

NMR-spektroskopische Untersuchung niedermolekularer Biooligomere

Struktur, Dynamik und Wechselwirkungen von Peptiden, Kohlenhydraten
und Nukleinsäuren



Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Naturwissenschaftliche Fakultät Chemie und Pharmazie
Universität Regensburg

Daniela Fischer
aus Freising

2005

Diese Arbeit wurde angeleitet von *Prof. Dr. Armin Geyer*

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 19.01.2005

Das Kolloquium fand statt am: 25.02.2005

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. H.-H. Kohler (Vorsitzender)
Prof. Dr. A. Geyer (Erstgutachter)
Prof. Dr. E. Brunner (Zweitgutachter)
Prof. Dr. J. Daub

Für meine Eltern

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit von Juni 2001 bis Juli 2004 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Armin Geyer nicht nur für das interessante und vielfältige Thema dieser Dissertation, sondern auch für die Freiheit, interessanten Dingen auf den Grund gehen zu dürfen.

Sein in mich gesetztes Vertrauen und die zahlreichen, konstruktiven Diskussionen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch bei allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe möchte ich mich bedanken.

Besonders natürlich bei Peter Tremmel, der durch seine Hilfsbereitschaft in allen Bereichen eine grosse Hilfe war. Auch an seine unnachahmliche Art, mich in Frustphasen zu motivieren und an die vielen hervorragenden (fachlichen) Diskussionen werde ich mich gerne erinnern. Ein ganz dickes Dankeschön auch für das Korrekturlesen dieses „Schinkens“.

Aber auch Dr. Karoly Agoston, Harald Seger und Dominik Kohr möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die gute Zusammenarbeit und den gegenseitigen Rückhalt.

Einen lieben Dank auch an Nikola Kastner-Pustet und Ulrike Weck für ihre freundliche Art und ihre Hilfsbereitschaft.

Für die zur Verfügungstellung von Substanzen bedanke ich mich bei: Peter Tremmel, Harald Seger, Dr. Karoly Agoston und Rolf Hörger.

Ein ganz besonderes Dankeschön „meiner“ Anke, Anke Friemel, von der Uni Konstanz für die geduldige und sehr lehrreiche Einführung in die Wirren der NMR Spektroskopie, obwohl ihr Probenkühlschrank schon am Überquellen war. Auch für die freundliche Aufnahme in Konstanz und die diversen Schlafstätten bei KN Besuchen vielen Dank.

Natürlich auch vielen Dank an die NMR Abteilung in Regensburg mit Dr. Thomas Burgemeister, Fritz Kastner, Annette Schramm und Georgine Stühler für die Überlas-

sung der Geräte und das in mich gesetzte Vertrauen. Bei Fritz Kastner möchte ich mich auch für die grosse Unterstützung in allen Computer- und Softwarefragen bedanken.

Für die freundliche Erledigung meiner Zuckermassenspektren möchte ich mich bei der Regensburger Massenabteilung mit Dr. K. K. Mayer, Josef Kiermaier und Wolfgang Söllner bedanken.

Ein besonderer Dank an meine Kooperationspartner, die mich mit interessanten Substanzen und Fragestellungen versorgt haben: Prof. Dr. Richard R. Schmidt (Universität Konstanz), Prof. Dr. Andreas Marx (Universität Konstanz), Prof. Dr. Horst Kunz (Universität Mainz), Prof. Dr. Martin E. Maier (Universität Tübingen) und PD Dr. Eckhard Loos (Universität Regensburg).

A big thank you also to Prof. Dr. Homayoun Valafar (University of South Carolina) for his patience in explaining the basics of RDCs and his computer programme REDCAT to me.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Eike Brunner (Universität Regensburg) für die Beantwortung zahlloser Fragen bedanken.

Selbstverständlich auch einen lieben Dank an meine Semesterkollegen für den guten Zusammenhalt über all die Jahre.

Einen ebensolchen herzlichen Dank an alle an der Uni Konstanz für die freundliche Aufnahme, besonders Christoph Röhrig für die bequeme Couch und den umwerfenden Fachschaftskaffee. Vielen Dank auch an Ritch, Sarina, Niels, Frank und Michi für die schönen WG-Zeiten.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Dissertation möchte ich mich bei der DFG und bei Prof. Richard R. Schmidt bedanken.

Der grösste Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium ermöglicht haben, sondern auch immer für mich da sind und bei all meinen Entscheidungen stets hinter mir stehen.

*"Das schönste Erlebnis ist die Begegnung mit dem Geheimnisvollen.
Sie ist der Ursprung jeder wahren Kunst und Wissenschaft. Wer nie diese Erfahrung gemacht hat, wer keiner Begeisterung fähig ist und nicht starr vor Staunen dastehen kann, ist so gut wie tot: seine Augen sind geschlossen."*
Albert Einstein

INHALTSVERZEICHNIS

Motivation dieser Arbeit

HAUPTTEIL

Kapitel I: Hydroxyprotonen in polar, protischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur

1. Allgemeines	3
1.1 Methanol – Austauschgeschwindigkeiten und Probenbehandlung	6
1.1.1 In Methanol schwer lösliche Saccharide	8
2. Hydroxyprotonen verschiedener Monosaccharide in methanolischer Lösung	10
2.1 Methyl- β -D-Galactopyranosid (β GalOMe)	10
2.1.1 Titration von β GalOMe mit CaCl_2	11
Exkurs: Titrationsauswertung mit Scatchardplot	12
2.1.2 2D Spektren bei Zusatz von 28 eq CaCl_2	16
Exkurs: Karplusbeziehung für Hydroxygruppen in Kohlenhydraten	16
2.1.3 CaCl_2 -gesättigte Lösung – Variation der Temperatur	19
2.2 α/β -D-Glucopyranosid	20
3. Hydroxyprotonen von Saccharose in methanolischer Lösung und daraus resultierende Hinweise auf die Struktur in Lösung	22
3.1 Saccharose in Methanol + 4 eq CaCl_2	24
Exkurs: Isotopeneffekt	26
3.1.1 Temperaturreihe	27
3.1.2 2D ROESY – Strukturelle Aussagen	30
3.1.3 Ergebnis	30
3.2 Saccharose in Methanol – CaCl_2 -gesättigte Lösung	31
3.2.1 Temperaturreihe	33
3.2.2 2D-Spektren – Strukturelle Aussagen	34
3.2.3 Isotopeneffekt im ^{13}C Spektrum	36
3.2.4 Ergebnis	37
4. Sequentielle H-Brücken in Thiazolidinlactamen und deren Abhängigkeit von der Ca^{2+} Konzentration	38
4.1 Titration mit CaCl_2	39
4.2 In CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung – Analyse von Struktur und H-Brücken	42
5. Zusammenfassung	48

6. Literaturstellen	49
Kapitel II: Ca²⁺ induzierte Wechselwirkungen zwischen Lewis^X Analoga. Analyse der 3D-Struktur	
1. Allgemeines	53
2. Lewis^X Monomer (Le^X Mono)	57
2.1 Le ^X Mono in MeOH _{d4}	57
2.2 Le ^X Mono in MeOH _{d3} :MeOH _{d4} 1:1	61
2.3 Titration mit CaCl ₂ in MeOH _{d3} :MeOH _{d4} (1:1)	63
2.4 Le ^X Mono in CaCl ₂ -gesättigter, methanolischer Lösung	64
3. Lewis^X Dimer	67
3.1 Le ^X Dimer in MeOH _{d3} :MeOH _{d4} – Zusatz von wenig CaCl ₂	68
3.2 CaCl ₂ -Titration von Le ^X Dimer	73
3.3 Le ^X Dimer in CaCl ₂ -gesättigter, methanolischer Lösung	75
4. Ein Hexapeptid mit zwei Lewis^X Einheiten	77
4.1 Le ^X Glypep in MeOH _{d4} + 30 eq CaCl ₂	78
4.2 Le ^X Glypep in D ₂ O – ohne CaCl ₂ -Zusatz	82
4.3 CaCl ₂ -Titration von Le ^X Glypep in D ₂ O	83
4.4 Le ^X Glypep in D ₂ O + 40 eq CaCl ₂	87
4.5 Le ^X Glypep in H ₂ O:D ₂ O 90:10 – Identifizierung der NH-Protonen	88
4.6 Theoretische Ca ²⁺ Bindung – Strukturermittlung in silico	89
5. Glycolipid mit zwei Lewis^X Einheiten – Strukturermittlung in silico	91
6. Bestimmung des Winkels zwischen Lewis^X Einheiten bei Calciumbindung	93
6.1 Mathematische Berechnung der Winkel	94
6.2 Bestimmung der Winkel in Le ^X Dimer, Le ^X Glypep und Le ^X Glycolipid	96
7. Berechnung eines möglichen Verknüpfungsmusters für ein Lewis^a Dimer	97
7.1 Mögliche kovalente Verknüpfungseinheiten	99
8. Zusammenfassung	103
9. Literaturstellen	104

Kapitel III: Oligosaccharide aus dem Cyanobakterium *Nostoc*. Identifizierung und Strukturanalyse

1. Allgemeines	109
1.1 Cyanobakterien und ihre extra- und intrazellulären Polysaccharide – ein Überblick	109
1.2 Verwendete <i>Nostoc</i> Stämme und Isolierung ihrer Oligosaccharide	111
1.3 Salz oder Wärme als Stressfaktoren Auswirkungen auf die Kohlenhydratproduktion der hier untersuchten Arten	113
1.4 Bekannte Homooligosaccharide und ihre 3D-Struktur	113
2. Identifizierung der isolierten Oligosaccharide und ihrer Struktur	114
2.1 Das Trisaccharid Z34	114
2.2 Die höheren Homologen – Tetra-, Penta- und Hexasaccharid	119
2.2.1 Vergleich mit homooligomeren Zuckern am Beispiel von Maltotetraose	128
2.2.2 Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der Temperatur am Beispiel des Hexasaccharids	130
2.3 Ermittlung der Orientierung der Fructofuranose und der OH-Gruppen	131
2.3.1 Trisaccharid Z34 in CaCl ₂ -gesättigtem Methanol	132
2.3.2 Tetrasaccharid HZ34 in DMSO _{d6}	133
2.4 Berechnung der Struktur am Beispiel des Hexasaccharids	137
2.4.1 Strukturberechnung basierend auf CH-/CH-Restraints	137
2.4.2 Berechnung der Struktur unter Berücksichtigung zusätzlicher OH-/CH-Restraints	140
2.4.3 Vergleich der Struktur mit einer gerechneten Modellhelix	143
3. Einfluss der Fructofuranose auf die Sekundärstruktur der Oligosaccharide	146
3.1 Identifizierung und Zuordnung der defructosylierten Pentasaccharide	146
3.2 Strukturanalyse der defructosylierten Saccharide und Vergleich mit Pentasaccharid	148
3.2.1 Berechnung der Struktur des α -defructosylierten Pentasaccharids anhand von ROESY Daten	152
3.2.2 Berechnung der Struktur des β -defructosylierten Pentasaccharids anhand von ROESY Daten	155
3.2.3 Vergleich der Strukturen für α -defructosyliertes Pentasaccharid und Hexasaccharid	159
4. Okta- und Dekasaccharid – Einfluss der Kettenlänge auf die dreidimensionale Struktur	160
4.1 Strukturanalyse des Oktasaccharids (Okta)	161
4.1.1 Berechnung der Struktur anhand von ROESY Daten	164
4.1.2 Anmerkungen	167
4.2 Strukturermittlung des Dekasaccharids	167

4.2.1	Strukturermittlung des defructosylierten Dekasaccharids und Vergleich mit Dekasaccharid	169
4.2.2	Anmerkungen	171
4.3	Ermittlung der vorliegenden Konformere in höheren Oligosacchariden	171
5.	Kann für höhere Oligomere eine Membranaffinität nachgewiesen werden?	175
5.1	Hexa und Deka in SDS _{d25} Micellen	176
5.2	Deka in DMPC Liposomen	176
5.3	Hexa und Deka in Bicellen – Analyse der dipolaren Kopplungen	177
5.3.1	Ermittlung der ¹ D _{CH} Werte aus 2D HMQC und ¹³ C INEPT Spektren	178
5.4	Deka + α-Amylase – Bindungsuntersuchungen mittels Sättigungstransfer (STD)	180
6.	Zusammenfassung	181
7.	Literaturstellen	183

Kapitel IV: Membranaffinität von Polyolen. Identifizierung der Stärke und Strukturabhängigkeit mittels RDCs

1.	Einleitung	189
1.1	Partielle Orientierung und NMR – Allgemeines	189
1.2	Mathematische und physikalische Grundlagen der Residualen Dipolaren Kopplungen (RDCs)	190
1.3	Möglichkeiten der partiellen Orientierung in Lösung	191
1.3.1	Bicellen – Aufbau und physikalische Eigenschaften	192
1.4	Orientierung kleinerer Moleküle im magnetischen Feld	195
1.5	Affinität an Lipidmembranen – Art der Wechselwirkungen und Beispiele	197
1.6	NMR Methoden zur Messung von „Ligand-Rezeptor“-Wechselwirkungen	198
2.	RDCs polarer, polyhydroxylierter Thiazolidinlactame	200
2.1	Thiazolidinlactame – Strukturelle Merkmale	200
2.2	RDCs für Molekül 1 – Abhängigkeit von experimentellen Parametern	209
2.2.1	Grosse dipolare Kopplungen für das Grundmolekül 1	209
2.2.2	Einfluss von q und c auf den Grad der Ausrichtung	211
2.2.3	Einfluss des f-Wertes auf den Grad der Ausrichtung	215
2.2.4	Einfluss erhöhter Ionenstärke – Zugabe von NaCl	216
2.3	Auswirkungen struktureller Modifikationen auf die RDC Werte	217
2.3.1	Bizyklen mit geänderter 7-Ringkonformation	217
2.3.2	Bizyklen mit „normaler“ Sesselkonformation und Modifikation in Position 3	219
2.3.3	Bizyklen mit Sesselkonformation und Modifikation in Position 6	222

2.3.4	Bizyklen mit Sesselkonformation und Modifikationen in den Positionen 3 und 6	225
2.3.5	Weitere, modifizierte Bizyklen	229
3.	Vergleich mit verschiedenen Sacchariden	232
3.1	Die Cryozucker Trehalose und Saccharose – Disaccharide mit membranschützender Wirkung	232
3.2	1,6-Anhydro- β -D-Glucose – ein Saccharid mit drei axialen OH-Gruppen und Wasserstoffbrücken	234
3.3	Titration von 1 mit Trehalose in Bicellen – Auswirkung auf den Orientierungsgrad von 1	235
4.	Modifikation der Bicellenoberfläche – Dotierung mit langkettigen Alkylglycosiden	238
5.	Ausrichtung verschiedener Bizyklen in einem weiteren, flüssig-kristallinen Medium	240
6.	Wechselwirkungen zwischen 1 und DMPC	243
6.1	DMPC Liposomen in D ₂ O	243
6.2	DMPC in CDCl ₃ – Titration mit 1	245
6.2.1	2D NOESY Spektren – Identifizierung der wechselwirkenden Gruppen	249
7.	Weitere NMR Methoden zur Untersuchung von Wechselwirkungen	250
7.1	Sättigungstransfermessungen – STD	250
7.1.1	STD von 1 und weiterer, sich stark ausrichtender Bizyklen	250
7.1.2	STD von Bizyklen mit hydrophoben Gruppen	252
7.1.3	STD von Bizyklen mit nur schwacher Ausrichtung in Bicellen	253
7.2	Bestimmung der Diffusionskonstanten für verschiedene Bizyklen in isotroper und anisotroper Phase	256
8.	Ist die Abschätzung der Bindungskonstante für Bizyklen in Bicellen mittels RDCs möglich?	259
8.1	Molekül 1 in verdünnter Bicellenprobe (5% wt)	262
8.2	Molekül 1 in Bicellenlösung mit hohem Lipidgehalt (15% wt)	263
8.3	Molekül 7 – ein in Bicellen nur schwach orientiertes Molekül	263
9.	Berechnung der Tensoraten mit REDCAT	264
9.1	Der GDO-Wert – Generalized Degree of Order	265
9.2	Bestimmung der Tensorelemente aus den experimentellen ¹ D _{CH} Daten	266
9.2.1	Molekül 1 in Abhängigkeit von den Probenbedingungen	266
9.2.2	Vergleich der verschiedenen Bizyklen	268
9.2.3	GDO-Werte für Messungen in Otting Phase	271
9.3	Graphische Darstellung der, um die Euler Winkelwerte rotierten, Strukturen	272

10. Zusammenfassung	275
11. Literaturstellen	276

Kapitel V: Struktur und Dynamik zyklischer Jasplakinolid Analoga

1. Jasplakinolid – ein zyklisches Depsipeptid – Allgemeines	281
2. 19-gliedrige, peptidische Jasplakinolid Analoga	283
2.1 Allgemeines	283
2.2 Der Makrozyklus Sy2741	284
2.2.1 Temperaturkoeffizienten der NH-Protonen	285
2.2.2 Prochirale Zuordnung der Methylenprotonen	287
2.2.3 Strukturermittlung mit Hilfe von ROESY- und NOESY-Daten	289
2.3 Der Makrozyklus Sy5141	295
2.3.1 Sy2741 und Sy5141 – Vergleich der ^1H Spektren	297
2.3.2 Temperaturkoeffizienten der NH-Protonen	298
2.3.3 Prochirale Zuordnung der Methylenprotonen	299
2.3.4 Strukturermittlung mit Hilfe von ROESY- und NOESY-Daten	301
2.4 Vergleich der für Sy2741 und Sy5141 erhaltenen Daten mit jenen für Jasplakinolid aus der Literatur	305
2.4.1 Vergleich der Temperaturkoeffizienten und der $^3J_{\text{NH},\text{H}\alpha}$ Kopplungen der NH-Protonen	305
2.4.2 Vergleich der diastereotopen Methylenprotonen – chemische Verschiebung, Kopplungen und Rotamerenverhältnis	306
3. 18-gliedrige, peptidische Jasplakinolid „Analoga“	308
3.1 Allgemeines	308
3.2 Makrozyklen Maclac1 und Maclac2 im Vergleich	309
3.2.1 Temperaturkoeffizienten der NH-Protonen	311
3.2.2 Prochirale Zuordnung der Methylenprotonen	312
3.2.3 Strukturermittlung mit Hilfe von ROESY- und NOESY-Daten	313
4. Zusammenfassung	319
5. Literaturstellen	320

Kapitel VI: 4'-modifizierte DNA Tetramere – Strukturanalyse für Einzel- und Doppelstrang

1. Allgemeines	323
2. Ermittlung der Konformation der Einzelstränge	327
2.1 Allgemeines zu den strukturellen Eigenschaften von DNA	327
2.2 Wichtige NMR Parameter für DNA Strukturen	330
2.3 Übersicht über die untersuchten DNA-Tetramere 4T, 4PH und 4PM	334
2.4 Allgemeines zur Strukturermittlung der Einzelstränge	335
2.5 Strukturanalyse des unmodifizierten Tetramers 4PH	336
2.6 Strukturanalyse des modifizierten Tetramers 4PM	341
2.7 Strukturanalyse des Komplementärstranges 4T	345
3. Ermittlung der Konformation der Doppelstränge	349
3.1 Temperaturreihen für 4PH/4T und 4PM/4T	349
3.2 Vergleich der ROESY Daten für 4PH/4T bei 300 und 277 K	355
3.3 Vergleich der ROESY Daten von 4PM als Einzelstrang (300 K) und in Lösung mit 4T (277 K)	357
3.4 Vergleich der ROESY Daten von 4PH und 4PM bei 277 K in Lösung mit 4T	358
4. Zusammenfassung	361
5. Literaturstellen	362
Zusammenfassung	365

EXPERIMENTALTEIL

Materialien und Methoden	371
Kapitel I: Hydroxyprotonen in polar, protischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur	379
Kapitel II: Ca ²⁺ induzierte Wechselwirkungen zwischen Lewis Analoga. Analyse der 3D-Struktur	385
Kapitel III: Oligosaccharide aus dem Cyanobakterium <i>Nostoc</i> . Identifizierung und Strukturanalyse	393

Kapitel IV:

Membranaffinität von Polyolen. Identifizierung der Stärke und Strukturabhängigkeit
mittels RDCs 403

Kapitel V:

Struktur und Dynamik zyklischer Jasplakinolid Analoga 417

Kapitel VI:

4'-modifizierte DNA Tetramere – Strukturanalyse für Einzel- und Doppelstrang 427

ANHANG (auf CD)

Zusätzliche Spektren und Verschiebungstabellen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% wt	Gewichtsprozent
Å	Angstroem (10^{-10} m)
Ala	Alanin
Asn	Asparagin
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
C12E5	Pentaethylenglycolmonododecylether
COSY	Correlated Spectroscopy
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
δ	chemische Verschiebung in ppm
<i>D</i>	dipolare Kopplung
D ₂ O	Deuteriumoxid
DHPC	Dihexanoylphosphatidylcholin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DQFCOSY	Double Quantum Filtered COSY
eq	Äquivalent
Fuc	Fucose
<i>g</i>	gauche
Gal	Galactose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gly	Glycin
GDO	Generalized Degree of Order
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
INEPT	Insensitive Nuclei enhanced by Polarisation Transfer
${}^nJ_{AB}$	skalare Kopplung zwischen den Kernen A und B über n Bindungen
K	Kelvin
K_a	Bindungs- / Assoziationskonstante
KH	Kohlenhydrat
Konz.	Konzentration
Le ^x	Lewis ^x Glycokonjugat
Le ^a	Lewis ^a Glycokonjugat
LM	Lösungsmittel
MD	Moleküldynamik
Me	Methyl-
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz

MLEV17	Breitbandentkopplungssequenz nach M. Levitt
mM	millimolar (Konzentrationsangabe)
ms	Millisekunde
n.d.	nicht ermittelt (not detected)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PC	Phosphocholin
ppb	parts per billion (10^{-9})
ppm	parts per million (10^{-6})
quart	quartär
RDC	Residual Dipolar Couplings
RMSD	Wurzel des mittleren Fehlerquadrats (root mean square deviation)
ROE	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect
ROESY	Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
STD	Sättigungstransfer (Saturation Transfer Difference)
t	trans
T_1	longitudinale / Spin-Gitter-Relaxationszeit
$T_{1\rho}$	Relaxationszeit unter Spin Lock
t_m	Mischzeit (NOESY)
Thr	Threonin
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
trDC	transferred residual dipolar coupling
TSP	Trimethylsilylpropionsäure
Ser	Serin
V	Volumen
WATERGATE	Wasserunterdrückung
WW	Wechselwirkung
Xaa	jede natürliche Aminosäure (ausser Prolin)

Motivation dieser Arbeit

Eine grosse Vielfalt unterschiedlichster Moleküle ist an biologischen und biochemischen Prozessen beteiligt.

Besonders „kleine“ Biomoleküle oder deren synthetische Analoga stellen eine Herausforderung dar bei der Aufklärung ihrer Struktur und ihrer dynamischen Eigenschaften.

Durch ihre grosse Oberfläche im Vergleich zu ihrem relativ kleinen Volumen sind sie in Lösung hochsolvatisiert und dadurch in ihren Eigenschaften stark von dem, sie umgebenden, Medium abhängig, so dass geringe Änderungen, wie z. B. im Salzgehalt, unter Umständen drastische Auswirkungen auf die Struktur/Konformation kleiner Moleküle in Lösung haben. Hinzu kommt eine teilweise hohe Flexibilität ihrer Strukturen in Lösung.

Um sich generell der Struktur von (Bio-)Molekülen auf atomarer Ebene nähern zu können, gibt es zwei herausragende, analytische Methoden: die Röntgenkristallographie und die NMR Spektroskopie.

Erstere ist eine seit langem etablierte Methode, die vor allem bei Makromolekülen von Bedeutung ist. Für kleinere Biomoleküle, die, wie z. B. die Kohlenhydrate, über eine hohe Flexibilität verfügen, ist es meist schwierig, wenn nicht sogar ausgeschlossen, entsprechende Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse zu erhalten.

Die NMR Spektroskopie hingegen bedient sich sowohl amorpher Festkörper, als auch Lösungen von Molekülen, um Strukturen aufzuklären.

Da besonders für biologisch relevante Moleküle ihre Struktur in Lösung, z. T. unter physiologischen Bedingungen, von besonderem Interesse ist, stellt die NMR Spektroskopie hierfür die Methode der Wahl dar.

Sie erlaubt auch Aussagen über die Dynamik von Molekülen, Bindungsaffinitäten oder Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Molekülen oder Molekülbereichen.

Gerade für die vielen, hier untersuchten, Kohlenhydrate, ihre dreidimensionale Struktur, ihre Wechselwirkungen miteinander und ihre hohe Dynamik aufgrund der flexiblen O-glykosidischen Bindungen, ist die NMR Spektroskopie in Lösung ein grosser Gewinn.

Auch die Auswirkungen von Modifikationen auf die strukturellen Eigenschaften von Naturstoffanaloga oder Biomolekülen auf atomarer Ebene liefert Einblicke in die Möglichkeiten, wie biologische Prozesse ablaufen könnten und führen zu neuen Überlegungen, wie diese Erkenntnisse in der Zukunft bei pharmazeutischen oder medizinischen Fragestellungen von Nutzen sein können.

Hierzu gehört auch die Untersuchung der Strukturabhängigkeit von Membranaffinitäten kleiner, organischer Moleküle.

Die vorliegende Arbeit soll einen Eindruck darüber vermitteln, welches Potential in niedermolekularen Biomolekülen steckt – von ihrer teilweise ungewöhnlichen Struktur bis hin zu höchst erstaunlichen Eigenschaften.

HAUPTTEIL

Kapitel I

Hydroxyprotonen in polar, protischen
Lösungsmitteln bei Raumtemperatur

1. Allgemeines

Gerade wenn es um die Strukturermittlung von Kohlenhydraten in Lösung geht, sind zusätzliche Informationen, die die Hydroxyprotonen betreffen, von grosser Bedeutung. Das Problem bei Kohlenhydraten in wässriger Lösung ist allgemein, dass meist nur wenige NOEs für die Struktur herangezogen werden können. Diese betreffen dann für gewöhnlich nur Protonen zu beiden Seiten einer O-glykosidischen Bindung, und long-range NOEs sind aufgrund der relativ grossen Flexibilität von Sacchariden nur schwer zu identifizieren, zumal für Kohlenhydrate eine sehr geringe Dispersion ihrer ^1H Signale (ca. 3.3 – 4.2 ppm) vorhanden ist und somit vielfach Überlagerungen auftreten. Auch das spezifische Isotopenlabelling mit ^{13}C steht für Zucker bis jetzt noch nicht in einem standardisierten Verfahren, wie es für Proteine oder Nucleinsäuren der Fall ist, zur Verfügung.¹

Aber nicht nur als zusätzliche Informationsquelle sind Hydroxyprotonen bei der Analyse von Zuckern entscheidend. Ein wichtiger Punkt sind die im Festkörper identifizierbaren H-Brücken in Kohlenhydraten; es wurde desöfteren vermutet, dass diese H-Brücken in Lösung viel zu schwach seien, um überhaupt die Struktur der Kohlenhydrate beeinflussen zu können. Hier ist aber nun von entscheidender Bedeutung, dass die direkt an den H-Brücken beteiligten Hydroxyprotonen überhaupt erst in wässriger Lösung dargestellt werden können. Das Problem liegt in der sehr hohen Austauschrate der Hydroxyprotonen mit Wasser in Lösung; diese ist so hoch, dass unter normalen Bedingungen im NMR keine OH-Signale in wässriger oder alkoholischer Lösung zu beobachten sind.

Vielfach wurde auf Lösungsmittel wie z. B. DMSO_{d6} ausgewichen, um Aussagen auch über die Hydroxyprotonen von Zuckermolekülen machen zu können. In DMSO_{d6} ist die Austauschrate so weit herabgesetzt, dass OH-Protonensignale separiert und mit Kopplungsmuster erhalten werden. Allerdings ist man mit DMSO_{d6} – einem rein organischen Lösungsmittel, das nur Akzeptoreigenschaften besitzt – relativ weit von wässrigen, biologischen Systemen entfernt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass starke H-Brücken in DMSO nicht unbedingt auch in Wasser vorhanden sein müssen², bzw. dass auch ein unterschiedliches intramolekulares H-Brückenmuster in beiden Lösungsmitteln beobachtet werden kann.³

Da eine Vielzahl an Kohlenhydraten entscheidend für die verschiedensten biologischen Funktionen sind, ist vor allem ihre Struktur in wässriger oder zumindest „wasserähnlicher“ Lösung besonders von Interesse.

Ein in der Literatur vielfach beschriebener „Ausweg“ ist die Verwendung von sog. kryogenen Mischungen, also Mischungen aus $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ und DMSO_{d6} (1:4 (v/v)) bzw. $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ und Acetone_{d6} (85%/15% (v/v)). Damit erreicht man wasserähnliche Lösungsmittelgemische, die zudem ohne zu gefrieren soweit heruntergekühlt werden können, dass der Austausch zwischen Wasser und Hydroxyprotonen extrem verlangsamt ist, und dadurch die OH-Signale ähnlich wie in reinem DMSO_{d6} – separiert und mit Kopplungen – erhalten werden können. Messtechnisch ist dies allerdings etwas aufwendig, da man in einem Temperaturbereich von -10 bis -15 °C messen muss, um in den Bereich des verlangsamten Austausches zu gelangen. Beispiele

hierfür sind u. a. Untersuchungen von Sandström und Kenne et al.^{1, 4} an verschiedenen Di-, Trisacchariden und Cyclodextrinen. Dabei wurden sowohl die $^3J_{\text{CH, OH}}$ Kopplungen, als auch die Temperaturkoeffizienten $\Delta\delta/\Delta T$, die chemischen Verschiebungen δ ($\Delta\delta$ im Vergleich zu den jeweiligen Monosacchariden) und die Austauschraten k_{ex} der Hydroxyprotonen bestimmt. Auch der H/D Isotopeneffekt der Hydroxyprotonen auf die ^{13}C Signale konnte gezeigt werden.¹ Hierbei handelt es sich – bei genügend langsamem Austausch – um eine Verbreiterung oder zusätzliche Aufspaltung der ^{13}C Signale bedingt durch die OH/OD-Gruppen.

- $^3J_{\text{CH, OH}}$: ein Wert von 5.5 ± 1.5 Hz entspricht einer gemittelten Kopplung aufgrund der freien Rotation der OH-Gruppe (lt. Karplusgleichung⁵) und somit keiner Vorzugsrichtung wie es im Falle einer H-Brücke zu erwarten wäre. Natürlich kann auch zufällig eine fixierte Ausrichtung genau einer Kopplung von ca. 5 Hz entsprechen.
- $\Delta\delta/\Delta T$: Werte um 10 ppb/deg für OH-Protonen, die nicht an H-Brücken beteiligt sind, Werte um 5 ppb/deg für solche, die mit grosser Wahrscheinlichkeit H-Brücken ausbilden (in $\text{D}_2\text{O}/\text{Aceton}_{\text{d}6}$).^{1, 4} Der letztgenannte Wert ist vom Minimalwert für H-Brücken in DMSO (ca. 3 ppb/deg) nicht weit entfernt.
- $\Delta\delta$: Da mehrere, teilweise gegenläufig agierende Faktoren die Verschiebung der OH-Protonen in Oligosacchariden (im Vergleich zu den jeweiligen Monosacchariden) beeinflussen, ist hier eine sorgfältige Analyse notwendig. Generell werden OH-Protonen, die an H-Brücken beteiligt sind, entschirmt. Allerdings besitzen räumlich benachbarte Sauerstoffe (die der O-glykosidischen Bindungen oder im Ring) einen abschirmenden Effekt.^{4a}
- k_{ex} : Austauschraten geben sowohl einen Hinweis auf räumliche Nähe, als auch auf H-Brückenwechselwirkungen. Für den Beweis von H-Brücken sollten allerdings auch andere Parameter berücksichtigt werden.

Auch Poppe und van Halbeek konnten für verschiedene Mono- und Disaccharide die Hydroxyprotonen in wässriger Lösung sichtbar machen und untersuchen.⁶ Von besonderem Interesse ist hierbei, dass es ihnen gelungen ist, in einer reinen $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ Mischung ohne Zusatz von $\text{DMSO}_{\text{d}6}$ oder $\text{Aceton}_{\text{d}6}$ bei -16 °C die OH-Protonen inkl. ihrer Kopplungen für Methyl- β -D-Galactopyranosid, Methyl- β -D-Glucopyranosid und Methyl- β -Lactosid darzustellen.^{6b} Der Trick war hierbei die Verwendung eines Kapillarröhrchens, wodurch ein Gefrieren der Zuckerlösung verhindert werden konnte.

Der erste Artikel über Hydroxyprotonen in wässriger Lösung stammt übrigens von Symons et al.⁷. Sie konnten OH Protonen im ^1H NMR in gepufferter, wässriger Lösung als breite Signale sichtbar machen.

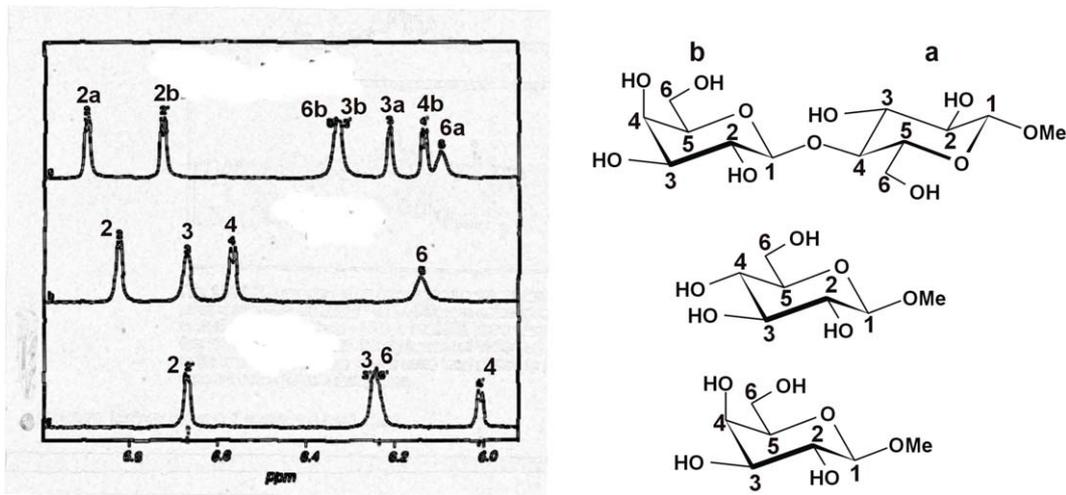


Abb. 1. ^1H NMR der Hydroxyprotonen von Methyl- β -D-Galactopyranosid, Methyl- β -D-Glucopyranosid und Methyl- β -Lactosid in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1 (v/v)) bei -16°C . (aus ^{6b}).

Die zahlreichen Untersuchungen der Saccharose in diesem Zusammenhang sind in einem späteren Kapitel ausführlich dargelegt.

Da, wie zuvor bereits erwähnt, die Messungen bei -10 bis -15°C relativ aufwendig sind und unter Umständen sehr lange Zeit in Anspruch nehmen (Äquilibration des Gerätes und der Probe) und zudem, mit Ausnahme von den Messungen von Poppe und Halbeek ^{6b}, wiederum Gemische von Wasser mit einem grossen Anteil an organischem Lösungsmittel eingesetzt werden, war der Grundgedanke, ein reines Lösungsmittel zu wählen, welches Wasser möglichst ähnlich ist, in welchem aber bereits bei Raumtemperatur der Austausch von Hydroxyprotonen und LM bzw. enthaltenem Restwasser soweit verlangsamt werden kann, dass die OH-Protonen separiert und mit Kopplungsmuster dargestellt werden können.

Die Wahl fiel auf Methanol, genauer eine Mischung aus $\text{MeOH}_{\text{d}3}$ (CD_3OH) und $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ (CD_3OD). Für diese Mischung ergab sich als optimales Verhältnis 1:1 (v/v), da folgende Faktoren berücksichtigt werden müssen:

- Der Austausch kann niemals verhindert, sondern nur verlangsamt werden. Daher müssen Protonen des LMs für den Austausch zur Verfügung stehen. Dies wird gewährleistet durch $\text{MeOH}_{\text{d}3}$, so dass die OH Protonen des gelösten Saccharids (bei $\text{d}3:\text{d}4 = 1:1$) ein Integral von ca. 50% bezogen auf CH Protonen aufweisen.
- Der Isotopeneffekt für acide Protonen ist nur in einem Gemisch aus voll- und teildeutertem Lösungsmittel sichtbar, welches jenen Protonen gestattet, sowohl mit D, als auch mit H auszutauschen.
- Da das OH Proton des $\text{MeOH}_{\text{d}3}$ selbst ein sehr grosses Signal ergibt, kann nicht in 100% $\text{MeOH}_{\text{d}3}$ gemessen werden, da hierdurch die Empfindlichkeit für die im Verhältnis zu $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ relativ schwachen Saccharidsignale vermindert wird.
- Zudem ist $\text{MeOH}_{\text{d}3}$ bedeutend teurer als $\text{MeOH}_{\text{d}4}$. Auch dies ist ein Grund für die Mischung von voll- und teildeutertem Methanol.

Tabelle 1 gibt einen Vergleich der physikalischen Eigenschaften von Wasser, Methanol und DMSO wieder.

	Wasser	Methanol	DMSO
Lösungsmittel- kategorie	polar, protisch	polar, protisch	polar, aprotisch
Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none"> • hohe DK • Donor- und Akzeptor-eigenschaften • Ausbildung von H-Brücken • Solvatisierung von Anionen und Kationen 	<ul style="list-style-type: none"> • hohe DK • Donor- und Akzeptor-eigenschaften • Ausbildung von H-Brücken • Solvatisierung von Anionen und Kationen 	<ul style="list-style-type: none"> • hohe DK • nur Akzeptoreigenschaften • Solvatisierung von Kationen
Polarität (relativ)	1.0 (per definitionem)	0.75	0.45
Dielektrizitäts- konstante (DK)	79.7	32.6	46.6

Tab. 1. Vergleich der physikalischen Eigenschaften von Wasser, Methanol und DMSO.⁸

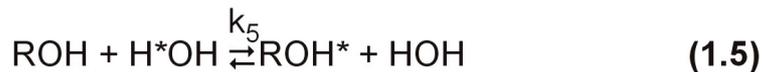
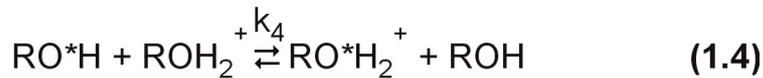
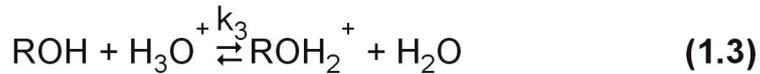
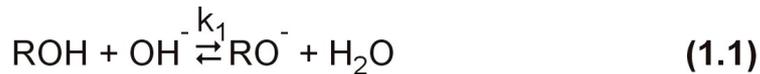
Methanol ist also ein dem Wasser in seinen physikalischen Eigenschaften relativ ähnliches Lösungsmittel, auch wenn es sich selbstverständlich um ein organisches Lösungsmittel handelt.

Wie kann nun in Methanol eine derart drastische Verlangsamung des Austausches erreicht werden, sodass die Signale der OH-Protonen inkl. ihrer Kopplungen erhalten werden können?

1.1 Methanol – Austauschgeschwindigkeiten und Probenbehandlung

Es ist allgemein bekannt, dass auch in Alkoholen der Austausch der Hydroxyprotonen stark beschleunigt ist, sodass diese Signale unter normalen Bedingungen im NMR bei Messung in alkoholischer Lösung nicht beobachtet werden können. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass der Austausch sowohl säure- als auch basenkatalysiert ist.⁹

Folgende Austauschreaktionen sind denkbar:⁹



Aber auch die Autoprotolyse muss im Falle von Methanol berücksichtigt werden:



Für die Reaktionen **1.1 – 1.5** hatten Meiboom et al. bereits 1959 und 1962 mittels NMR Messungen die entsprechenden Austauschraten bestimmt.^{9, 10} Der Wert für die Autoprotolysereaktion (Gleichung 1.6) stammt von Koskikallio.¹¹

Austauschrate	Wert [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$]
k_1	2.6×10^6
k_2	9.5×10^6
k_3	Gleiche Grössenordnung wie k_4
k_4	8.8×10^7
k_5	-
k_6	10 (max. Grenzwert)

Tab. 2. Austauschraten von Methanol für die angeführten Reaktionen 1.1 bis 1.6. Der pH-Wert der untersuchten Lösungen war nicht angegeben.

Da die Werte für k_1 und k_3 bzw. k_4 (also für die basen- bzw. säurekatalysierten Reaktionen) sehr hoch ist, genügen nur geringste Säure- oder Basenspuren, um den Austausch der Hydroxyprotonen derart zu beschleunigen, dass ihre Signale im NMR nicht mehr sichtbar sind.

Generell müssen folgende Bedingungen erfüllt sein, damit OH-Signale in alkoholischer Lösung separiert und mit Kopplungsmuster dargestellt werden können:¹²

- Ist die durchschnittliche Lebensdauer τ eines OH Protons grösser als $1/\Delta\delta$ (= chemische Verschiebungsdifferenz zwischen zwei OH Protonenpositionen [Hz]), jedoch kleiner als $1/J$, so können separierte Signale ohne Kopplungsmuster beobachtet werden.
- Ist die durchschnittliche Lebensdauer τ grösser als $1/J$, so sind zusätzlich die Kopplungen erkennbar

- Wenn τ grösser als die T_1 Relaxationszeit wird, können auch separierte NOE Signale von und zu den OH Protonen beobachtet werden.

Aufgrund dieser physikalischen Gegebenheiten methanolischer Lösungen ist es entscheidend, eine Lösung herzustellen, die frei ist von Säure- oder Basenspuren. Wie sich später noch zeigen wird, ist auch der Wassergehalt der Proben von Bedeutung. Pearce und Sanders verwendeten für die Untersuchung von Naturstoffen in CDCl_3 Lösung trockenes, basisches Aluminiumoxid, um die Säurespuren und teilweise Wasser entfernen zu können.¹²

Ein analoges Vorgehen sollte auch für methanolische Lösungen erfolgversprechend sein, allerdings kam basisches Aluminiumoxid nicht in Frage, da der Austausch in Methanol ja auch von Basenspuren katalysiert wird.

Verwendet wurde letztendlich neutrales Aluminiumoxid, das zudem einen extrem niedrigen Wassergehalt aufwies. Die exakte Probenbehandlung ist im experimentellen Teil erläutert.

Natürlich ist man aufgrund dieser ganzen Bedingungen insofern eingeschränkt, dass Moleküle mit stärker aciden Protonen nicht untersucht werden können. Da es sich aber im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt um neutrale Zucker handelte, war diese Einschränkung kein Problem.

1.1.1 In Methanol schwer lösliche Saccharide

Weiterhin gibt es einige Kohlenhydrate, die sich zwar in Wasser sehr gut, in Methanol aber nahezu überhaupt nicht lösen. Hierzu gehören z. B. Saccharose oder auch α -Cyclodextrin. Diese Zucker konnten durch schrittweise Zugabe von wasserfreiem CaCl_2 in Lösung gebracht werden, wobei man sich durch diese Änderung der Lösungsmittleigenschaften aufgrund der hohen Ionenstärke natürlich etwas weiter von einem wasserähnlichen System entfernt. Zusätzlich führte die erhöhte Ionenstärke zu einer Verbreiterung aller Signale, was einen Verlust der Kopplungen bei den OH Protonen zur Folge hatte.

Die Zugabe von CaCl_2 hatte aber noch einen interessanten Nebeneffekt – sättigte man nämlich die Lösung mit CaCl_2 , was für ca. 800 – 900 μL MeOH durchaus 200 – 250 mg CaCl_2 entsprechen kann, so hatte dies eine Art „Trocknungseffekt“ zur Folge, wodurch alle Signale (inkl. OH Protonensignale) wieder ihr Kopplungsmuster und eine nur geringe Halbwertsbreite erreichten.

Auch in solch CaCl_2 -gesättigten methanolischen Lösungen konnten alle nötigen 1D und 2D Messungen bei RT durchgeführt und die OH Protonensignale untersucht werden.

Die genaue Beschreibung der Probenbehandlung findet sich wiederum im experimentellen Teil.

Bleibt abschliessend zu bemerken, dass für Proben, die mit CaCl_2 gesättigt wurden und bei denen eine stärkere Abweichung von einem wässrigen Medium irrelevant war, eine vorherige Behandlung mit neutralem Aluminiumoxid nicht nötig war, da der

Trocknungseffekt des CaCl_2 ausreichte, um separierte OH Signale mit aufgelöstem Kopplungsmuster zu erhalten.

Im Folgenden sollen nun die Untersuchungen der OH Protonen für ausgewählte Monosaccharide, Saccharose und ein bityklisches Thiazolidinlactam aus unserer Arbeitsgruppe bei Raumtemperatur vorgestellt werden.

2. Hydroxyprotonen verschiedener Monosaccharide in methanolischer Lösung

2.1 Methyl- β -D-Galactopyranosid (β GalOMe)

Als eines der ersten untersuchten Modell-Monosaccharide wurde im Falle von β GalOMe das neutrale Aluminiumoxid ohne zusätzliche, vorherige Trocknung (durch Ausheizen) zugesetzt und nach ca. 12 h bei RT die Lösung entweder über einen Filter abfiltriert oder nach Zentrifugation der Überstand abpipettiert.

Alle gezeigten Spektren wurden bei 400 MHz und 294 K in $\text{MeOH}_{d3} : \text{MeOH}_{d4} = 1:1$ (v/v) aufgenommen.

Die folgende Abbildung gibt die Struktur und die verwendete Numerierung für β GalOMe wieder.

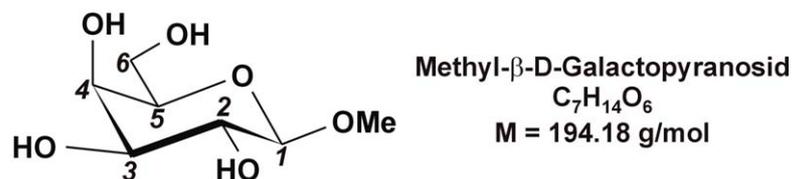


Abb. 2. Struktur und Numerierung für β GalOMe.

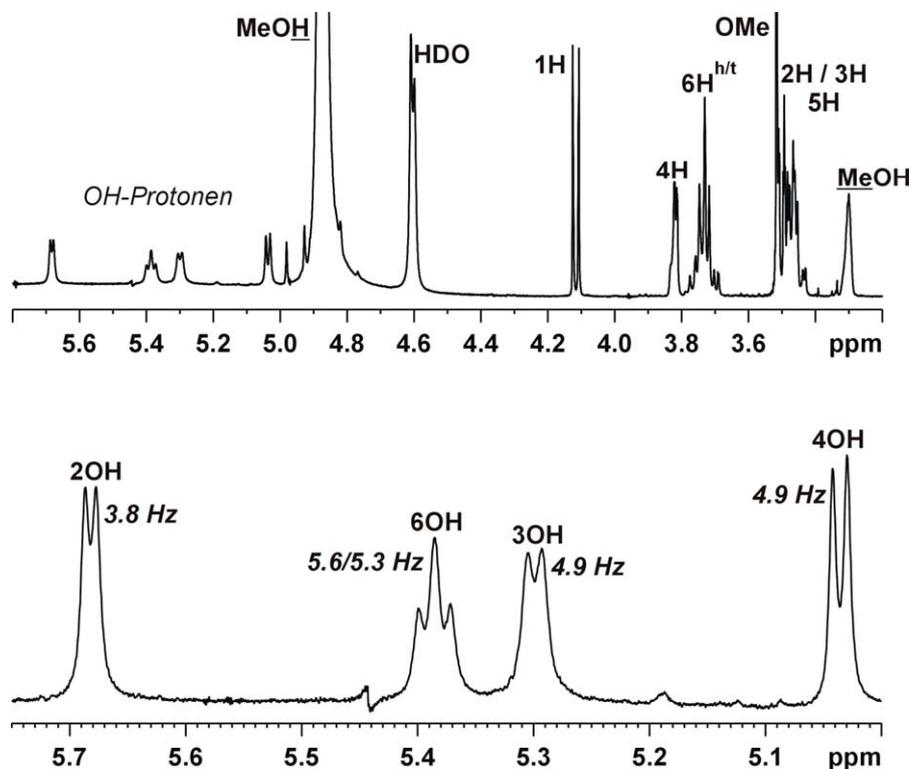


Abb. 3. ^1H Spektrum für β GalOMe in MeOH ($d3:d4 = 1:1$), ohne CaCl_2 -Zusatz, nach Behandlung mit Aluminiumoxid (400 MHz, 294 K).

Für **β GalOMe** ohne Zusatz von CaCl_2 (s. Abb. 3) sind alle OH Protonen als separierte Signale mit entsprechenden Kopplungen zu beobachten. Auch das HDO Signal ist separiert vom Signal für das OH Proton des Methanols – ein weiteres Indiz für einen stark verlangsamten Austausch. Die Zuordnung wurde durch Vergleich mit einer Probe mit 28 eq CaCl_2 getroffen.

2.1.1 Titration von **β GalOMe** mit CaCl_2

Da Ca^{2+} Ionen die OH Protonen von Kohlenhydraten schwach komplexieren, was bis jetzt immer nur in DMSO_{d6} oder einem anderen, organischen LM mit langsamen Austausch verfolgt werden konnte, wurde **β GalOMe** mit CaCl_2 titriert, um die Effektivität und Anwendbarkeit der hier beschriebenen experimentellen Bedingungen zu beweisen.

Hierbei zeigten sich erhebliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung der OH Protonen in Abhängigkeit von der Ca^{2+} Konzentration.

So zeigt das OH Proton in Position 3 den stärksten Shift mit 612.4 Hz maximalem Shift ($\Delta\delta$ in Bezug auf 0 eq CaCl_2) und eine deutliche Abstufung zu den übrigen Hydroxyprotonen. Den geringsten Shift in Abhängigkeit von der Ca^{2+} Konzentration zeigt 2OH mit 63.4 Hz. Im Vergleich dazu beträgt der maximale Shift für ein CH Proton (hier: 4H) 127.2 Hz.

Mit der Möglichkeit, innerhalb einer Titration mit Metallkationen die OH Protonen verfolgen zu können, steigert sich die maximale Änderung der chemischen Verschiebung im Vergleich zu CH Protonen um einen Faktor von ca. 5. Dadurch wird ein weitaus grösseres Messfenster umfasst, so dass der Effekt durch Messfehler oder Ableseungenauigkeiten verringert werden kann.

Zudem ist man mit den OH Protonen näher am Ort des Geschehens, also an jenen Gruppen, die direkt an der Komplexierung der Metallkationen beteiligt sind.

eq CaCl_2	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]				
	2OH	3OH	4OH	6OH	4H
0	0	0	0	0	0
0.2	6.2	58.2	39.3	17.0	11.2
0.5	13.0	134.9	86.2	36.6	25.2
1.0	24.0	233.8	147.7	61.8	43.6
1.9	38.9	359.4	226.3	87.4	67.6
3.9	50.7	469.2	289.4	112.8	88.8
6.7	56.9	534.8	321.4	124.0	102.4
14.3	63.3	612.4	347.9	126.0	120.4
28.0	63.4	600.5	314.2	123.5	127.2

Tab. 3. Änderung der chemischen Verschiebungen der OH Protonen von **β GalOMe** und dem am stärksten shiftenden CH Proton (4H) bei Titration mit CaCl_2 .

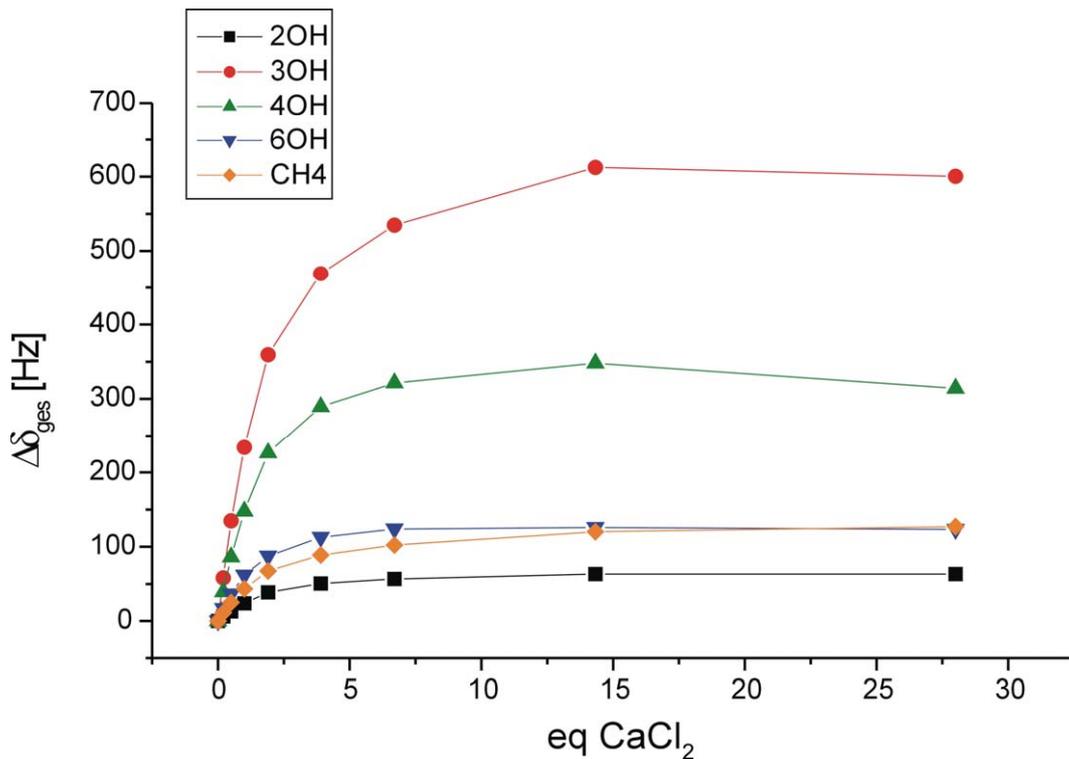
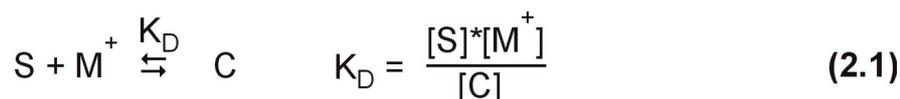


Abb. 4. Graphische Darstellung der Titrationsergebnisse von β GalOMe mit CaCl_2 .

Wie Tab. 3. eindeutig zeigt, ist für die OH Protonen bei ca. 14 eq CaCl_2 die Plateauphase bereits erreicht, bei Zugabe von mehr CaCl_2 erfolgt bereits eine Verringerung der maximalen, chemischen Verschiebung, nur noch bedingt durch die physikalische Änderung der Lösungsmiteileigenschaften. Für das beobachtete CH (4H) ist auch bei 28 eq CaCl_2 die Plateauphase noch nicht erreicht, was verständlich ist, wenn man bedenkt, dass die CH Protonen nicht unmittelbar von der Komplexbildung betroffen sind.

Exkurs: Titrationsauswertung mit Scatchardplot ¹³

Legt man die Annahme zugrunde, dass es sich um einen 1:1 Komplex (C) von Saccharidmolekül (S) und Metallkation (M^+) handelt, so gilt nachfolgende Gleichgewichtsreaktion mit der entsprechenden Dissoziationskonstanten K_D :



Der Anteil ν an Saccharid, der in Form des Ionenkomplexes C vorliegt, wird durch folgende Gleichung berechnet:

$$v = \frac{[C]}{[C] + [S_{\text{frei}}]} \quad (2.2)$$

Löst man nun (2.1) nach [C] auf, und setzt dieses Ergebnis in (2.2) ein, so erhält man:

$$v = \frac{[M_{\text{frei}}^+]}{K_D + [M_{\text{frei}}^+]} \quad (2.3)$$

Wenn man nun (2.3) nach $v/[M_{\text{frei}}^+]$ auflöst, erhält man die Gleichung für den sog. **Scatchardplot**:

$$\frac{v}{[M_{\text{frei}}^+]} = \frac{1}{K_D} - \frac{1}{K_D} * v \quad (2.4)$$

Mit (2.4) hat man eine **Geradengleichung**, mit Hilfe derer man die Komplexbildungskonstante K_A ($= 1/K_D$) bestimmen kann. Trägt man v gegen $v/[M_{\text{frei}}^+]$ auf, so erhält man nach linearem Fit der Datenpunkte aus dem y-Achsenabschnitt den Wert für $1/K_D$, aus der Steigung den Wert $-1/K_D$. Dadurch hat man immer eine sehr gute Kontrolle der Genauigkeit der experimentellen Daten.

Auch für die Titration von **β GalOMe** mit CaCl_2 wurde eine Auswertung mittels Scatchardplot vorgenommen. Hierbei wurde das OH Proton mit der stärksten Änderung der chemischen Verschiebung verwendet (3OH).

Eine Tabelle mit allen, für die Auswertung mittels Scatchardplot, nötigen Zahlenwerten ist im experimentellen Teil wiedergegeben.

Aus dem linearen Fit der Daten erhält man:

- aus dem y-Achsenabschnitt: $1/K_D = 8.95 \text{ L/mol}$
- aus der Steigung: $-1/K_D = -7.44 \text{ L/mol}$

Somit liegt die Komplexbildungskonstante K_A für den Komplex zwischen **β GalOMe** und Ca^{2+} in methanolischer Lösung bei etwa **7 – 9 L/mol** – ein typischer, niedriger Wert für die schwache Komplexierung von Metallkationen durch Kohlenhydrate.

