose³³ lässt sich mit Hilfe des GESA-Programms ein Datensatz für 2-Acetamido-1,6-anhydro- β -D-glucose erzeugen. Dabei wird die OH-2-Gruppe gegen ein NAc-Gruppe ausgetauscht, deren Koordinaten der Röntgenstruktur für 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose entnommen sind. Der Diederwinkel zwischen den Bindungen H-2-C-2 und N-C wird zu -2° , der zwischen C-2-N und C=O zu $+2^\circ$ festgelegt.

N.m.r.-Experimente. — Die N.m.r.-Spektren wurden mit den Bruker-Geräten AM 500, WM 400 und WM 270 aufgenommen. Alle Messungen wurden mit Quadraturdetektion durchgeführt. Die Spektrometerfrequenzen für Protonen betrugen 500.13, 400.13 und 270.13 MHz, und für ¹³C-Kerne 100.63 MHz. Die Probenkonzentrationen waren: 2 (0.035 m), 3 (0.187 m), 4 (0.073 m), 5 (0.104 m), 6 (0.073 m). Die untersuchten Verbindungen wurden mehrmals in D₂O aufgenommen und gefriergetrocknet, bevor sie in hochreinem D₂O (> 99.96% D) gelöst wurden. Das Entgasen der Proben erfolgte durch wiederholte "freeze-pump-thaw"-Zyklen oder durch Sättigen mit N₂. Die N.m.r.-Röhrchen wurden unter N₂ oder Ar abgeschmolzen. Alle Kopplungskonstanten wurden nach erster Ordnung ausgewertet.

Die 90°-¹H- und ¹³C-Impulse wurden nach dem 180°-Verfahren und nach der Methode von Haupt³⁴, die 90°-¹H-Entkoppler-Impulse mit Hilfe des DEPT-Experiments³⁵ bestimmt. N.O.e.-Spektren wurden mit Hilfe der Differenzspektren-Methode³⁶ ausgewertet. In einigen Fällen wurde eine exponentielle Multiplikation der Differenz-FID's durchgeführt. Die ¹H-Spin-Gitter-Relaxationszeiten wurden nach der "non-selective-inversion-recovery"-Methode³⁷ unter Verwendung von Composite- -180° -Impulsen³⁸ bestimmt. Die 2D-Messungen wurden mit Bruker-Meßprogrammen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit einem ASPECT 2000-Computer.

DANK

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die wirkungsvolle Unterstützung der Untersuchungen. Thomas Peters dankt dem Fonds der chemischen Industrie für ein Stipendium. Herrn Dr. K. Bock danken wir für die Möglichkeit, Messungen am 500-MHz-Spektrometer in Kopenhagen durchzuführen.

