

Konformationsanalytische Untersuchungen von D-Xylosehaltigen O-Glycopeptidsequenzen*

Hans Paulsen, Rainer Busch, Volker Sinnwell und Annette Pollex-Krüger

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

(Eingegangen am 20. März 1990; angenommen in revidierter Form am 19. Oktober 1990)

ABSTRACT

The preferred conformations of the sequences of *O*-glycopeptides containing a β -D-xylosyl group linked to an L-seryl residue, found in the N-terminus of proteodermatan sulfate, show an almost extended peptide chain with the sugar unit in a specific position. The results of force-field calculations with the AMBER program have been confirmed, by n.m.r.-spectroscopic experiments, for a minimum conformation.

ZUSAMMENFASSUNG

In bevorzugten Konformationen von *O*-Glycopeptidsequenzen, die im N-terminalen Ende von Proteodermatansulfat enthalten sind und in denen D-Xylose β -glycosidisch mit L-Serin verbunden ist, nimmt die Saccharideinheit eine charakteristische Stellung zur weitgehend gestreckten Peptidkette ein. Kraftfeldberechnungen mit dem Programm AMBER ergeben für eine Minimumkonformation eine gute Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten n.m.r.-spektroskopischen Daten.

EINFÜHRUNG

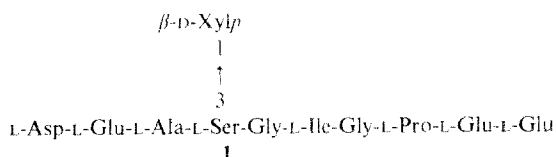
In einer vorhergehenden Arbeit¹ hatten wir Konformationsanalysen von *O*-Glycopeptiden durchgeführt, die, gebunden an L-Threonin eine α -glycosidisch verknüpfte Einheit von 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose enthalten. Dieser Typ stellt eine der wichtigsten Basisstrukturen der *O*-Glycoproteine dar². Es lag eine Serie von *O*-Glycopeptiden mit unterschiedlichen Kettenlängen vor³, die im N-terminalen Ende des Interleukin-2 vorkommen. Diese Untersuchungen hatten ergeben, daß durchaus in der Bindungsregion Konformationen bevorzugt sind, bei denen die Saccharideinheit zur vicinalen Peptidkette eine bestimmte Anordnung einnimmt¹. Diese Anordnung von etwa vier Aminosäuren in der Bindungsregion bleibt im wesentlichen unverändert, wenn die Peptidkette verlängert wird. Es ist keine Beeinflussung dieser Bindungsregion zu beobachten, wenn bis zu zehn Aminosäuren angeknüpft werden¹.

Eine weitere, in der Natur stark verbreitete *O*-Glycoproteinstruktur ist die β -glycosidische Bindung einer D-Xylopyranose an eine L-Serin-Einheit von Peptidketten². Diese, auch als Core-B-Struktur bezeichnete Anordnung kommt in großer struktureller

* XXX. Mitteilung der Serie "Konformationsanalyse". XXIX. Mitteilung, siehe Zitat 1.

Vielfalt in den Proteoglycanen vor, die Bestandteile der Stütz- und Bindegewebe sind^{4,5}. Die Verknüpfung an die Proteinkette erfolgt somit stets über die β -D-Xylose-Einheit, an die weitere Oligosaccharidketten mit bis zu 200 Resten geknüpft werden können. Die so an das Protein angeknüpften Reste können alternierende Disaccharideinheiten oder weitere komplexe Strukturen darstellen. Es sei hier an Proteoglycane, Glycosaminoglycane und Mucine von diesem Typ erinnert^{4,6}.

Wir wählten als Modellschubstanz ein Proteodermatansulfat aus Rinderhaut, dessen N-terminale Aminosäuresequenz von Pearson *et al.* aufgeklärt wurde⁷. Die N-terminale Sequenz hat die Struktur **1**. Es ist von Interesse, daß vergleichende Untersuchungen an anderen Proteodermatansulfaten aus Geweben von Mensch, Rind, Schwein und Hai zeigen, daß sie die gleiche glycosylierte Sequenz β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)-L-Ser-Gly enthalten⁸. Dies führte zu der Vermutung, daß die Sequenz Ser-Gly als Signalsequenz für die enzymatische Anknüpfung der ersten D-Xylose-Einheit von Bedeutung sein könnte⁸. Über bevorzugte Konformationen in der Bindungsregion von D-Xylose-haltigen O-Glycopeptiden liegen bisher keine Untersuchungen vor. In der nachstehenden Arbeit werden Sequenzen aus der Proteodermatansulfat-Sequenz **1** auf ihre konformativen Eigenschaften überprüft.



ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Als Strukturen standen für die Untersuchungen die Verbindungen **2–5** zur Verfügung, deren Synthese bereits früher von uns durchgeführt wurde⁹. Die n.m.r.-spektroskopischen Methoden zur Konformationsanalyse werden ausführlich in der vorhergehenden Arbeit beschrieben¹. Die Zuordnung aller ¹H- und ¹³C-n.m.r.-Spektren gelingt für alle Verbindungen durch Anwendung der üblichen zweidimensionalen Korrelationsexperimente¹⁰. Die Kopplungskonstanten werden nach erster Ordnung ausgewertet. Die komplexen Multipletts der Protonen der Isoleucin-Seitenketten in **3** und **5** sowie die der Glutaminsäure-Seitenkette in **4** werden nicht analysiert (vergl. Tab. I und II). Als weitere N.m.r.-Parameter werden die Spin-gitter-Relaxationszeiten T_1 der ¹³C-Kerne bestimmt. Eventuelle Wasserstoffbrücken werden durch die Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der NH-Protonen erfaßt. Die für die Konformationsanalyse wichtigsten Daten sind die Kopplungskonstanten und die n.O.e.-Effekte, die durch ein- und zweidimensionale n.O.e.- sowie ROESY-Messungen ermittelt werden (vergl. Tab. III). Theoretische Berechnungen zur Bestimmung einer Minimumkonformation werden mit dem Programm AMBER¹¹ innerhalb des Programms MACROMODEL durchgeführt. Die theoretisch ermittelte Minimumkonformation ist dann mit den experimentellen N.m.r.-Daten zu vergleichen.

TABELLE I

¹H-N.m.r. chemische Verschiebungen^a und Kopplungskonstanten^b der Verbindungen 2–5^c.

Verbindung	<i>β</i> -D-Xylose-Einheit						
	<i>H</i> -1	<i>H</i> -2	<i>H</i> -3	<i>H</i> -4	<i>H</i> -5a	<i>H</i> -5e	
2	4.37 (7.8)	3.27 (9.1)	3.38 (9.1)	3.56	3.26 (10.4) (11.4)	3.90 (4.2)	
3	4.46 (7.6)	3.33 (9.2)	3.47 (9.2)	3.64	3.35 (10.5) (11.5)	3.99 (5.4)	
4	4.45 (7.8)	3.32 (9.2)	3.47 (9.1)	3.61	3.35 (10.9) (10.9)	4.00 (5.5)	
Verbindung	Peptid-Einheit	<i>NH</i>	<i>α</i> - <i>H</i>	(<i>R</i>)- <i>β</i> - <i>H</i>	(<i>S</i>)- <i>β</i> - <i>H</i>		
2	Ser		3.90	3.90 (4.8) (10.5)	4.21 (5.9)		
3	Ala		4.19 (7.0)	1.60			
	Ser	8.84 (8.2)	4.73	3.90 (5.0) (10.6)	4.21 (5.5)		
	Gly	8.44 (5.4)	4.04				
	Ile	8.07 (8.3)	4.35 (5.8)	1.96	1.23 1.48	0.92 (7.4)	0.97 (6.8)
				<i>β</i> , <i>γ</i> - <i>H</i>			
4	Glu		2.43	2.15			
	Ala	8.6	4.46 (7.0)	1.53 (7.0)			
	Ser	8.6	4.69	4.01 (5.0) (10.6)	4.42 (4.9)		
5	Gly	8.6	3.82				
	Ala		4.20 (7.1)	1.60			
	Ser	8.76 (6.2)	4.60	3.92 ^d (4.9) (11.4)	3.94 ^d (6.3)		
	Gly	8.52 (5.6)	4.03				

			β -H	γ -H	γ' -CH ₃	δ -CH ₃
Ile	7.66 (8.8)	4.17 (5.8)	1.90 (5.8) (7.4)	1.17 1.43 (6.9)	0.95 (7.4)	0.90 (6.9)

^a δ -Werte. ^b J in Hz in Klammern. ^c Lösung in D₂O; für NH-Protonen, 9:1 H₂O : D₂O; interner Standard, H₂O δ 4.8; T 300 K; 400.13 MHz; pH 5.5. ^d Diese Zuordnung kann auch vertauscht sein.