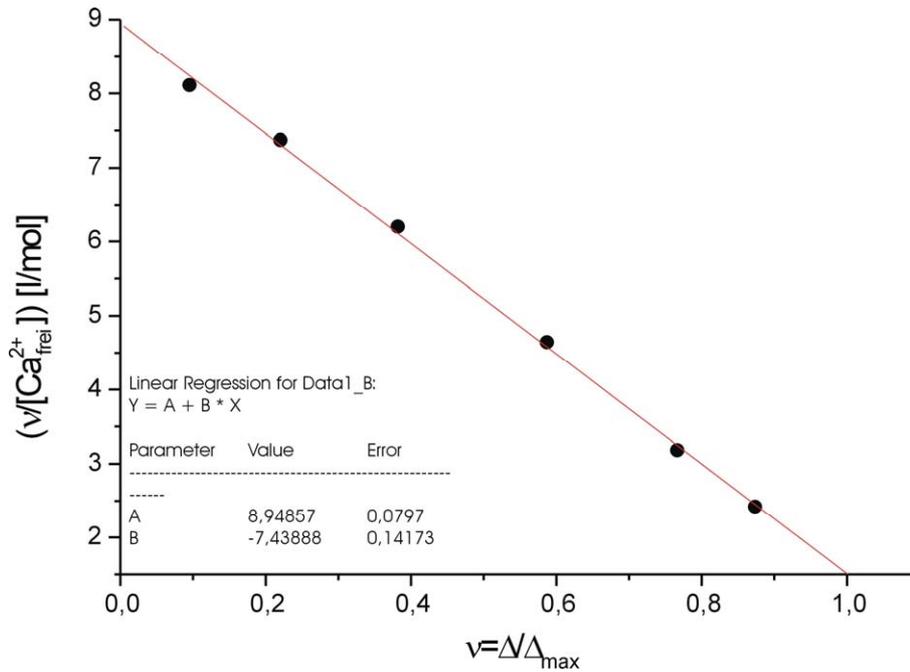


Abb. 5. Scatchardplot für die Titration von **β GalOMe** mit CaCl_2 in MeOH. Zugrundeliegende Daten sind die Verschiebungen für 3OH.

In der nachfolgenden Abbildung ist die zunehmende Verbreiterung der Signale bei Zugabe von CaCl_2 deutlich zu erkennen, wobei bei 28 eq CaCl_2 bereits wieder die Kopplungen zu erkennen sind und bei Sättigung der Lösung mit CaCl_2 die Signale ähnliche Halbwertsbreiten aufweisen wie vor CaCl_2 Zugabe.

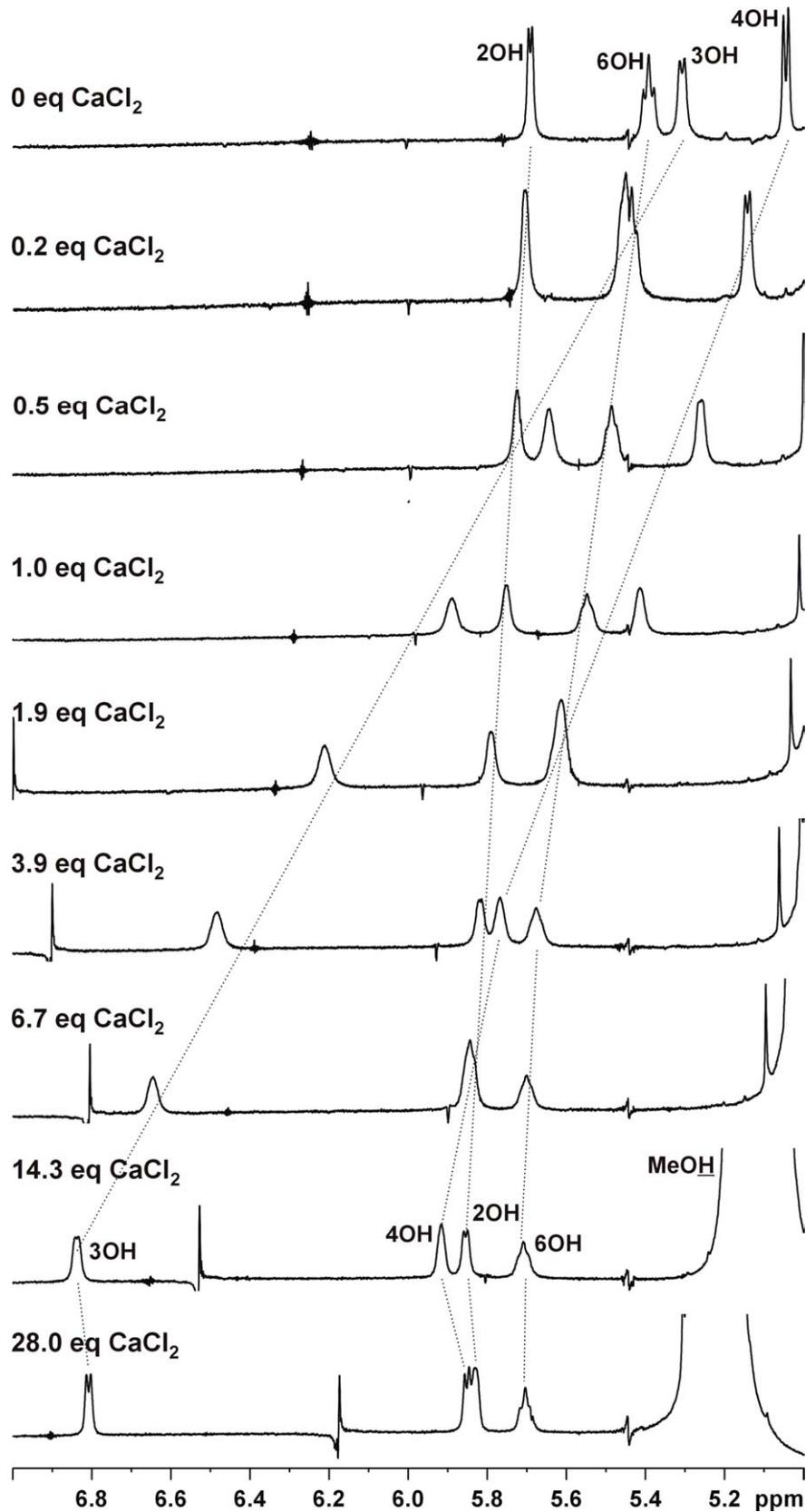


Abb. 6. ^1H OH-Bereich von βGalOMe bei Titration mit CaCl_2 (400 MHz, 294 K). Bei den scharfen „Spikes“ in manchen der Spektren handelt es sich um gerätebedingte Artefakte. Die Verschiebung der OH Signale beim letzten Titrationsschritt wieder hin zu hochfeldigen δ -Werten ist bedingt durch die rein physikalische Änderung der Lösung, die sich bereits in der Sättigung befindet.

2.1.2 2D Spektren bei Zusatz von 28 eq CaCl_2

Die zuvor schon gezeigten Zuordnungen stammen aus den nachfolgenden 2D Messungen. Der Austausch der Hydroxyprotonen kann soweit verlangsamt werden, dass sowohl die Zuordnung über 2D DQFCOSY, als auch eine Strukturermittlung über ein 2D ROESY Spektrum möglich waren.

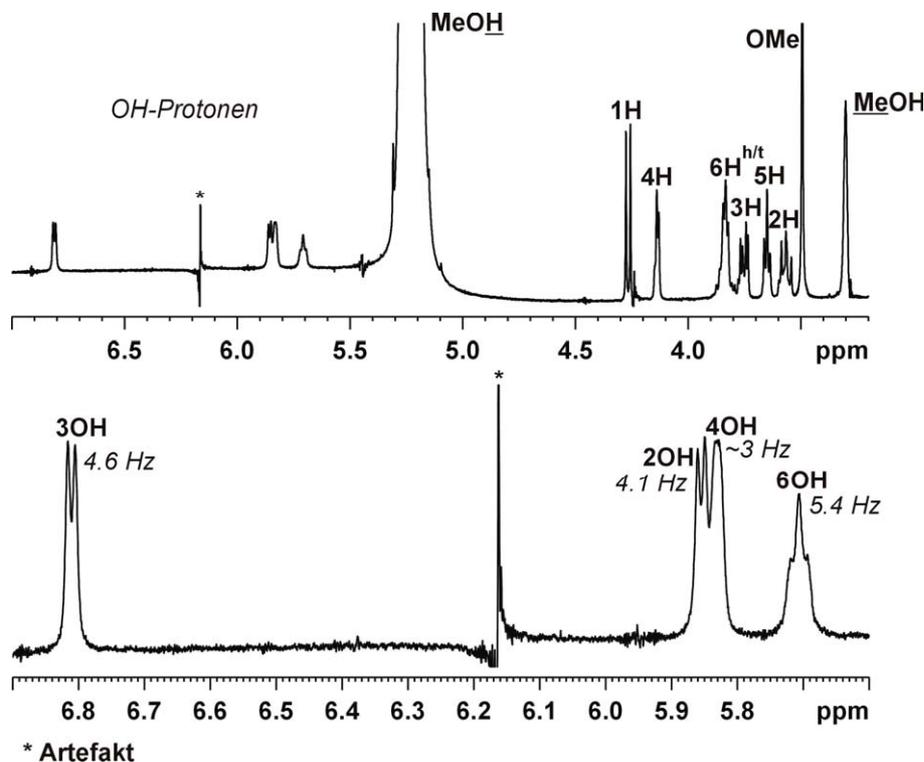


Abb. 7. ^1H Spektrum für $\beta\text{GalOMe} + 28 \text{ eq } \text{CaCl}_2$ in $\text{MeOH } 1:1$ (400 MHz, 294 K). * = Artefakt

Für alle OH Protonen können die $^3J_{\text{CH}, \text{OH}}$ Kopplungen aus dem Lorentz-Gauss-transformierten ^1H Spektrum abgelesen werden.

Wie der Karpluskurve für $\text{H} - \text{C} - \text{O} - \text{H}$ zu entnehmen, handelt es sich um gemittelte Kopplungen ($5.5 \pm 1 \text{ Hz}$) – gleichbedeutend mit einer Mittelung aller möglichen Rotamere, so dass die OH Gruppen keine Vorzugsrichtung, wie dies z. B. beim Vorliegen einer H-Brücke der Fall wäre, aufweisen.

Der Wert für 4OH ist aufgrund der etwas stärkeren Verbreiterung des Signals nur schlecht abzulesen, und evtl. deswegen mit 3 Hz relativ klein.

Exkurs: Karplusbeziehung für Hydroxygruppen in Kohlenhydraten

Die allgemeinen Parameter A, B und C der Karplusbeziehung lassen sich empirisch für viele verschiedene 3J Kopplungsbeziehungen ermitteln.¹⁴

$${}^3J = A \cdot \cos^2(\theta) + B \cdot \cos(\theta) + C \quad (2.5)$$

Für A, B und C von ${}^3J_{\text{CH, OH}}$ Kopplungen (z. B. in Kohlenhydraten) ergeben sich laut Literatur:¹⁴

$$A = 10.4$$

$$B = -1.5$$

$$C = 0.2$$

Und damit die Karplusbeziehung für H – C – O – H zu:

$${}^3J = 10.4 \cdot \cos^2(\theta) - 1.5 \cdot \cos(\theta) + 0.2 \quad (2.6)$$

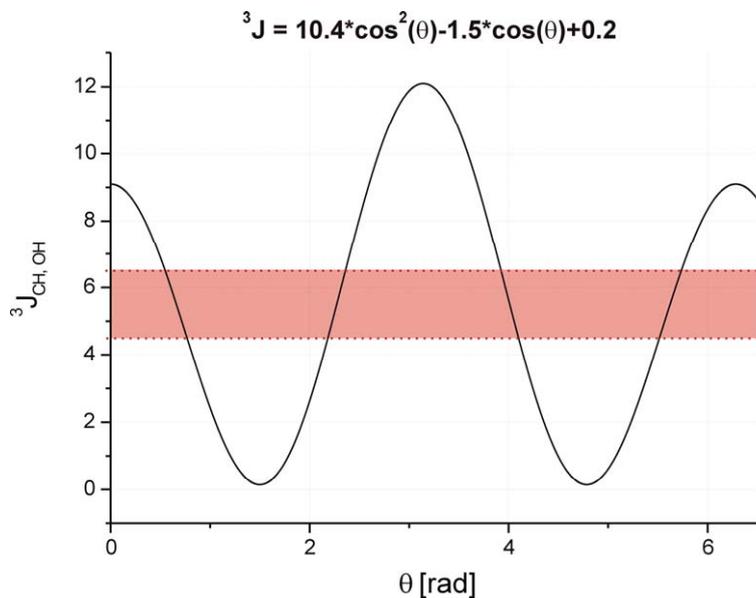


Abb. 8. Karpluskurve für H – C – O – H. In rot 5.5 ± 1 Hz – der Bereich der gemittelten Kopplung aufgrund des Gleichgewichts mehrerer Rotamere. Die Karpluskurve ist – da empirisch ermittelt – keine schmale Linie, wie hier gezeigt, sondern etwas breiter und mit stärkeren Verbreiterungen in den Minima- und Maximabereichen aufgrund der grösseren Ungenauigkeit.

Das gezeigte DQFCOSY Spektrum lässt eine eindeutige Zuordnung der Hydroxyprotonen zu. Die entsprechenden Kreuzsignale sind intensiv, d. h. der Austausch ist soweit verlangsamt, dass die Lebenszeit τ des OH Protons den Wert für $1/J$ übersteigt. Dies ist auch durch das Vorhandensein eines Kopplungsmusters der OH Protonen im ${}^1\text{H}$ Spektrum belegt.

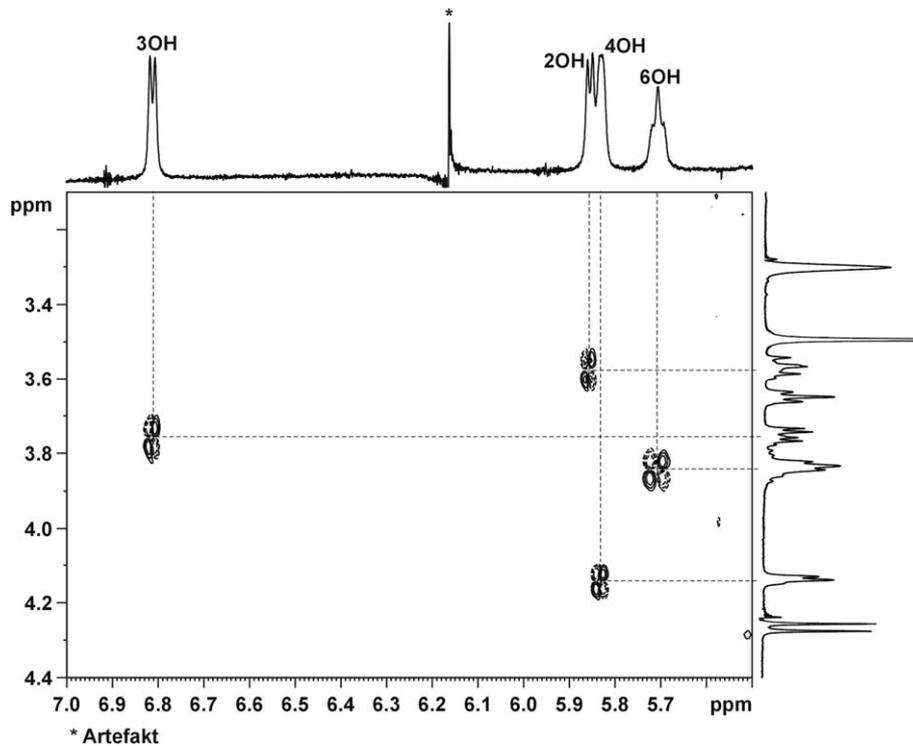


Abb. 9. DQFCOSY – Ausschnitt für die OH Protonen von β GalOMe (28 eq CaCl_2 , MeOH 1:1, 400 MHz, 294 K). * = Artefakt

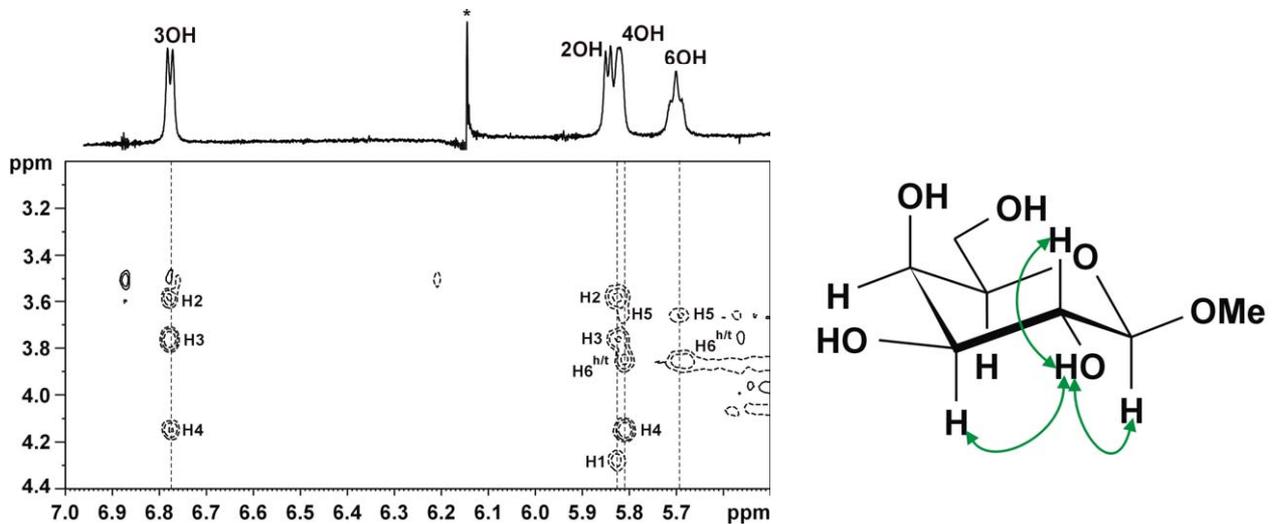


Abb. 10. ROESY – Ausschnitt aus dem OH Protonenbereich von β GalOMe (28 eq CaCl_2 , MeOH 1:1, 400 MHz, 294 K). Alle ROE Kreuzsignale sind negativ (entgegengesetztes Vorzeichen zur Diagonale). Am Beispiel von 2OH sind rechts die ermittelten ROEs gezeigt.

Alle OHs zeigen ROE Signale zu ihrem eigenen CH und zusätzlich zu den beiden benachbarten CH Signalen. ROE Signale zwischen den OH Protonen konnten im Falle von β GalOMe nicht beobachtet werden.

2.1.3 CaCl_2 -gesättigte Lösung – Variation der Temperatur

Für die CaCl_2 - gesättigte Lösung von βGalOMe in MeOH 1:1 ist das ^1H Spektrum abgebildet, welches zeigt, dass die Signale nun deutlich weniger stark verbreitert, und die Kopplungen – auch für die Hydroxyprotonen – eindeutig ablesbar sind.

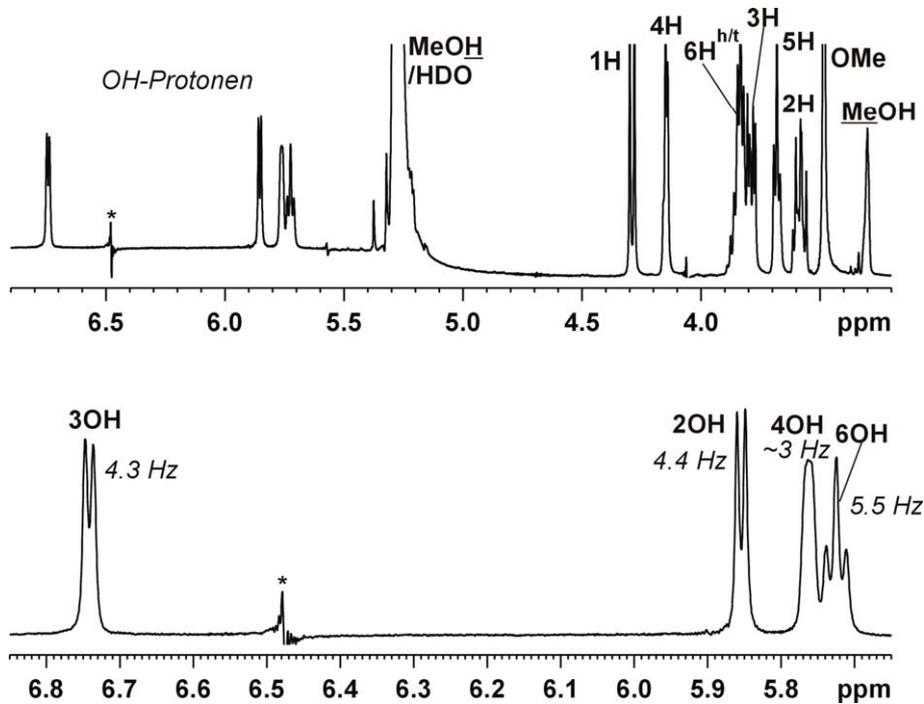


Abb. 11. ^1H Spektrum von βGalOMe in CaCl_2 -gesättigter Lösung (MeOH 1:1, 400 MHz, 294 K). Die $^3J_{\text{CH}, \text{OH}}$ Kopplungen wurden aus dem Lorentz-Gauss-transformierten ^1H Spektrum erhalten. * = Artefakt

Bei Messung dieser Lösung bei 5 °C (278 K) zeigte sich im Vergleich zur Messung bei 21 °C (294 K) keine Verbesserung der Signalauflösung für die OH Protonen. Man ist also aufgrund der CaCl_2 -gesättigten Lösung für βGalOMe bereits bei RT in einem maximal verlangsamten Austausch, so dass eine Temperaturniedrigung keinerlei Verbesserung mehr mit sich bringt.

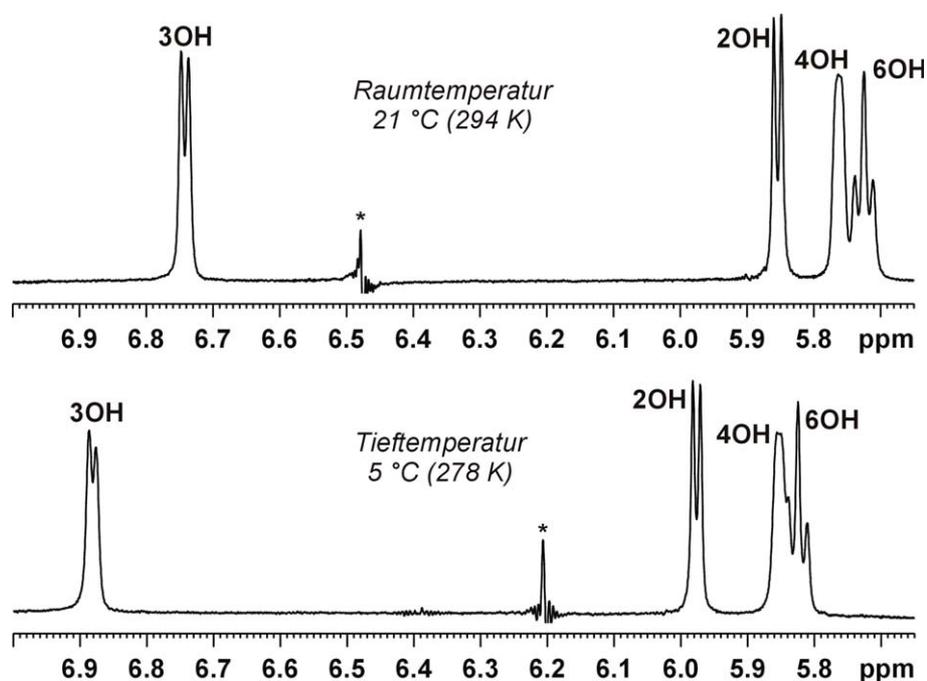


Abb. 12. ^1H OH-Bereich für βGalOMe in CaCl_2 -gesättigter Lösung bei verschiedenen Temperaturen (MeOH 1:1, 400 MHz). * = Artefakt

2.2 α -/ β -D-Glucofuranosid

Die für Glucose (**Glc**) aufgenommenen Spektren zeigen, dass es, für in MeOH leicht lösliche Zucker, völlig ausreichend ist, mit neutralem Aluminiumoxid vorzubehandeln, um die OH Signale als separierte Signale mit Kopplungsmuster zu erhalten. D. h. für neutrale, leicht lösliche Zucker ist keine Sättigung mit CaCl_2 erforderlich, um die OH Protonensignale möglichst gut darstellen zu können.

Im Falle dieser Probe wurde neutrales Aluminiumoxid für ca. 2h im Trockenschrank (ca. 200 °C) zusätzlich ausgeheizt, bevor es noch warm zur **Glc**/MeOH Lösung gegeben wurde. Diese Methode eignet sich allerdings nur dann, wenn eine exakte Konzentration der Substanz in Lösung nicht benötigt wird. Durch die Zugabe von warmem Aluminiumoxid verdampft nämlich ein Teil des LMs; ferner konnte eine Adsorption von Substanz an das Aluminiumoxid nicht völlig ausgeschlossen werden. Dennoch bringt das zusätzliche Ausheizen des Aluminiumoxids den Vorteil wesentlich stabilerer Proben, also bestmögliche Entfernung von Säure-/Basenspuren und teilweise Entfernung von im LM enthaltenen Restwassers.

Die Zuordnung erfolgte über ein 2D DQFCOSY Spektrum. Aufgenommene 2D NOESY Spektren zeigen auch für die OH Protonen schwache NOE Signale, die, wie für ein kleines Molekül zu erwarten, negatives Vorzeichen, also entgegengesetztes Vorzeichen zur Diagonale, aufweisen. Auch Austauschsignale zwischen den OH Protonen der **Glc** und Methanol sind vorhanden.

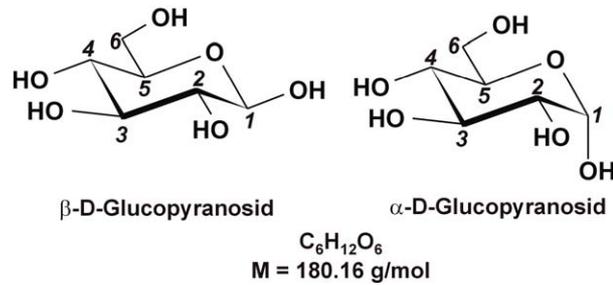


Abb. 13. Struktur und Numerierung für α - und β -Glc.

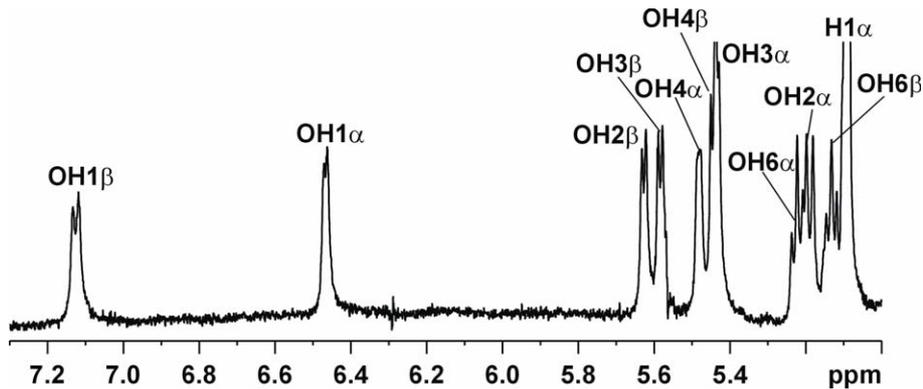


Abb. 14. ^1H OH Protonenbereich für α -/ β -Glc in MeOH 1:1 (ohne CaCl_2 -Zusatz, 400 MHz, 294 K).

Die Kopplungen für alle OH Protonen konnten aus dem Lorentz-Gauss-transformierten ^1H Spektrum erhalten werden:

OH Proton	$^3J_{\text{CH, OH}}$ [Hz]	
	α -Glc	β -Glc
1OH	3.9	6.35
2OH	6.8	4.4
3OH	4.8	4.5
4OH	4.5	5.6
6OH	5.7	5.5

Tab. 4. $^3J_{\text{CH, OH}}$ Kopplungen für alle Hydroxyprotonen in α - bzw. β -Glc in MeOH, ohne CaCl_2 -Zusatz.

Nur 2OH und 1OH der α -D-Glc zeigen einen von der typischen, gemittelten Kopplung ($5.5 \pm 1 \text{ Hz}$) abweichenden Wert. Allerdings sind diese Abweichungen nur sehr gering und somit die Bevorzugung eines bestimmten Rotameren nur schwach, d. h. diese Werte sind nicht ausreichend für die Annahme einer intramolekularen H-Brücke, zumal im NOESY Spektrum keinerlei Signale zwischen diesen beiden OH Protonen – sei es Austausch oder NOE – zu erkennen sind. Auch ansonsten finden sich keinerlei Kreuzsignale im NOESY Spektrum zwischen OH Protonen.

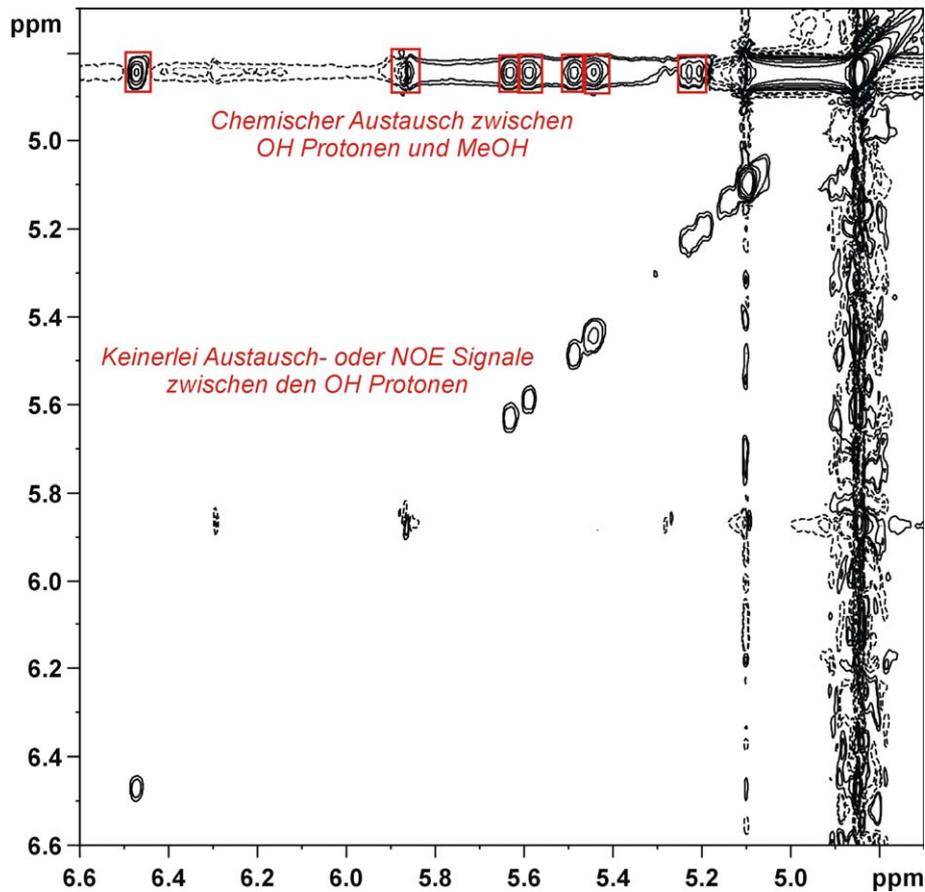


Abb. 15. NOESY Ausschnitt aus dem OH Protonenbereich von α/β -Glc in MeOH 1:1 (ohne CaCl_2 , 400 MHz, 294 K, $t_m = 300$ ms).

Das gesamte ^1H Spektrum und ein Ausschnitt aus dem DQFCOSY Spektrum finden sich im Anhang.

3. Hydroxyprotonen von Saccharose in methanolischer Lösung und daraus resultierende Hinweise auf die Struktur in Lösung

Die Struktur von Saccharose, einem der prominentesten Zuckermoleküle, ist seit Jahrzehnten ein Thema, dem viel Aufmerksamkeit gewidmet wird.

Im Kristall konnte mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden, dass zwei intramolekulare, zwischen Glucose und Fructose auftretende, H-Brücken vorhanden sind, nämlich $2b\text{-O}\cdots\text{HO-}1a$ und $5b\text{-O}\cdots\text{HO-}6a$ (s. Abb. 16).¹⁵

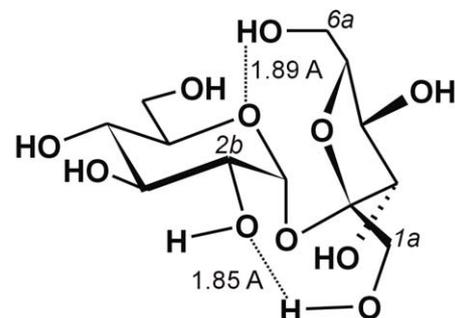


Abb. 16. Struktur von Saccharose im Kristall mit den beiden ermittelten H-Brücken.

Mit die ersten, durchgeführten NMR Untersuchungen von Saccharose in Lösung¹⁶ kamen zu dem Schluss, dass die Struktur von Saccharose in Lösung jener im Kristall sehr ähnlich ist, mit einer H-Brücke zwischen 2bO und HO-1a. Diese Ergebnisse bedeuteten, dass es sich bei Saccharose auch in Lösung um ein starres Molekül handelt, also keine grosse Flexibilität bezüglich der O-glykosidischen Bindung vorliegt.

Da O-glykosidische Bindungen im allgemeinen aber recht flexible Einheiten darstellen, folgte in den kommenden Jahren eine Reihe von Untersuchungen der Saccharosestruktur in Lösung.

Christofides und Davies¹⁷ folgerten aus ihren NMR Daten in DMSO_{d6}, dass zwei konkurrierende H-Brücken auftreten, nämlich zum einen 2b-O...HO-1a (also wie im Kristall) und zum anderen 2b-O...HO-3a, wobei erstere mit einem Verhältnis von ca. 2:1 bevorzugt scheint.

Viele weitere NMR Untersuchungen, auch in wässriger Lösung, kamen zu recht unterschiedlichen Ergebnissen:

- Duker und Serianni^{18a} folgerten eine hohe konformationelle Flexibilität.
- Hervé du Penhoat et al.^{18b} zeigten durch Vergleich mit 2-Deoxy-Saccharose, dass durchaus mehrere Konformere in Lösung vorliegen, die H-Brücken jedoch für die Struktur nur von geringer Bedeutung sind.
- van Halbeek et al.^{18c, d} fanden durch NOE Messungen, dass eine transiente H-Brücke zwischen 2b-O und HO-1a vorliegt, welche jedoch, da es sich bei Saccharose um ein flexibles Molekül handelt, gebildet und wieder gebrochen wird, wenn das Saccharosemolekül von einer Konformation zur anderen wechselt.
- schliesslich zeigten Adams und Lerner^{2a} durch Messung von Saccharose in Aceton_{d6} / H₂O bei 253 K anhand der Hydroxyprotonen, dass sowohl die ³J_{CH, OH} Kopplungskonstanten als auch die Austauschraten der OH Protonen keinen Hinweis auf vorliegende H-Brücken liefern. Auch die Temperaturkoeffizienten der OH Protonen sind in etwa gleich, mit einem leicht niedrigeren Wert für 2bOH, und einem leicht höheren Wert für 3aOH. Adams und Lerner folgerten daraus, dass die Hydroxyprotonen von Saccharose bevorzugt H-Brücken mit dem LM (hier also Wasser) ausbilden, wobei sie transiente, wie von van Halbeek et al. postulierte, H-Brücken nicht gänzlich ausschlossen.
- Immel und Lichtenthaler^{18e} führten MD Rechnungen für Saccharose im Vakuum durch und kamen zu dem Schluss, dass es drei Konformere (S1, S2, S3) mit niedriger Energie gibt, die in einem Verhältnis von ca. 71:21:8 vorliegen. Die hierin vorliegenden H-Brücken sind wie folgt: S1 2b-O...HO-1a (wie im Kristall), S2 2b-O...HO-3a und S3 5b-O...HO-3a. Rechnungen in wässriger Lösung ergaben, dass alle OH Protonen nur mehr H-Brücken zum umgebenden LM ausbilden.

Mit der hier vorgestellten Probenbehandlung kann nun Saccharose in methanolischer Lösung bei RT vermessen werden und zugleich sind Aussagen über die Hydroxyprotonen möglich. Ziel war es, die oben angeführten, möglichen Strukturen von Saccharose in Lösung zu bestätigen, zu widerlegen oder aber um eine neue Variante

zu bereichern, und zu zeigen, dass diese Art der Probenbehandlung Vorteile und zusätzliche Informationen für die Strukturaufklärung mit sich bringt.

Da es sich bei Saccharose um einen in MeOH schwer löslichen Zucker handelt, konnten nur Proben, die etwas CaCl_2 enthielten, überhaupt untersucht werden. Nachfolgend seien die Struktur und Numerierung für Saccharose, wie sie im weiteren verwendet werden wird, dargestellt.

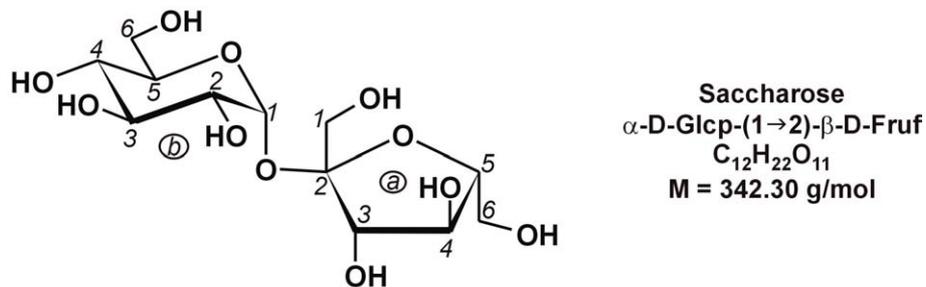


Abb. 17. Struktur und Numerierung für Saccharose.

3.1 Saccharose in Methanol + 4 eq CaCl_2

Bei den 4 eq CaCl_2 handelt es sich um die Menge CaCl_2 , die in diesem Fall benötigt wurde, um die vorgelegte Menge Saccharose (**Suc**) gerade in Lösung zu bringen. D. h. diese Probe ist nur mit dem absoluten Minimum an CaCl_2 versetzt. Auch hier wurde neutrales Aluminiumoxid, nachdem es ca. 2h im Trockenschrank ausgeheizt worden war, noch warm zugegeben.

Alle hier gezeigten Spektren sind bei 600 MHz aufgenommen. Die Zuordnung erfolgte über 2D DQFCOSY.

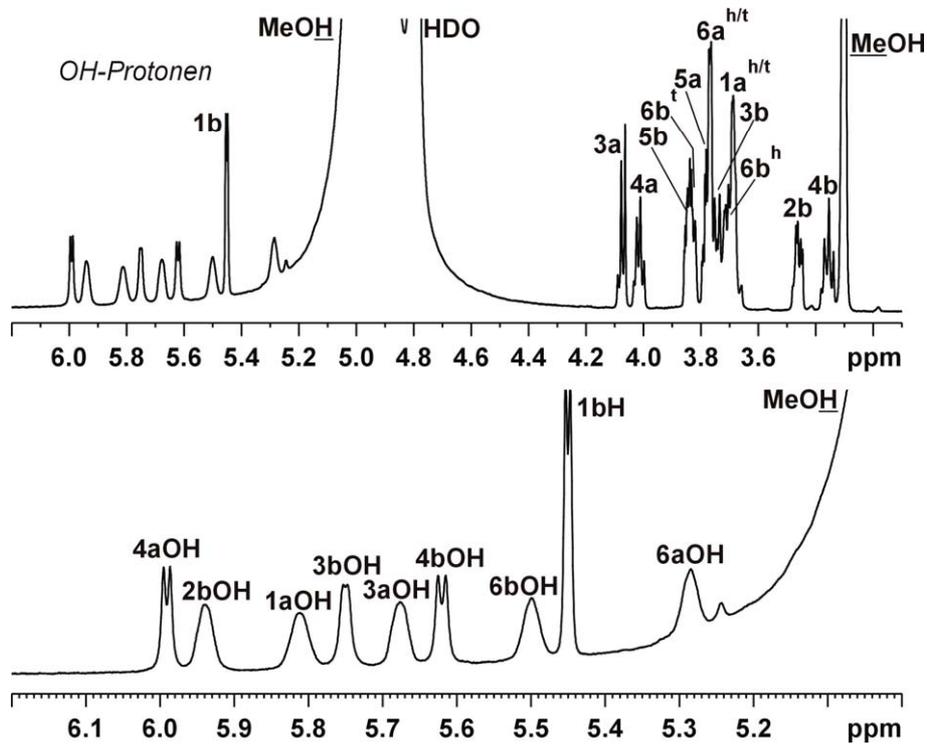


Abb. 18. ^1H Spektrum von **Suc** in MeOH 1:1 bei 292 K (4 eq CaCl_2 , 600 MHz). Bis auf 4aOH und 4bOH sind alle OH Protonensignale relativ breit.

Die $^3J_{\text{CH}, \text{OH}}$ Kopplungen für zumindest einige der OH Protonen konnten aus dem Lorentz-Gauss-transformierten ^1H Spektrum bei 280 K abgelesen werden.

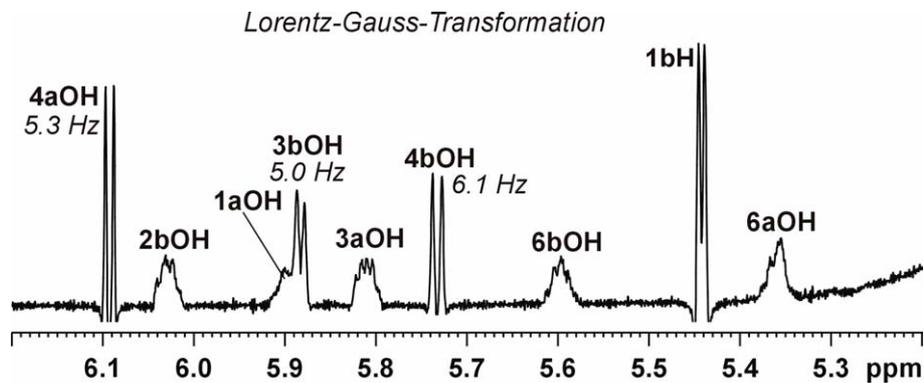


Abb. 19. OH Protonenbereich des Lorentz-Gauss-transformierten ^1H Spektrums von **Suc** bei 280 K (4 eq CaCl_2 , 600 MHz).

Alle ablesbaren Kopplungen liegen im Bereich der gemittelten Kopplung (5.5 ± 1 Hz). Zumindest für diese OH Protonen kann eine Vorzugsrichtung (z. B. aufgrund einer H-Brücke) nahezu ausgeschlossen werden. Auffallend ist, dass nicht nur, wie zu erwarten, die primären Hydroxylgruppen – 1aOH, 6aOH und 6bOH – eine Pseudotriplettstruktur zeigen, sondern auch 2bOH und 3aOH, für welche eigentlich jeweils ein Dublett zu erwarten wäre. Die vorhandene Pseudotriplettstruktur lässt sich mit dem

sog. Isotopeneffekt erklären, der bei H-Brücken, an denen zwei Gruppen, die sowohl Donor- als auch Akzeptoreigenschaften aufweisen, beteiligt sind, auftritt.

Exkurs: Isotopeneffekt¹⁹

Hat man ein Lösungsmittelgemisch, das es ermöglicht, dass Hydroxyl- oder Amino- gruppen sowohl deuteriert als auch protoniert vorliegen, und man die Signale der protonierten Gruppen beobachten kann (wie z. B. in DMSO_{d6} + etwas D_2O oder wie hier $\text{MeOH}_{d3} : \text{MeOH}_{d4}$ 1:1), so hat dies Auswirkungen auf jene Protonen, die als Partner an einer Wasserstoffbrücke beteiligt sind. Es treten für jene Protonen zwei Signale auf, je nachdem ob ihr Partner in der H-Brücke ein H oder ein D trägt. Vereinfacht kann man sich das Auftreten eines zweiten Signals für diese Protonen wie folgt vorstellen:

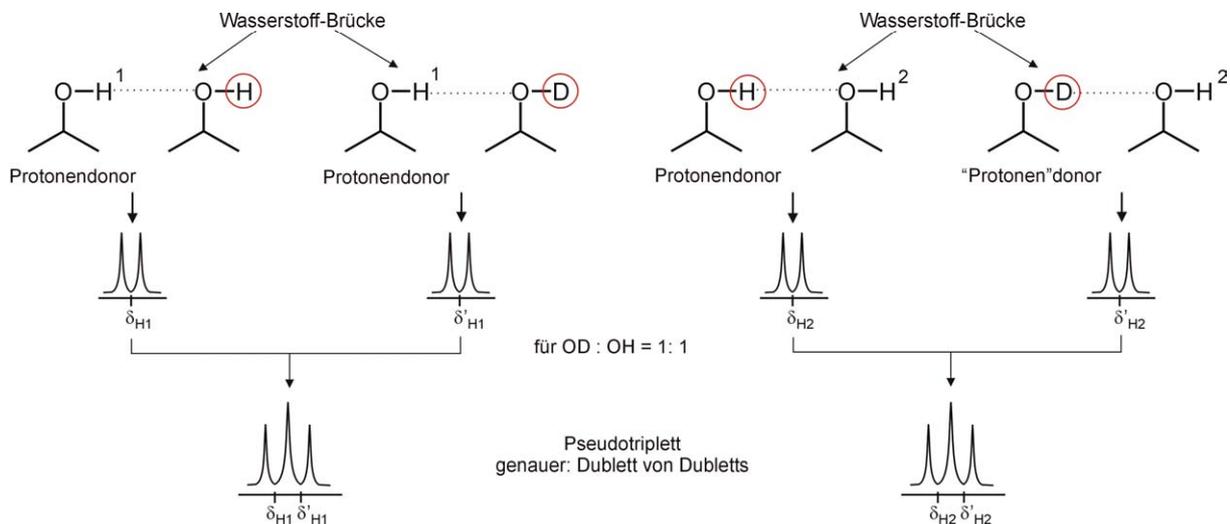


Abb. 20. Schematische Darstellung des Isotopeneffekts für H-Brücken, in denen beide beteiligten Partner sowohl Donor- als auch Akzeptoreigenschaften besitzen.

Da die chemische Verschiebung für ein OH-Proton, das mit einem OH oder OD als Partner an einer H-Brücke beteiligt ist, verschieden ist, erhält man für jeden der beiden Fälle ein Dublett. Diese sind meist in ihrer chemischen Verschiebung δ_H so ähnlich, dass sie stark überlappen und man so ein Pseudotriplett als Signal erhält, welches aber durch eine Lorentz-Gauss-Transformation des ^1H Spektrums meist als Dublett von Dubletts zu erkennen ist. Ist der Anteil an OH gleich dem Anteil an OD als Partner in der H-Brücke, so sind die beiden Dubletts von gleicher Intensität (wie in obiger Abbildung).

Natürlich gilt dies auch für das zweite, beteiligte Proton. Soll heißen, auch das Proton, welches am Akzeptor sitzt, merkt, ob die zu seinem Heteroatom ausgebildete H-Brücke ein Proton oder ein Deuterium enthält. Somit zeigt auch dieses Proton eine Pseudotriplettstruktur.

Das eben dargelegte würde also zu dem Schluss führen, dass sowohl 2bOH als auch 3aOH an einer intramolekularen H-Brücke beteiligt sein könnten.

Weitere Aussagen kann man aus einer Temperaturreihe gewinnen.

3.1.1 Temperaturreihe

Es wurde eine Temperaturreihe im Bereich von 280 bis 310 K, in Schritten von 3 K, aufgenommen, und die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung δ der Hydroxyprotonen von der Temperatur untersucht.

Auftragung von $\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz] gegen ΔT [K] ergibt idealerweise eine Gerade für jedes OH Proton. Durch linearen Fit kann aus der Steigung der Geraden der Temperaturkoeffizient ermittelt werden. Er gibt einen Anhaltspunkt dafür, ob ein OH Proton an einer intramolekularen H-Brücke (nicht zum LM!) beteiligt ist. Wie in Kapitel V/2.2.1 gezeigt werden wird, gibt es empirische Werte für NH Protonen in Amidbindungen, jedoch keine Referenzwerte für OH Protonen in Methanol. D. h. es kann nur durch Vergleich der Steigungen innerhalb einer Probe eine Aussage getroffen werden.

Aus der Literatur sind folgende Werte als Anhaltspunkte zu nennen:

- Messung von Saccharose in H₂O / D₂O (9:1 (v/v)), pH 6.5, in einem Temperaturbereich von -18 bis -8 °C.^{18d}
- Messung von Saccharose in H₂O / Aceton_{d6} (Temperaturbereich unbekannt). Bestimmung der Temperaturkoeffizienten in Abhängigkeit des Volumenanteils an Aceton_{d6}.^{2a}

Hieraus erhaltene Temperaturkoeffizienten κ :

Proton	κ aus ^{18d} [ppb/K]	κ aus ^{2a} (H ₂ O:Aceton _{d6} 4:1) [ppb/K]
1aOH	-8.2	-9.5
3aOH	-8.8	-12.5
4aOH	-9.2	-10.5
6aOH	-11.0	-
2bOH	-8.0	-9.2
3bOH	-10.3	-10.3
4bOH	-9.4	-10.9
6bOH	-10.3	-

Tab. 5. Aus der Literatur stammende Werte für Temperaturkoeffizienten der OH Protonen in Saccharose.

Alle Werte liegen relativ einheitlich in einem Bereich von -8 bis -11 ppb/K, es können also keine intramolekularen H-Brücken identifiziert werden.

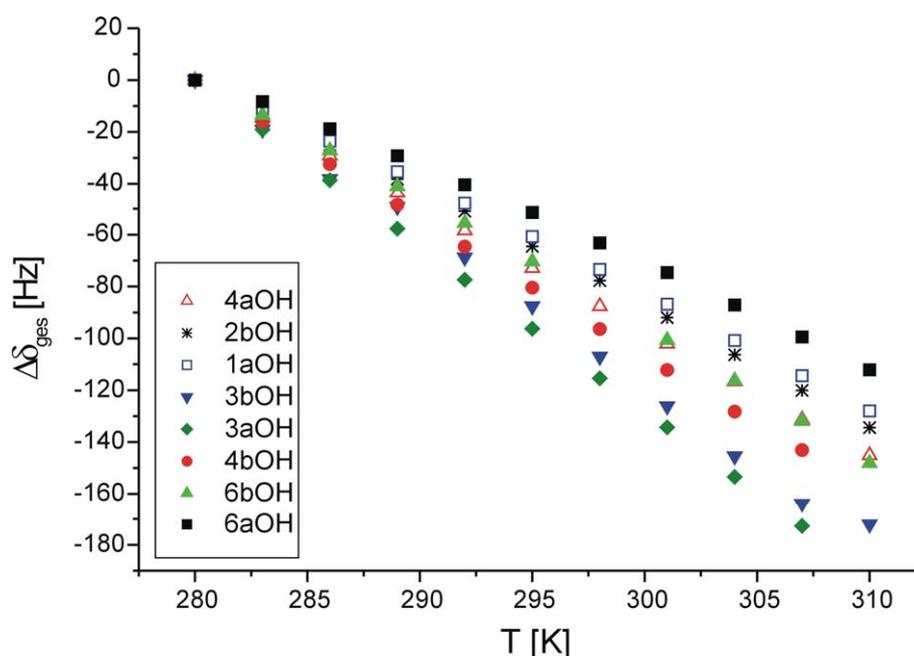


Abb. 21. Auftragung von $\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz] gegen T [K] für alle OH Protonen von Saccharose in methanolischer Lösung bei Zusatz von 4 eq CaCl_2 .

Aus dem linearen Fit der Geraden erhaltene Temperaturkoeffizienten κ :

Proton	κ [ppb/K]
1aOH	-7.2
3aOH	-10.7
4aOH	-8.1
6aOH	-6.3
2bOH	-7.5
3bOH	-9.8
4bOH	-8.8
6bOH	-8.2

Tab. 6. Temperaturkoeffizienten κ für OH Protonen von Saccharose in MeOH 1:1 (+ 4 eq CaCl_2).

Die niedrigsten Werte besitzen die beiden primären Hydroxylgruppen an 1a und 6a. Alle anderen OH Protonen, mit Ausnahme von 2bOH, besitzen κ Werte im Bereich von -8 bis ca. -11 ppb/K. Dies passt recht gut mit den zuvor gezeigten Werten aus der Literatur zusammen. Dies ist gleichbedeutend mit einer ähnlichen Solvation der Hydroxygruppen in methanolischer wie in wässriger Lösung.

Der Wert für 2bOH ist mit -7.5 ppb/K minimal kleiner als die anderen Werte der sekundären Hydroxylgruppen. Somit ist für diese OH Gruppe, wenn überhaupt, dann nur ein sehr schwacher Einfluss durch eine H-Brücke vorhanden. Da in der Literatur kein Unterschied zwischen primären und sekundären Hydroxylgruppen festzustellen war, könnten auch 1aOH und besonders 6aOH an schwachen H-Brücken beteiligt

sein. Im übrigen sind dies genau jene drei OH Gruppen, die in der Kristallstruktur an den H-Brücken ((2bOH – 1aOH) und (5bO – 6aOH)) beteiligt sind.

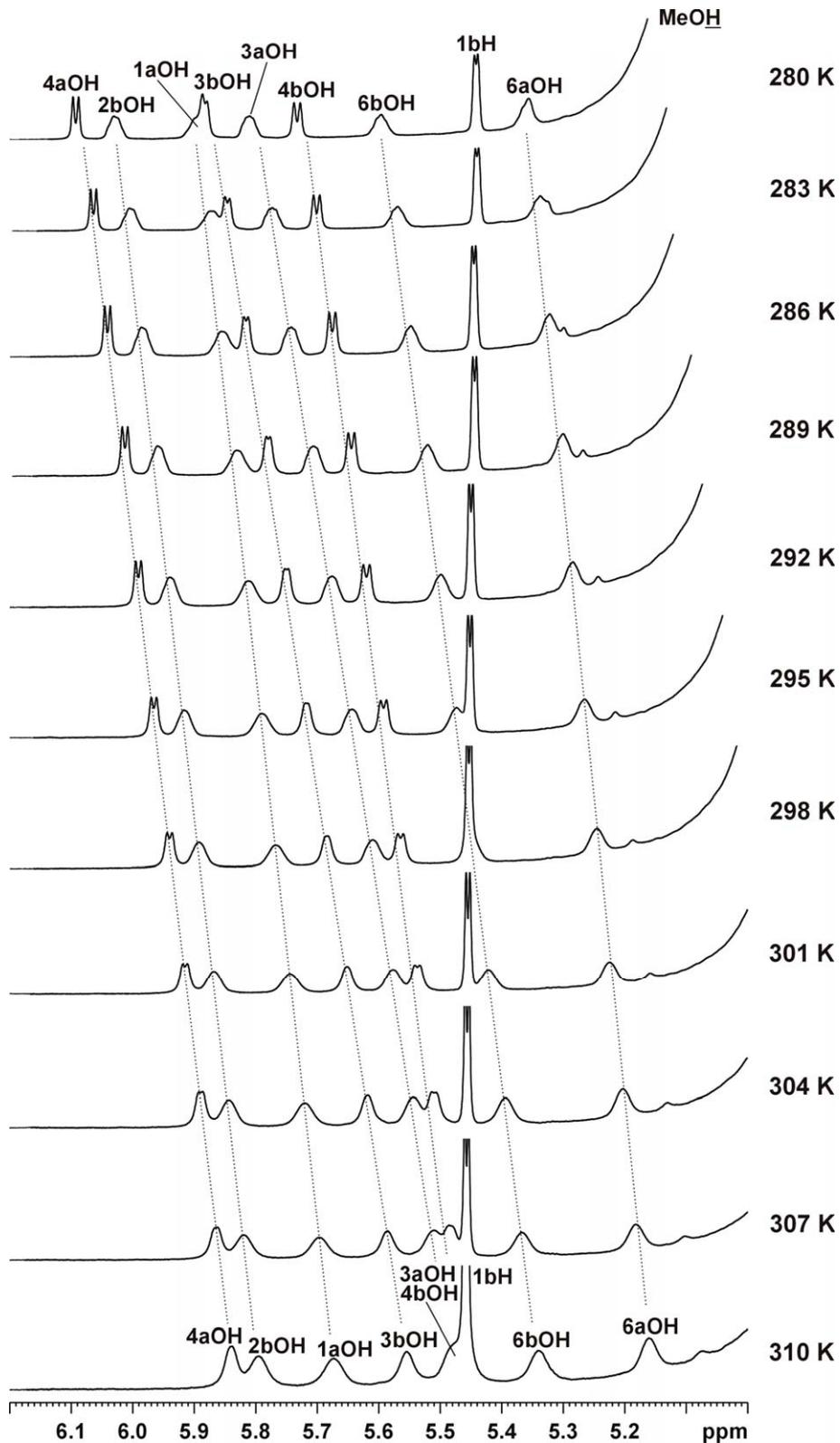


Abb. 22. ^1H Spektrum - OH-Bereich für Saccharose + 4 eq CaCl_2 in MeOH 1:1 für einen Temperaturbereich von 280 bis 310 K (600 MHz).

3.1.2 2D ROESY – strukturelle Aussagen

Sollten tatsächlich transiente H-Brücken in Saccharose (in MeOH, + 4 eq CaCl₂) vorhanden sein, so müssten auch im ROESY Spektrum entsprechende Kreuzsignale zu beobachten sein.