LITERATUR

- 1 H. PAULSEN, T. PETERS, V. SINNWELL, M. HEUME UND B. MEYER, *Carbohydr. Res.*, 156 (1986) 86-106.
- 2 H. PAULSEN, T. PETERS, V. SINNWELL, R. LEBUHN UND B. MEYER, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1985) 489-509.
- 3 H. PAULSEN, T. PETERS, V. SINNWELL, R. LEBUHN UND B. MEYER, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1984) 951-976.
- 4 J.-R. BRISSON UND J. P. CARVER, *Biochemistry*, 22 (1983) 3671-3680; *ibid.*, 22 (1983) 3680-3686.
- 5 M. BISWAS, Y. C. SEKHARUDU UND V. S. R. RAO, *Int. J. Biol. Macromol.* 8 (1986) 1-8; *ibid.*, 8 (1986) 9-19.
- 6 H. PAULSEN UND T. PETERS, *Carbohydr. Res.*, 165 (1987) 229-249.
- 7 H. DEBRAY, D. DECOUT, G. STRECKER, G. SPIK UND J. MONTREUIL, *Eur. J. Biochem.*, 117 (1981) 41-55.
- 8 N. HARPAZ UND H. SCHACHTER, *J. Biol. Chem.*, 225 (1980) 4885-4893; *ibid.*, 225 (1980) 4894-4902.
- 9 G. J. VELLA, H. PAULSEN UND H. SCHACHTER, *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, 62 (1984) 409-417.
- 10 J. F. G. Vliegenthart, H. van Halbeek UND L. Dorland, *Pure Appl. Chem.*, 53 (1981) 45-77; J.-C. Michalski, G. Strecker, H. van Halbeek, L. Dorland UND J. F. G. Vliegenthart, *Carbohydr. Res.*, 100 (1982) 351-353; J. F. G. Vliegenthart, L. Dorland UND H. van Halbeek, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 41 (1983) 209-374.
- 11 J. MONTREUIL, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37 (1980) 157-223.
- 12 K. BOCK, B. MEYER, H. THØGERSEN UND R. U. LEMIEUX, *Can. J. Chem.*, 60 (1982) 44-57.
- 13 B. MEYER, *Int. Carbohydr. Symp., XIIth*, (1982) Abstr. II/25.
- 14 J. H. NOGGLE UND R. E. SCHIRMER, *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic Press, New York, 1971.
- 15 Y. NISHIDA, H. OHRUI UND H. MEGURO, *Tetrahedron Lett.*, 25 (1984) 1575-1578; H. OHRUI, Y. NISHIDA, M. WATANABE, H. HORI UND H. MEGURO, *Tetrahedron Lett.*, 26 (1985) 3251-3254.
- 16 K. BOCK, persönliche Mitteilung.
- 17 G. EICH, G. BODENHAUSEN UND R. R. ERNST, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 3731-3732.
- 18 G. KING UND P. WRIGHT, *J. Magn. Reson.*, 54 (1983) 328-332.
- 19 G. WAGNER, *J. Magn. Reson.*, 55 (1983) 151-156.
- 20 A. BAX UND G. DROBNEY, *J. Magn. Reson.*, 61 (1985) 306-320.
- 21 D. J. STATES, R. A. HABERKORN UND D. J. RUBEN, *J. Magn. Reson.*, 48 (1982) 286-292.
- 22 D. MARION UND K. WÜTHRICH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 113 (1983) 967-974.
- 23 A. A. MAUDSLEY UND R. R. ERNST, *Chem. Phys. Lett.*, 50 (1977) 368.
- 24 G. BODENHAUSEN UND R. FREEMAN, *J. Magn. Reson.*, 28 (1977) 471-476.
- 25 A. A. MAUDSLEY, L. MÜLLER UND R. R. ERNST, *J. Magn. Reson.*, 28 (1977) 463-469.
- 26 H. KESSLER, C. GRIESINGER, J. ZARBOCK UND H. R. LOOSLI, *J. Magn. Reson.*, 57 (1984) 331-336.
- 27 H. KESSLER, W. BERMEL UND C. GRIESINGER, *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 1083-1084.
- 28 K. BOCK, *Int. Carbohydr. Symp., XIIth*, (1984) D 6.
- 29 T. PETERS, Dissertation, Univ. Hamburg, 1986.
- 30 W. T. WINTER, S. ARNOTT, D. H. ISAAC UND E. D. T. ATKINS, *J. Mol. Biol.*, 125 (1978) 1-19.
- 31 V. WARIN, F. BAERT, R. FOURET, G. STRECKER, G. SPIK, B. FOURNET UND J. MONTREUIL, *Carbohydr. Res.*, 76 (1979) 11-22.
- 32 G. A. JEFFREY, R. K. McMULLAN UND S. TAKAGI, *Acta Crystallogr., Sect. B*, 33 (1977) 728-737.
- 33 Y. J. PARK, H. S. KIM UND G. A. JEFFREY, *Acta Crystallogr., Sect. B*, 27 (1971) 220-227.
- 34 E. HAUPT, *J. Magn. Reson.*, 49 (1982) 358-364.
- 35 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 UND D. T. PEGG, *ibid.*, 52 (1983) 407-423.
- 36 R. RICHARZ UND K. WÜTHRICH, *J. Magn. Reson.*, 30 (1978) 147-150.
- 37 R. L. VOLD, J. S. WAUGH, M. P. KLEIN UND D. E. PHELPS, *J. Chem. Phys.*, 48 (1968) 3831-3832.
- 38 D. J. CRAIK UND G. C. LEVEY, *Top. Carbon-13 NMR Spectrosc.*, 4 (1984) 241-275.