TABELLE II

¹³C-N.m.r.-chemische Verschiebungen^a

Verbindung	β -D-Xylose-Einheit				
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
2	103.73	73.75	76.44	70.12	66.14
3	103.52	73.27	76.01	69.60	65.65

Verbindung	Peptid-Einheit	α -C	β -C	γ -C	δ -Me	ϵ -Me
2	Ser	55.53	68.79			
3	Ala	49.49	16.66			
	Ser	54.04	69.04			
	Gly	42.96				
	Ile		36.94	25.04	11.06	15.47
4	Glu	33.67	28.23			
	Ala	50.64	17.17			
	Ser	54.10	69.50			
	Gly	44.15				
5	Ala	49.60	16.99			
	Ser	56.16	61.49			
	Gly	43.11				
	Ile	60.12	37.34	24.89	11.25	15.66

^a δ -Werte, D₂O; externer Standard, Acetonitril, δ 1.3; T 300 K; 100.63 MHz; pH 5.5.

Die Verbindung **2** zeigt ein sehr einfaches N.m.r.-Spektrum. Die D-Xylopyranose Einheit liegt wie in allen Verbindungen **2–4** in der normalen ⁴C₁-(D)-Sesselkonformation vor. Dieses ergibt sich aus den Kopplungskonstanten der Ringprotonen. Man findet nur die großen *trans*-Kopplungen für $J_{2,3}$, $J_{3,4}$, $J_{4,5a}$. Die sich 1,3-diaxial gegenüberstehenden Protonen weisen auch die entsprechenden n.O.e.-Effekte auf. Die große Kopplung $J_{1,2}$ von 7.8 Hz zeigt die β -D-glycosidische Verknüpfung zum Serin an.

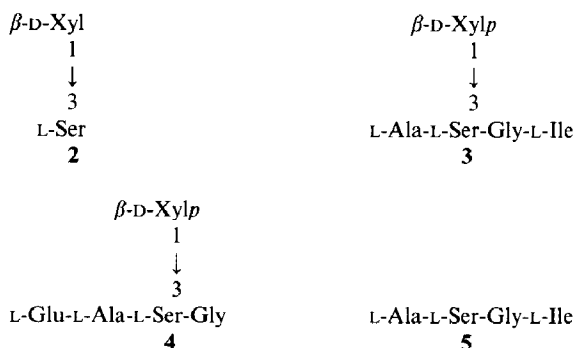
Für die Konformationsanalyse sind generell die beiden prochiralen Protonen der Seitenkette des Serins Ser ^{β} -H von Bedeutung. Diese beiden Protonen weisen in den Verbindungen **2–4** eine deutlich unterschiedliche chemische Verschiebung auf, so daß sie sauber getrennt untersucht werden können. Die Kopplungskonstanten der beiden Ser ^{β} -H mit Ser ^{α} -H sind mit 4.8 und 5.9 Hz sehr ähnlich und können nur Hinweise auf die Konformation der Seitenkette geben. Es wird jedoch ein deutlicher n.O.e.-Effekt des Xyl-H-1 mit einem der Ser ^{β} -H-Protonen gefunden. Das zweite Ser ^{β} -H-Proton weist nur

TABELLE III

Ergebnisse der 1D-n.O.e.- und 2D-ROESY-Messungen der Verbindungen 2–4^a

Konnektivität	2	3	4	
	n.O.e.	n.O.e.	R.o.e.	n.O.e.
Xyl-H-1–Xyl-H-3	5.3	5.2	m	2.9
Xyl-H-1–Xyl-H-5a	7.3	7.5	s	4.4
Xyl-H-1–Ser-(R)-β	3.0	4.9	s	1.7
Xyl-H-1–Ser-(S)-β	<1.0	<1.0	w	1.0
Xyl-H-2–Xyl-H-4	3.2	2.6	m	4.1
Xyl-H-4–Xyl-H-5e	3.3	2.5		4.3
Ser-α–Ser-(R)-β			s	4.5
Ser-α–Ser-(S)-β			m	2.5
Ser-(S)-β–Gly-NH			m	<1.0
Ser-α–Gly-NH			s	<1.0
Ser-α–Ser-NH			w	<1.0
Ala-α–Ser-NH			s	<1.0
Gly-α–Gly-NH			s	<1.0
Gly-α–Ile-NH			s	
Ile-α–Ile-NH			m	
Ile-α–Ile-Me		1.3	s	
Ile-α–Ile-β			m	
Ile-β–Ile-Me		5.0		