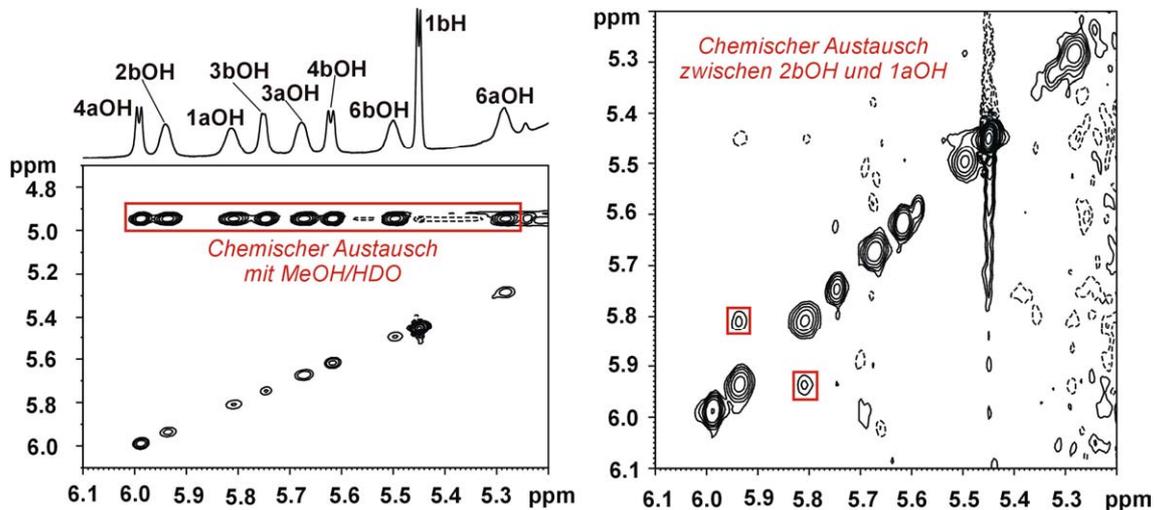


Abb. 23. 2D ROESY OH Protonenbereich. Deutlich zu erkennen der chemische Austausch der OH Protonen mit MeOH/HDO (links) und das Austauschsignal zwischen 2bOH und 1aOH (rechts) (Saccharose, + 4 eq CaCl₂, MeOH, 292 K, 600 MHz).

Auch das ROESY gibt einen Hinweis darauf, dass 2bOH und 1aOH sich sehr nahe kommen und somit ein Austausch zwischen beiden (positives Kreuzsignal (gleiches Vorzeichen wie die Diagonale) zu beobachten ist.

3.1.3 Ergebnis

→ Für die Beteiligung an einer H-Brücke sprechen

- **für 2bOH:** der Isotopeneffekt, der relativ kleine Temperaturkoeffizient, das Austauschsignal im ROESY mit 1aOH
- **für 1aOH:** der relativ kleine Temperaturkoeffizient und das Austauschsignal im ROESY zu 2bOH
- **für 3aOH:** nur der Isotopeneffekt. Da sonst keinerlei Anhaltspunkte für eine H-Brücke sprechen, ist davon auszugehen, dass keine Wasserstoffbrücke mit Beteiligung von 3aOH vorhanden ist.
- **für 6aOH:** nur der niedrige Temperaturkoeffizient. Da, wie in der Kristallstruktur vorhanden, eine H-Brücke zwischen 6aOH und dem Ringsauerstoff der Glucose (5bO) möglich ist, und dies weder durch einen Isotopeneffekt (primäre OH Gruppe), noch durch ein Kreuzsignal im ROESY zu verifizieren ist, kann die Beteiligung von 6aOH an einer H-Brücke weder ganz ausgeschlossen noch eindeutig belegt werden.

→ Für Saccharose in MeOH (+ 4 eq CaCl_2) kann eine H-Brücke zwischen 2bOH und 1aOH (zumindest transient) als gesichert angenommen werden. Eine weitere H-Brücke, nämlich zwischen 6aOH und 5bO kann nicht eindeutig bewiesen werden, gilt aber als wahrscheinlich.

→ Dieses H-Brückenmuster entspricht jenem in der Kristallstruktur.

Da alle aufgeführten, experimentellen Daten nur minimale Änderungen zueinander aufweisen, kann man davon ausgehen, dass das Saccharosemolekül auch in methanolischer Lösung sehr flexibel ist, wenngleich eine Struktur mit jenen beiden, postulierten H-Brücken schwach bevorzugt zu sein scheint.

3.2 Saccharose in Methanol – CaCl_2 -gesättigte Lösung

Insgesamt bedeutet das Sättigen der Lösung mit CaCl_2 natürlich eine sehr hohe Ionenstärke der methanolischen Lösung, was generell zu einer Signalverbreiterung führt.

Aufgrund des schon erwähnten, trocknenden Effekts des CaCl_2 auf MeOH (mit geringen Spuren Restwasser) erhält man dennoch Signale inkl. Multiplettstruktur und passabler Halbwertsbreite.

Im Folgenden soll eine Aussage über die Struktur von Saccharose in CaCl_2 -gesättigter Lösung getroffen, und ein Vergleich mit den in 3.1 erhaltenen Ergebnissen vorgenommen werden.

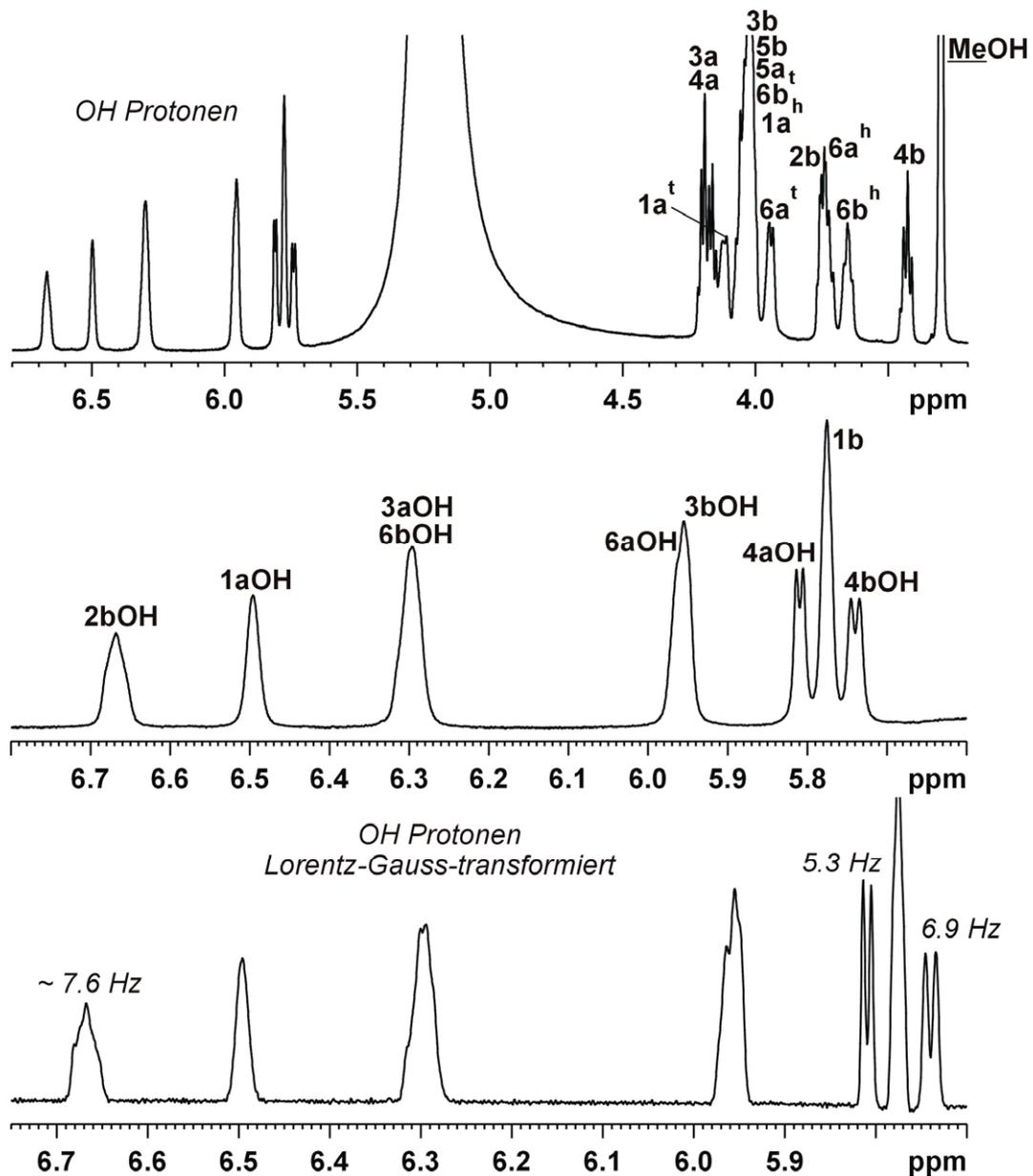


Abb. 24. ^1H Spektrum von Saccharose in MeOH 1:1 (CaCl₂-gesättigt, 600 MHz, 305 K).

Für 2bOH ist eindeutig eine Triplettstruktur zu erkennen, was einen Hinweis auf eine mögliche, vorhandene H-Brücke gibt. Da es sich im Falle von 2bOH um eine sekundäre Hydroxygruppe handelt, ist die (Pseudo-)Triplettstruktur auf den Isotopeneffekt – verursacht durch die Beteiligung an einer Wasserstoffbrücke – zu erklären (siehe s. 26).

Die $^3J_{\text{OH, CH}}$ Werte für 4bOH und 4aOH liegen im Bereich der gemittelten Kopplungen. Für alle anderen OH Protonen ist aufgrund der Überlagerungen keine Aussage möglich.

3.2.1 Temperaturreihe

In einem Bereich von 285 bis 305 K wurden in Schritten von 5 K ^1H Spektren aufgenommen.

Hieraus erhält man wiederum die Temperaturkoeffizienten κ der OH Protonen von Saccharose.

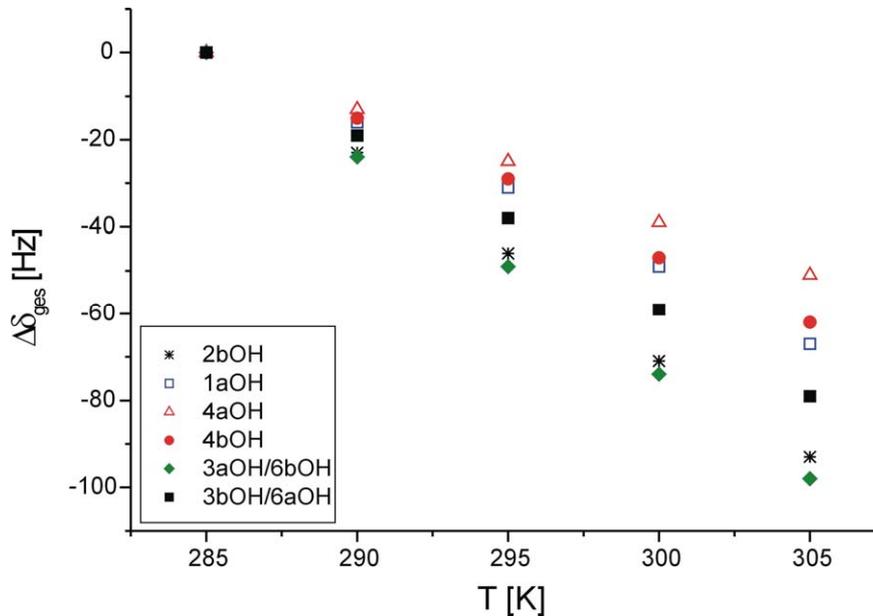


Abb. 25. Auftragung von $\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz] gegen T [K] für OH Protonen von Saccharose in CaCl_2 -gesättigtem MeOH 1:1.

Aufgrund von Überlagerungen im OH Bereich konnten die Temperaturkoeffizienten für 3aOH/6bOH und 3bOH/6aOH nicht separat ermittelt werden. Ihre Werte sollen nur ein Anhaltspunkt sein.

Aus dem linearen Fit der Geraden erhaltene Temperaturkoeffizienten κ :

Proton	κ [ppb/K]	κ zum Vergleich (+ 4 eq CaCl_2)
1aOH	-5.5	-7.2
3aOH	-	-10.7
4aOH	-4.3	-8.1
6aOH	-	-6.3
2bOH	-7.8	-7.5
3bOH	-	-9.8
4bOH	-5.2	-8.8
6bOH	-	-8.2
3aOH/6bOH	-8.2	-
3bOH/6aOH	-6.7	-

Tab. 7. Temperaturkoeffizienten κ für OH Protonen von Saccharose in MeOH (CaCl_2 -gesättigt).

Es zeigt sich, dass

- die Temperaturkoeffizienten für 1aOH, 4aOH und 4bOH in CaCl₂-gesättigter Lösung deutlich niedriger sind.
- nur für 2bOH in beiden Lösungen ein ähnlicher Wert vorliegt.
- Die Werte für 3aOH/6bOH und 3bOH/6aOH jeweils mehr dem Wert für die primäre Hydroxygruppe entsprechen.

Allerdings kann man die Temperaturkoeffizienten der beiden untersuchten Lösungen nicht direkt vergleichen, da die physikalischen Lösungsmiteileigenschaften doch stark voneinander abweichen.

Man kann jedoch innerhalb eines Systems vergleichen, und hier zeigt sich, dass für die CaCl₂-gesättigte Lösung die OH Protonen der Positionen 4a und 4b die niedrigsten Temperaturkoeffizienten aufweisen.

Der Ausschnitt der entsprechenden ¹H Spektren ist im Anhang wiedergegeben.

3.2.2 2D Spektren – Strukturelle Aussagen

Die Zuordnung der OH Protonen war über das 2D DQFCOSY eindeutig möglich.

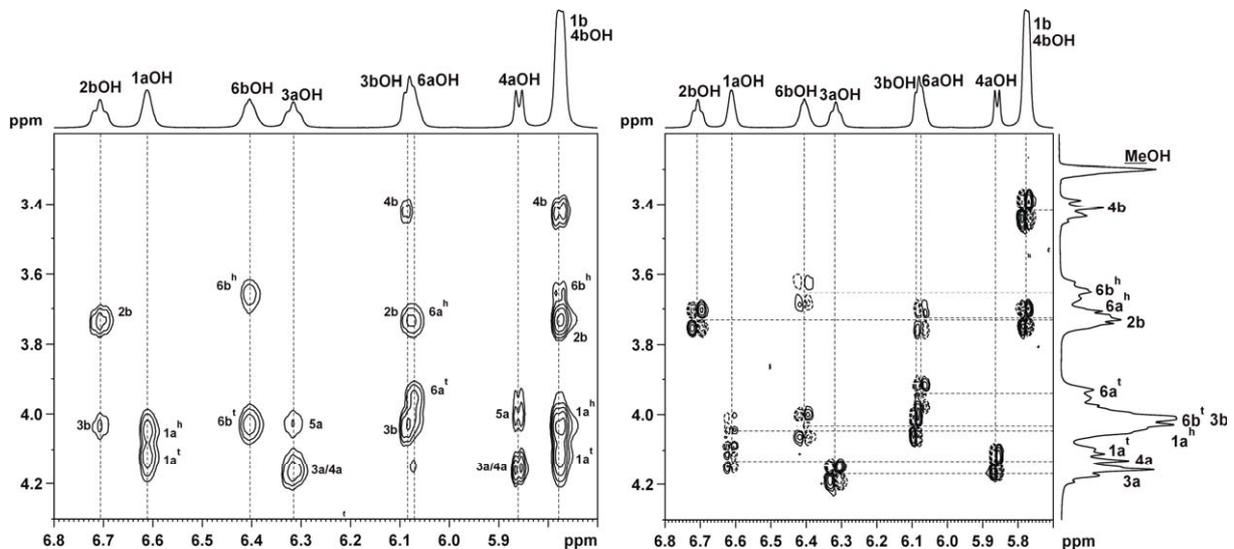


Abb. 26. 2D NOESY (links) und 2D DQFCOSY (rechts) Ausschnitte des OH Protonenbereichs von Saccharose (CaCl₂-gesättigt, MeOH 1:1, 400 MHz, 294 K).

Das NOESY Spektrum ($t_m = 100$ ms) zeigt im Bereich der OH Protonen keine für die Struktur der Saccharose bedeutsamen NOE Signale.

Interessant ist jedoch, dass auch bei einer so geringen Mischzeit wie hier (100 ms) Spindiffusion auftritt und alle Kreuzsignale dasselbe Vorzeichen wie die Diagonale besitzen. Beides würde man eigentlich erst für Moleküle mit viel grösserer Molmasse erwarten. Evtl. führt die methanolische, CaCl₂-gesättigte Lösung von Saccharose zu

einer Aggregation derselbigen und man hat dadurch im NOESY Spektrum den Eindruck, dass ein sehr viel grösseres Molekül vorliegt.

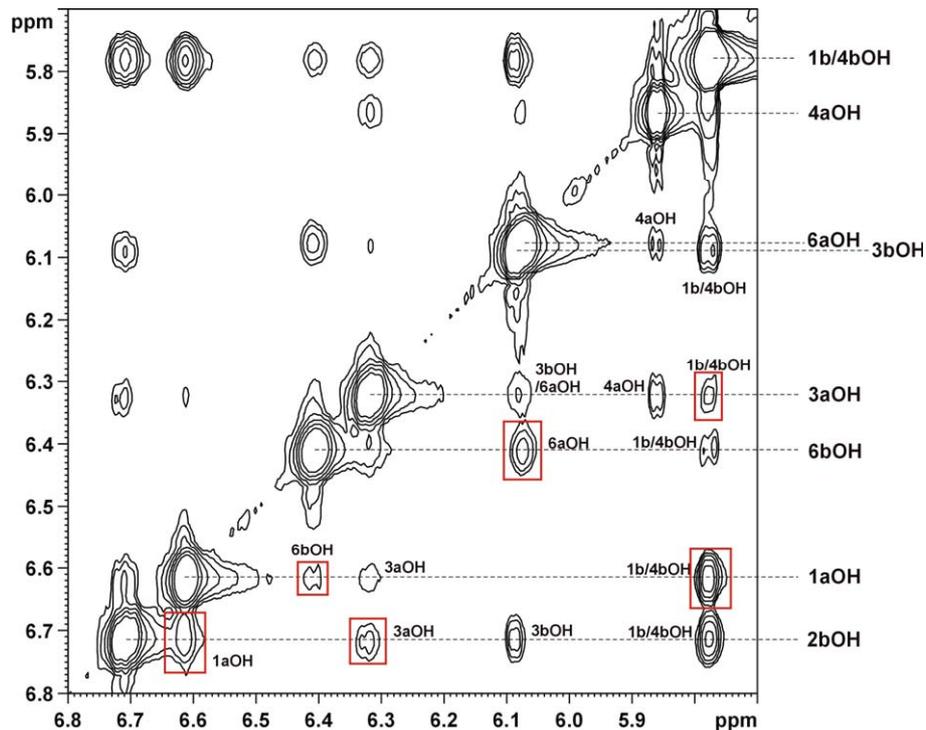


Abb. 27. NOESY Ausschnitt des OH Protonenbereichs von Saccharose (CaCl₂-gesättigt, MeOH 1:1, 400 MHz, 294 K, $t_m = 100$ ms).

Die vorangehende Abbildung zeigt deutlich die auftretende, schwache Spindiffusion bei einer Mischzeit von 100 ms.

Für die Struktur von Bedeutung könnten die etwas intensiveren Signale zwischen 2bOH und 1aOH bzw. zwischen den beiden primären Hydroxygruppen (6bOH & 6aOH) sein. Auch das starke Signal zwischen 1aOH und 1b – typisch für die O-glykosidische Bindung in Saccharose – ist wichtig für die Ermittlung der Struktur.

Ein ganz anderes Bild erhält man im Falle eines 2D ROESY Spektrums (200 ms Spinlock). Da es sich hier um eine andere Probe handelt und die Messungen bei 600 MHz und 305 K durchgeführt wurden, ist der Vergleich schwierig.

Zu erkennen sind der – immer noch stattfindende – Austausch zwischen den OH Protonen und MeOH und ein Austauschsignal zwischen den beiden primären OH Gruppen 6aOH und 6bOH. Ansonsten sind weder ROE noch weitere Austauschsignale vorhanden.

Zumindest scheinen sich in CaCl₂-gesättigter Lösung die beiden primären Hydroxygruppen an 6a und 6b sehr nahe zu kommen, was in der Lösung mit nur wenig CaCl₂ nicht der Fall ist.

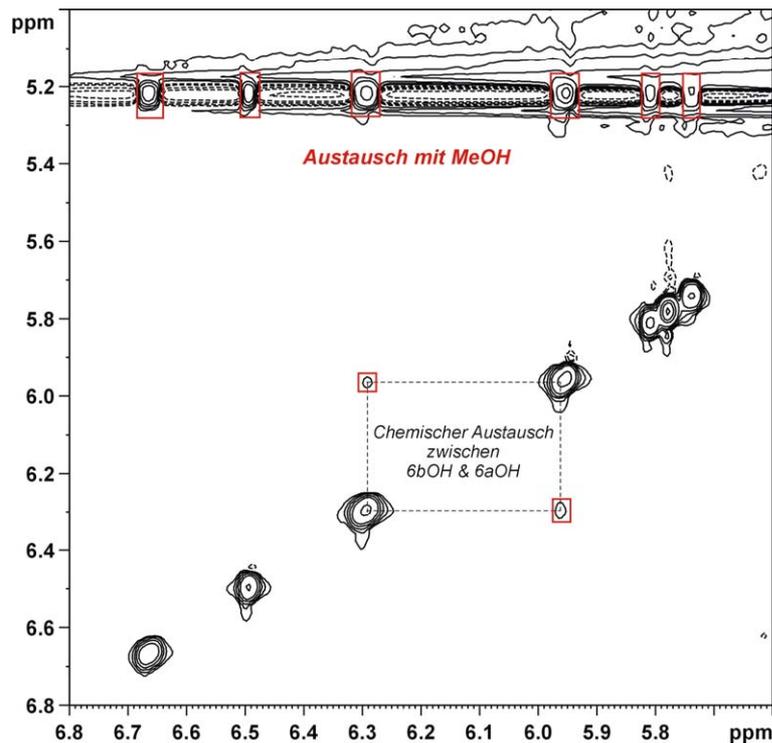


Abb. 28. Ausschnitt aus dem ROESY Spektrum von **Saccharose** (CaCl_2 -gesättigt, MeOH 1:1, 600 MHz, 305 K). Die Austauschraten primärer, sekundärer und tertiärer OH-Gruppen unterscheiden sich deutlich, mit ersteren als acidesten Protonen. Da im vorliegenden Fall zwei primäre OH Gruppen Austausch zueinander zeigen, die dritte primäre OH (1aOH) aber keinerlei Austausch aufweist, kann man davon ausgehen, dass 6bOH und 6aOH tatsächlich eine grosse räumliche Nähe zueinander haben und nicht nur eine erhöhte Austauschrate aufgrund ihrer stärkeren Acidität.

3.2.3 Isotopeneffekt im ^{13}C Spektrum

Ist der Austausch der Hydroxyprotonen so stark verlangsamt, dass die entsprechenden Signale im ^1H sichtbar sind, so hat dies auch Auswirkungen auf die ^{13}C Signale. Wie schon mehrfach für Mono-, Oligo- oder auch Polysaccharide beschrieben^{1, 20}, führt die Teildeuterierung von OH Gruppen zu einer Aufspaltung der zugehörigen ^{13}C Signale, da HC – OH eine, wenn auch nur geringfügig, unterschiedliche chemische Verschiebung $\delta_{13\text{C}}$ aufweist im Vergleich zu HC – OD. Ferner haben auch die Hydroxygruppen an Nachbarkohlenstoffen einen Einfluss, sowohl auf die chemische Verschiebung $\delta_{13\text{C}}$ als auch auf die Signalstruktur. Häufig findet man aufgrund der zusätzlichen Kopplungen stark verbreiterte Signale oder Multiplettstrukturen. Auch intramolekulare H-Brücken führen zu zusätzlichen Aufspaltungen und leicht veränderten Verschiebungen. Eine sorgfältige Analyse der chemischen Verschiebungen erlaubt sogar eine Aussage über die Orientierung der Hydroxygruppen.^{20a}

Für Saccharose zeigt sich deutlich, welche Kohlenstoffe Hydroxyprotonen tragen und zu welchem Grad auch die benachbarten Kohlenstoffe Hydroxygruppen besitzen. Somit kann hiermit die getroffene Zuordnung nochmals auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

Eine genauere Analyse der ^{13}C Verschiebungen und Multipllettstrukturen hinsichtlich vorhandener H-Brücken ist extrem schwierig, da mehrere Effekte überlagern und somit dies nicht als eindeutiger Beweis herangezogen werden kann.

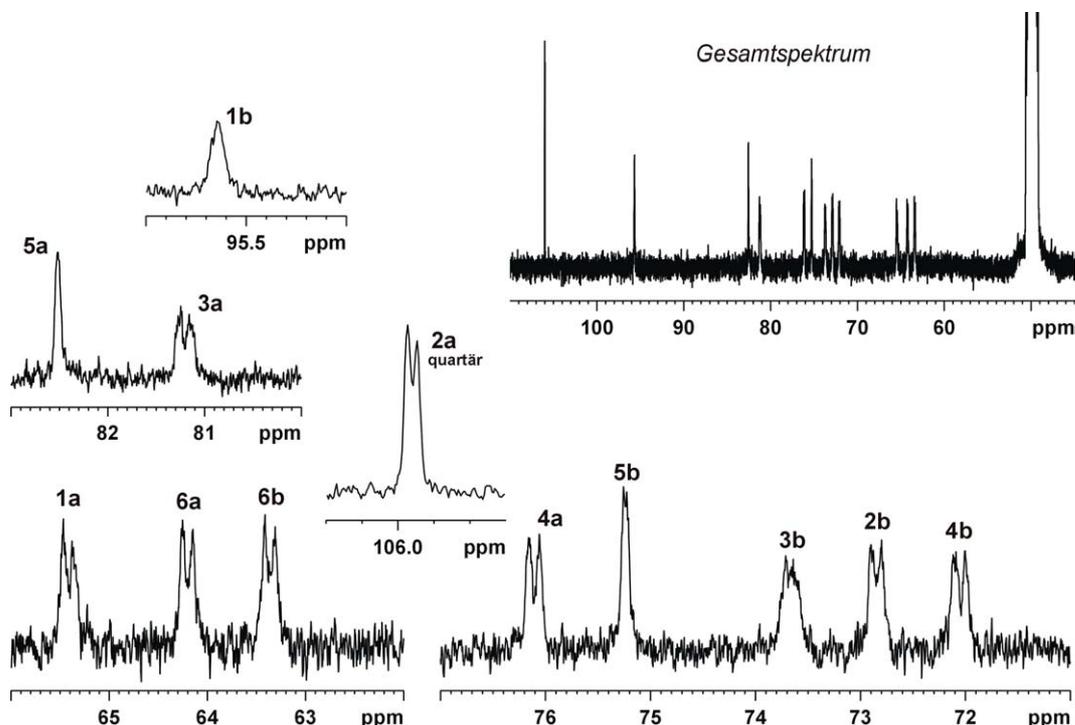


Abb. 29. ^1H -entkoppeltes ^{13}C Spektrum für Saccharose in MeOH 1:1 (CaCl_2 -gesättigt, 400 MHz, 294 K).

3.2.4 Ergebnis

Für die CaCl_2 -gesättigte, methanolische Saccharoselösung sind die experimentellen Daten nicht so eindeutig wie für die Lösung, die nur eine geringe Menge CaCl_2 (4 eq CaCl_2) enthält.

Für die Beteiligung von 2bOH an einer H-Brücke sprechen der Isotopeneffekt im ^1H und das relativ intensive NOE Signal zu 1aOH. Vergleicht man den Temperaturkoeffizienten von 2bOH mit jener der anderen OH Protonen, so ist er vergleichsweise gross, besitzt aber einen ähnlichen Wert wie in schwach CaCl_2 -haltiger Lösung.

Die OH Protonen mit dem niedrigsten Temperaturkoeffizienten – 4aOH und 4bOH – zeigen keinerlei Isotopeneffekt und besitzen gemittelte 3J Kopplungen. Ihre Beteiligung an einer H-Brücke ist eher unwahrscheinlich.

Auffallend ist ein intensives NOE Kreuzsignal zwischen 6aOH und 6bOH. Zumindest könnte man eine leicht veränderte Geometrie der O-glykosidischen Bindung vermuten, bei der sich jene beiden OH Gruppen nahe kommen.

Insgesamt kann keine eindeutige Aussage über evtl. vorhandene H-Brücken in Saccharose in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung getroffen werden. Jedoch kann eine H-Brücke zwischen 2bOH und 1aOH, wie in der schwach CaCl_2 -haltigen Lösung der Fall, als wahrscheinlich angenommen werden. Dennoch scheint die Zu-

gabe von grossen Mengen CaCl_2 die Struktur von Saccharose zu beeinflussen – konnte doch eine räumliche Nähe von 6aOH und 6bOH bei 4 eq CaCl_2 nicht nachgewiesen werden.

4. Sequentielle H-Brücken in Thiazolidinlactamen und deren Abhängigkeit von der Ca^{2+} Konzentration

Am Beispiel eines aus unserer Arbeitsgruppe stammenden Thiazolidinlactams kann gezeigt werden, dass der Nachweis von H-Brücken in vorbehandelter, methanolischer Lösung auch für Nicht-Kohlenhydrate möglich ist und durch Titration mit CaCl_2 zusätzlich eine Änderung in der Orientierung der OH-Gruppen auftritt.

Der in ²¹ beschriebene Grundbaustein, im weiteren bezeichnet als **BicOMe**, wurde bereits in DMSO_{d6} und mittels Kristallstrukturanalyse ausgiebig untersucht.²²

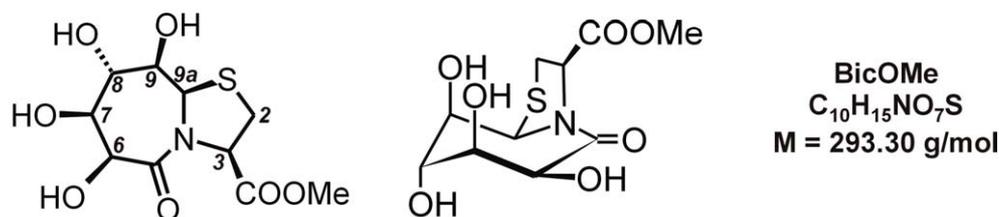


Abb. 30. Struktur und Numerierung für **BicOMe**.

Die Messungen in DMSO_{d6} ergaben folgende 3J Kopplungskonstanten für die Hydroxyprotonen:²²

OH Proton	$^3J_{\text{OH, CH}}$ [Hz]
6OH	6.6
7OH	5.4
8OH	3.9
9OH	11.0

Tab. 8. 3J Kopplungen der Hydroxyprotonen von **BicOMe** in DMSO_{d6} .

Entscheidend ist die eindeutige **trans**-Ausrichtung der 9OH Gruppe, zu erkennen an der sehr grossen 3J Kopplung von 11 Hz (entspricht einem Winkel zwischen 160 und 190°). Diese OH Gruppe besitzt also eine definierte Orientierung und ist Teil einer H-Brücke – nur dadurch ist eine so starke Fixierung der Hydroxygruppe zu erklären.

Genauere Untersuchungen in DMSO_{d6} Lösung ergaben gegabelte H-Brücken von 9OH als Donor zu 7OH und der Carbonylfunktion an Position 3.

Im Gegensatz dazu zeigt die Kristallstruktur ein H-Brückenmuster mit 7OH als Donor für 9OH, welche wiederum als Donor für die Carbonylfunktion an Position 3 fungiert.

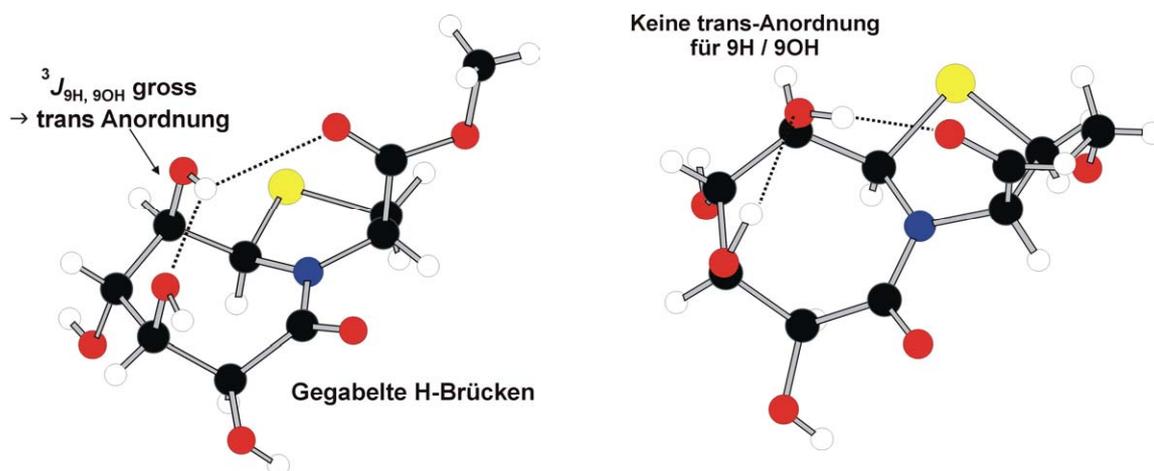


Abb. 31. Links die gegabelten H-Brücken für **BicOMe**, wie sie in DMSO_{d6} Lösung nachgewiesen werden konnten. Rechts die Kristallstruktur für **BicOMe** mit sequentiellen H-Brücken.

4.1 Titration mit CaCl_2

BicOMe löst sich leicht in Methanol, so dass ein anfänglicher Zusatz von CaCl_2 nicht nötig ist.

Die Probe wurde mit Aluminiumoxid (nicht ausgeheizt) versetzt und nach einem Tag bei RT über einen Filter abfiltriert.

CaCl_2 Menge [eq]	$^3J_{\text{OH, CH}}$ [Hz]			
	6OH	7OH	8OH	9OH
0	n.d.	b	b	10.9
10.5	3.5	5.3	4.0	-
22.6	3.5	m	4.1	-
32.3	3.5	4.7	4.3	9.1 / 11.5
(Bodensatz)				
45.8	3.2	5.7	4.6	8.4 / 9.6
(Bodensatz)				
CaCl_2 -gesättigt	3.5	5.4	4.6	8.8

Tab. 9. 3J Kopplungen der OH Protonen von **BicOMe** in Abhängigkeit von der CaCl_2 Menge.

Ohne CaCl_2 ist der Austausch noch nicht so stark verlangsamt, dass alle OH Protonensignale identifiziert werden können. 6OH als das acideste Proton (neben der Carbonylfunktion) tauscht immer noch so schnell aus, dass kein Signal zu beobachten ist; 7OH und 8OH sind nur als breite Signale ohne Multiplettstruktur vorhanden. Einzig 9OH ist als deutliches Dublett zu identifizieren. Ein weiterer Hinweis darauf, dass auch in Methanol 9OH in einer H-Brücke mit räumlicher Fixierung (grosses 3J) vorliegt.

Die 3J Kopplungen für 7OH und 9OH ändern sich mit Zugabe von CaCl_2 deutlich, für 8OH ist dieser Effekt nur gering und für 6OH nur minimal. Dies lässt den Schluss zu,

dass sich für jene beiden OH Gruppen, die an der Ausbildung von H-Brücken beteiligt sind (7OH und 9OH), strukturelle Veränderungen ergeben. Dies kann z. B. eine Änderung der Orientierung der H-Brücken oder eine veränderte Gesamtkonformation sein.

Ein Isotopeneffekt wie auf Seite 26 beschrieben, wird für 7OH und 9OH erst bei höheren CaCl_2 Konzentrationen erkennbar. Für 45.8 eq CaCl_2 zeigen beide OH Signale die typische Pseudotriplettstruktur. Daher sollten beide an H-Brücken beteiligt sein.

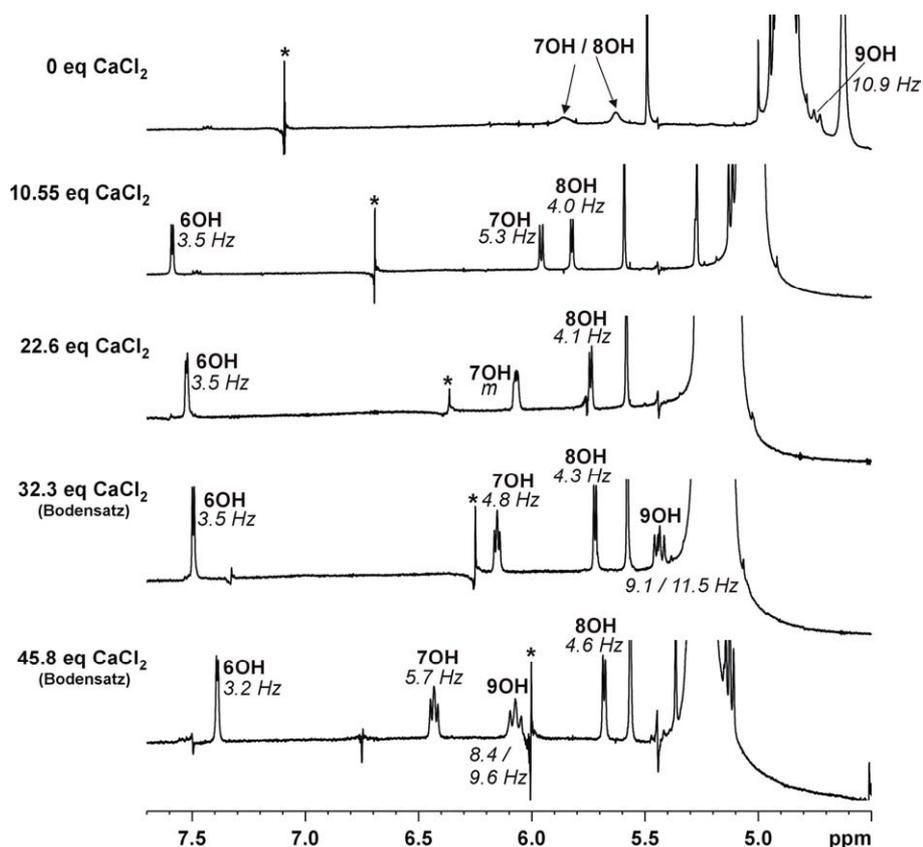


Abb. 32. ^1H OH Protonenbereich von **BicOME** in Abhängigkeit von der CaCl_2 Konzentration (MeOH 1:1, 400 MHz, 294 K). Die angegebenen 3J Kopplungen stammen aus den Lorentz-Gauss-transformierten ^1H Spektren. * = Artefakt

Wie aus den Messungen in DMSO-d_6 zu sehen war, bildet 9OH als Protonendonor eine gegabelte H-Brücke zu 7OH und der Carbonylfunktion des Esters an Position 3 aus. Der soeben angeführte Isotopeneffekt für 7OH und 9OH liesse sich damit erklären. Die Verringerung der $^3J_{\text{OH, CH}}$ Kopplung für 9OH bei CaCl_2 -Zugabe könnte auf eine schwächere H-Brücke oder aber eine veränderte Orientierung hindeuten. Letzteres wird gestützt durch den Befund, dass im Alkylbereich bei Zugabe von CaCl_2 ebenfalls Veränderungen zu beobachten sind. Und zwar betrifft dies die diastereotope CH_2 -Gruppe an Position 2. Sie besitzt ohne CaCl_2 eine Aufspaltung von 0.2 ppm (= 80 Hz) für hochfeldiges und tieffeldiges Proton. Mit zunehmender CaCl_2 Konzentration nähern sich diese beiden Signale immer stärker an, bis sie schliesslich als

ein Signal (Spinsystem höherer Ordnung) vorliegen. Mehrere Gründe können hierfür verantwortlich sein:

- unterschiedliches Ringpuckering des 5-Ringes.
- erhöhte Flexibilität des 5-Ringes.
- unterschiedliches H-Brückenmuster (allg. stark beeinflusst durch den Substituenten an Position 3).
- unterschiedliche Stärke der existierenden H-Brücken aufgrund unterschiedlicher Solvataion durch das LM.

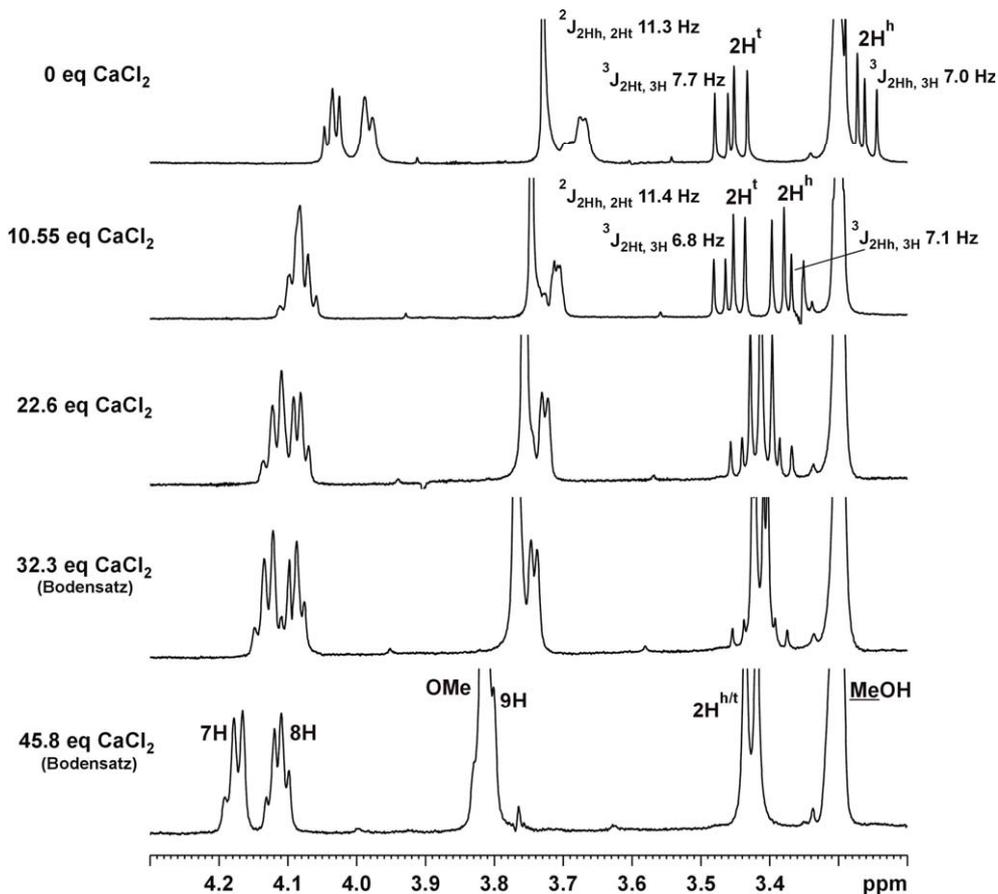


Abb. 33. ^1H Alkylbereich von **BicOMe** in Abhängigkeit von der CaCl_2 Konzentration (MeOH 1:1, 400 MHz, 294 K). Bei 0 und 10 eq CaCl_2 handelt es sich für $2\text{H}^h/2\text{H}^t$ noch nicht um ein Spinsystem höherer Ordnung, so dass die Kopplungen zu H3 noch abgelesen werden können. Wie zu erkennen, ändert sich jene Kopplung für 2H^t um ca. 1 Hz.

Ferner ist auch der Shift der OH Protonen in Abhängigkeit von der CaCl_2 Menge sehr unterschiedlich. Für 9OH erhält man eine Shiftdifferenz von + 534 Hz zwischen der Probe ohne und der mit ~45.8 eq CaCl_2 . Für die anderen OH Protonen ergibt sich aus dem Vergleich der Proben mit 10.6 und ~45.8 eq CaCl_2

für 6OH: - 80 Hz

für 7OH: + 189 Hz

für 8OH: - 58 Hz.

Dies zeigt wiederum deutlich, dass die an H-Brücken beteiligten OH Protonen 7 und 9 der stärksten Änderung unterliegen.

Sicher ist, dass die Zugabe von CaCl_2 Auswirkungen auf die Struktur und die H-Brücken in **BicOMe** hat. Welcher Art dieser Effekt genau ist, kann aus den vorhandenen Daten nicht geschlossen werden.

Daher ist es sinnvoll, eine mit CaCl_2 -gesättigte Probe näher zu untersuchen.

4.2 In CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung – Analyse von Struktur und H-Brücken

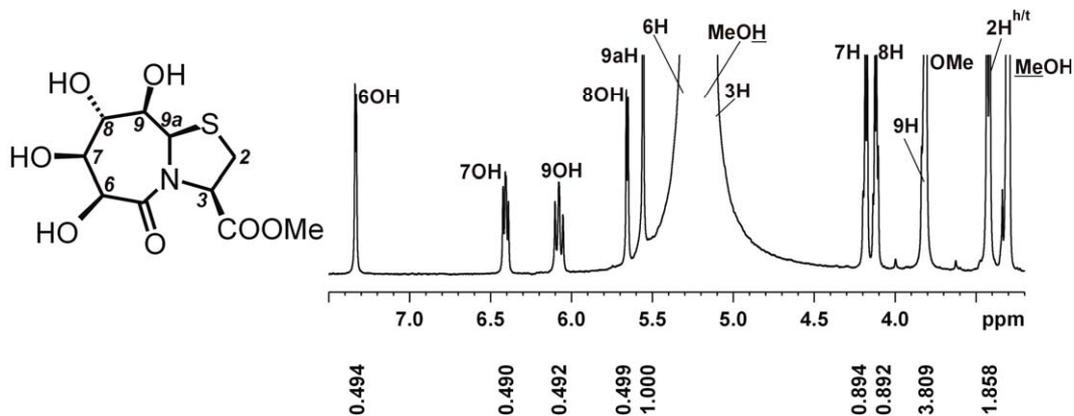


Abb. 34. ^1H Spektrum von **BicOMe** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung (MeOH 1:1, 400 MHz, 300 K). Die Integrale verdeutlichen, dass durch das Verhältnis von $\text{MeOH}_{\text{d}3}$ zu $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ von 1:1 auch die Intensitäten der OH Signale in etwa nur die Hälfte betragen.

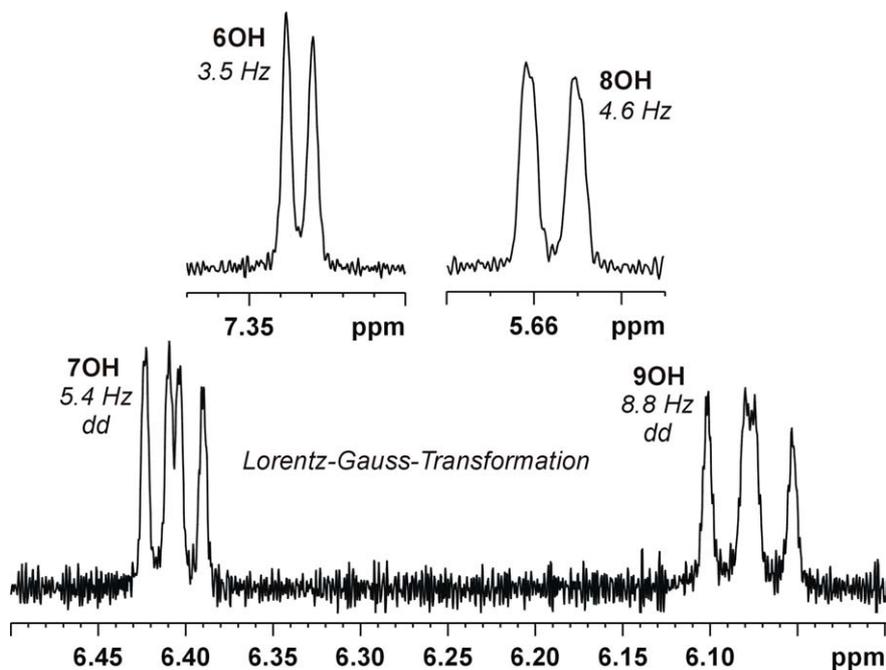


Abb. 35. Lorentz-Gauss-transformiertes ^1H Spektrum des OH Bereichs von **BicOMe** (CaCl_2 -gesättigt, MeOH 1:1, 400 MHz, 300 K).

Vergleicht man die 3J Kopplungen mit jenen in Tab. 8, so zeigen sich erhebliche Unterschiede:

- für 6OH: von **6.6 Hz auf 3.5 Hz**
- für 7OH: gleichbleibend 5.4 Hz
- für 8OH: von 3.9 Hz auf 4.6 Hz
- für 9OH: von **11 Hz auf 8.8 Hz**

6OH und 9OH erfahren also die stärksten Änderungen im Vergleich zur Struktur in DMSO_{d6} Lösung. Der vorhandene Isotopeneffekt für 7OH und 9OH legt deren Beteiligung an H-Brücken nahe.

Ordnet man anhand der Karplusbeziehung von Seite 16 jeder dieser Kopplungen mögliche Winkel zu, so sind folgende Ausrichtungen der OH Gruppen möglich:

OH Proton	$^3J_{OH, CH}$ [Hz]	Mögliche Winkel [°]
6OH	3.5	51°, 120°
7OH	5.4	38°, 130°
8OH	4.6	44°, 126°
9OH	8.8	11°, 147°

7OH und 8OH besitzen typische 3J Werte einer 50%igen Mittelung über alle drei gauche/trans Rotamere

Tab. 10. Aus den 3J Kopplungen mit Hilfe der Karplusbeziehung ermittelte, mögliche Orientierungen der OH Gruppen.

Von besonderem Interesse sind natürlich 7OH und 9OH, da sie an H-Brücken beteiligt sind. Für diese beiden OH Gruppen sind folgende vier Winkelkombinationen denkbar:

	A	B
Mögliche H-Brücken	$\angle H-O-C-H(7) = 40^\circ$ $\angle H-O-C-H(9) = 150^\circ$ H-Brücken von 9OH als Donor zu 7OH und zur Carbonylfunktion des Esters.	$\angle H-O-C-H(7) = 130^\circ$ $\angle H-O-C-H(9) = 150^\circ$ H-Brücken von 9OH als Donor zu 7OH und zur Carbonylfunktion des Esters. Winkel zwischen 7OH und Carbonylfunktion an Position 6 ungünstig → evtl. polarer Kontakt.
ROEs	7OH – 7H: 2.0 Å 7OH – 8H: 3.1 Å 9OH – 8H: 2.4 Å 9OH – 9H: 2.5 Å 9OH – 2H: 5.2 / 5.2 Å	7OH – 7H: 2.5 Å 7OH – 8H: 3.2 Å 9OH – 8H: 2.4 Å 9OH – 9H: 2.5 Å 9OH – 2H: 5.2 / 5.2 Å

	C $\angle \text{H} - \text{O} - \text{C} - \text{H} (7) = 40^\circ$ $\angle \text{H} - \text{O} - \text{C} - \text{H} (9) = 10^\circ$	D $\angle \text{H} - \text{O} - \text{C} - \text{H} (7) = 130^\circ$ $\angle \text{H} - \text{O} - \text{C} - \text{H} (9) = 10^\circ$
Mögliche H- Brücken	Keinerlei H-Brücken für diese Anordnung möglich. → Diese Winkelkombination scheidet also aus!	H-Brücken von 7OH als Donor zu 9OH und evtl. polarer Kontakt zur Carbonylfunktion an Position 6.
ROEs	-	7OH – 7H: 2.5 Å 7OH – 8H: 3.2 Å 9OH – 8H: 2.7 Å 9OH – 9H: 2.0 Å 9OH – 2H: 5.1 / 5.3 Å

Tab. 11. Mögliche Winkelkombinationen für 7OH und 9OH und daraus resultierende H-Brückenmuster. Die ROE Abstände entstammen den in Abb. 36 gezeigten Strukturen.

Die in Abb. 36 gezeigte Orientierung der Carbonylfunktion der Estergruppe entspricht jener in der Kristallstruktur und muss somit nicht zwangsläufig dem tatsächlichen Bild in Lösung entsprechen.

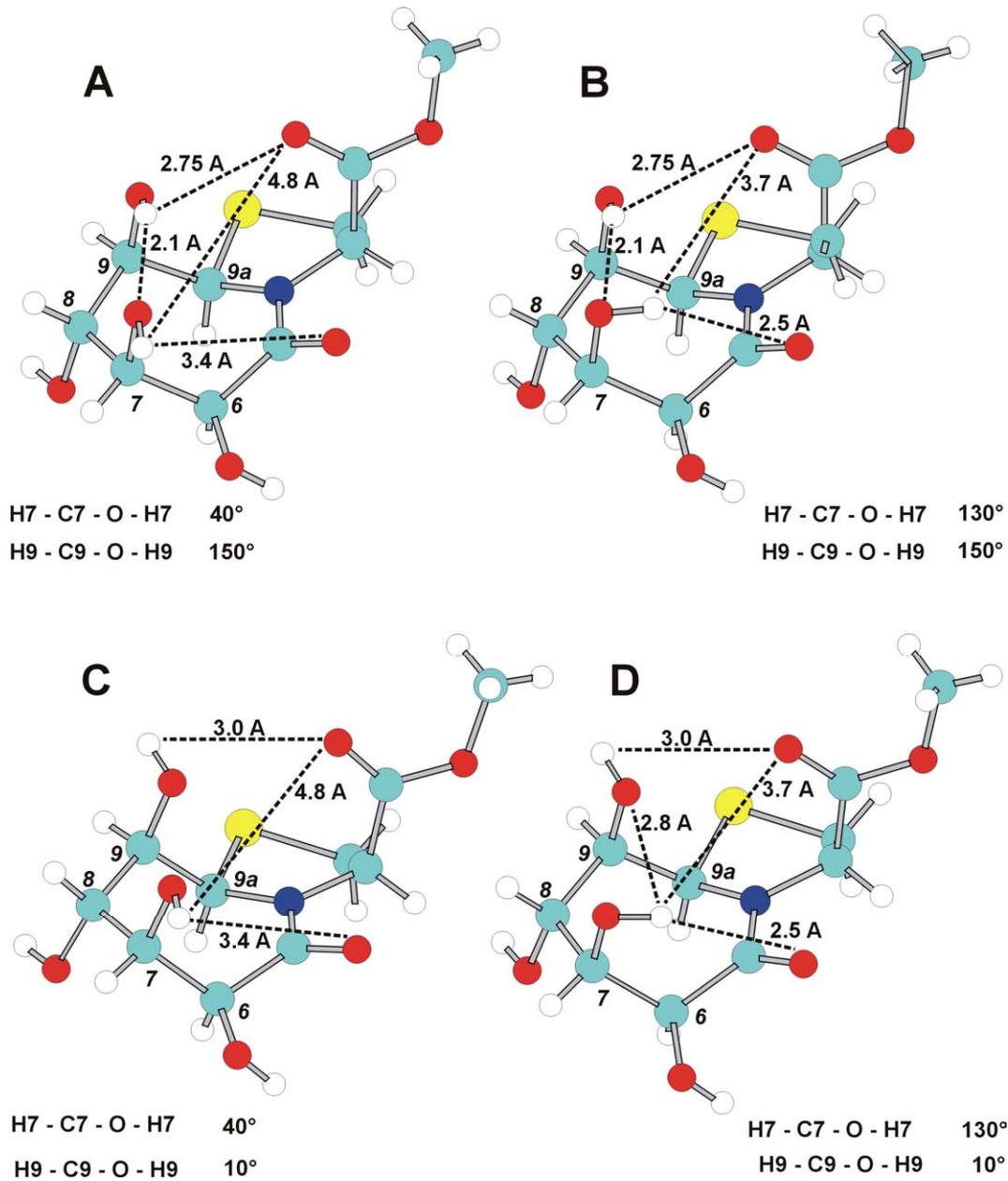


Abb. 36. Mögliche Kombinationen der OH Gruppenausrichtung für 7OH und 9OH und daraus resultierende Abstände möglicher polarer Kontakte oder H-Brücken.

Die Integration der interessierenden NOE Signale (NOESY, $t_m = 200$ ms) und deren Eichung auf 9aH – 9H ($\equiv 2.47$ Å) ergibt folgende Abstände:

ROE	Abstand [Å] aus NOESY Integration
7OH – 7H	2.4
7OH – 8H	3.0
9OH – 9H	2.4
9OH – 8H	3.1
9OH – 2H ^{h/t}	3.3
9aH – 9H	$\equiv 2.47$
9H – 8H	2.5

Für OH Integrale wurde der ursprüngliche Integralwert verdoppelt, da diese nur $\frac{1}{2}$ Intensität besitzen

Tab. 12. Aus NOESY Integration erhaltene OH / CH Abstände. Die Eichung auf 9aH – 9H ist möglich, da es sich aufgrund des starren, bicyklischen Systems (fixierte Sesselkonformation) um einen festen Abstand handelt.

Die einzige Struktur, in der sowohl 7OH – 7H als auch 9OH – 9H einen Abstand um 2.4 Å zueinander aufweisen, ist jene mit $\angle \text{H} - \text{O} - \text{C} - \text{H} (7) = 130^\circ$ und $\angle \text{H} - \text{O} - \text{C} - \text{H} (9) = 150^\circ$. Dies entspricht Struktur **B** in Abb. 16. Allerdings ist der Abstand 9OH – 8H bedeutend grösser als für jene Struktur zu erwarten, allerdings auch grösser als für jede andere, hier gezeigte Winkelkombination.

Die plausibelste Struktur für **BicOMe** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung ist jene, in der 9OH als Donor für H-Brücken zu 7OH und zur Carbonylfunktion des Esters fungiert. Letztere ist zwar mittels Isotopeneffekt nicht direkt beweisbar, aber die räumliche Ausrichtung von 9OH und Carbonylfunktion des Esters ist sehr gut für die Ausbildung einer H-Brücke geeignet. Zwischen 7OH und der Carbonylfunktion an Position 6 ist der Abstand mit 2.5 Å günstig für die Ausbildung einer H-Brücke, aber die räumliche Orientierung der beiden Partner denkbar ungünstig (spitzer Winkel), so dass in diesem Fall höchstens ein polarer Kontakt zwischen OH und Carbonylfunktion auftreten kann, jedoch keine H-Brücke.

Zu bedenken bleibt weiterhin, dass in DMSO_{d6} für 9OH eine 3J Kopplungskonstante von 11 Hz vorliegt, entsprechend einer OH Gruppe mit reiner Donorfunktion. Es ist also wahrscheinlich, dass im hier vorliegenden System (CaCl_2 -gesättigt, MeOH) die 9OH Gruppe nicht mehr ausschliesslich Donoreigenschaften aufweist, sondern auch als Akzeptor für die 7OH Gruppe dienen kann. Dies wäre im Einklang sowohl mit der verminderten 3J Kopplung von 8.8 Hz für 9OH, als auch mit dem nur schwachen ROE 9OH – 8H, bedingt durch das „Herausdrehen“ des Protons der 9OH Gruppe aus dem Ring, wenn sie als Protonenakzeptor fungiert.

Die Möglichkeit, dass, wie im Kristall, sequentielle H-Brücken mit 7OH als Donor für 9OH und 9OH wiederum als Donor für die Carbonylgruppe vorliegen, ist insofern unwahrscheinlich, da die $^3J_{\text{CH, OH}}$ Kopplung für 7 unverändert 5.4 Hz beträgt. Wäre 7OH zu einem gewissen Grad Donor für 9OH, so müsste sich die $^3J_{\text{CH, OH}}$ Kopplung für 7 deutlich verkleinern, da in der Ausrichtung als reiner Donor nur ca. 2 Hz Kopplung die Folge wären.

Wie schon die Titration mit CaCl_2 in 4.1, so deutet auch die hier vorgestellte Strukturanalyse in CaCl_2 -gesättigter Lösung daraufhin, dass es in Abhängigkeit von der CaCl_2 -Menge zu einer Änderung des H-Brückenmusters im Bereich von 9OH kommt. So geht 9OH von einer gegabelten H-Brücke zu 7OH und CO(3) mit reiner Donorfunktion und einer eindeutigen trans-Kopplung zu einem System über, in dem der Anteil an 9OH als Akzeptor für 7OH eine grössere Rolle spielt.

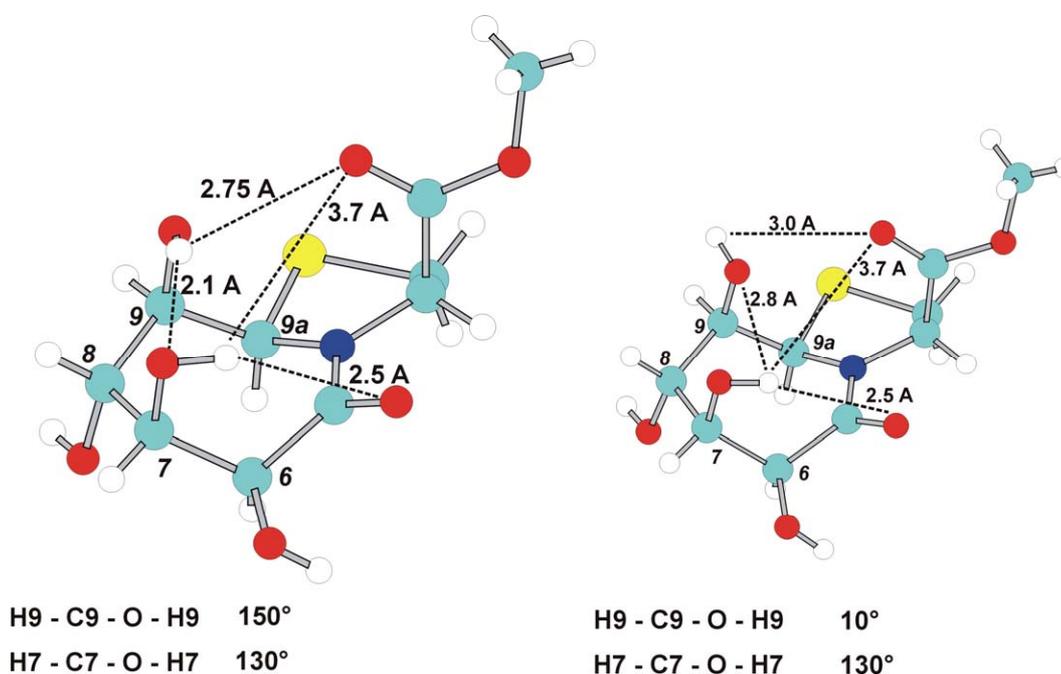


Abb. 37. Aufgrund der experimentellen Daten plausibelste Struktur (links) für **BicOMe** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung. Rechts die Variante mit 9OH als Akzeptor, welche ebenfalls – zu einem geringeren Anteil – vorliegen kann.

5. Zusammenfassung

Mit der hier vorgestellten Methode, in methanolischen Lösungen durch Zusatz von trockenem, neutralem Aluminiumoxid Säure- und/oder Basenspuren weitestgehend zu eliminieren, ist es möglich, den chemischen Austausch von Hydroxyprotonen drastisch zu verlangsamen und so sowohl die zugehörigen Signale, als auch deren Signalstruktur (Multiplizität) zu detektieren. Zudem ist der Austausch bereits bei RT so stark verlangsamt, dass Messungen bei tiefen Temperaturen nicht nötig sind und somit der experimentelle Aufwand gering gehalten werden kann.

Dieses Verfahren eignet sich für Moleküle, die selbst keine aciden Gruppen besitzen, welche zu einer erneuten Beschleunigung des Austausches führen würden.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Vorgehensweise für verschiedene Mono-, Di- und Oligosaccharide (z. B. Lewis^X; siehe Kap. II) und ein Thiazolidinlactam angewendet.

Auch der Zusatz von CaCl₂ und im Verlauf die Sättigung der methanolischen Lösung mit CaCl₂ haben einen trocknenden Effekt auf die Probe, was zu einer weiteren Reduzierung des chemischen Austausches führt.

Es ist also möglich, vor allem Kohlenhydrate in einem, noch am ehesten mit Wasser vergleichbaren, organischen LM zu untersuchen und so, durch die Hydroxylgruppen zusätzliche, strukturelle Informationen zu erhalten. Auch im Rahmen von Untersuchungen zur Komplexbildung, wobei häufig die OH Protonen das eigentliche Bindungsmotiv darstellen, ist es nun möglich, näher an den Ort des Geschehens, also direkt an die Stelle der Komplexbildung, vorzudringen und so genauere Aussagen über die Struktur der entstandenen Komplexe zu erhalten.

Das vorgestellte Verfahren stellt für Moleküle ohne acide Protonen sicherlich eine gute Alternative zu den gängigen Kryomischungen dar.

6. Literaturstellen

- [1] Sandström C.; Baumann H.; Kenne L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, *4*, 809-815.
- [2] (a) Adams B.; Lerner L. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4827-4829. (b) Leeflang B. R.; Vliegthart J. F. G.; Kroon-Batenburg L. M. J.; van Eijck B. P.; Kroon J. *Carbohydr. Res.* **1992**, *230*, 41-61.
- [3] Bock K.; Frejd T.; Kihlberg J.; Magnusson G. *Carbohydr. Res.* **1988**, *176*, 253-270.
- [4] (a) Sandström C.; Baumann H.; Kenne L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, *11*, 2385-2393. (b) Ivarsson I.; Sandström C.; Sandström A.; Kenne L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, *10*, 2147-2152. (c) Bekiroglu S.; Kenne L.; Sandström C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1671-1678.
- [5] Fraser R. T.; Kaufman M.; Morand P.; Govil G. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 403-409.
- [6] (a) Poppe L.; van Halbeek H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 363-365. (b) Poppe L.; van Halbeek H. *Nature Struct. Biol.* **1994**, *4*, 215-216.
- [7] Symons M. C. R.; Benbow J. A.; Harvey J. M. *Carbohydr. Res.* **1980**, *83*, 9-20.
- [8] (a) Smallwood I. *Handbook of Organic Solvent Properties*, Arnold Verlag: London, **1996**. (b) Sucha L.; Kotrly S. *Solution Equilibria in Analytical Chemistry*, Van Nostrand Verlag: London, **1972**; 93.
- [9] Luz Z.; Gill D.; Meiboom S. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 1540-1545.
- [10] Grunwald E.; Jumper C. F.; Meiboom S. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 4664-4671.
- [11] Koskikallio J. *Suomen Kemistilehti B* **1957**, *30B*, 155-156.
- [12] Pearce C. M.; Sanders J. K. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, *9*, 1119-1124.
- [13] (a) Deranleau D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 4044-4049. (b) Marshall A. G. *Biophysical Chemistry: principles, techniques and applications*, Wiley: New York, **1978**; 70-84.
- [14] Govil G.; Hosur R. V. *Conformation of Biological Molecules, New Results from NMR*, Springer-Verlag: Heidelberg, **1982**; 18-19.
- [15] Hanson J. C.; Sieker L. C.; Jensen L. H. *Acta Cryst. Sect. B* **1973**, *29*, 797-808.
- [16] Bock K.; Lemieux R. U. *Carbohydr. Res.* **1982**, *100*, 63-74.
- [17] Christofides J. C.; Davies D. B. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, *21*, 1533-1534.

[18] (a) Duker J. M.; Serianni A. S. *Carbohydr. Res.* **1993**, *249*, 281-303. (b) Hervé du Penhoat C.; Imberty A.; Roques N.; Michon V.; Mentech J.; Descotes G.; Pérez S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3720-3727. (c) Poppe L.; van Halbeek H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1092-1094. (d) Sheng S.; van Halbeek H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 504-510. (e) Immel S.; Lichtenthaler F. W. *Liebigs Ann.* **1995**, 1925-1937.

[19] Dabrowski J.; Kožár T.; Grosskurth H.; Nifant`ev N. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5534-5539.

[20] (a) Reuben J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6180-6186. (b) Bosco M.; Picotti F.; Radoicovich A.; Rizzo R. *Biopolymers* **2000**, *53*, 272-280.

[21] Geyer A.; Moser F. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, *7*, 1113-1120.

[22] Bockelmann D. *Diplomarbeit*, Universität Konstanz, **1998**.

Kapitel II

Ca²⁺ induzierte Wechselwirkungen
zwischen Lewis Analoga
Analyse der 3D-Struktur

1. Allgemeines

Kohlenhydrate kommen in unterschiedlichster Form in der Natur vor: als Mono-, Oligo- oder Polysaccharide, oder aber in Form von Glycolipiden oder Glycopeptiden.^{1,2}

Betrachtet man die vielfältigen Optionen, Monosaccharide untereinander zu verknüpfen und zusätzlich noch jene Modifikationen, welche durch Substitution der einzelnen Hydroxygruppen erzielt werden können, so ergibt sich eine nahezu unüberschaubare Anzahl an Variationsmöglichkeiten, die jene in Peptiden oder Nucleinsäuren bei weitem übertrifft.³

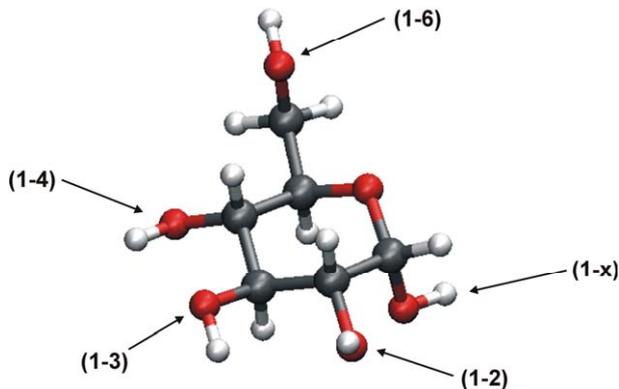


Abb. 1. Mögliche Verknüpfungsstellen in einer Pyranose.

So erhält man z. B. für ein Hexamer, wenn man von 20 verschiedenen Monosacchariden ausgeht, $1.44 \cdot 10^{15}$ mögliche Isomere, analog ergeben sich für 20 Aminosäuren „nur“ $6.4 \cdot 10^7$ und für die 4 Nucleotide der DNA gerade mal 4096 verschiedene Isomere.⁴

Berücksichtigt man nun noch, zusätzlich zu den diversen Verzweigungsmöglichkeiten, die dritte Dimension, also die vielfältigen dreidimensionalen Strukturen bei gleichem Verknüpfungsmuster in Abhängigkeit von den, die O-glykosidischen Bindungen definierenden, Winkeln Φ und Ψ , so wird die Anzahl an verschiedenartigsten Kohlenhydraten, mit unterschiedlichsten biologischen Funktionen, praktisch nahezu grenzenlos. Somit kann in Form von Kohlenhydraten eine grosse Menge an unterschiedlichsten Informationen auf kleinstem Raum gespeichert werden.³

Weshalb schliesslich Kohlenhydrate in Organismen nicht nur Speicher- oder Stützfunktionen besitzen, sondern durch eben jene Fähigkeit, spezifisch Informationen zu tragen, z. B. für die Kommunikation zwischen Zellen von entscheidender Bedeutung sind.

So gibt es auf der Oberfläche der Zellen Lipide oder auch Peptide, die Kohlenhydratstrukturen präsentieren. Sie werden allgemein als Glykokonjugate bezeichnet und dienen z. B. für Antikörper, Hormone, Lektine, aber auch Viren oder Bakterien als Rezeptorstellen.⁵

Die Gesamtheit der, auf der Zelloberfläche präsentierten Kohlenhydrate, bezeichnet man auch als Glycocalix. Ihre in der Membran sitzenden Lipid- bzw. Peptidanteile können innerhalb der Lipiddoppelschicht der Zellmembran lateral diffundieren⁶, so dass es zur Ausbildung grösserer Flächen mit hoher Konzentration an Glykokonjugaten (sog. Mikrodomänen oder Rafts)⁷ kommen kann. Unklar ist bis dato, ob diese lokale Konzentration rein physikalisch durch Entmischung oder durch spezifische

Wechselwirkungen zwischen den Kohlenhydraten verursacht wird. Innerhalb dieser Mikrodomänen kommunizieren die Kohlenhydratkopfgruppen durch *side-by-side* Wechselwirkungen⁸, wohingegen die Wechselwirkung benachbarter Zellen über ihre Mikrodomänenbereiche über sog. *head-to-head* Wechselwirkungen⁹ vermittelt wird (Abb. 3).

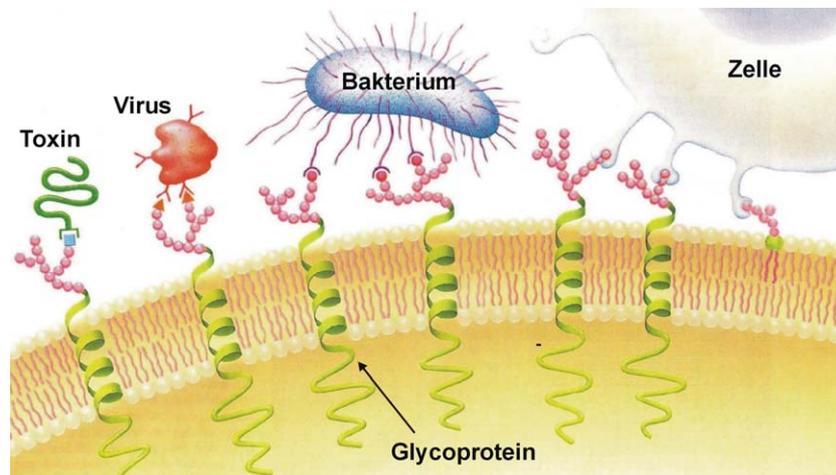


Abb. 2. Beispiele für Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen.(aus ⁵)

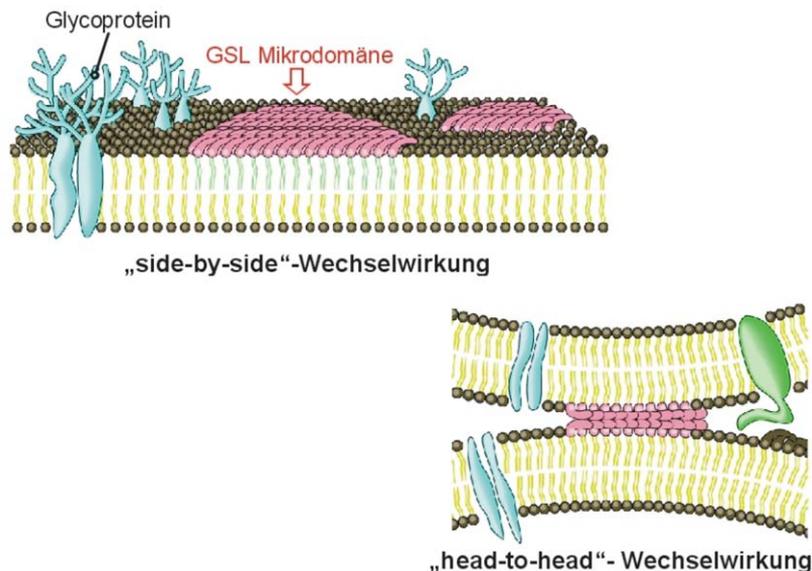


Abb. 3. Darstellung der *side-by-side* Wechselwirkung zwischen Glycosphingolipiden (GSL) innerhalb einer Mikrodomäne und der *head-to-head* Wechselwirkungen zwischen Mikrodomänen benachbarter Zellen.(aus ^{13a})

Eine Klasse dieser Kopfgruppenkohlenhydrate sind die Lewis Blutgruppenantigene, bestehend aus einer Tri- bzw. Tetrasaccharideinheit, die zusätzlich sialyliert und/oder mit Lactosespacer an ein Sphingosin gebunden ist.¹⁰

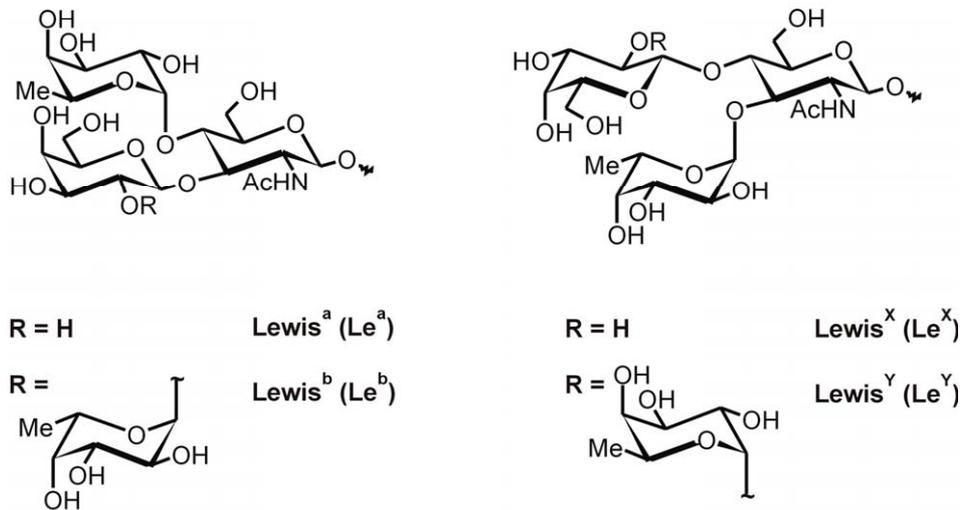


Abb. 4. Strukturen der Lewis Blutgruppenantigene mit den, für den Erkennungsprozess entscheidenden, Kopfgruppeneinheiten.

Die Wechselwirkungen zwischen Lewis Kopfgruppen und Proteinen besitzen eine nur sehr schwache Affinität.¹¹ Genau diese, nur schwache Kohlenhydrat-Protein Wechselwirkung ist von entscheidender Bedeutung für Erkennungs- und Adhäsionsprozesse, da hier eine höhere Flexibilität vonnöten ist.^{11a} Ein Beispiel hierfür ist der Entzündungsprozess, bei dem Leukozyten aus dem Blutstrom durch die Blutgefäßwände in das betroffene Gewebe wandern. Durch die schwache KH-Protein Wechselwirkung zwischen Leukozytenoberfläche und Endotheloberfläche werden die Leukozyten langsam abgebremst, da die sonst auftretenden Scherkräfte die Leukozyten zerstören würden.¹²

Dies ist nur ein Beispiel dafür, dass für bestimmte Erkennungsprozesse eine schwache Wechselwirkung vorliegen muss, da eine starke WW einen negativen Effekt bestände.

Weiterhin spielen die KH-Protein WWs (bzw. auch Protein-Protein WWs) auch bei vielen Tumorerkrankungen¹³, in der Embryonalentwicklung¹⁴ und bei Xenotransplantationen¹⁵ eine entscheidende Rolle.

Die hier untersuchten Lewis Blutgruppenantigene besitzen bekanntermassen eine – schwache – Affinität zu Ca^{2+} Ionen, was dazu führt, dass bei Untersuchung in Lösung die Aggregate hauptsächlich dissoziiert vorliegen und somit eine direkte Beobachtung mit NMR Spektroskopie nicht möglich ist.^{10, 16} Allerdings war es, wie in der Literatur gezeigt, möglich, eine Bindungsstelle für Ca^{2+} (allg. M^{2+}) zu postulieren.^{16b} Mit der kovalenten Verknüpfung zweier Lewis Trisaccharide¹⁷ über eine Etherbrücke und Titration mit $CaCl_2$ kann anhand der CH-Protonen über deren Ca^{2+} abhängige Verschiebung eine Bindungskonstante ermittelt und über NOE Messungen die Struktur des dimeren Lewis^x bei Calciumbindung berechnet werden.¹⁸

Die, im zuvor beschriebenen Kapitel I, vorgestellte Methode, OH Protonen in polar, protischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur sichtbar zu machen, wird hier eingesetzt, um die Ca^{2+} Bindungsstelle jetzt durch Beobachtung der OH-Protonen genauer zu charakterisieren.

Sie wird zudem angewendet auf ein dimeres Lewis^X Glycopeptid¹⁹, welches den natürlichen Gegebenheiten mehr entspricht, als ein artifizielles Lewis^X Dimer mit kovalenter Brücke.

Durch Analyse der, direkt an der Ca²⁺ Bindung beteiligten, (OH-) Gruppen ist eine viel genauere Beurteilung der Bindung möglich.

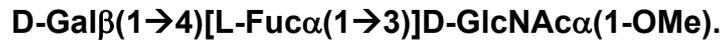
Zudem gestattet die Untersuchung mittels NMR Spektroskopie die Betrachtung des Bindungsepitops auf atomarer Ebene.

Somit wird ein weitaus tieferer Einblick in KH-KH Wechselwirkungen gewährt, als dies bisher der Fall war.

Die untersuchten Lewis^X Analoga (Dimer und Monomer) stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. R. R. Schmidt (Universität Konstanz), das Lewis^X Glycopeptid aus der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kunz (Universität Mainz).

2. Lewis^X Monomer (Le^X Mono)

Bei der ersten, untersuchten Verbindung handelt es sich um die Lewis^X Kopfgruppe bestehend aus drei Sacchariden – N-Glucosamin, Fucose und Galactose – ohne Säurefunktion:



Das anomere Zentrum des N-Glucosamins liegt methyliert, in α -Konfiguration vor.

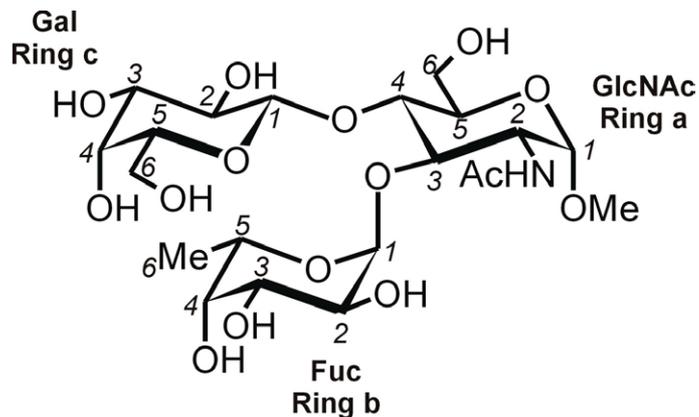


Abb. 5. Struktur von Lewis^X Monomer mit Numerierung.

Wie Abb. 5 zeigt, ist die Fucose über eine α -(1 \rightarrow 3)-O-glykosidische Bindung, die Galactoseeinheit über eine β -(1 \rightarrow 4)-O-glykosidische Bindung mit der N-Glucosamineinheit verknüpft.

2.1 Le^X Mono in MeOH_{d4}

Le^X Mono ist leicht löslich in Methanol. Die Messung in reinem MeOH_{d4} dient zur Zuordnung der nicht-aciden Protonen, was die anschließende Zuordnung der aciden Protonen in MeOH_{d3} : MeOH_{d4} (1:1) erleichtert.

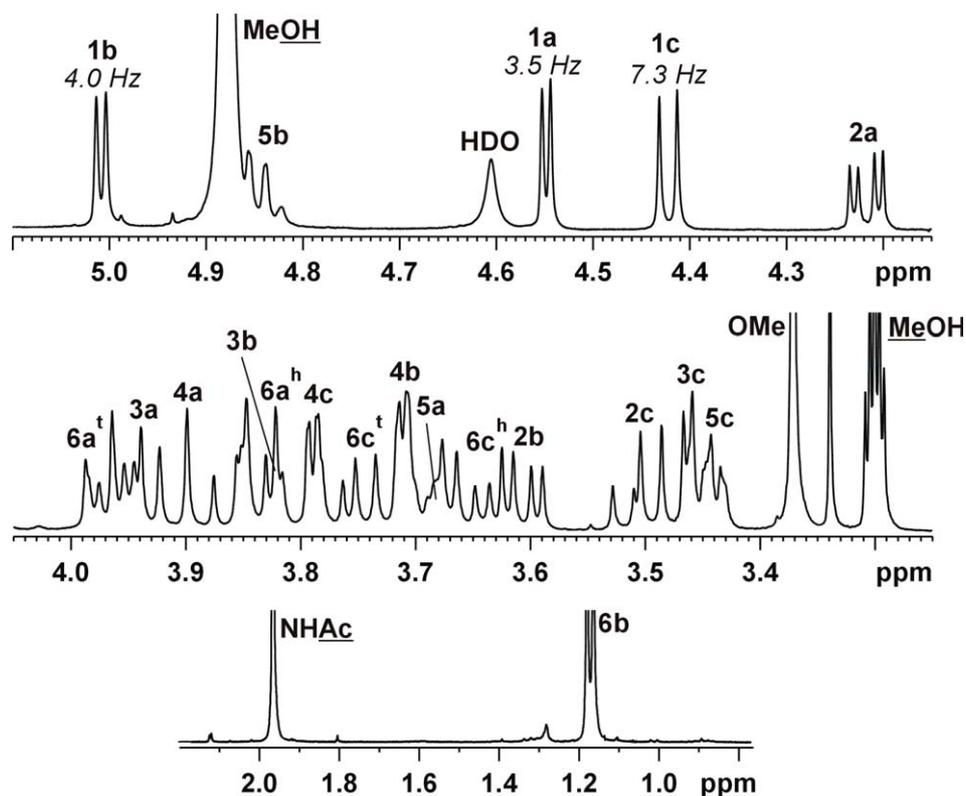


Abb. 6. ^1H NMR Spektrum von **Le^X Mono** in MeOH_{d4} (400 MHz, 294 K).

Die Zuordnung erfolgte über ein DQFCOSY Spektrum und durch Vergleich mit bereits vorliegenden Zuordnungen von **Le^X Mono** in MeOH_{d4} .^{17a, 20}

Aus dem ROESY Spektrum konnten für die Strukturermittlung von **Le^X Mono** charakteristische ROEs erhalten werden:

- intraglykosidische ROEs: wie z. B. 1b – 2b, 4b – 5b, 3b – 5b, 1c – 5c
- transglykosidische ROEs: 1b – 3a und 1c – 4a
- long-range ROEs: 2c – 5b und 2c – 6b (sog. *stacking* ROEs zwischen den hydrophoben Ringseiten von Fuc und Gal)

Durch Integration und Eichung auf einen festen Referenzabstand ($1a - 2a \equiv 2.4 \text{ \AA}$) können die, aus dem ROESY Spektrum erhaltenen, Abstände in eine MD Simulation zur Berechnung der Struktur von **Le^X Mono** einbezogen werden.

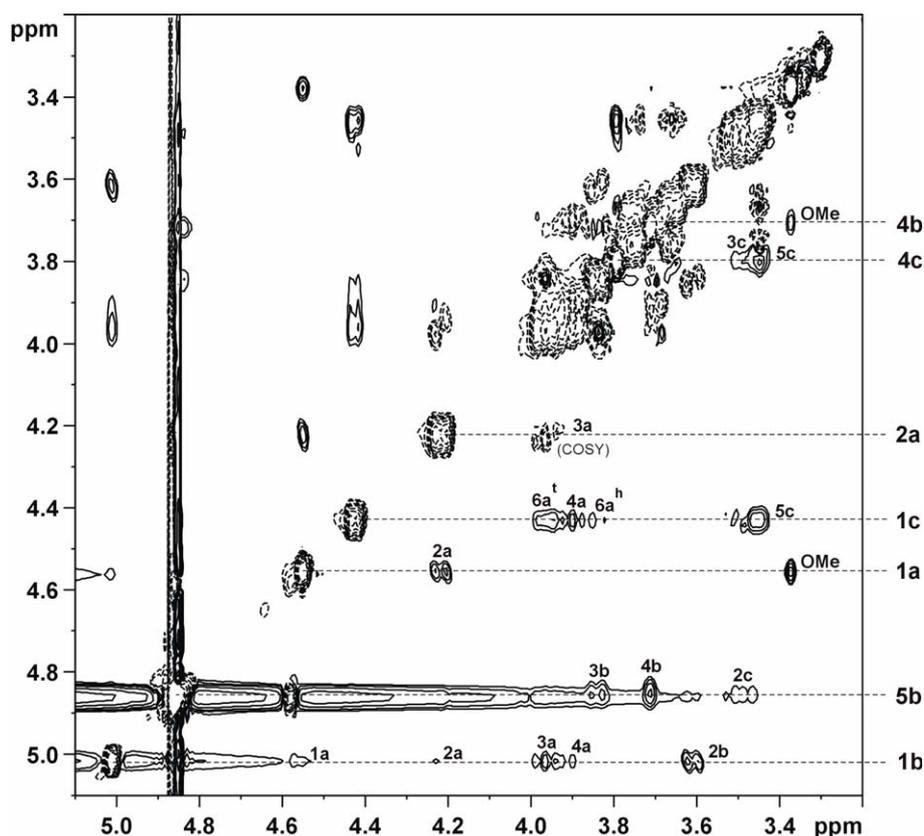


Abb. 7. Ausschnitt aus dem ROESY Spektrum von Le^x Mono in MeOH_{d4} (400 MHz, 294 K).

Weitere Ausschnitte sind im Anhang abgebildet. Eine Liste mit allen ermittelten ROEs findet sich im experimentellen Teil.

Folgende ROEs und Winkel der O-glykosidischen Bindungen wurden in der MD Simulation (10x10 ps, 300 K) als Restraints gesetzt:

Abstand bzw. Winkel	Wert [\AA] bzw. [$^\circ$]
H1b – H2a	2.9
H1b – H3a	2.35
H1c – H4a	2.4
H2c – H5b	2.3
H2c – H6b	2.6
Φ (Fuc)	40
Ψ (Fuc)	30
Φ (Gal)	47
Ψ (Gal)	17

Tab. 1. Für die Strukturermittlung von Le^x Mono gesetzte Abstände und Winkel bei der Berechnung.

Die Winkel Φ und Ψ , welche die O-glykosidischen Bindungen betreffen, sind wie folgt definiert:

- Φ (Fuc): H1b – C1b – O – C3a
- Ψ (Fuc): C1b – O – C3a – H3a
- Φ (Gal): H1c – C1c – O – C4a
- Ψ (Gal): C1c – O – C4a – H4a

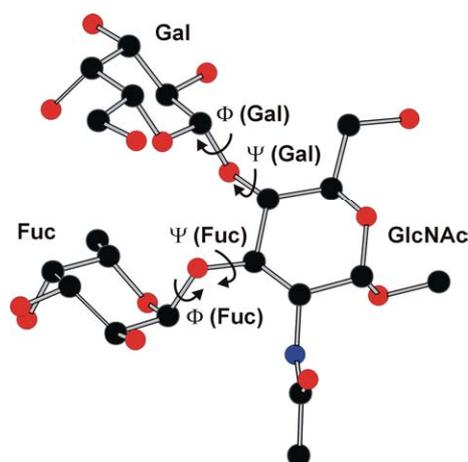


Abb. 8. Graphische Darstellung der Φ -/ Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen in **Le^X Mono**.

Sie ergeben sich aus der, über NOEs definierten, Konformation des Lewis^X Trisaccharids in Lösung. Diese kann als relativ starr angesehen werden.²¹

Alle zehn erhaltenen Snapshots werden überlagert und hieraus eine gemittelte Struktur bestimmt, welche anschliessend energieminimiert wird.

Die gesetzten Abstände und Winkel werden im Rahmen der MD Simulation wie folgt gefittet:

Abstand bzw. Winkel	Gesetzter Wert [Å] bzw. [°]	Wert aus MD Simulation [Å] bzw. [°]
H1b – H2a	2.9	3.3
H1b – H3a	2.35	2.4
H1c – H4a	2.4	2.4
H2c – H5b	2.3	2.4
H2c – H6b	2.6	2.8
Φ (Fuc)	40	43
Ψ (Fuc)	30	30
Φ (Gal)	47	53
Ψ (Gal)	17	14

Tab. 2. Vergleich der gesetzten Restraints mit den, aus der gerechneten Struktur erhaltenen, Abständen und Winkeln. Nur für H1b – H2a ist eine grössere Differenz zwischen gesetztem und gefittetem Wert vorhanden, allerdings werden die Winkel der zugehörigen O-glykosidischen Bindung gut gefittet.

Alle strukturelevanten Abstände wurden sehr gut im Rahmen der MD Simulation gefittet. Daraus ergibt sich folgende Struktur für **Le^X Mono** in MeOH_{d4}:

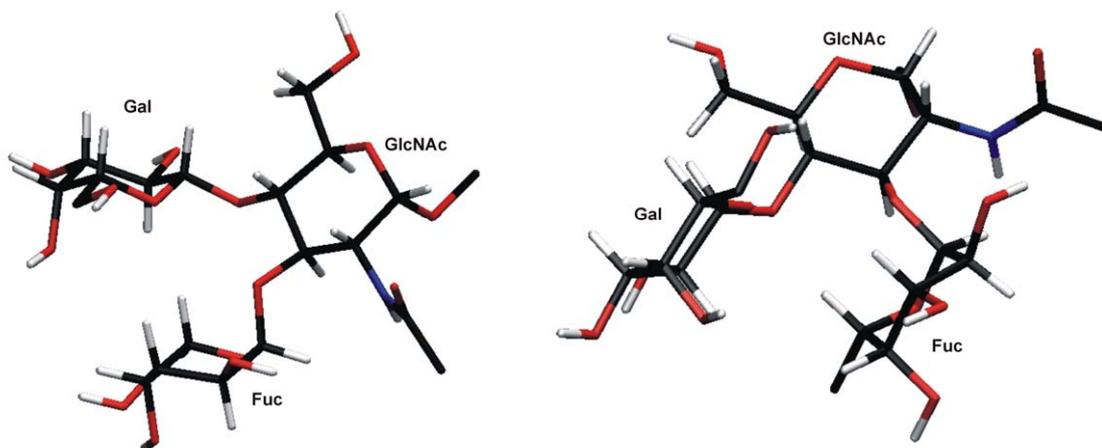


Abb. 9. Aus MD Simulation erhaltene Struktur von **Le^X Mono**. Deutlich zu erkennen das hydrophobe Stacking von Fucose- und Galactoseeinheit.

2.2 Le^X Mono in MeOH_{d3}:MeOH_{d4} 1:1

Wie in Kapitel I beschrieben, kann durch Behandlung mit Aluminiumoxid der Austausch in MeOH so stark verlangsamt werden, dass acide Protonen wie NHs oder Hydroxyprotonen als separierte Signale, teilweise mit Multipllettstruktur, detektiert werden können.

Dieses Verfahren wurde auch im Falle von **Le^X Mono** angewendet, um, wie schon angesprochen, zusätzliche strukturelle Aussagen anhand der Hydroxyprotonen zu erhalten. Besonders von Bedeutung ist dieses Verfahren jedoch für die dimeren Lewis^X Systeme, die über ihre Hydroxygruppen Ca²⁺ binden.

Für **Le^X Mono** kann der Austausch auch ohne Zugabe von CaCl₂ soweit verlangsamt werden, dass die Hydroxyprotonen (& das NH-Proton) über DQFCOSY und ROESY Spektren eindeutig zugeordnet werden können.

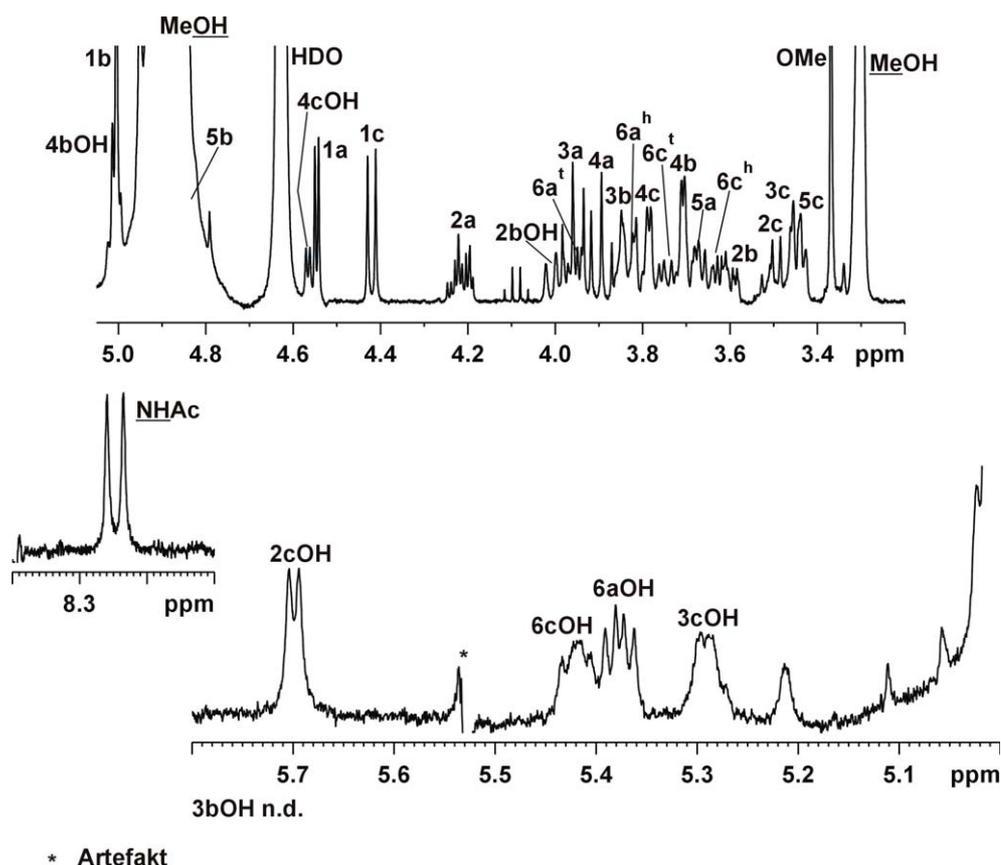


Abb. 10. ^1H NMR Ausschnitte von $\text{Le}^x \text{Mono}$ in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$ (1:1), nach Al_2O_3 (400 MHz, 294 K).

Für die CH-Protonen ergeben sich als einzige Änderung im Vergleich zur Messung in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ andere Multipllettstrukturen aufgrund der zusätzlichen 3J Kopplungen durch die OH-Protonen.

Besonders 2bOH zeigt im Vergleich zu den übrigen OH-Protonen einen starken Hochfeldshift (bei ~ 4 ppm) und eine sehr grosse Kopplungskonstante ($^3J_{\text{H, OH}} = 9.1$ Hz); auch 4cOH ist hochfeldverschoben. Für 2bOH legt besonders die grosse Kopplungskonstante (kaum freie Rotation, stattdessen bevorzugte Orientierung) die Beteiligung an einer H-Brücke nahe, welche aber aufgrund des fehlenden Isotopeneffekts mit grosser Wahrscheinlichkeit zu einer Carbonylfunktion ausgebildet wird. Einzig in Frage kommende Carbonylgruppe ist jene des Acetyls in Position 2 des a-Ringes.

Die sekundären OH-Protonen (soweit identifizierbar) – 2bOH, 2cOH, 3cOH, 4cOH – zeigen, bis auf 3cOH, die typische Dublettstruktur. Für 3cOH ist das Signal verbreitert und seine Pseudotriplettstruktur deutet auf seine Beteiligung an einer H-Brücke mit einer weiteren OH- bzw. NH-Gruppe als Partner hin (Isotopeneffekt). Hierfür kommen ausschliesslich seine Nachbar OH-Gruppen an den Positionen 2 und 4 des c-Ringes in Frage.

Die primären OH-Protonen – 6aOH und 6cOH – zeigen die, für sie typische, Pseudotriplettstruktur.

2.3 Titration mit CaCl_2 in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ (1:1)

Monomere Lewis Einheiten zeigen eine nur schwache Affinität für Ca^{2+} Ionen, wohingegen dimere Lewis Systeme eine für Saccharide hohe Affinität für Ca^{2+} Ionen besitzen (in MeOH).²⁰

Mit der hier verwendeten Probe von **Le^x Mono** in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ soll gezeigt werden, dass es für die Ermittlung von Bindungseigenschaften von Vorteil ist, die direkt beteiligten Gruppen – also in diesem Fall die Hydroxygruppen – in ihrem Verhalten beobachten zu können, und so genauere Ergebnisse über die Art und Weise der Bindung zu erhalten.

Die Ausschnitte der ^1H Spektren im Verlauf der CaCl_2 -Titration sind im experimentellen Teil gezeigt.

Die Auftragung der Änderung der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta_{\text{H}}$) in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an CaCl_2 zeigt deutlich, dass die Hydroxyprotonen und das NH-Proton eine sehr viel stärkere Änderung ihrer chemischen Verschiebung erfahren als z. B. die anomeren CH-Protonen.

Die maximale Änderung für diese Titration beträgt 67 Hz für CH (1cH) und 583 Hz für OH (3cOH). Mit dieser Vergrößerung des überstrichenen Bereichs um einen Faktor von etwa 9 wird auch die Auswirkung von Ablesefehlern (prozentual) geringer.

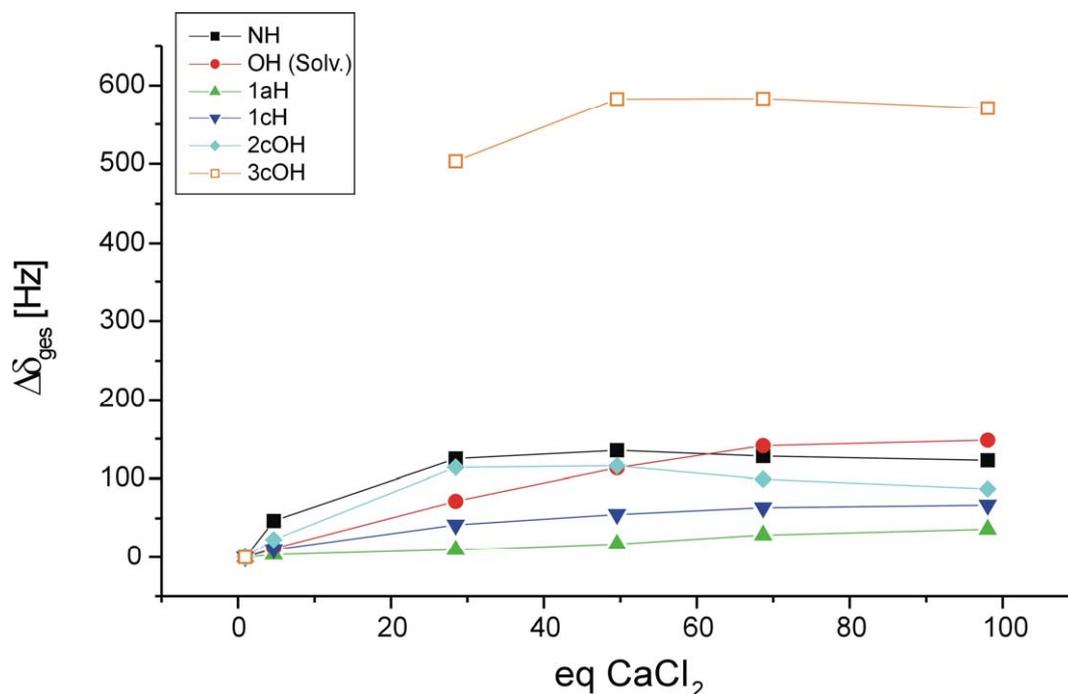


Abb. 11. Auftragung der Änderung der chemischen Verschiebung gegen die zugegebene Menge CaCl_2 für **Le^x Mono** in $\text{MeOH}_{d3}/\text{MeOH}_{d4}$.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die OH- bzw. NH-Protonen die maximale Verschiebung im Rahmen der Titration bereits erreicht haben, wohingegen für die CH-Protonen der maximale Shift bei 98 eq CaCl_2 noch nicht erreicht ist.

Eine nur schwache Bindung erlaubt die Auswertung mit Hilfe des sog. Scatchardplots (siehe auch Kapitel I).

Da die CH-Protonen ihren maximalen Shift noch nicht erreicht haben, ist der Wert für die maximale Verschiebung, welcher bei der Berechnung des Scatchardplots benötigt wird, nicht verfügbar, so dass bei Auswertung dieser Protonen ein entsprechender Fehler zu berücksichtigen ist.

Für 2cOH und NH kann eine Auswertung mit Scatchardplot erfolgen, auch wenn aus der geringen Anzahl an Datenpunkten ein etwas grösserer Fehler in der erhaltenen Bindungskonstante zu berücksichtigen ist.

Die aus der Steigung der Scatchardplot-Geraden ermittelte Bindungskonstante K_a beträgt:

- ca. **5 – 6 L/mol** (aus den NH Daten)
- ca. **2 L/mol** (aus den 2cOH Daten)
- ca. **1 – 2 L/mol** (aus H1c Daten, mit Abschätzung des maximalen Shifts)

Insgesamt also im selben Bereich, wie frühere Titrationsen in reinem MeOH_{d4} ergeben hatten (ca. 6 L/mol).²⁰ Die Bindung von Ca^{2+} an monomere Lewis^X Einheiten ist demnach (in MeOH) sehr schwach.

Alle für die Ermittlung des Scatchardplots benötigten Daten sind im Anhang zusammengestellt.

Zusätzlicher Vorteil ist, dass man sich bei Betrachtung der OH- (bzw. NH-) Protonen näher am eigentlichen Ort des Bindungsvorganges befindet.

Mit der hier maximal zugegebenen Menge an CaCl_2 von 98 eq ist man bereits im Bereich einer CaCl_2 -gesättigten, methanolischen Lösung. Überschüssiges CaCl_2 kristallisiert nach einiger Zeit aus.

Diese so erhaltene Lösung kann im weiteren verwendet werden, um Aussagen über die Struktur von **Le^X Mono** bei sehr hoher Ca^{2+} Konzentration treffen zu können.

2.4 Le^X Mono in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung

Aufgrund des hohen Salzgehalts sind alle Signale nun verbreitert, so dass keine Multipletstrukturen mehr für OH- und NH-Protonen erkennbar sind. Allerdings bewirkt der zusätzliche, „trocknende“ Effekt des CaCl_2 , dass der Austausch weiter verlangsamt werden kann, so dass nun Spektren mit Unterdrückung des OH-Signals von MeOH_{d3} durch Vorsättigung möglich sind, ohne die OH-/NH-Protonen in ihrer Intensität wesentlich zu schwächen.

Eine eindeutige Zuordnung ist mittels COSY Spektrum trotz Signalverbreiterung immer noch möglich.

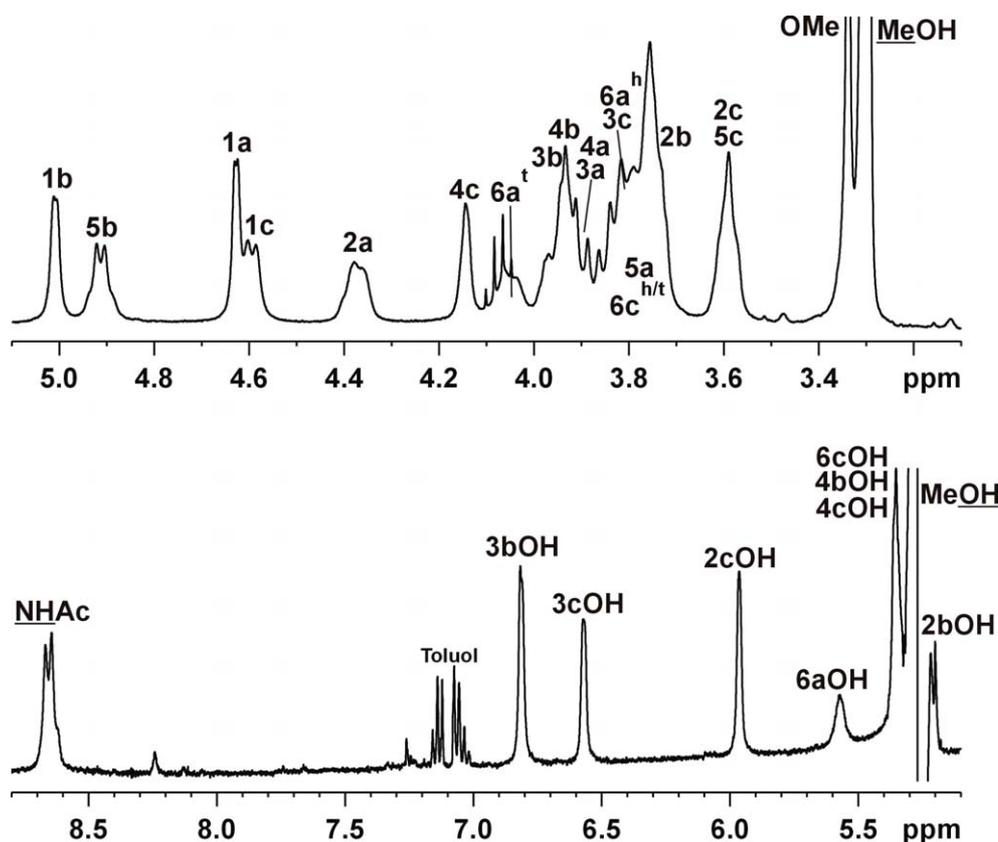


Abb. 12. ^1H Spektrum von **Le^X Mono** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung ($\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ 1:1, mit Vorsättigung, 400 MHz, 294 K).

Im NOESY Spektrum zeigt sich, bei einer Mischzeit von 200 ms, eine leichte Spindiffusion. Zudem sind alle Kreuzsignale positiv (negativer NOE). Dies tritt eigentlich nur bei grösseren Molekülen auf, so dass hier im Fall von **Le^X Mono**, wie schon für Saccharose in Kapitel I, von einer durch das CaCl_2 -bedingten (unspezifischen) Aggregation ausgegangen werden muss.

Im ROESY Spektrum (200 ms Mischzeit) ergibt sich keine Verfälschung der Kreuzsignalintensitäten durch Spindiffusion und die ermittelten Integrale der Kreuzsignale können in Abstände umgesetzt werden.

Es wurde wiederum $\text{H1a} - \text{H2a}$ ($\cong 2.4 \text{ \AA}$) als Referenzabstand gewählt. Die strukturrelevanten long-range (*stacking*) und die transglykosidischen Abstände unterscheiden sich für **Le^X Mono** ohne CaCl_2 bzw. bei CaCl_2 -Sättigung nur minimal.

Aus der Integration der ROESY Kreuzsignale erhaltene Abstände für **Le^X Mono**, die in der MD Simulation als Restraints gesetzt wurden:

Abstand bzw. Winkel	Wert [\AA] bzw. [$^\circ$]	Wert für Le^X Mono , ohne CaCl_2
H1b – H2a	Überlagert*	2.9
H1b – H3a	Überlagert*	2.35
H1c – H4a	2.4	2.4
H2c – H5b	2.5	2.3
H2c – H6b	2.8	2.6

Φ (Fuc)	40	40
Ψ (Fuc)	30	30
Φ (Gal)	47	47
Ψ (Gal)	17	17

Tab. 3. Gesetzte Restraints für **Le^X Mono** in CaCl₂-gesättigter, methanolischer Lösung. * nicht gesetzte Restraints, dienen nur zum Vergleich mit CaCl₂-freier Probe.

Die aus den zehn Snapshots gemittelte, energieminierte Struktur von **Le^X Mono** unterscheidet sich nur minimal von jener, wie sie für eine CaCl₂-freie Lösung berechnet wurde.

Die Zugabe von CaCl₂ hat praktisch keine strukturellen Auswirkungen auf das Monomere Lewis^X. Es besitzt, wie schon früher gezeigt worden war, eine starre Lösungskonformation.²¹

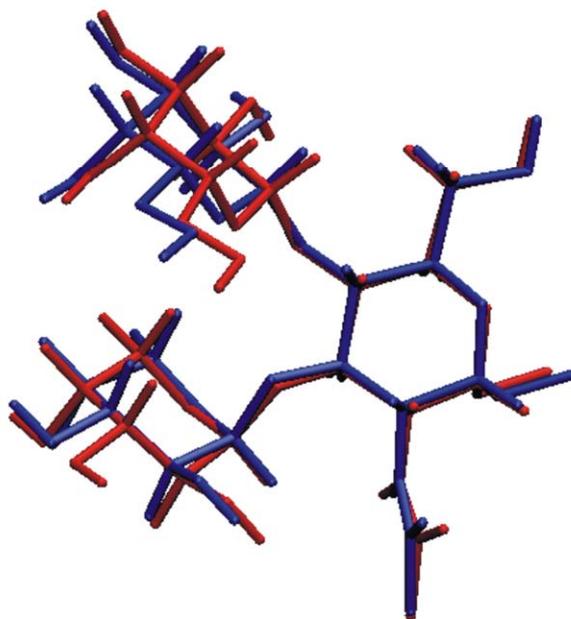


Abb. 13. **Le^X Mono** – berechnete Struktur ohne CaCl₂-Zusatz (blau) und bei CaCl₂-Sättigung (rot). Die Unterschiede in den beiden Strukturen sind minimal.

Abstand bzw. Winkel	Gesetzter Wert [Å] bzw. [°]	Wert aus MD Simulation [Å] bzw. [°]
H1c – H4a	2.4	2.4
H2c – H5b	2.5	2.5
H2c – H6b	2.8	2.95
Φ (Fuc)	40	42
Ψ (Fuc)	30	27
Φ (Gal)	47	51
Ψ (Gal)	17	14

Tab. 4. Vergleich der gesetzten Restraints mit den, aus der gerechneten Struktur erhaltenen, Abständen und Winkeln für **Le^X Mono** in CaCl₂-gesättigter Lösung.

Die zusätzlich im ROESY Spektrum zu beobachtenden OH-/CH- bzw. NH-/CH-ROEs können nur rein qualitativ bzw. halbquantitativ betrachtet werden, da nicht bekannt ist, wie gross der Anteil an OH im Vergleich zu OD ist. Eine Integration der ¹H Signale liefert zwar einen groben Anhaltspunkt, ist aber als Basis für eine 2D-Integration zu ungenau. Zumindest kann bei Vorhandensein eines NOE Kreuzsignals der Abstand zwischen den betreffenden Protonen mit kleiner 5 Å angesetzt werden.

Folgende OH-/CH- bzw. NH-/CH- ROEs können identifiziert werden:

ROE	ROE
6bH – 4bOH/4cOH	NH <u>Ac</u> - NH <u>Ac</u>
2bH – 2bOH	2bH – 4bOH/4cOH
3bH/4bH – 4bOH/4cOH	1bH - NH <u>Ac</u>
3bH/4bH – 3bOH	4cH – 3cOH
3cH/6cH – 3cOH	2cH/5cH – 3cOH
3cH/6cH – 2cOH	2cH/5cH – 2cOH

Tab. 5. Vorhandene OH-(NH-)/CH- ROEs, die allerdings nur rein qualitativ bzw. semiquantitativ betrachtet werden können.

3. Lewis^X Dimer

Zwei Lewis^X Trisaccharideinheiten wurden kovalent über eine Etherbrücke verknüpft.^{17a} Wie bereits erwähnt, können dimere Lewis^X Kopfgruppen spezifisch Ca²⁺ Ionen binden, wobei ihre Orientierung zueinander von entscheidender Bedeutung ist. Bei dem hier untersuchten Molekül handelt es sich um ein artifizielles Lewis^X Dimer, um die Wechselwirkungen zwischen diesen Kopfgruppen besser untersuchen zu können.

Die Brücke – eine CH₂-Gruppe – befindet sich zwischen den beiden OH-Gruppen an Position 6 des a-Ringes.

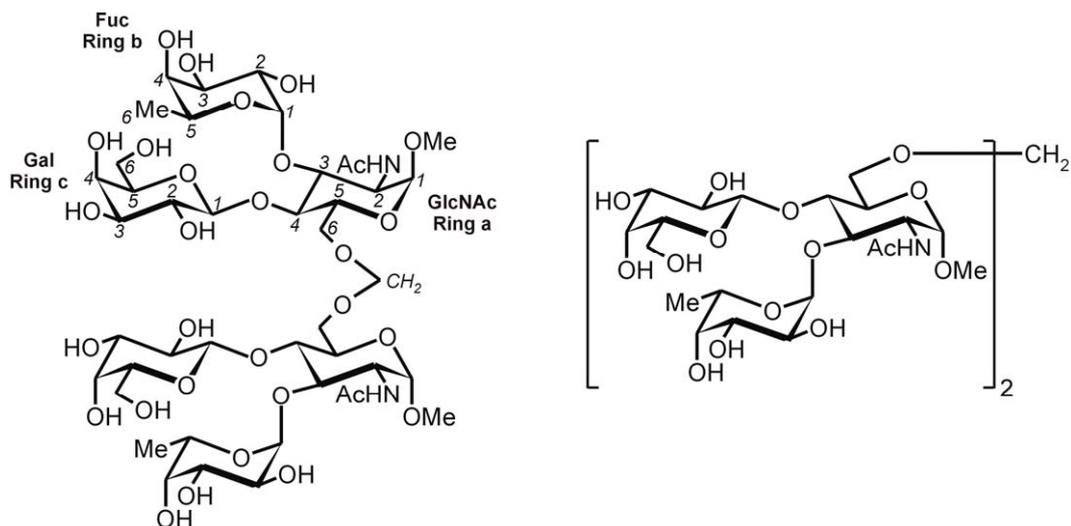


Abb. 14. Struktur für Le^{X} Dimer mit CH_2 -Brücke als Spacer.