^a n.O.e.-Aufnahmen bei 400 MHz, 300K, in D₂O bzw. 9:1 H₂O–D₂O in Prozent der Einstrahlungsintensität. ROESY-Aufnahmen bei 250 MHz, 300K, in D₂O bzw. 9:1 H₂O–D₂O; Unterscheidung erfolgt nach schwachen (w), mittleren (m) und starken (s) Effekten.



einen schwachen entsprechenden n.O.e.-Effekt auf. Diese Befunde deuten darauf hin, daß in 2, wie zu erwarten, der *exo*-anomere Effekt wirksam ist, wodurch der ϕ -Xyl-Winkel auf $\sim 60^\circ$ festgelegt ist. Der χ -Ser-Winkel könnte um 60° schwanken. Es ist aber zu erwarten, daß bei diesem kleinen Molekül erhebliche Anteile von unterschiedlichen Konformationen vorliegen (Definition der Diederwinkel, siehe Zit. 1).

Wesentlich deutlicher sind jedoch die Verhältnisse bei dem Glycotetrapeptid 3. Der Saccharidrest ist identisch wie in 2. Von den beiden prochiralen Protonen Ser^H-H zeigt das bei hohem Feld (δ 3,90) einen starken n.O.e.-Effekt mit Xyl-H-1. Für das zweite Ser^H-H bei tiefem Feld (δ 4,21) wird nur ein kaum zu beobachtender, ver-

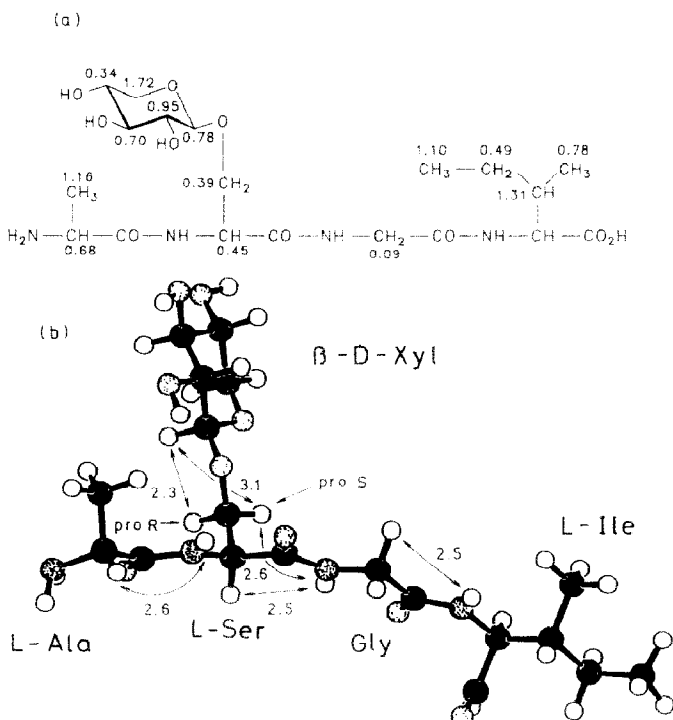


Abb. 1. (a) Strukturformel von **3** mit ^{13}C - T_1 -Werten (s). (b) Mit AMBER berechnete Energieminimum-Konformation von **3**. Wichtige H...H-Abstände (Å), für die n.O.e.-Effekte gefunden werden, sind eingezeichnet.

schwindend kleiner n.O.e.-Effekt mit Xyl-H-1 gefunden. Von vornherein ist eine Zuordnung der beiden prochiralen H-Atome noch nicht möglich. Man findet jedoch einen n.O.e.-Effekt des Ser $^{\beta}$ -H bei tiefem Feld (δ 4.21) mit dem Gly-NH. Hieraus ist zu schließen, daß, wie es in Abb. 1 gezeigt wird, der Gly-Ile-Arm nach rechts zum Saccharidteil angeordnet sein sollte. Der Ala-Arm weist dann nach links oben. Damit ergibt sich eine Zuordnung, nach der das Ser $^{\beta}$ -H bei hohem Feld (δ 3.9) mit dem starken n.O.e.-Effekt zu Xyl-H-1 die *R*-Konfiguration haben muß. Diese Zuordnung ist in Abb. 1b angegeben.