Aufgrund der C_2 -Symmetrie des Moleküls sind beide „Hälften“ identisch und man erhält nur einen einfachen Signalsatz.

3.1 Le^{X} Dimer in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$ – Zusatz von wenig CaCl_2

Zuordnungen und CaCl_2 -Titrations für dieses Molekül in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ standen aus früheren Arbeiten zur Verfügung.^{17a, 20}

Da ohne CaCl_2 -Zusatz keine bevorzugte Orientierung der beiden Le^{X} Hälften zu erwarten ist – freie Beweglichkeit um die CH_2 -Gruppe – wurde die Struktur nur in Abhängigkeit von verschiedenen Mengen CaCl_2 untersucht.

Eine bereits vorhandene Probe mit 22 eq CaCl_2 wurde lyophilisiert, in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$ (1:1) aufgenommen und anschliessend über Aluminiumoxid getrocknet.

Die Zuordnung erfolgte durch Vergleich mit bereits bestehenden Zuordnungen in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ und mittels ROESY Spektren.

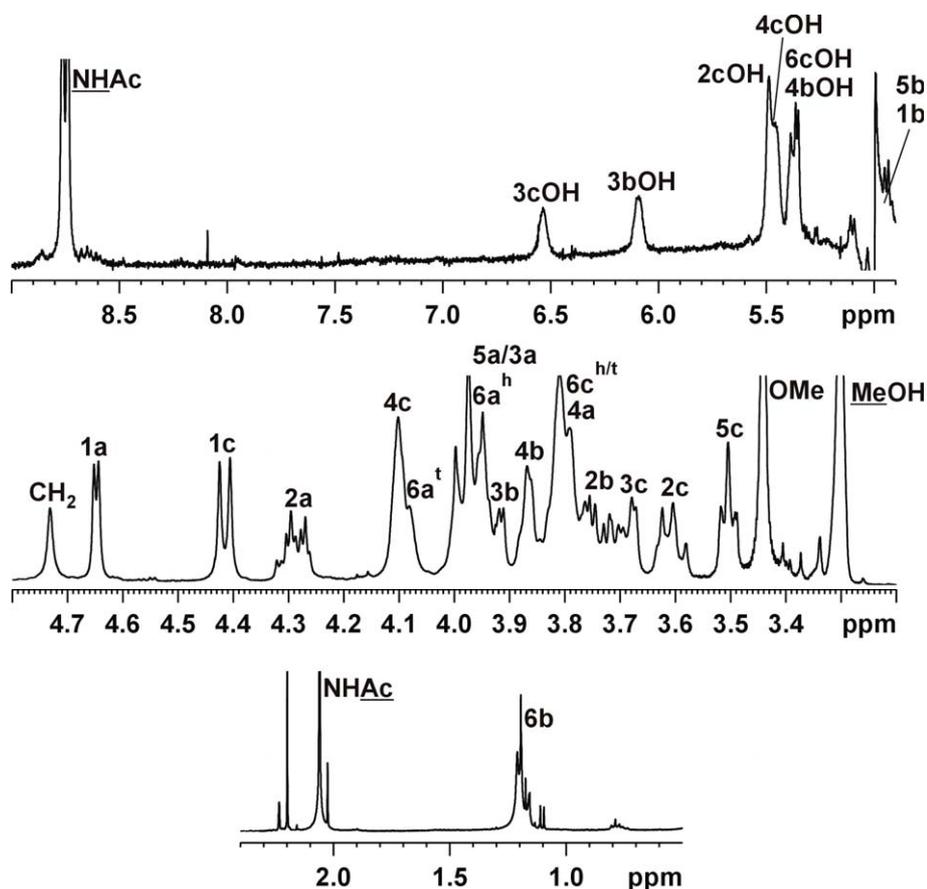


Abb. 15. ^1H Spektrum von Le^{X} Dimer in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$ (1:1) bei Zusatz von 22 eq CaCl_2 (mit Vorsättigung, 400 MHz, 294 K). Nicht zugeordnet werden konnte 2bOH.

Auch für diese Probe konnten die Kreuzsignale im ROESY Spektrum integriert und, auf einen Referenzabstand ($1\text{c} - 5\text{c} \equiv 2.3 \text{ \AA}$) geeicht, die entsprechenden Interprotonenabstände ermittelt werden.

Abstand bzw. Winkel	Wert [\AA] bzw. [$^\circ$]
ROEs zwischen beiden Le^{X} Einheiten	
H1a – H2c	3.2
H2a – H2c	2.7
H1a – H6b	3.1
<i>Stacking</i> ROE innerhalb jeder Le^{X} Einheit	
H2c – H6b	2.8
Φ (Fuc)	40
Ψ (Fuc)	30
Φ (Gal)	47
Ψ (Gal)	17
Die Winkel sind ebenfalls für beide Le^{X} Einheiten gesetzt	

Tab. 6. Aus dem ROESY Spektrum ermittelte Abstände zwischen beiden Lewis^X Einheiten und innerhalb jeder Le^{X} Einheit. Die hier gezeigten Abstände wurden in der MD Simulation als experimentelle Restraints gesetzt.

Die erhaltenen ROEs zwischen den Lewis^X Einheiten lassen nur eine Möglichkeit ihrer Orientierung zueinander zu.

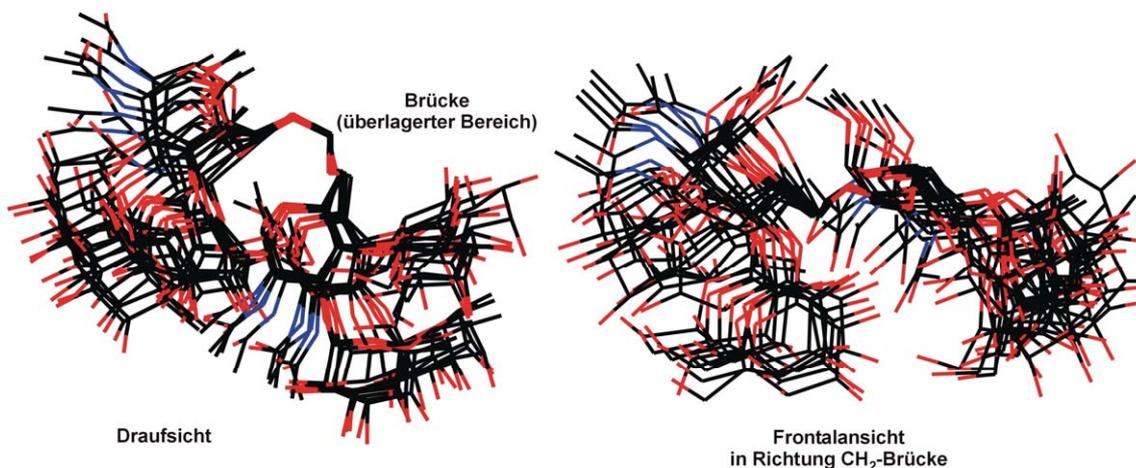


Abb. 16. Übereinanderlagerung aller zehn, im Rahmen der MD Simulation gemachten, Snapshots von Le^X Dimer. Die Atome der Brückeneinheit wurden überlagert, um die Bewegung der beiden Lewis^X Hälften besser darstellen zu können.

Die Struktur ist relativ gut definiert und die Bewegung der Lewis^X Einheiten nicht allzu stark. Die gesetzten Restraints werden in der gemittelten, energieminierten Struktur gut erreicht:

Abstand bzw. Winkel	Gesetzter Wert [Å] bzw. [°]	Wert aus MD Simulation [Å] bzw. [°]
H1a – H2c	3.2	3.2
H2a – H2c	2.7	2.7
H1a – H6b	3.1	3.1
H2c – H6b	2.8	2.9 / 3.0
Φ (Fuc)	40	41 / 42
Ψ (Fuc)	30	27 / 27
Φ (Gal)	47	52 / 48
Ψ (Gal)	17	14 / 13

Tab. 7. Vergleich gesetzter Abstände und Winkel mit jenen aus der gerechneten, gemittelten Struktur nach Energieminimierung.

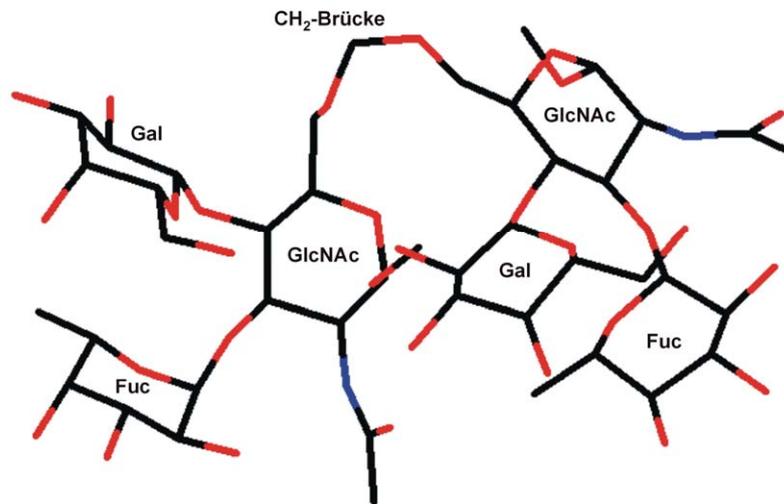


Abb. 17. Aus den 10 Snapshots gemittelte, energieminierte Struktur von **Le^X Dimer**. Deutlich zu erkennen ist die Stapelung (*Stacking*) der Galactose- und Fucoseeinheit innerhalb jeder **Le^X** Hälfte.

Aus dieser Struktur ergibt sich nur eine, mögliche Bindungsstelle für Ca^{2+} , an der beide **Le^X** Einheiten beteiligt sind. Durch die Hydroxygruppen, aber auch Carbonyl- bzw. Ethersauerstoffe wird eine hydrophile Kontakt“höhle“ gebildet, welche die Bindung von Ca^{2+} Ionen erlaubt.

Da, wie bereits mehrfach gezeigt,^{18, 20} ein Lewis^X Dimer eine sehr viel grössere Affinität zu Ca^{2+} Ionen besitzt als Lewis^X Monomere, müssen an der Ionenbindung beide **Le^X** Kopfgruppen des Dimers beteiligt sein.

An der hier postulierten Ca^{2+} Bindungsstelle sind folgende Gruppen beteiligt:

- „obere“ **Le^X** Einheit: **2bOH**, **6cOH** und **Carbonyl (NHAc)** (evtl. auch **O1b**)
- „untere“ **Le^X** Einheit: **2cOH** und **3cOH**

Die Definitionen „oben“ und „unten“ sind willkürlich gewählt und dienen nur der Unterscheidung der beiden **Le^X** Einheiten.

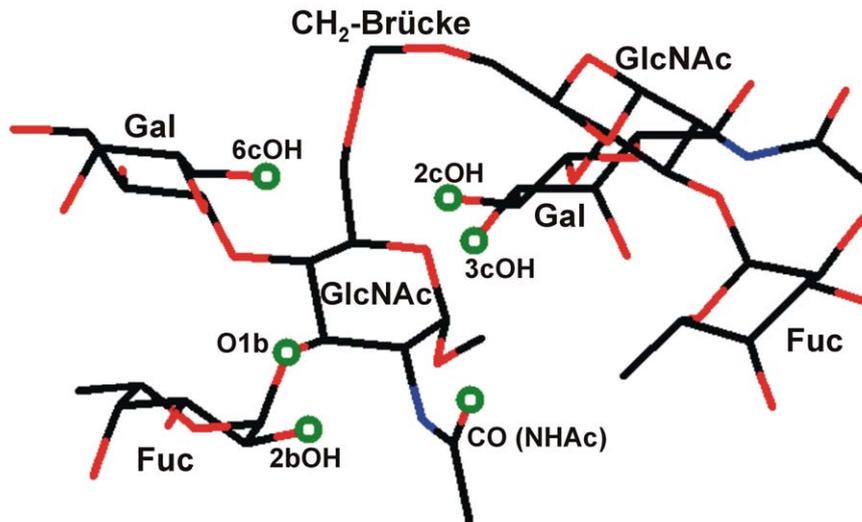


Abb. 18. Le^X Dimer mit für den, die Bildung der hydrophilen Höhle postulierten, Gruppen in grün.

Fügt man nun der in Abb. 17 gezeigten Struktur ein Ca²⁺ Ion zu und definiert zu jenen fünf Gruppen (grün in Abb. 18, ohne O1b) einen Abstand von 2.5 Å, so zeigt sich nach einer 10x10 ps MD Simulation (300 K) mit anschließender Energieminimierung, dass das Ca²⁺ Ion sehr gut in jene, zuvor definierte, hydrophile Höhle passt. Die zusätzlichen Ca²⁺ Bindungsstellen (oktaedrische Koordinationssphäre) können trotzdem mit Wassermolekülen abgesättigt werden.²²

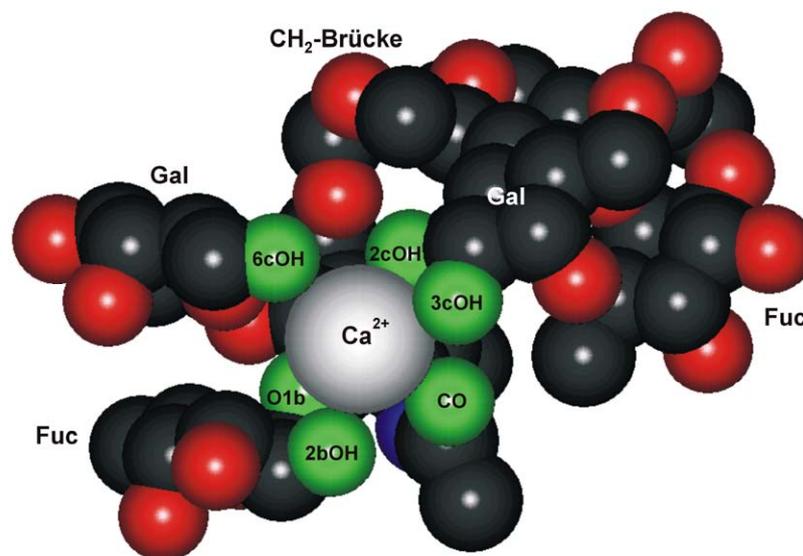


Abb. 19. Le^X Dimer + Calciumion. Zusätzliche Restraints zwischen den Hydroxygruppen bzw. der Carbonylgruppe der NHAc Einheit und dem Ca²⁺ Ion wurden gesetzt. Hier dargestellt ist die energie-minimierte Struktur nach 10x10 ps MD Simulation.

Die gesetzten Restraints wurden im Rahmen der MD Simulation wie folgt gefittet:

Abstand bzw. Winkel	Gesetzter Wert [Å] bzw. [°]	Wert aus MD Simulation [Å] bzw. [°]
H1a – H2c	3.2	3.3
H2a – H2c	2.7	2.7
H1a – H6b	3.1	3.0
H2c – H6b	2.8	2.9 / 3.0
Φ (Fuc)	40	41 / 40
Ψ (Fuc)	30	26 / 26
Φ (Gal)	47	51 / 49
Ψ (Gal)	17	12 / 13
2bOH – Ca	2.5	2.7
6cOH – Ca	2.5	2.7
CO – Ca	2.5	2.7
2cOH – Ca	2.5	2.65
3cOH – Ca	2.5	2.7

Tab. 8. Vergleich gesetzter Abstände und Winkel mit jenen aus der gerechneten, gemittelten Struktur nach Energieminimierung.

Auch mit den zusätzlichen, die postulierte Ca^{2+} Bindungsstelle definierenden, Restraints wird die Gesamtstruktur nicht gestört und die experimentell ermittelten ROEs nicht verletzt.

Da dieses Bild in sich schlüssig ist, stellt sich die Frage, ob sich in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$ im Verlauf einer CaCl_2 -Titration für jene OH-Gruppen, für die die Ca^{2+} Bindung postuliert wird, Unterschiede in ihrem Verhalten im Vergleich zu den übrigen Hydroxygruppen ergeben.

3.2 CaCl_2 -Titration von Le^{X} Dimer

Die durchgeführten Titrations in reinem $\text{MeOH}_{\text{d}3}^*$ ergaben, dass sich die chemische Verschiebung der Hydroxygruppen in Abhängigkeit von der CaCl_2 Konzentration sehr unterschiedlich ändert.

Folgende Tabelle gibt die Änderung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit von der CaCl_2 Konzentration wieder:

* Diese Ergebnisse wurden im Rahmen der Habilitation von Prof. Dr. Armin Geyer, Universität Konstanz, erbracht.

eq CaCl ₂	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]								
	NH	2cOH	6cOH	3cOH	4bOH	3bOH	4cOH	2bOH	H1a
0.26	29.3	-15.9	5.0	72.5	17	19.1	57.0	60.5	8.5
0.52	58.1	-30.3	10.3	138.0	33.4	38.2	102.2	118.9	16.1
0.77	79.2	-42.3	12.1	191.5	44.0	51.1		161.7	22.0
1.29	102.1	-57.3	12.1	246.7	54.0	65.1		208.7	28.8
1.8	116.8	-73.2	9.2	281.9	57.5	74.1		238.7	33.5
2.31	133.8	-78.2	7.2	318.9	64.5	88.1		276.2	37.9
3.21	152.3	-85.2	5.2	366.9	72.5	102.1		317.2	42.6
3.86	167.3	-94.0	-0.1	401.9	76.3	117.4			47.0
5.14	186.7	-101.5	-3.6	446.9	85.4	143.4			51.7
7.71	209.3		-14.1	502.9	92.4	185.4			57.3
12.86	234.0		-29.1	579.9	102.7	268.4			62.3
23.14	254.3		-47.3	664.9	118.8	408.4			65.2
38.57	267.8		-71.7	746.9	140.8	603.4			66.4
51.43	269.8			785.9		725.4			66.4

Tab. 9. Gesamtänderung der chemischen Verschiebungen für OH-Protonen von **Le^x Dimer**. Zusätzlich zum Vergleich sind die Werte für NH und H1a aufgelistet.

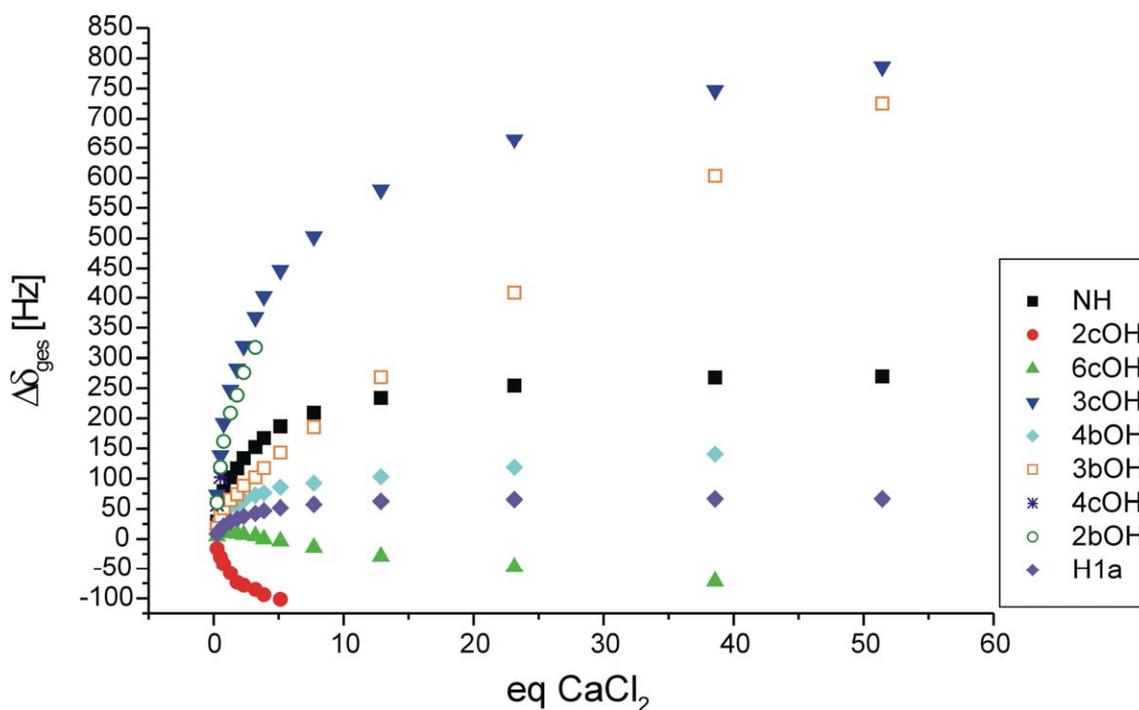


Abb. 20. Auftragung der Gesamtänderung der chemischen Verschiebung gegen die zugegebene Menge an CaCl₂.

- stärkster Einfluss auf: **3cOH**, **2bOH** (nur teilweise zu beobachten, da von MeOH Signal überlagert) und **3bOH**
- mittelstarker Einfluss auf: **NH**, **2cOH** und **6cOH**
- geringer Einfluss auf: **4bOH** und **H1a**

Für 4cOH stehen nur wenige Daten zur Verfügung, da es vom MeOH Signal überlagert wird.

Alle, an den hydrophilen Kontakten zu Ca^{2+} beteiligten, Hydroxygruppen zeigen eine starke bzw. mittelstarke Abhängigkeit von der Ca^{2+} Menge.

Dies stützt die postulierte hydrophile Höhle wie in Abb. 19 dargestellt.

3bOH, welches nicht an der Ca^{2+} Bindung beteiligt sein sollte, zeigt ebenfalls eine starke Abhängigkeit, welche jedoch nicht eindeutig ist. Einem relativ flachen Anstieg zu Beginn (ähnlich wie für NH) folgt kein anschließender Übergang in den Sättigungsbereich, sondern ein starker Anstieg ohne erkennbaren Endpunkt.

Die Auswertung der Daten mittels Scatchardplot ergibt folgende Bindungsaffinitäten:

- ~ 50 – 80 L/mol (aus 3cOH Daten)
- ~ 85 – 110 L/mol (aus H1a Daten).

Dies ist in Einklang mit früheren Titrationsergebnissen ($K_a = 55 \text{ L/mol}$)²⁰, bei denen lediglich die CH-Protonen untersucht wurden (Messungen in MeOH_{d4}).

3.3 Le^X Dimer in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung

Die Sättigung der Lösung erfolgte wie in Kapitel I beschrieben, so dass das überschüssige CaCl_2 auskristallisierte.

Die Zuordnung wurde mit COSY-, TOCSY- und NOESY-Spektren durchgeführt.

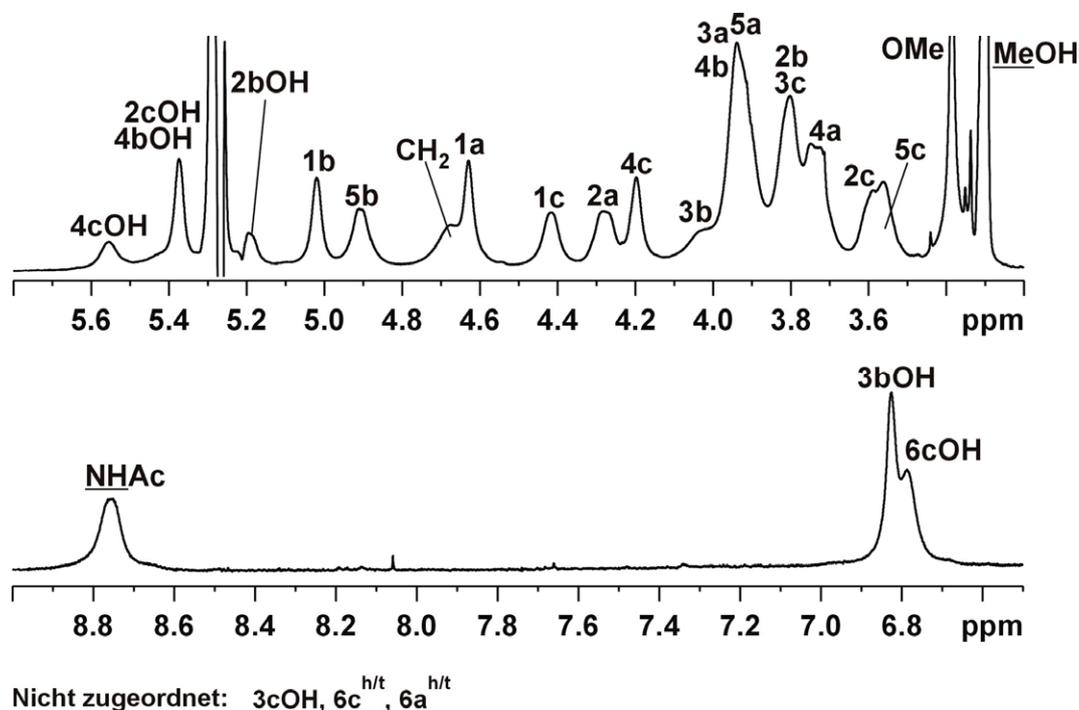


Abb. 21. ^1H Spektrum von Le^X Dimer in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ (1:1) bei Sättigung mit CaCl_2 (mit Vorsättigung, 400 MHz, 294 K).

Alle Signale sind stark verbreitert; bei dieser Probe führte der zusätzliche, trocknende Effekt des CaCl_2 zu keiner Verbesserung der Signalstruktur (Halbwertsbreite!).

Die anschliessende Temperaturreihe (285 – 310 K) ergab für identifizierbare OH-Gruppen folgende Abhängigkeit ihrer chemischen Verschiebungen von der Temperatur:

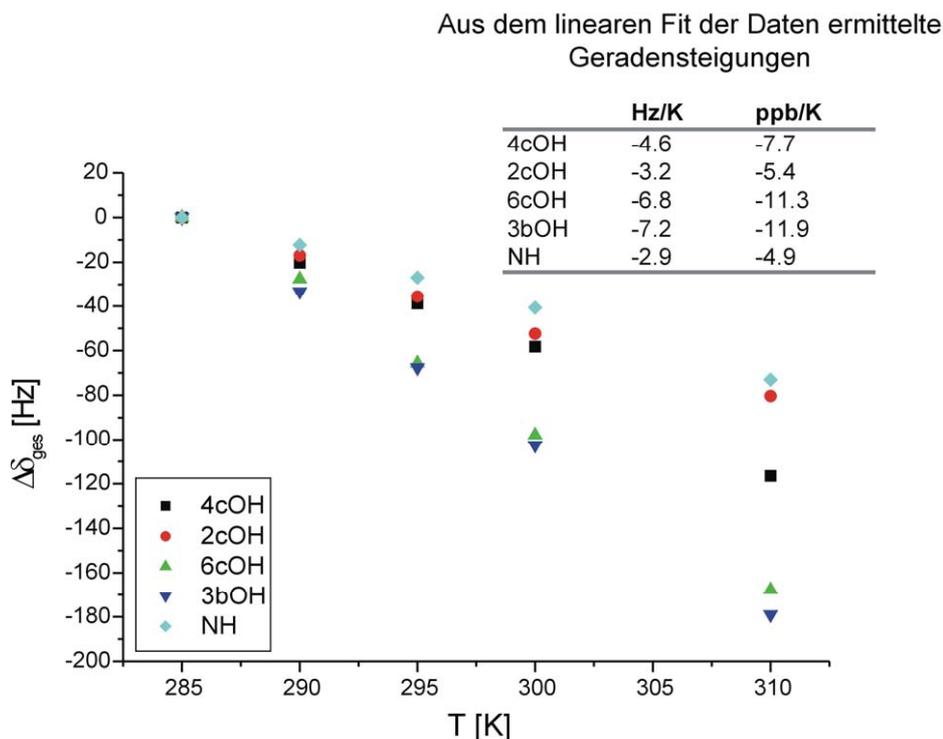


Abb. 22. Ermittlung der Temperaturkoeffizienten der OH-Protonen bzw. des NH-Protons für **Le^X Dimer** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung.

Vergleicht man die so erhaltenen Temperaturkoeffizienten κ mit jenen für Saccharose in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung (siehe Kapitel I, 3.2), so zeigt sich, dass die Dispersion für **Le^X Dimer** grösser ist (κ : -4.9 bis -11.9 ppb/K), als für Saccharose (κ : -4.3 bis -8.2 ppb/K). Hierbei fallen für **Le^X Dimer** die Werte für 3bOH und 6cOH aus dem Bereich für κ von Saccharose heraus.

Da aufgrund der starken Signalverbreiterung für **Le^X Dimer** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung keine zusätzlichen Informationen, wie z. B. der Isotopeneffekt, gewonnen werden können, um evtl. vorliegende H-Brücken zu verifizieren, ist es schwierig für H-Brücken zwischen OH-Gruppen bei sehr hoher Salzkonzentration eindeutige Aussagen zu treffen.

Somit können H-Brücken für **Le^X Dimer** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Die Ermittlung der Struktur von **Le^X Dimer** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung erwies sich als unmöglich, da für dieses System eine sehr starke Spindiffusion auftrat, die auch bei Mischzeiten von 50 ms keine Auswertung und Integration von

NOESY Spektren erlaubt. Zudem besitzen, wie schon bei **Le^X Mono** zu beobachten, alle Kreuzsignale positives Vorzeichen (negativer NOE), ein Effekt, der normalerweise nur bei grossen Molekülen zu beobachten ist.

Dies ist zumindest damit in Einklang zu bringen, dass, wie in der Literatur beschrieben,^{8, 9} Ca^{2+} Ionen zur Clusterbildung von Lewis^X gruppentragenden Glycolipiden oder -peptiden in der Membran führen.

Auch für den hier vorliegenden Fall kann von einer starken Aggregation ausgegangen werden, die jene des monomeren Lewis^X bei weitem übertrifft.

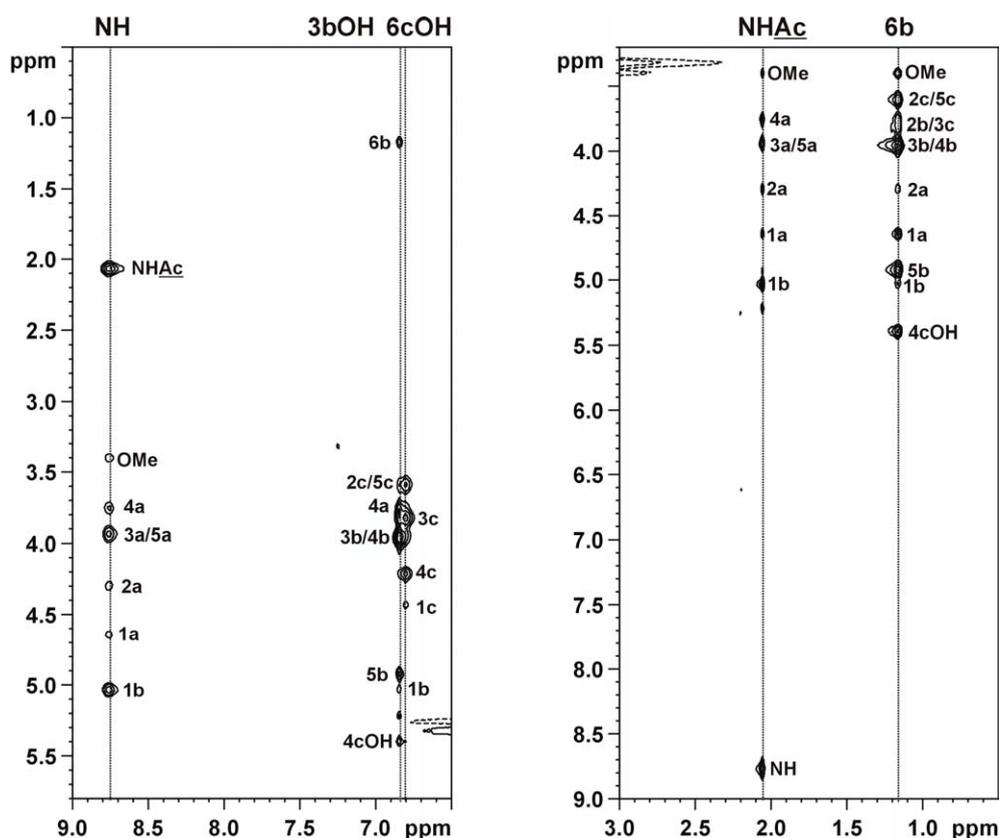


Abb. 23. NOESY Ausschnitte von **Le^X Dimer** in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ (1:1) bei Sättigung mit CaCl_2 und 50 ms Mischzeit. Es sind beispielhaft der Bereich der OH-/NH-Protonen (links) und der Bereich der Methylgruppen (rechts) gezeigt (mit Vorsättigung, 400 MHz, 294 K).

Die, für biologische Systeme so wichtige, Aggregation von Lewis-tragenden Membranbausteinen in Form von Clustern macht die hier erhaltenen Ergebnisse in CaCl_2 -gesättigter Lösung plausibel.

4. Ein Hexapeptid mit zwei Lewis^X Einheiten

Aus der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kunz (Universität Mainz) stammt ein Glycopeptid bestehend aus sechs Aminosäuren und zwei Lewis^X Trisacchariden, die jeweils über die Seitenkette eines Asparagins über eine Amidbindung mit dem Hexapeptid verknüpft sind.^{19, 23} Beide Lewis^X Einheiten besitzen in Position 1 des α -Ringes β -Konfi-

guration, wohingegen die bis dato untersuchten Systeme allesamt α -konfiguriert waren. Im Fall des Le^{X} Glycopeptids handelt es sich nicht mehr um eine C2-symmetrische Struktur, so dass die beiden Lewis^X Einheiten nicht mehr äquivalent sind.

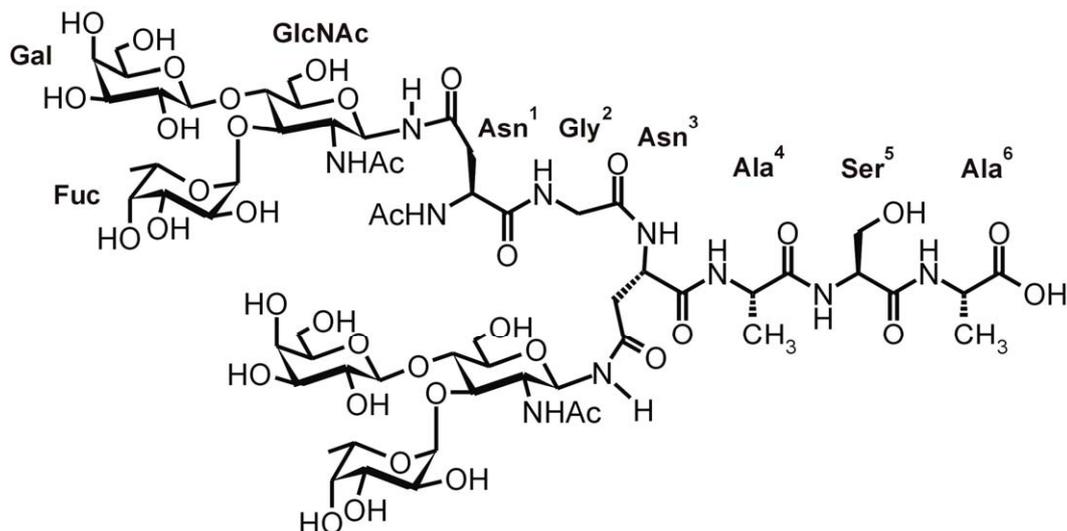


Abb. 24. Struktur des untersuchten Glycopeptids mit Kennzeichnung der enthaltenen Aminosäuren. Die Numerierung für die Zuckereinheiten entspricht jener für Le^{X} Dimer.

Da sich diese Substanz (Le^{X} Glypep) nur unter Zugabe von CaCl_2 in Methanol löst, konnte weder eine Titration mit CaCl_2 , noch eine Strukturanalyse in reinem MeOH durchgeführt werden.

4.1 Le^{X} Glypep in $\text{MeOH}_{\text{d}4} + 30 \text{ eq CaCl}_2$

Die komplette Zuordnung aller Signale erfolgte mit Hilfe von 2D DQFCOSY, HMQC, NOESY und ROESY Spektren.

Trotz fehlender C2-Symmetrie ergibt sich nur ein Signalsatz für beide Lewis^X Einheiten, wobei dieser jedoch stark verbreitert ist.

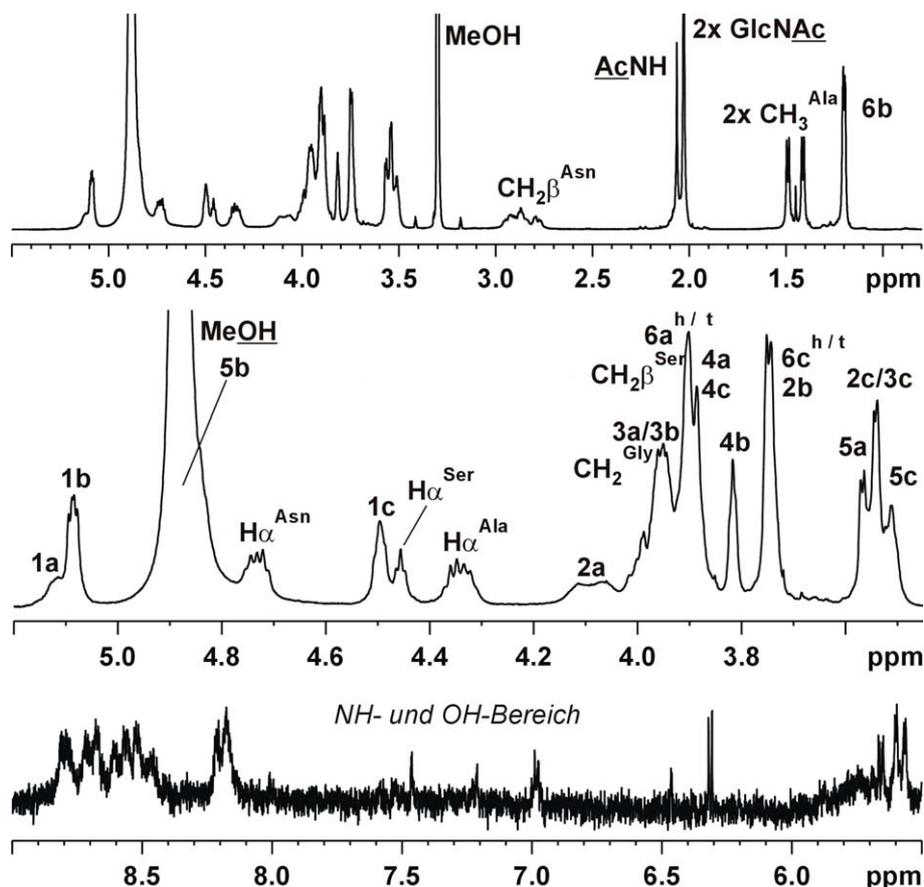


Abb. 25. ^1H Ausschnitte von Le^{X} Glypep in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ (30 eq CaCl_2 , 600 MHz, 300K).

Aus dem ROESY Spektrum konnten folgende charakteristischen ROEs ermittelt werden:

- intraglykosidische ROEs: wie z. B. 1a – 3a, 1b – 2b, 4b – 5b, 5b – 6b
- transglykosidische ROEs: 1b – 3a
- long-range ROEs: 2c – 6b, 2c – 5b (*Stacking* ROEs), 1a/1b – 2c/3c

Integration der ROE Kreuzsignale bei Referenzierung auf 3b – 5b ($\approx 2.55 \text{ \AA}$) lieferte für strukturell interessante ROEs folgende Abstände:

Abstand bzw. Winkel	Wert [\AA] bzw. [$^\circ$]
Transglykosidische ROEs	
H1c – H4a	2.2
<i>Stacking</i> ROEs innerhalb jeder Le^{X} Einheit	
H2c – H6b	3.2
H2c – H5b	2.8

Tab. 10. Für Le^{X} Glypep ermittelte Protonenabstände aus ROESY Daten.

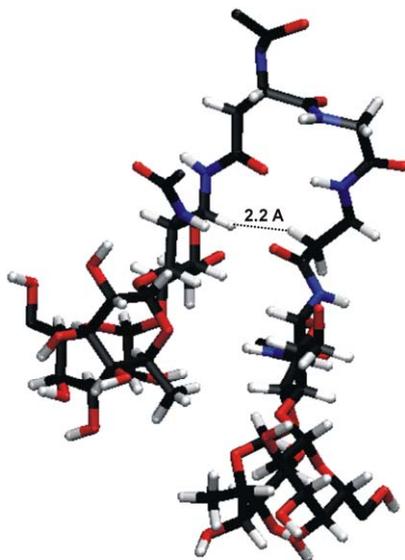
Die für Le^{X} Dimer so charakteristischen ROEs zwischen den beiden Le^{X} Einheiten – 1a – 2c, 1a – 6b, 2a – 2c – sind für Le^{X} Glypep entweder extrem schwach (1a – 2c,

1a – 6b) oder gar nicht vorhanden (2a – 2c). Für die beiden, das anomere Proton von Ring a betreffenden, ROEs ist zu berücksichtigen, dass es sich im Falle des Glycopeptids um die β -konfigurierte Form handelt, wohingegen die bisher untersuchten Lewis^X Systeme α -Konfiguration in Position 1 des a-Ringes aufwiesen.

Daher können diese ROEs nicht als direkter Vergleich herangezogen werden.

Es können keine ROEs ermittelt werden, die den Schluss zulassen, dass auch im Falle des **Le^X Glypep** (in MeOH, mit wenig CaCl₂) die beiden Lewis^X Einheiten unter Calciuminduktion miteinander wechselwirken bzw. sich so nahe kommen, dass entsprechende ROE Kreuzsignale detektiert werden könnten.

Lediglich das schon beschriebene *Stacking* innerhalb jeder Lewis^X Einheit ist vorhanden.



Setzt man nur die Φ/Ψ Winkel aller O-glykosidischen Bindungen als Restriktionen, so erhält man im Rahmen einer 10x10 ps MD Simulation eine Struktur, bei der die Aminosäuren Asn¹, Gly² und Asn³ eine turnartige Struktur ausbilden. In dieser besitzen die Protonen 1a (Le^X Einheit an Asn¹) und proS-CH₂^β (Asn³) einen Abstand von 2.2 Å zueinander. Dies kann jedoch nicht der Realität entsprechen, da zwischen diesen beiden Protonen kein Kreuzsignal im ROESY zu beobachten ist. D. h. für weitere Rechnungen sollte dieser Abstand auf ≥ 5 Å gesetzt werden, damit sich die, bei Rechnung im Vakuum begünstigte, real aber wohl nicht vorliegende Turnstruktur, nicht ausbilden kann.

Abb. 26. Turnstruktur in **Le^X Glypep**.

Für die Ausbildung eines sog. ASX-Turns (Asn-Xaa-Ser/Thr),²⁴ der für die Glycosylierung von Asn Seitenketten entscheidend ist, liegt in diesem Fall zwischen den beiden Lewis Einheiten eine abweichende Aminosäuresequenz vor. Die zum C-Terminus hin vorliegende Sequenz Asn-Ala-Ser erfüllt die Sequenzbedingung zur Ausbildung eines ASX-Turns, dessen Vorliegen jedoch für die Orientierung der beiden Lewis^X Einheiten irrelevant ist.

Die Berechnung der Struktur erfolgte mit folgenden Restraints:

Abstand bzw. Winkel	Wert [Å] bzw. [°]
<i>Stacking</i> ROEs innerhalb jeder Le ^X Einheit	
H2c – H6b	3.2
H2c – H5b	2.8
Verhindern der Turnbildung	
H1a – CH ₂ ^β (Asn ³)	5
Φ (Fuc)	40
Ψ (Fuc)	30
Φ (Gal)	47
Ψ (Gal)	17
Die Winkel sind ebenfalls für beide Le ^X Einheiten gesetzt	

Tab. 11. In der MD Simulation Le^X Glypep gesetzte Restraints.

Führt zu einer wenig definierten Struktur mit hoher Beweglichkeit der beiden Lewis^X Hälften.

Aus dieser starken Dynamik lässt sich auch das Fehlen von detektierbaren ROE Signalen zwischen Protonen beider Lewis^X Einheiten erklären.

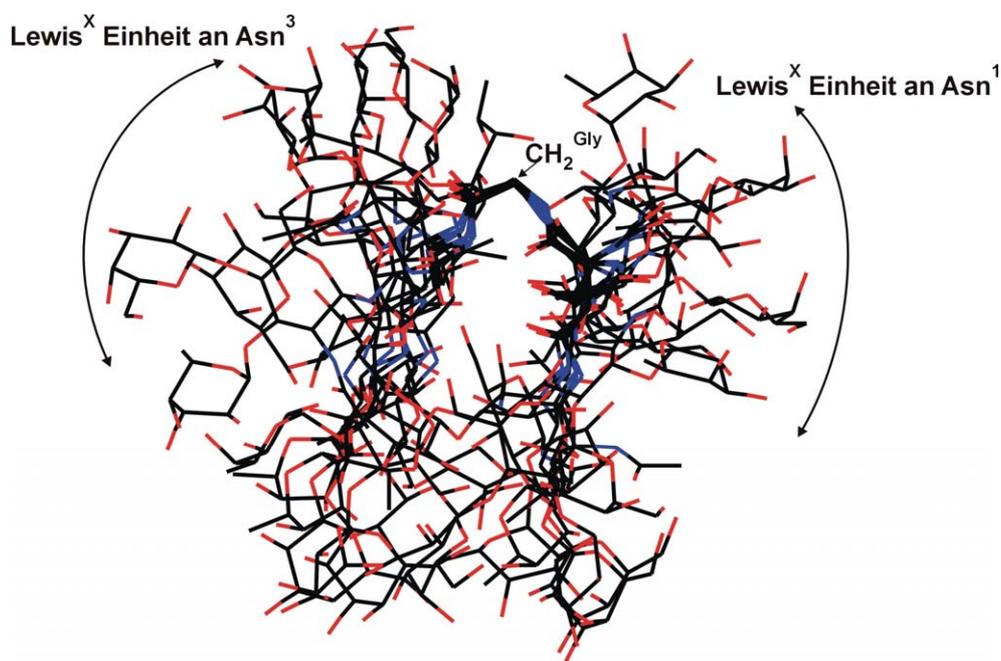


Abb. 27. Überlagerung aller zehn Snapshots aus der MD Simulation. Die Orientierung der Lewis^X Einheiten zeigt keinerlei Vorzugsrichtung.

Somit kann eine Interaktion zwischen beiden Lewis^X Hälften, vermittelt durch Ca²⁺ Bindung, für dieses System nicht bewiesen werden.

Um genauere Aussagen treffen zu können, und vor allem, um eine Titration mit CaCl_2 durchführen zu können, muss zu einem anderen Lösungsmittel übergegangen werden.

Die Wahl fiel auf D_2O (bzw. $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 90:10), wobei zu berücksichtigen ist, dass die Bindungsaffinität zwischen Ca^{2+} und Lewis Kopfgruppen in Wasser deutlich geringer ist als in MeOH .²⁰

4.2 Le^X Glypep in D_2O – ohne CaCl_2 -Zusatz

Um eventuelle Unterschiede in der Struktur in Abhängigkeit von vorhandenen Ca^{2+} Ionen aufzeigen zu können, wurde zuerst eine Analyse der Struktur in D_2O ohne CaCl_2 Zusatz durchgeführt.

Die Zuordnung erfolgte über 2D DQFCOSY und ROESY Spektren.

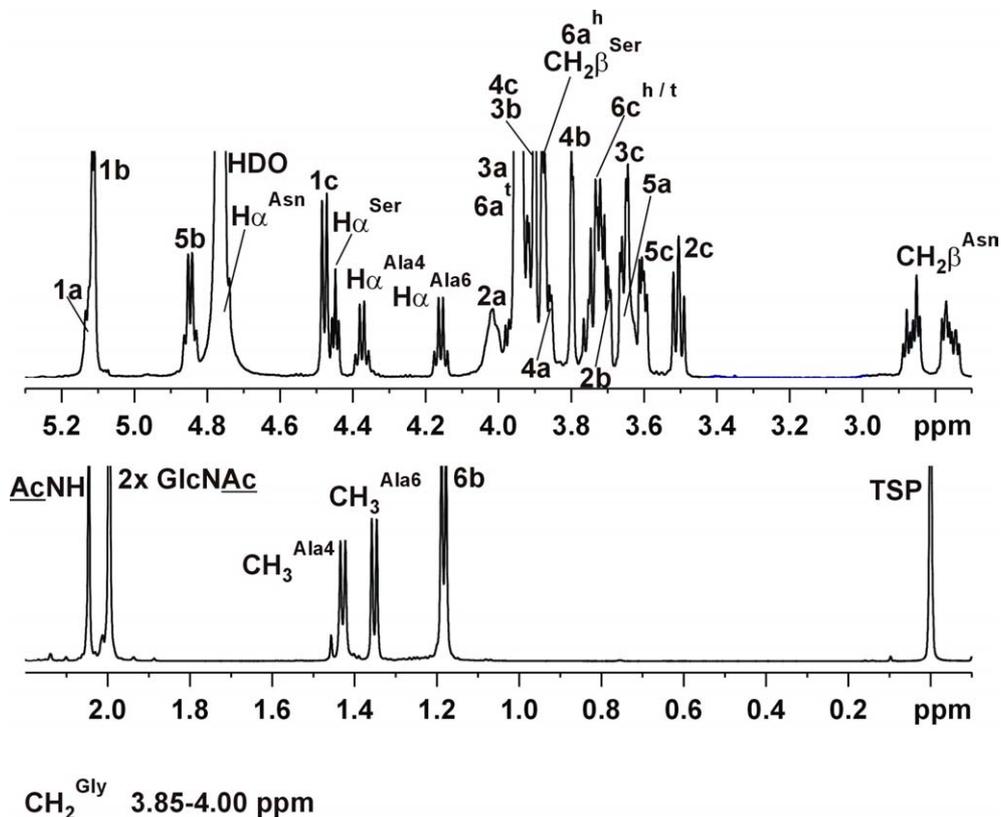


Abb. 28. ^1H Spektrum von Le^X Glypep in D_2O (ohne CaCl_2 , 600 MHz, 300 K).

In Methanol waren die Protonen der beiden enthaltenen Alanine nicht voneinander zu unterscheiden, in D_2O hingegen zeigen sie separierte Signale.

Die Integration der ROE Kreuzsignale (Referenz: $3b - 5b \equiv 2.55 \text{ \AA}$) ergab folgende Protonenabstände:

- intraglykosidische ROEs: wie z. B. 1a – 2a, 1b – 2b, 3b – 5b, 1c – 5c
- transglykosidische ROEs: 1b – 3a und 1c – 4a
- long-range ROEs: 3a – 5b, 1c – 6a^t, 2c – 5b und 2c – 6b (*Stacking* ROEs)

Bei der Untersuchung von **Le^X Glypep** in D₂O, ohne CaCl₂-Zusatz, konnten keine ROEs zwischen Protonen der beiden Lewis^X Einheiten identifiziert werden. Zudem gab es keinerlei ROE Signale zwischen Protonen des Peptid“rückgrats“, welche eine definierte Struktur (z. B. wie den zuvor beschriebenen Turn) belegen würden. Somit kann auch in Wasser (ohne CaCl₂) von einer hohen Flexibilität des Systems, ohne Vorzugsorientierung der Lewis^X Hälften zueinander, ausgegangen werden.

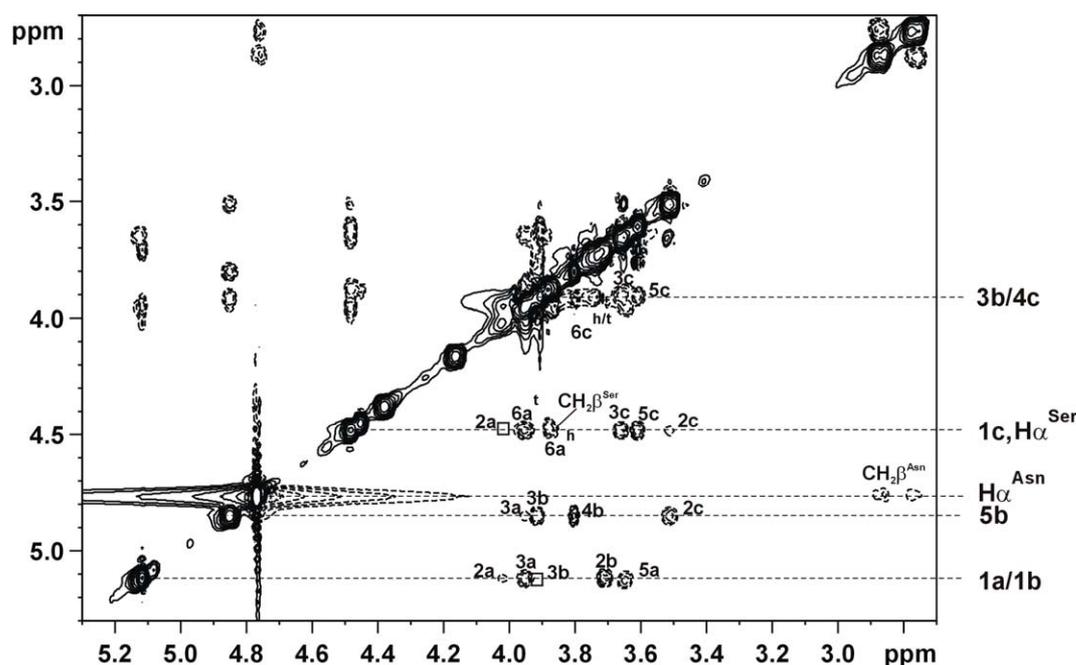


Abb. 29. Ausschnitt aus dem ROESY Spektrum von **Le^X Glypep** in D₂O (ohne CaCl₂, 600 MHz, 300 K). Schwarze Kästchen markieren ROE Signale, die vorhanden, aber in der gewählten Darstellung zu schwach waren, um sichtbar zu sein.

Bei der MD Simulation ergibt sich für die Struktur ein ähnliches Bild wie in Abb. 27 gezeigt, da auch im hier vorliegenden Fall nur die Φ/Ψ Winkel der O-glykosidischen Bindungen und die *Stacking* Abstände (2c – 5b, 2c – 6b) innerhalb jeder Lewis^X Einheit als Restraints gesetzt werden können.

4.3 CaCl₂-Titration von **Le^X Glypep** in D₂O

Da, wie bereits erwähnt, die Bindung von Ca²⁺ durch dimere Lewis^X Einheiten in Wasser relativ schwach ist (z. B. für **Le^X Dimer** 5-10 L/mol)²⁰, und zudem nur CH-Protonen, für die der Effekt sehr viel geringer ist als für OH- oder NH-Protonen, verfolgt werden können, ist insgesamt die Änderung der chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit von der Calciumkonzentration eher gering. Zudem führt eine extrem schwache Bindung dazu, dass der Steady State Bereich der Titration erst bei sehr

hoher Zugabe erreicht wird, wenn nicht ein stetiger, schwacher Shift, nur bedingt durch die Änderung der Lösungsmitelegenschaften, vorliegt.

So zeigten sich im ^1H Spektrum bei einer Titration bis zu ca. 160 eq CaCl_2 nur geringfügige Änderungen, eine weitere Erhöhung der Calciummenge bis auf ca. 432 eq hatte ebenfalls keinen entscheidenden Einfluss.

Einzig bemerkenswert ist das Signal für 1a, das anomere Proton an Ring a, welches bei ≥ 80 eq CaCl_2 keine Dublettstruktur zeigt, sondern vielmehr eine Pseudotriplett- bzw. Doppeldublettstruktur (dd), was darauf hindeutet, dass die beiden Lewis^X Hälften nicht äquivalent sind. Alle übrigen Signale zeigen keine „Signalverdoppelung“. Da für niedrigere CaCl_2 Konzentrationen das Signal von 1a überlagert ist, kann nicht untersucht werden, ob die Pseudotriplettstruktur unabhängig von der CaCl_2 Menge ist. Obwohl **Le^X Glypep** nicht C2 symmetrisch ist, weisen alle übrigen Protonensignale nur einen einfachen Signalsatz auf. Dies könnte durch die erhöhte Flexibilität des Systems erklärt werden.

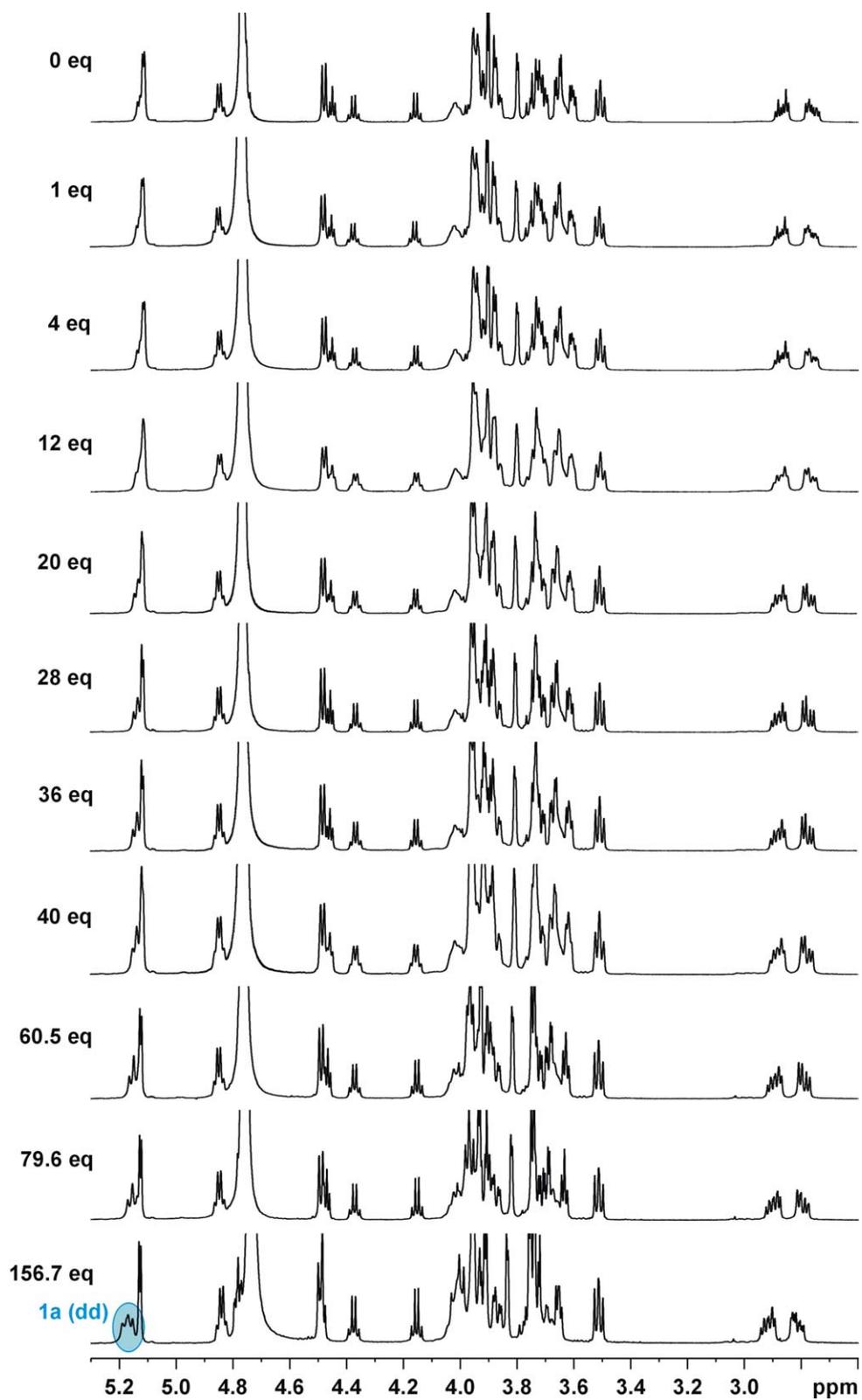


Abb. 30. ^1H Alkylbereich von Le^X Glypep in D_2O – Titration mit CaCl_2 (600 MHz, 300 K).

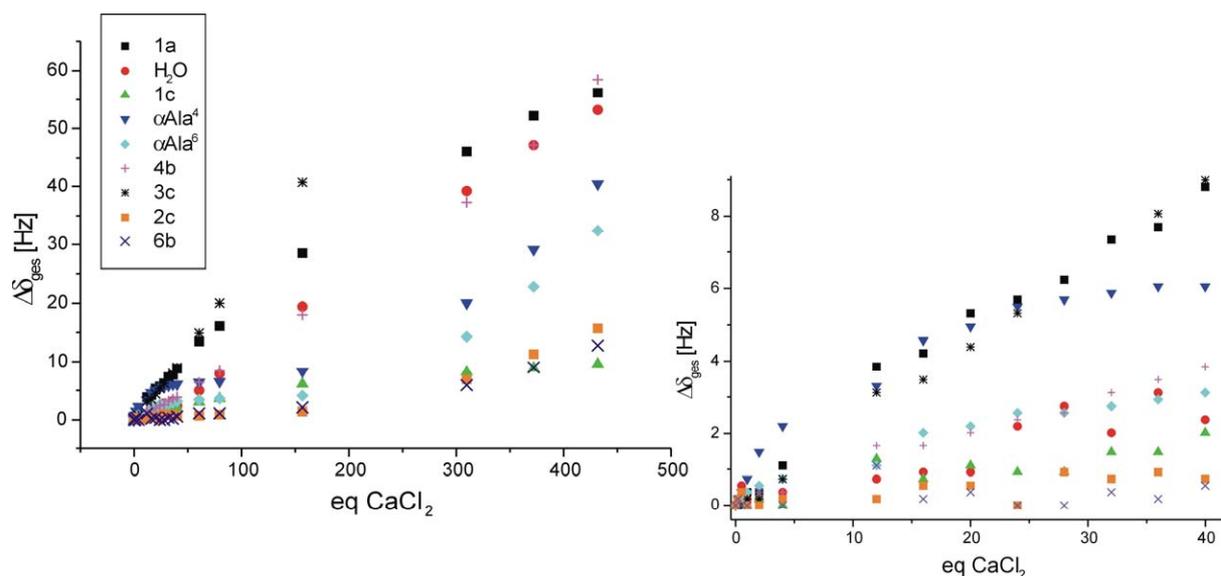


Abb. 31. Auftragung der Änderung der chemischen Verschiebung in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge CaCl_2 .

Die Auswertung der Daten für H1a und $\text{H}\alpha^{\text{Ala}4}$ mittels Scatchardplot liefert Bindungsaffinitäten im Bereich von **1 – 3 L/mol**, also eine deutlich schwächere Affinität zu Ca^{2+} als jene für **Le^{X} Dimer** in Wasser (5 – 10 L/mol)²⁰. Dennoch muss ein gewisser kooperativer Effekt zwischen den beiden Lewis^X Einheiten bei der Ca^{2+} Bindung auftreten, denn für **Le^{X} Mono** oder auch Systeme wie dimere Lactose (CH_2 -Brücke zwischen den 6aOH Einheiten der beiden Lactosen, analog zu **Le^{X} Dimer**) ist in Wasser gar keine Ca^{2+} Bindung zu beobachten.²⁰

Nur für einen bestimmten Bereich der Titration beruht die Änderung auf einer spezifischen Bindung, mit zunehmender Calciumkonzentration ergeben sich die Änderungen in den chemischen Verschiebungen vorrangig aus unspezifischer Bindung bzw. der blossen Änderung der Lösungsmiteileigenschaften.

Beispielhaft sei hier der Scatchardplot für $\text{H}\alpha^{\text{Ala}4}$ gezeigt.

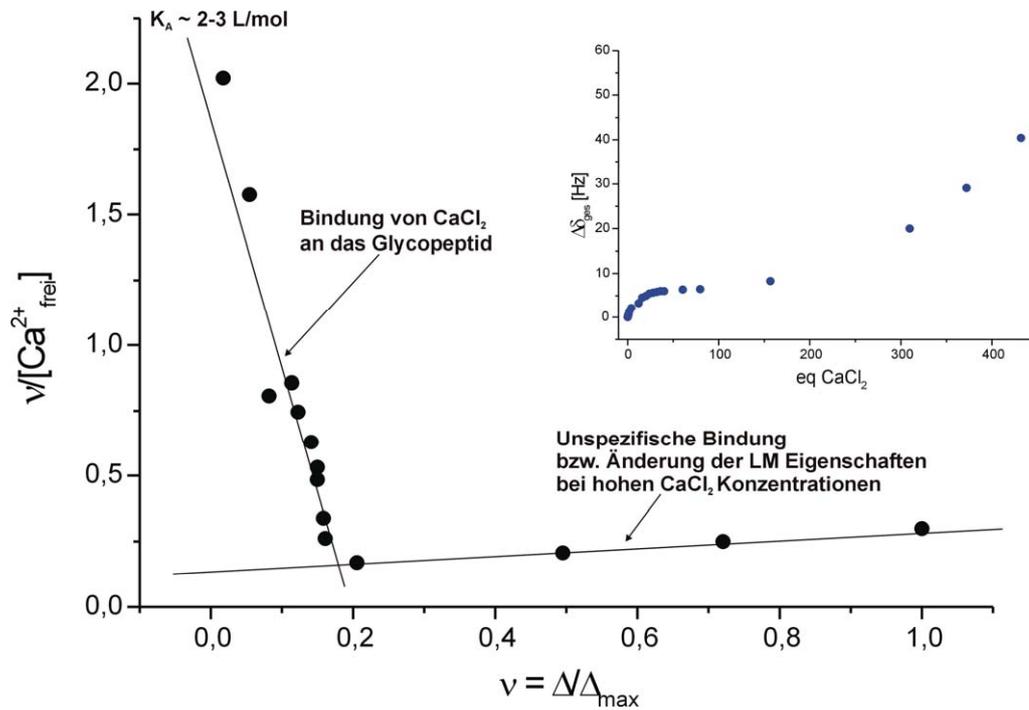


Abb. 32. Scatchardplot für Le^X Glycep bei Berücksichtigung der Daten von $\text{H}\alpha^{\text{Ala4}}$.

4.4 Le^X Glycep in $\text{D}_2\text{O} + 40 \text{ eq CaCl}_2$

Die Zuordnung der Signale im ^1H erfolgte mittels DQFCOSY Spektrum und durch Vergleich der Verschiebungen im Verlauf der Titration.

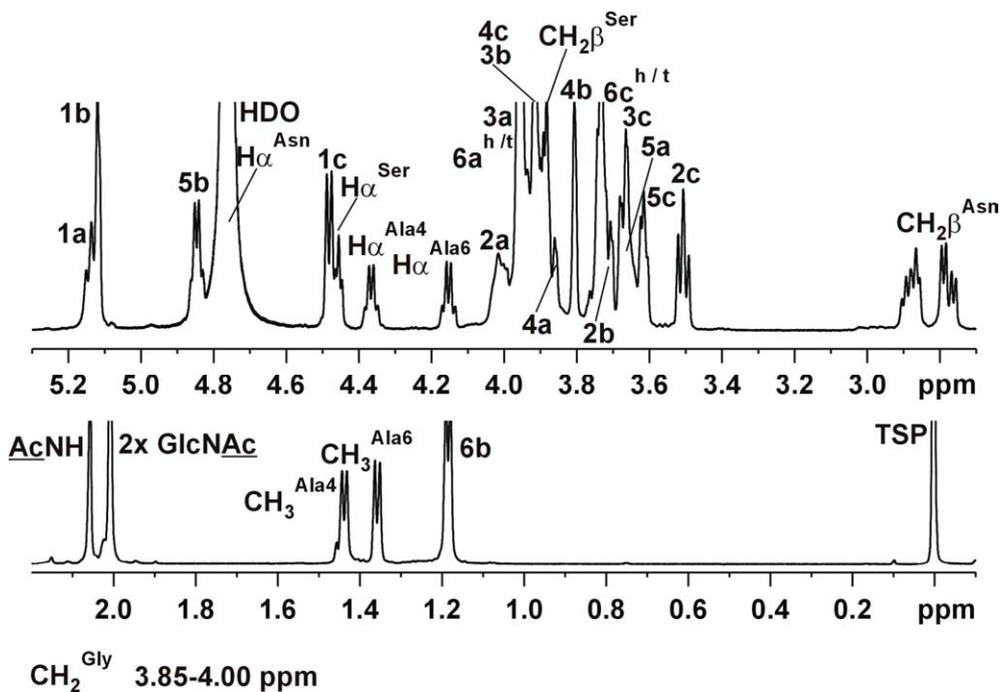


Abb. 33. ^1H Spektrum von Le^X Glycep in D_2O bei Zusatz von 40 eq CaCl_2 (600 MHz, 300 K).

Wie schon für die Untersuchungen in $\text{MeOH}_{d4} + \text{CaCl}_2$ und D_2O ohne CaCl_2 , so zeigen sich auch für $\text{D}_2\text{O} + 40 \text{ eq CaCl}_2$ im ROESY Spektrum keinerlei ROE Signale zwischen Protonen der beiden Lewis^X Einheiten.

Die transglykosidischen ROEs (1b – 3a und 1c – 4a), sowie die *Stacking* ROEs (2c – 5b und 2c – 6b) können identifiziert werden. Entsprechende ROESY Ausschnitte finden sich im Anhang.

Dies bedeutet, dass auch in Wasser bei Zusatz von CaCl_2 entweder gar keine Wechselwirkungen zwischen den beiden Lewis^X Hälften auftreten und eine spezifische Bindung von Ca^{2+} , an der beide Lewis^X Einheiten beteiligt sind, die wie im Fall von **Le^X Dimer** eine hydrophile Höhle bilden, nicht stattfindet, oder dass die beiden Lewis^X Einheiten bei (sehr) schwacher Bindung von Ca^{2+} zu weit voneinander entfernt sind, um entsprechende ROESY Signale zu erzeugen.

4.5 Le^X Glypep in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 90:10 – Identifizierung der NH-Protonen

Die Probe von **Le^X Glypep** aus 4.4 wurde anschliessend lyophilisiert und in einer Mischung aus $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (90:10 (v/v)) gelöst, um somit auch die Signale der Amidprotonen identifizieren zu können.

Die Zuordnung der NH-Protonen erfolgte mit Hilfe von DQFCOSY und ROESY Spektren.

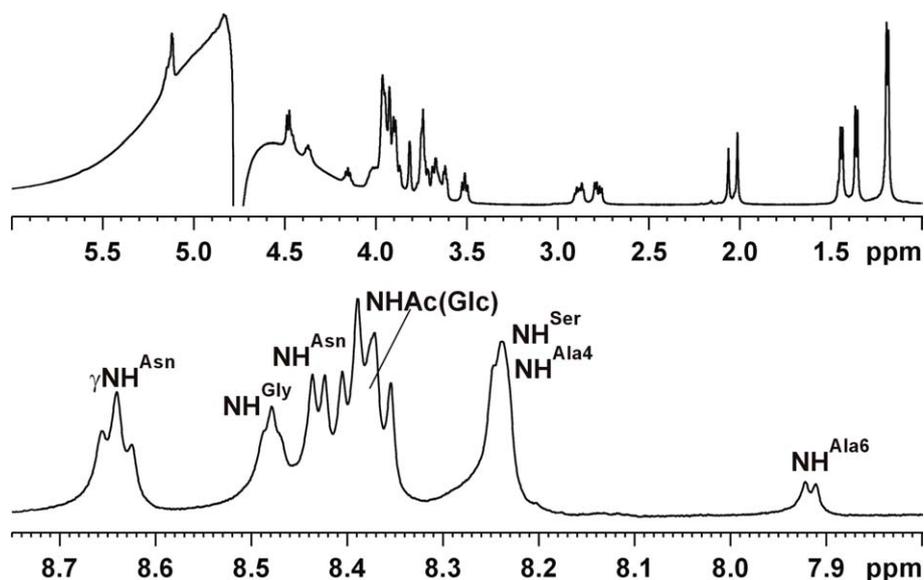


Abb. 34. ^1H Watergate Spektrum von **Le^X Glypep** in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 90:10, + 40 eq CaCl_2 (600 MHz, 300 K), oben das Gesamtspektrum, unten der Ausschnitt des NH-Bereichs. Die Zuordnung der CH-Protonen entspricht der in Abb. 33 gezeigten.

Eine Auswertung des ROESY Spektrums ergibt, dass alle NH-Protonen jeweils nur sequentielle ROE Kreuzsignale zu ihren nächsten Nachbarn aufweisen. Somit kann auch dieses Ergebnis eine evtl. vorliegende Turnstruktur nicht stützen.

Es kann also angenommen werden, dass sich der Turn im Bereich von Asn¹ – Gly² – Asn³ nur im Rahmen einer Rechnung im Vakuum als bevorzugt darstellt, nicht jedoch tatsächlich vorliegt.

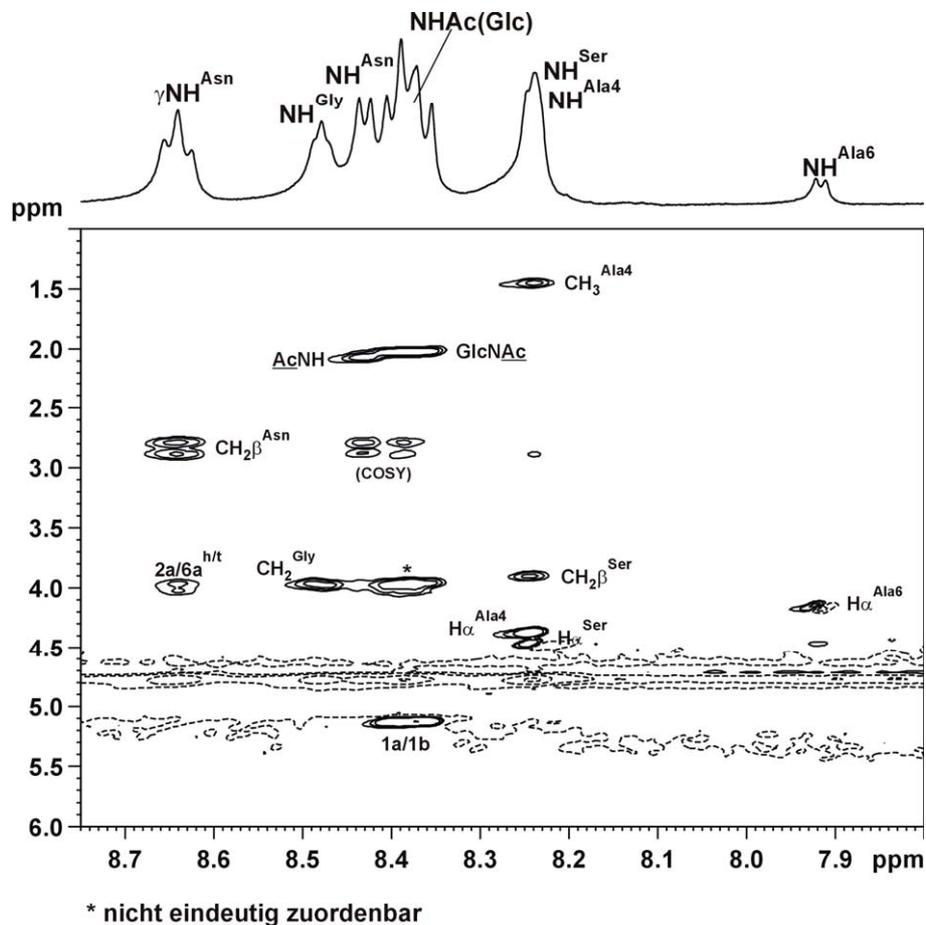


Abb. 35. NH-Bereich des ROESY Watergate Spektrums von **Le^X Glypep** in H₂O:D₂O 90:10 (+ 40 eq CaCl₂, 600 MHz, 300 K).

4.6 Theoretische Ca²⁺ Bindung – Strukturermittlung in silico

Auch wenn sich experimentell gezeigt hat, dass im Falle des Glycopeptids keine zu **Le^X Dimer** vergleichbar starke Ca²⁺ Bindung durch die beiden Lewis^X Hälften nachgewiesen werden kann, ist es dennoch sinnvoll, vom gleichen Bindungsepitop, wie für **Le^X Dimer** postuliert, auszugehen und rechnerisch eine mögliche Struktur mit gebundenem Ca²⁺ zu generieren.

Es werden analog die entsprechenden OH- bzw. Carbonylgruppen als Bindungspartner für Ca²⁺ definiert:

- **2cOH** und **3cOH** von der einen,
- **2bOH**, **6cOH** und **Carbonyl (NHAc)** von der anderen Lewis^X Einheit.

Diese Abstände werden zusätzlich zu den Winkelrestraints für die Lewis^X Einheiten im Rahmen einer MD Simulation gesetzt.

Abstand bzw. Winkel	Gesetzter Wert [Å] bzw. [°]
2cOH – Ca	2.5
3cOH – Ca	2.5
2bOH – Ca	2.5
6cOH – Ca	2.5
CO – Ca	2.5
Φ (Fuc)	40
Ψ (Fuc)	30
Φ (Gal)	47
Ψ (Gal)	17

Alle Winkelrestraints sind für beide Le^{X} Hälften definiert

Tab. 12. Gesetzte Restraints bei der Strukturberechnung von Le^{X} Glypep, wenn von einem zu Le^{X} Dimer analogen Ca^{2+} Bindungsepitop ausgegangen wird.

Die erhaltenen Snapshots zeigen zwar eine gewisse Variationsbreite, was die Orientierung der Lewis^X Einheiten zueinander betrifft, dennoch kann eine sinnvolle, gemittelte und energieminierte Struktur bestimmt werden. In ihr sind die beiden Lewis^X Trisaccharide nun – durch die „erzwungene“ Calciumbindung – so orientiert, dass sich, wie schon beim experimentellen Befund, keine signifikanten Protonenabstände zwischen beiden ergeben. Lediglich H6a zeigt kurze Abstände zu $\text{CH}_2\beta^{\text{Asn}}$ ($\sim 2.9 \text{ \AA}$) und $\gamma\text{NH}^{\text{Asn}}$ ($\sim 2.4 \text{ \AA}$).

Für diese Protoneninteraktionen sind bei tiefem Signal/Rausch Level in den ROESY Spektren in D_2O bzw. $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (mit jeweils 40 eq CaCl_2) die betreffenden Kreuzsignale schwach zu erkennen.

Die hier rechnerisch, nur durch Definition des Ca^{2+} -Bindungsepitops, erzeugte Struktur bildet keinen Widerspruch zu den experimentellen Daten.

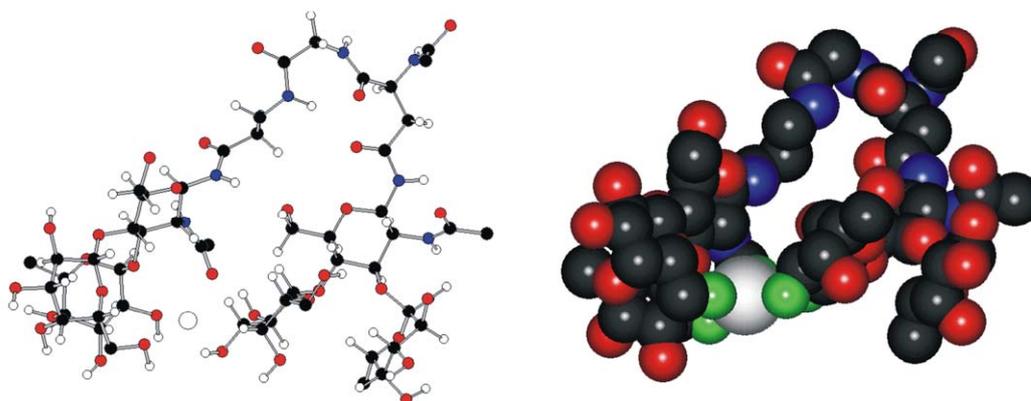


Abb. 36. Gemittelte Struktur für Le^{X} Glypep bei Definition eines zu Le^{X} Dimer analogen Calcium-Bindungsepitops.

Die beiden Lewis^X Hälften sind sehr viel weiter voneinander entfernt und in einem anderen Winkel zueinander orientiert als dies im Le^{X} Dimer der Fall ist.

Dies macht die Möglichkeit verschiedener Anordnungen der Kopfgruppen bei Bindung eines Ca^{2+} Ions wahrscheinlich.

Die Struktur eines weiteren dimeren Lewis^X Systems mit einem Membrananker in Form langkettiger Alkyle soll daher ebenfalls *in silico* bestimmt werden.

5. Glycolipid mit zwei Lewis^X Einheiten – Strukturermittlung *in silico*

Bei dem, im Folgenden nur rechnerisch untersuchten, Molekül handelt es sich um ein Glycolipid, welches durch seine vier langkettigen Alkylreste als Membranbaustein dienen kann. Dadurch könnte man die Wechselwirkungen zwischen membrangebundenen Lewis^X und freien Lewis^X bzw. zwischen zwei membrangebundenen Lewis^X Kopfgruppen in Lösung untersuchen.

Die beiden Lewis^X Trisaccharideinheiten sollten zueinander eine günstige Orientierung besitzen, um Ca^{2+} spezifisch zu binden.

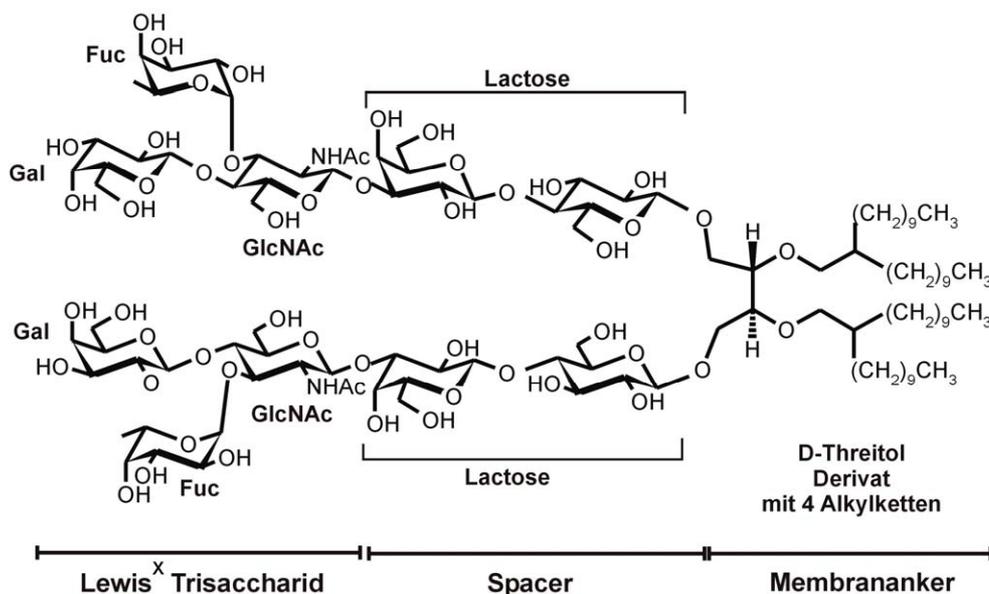


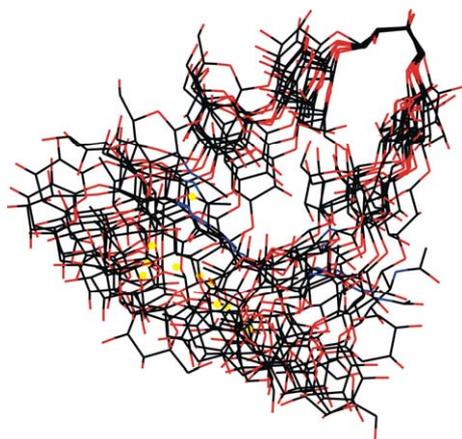
Abb. 37. Das untersuchte **Le^X Glycolipid** – bestehend aus Lewis^X Trisaccharid, Lactose-Spacer und Threitol-Membrananker.

Wenn man davon ausgeht, dass ein Ca^{2+} Ion analog gebunden wird, wie für **Le^X Dimer** postuliert – nämlich über 2cOH, 3cOH, 2bOH, 6cOH und Carbonyl (NHAc) – so kann man die entsprechenden Restriants im Rahmen einer MD Simulation setzen und die theoretische Orientierung der Lewis^X Kopfgruppen zueinander vergleichen, um dies später anhand experimenteller Daten zu überprüfen.

Um die starre Lösungskonformation²¹ der Lewis^X Einheiten zu gewährleisten, werden die entsprechenden Φ/Ψ Winkel der O-glykosidischen Bindungen ebenfalls als Restriants gesetzt.

Abstand bzw. Winkel	Gesetzter Wert [Å] bzw. [°]
2cOH – Ca	2.5
3cOH – Ca	2.5
2bOH – Ca	2.5
6cOH – Ca	2.5
CO – Ca	2.5
Die ersten beiden OHs stammen von der einen, die anderen beiden und die Carbonyleinheit von der anderen Lewis ^X Gruppe	
$\Phi(\text{Fuc})$	40
$\Psi(\text{Fuc})$	30
$\Phi(\text{Gal})$	47
$\Psi(\text{Gal})$	17
$\Phi(\text{GlcNAc})$	30
$\Psi(\text{GlcNAc})$	-50
$\Phi(\text{Gal}^{\text{Lactose}})$	50
$\Psi(\text{Gal}^{\text{Lactose}})$	-10
$\Phi(\text{Glc}^{\text{Lactose}})$	30
Alle Winkelrestraints sind für beide Le ^X Hälften definiert	

Tab. 13. In der MD Simulation von Le^X Glycolipid gesetzte Restraints.



Die Flexibilität der so definierten Struktur ist nicht allzu gross, so dass die Überlagerung aller zehn Snapshots ein relativ einheitliches Bild liefert und daher eine daraus gemittelte Struktur berechnet werden kann.

Abb. 38. Überlagerung aller zehn Snapshots, ohne Darstellung der vier Alkylreste. Ca²⁺ in gelb.

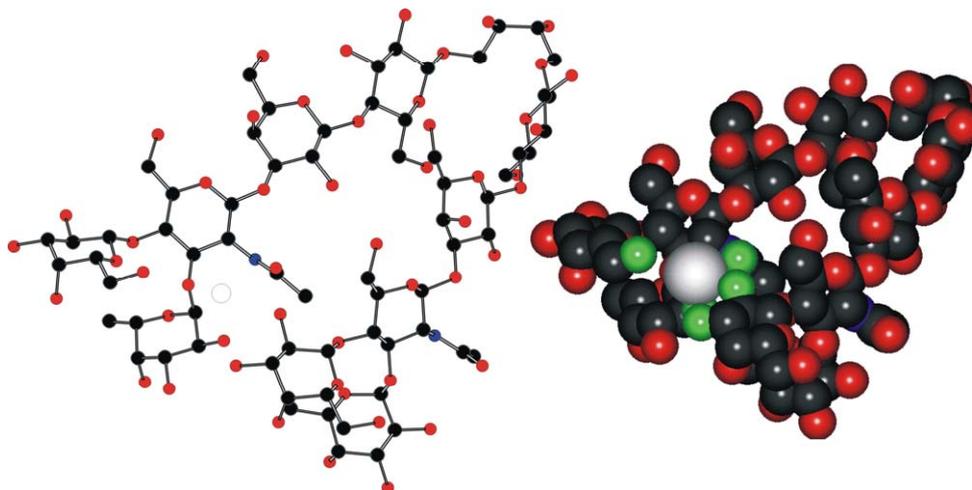


Abb. 39. Gemittelte, energieminierte Struktur aus 10 Snapshots für Le^{X} Glycolipid. In grün OH- und Carbonylgruppen, für die eine Beteiligung an der Ca^{2+} Bindung postuliert wird. Der Übersichtlichkeit halber sind die vier Alkylketten nicht dargestellt.

Auffallend ist, dass in diesem Modell die beiden Lewis^X Einheiten annähernd parallel zueinander orientiert sind, was einer weiteren möglichen Variante der Kopfgruppenorientierung bei Calciumbindung entsprechen würde.

Rechnet man diese Struktur nur mit den Winkelrestraints für alle O-glykosidischen Bindungen, so zeigen die beiden Lewis^X Einheiten maximale Entfernung voneinander und sind ca. 180° gegeneinander orientiert.

Diese rein rechnerisch bestimmten, theoretischen Strukturen Lewis^X tragender Glycokonjugate stellen selbstverständlich „nur“ Arbeitshypothesen dar, die es experimentell zu belegen gäbe.

Da im Rahmen dieser Dissertation auf das entsprechende Glycolipid nicht zurückgegriffen werden konnte, war eine experimentelle Bestätigung oder Widerlegung der in silico ermittelten Variante der Kopfgruppenorientierung nicht möglich.

6. Bestimmung des Winkels zwischen Lewis^X Einheiten bei Calciumbindung

Da, wie die vorigen Kapitel gezeigt haben, wohl mehrere Möglichkeiten der Kopfgruppenorientierung bei Ca^{2+} Bindung durch zwei Lewis^X Einheiten bestehen, ist es nun von Interesse die genaue Orientierung der Lewis Einheiten zueinander zu definieren.

Zum einen ist wichtig, inwiefern die zwei Lewis^X Einheiten gegeneinander „verkippt“ sind. Dies kann durch Definition jeweils einer Ebene pro Lewis^X Trisaccharid und der Bestimmung des Winkels zwischen diesen beiden Ebenen erfolgen.

Zum anderen kann durch Definition eines Vektors innerhalb jeder Lewis Einheit und des Winkels zwischen diesen beiden Vektoren die Ausrichtung der beiden Trisaccharideinheiten zueinander bestimmt werden.

6.1 Mathematische Berechnung der Winkel²⁵

Zur Bestimmung der Verkipfung der beiden Einheiten eignet sich die GlcNAc-Einheit. So werden drei Ringatome – Ring-O, C2 und C4 – zur Bestimmung der Ebenen herangezogen.

Der Winkel zwischen zwei Ebenen E_1 und E_2 ist allgemein gegeben durch:

$$\cos \angle (E_1, E_2) = \cos \phi = \left| \frac{a_1 \cdot a_2 + b_1 \cdot b_2 + c_1 \cdot c_2}{\sqrt{(a_1^2 + b_1^2 + c_1^2) \cdot (a_2^2 + b_2^2 + c_2^2)}} \right| \quad (1)$$

wobei a_1, b_1, c_1 und a_2, b_2, c_2 die zugehörigen Unterdeterminanten sind. Sie sind wie folgt zu bestimmen:

Eine Ebene ist definiert durch 3 Punkte mit den Koordinaten (x_1, y_1, z_1) , (x_2, y_2, z_2) und (x_3, y_3, z_3)

Definition der Unterdeterminanten:

$$a = \begin{vmatrix} y_1 & z_1 & 1 \\ y_2 & z_2 & 1 \\ y_3 & z_3 & 1 \end{vmatrix} = y_1 \cdot z_2 + z_1 \cdot y_3 + y_2 \cdot z_3 - z_2 \cdot y_3 - y_1 \cdot z_3 - z_1 \cdot y_2$$

$$b = \begin{vmatrix} x_1 & z_1 & 1 \\ x_2 & z_2 & 1 \\ x_3 & z_3 & 1 \end{vmatrix} = x_1 \cdot z_2 + z_1 \cdot x_3 + x_2 \cdot z_3 - z_2 \cdot x_3 - x_1 \cdot z_3 - z_1 \cdot x_2$$

$$c = \begin{vmatrix} x_1 & y_1 & 1 \\ x_2 & y_2 & 1 \\ x_3 & y_3 & 1 \end{vmatrix} = x_1 \cdot y_2 + y_1 \cdot x_3 + x_2 \cdot y_3 - y_2 \cdot x_3 - x_1 \cdot y_3 - y_1 \cdot x_2$$

Für den Vektor innerhalb einer Lewis Einheit wurden die Atome Ring-O (GlcNAc) und 4C (Fuc) gewählt.

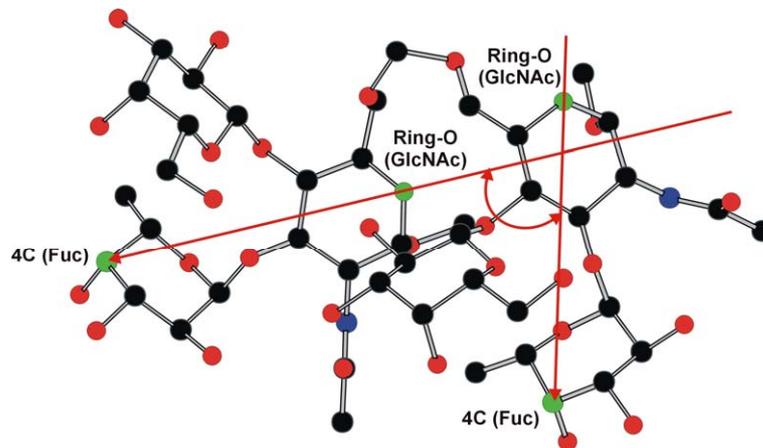


Abb. 40. Die, die Vektoren definierenden Atome sind grün, die entsprechenden Vektoren rot dargestellt. Hier am Beispiel des **Le^X Dimer**.

Der Cosinus zwischen zwei Vektoren im Raum ist definiert als:

$$\cos \angle (a, b) = \frac{\vec{a} \cdot \vec{b}}{|\vec{a}| |\vec{b}|} \quad (2)$$

wobei hier die Vektoren a und b wie folgt definiert sind:

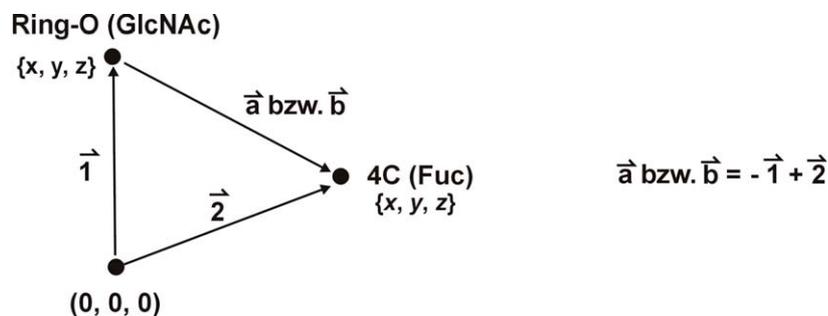


Abb. 41. Definition der Vektoren a und b.

Das Skalarprodukt ist definiert als: $\mathbf{a} \cdot \mathbf{b} = a_1 b_1 + a_2 b_2 + \dots + a_n b_n = \sum a_i b_i$ mit $i = 1$ bis n

wobei a_1 der x-, a_2 der y- und a_3 der z-Koordinate des Vektors a entsprechen.

Der Betrag eines Vektors ist definiert als:

$$|\vec{a}| = \sqrt{\vec{a} \cdot \vec{a}} = \sqrt{\sum a_i^2} \quad (3)$$

Mit diesen Grundlagen kann man für die, auf experimentellen Daten basierende, Struktur von **Le^X Dimer**, sowie für die, in silico erzeugten, Strukturen von **Le^X Glycep** und **Le^X Glycolipid** bei Calciumbindung die Orientierungen der Lewis^X Einheiten zueinander bestimmen.

6.2 Bestimmung der Winkel für Le^X Dimer, Le^X Glypep und Le^X Glycolipid

Ein Excel-Arbeitsblatt mit der Berechnung der Grössen findet sich für **Le^X Dimer** im experimentellen Teil.

	Le ^X Dimer	Le ^X Glypep	Le ^X Glycolipid
Winkel zwischen GlcNAc-Flächen [°]	14	89	47
Winkel zwischen Vektoren [°]	84	70	14
Abstand 1C(GlcNAc) – 1C(GlcNAc) [Å]	6.3	8.0	8.6

Tab. 14. Übersicht über die, aus den berechneten Strukturen ermittelten, Winkel der Lewis^X Einheiten.

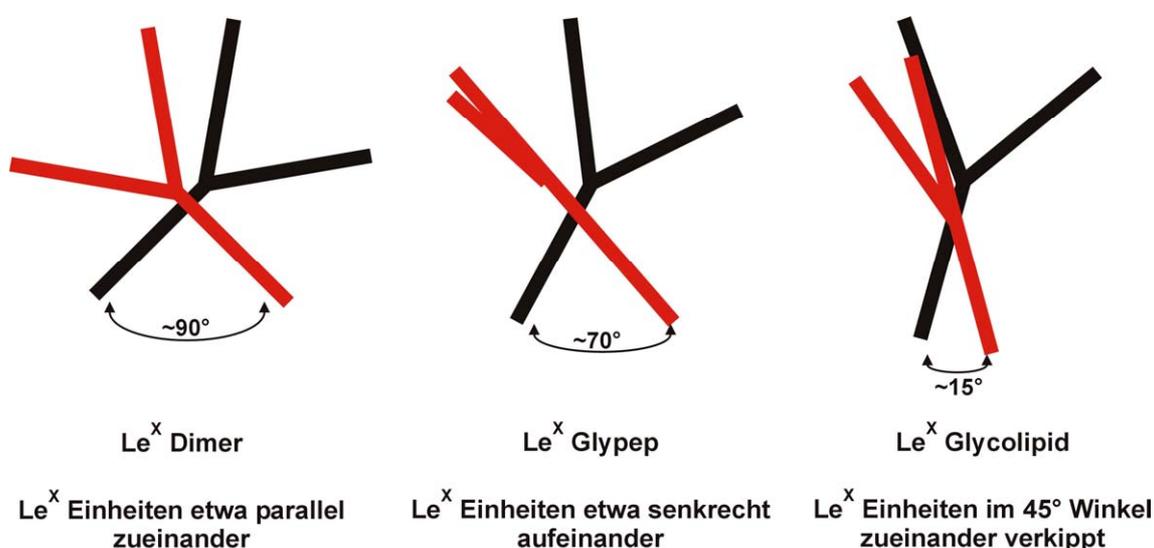


Abb. 42. Schematische Darstellung der Winkel zwischen den Lewis^X Einheiten in **Le^X Dimer**, **Le^X Glypep** und **Le^X Glycolipid** bei Betrachtung der Vektoren Ring-O (GlcNAc) – 4C (Fuc).

Alle drei untersuchten Moleküle zeigen eine sehr unterschiedliche Verkippung der GlcNAc-Flächen zueinander, wobei in **Le^X Dimer** diese fast parallel zueinander angeordnet sind, wohingegen **Le^X Glypep** mit ca. 90° den anderen Extremfall zeigt. Der Winkel zwischen den Lewis^X Einheiten ist für **Le^X Dimer** und **Le^X Glypep** zwar in etwa vergleichbar, eine ähnliche Orientierung kann jedoch aufgrund der konträren Verkippung der Lewis Einheiten in jedem der Moleküle ausgeschlossen werden. **Le^X Glycolipid** weist einen deutlich kleineren Winkel zwischen beiden Le^X Einheiten auf – die definierten Vektoren sind annähernd parallel.

Die Abstände zwischen den 1C-Atomen der GlcNAc-Einheiten sind für **Le^X Glypep** und **Le^X Glycolipid** bedeutend grösser als für **Le^X Dimer**, so dass hier eine deutliche Aufweitung vorliegt, welche im Fall von **Le^X Glypep** auch mit ein Grund für das Fehlen von ROE Signalen zwischen Protonen beider Lewis^X Einheiten sein dürfte.

Es sind theoretisch durchaus verschiedene Anordnungen der Lewis^X Einheiten zueinander möglich, um Ca²⁺ Ionen in einer hydrophilen „Tasche“ zu binden. Allerdings

könnte aufgrund der unterschiedlichen „Weite“ der Tasche die Bindungsaffinität mehr oder weniger stark variieren.

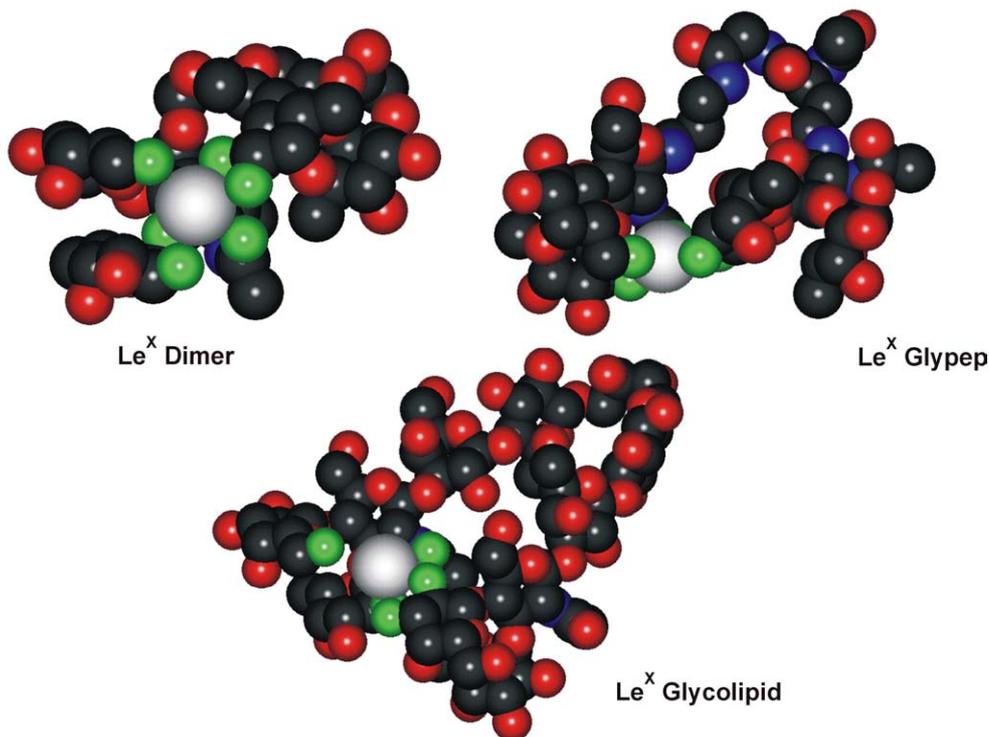


Abb. 43. Vergleich der drei gerechneten, gemittelten Strukturen unter Einbeziehung von Restraints zwischen bestimmten OH- bzw. Carbonylgruppen (grün) und dem Ca^{2+} Ion (weiss). Nur die Struktur von **Le^X Dimer** beruht auf experimentellen (NMR) Daten, **Le^X Glypep** und **Le^X Glycolipid** stellen in silico erzeugte, theoretische Strukturen dar.

Im Falle von **Le^X Dimer** umschliessen die markierten OH- bzw. Carbonylgruppen das Calciumion, wohingegen für **Le^X Glypep** und **Le^X Glycolipid** die hydrophile Höhle nicht so eindeutig ist und das Ca^{2+} Ion eher lose von jenen Gruppen umgeben ist.

7. Berechnung eines möglichen Verknüpfungsmusters für ein Lewis^a Dimer

Es gibt, wie in der Einleitung gezeigt, verschiedene Kopfgruppen innerhalb der Lewis Familie.

Lewis^a und Lewis^X unterscheiden sich nur dahingehend, dass rein formal die GlcNAc-Einheit eine 180° Drehung um ihre Längsachse vollführt, so dass die Galactose nun eine (1→3)- und die Fucose eine (1→4)-O-glykosidische Bindung zu GlcNAc besitzen.

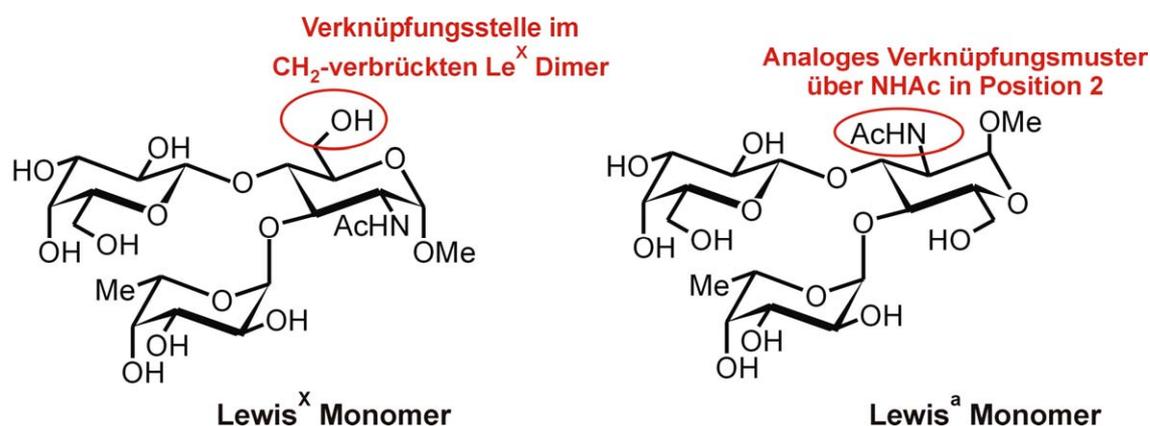


Abb. 44. Vergleich der Strukturen von Lewis^X und Lewis^a Monomer.

Wie in Abb. 44 zu sehen, müsste, falls ein zu **Le^X Dimer** analoges Ca²⁺ Bindungssepitop möglich sein soll, eine Verknüpfung der beiden Lewis^a Einheiten über die NHAc-Einheiten in Position 2 erfolgen, da diese Position der Position 6 der GlcNAc Einheit in **Le^X Dimer** entspricht.

Zuerst werden zwei nicht-kovalent verbundene Lewis^a Einheiten im Rahmen einer Geometrieoptimierung durch Restraints so zueinander orientiert, dass das in **Le^X Dimer** vorliegende Ca²⁺ Bindungssepitop erzeugt wird.

Hierzu sind folgende Restraints nötig:

Abstand bzw. Winkel	Wert [Å] bzw. [°]
2cOH – Ca	2.5
3cOH – Ca	2.5
2bOH – Ca	2.5
6cOH – Ca	2.5
6aOH – Ca	2.5
In der Position des Carbonyls (GlcNAc) in Le^X Dimer findet sich in Lewis ^a 6aOH als hydrophiler Partner	
Φ (Fuc)	40
Ψ (Fuc)	30
Φ (Gal)	47
Ψ (Gal)	17
Winkel in jeder Lewis ^a Einheit gesetzt	

Tab. 15. Für zwei nicht kovalent verknüpfte Lewis^a Einheiten gesetzte Restraints zur Bildung einer zu **Le^X Dimer** analogen Ca²⁺ Bindungstasche.

Die so erhaltene Struktur zeigt einen Abstand zwischen den beiden C-Atomen in Position 2 der GlcNAc Einheiten von 5 Å, ein Wert, der annähernd jenem für den Ab-

stand der C-Atome 5 in **Le^X Dimer** entspricht (4.7 Å). Die C-Atome 2 und 5 in Lewis^a bzw. Lewis^X entsprechen einander.

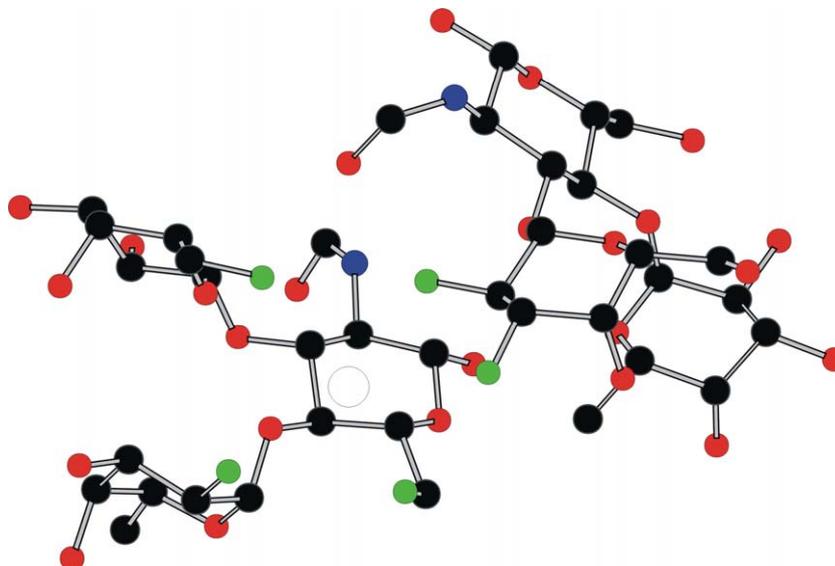


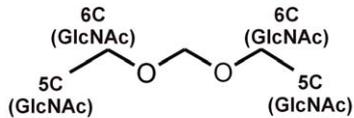
Abb. 45. Energieminimierte Struktur zweier Lewis^a Einheiten, die über die entsprechenden Restraints zum Ca²⁺ Ion „verbunden“ sind. In grün, die an der Bindung des Calciumions beteiligten OH-Gruppen.

Die NHAc Einheiten sind in Abb. 45 unvollständig dargestellt – an ihrer Stelle soll ein entsprechender Spacer die beiden Hälften kovalent verknüpfen, ohne das Ca²⁺ Bindungsepitop und die Orientierung der beiden Lewis^a Einheiten zu verändern.

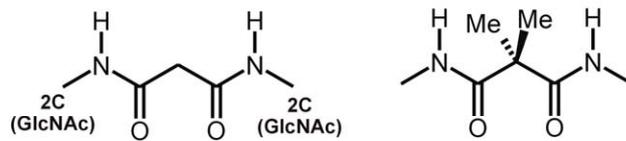
7.1 Mögliche kovalente Verknüpfungseinheiten

Wie gesagt, soll die kovalente Verknüpfungseinheit weder die Orientierung der Lewis Einheiten zueinander noch die Bindungstasche ändern. Zudem darf der Spacer nicht zu lang und/oder zu flexibel sein, da sonst eine spezifische Bindung des Ca²⁺ Ions erschwert sein könnte.

in Le^X Dimer: 6 Einfachbindungen



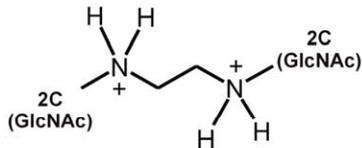
in Le^a Dimer: 6 Einfachbindungen
→ Malonsäure bzw. Dimethylmalonsäure



Beide strukturell problematisch:

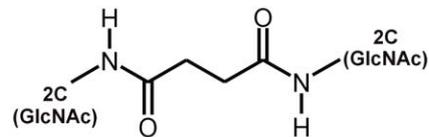
Le^a Einheiten nicht mehr zueinander orientiert

in Le^a Dimer: 5 Einfachbindungen

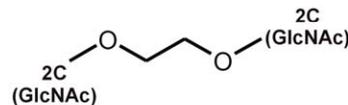


Problem: zweifach positiv geladen
→ Bindung eines Kations erschwert

in Le^a Dimer: 7 Einfachbindungen
→ Bernsteinsäure



keine Probleme



Problem:
entspricht nicht mehr Lewis^a

Abb. 46. Mögliche Spacer für die 2-2-Verknüpfung zweier Lewis^a Einheiten unter Erhalt des zu Le^X Dimer analogen Ca^{2+} Bindungsepitops.

Durch Einsatz von Malonsäure bzw. Dimethylmalonsäure bleibt die Anzahl an Einfachbindungen zwischen den beiden Le^a Einheiten die gleiche wie in Le^X Dimer. Allerdings führt dies zu keiner Struktur, welche die postulierte Calciumbindung gewährleisten sollte, da aufgrund der energetisch günstigeren trans-Anordnung von H2a und NH bzw. innerhalb der Amidbindung (NH-CO) die Lewis^a Einheiten auseinander tendieren und die Bindungstasche für das Calciumion verloren geht.

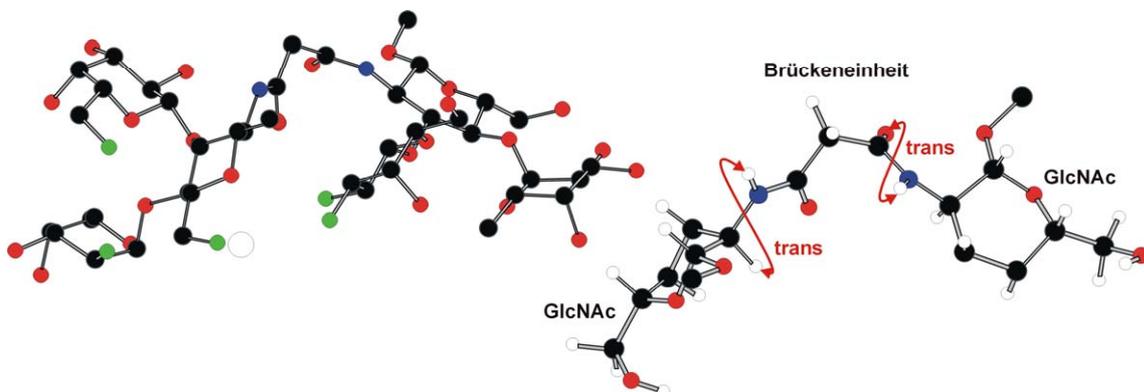


Abb. 47. Struktur für Le^a Dimer mit Malonsäurespacer. In grün jene OH-Gruppen, die eigentlich die Ca^{2+} Bindungstasche bilden sollten. Rechts dargestellt nur die Brückeneinheit mit den trans-Anordnungen für H1a – NH und CO – NH.

Geht man zu einem verkürzten Spacer mit nur fünf Einfachbindungen zwischen den Le^a Einheiten über, so sind zwar beide, in Abb. 46 vorgeschlagenen, Spacer günstig für die Orientierung der Le^a Einheiten unter Beibehaltung des Bindungsepitops, doch besitzt das Diamin zwei positive Ladungen, was ungünstig für die Bindung des Ca^{2+} Ions ist, und die etherverbrückte Variante besteht streng genommen nicht mehr aus zwei Lewis^a Einheiten.

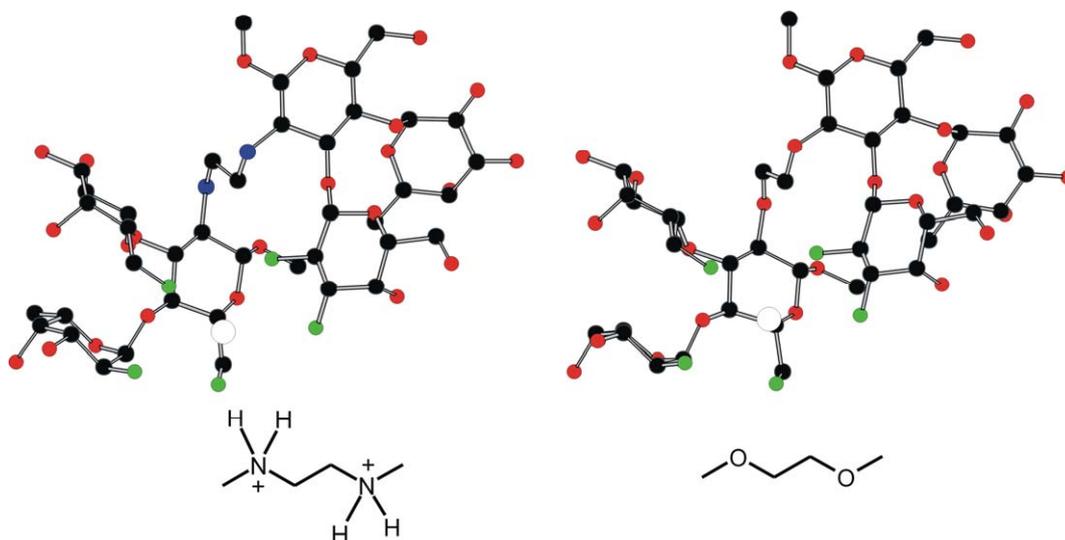


Abb. 48. Zwei Spacervorschläge mit fünf Einfachbindungen zwischen den beiden Glucoseeinheiten.