Als Ergebnis dieser Überlegungen zeigt Abb. 1, in welcher Weise eine bevorzugte Anordnung von Saccharidrest und Peptidkette um die Bindungsregion eingenommen wird. Mit diesem Bild stimmen auch gut die Kopplungskonstanten von Ser $^{\alpha}$ -H mit den Ser $^{\beta}$ -H-Protonen überein. Es werden für Ser $^{\alpha}$ -H mit Ser $^{\beta}$ -(*R*)-H 5.0 und mit Ser $^{\beta}$ -(*S*)-H 5.5 Hz, also etwa gleiche Werte gefunden. Dieses würde einem χ -Ser-Winkel von $\sim 60^\circ$ entsprechen, der im wesentlichen die Anordnung zwischen Saccharidrest und Peptidkette bestimmt.

Innerhalb der Peptidkette werden die üblichen n.O.e.-Werte gefunden, zwischen Ala $^{\alpha}$ -H und Ser-NH, zwischen Ser $^{\alpha}$ -H und Gly-NH, sowie zwischen Gly $^{\alpha}$ -H und Ile-NH. Dieses zeigt, daß die Peptidkette gestreckte Konformationen bevorzugt. Die Kopplungskonstanten der NH-Protonen mit den α -H-Protonen der jeweiligen Aminosäure (Tab. I)

stimmen auch mit einer bevorzugt gestreckten Anordnung überein. Aus den Kopplungskonstanten ergeben sich etwa ϕ -Werte der Aminosäuren um -160 bis -170° . Die Temperaturkoeffizienten der NH-Protonen weisen nicht auf etwaige Wasserstoffbrückenbindungen hin. Jedoch ist hierbei die Flexibilität der Kette zu berücksichtigen.

Von **3** wird ferner eine Energieminimumberechnung mit dem Kraftfeldprogramm AMBER durchgeführt, wobei als Startparameter ein χ -Ser-Winkel von 60° vorgegeben wird, der mit den beobachteten n.O.e.-Effekten am besten in Übereinstimmung zu bringen ist. Nach Freigabe aller Winkel wird eine Minimumkonformation errechnet, die in Abb. 1b wiedergegeben ist (vergl. Tab. IV). Die dort an den Pfeilen angegebenen Zahlen geben die Entfernung in Å für die Protonen an, bei denen für die Konformationsbetrachtung relevante n.O.e.-Effekte gefunden werden. Der χ -Ser-Winkel errechnet sich dann zu 49° . Es ist erkennbar, daß bei den angegebenen Entfernungen n.O.e.-Effekte zu erwarten sind, so daß eine Übereinstimmung zwischen den N.m.r.-Daten und der Konformation der Abb. 1 besteht. Demnach sollten innerhalb der Konformerenverteilung bevorzugte Anteile dieser Form vorliegen.

Die Untersuchungen am Glycotetrapeptid **4** führen zu sehr ähnlichen Ergebnissen wie bei der Verbindung **3**. Man beobachtet wiederum den charakteristischen starken n.O.e.-Effekt zwischen Xyl-H-1 und Ser $^\beta$ -(R)-H. Der entsprechende n.O.e.-Effekt zwischen Xyl-H-1 und Ser $^\beta$ -(S)-H ist wiederum klein. Der entscheidende n.O.e.-Effekt wird auch hier gefunden zwischen dem Ser $^\beta$ -(S)-H und dem Gly-NH. Damit ist in analoger Weise die Zuordnung der beiden prochiralen Protonen Ser $^\beta$ -H der Serin-Seitenkette möglich (vergl. Tab. III). Weiterhin zeigt sich eine Anordnung in der Bindungsregion, die der des anderen Moleküls **3** entspricht, wobei entsprechend der Gly-Arm nach rechts und hier der Glu-Ala-Arm nach links weist. Nach den Kopplungskonstanten von Ser $^\alpha$ -H mit Ser $^\beta$ -(R)-H von 5.0 und mit Ser $^\beta$ -(S)-H von 4.9 Hz ist für den χ -Ser-Winkel ein Wert von $\sim 60^\circ$ zu erwarten. Innerhalb der Peptidkette findet man auch hier die entsprechenden n.O.e.-Effekte zwischen Ala $^\alpha$ -H und Ser-NH sowie zwischen Ser $^\alpha$ -H und Gly-NH. Mit den entsprechenden Vorbehalten dürften auch hier die gestreckten Konformationen der Peptidkette bevorzugt sein.