Die Verlängerung des Spacers auf sieben Einfachbindungen zwischen den GlcNAc Einheiten, erzielt durch Verwendung von Bernsteinsäure, bringt, trotz der Verlängerung um eine Einfachbindung (i. Vgl. zu **Le^X Dimer**) nur Vorteile mit sich.

Die Anordnung der beiden Le^a Hälften zueinander bleibt erhalten, die Bindungstasche für Ca^{2+} ebenfalls. Auch allen trans-Orientierungen in der Brückeneinheit kann entsprochen werden. So stellt dieser Vorschlag trotz längerer Spacereinheit die beste Möglichkeit für eine 2-2-Verknüpfung zweier Lewis^a Einheiten dar, wobei davon ausgegangen werden kann, dass dieses Systems ähnlich effektiv Ca^{2+} bindet wie **Le^X Dimer**. Um sterische Behinderungen zu vermeiden ist es im hier gezeigten Fall günstiger, die β -Konfiguration des O-methylierten Glucosamins (GlcNAc) zu wählen.

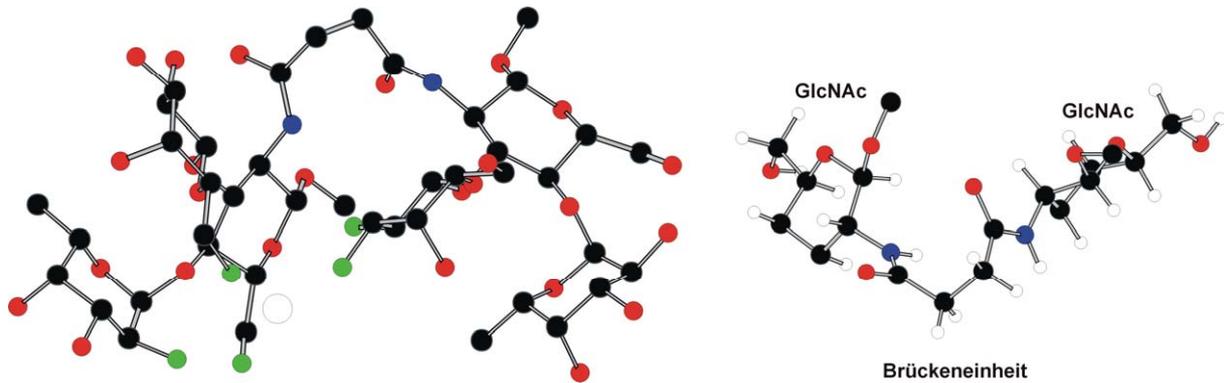


Abb. 49. Zwei Lewis^a Einheiten mit einer 2-2-Verknüpfung über eine Bernsteinsäureeinheit. In grün jene OH-Gruppen, die die Ca²⁺ Bindungstasche definieren.

Die Untersuchung dieses Moleküls sollte Aufschluss über die Bindungsaffinität von Ca²⁺ an dimere Lewis^a Einheiten liefern.

Die synthetischen Arbeiten hierzu wurden jedoch nicht im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation zu Ende geführt, so dass eine Untersuchung der Ca²⁺ Bindungseigenschaften mittels NMR nicht erfolgen konnte.

8. Zusammenfassung

Die durch dimere Lewis^X Einheiten geformte Bindungstasche für Ca²⁺ Ionen konnte durch zusätzliche Untersuchungen in MeOH_{d3}:MeOH_{d4} bzw. in reinem MeOH_{d3} via OH-/NH-Protonen genauer definiert werden. So wird die mittels charakteristischer Protonenabstände berechnete Struktur eines artifiziellen **Le^X Dimers** mit Vorschlag für eine hydrophile Bindungstasche durch Titration mit CaCl₂ bestätigt, bei der die Änderung der chemischen Verschiebung der OH Protonen verfolgt werden kann. Sie zeigen ein zur, auf CH-Restraints basierenden, berechneten Struktur komplementäres Bild.

Auch für komplexere Lewis^X Glycolipide oder -peptide konnte rechnerisch gezeigt werden, dass eine Ca²⁺ Bindung gut möglich ist. Beide Systeme sind jedoch sehr viel weiter – also der Abstand zwischen den Le^X Hälften grösser – so dass experimentell keine charakteristischen ROE Signale zwischen den Protonen beider Le^X Hälften zu erwarten wären. Dies konnte für das untersuchte **Le^X Glycopeptid** experimentell bestätigt werden.

Zudem bedeutet der grössere Abstand zwischen den Lewis^X Einheiten eine räumlich weniger gut definierte Ca²⁺ Bindungstasche und damit höchstwahrscheinlich auch eine schwächere Affinität zu Ca²⁺.

Sind die Lewis^X Kopfgruppen nicht annähernd parallel zueinander orientiert und schliessen einen Winkel von 90° ein, wie dies für **Le^X Dimer** der Fall ist, sondern verkippt zueinander (max. 90° wie in **Le^X Glypep**) und schliessen sie einen von 90° abweichenden Winkel miteinander ein (min. 14° für **Le^X Glycolipid**), so ist dennoch das in **Le^X Dimer** definierte Ca²⁺ Bindungsepitop vorhanden, wenn auch sehr viel weniger gut definiert, mit einer lockereren Ca²⁺ Bindung, welche eine schwächere Affinität zu Ca²⁺ bedingen sollte im Vergleich zu **Le^X Dimer**.

Auch die Möglichkeit, zwei Lewis^a Einheiten kovalent so miteinander zu verknüpfen, dass ein zu **Lewis^X Dimer** analoges Ca²⁺ Bindungsepitop geschaffen wird, konnte gezeigt werden. Ein idealer Spacer für 2-2-verknüpfte Lewis^a Einheiten stellt Bernsteinsäure dar. Sie gestattet die, für die Ca²⁺ Bindung benötigte, Orientierung der Lewis^a Hälften zueinander.

Die hier vorgestellten Lewis Analoga sind nur ein kleiner Ausschnitt dessen, was auf der Zelloberfläche an Antigenen präsentiert wird.

Eine Vielzahl weiterer (artifizier) Lewis Systeme wird vonnöten sein, um einen genaueren Einblick in die molekularen Abläufe der Zell-Zell-Interaktionen via die Glyco-konjugate zu erhalten.

9. Literaturstellen

- [1] a) Voet D.; Voet J. D.; Pratt C. W. *Lehrbuch der Biochemie*; Beck-Sickinger A. G., Hahn U. (Hrsg.); Wiley-VCH: Weinheim, **2002**; 211-236. b) Dwek R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- [2] a) Kopitz K. *Glycolipids: Structure and Function*, Gabius H.-J. und Gabius S., Eds.; Chapman & Hall: London, **1997**; 163-189. b) Sharon N.; Lis H. *Glycopeptides: Structure and Function*, , Gabius H.-J. und Gabius S., Eds.; Chapman & Hall: London, **1997**; 133-162.
- [3] Gabius H.-J. *Naturwissenschaften* **2000**, *87*, 108-121.
- [4] Laine R. A. *The information-storing potential of the sugar code*, Gabius H.-J. und Gabius S., Eds.; Chapman & Hall: London, **1997**; 1-14.
- [5] Sharon N.; Lis H. *Spektrum Wissensch.* **1993**, März, 66-74.
- [6] Singer S. J.; Nicolson G. L. *Science* **1972**, *175*, 720-731.
- [7] Binder W. H.; Barragan V.; Menger F. M. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5980-6007.
- [8] a) Hakomori S.; Handa K.; Iwabuchi K.; Yamamura S.; Prinetti A. *Glycobiology* **1998**, *8*, xi-xix. b) Davis B. G. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1999**, *22*, 3215-3237.
- [9] Boubelik M.; Floryk D.; Bohata J.; Draberova L.; Macak J.; Smid F.; Draber P. *Glycobiology* **1998**, *8*, 139-146.
- [10] a) Imberty A.; Perez S. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4567-4588. b) Hakomori S. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 247-266.
- [11] a) Eggens I.; Fenderson B.; Toyokuni T.; Hakomori S. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 9476-9484. b) Hakomori S. *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 143-151.
- [12] a) Springer T. A. *Ann. Rev. Physiol.* **1995**, *57*, 827-872. b) Bendas G. *Pharm. Ztg.* **1999**, *144*, 3754-3760.
- [13] a) Hakomori S.; Zhang Y. *Chemistry & Biology* **1997**, *4*, 97-104. b) Kannagi R. *Glycoconjugate J.* **2004**, *20*, 353-364. c) Ono M.; Hakomori S. *Glycoconjugate J.* **2004**, *20*, 71-78.
- [14] a) Solter D.; Knowles B. B. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1978**, *75*, 5565-5569. b) Gooi H. C.; Feizi T.; Kapadia A.; Knowles B. B.; Solter D.; Evans M. J. *Nature* **1981**, *292*, 156-158.
- [15] a) Galili U.; Rachmilewitz E. A.; Peleg A.; Flechner I. *J. Exp. Med.* **1984**, *160*, 1519-1531. b) Galili U.; Macher B. A.; Buehler J.; Shohet S. B. *J. Exp. Med.* **1985**, *162*, 573-582.

- [16] a) Kojima N.; Fenderson B. A.; Stroud M. R.; Goldberg R. I.; Habermann R.; Toyokuni T.; Hakomori S. *Glycoconjugate J.* **1994**, *11*, 238-248. b) Henry B.; Desvaux H.; Pristchepa M.; Berthault P.; Zhang Y.-M.; Mallet J.-M.; Esnault J.; Sinaÿ P. *Carbohydr. Res.* **1999**, *315*, 48-62
- [17] a) Christian Gege, *Dissertation*, Universität Konstanz, **2001**.
- [18] a) Geyer A.; Gege C.; Schmidt R. R. *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3382-3385. b) Gege C.; Geyer A.; Schmidt R. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, *15*, 2475-2485.
- [19] Karsten von dem Bruch, *Dissertation*, Universität Mainz, **1993**.
- [20] Armin Geyer, *Habilitation*, Universität Konstanz, **2000**.
- [21] Geyer A.; Hummel G.; Eisele T.; Reinhardt S.; Schmidt R. R. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 981-988.
- [22] Katz A. K.; Glusker J. P.; Beebe S. A.; Bock C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5752-5763.
- [23] Garg H. G.; v. d. Bruch K.; Kunz H. *Developments in the Synthesis of Glycopeptides containing Glycosyl L-Asparagine, L-Serine, and L-Threonine*; In: *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, Inc.: San Diego **1994**, *50*, 277-310.
- [24] Imperiali B. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 452-459.
- [25] Bartsch H.-J. *Taschenbuch mathematischer Formeln: Nachschlagewerk zur höheren Mathematik*, 16. Aufl., Fachbuchverlag: Leipzig, **1994**; 218-222 und 255-260.

Kapitel **III**

Oligosaccharide aus dem Cyanobakterium
Nostoc
Identifizierung und Strukturanalyse

1. Allgemeines

1.1 Cyanobakterien und ihre extra- und intrazellulären Polysaccharide – ein Überblick

Cyanobakterien gehören zur Gruppe gram-negativer Prokaryoten, die eine den Pflanzen ähnliche Photosynthese betreiben und somit autotroph leben können. Sie kommen in sehr vielfältigen Formen und Spezialisierungen vor, so gibt es u.a. auch Arten, die im Dunkeln auf organischen Medien oder unter anaeroben Bedingungen gedeihen. Weiterhin besitzen einige Stämme die Fähigkeit, den Stickstoff der Luft in organischen Molekülen zu fixieren.¹

Nicht nur ihre Lebensweise, auch ihre Morphologie ist von grosser Vielfalt. So existieren z. B. einzellige Formen oder auch fadenförmige Zellkolonien mit enormen Grössenunterschieden. Viele Arten besitzen zudem eine Art Schleimhülle oder Kapsel, die vorrangig zu deren Schutz dient.

Diese Vielfalt spiegelt sich auch im Vorkommen der Cyanobakterien wider. So findet man sie im Boden, im Wasser oder auch in Symbiose mit anderen Arten, z. B. bei manchen Flechten. Ein weiterer Effekt ihrer immensen Variationsbreite ist, dass sich viele Arten an die unterschiedlichsten Bedingungen optimal angepasst haben, und somit auch in extremen Lebensräumen gedeihen können.¹

Die zuvor erwähnte und bei vielen Cyanobakterien auftretende äussere Schleimhülle ist zumeist aus relativ komplexen Polysacchariden aufgebaut. Unter bestimmten Wachstumsbedingungen können solche Polysaccharide auch in wasserlöslicher Form an das umgebende Medium abgegeben werden; man spricht dann von sog. Exopolysacchariden.² Generell handelt sich bei diesen Polysacchariden um komplexe Heteropolymere, die in ca. 80% der Fälle aus 6 bis 10 verschiedenen Monosacchariden aufgebaut sind. Hierbei handelt es sich um: die Hexosen Glucose, Galactose und Mannose, die Pentosen Ribose, Arabinose und Xylose, die Desoxyhexosen Fucose und Rhamnose und die Uronsäuren Glucuron- und Galacturonsäure. Fast allen Polysacchariden gemein ist ihr anionischer Charakter, der auf die enthaltenen Säurefunktionen zurückzuführen ist.³

Als Beispiel sei hier ein aus *Cyanospira capsulata* isoliertes Exopolysaccharid gezeigt, welches ein komplexes Oktasaccharid (Abb. 1) als repetitive Einheit besitzt.⁴

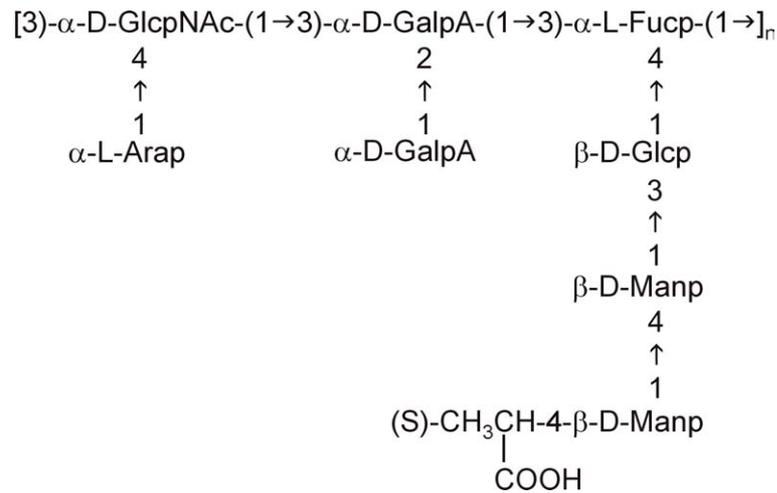


Abb. 1. Repetitive Struktureinheit eines aus *Cyanospira capsulata* isolierten Exopolysaccharids.

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl Menge als auch Zusammensetzung der produzierten Polysaccharide von den Umgebungsbedingungen abhängen und verschiedene Stressparameter, wie Salz oder Hitze, dies beeinflussen können.

So zeigen verschiedene Cyanobakterienarten in Sandkrusten (z. B. Wüste Negev, Israel) eine hohe Temperatur- und Austrocknungstoleranz und die freigesetzten Exopolysaccharide scheinen einen Einfluss auf Wasserspeicherung und -verdunstung zu haben.⁶

Viele Cyanobakterien haben sich auch an einen erhöhten Salzgehalt ihrer Umgebung angepasst. Untersuchungen an sechs N₂-fixierenden Cyanobakterienarten (u. a. *Nostoc* und *Anabaena*) haben gezeigt, dass eine leichte Erhöhung des Salzgehalts (bis 20 mM NaCl) zu einer schwachen Steigerung der Exkretion an Polysacchariden führt, wohingegen ein höherer NaCl-Gehalt sowohl ihren Gehalt an Chlorophyll a, als auch die Ausschüttung von Polysacchariden und Aminosäuren drastisch reduziert.⁷

Es werden allerdings noch viele weitere, mögliche Funktionen der Exopolysaccharide diskutiert. Zum einen als direkte Grenze zwischen der Bakterienzelle und ihrer Umgebung, zum anderen auch als Schutz gegen antibakterielle Reagenzien, wie z. B. Antibiotika, Antikörper oder Phagen.¹

Obwohl weder die Struktur der meisten Exopolysaccharide noch die bestmögliche Kultivierung der entsprechenden Cyanobakterien-Arten hinreichend erforscht sind, werden jene Polysaccharide bereits teilweise industriell genutzt. So hat die Gewinnung aus photosynthetisch aktiven Mikroorganismen gegenüber heterotrophen Bakterien Vorteile, wie z. B. die Anzucht in Abwässern oder die Verwertung von CO₂ aus Industrieanlagen.¹

Besonders ihre rheologischen Eigenschaften, z. B. Einsatz als Verdickungsmittel oder zur Änderung der Fliesseigenschaften wässriger Lösungen unter extremen Bedingungen, sind von besonderem Interesse.³

Vergleichsweise wenig ist über die intrazellulären Saccharide bekannt. Zwar sind Disaccharide wie Saccharose, Trehalose oder auch Glucosylglycerol hinreichend auf ihre Schutzfunktion für die Zellen (allg. für Membranen) bei osmotischem Stress untersucht worden,⁸ und auch polysaccharide Formen wie Glycogen (ein Speicherkohlenhydrat) sind bestens bekannt,⁹ aber gerade der Bereich der kleineren Oligosaccharide, welche von Cyanobakterien unter verschiedensten Bedingungen gebildet werden, ist nur wenig untersucht. So sind in frühen Veröffentlichungen von Tsusue et al.⁵ und in neuesten Veröffentlichungen von Salerno et al.¹⁰ auch einfachere (intrazelluläre) Oligosaccharide beschrieben. Bei den aus *Tolypothrix tenuis*⁵ bzw. *Anabaena* sp.¹⁰ isolierten Sacchariden handelt es sich um eine homologe Reihe sog. Glucofructane, also um eine Kette mit steigender Anzahl an Fructoseeinheiten, welche an einem Ende eine Glucoseeinheit trägt.

Die hier vorgestellten und auf ihre biologische Bedeutung untersuchten Oligosaccharide gehören ebenfalls zur Gruppe der intrazellulären Saccharide, über deren Funktion und Bedeutung nur wenig bekannt ist. Daher ist die im Folgenden vorgestellte, strukturelle Untersuchung jener Oligosaccharide von besonderem Interesse.

1.2 Verwendete *Nostoc*-Stämme und Isolierung ihrer Oligosaccharide

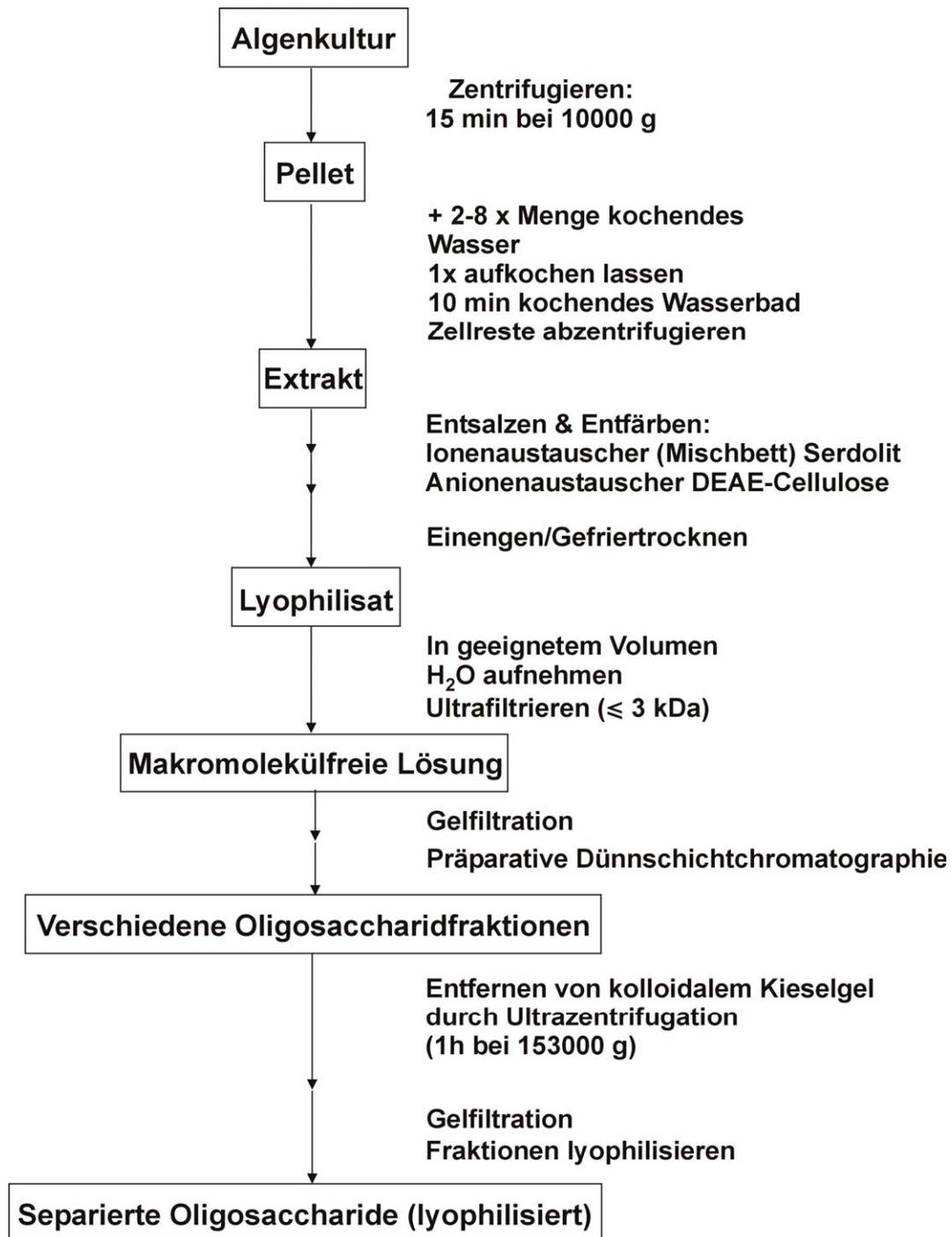
Aus zwei verschiedenen *Nostoc*-Arten – *Nostoc ellipsosporum* und *Nostoc* spec. – wurden die hier untersuchten Oligosaccharide isoliert.

Die kürzeren Oligosaccharide, Tri-, Tetra-, Penta- und z. T. auch Hexasaccharid, stammen aus *Nostoc* spec., welche in Symbiose mit der Flechte *Peltigera horizontalis* vorkommt und aus dieser, wie durch Loos et al. beschrieben, isoliert worden war.¹¹

Die höheren Oligomere – Hexa-, Okta- und Dekasaccharid stammen aus *Nostoc ellipsosporum*. Diese Art wurde von der Sammlung für Algenkulturen Göttingen (SAG) bezogen (Stammnr. 1453-7).

Generell werden die verschiedenen Arten in einer wässrigen, anorganische Salze enthaltenden Lösung 7 – 12 Tage bei 28°C bis zur beginnenden, stationären Phase angezogen. Während der gesamten Zeit werden die Kulturen mit 2% CO₂/Luft begast und einer permanenten Lichtquelle (3.9 W/m²) ausgesetzt. Die Zugabe einer künstlichen N₂-Quelle ist nicht nötig, da die beschriebenen Arten selbständig Luftstickstoff fixieren können.

Um aus diesen Algenkulturen die verschiedenen Oligosaccharide isolieren zu können, wurde folgendes Extraktionsschema angewendet:



Schema 1. Extraktionsschema für Oligosaccharide aus *Nostoc*.*

Im Falle der höheren Oligomere, Okta- und Dekasaccharid, wurde die präparative Dünnschichtchromatographie nicht durchgeführt. Überprüfung mittels HPLC (Gelfiltration über Dionex Säule) ergab < 10% als Summe aller Verunreinigungen.

Tri-, Tetra-, Penta- und Hexasaccharid stammen aus z. T. mit Salz behandelten (2d, 75 mM NaCl) *Nostoc spec.* Kulturen.

* mündliche Mitteilung durch PD Dr. E. Loos

Das Hexasaccharid und die höheren Oligosaccharide – Okta- und Dekasaccharid – wurden aus wärmebehandelten *Nostoc ellipsosporum* Kulturen isoliert (1d bei 40°C).

1.3 Salz oder Wärme als Stressfaktoren – Auswirkungen auf die Kohlenhydratproduktion der hier untersuchten Arten

Bei Zugabe von NaCl (2d, 75 mM) zu *Nostoc spec.* stieg der Gesamtkohlenhydratgehalt auf das bis zu 12-fache im Vergleich zu Kulturen ohne Salzbehandlung. Hierbei interessant ist, dass der Saccharoseanteil am stärksten zunimmt (bis zu Faktor 60), wohingegen die Menge an Trisaccharid nur um Faktor 7 gesteigert wird. Eine spezifische Zunahme der höheren Oligosaccharide kann durch Salzstress nicht erreicht werden, sondern lediglich eine Zunahme des Gesamtgehalts an Kohlenhydraten.

Die Wärmebehandlung von *Nostoc ellipsosporum* Kulturen (1d, 40 °C) führte zu einer max. 9-fachen Steigerung des Gesamtkohlenhydratgehalts, wobei hier allerdings eine spezifische Zunahme der höheren Oligosaccharide (v. a. des Dekasaccharids) zu beobachten war. In nicht wärmebehandelten Kulturen liegt der Dekasaccharidanteil bei ca. 5%, in wärmebehandelten bei ca. 25%, bezogen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt.

Die in den Kapiteln 1.2 und 1.3 beschriebenen Arbeiten und Untersuchungen wurden von der Gruppe um PD Dr. Eckhard Loos (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie, Universität Regensburg) durchgeführt.

1.4 Bekannte Homooligosaccharide und ihre 3D-Struktur

Das bekannteste Beispiel eines homooligomeren Kohlenhydrats ist die Cellulose. Hierbei handelt es sich um β -(1→4)-verknüpfte Glucoseeinheiten. Generell ergeben β -(1→4)-Verknüpfungen band- oder blattartige, langgestreckte Strukturen, neben der Cellulose z. B. auch in Chitin oder Mannan.¹²

Im Gegensatz dazu ergeben α -(1→4)-Verknüpfungen sehr viel flexiblere Strukturen, die eine Tendenz zur Helixbildung zeigen. Dies ist z. B. für Amylose – α -(1→4)-verknüpfte Glucosen – der Fall. Es bildet sich eine linksgängige Helix mit ca. 6 Glucoseeinheiten pro Turn.¹³ Stabilisiert wird die Struktur durch H-Brücken zwischen den einzelnen Glucoseeinheiten.¹²

Die für Maltooligosaccharide – also kürzerkettige Amyloseeinheiten – vorhandenen NMR Daten¹⁴ zeigen jedoch, dass nur die Glucoseeinheit am reduzierenden Ende der Kette deutlich von den anderen Kettengliedern zu unterscheiden ist. Alle übrigen Glucoseeinheiten weisen, unabhängig von ihrer Position innerhalb des Oligomers, dieselben ¹H- und ¹³C-Verschiebungen auf. Dies spricht für eine grössere Flexibilität innerhalb des Oligomers und keine starre 3D-Struktur.

In welcher Weise dies beim Vergleich mit den hier untersuchten Oligomeren von Bedeutung sein wird, werden die nachfolgenden Kapitel zeigen.

2. Identifizierung der isolierten Oligosaccharide und ihrer Struktur

Alle Messungen sind – soweit nicht anders angegeben – bei 300 K und 600.13 MHz Protonenfrequenz in reinem D₂O durchgeführt worden. Geeicht ist auf zugesetztes Aceton ($\delta_{\text{H}} = 2.22$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 30.89$ ppm (CH₃)). Alle relevanten ¹H Spektren mit kompletter Zuordnung und alle 2D HMQC-, TOCSY- und HMBC-Spektren sind inkl. der zugehörigen ¹H- und ¹³C-Verschiebungstabellen im Anhang wiedergegeben.

2.1 Das Trisaccharid Z34

Am Beispiel des Trisaccharids **Z34** soll nachfolgend die Ermittlung der Struktur der isolierten Oligomere gezeigt werden.

Mit Hilfe von 2D DQFCOSY, TOCSY, HMQC und HMBC konnten als erstes die einzelnen Bausteine des Oligomers und ihre Verknüpfung bestimmt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es sich um ein Trisaccharid bestehend aus einer Furanose und zwei α -Pyranosen handelt.

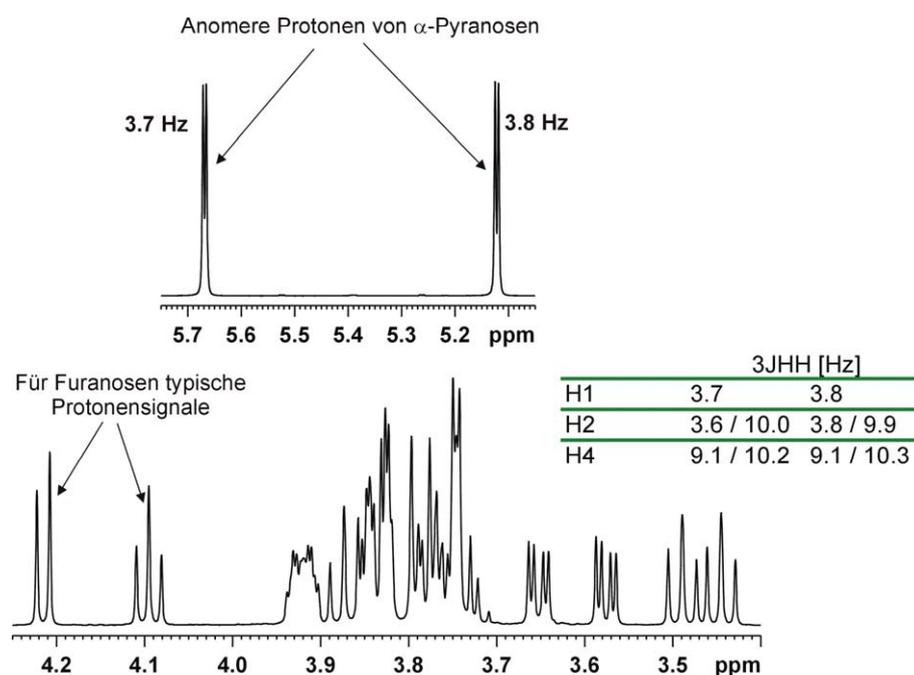


Abb. 2. Erste Hinweise auf die im Oligomer enthaltenen Monosaccharidbausteine aus dem ¹H NMR.

Die Zuordnung der einzelnen Protonen zu den drei enthaltenen Monosaccharidbausteinen war über DQFCOSY und TOCSY ohne Probleme möglich.

Die Art der Verknüpfung der Bausteine untereinander konnte mittels HMBC zweifelsfrei geklärt werden.

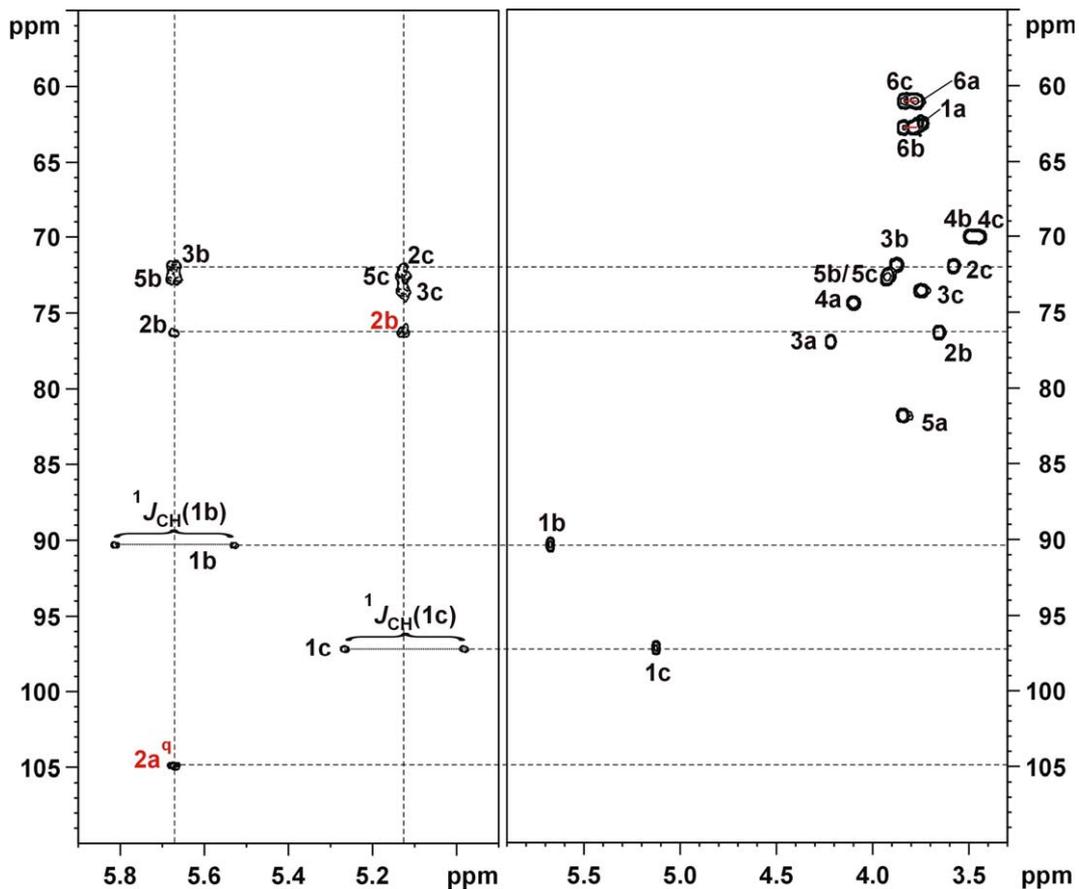


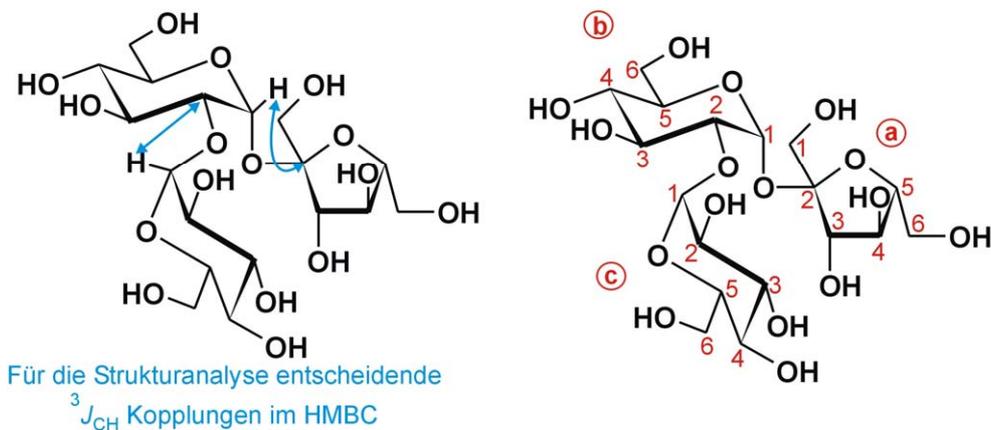
Abb. 3. Anomerenbereich aus dem HMBC (links) von **Z34** mit Vergleich mit dem zugehörigen HMQC (rechts).

Wie der hier abgebildete Ausschnitt aus dem Anomerenbereich des HMBCs zeigt, ist das Anomere bei 5.67 ppm über 2 oder 3 Bindungen vom quartären Kohlenstoff (C2a^q) der Fructoseeinheit entfernt. Daraus ergibt sich eine α -(1→2) glykosidische Bindung.

Weiterhin zeigt das Anomere bei 5.12 ppm ein Signal im HMBC zum C2 der mit Fructose verknüpften Glucoseeinheit, aber keine Signale zu ¹³C Verschiebungen von Kohlenstoffatomen der Fructose. Hieraus ergibt sich wiederum eine α -(1→2) glykosidische Bindung – diesmal zwischen den beiden Glucoseeinheiten.

Da es sich bei dem hier dargestellten HMBC um ein ohne Filter gemessenes HMBC handelt, ist an der Stelle der ¹³C Verschiebung der betrachteten Anomeren ein Dublett zu sehen, dessen Aufspaltung der ¹J_{CH} Kopplungskonstanten der entsprechenden CH-Gruppe entspricht.

Die Analyse des HMBC führt zu folgendem Trisaccharid:



α -D-Glucopyranose-(1→2)- α -D-Glucopyranose-(1→2)- β -D-Fructofuranose

Abb. 4. Strukturformel des Trisaccharids **Z34** mit Numerierung.

Aus den oben angeführten 2D-Spektren ergibt sich folgende Zuordnung im 1H Spektrum:

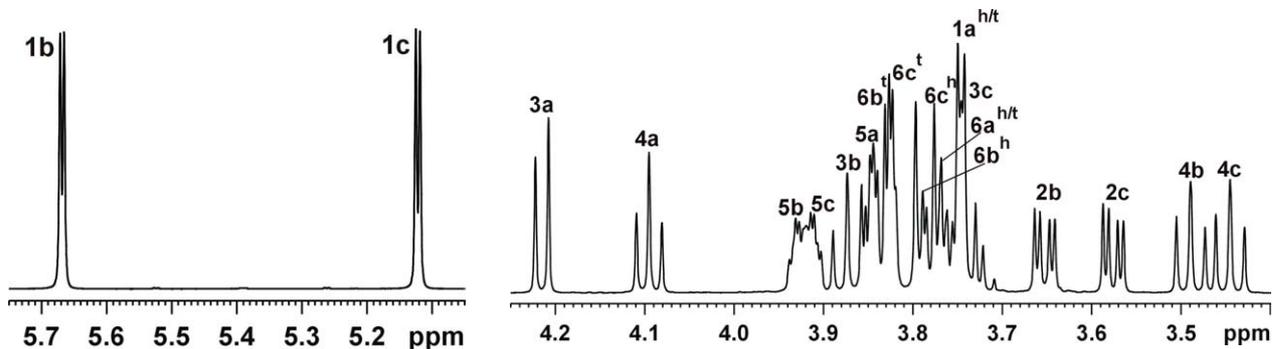


Abb. 5. 1H NMR für **Z34** mit vollständiger Zuordnung (D_2O , 300 K, 600 MHz).

Ein Beleg dafür, dass es sich um zwei Glucose- und nicht um andere Pyranosen (z. B. Galactose) handelt, liefert die Analyse der Kopplungen für H2b, H2c, H4b und H4c.

	H2b	H4b	H2c	H4c
$^3J_{HH}$	3.6 Hz	9.1 Hz	3.8 Hz	9.1 Hz
$^3J_{HH}$	10.0 Hz	10.2 Hz	9.9 Hz	10.3 Hz

Tab. 1. Übersicht über signifikante $^3J_{HH}$ Kopplungen der Glucoseeinheiten in **Z34**.

H2b und H2c zeigen jeweils eine kleine Kopplung, wie es für eine ax – eq Anordnung charakteristisch ist ($\rightarrow \alpha$ konfiguriertes Anomeres) und eine große Kopplung, wie es

für eine ax – ax Anordnung typisch ist. Die Protonen an Position 4 (H4b und H4c) besitzen 2 große (ax – ax) Kopplungen. Würde z. B. eine Galactose vorliegen, so wären beide Kopplungen für H4 klein (2x eq – ax).

Um eine genauere Aussage über die 3-dimensionale Struktur des Trisaccharids machen zu können, wurde ein 2D ROESY Spektrum herangezogen und die signifikanten ROEs integriert.

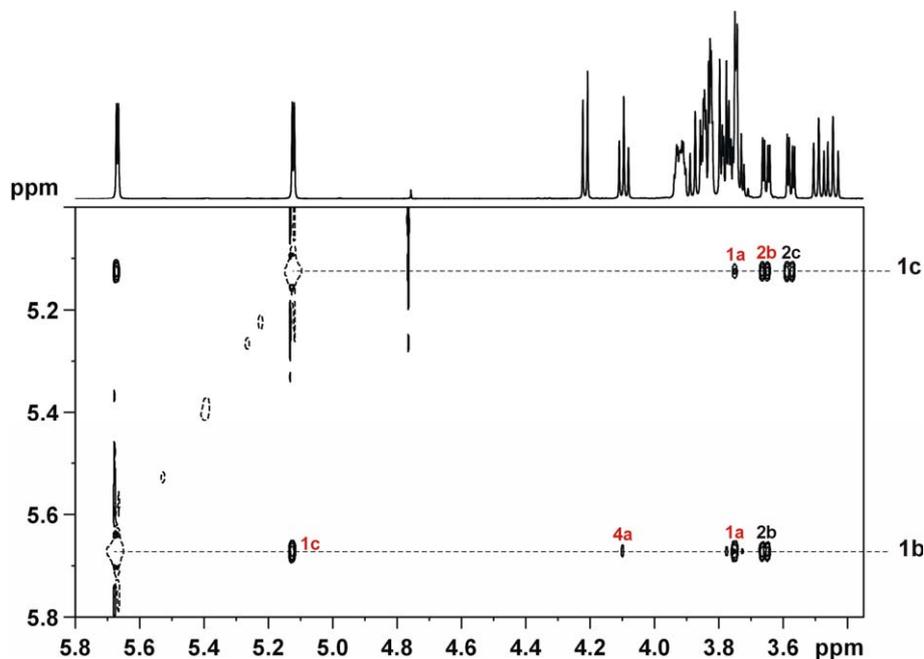


Abb. 6. Ausschnitt aus dem Anomerenbereich des ROESY Spektrums von **Z34** (D₂O, 300 K, 600 MHz).

Charakteristisch sind die 1 – 1 ROEs zwischen den anomeren Protonen und die 1 – 2 ROEs über die O-glykosidische Bindung hinweg. Um die für die O-glykosidische Bindung charakteristischen Winkel Φ und Ψ bestimmen zu können und somit eine Aussage über die Orientierung der Bausteine zueinander zu erhalten, müssen die ROEs integriert werden. Als Eichabstand wird hierzu H1b – H2b herangezogen, der in α -konfigurierten Zuckern einen Wert von 2.4 Å hat.

ROE	Berechneter Abstand in Z34 [Å]
H1b – H1a	2.35
H1b – H1c	2.4
H1b – H4a	3.2
H1b – H2b	≡ 2.4
H1c – H2c	2.4
H1c – H2b	2.4
H1c – H1a	2.9

Tab. 2. Bestimmung signifikanter Protonenabstände in **Z34** aus dem ROESY Spektrum.

Gibt man jene ermittelten ROE Abstände als Restraints in das Modelling Programm HyperChem© ein und lässt nach einer Geometrieoptimierung eine Moleküldynamik Simulation von 2x1 ps (300 K) rechnen, so werden die experimentell ermittelten Parameter in der entsprechenden, gerechneten Struktur gut erreicht.

	Gesetzter Restraint [Å]	Berechneter Restraint* [Å]
H1b – H1a	2.35	2.6
H1b – H1c	2.4	2.3
H1b – H2b	2.4	2.5
H1b – H4a	3.2	3.9
H1c – H2c	2.4	2.45
H1c – H2b	2.45	2.6
H1c – H1a	2.9	2.9

Tab. 3. Für das Modelling von **Z34** gesetzte Restraints. * Abstände aus der energieminierten Struktur nach MD Simulation.

Einziger signifikanter Ausreisser ist der ROE zwischen H1b und H4a in der gerechneten Struktur (fett gedruckt in Tab. 3). Da aber für den a-Ring – die Fructofuranose – ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen Ringpuckeringkonformationen des 5-Ringes zu erwarten ist, ist es nicht verwunderlich, dass ROEs zum a-Ring nicht so exakt in der gerechneten Struktur erreicht werden.

Die Winkel der O-glykosidischen Bindung zwischen den α -(1→2) verknüpften Glucoseeinheiten ergeben sich aus der gerechneten Struktur wie folgt:

- definiert über die Protonen ($\Phi = \text{H1} - \text{C1} - \text{O} - \text{C2}'$, $\Psi = \text{C1} - \text{O} - \text{C2}' - \text{H2}'$)

$$\Phi = -43^\circ \quad \Psi = -38^\circ$$

- definiert über die Schweratome ($\Phi = \text{O5} - \text{C1} - \text{O} - \text{C2}'$, $\Psi = \text{C1} - \text{O} - \text{C2}' - \text{C1}'$)

$$\Phi = +73^\circ \quad \Psi = +82^\circ$$

Nachfolgend ist die gerechnete Struktur des Trisaccharids **Z34** dargestellt.

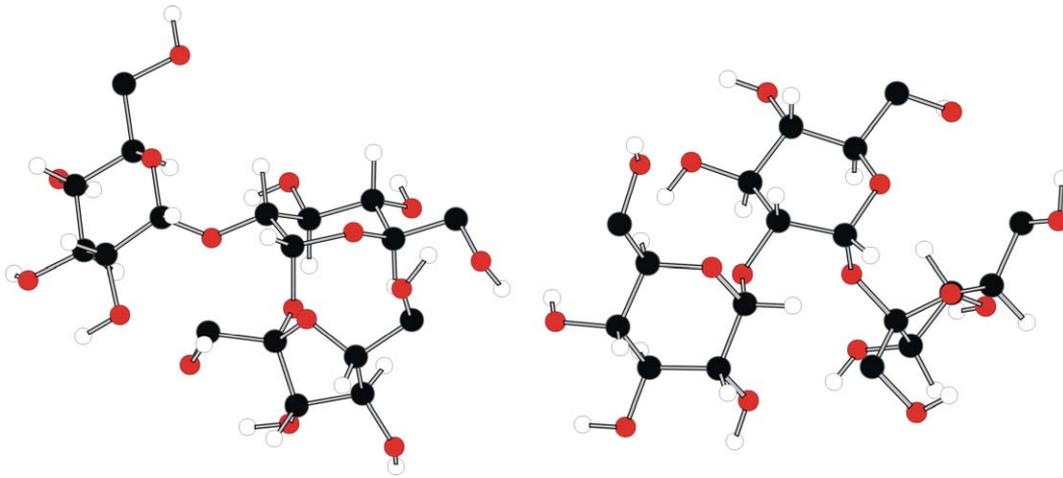
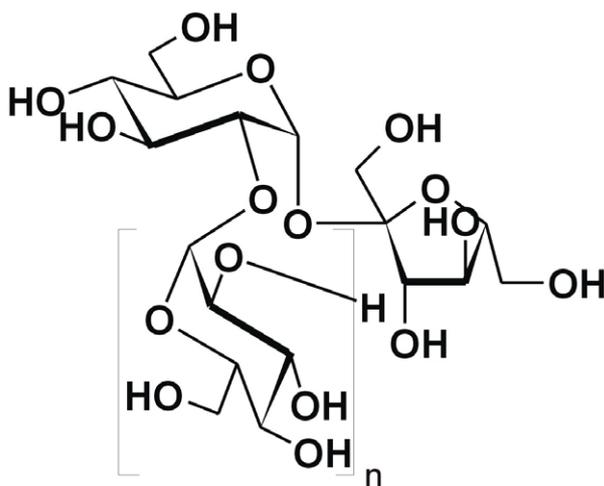


Abb. 7. Zwei Ansichten der, mit HyperChem© berechneten, Struktur von **Z34**.

2.2 Die höheren Homologen – Tetra-, Penta- und Hexasaccharid

Die zur Verfügung stehenden höheren Homologen – das Tetrasaccharid (**HZ34**), das Pentasaccharid (**HHZ34**) und das Hexasaccharid (**Hexa**) – wurden analog zum Trisaccharid **Z34** mittels 2D NMR untersucht. Aufgrund sehr geringer Mengen für jene höheren Oligosaccharide, konnte nur noch für **HZ34** ein HMBC gemessen werden. Da jedoch, wie im Folgenden gezeigt, die ^1H und TOCSY Spektren sowie das Muster der ROEs identisch – nur eben immer für eine Glucoseeinheit mehr – waren, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den höheren Oligosacchariden um die gleichen Verknüpfungsmuster zwischen den einzelnen Zuckerbausteinen handelt, wie für **Z34** gezeigt.



Für Tri-, Tetra-, Penta- bzw. Hexasaccharid ist

$$n = 1, 2, 3 \text{ bzw. } 4$$

Abb. 8. Allgemeine Struktur der untersuchten Saccharide.

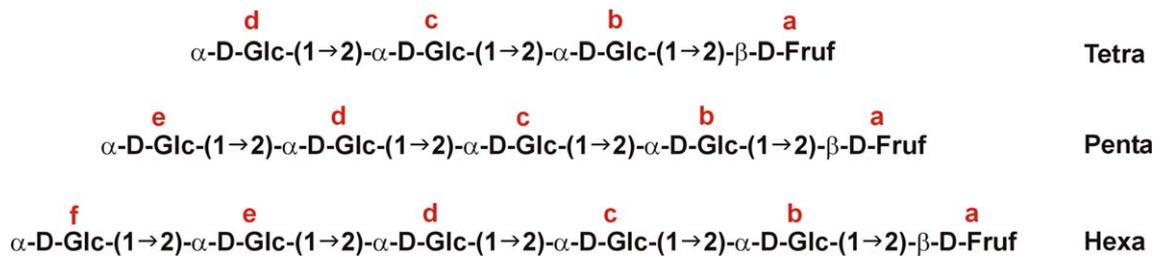


Abb. 9. Übersicht über die hier verwendete Numerierung bei den höheren Oligosacchariden.

Auffallend ist, dass, nicht wie bei anderen homooligomeren Zuckern, die Signale der anomeren Protonen im ^1H NMR mit steigender Kettenlänge „zusammenfallen“, d. h. aufgrund nahezu identischer Verschiebungen nicht mehr unterscheidbar sind. Bei Oligomaltose sind z. B. nur die Signale der Anfangszuckereinheit von den Zuckereinheiten des Mittel- und Endteils zu unterscheiden, so daß die einzelnen Einheiten innerhalb der Kette nicht mehr voneinander getrennt wahrgenommen und bestimmt werden können.

Für die hier beschriebenen Oligosaccharide erhält man jedoch für jedes Monomer innerhalb der Kette eindeutig zuordenbare Signale, je nachdem an welcher Stelle innerhalb des Oligosaccharids sich der Baustein befindet. Am besten lässt sich dies am Anomerenbereich zeigen.

Alle Anomeren sind in ihrer ^1H -Verschiebung deutlich voneinander separiert – die Dispersion dieser Signale ist für das Tetrasaccharid **HZ34** mit 0.60 ppm am grössten. Die nachfolgende Abbildung gibt den ^1H Anomerenbereich für Tri-, Tetra-, Penta- und Hexasaccharid wieder und zeigt, dass sowohl Verschiebung als auch Größe der $^3J_{\text{H}_1,\text{H}_2}$ Kopplung vom Platz des Bausteins in der Kette abhängen.

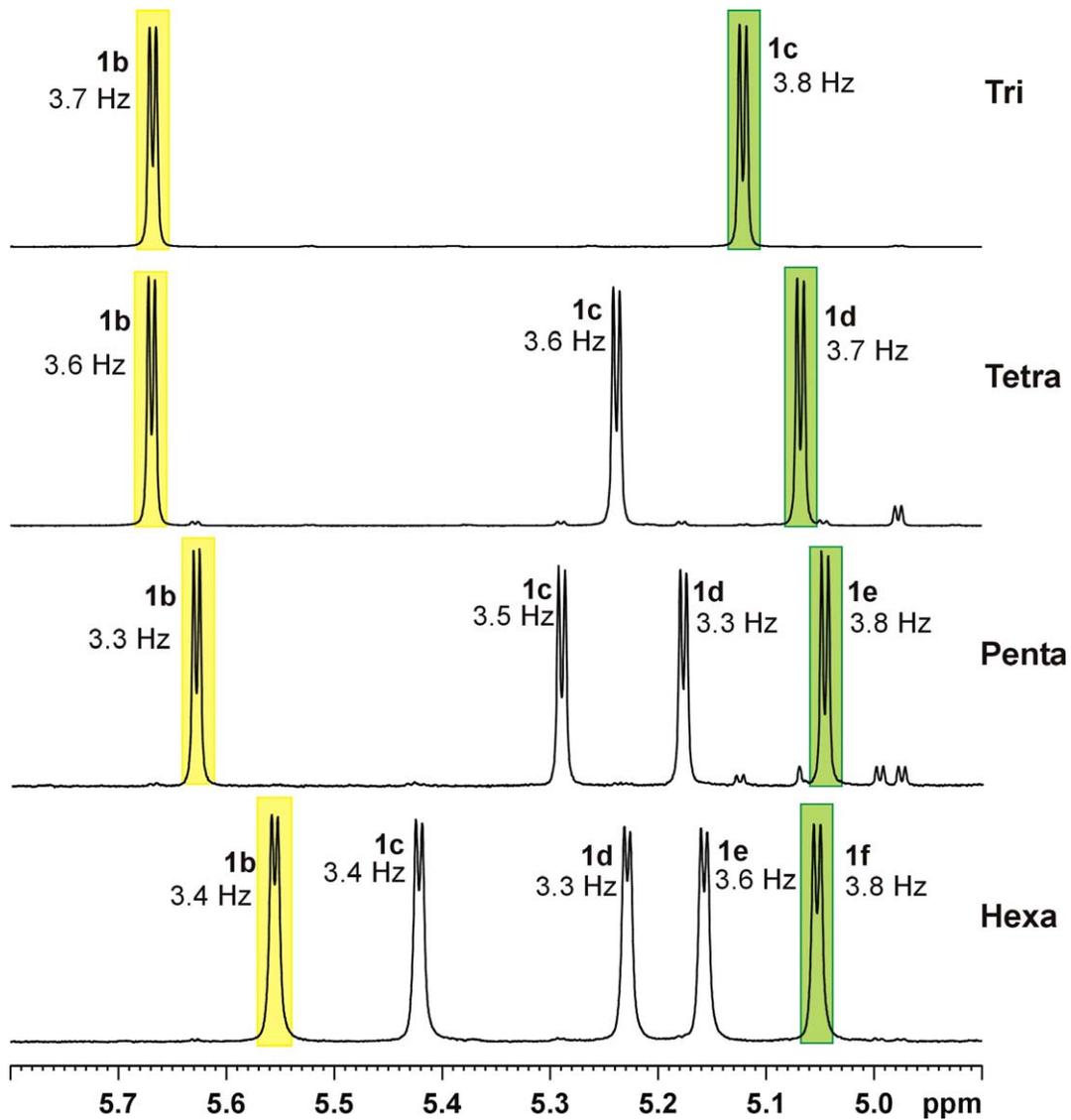


Abb. 10. ^1H Anomerenbereich für Tri-, Tetra-, Penta- und Hexasaccharid (D_2O , 300 K, 600 MHz). Gelb unterlegt ist die erste Glucoseeinheit (1b) nach der Fructofuranose, grün unterlegt die letzte Glucoseeinheit, also das Kettenende, dargestellt.

Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass eine stärker definierte Konformation vorliegen muss, die jeden einzelnen Baustein innerhalb des Oligomers von seinem Nachbarn im NMR unterscheidbar macht.

Einen ähnlichen Effekt sieht man auch, wenn man die ^{13}C -Verschiebungen der Anomeren betrachtet. Auch hier zeigt sich eine Abhängigkeit ihrer Verschiebung vom Platz innerhalb der Kette.

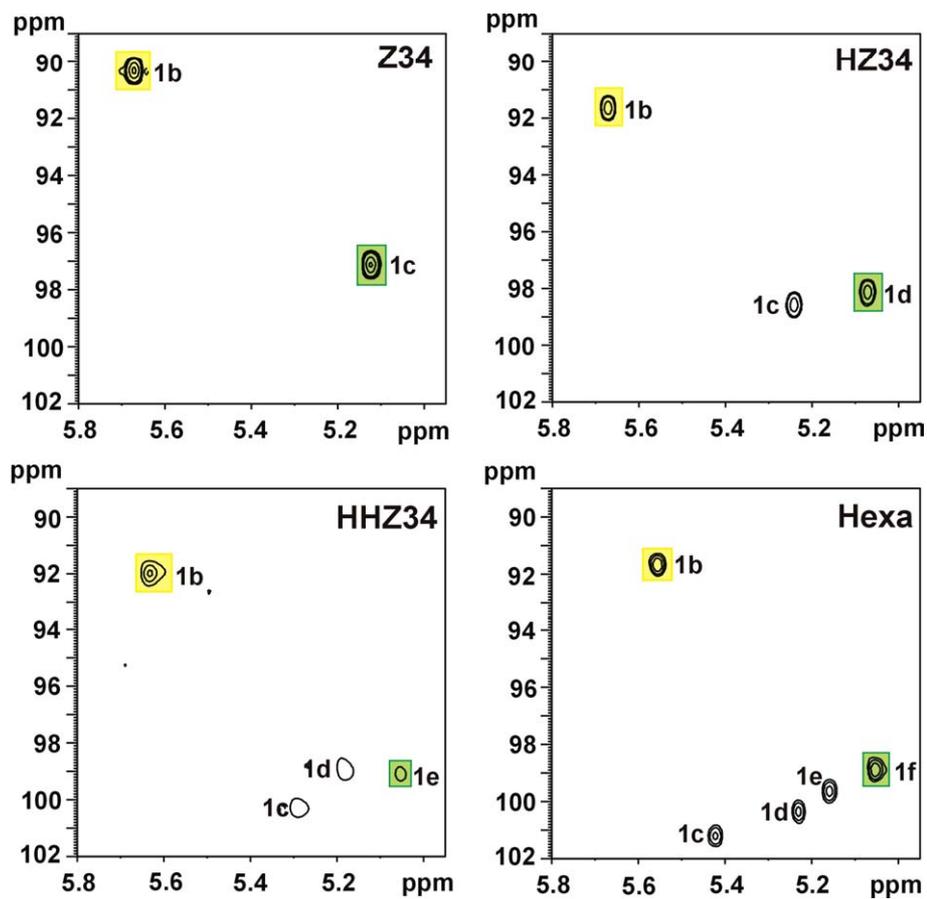


Abb. 11. Anomerenbereiche aus den HMQC Spektren für **Z34**, **HZ34**, **HHZ34** und **Hexa**. (D_2O , 300 K, 600 MHz). Das Anomere der ersten Glucose nach der Fructoseeinheit (1b) ist gelb hinterlegt, das Anomere der letzten Glucose grün.