Auch von **4** wurde eine entsprechende Energieminimumberechnung mit dem Programm AMBER durchgeführt (vergl. Tab. IV). Das Ergebnis ergibt eine Anordnung, die der von **3** sehr ähnlich ist. Im Bereich der glycosidischen Bindung ergeben sich Entfernungen zwischen den entsprechenden Protonen, für die relevante n.O.e.-Effekte zu erwarten sind und auch beobachtet werden. Insofern ergibt der Vergleich eine recht gute Übereinstimmung zwischen berechneter Konformation und den ermittelten N.m.r.-Daten. Dies zeigt, daß auch für **4** innerhalb der Konformerenverteilung die Konformation, die der von **3** entspricht, eine bevorzugte Rolle spielen sollte.

Das nicht glycosylierte flexible Tetrapeptid **5** zeigt ein einfaches N.m.r.-Spektrum, das sich analysieren läßt. Die Kopplungskonstanten entsprechen auch den Erwartungen. Jedoch zeigt das Tetrapeptid überraschenderweise ein so ungünstiges Relaxationsverhalten, daß die Ergebnisse von ein- oder zweidimensionalen n.O.e.-Spektren oder ROESY-Spektren unbefriedigend sind, und ein Vergleich mit **3** wenig Aussagen liefert.

TABELLE IV

Diederwinkel der glycosidischen Region und des Peptidgerüsts der mit AMBER berechneten Energieminimum-Konformationen von Verbindungen **3** und **4**^a

Verbindung	ϕ -Xyl	ψ -Xyl	χ -Ser	ψ -Glu	ϕ -Ala
3	63	-170	49		
4	60	178	53	-14	-58

Verbindung	ψ -Ala	ϕ -Ser	ψ -Ser	ϕ -Gly	ψ -Gly	ϕ -Ile
3	-170	-173	163	171	172	-61
4	157	-168	168	180		

^a In Grad. Definition der Winkel, siehe Zit. 1.

EXPERIMENTELLER TEIL

Alle N.m.r.-Experimente wurden in völlig analoger Weise durchgeführt, wie es in der vorhergehenden Arbeit¹ beschrieben worden ist. Die Kraftfeldberechnungen mit dem Programm AMBER erfolgten gleichfalls in entsprechender Weise wie beschrieben¹.

Die Temperaturkoeffizienten der Amid-Protonen $d\delta/dT$ [10^{-3} p.p.m./K] betragen bei **3**: Ser 7.67; Gly 6.51; Ile 7.49. Messungen bei 400 MHz bei 300, 310, 320, 330 K in 9:1 H₂O-D₂O.

DANK

Die Autoren danken Frau H. Nürnberger und Herrn M. Brenken für die Bereitstellung der Substanzen. Professor Still, New York, sind wir für die Überlassung des Programms MACROMODEL, das das Kraftfeld AMBER enthält, dankbar. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft und der Fonds des Chemischen Industrie hat dankenswerterweise Sachmittel für das Projekt zur Verfügung gestellt.

LITERATUR

- 1 H. Paulsen, A. Pollex-Krüger und V. Sinnwell, *Carbohydr. Res.*, 214 (1991) 199-226.
- 2 J. Montrenil, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 37 (1980) 157-223.
- 3 H. Paulsen und K. Adermann, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1989) 751-769.
- 4 L. A. Fransson, in G. O. Aspinall (Ed.), *The Polysaccharides*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1985, Ss. 337-415.
- 5 J. A. Nieduszynski, in E. D. T. Adkins (Ed.), *Polysaccharides*, VCH Verlag, Weinheim, 1985, Ss. 107-139.
- 6 W. J. Lennarz, *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, Plenum Press, New York, 1985.
- 7 C. H. Pearson, N. Winterbottom, D. S. Fackre and P. G. Scott, *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 15101-15104.
- 8 R. K. Chopra, C. H. Pearson, G. A. Pringle, D. S. Fackre und P. G. Scott, *Biochem. J.*, 232 (1985) 277-279.
- 9 H. Paulsen und M. Brenken, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1988) 649-654.
- 10 H. Kessler, M. Gehrke und C. Griesinger, *Angew. Chem.*, 100 (1988) 507-554; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 27 (1988) 490-538.
- 11 S. J. Weiner, P. Kollmann, D. A. Case, U. S. Singh, C. Ethio, G. Alagona, S. Profeta and P. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 765-784.