Die nachfolgende Gegenüberstellung der ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen der anomeren Protonen verdeutlicht nocheinmal die großen Unterschiede der einzelnen Bausteine innerhalb eines Oligomers.

¹H-Shift für die anomeren Protonen

Erste Glucoseeinheit nach Fructofuranose

Letzte Glucoseeinheit mit freier 2OH Position

			1b	1c		
			5,67	5,12		Tri
		1b	1c	1d		
		5,67	5,24	5,07		Tetra
	1b	1c	1d	1e		
	5,63	5,29	5,18	5,05		Penta
1b	1c	1d	1e	1f		
5,56	5,42	5,23	5,16	5,05		Hexa

Glucoseeinheiten im Mittelteil des Oligomers
⇒ dennoch eindeutige Unterscheidung ihrer Position in der Kette möglich

¹³C-Shift für anomere Kohlenstoffe

			1b	1c		
			90,3	97,1		Tri
		1b	1c	1d		
		91,60	98,50	98,10		Tetra
	1b	1c	1d	1e		
	91,90	100,20	98,90	99,00		Penta
1b	1c	1d	1e	1f		
90,7	100,3	99,4	98,7	97,9		Hexa

Abb. 12. Tabellarische Übersicht über die ¹H- und ¹³C-Verschiebungen der Anomeren von Tri-, Tetra-, Penta- und Hexasaccharid.

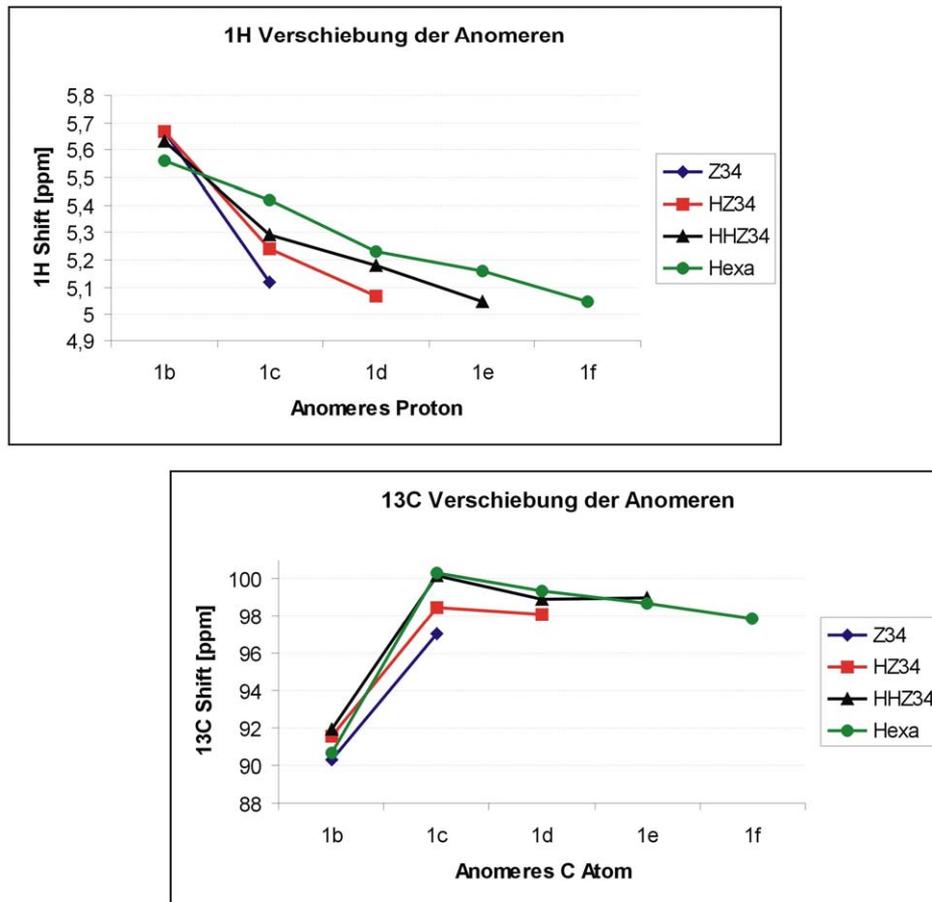


Abb. 13. Graphische Darstellung der anomeren ¹H- und ¹³C-Verschiebungen.

Eine Besonderheit stellt die Abhängigkeit der ¹³C-Verschiebungen (und in geringerem Masse auch der ¹H-Verschiebungen) der C2 Positionen von der Lage innerhalb der Oligomerkette dar. So führt eine Verlängerung des Oligomers stets auch zu einer Änderung im Bereich der ersten an die Fructofuranose anschliessenden Glucose – d. h., der „Anfang“ des Oligosaccharids „bemerkt“ eine Änderung am Ende des Oligomers.

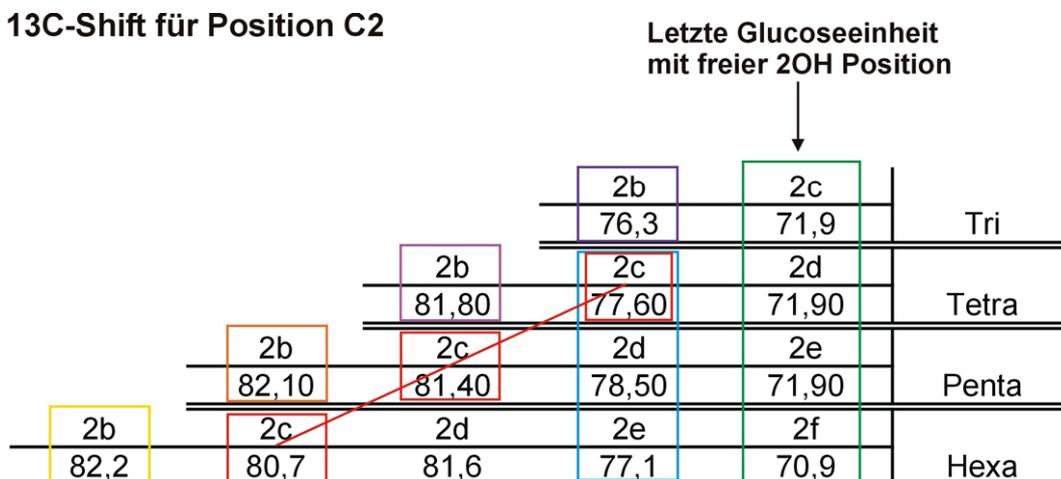


Abb. 14. ¹³C-Verschiebungen für C2 innerhalb der verschiedenen Oligomere.

So bleibt die letzte Glucoseeinheit mit der freien 2OH-Gruppe unberührt von der Kettenverlängerung, wohingegen die erste der Glucoseeinheiten einen deutlichen ^{13}C Tieffeldshift erfährt (5.5 ppm von Tri- auf Tetrasaccharid). Die in Abb. 14 gezeigten Kohlenstoffverschiebungen an C2 führen zu der Erkenntnis, dass die Kette nicht an ihrem Ende verlängert wird, sondern dass eine der Glucosen im Mittelteil „neu hinzu kommt“ – genauer gesagt, die zweite Glucoseeinheit nach der Fructofuranose ist der „neu insertierte“ Baustein.

Ein Vergleich der ROESY Spektren sämtlicher Oligomere zeigt, dass ein eindeutiges ROE Muster vorliegt, welches mit wachsender Kettenlänge zwar zusätzliche long-range ROEs mit sich bringt, aber an sich unverändert bleibt. Wie schon beim Trisaccharid **Z34** sind auch für höhere Oligomere die ROEs über die O-glykosidische Bindung hinweg und die ROEs zwischen den Anomeren benachbarter Glucosen von entscheidender Bedeutung für die Strukturaufklärung.

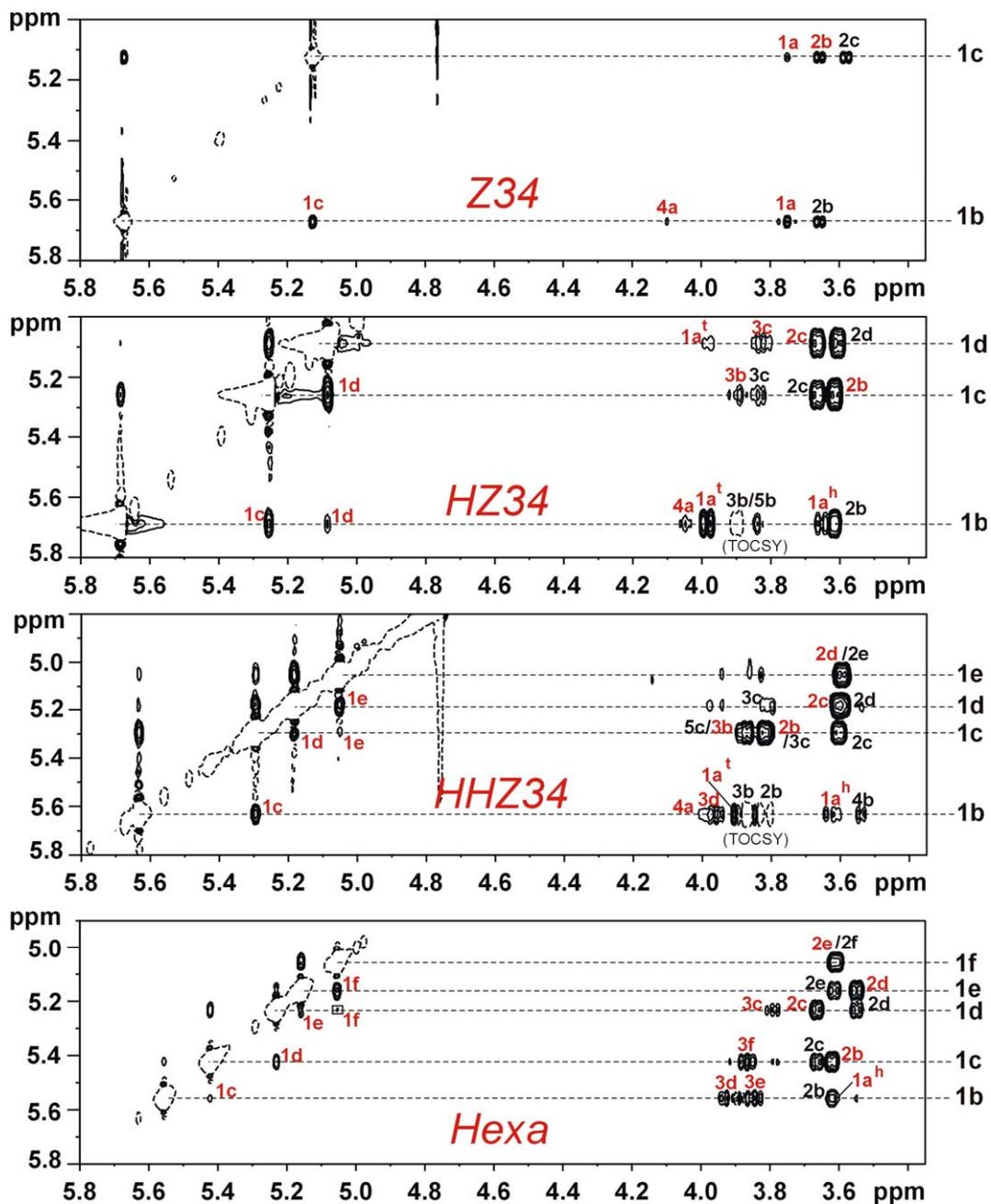


Abb. 15. Ausschnitte der Anomerenbereiche aus den ROESY Spektren von **Z34**, **HZ34**, **HHZ34** und **Hexa** (D₂O, 300 K, 600 MHz). Intraglykosidische ROEs sind schwarz, transglykosidische und long-range ROEs sind rot gekennzeichnet.

Alle gezeigten ROESY Spektren wurden integriert, wobei jeweils auf folgende Eichabstände kalibriert wurde:

- Trisaccharid **Z34**: H1b – H2b ≙ 2.4 Å
- Tetrasaccharid **HZ34**: H1c – H2c ≙ 2.4 Å
- Pentasaccharid **HHZ34**: H1c – H2c ≙ 2.4 Å
- Hexasaccharid **Hexa**: H1e – H2e ≙ 2.4 Å

Hieraus ergaben sich folgende Abstände aus der Integration der ROESY Spektren:

ROE	Aus Integration ermittelte Abstände [Å]			
	Z34	HZ34	HHZ34	Hexa
1 – 1 ROEs				
1b – 1a	h/t: 2.35	h: 3.1 / t: 2.4	h: 3.2	-
1b – 1c	2.4	3.0	2.8	3.4
1c – 1a	h/t: 2.9	-	-	-
1c – 1d	-	2.4	3.0	2.9
1d – 1e	-	-	2.6	3.1
1e – 1f	-	-	-	2.6
1d – 1f	-	-	-	3.8
1 – 2 ROEs				
1b – 2b	≅ 2.4	2.5	-	2.4
1c – 2c	2.4	≅ 2.4	≅ 2.4	2.4
1d – 2d	-	2.3	-	-
1e – 2e	-	-	-	≅ 2.4
1c – 2b	2.4	2.1	2.2	2.1
1d – 2c	-	2.4	-	2.2
1e – 2d	-	-	-	2.1
Long-range ROEs				
1b – 4a	3.2	-	-	-
1c – 3b	-	-	2.4	-
1d – 3c	-	-	-	2.8
1b – 3d	-	-	2.7	-
1b – 3e	-	-	-	2.5
1c – 3f	-	-	-	2.4

Tab. 4. Übersicht über alle durch Integration der ROESY Daten erhaltenen Protonen Abstände.

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- die 1–1 ROEs zwischen aufeinanderfolgenden Glucosen sind **relativ intensitäts-schwach** und somit die zugehörigen **Abstände lang**
- die 1–2 ROEs über die O-glykosidische Bindung hinweg sind **stark** und somit die entsprechenden **Abstände kurz**
- im Hexasaccharid sind ROEs von best. Anomeren zum H3 der drittnächsten Glucoseeinheit vorhanden (long-range ROEs)

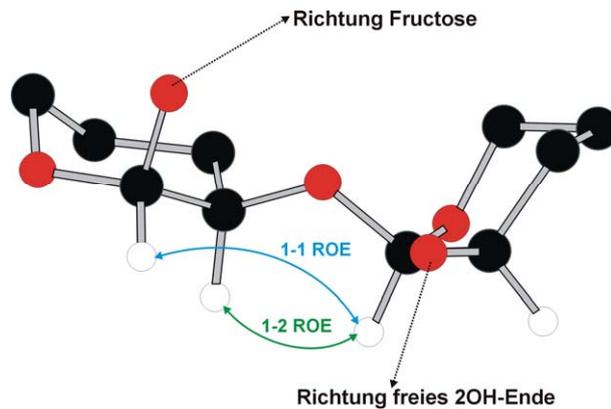


Abb. 16. Schematische Darstellung der charakteristischen 1 – 1 und 1 – 2 ROEs. Zwei Glucoseeinheiten als Ausschnitt aus der gerechneten **Hexa** Struktur.

Die aus jenen ROE Abständen resultierenden, gerechneten Strukturen sind in 2.4 näher dargestellt.

2.2.1 Vergleich mit homooligomeren Zuckern – am Beispiel von Maltotetraose

Die Oligomaltose besitzt α -(1 \rightarrow 4)-O-glykosidische Bindungen – ein Verknüpfungsmuster, welches mit den hier vorliegenden α -(1 \rightarrow 2)-O-glykosidischen Bindungen verglichen werden kann.

Im Folgenden werden die ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen und die zugehörigen Spektren von Maltotetraose **M4** und Pentasaccharid **HHZ34** in D_2O bei 300 K verglichen.

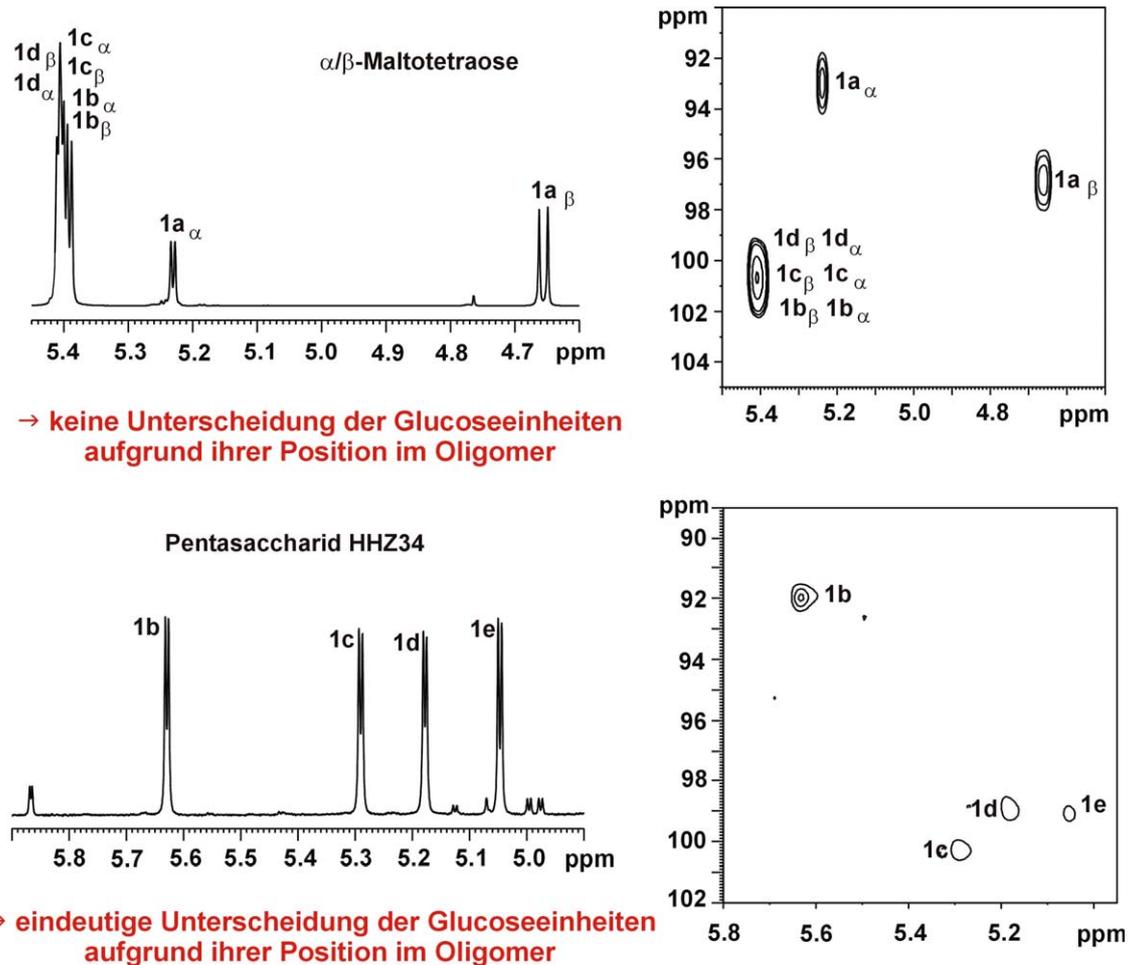


Abb. 17. Vergleich von ^1H - und HMQC-Anomerenbereich für **M4** und **HHZ34** in D_2O (300 K, 600 MHz).

Es ist klar zu erkennen, dass für Maltotetraose die ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen der Glucoseeinheiten in der Kette nicht aufgrund ihrer Position in der Kette voneinander unterscheidbar sind, was hingegen beim Pentasaccharid **HHZ34** – und allgemein bei den hier untersuchten Oligosacchariden – sehr wohl der Fall ist. Dies bedeutet, dass für Maltotetraose keine eindeutige 3D-Struktur zu erkennen ist, sondern vielmehr aufgrund der hohen Flexibilität nur eine Mittelung mehrerer Konformationen vorliegt. Für höhere Maltooligosaccharide wurde kürzlich rechnerisch eine schwache Bevorzugung einer linksgängigen Helix postuliert.¹⁵

Auch Abb. 18 verdeutlicht dies nochmals an der Dispersion der ^{13}C -Verschiebungen der Anomeren für **M4** und **HHZ34**.

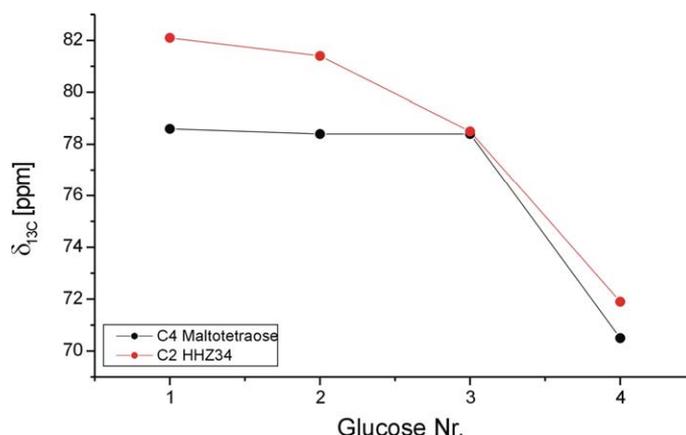


Abb. 18. Graphische Darstellung der anomeren ^{13}C -Verschiebung für **M4** und **HHZ34**.

Eine Tabelle mit sämtlichen ^{13}C -Verschiebungen für **M4** im Vergleich mit **HHZ34** ist im experimentellen Teil wiedergegeben.

2.2.2 Abhängigkeit der chemischen Verschiebung von der Temperatur am Beispiel des Hexasaccharids

Über die temperaturabhängige Verschiebung von CH-Protonen, z. B. wie hier der Anomeren, lassen sich zwar keine direkten Schlüsse auf die Struktur ziehen (wie z. B. für OH Protonen bei Beteiligung an H-Brücken), es sollte aber zumindest an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Anomerenprotonen des Hexasaccharids (in D_2O) deutliche Unterschiede in ihrer chemischen Verschiebung in Abhängigkeit von der Temperatur aufweisen. Eine starke Temperaturabhängigkeit kann durchaus auf eine stark geordnete (also wenig flexible) Struktur hindeuten.

Aufgenommen wurde eine Temperaturreihe von 280 – 310 K in 5 K Schritten.

Steigungen der gefitteten Geraden:

Atom	Steigung [Hz/K]	Steigung [ppb/K]
H1b	-0.21	-0.35
H1c	-0.90	-1.50
H1d	+0.49	+0.82
H1e	+0.14	+0.23
H1f	-0.07	-0.12
H3a	-0.09	-0.15

Tab. 5. Berechnete Steigungen der Geraden bei Auftragung der chemischen Verschiebung δ in Abhängigkeit von der Temperatur (**Hexa**, D_2O , 600 MHz).

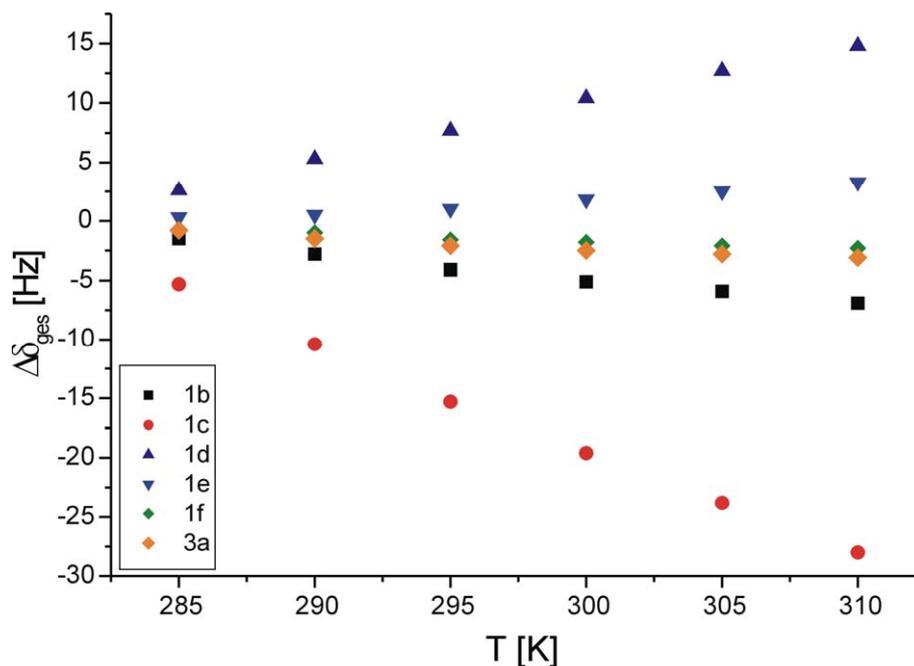


Abb. 19. Graphische Darstellung der Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Anomeren des Hexasaccharids (D_2O , 600 MHz).

Das Anomere am f-Ring (also der letzten Glucoseeinheit) zeigt einen ähnlich schwachen Hochfeldshift wie das als Referenz verwendete Proton H3a aus der Furanoseeinheit. Eine etwas stärkere Temperaturabhängigkeit zeigen H1b (Hochfeldshift) und H1e (Tieffeldshift). Die stärkste Temperaturabhängigkeit jedoch besitzen H1c (Hochfeldshift) und H1d (Tieffeldshift) – also die Anomeren der Ringe in der Mitte des Oligomers.

Die geringe Temperaturabhängigkeit für die erste und letzte Zuckereinheit (Ringe a und f) lässt sich durch eine erhöhte Flexibilität der Enden im Vergleich zum Mittelteil der Helix erklären, da durch die geringere Fixierung der Enden bei Temperaturerhöhung keine extremen Änderungen der Struktur bzw. der strukturellen Umgebung zu erwarten sind.

Eine Tabelle mit den genauen Werten für δ_H [Hz] sowie die zugehörigen 1H -Ausschnitte sind im experimentellen Teil bzw. im Anhang wiedergegeben.

2.3 Ermittlung der Orientierung der Fructofuranose und der OH-Gruppen

Um etwas genauere Aussagen über die Funktion des Kopfendes, also die Fructofuranose, und ihre Orientierung in Bezug auf die Glucosekette treffen zu können wurden Messungen einzelner Oligosaccharide in anderen Lösungsmitteln als D_2O vorgenommen. Ebenfalls interessant ist, ob über die Orientierung der OH-Gruppen bzw. über evtl. vorliegende H-Brücken etwas ausgesagt werden kann.

Die zugehörigen 2D Spektren inkl. Zuordnung sowie Tabellen mit den jeweiligen chemischen Verschiebungen sind im Anhang wiedergegeben.

2.3.1 Trisaccharid **Z34** in CaCl₂-gesättigtem Methanol

Das, wie in Kapitel I verwendete, Verfahren zum Sichtbarmachen von Hydroxyprotonen in methanolischer Lösung kam auch im Fall von **Z34** zur Anwendung. Da **Z34** in reinem MeOH unlöslich ist, wurde es durch Zusatz von CaCl₂ in Lösung gebracht. Aufgrund relativ breiter Signale bei nicht vollständig CaCl₂-gesättigter Lösung musste die Probe solange mit CaCl₂ versetzt werden, bis eine Sättigung erreicht war. Hierauf konnte eine Messung bei 300 K mit befriedigender Darstellung der OH-Signale erfolgen.

Ziel ist es, signifikante ROEs zwischen OH- und CH-Protonen bzw. Autauschsignale zwischen verschiedenen OH-Protonen zu ermitteln.

Die Zuordnung erfolgte über 2D DQFCOSY und ROESY Spektren.

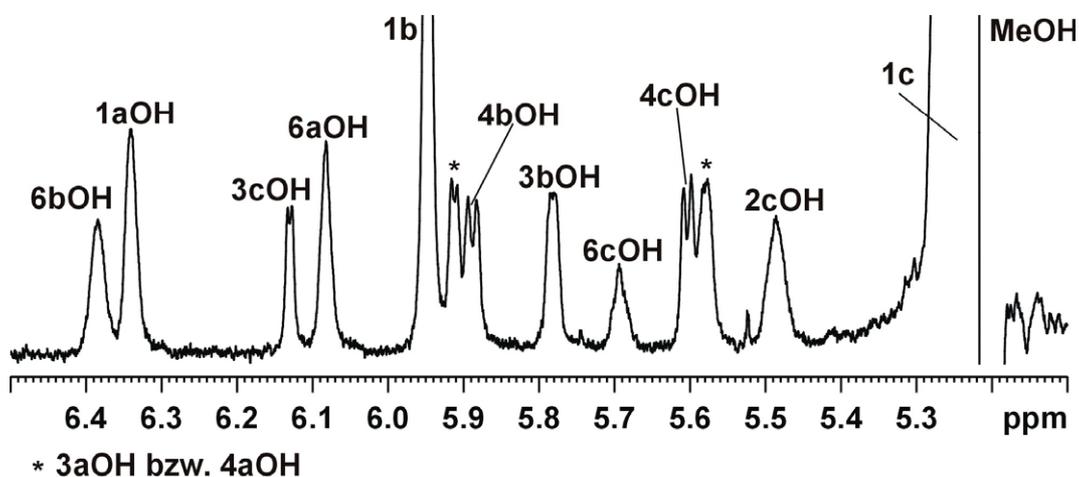


Abb. 20. ¹H OH- und Anomerenbereich für **Z34** in MeOH 1:1, + CaCl₂ (gesättigt). Aufgrund des großen MeOH Signals bei ~ 5.2 ppm ist hier das ¹H Spektrum mit Vorsättigung dargestellt (300 K, 600 MHz).

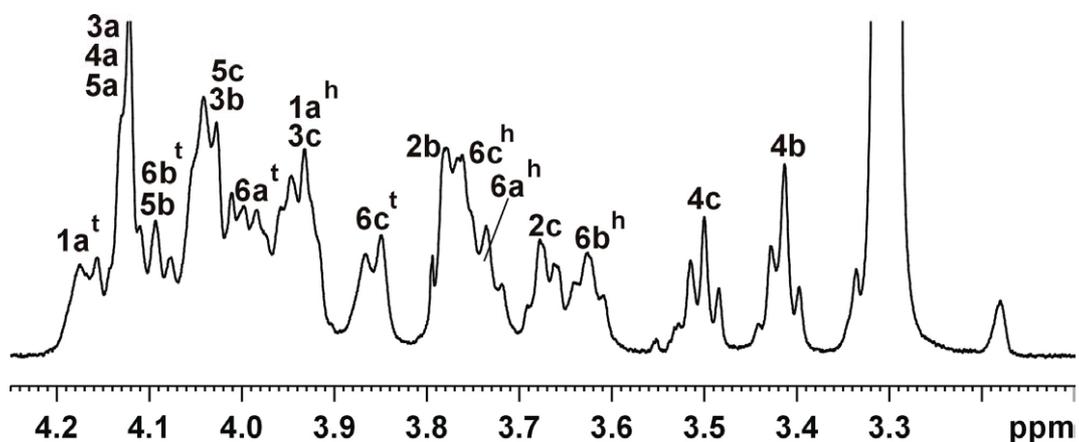


Abb. 21. ¹H Alkylbereich für **Z34** in MeOH 1:1, + CaCl₂ (gesättigt) (¹H presat, 300 K, 600 MHz).

Die eindeutige Zuordnung von 3aOH und 4aOH ist trotz unterschiedlicher ROEs nicht möglich, da eine Unterscheidung zwischen H3a und H4a nicht getroffen werden kann. Ein Vergleich mit einer nicht vollständig CaCl_2 -gesättigten Probe legt aufgrund der Signalform und der Signalverschiebungen nahe, dass das Signal bei 5.91 ppm 4aOH, das bei 5.58 ppm 3aOH entspricht. Allerdings kann dies nicht durch vergleichbare ROE Muster bestätigt werden.

Ausschnitte aus dem OH-/Anomerenbereich der Protonenspektren für **Z34** in MeOH mit wenig CaCl_2 und CaCl_2 -gesättigt, sowie ein Vergleich der ROEs für 3aOH und 4aOH sind im Anhang wiedergegeben.

Die Auswertung des ROESY Spektrums der CaCl_2 -gesättigten Probe von **Z34** in MeOH ($d_3:d_4$) ergab keine long-range ROEs zwischen OH- und CH-Protonen, die für eine weitere Verbesserung der Strukturrechnung herangezogen werden könnten. Die Ausschnitte aus dem entsprechenden ROESY Spektrum sind im Anhang gezeigt.

Daher wurde schliesslich auf ein dem Wasser weniger vergleichbares, organisches Lösungsmittel zurückgegriffen – DMSO_{d_6} – um doch noch Aussagen über die Ausrichtung der Furanoseeinheit mit Hilfe der OH ROEs machen zu können. Wie im folgenden Kapitel gezeigt, sollte eine Vergleichbarkeit und Kombination der Daten aus D_2O und DMSO_{d_6} Messungen möglich sein.

2.3.2 Tetrasaccharid **HZ34** in DMSO_{d_6}

Die Zuordnung aller Signale inkl. aller OHs für **HZ34** in DMSO_{d_6} erfolgte mit Hilfe von 2D DQFCOSY, TOCSY, HMQC und ROESY.

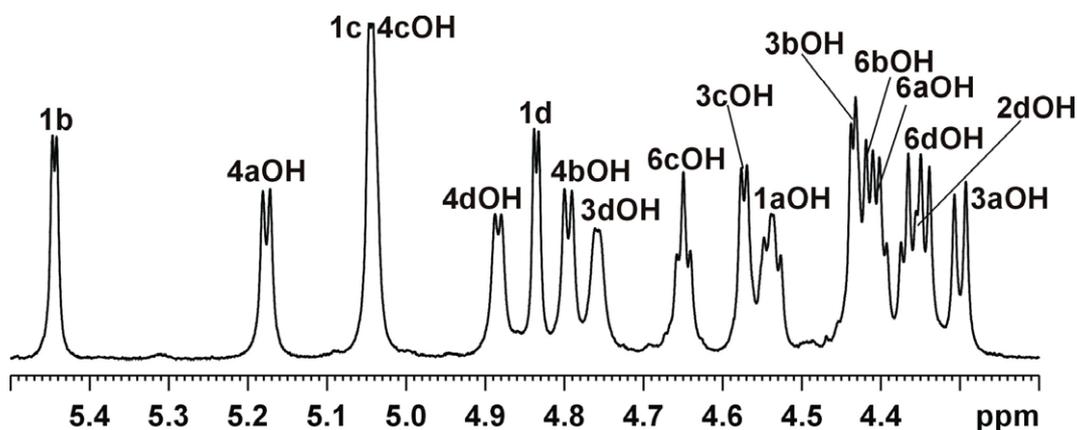


Abb. 22. ^1H Anomeren- und OH-Bereich für **HZ34** in DMSO_{d_6} (300 K, 600 MHz).

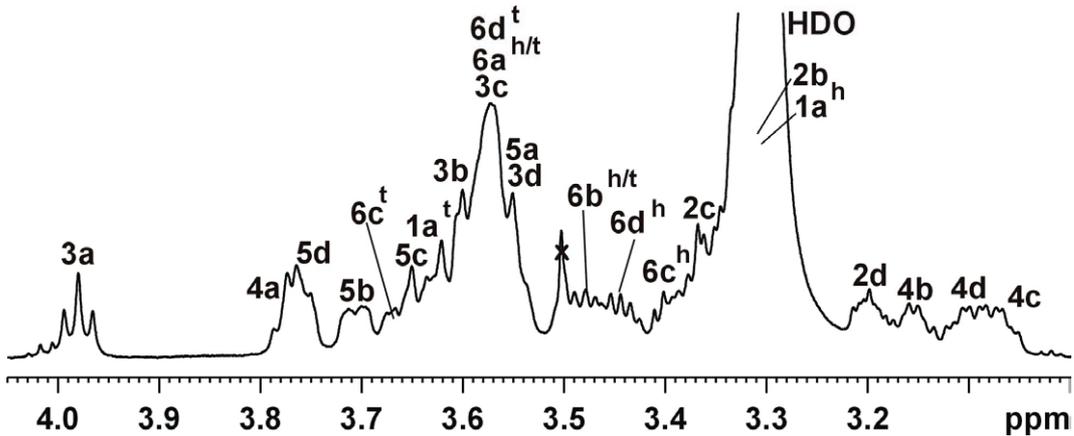


Abb. 23. ^1H Alkylbereich für **HZ34** in DMSO_{d_6} (300 K, 600 MHz).

Das ROESY Spektrum ergab, dass die für **HZ34** in D_2O charakteristischen ROEs auch in DMSO_{d_6} vorhanden sind, so dass man davon ausgehen kann, dass in DMSO_{d_6} **HZ34** in derselben Struktur vorliegt wie in D_2O . Deshalb können auch die aus dem nachfolgend gezeigten ROESY Spektrum ermittelten CH- / OH- bzw. OH- / OH-ROEs für die Strukturoptimierung von **HZ34** herangezogen werden.

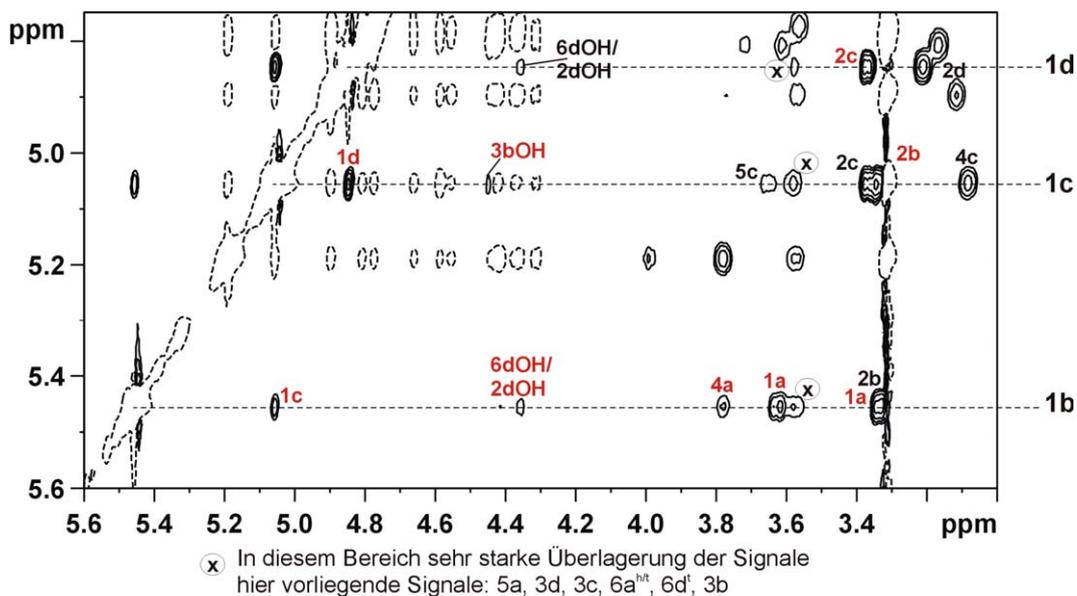


Abb. 24. ROEs der Anomeren von **HZ34** in DMSO_{d_6} (300 K, 600 MHz). Intraglykosidische ROEs sind in schwarz, transglykosidische und long-range ROEs sind in rot dargestellt.

CH- / CH- ROEs	
1b – 1c	3.2 (3.0)
1c – 1d	2.7 (2.4)
1d – 2d	≡ 2.4 (2.3)
1d – 2c	2.4 (2.4)
1b – 4a	3.1 (-)

Tab. 6. Übersicht über die für **HZ34** in DMSO_{d6} ermittelten CH- / OH- bzw. OH- / OH- ROEs und der Vergleich signifikanter CH- / CH- ROEs mit Werten für **HZ34** in D_2O (in Klammern).

Diese, die OH Protonen betreffenden, ROEs finden bei der in 2.4 gezeigten Strukturanalyse der Oligosaccharide als zusätzliche Restriants Anwendung.

Um H-Brücken zwischen OH- (bzw. NH-) Protonen in DMSO_{d6} nachweisen zu können, wird die entsprechende Probe mit D_2O titriert. Hierbei kommt es aufgrund des Isotopeneffekts zu einer Verdoppelung der OH-Signale, die an einer H-Brücke als Protonendonoren beteiligt sind. Ansonsten führt die Zugabe von D_2O zu einer DMSO_{d6} Probe lediglich zu einer Verringerung der Intensität der OH-Signale, da mit steigender D_2O Menge immer mehr OH-Protonen gegen Deuterium ausgetauscht werden, welche selbstverständlich im ^1H nicht sichtbar sind.

Eine genauere Erläuterung dieses Sachverhalts ist in Kapitel I / 3 dargestellt.

So sollte die Titration der **HZ34** Probe in DMSO_{d6} mit D_2O Aufschluss darüber geben, ob und wenn ja welche OH-Protonen an einer H-Brücke beteiligt sind.

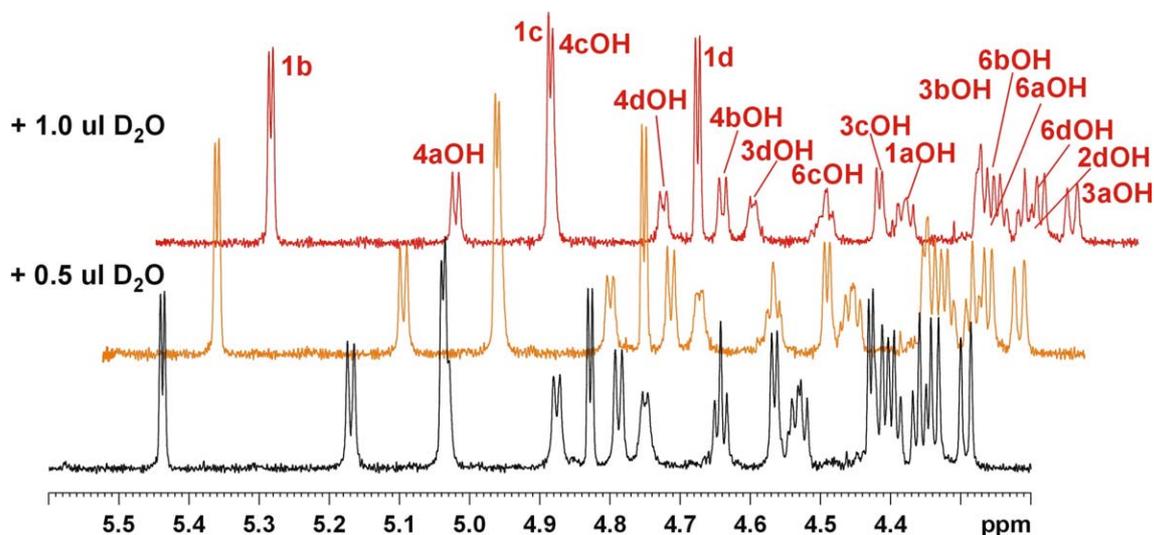


Abb. 26. Titration von **HZ34** in DMSO_{d6} mit D_2O (300 K, 600 MHz). Dargestellt ist der Anomeren- und OH-Bereich.

Wie aus Abb. 26 ersichtlich, zeigt keines der OH-Protonen von **HZ34** einen Isotopeneffekt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass keine stabilen H-Brücken zwischen den OH-Protonen der einzelnen Zuckerbausteine auftreten. Es ist aller-

dings allgemein bekannt, dass Wasserstoffbrücken in Zuckermolekülen nur schwer greifbar sind, da sie nur schwach sind oder nur transient vorkommen. Die Pseudotriplettstruktur der primären OH-Protonen – auch ohne Zugabe von D₂O – ergibt sich aus der benachbarten diastereotopen CH₂-Gruppe, bei welcher jedes der beiden Protonen eine zum OH-Proton verschiedene Kopplung aufweist.

2.4 Berechnung der Struktur am Beispiel des Hexasaccharids

2.4.1 Strukturberechnung basierend auf CH-/CH-Restraints

Um eine genauere Vorstellung von der 3-dimensionalen Struktur der höheren Oligomere zu erhalten, wurden die, aus der Integration der ROESY Kreuzsignale, erhaltenen Protonenabstände für das Hexasaccharid in D₂O bei 300 K als Restraints in HyperChem© gesetzt.

ROE	Gesetzter Abstand [Å]
H1b – H1c	3.4
H1c – H1d	2.9
H1d – H1e	3.1
H1e – H1f	2.55
H1d – H1f	3.75
H1c – H2b	2.1
H1d – H2c	2.2
H1e – H2d	2.1
H1d – H3c	2.8
H1b – H3e	2.5
H1c – H3f	2.4
H2c – H4c	2.55
H3c – H5c	2.55
Federkonstante = 7 (default)	

Tab. 7. Für die MD Simulation des Hexasaccharids gesetzte Abstände.

Die beiden letztgenannten Restraints wurden als intraglykosidische Restraints gesetzt, um die Stabilität der Sesselstruktur des c-Rings zu gewährleisten. Dieser hatte bei einer der ersten Energieminimierungen gezeigt, dass – aufgrund der an ihm angreifenden Restraints – die Sesselstruktur nicht beibehalten wird, sondern ein Umklappen in die Wannenkonformation erfolgt. Dieser Umstand ist entweder darauf zurückzuführen, dass zuviele Restraints an denselben Protonen des c-Ringes angreifen oder dass sich die erhaltenen ROEs aus der Mittelung mehrerer Strukturen ergeben und somit nicht innerhalb einer Struktur gefittet werden können.

Soweit die ³J_{HH} Kopplungen aus dem Lorentz-Gauss-transformierten ¹H Spektrum ablesbar sind, ergeben sich keine Hinweise auf eine veränderte Ringkonformation für Ring c.

Nach einer Energieminimierung der Struktur (inkl. Restraints) wurde eine Moleküldynamik Simulation mit 10 x 10 ps gerechnet. Nach jeweils 10 ps MD Simulation bei 300 K wurde ein Snapshot gespeichert. Diese insgesamt 10 Snapshots wurden anschliessend überlagert und die daraus erhaltene, gemittelte Struktur nochmals energieminimiert.

Aus jener ergaben sich folgende Protonenabstände:

ROE	Gesetzter Abstand [Å]	Abstand aus energieminimierter Struktur* [Å]
H1b – H1c	3.4	2.5
H1c – H1d	2.9	3.3
H1d – H1e	3.1	3.1
H1e – H1f	2.55	2.4
H1d – H1f	3.75	3.8
H1c – H2b	2.1	2.5
H1d – H2c	2.2	2.1
H1e – H2d	2.1	2.1
H1d – H3c	2.8	3.8
H1b – H3e	2.5	2.55
H1c – H3f	2.4	2.35
H2c – H4c	2.55	2.7
H3c – H5c	2.55	2.75

Tab. 8. Gesetzte und berechnete ROE Abstände für **Hexa**. * Struktur aus 10x10 ps MD Simulation mit anschliessender Energieminimierung

Bestimmung der Φ - und Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen des Hexasaccharids:

	Φ [°]	Ψ [°]
b – c	81	169
c – d	84	138
d – e	85	118
e – f	72	90

Tab. 9. Aus der gemittelten Struktur des Hexasaccharids ermittelte Φ - und Ψ -Winkel. Diese sind über die Schweratome definiert (siehe 2.1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht nur mehrere charakteristische ROEs in der erhaltenen Struktur schlecht gefittet sind (fett gedruckt in Tab.8), sondern dass auch die Varianz im Ψ -Winkel innerhalb des Oligomers beträchtlich ist. Da der Fehler in der Integration der ROE Signale relativ gering ist und es sich bei den abweichenden ROEs nicht um schlecht zu integrierende Signale handelt, müssen andere Gründe für die Abweichungen vorliegen. Auffallend ist, dass die schlecht

gefitteten ROEs alle c- und b-Ring betreffen; zuvor hatte sich ja schon gezeigt, dass die Sesselkonformation des c-Rings nicht stabil ist. Da alle restlichen gesetzten Restraints sehr gut zu der gerechneten Struktur passen, könnte eine grössere Flexibilität des einen Endes des Oligomers – nämlich der Bereich mit der Fructoseeinheit – ein Grund für die Abweichungen sein. Eine erhöhte Flexibilität führt zu gemittelten ROEs aus zwei oder mehreren Konformationen, welche dann nicht zu einer definierten, gerechneten Struktur passen können.

Dennoch sei nachfolgend die für das Hexasaccharid berechnete Struktur gezeigt:

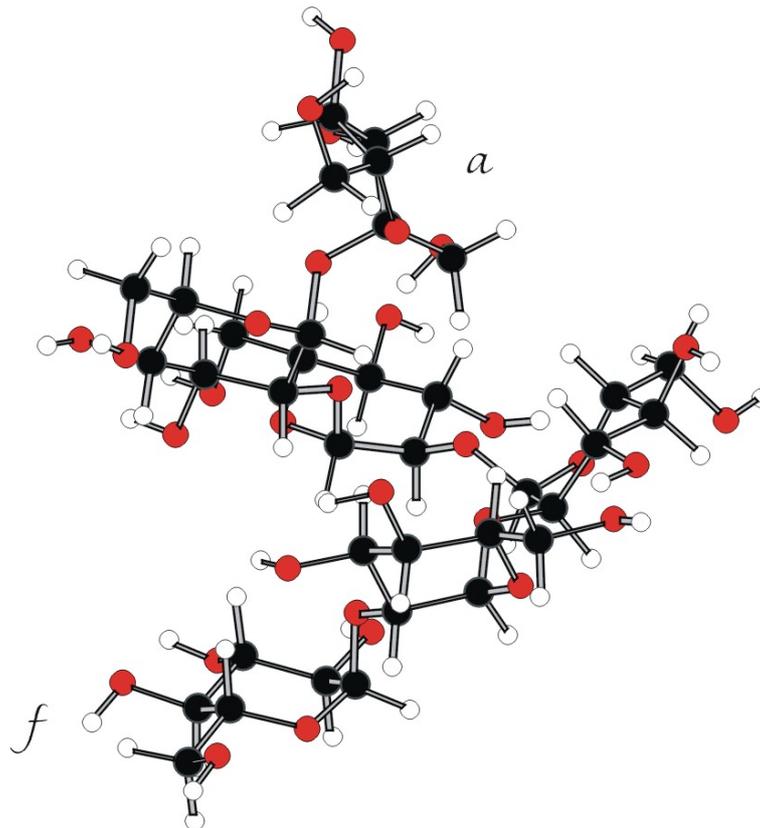


Abb. 27. Struktur des Hexasaccharids – gemittelte Struktur aus MD Simulation (10 x 10 ps bei 300 K).

→ Helikale Struktur mit einer Ganghöhe von 4 Glucoseeinheiten

Um die helikale Struktur besser erkennen zu können, ist in der nächsten Abbildung die Fructofuranoseeinheit entfernt.

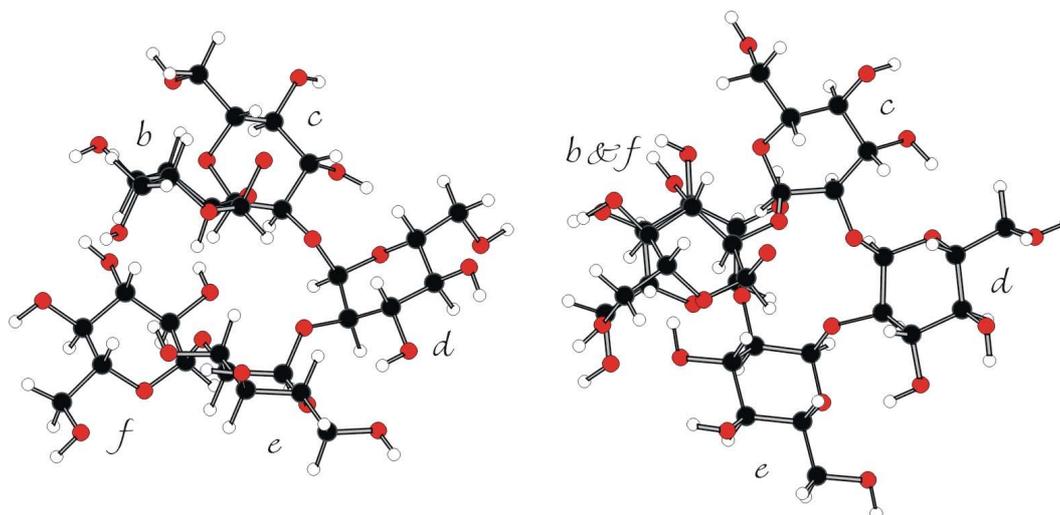


Abb. 28. Struktur des Hexasaccharids ohne Fructoseeinheit. Deutlich zu erkennen sind die Ganghöhe von 4 Glc-Einheiten und die enge helikale Windung in der Draufsicht (rechts) sowie in der Seitenansicht (links).

2.4.2 Berechnung der Struktur unter Berücksichtigung zusätzlicher OH-/CH-Restraints

Da, wie in 2.3.2 beschrieben, das ROE Muster und die Größe der Abstände für **HZ34** in D₂O und DMSO_{d6} identisch sind, können die aus den Messungen von **HZ34** in DMSO_{d6} erhaltenen OH-/CH-ROEs als Restriktionsbedingungen mit in die Berechnung der Struktur des Hexasaccharids zusätzlich zu den CH-/CH-Restraints eingebracht werden.

Es wurde wiederum eine MD Simulation mit 10 x 10 ps bei 300 K gerechnet und die sich hieraus ergebende, gemittelte Struktur energieminiert.

ROE	Gesetzter Abstand [Å]	Abstand aus energieminimierter Struktur* [Å]
H1b – H1c	3.4	2.5
H1c – H1d	2.9	3.3
H1d – H1e	3.1	3.1
H1e – H1f	2.55	2.4
H1d – H1f	3.75	3.8
H1c – H2b	2.1	2.5
H1d – H2c	2.2	2.1
H1e – H2d	2.1	2.1
H1d – H3c	2.8	3.8
H1b – H3e	2.5	2.45
H1c – H3f	2.4	2.4
H1b – 3aOH	3.85	4.0
H5b – 3aOH	3.0	2.85
H5d – 3cOH	3.0	3.0

H3c – 1aOH	3.0	2.9
H1b – H4a	3.1	2.95

Tab. 10. Zur Berechnung der Struktur des Hexasaccharids gesetzte und aus der gemittelten Struktur erhaltene Protonenabstände. Abstände mit Abweichungen von mehr als 0.4 Å sind fett gedruckt.

* Struktur aus 10x10 ps MD Simulation mit anschließender Energieminimierung

Hier zeigt sich, dass dieselben ROEs wie in 2.4.1 schlecht gefittet werden, wobei der c-Ring allerdings bei dieser MD Simulation in seiner Sesselkonformation stabil war, sodass keine zusätzlichen intraglykosidischen Restraints gesetzt werden mussten. Die OH-/CH- Restraints sind alle zufriedenstellend gut erreicht in der gerechneten Struktur, wobei es sich bei diesen vorrangig um ROEs zu Hydroxygruppen des a-Ringes, also der Furanose, handelt. Der letzte, in der Tabelle aufgeführte CH-/CH-ROE (1b – 4a) stammt ebenfalls aus der Messung des Tetrasaccharids **HZ34** in DMSO_{d6} und ist bei der Messung des **Hexa** in D₂O nur sehr schwach zu erkennen. Einen Vergleich der beiden gerechneten Strukturen des Hexasaccharids zeigt die nachfolgende Abbildung.

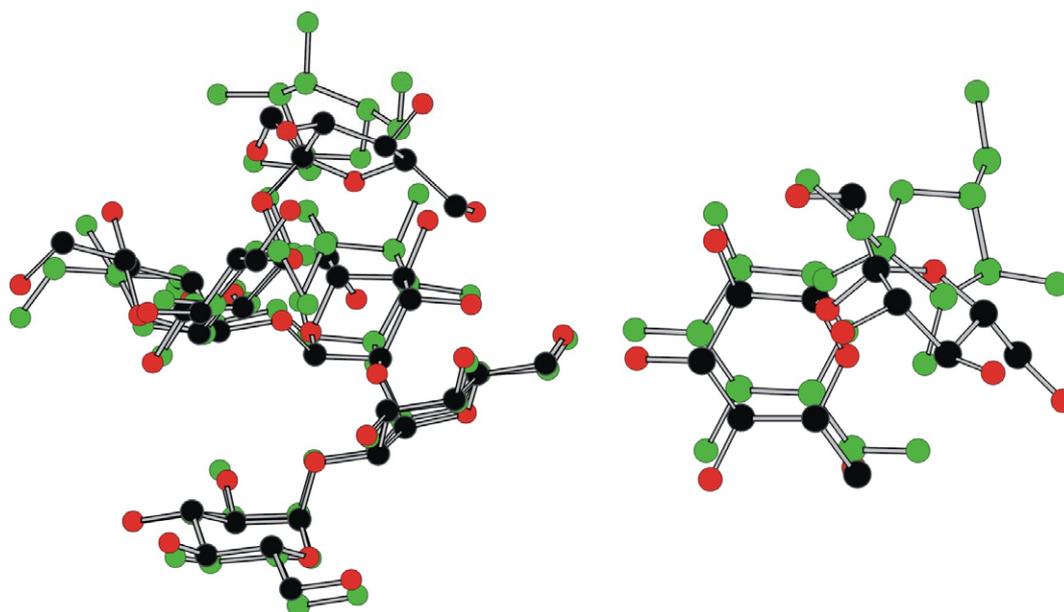


Abb.29. Vergleich der beiden gerechneten Strukturen für das Hexasaccharid. In grün Struktur ohne Berücksichtigung der OH-/CH-Restraints, in schwarz/rot mit Berücksichtigung der OH-/CH-Restraints. Die rechte Abbildung zeigt lediglich den b-Ring mit der Fructofuranoseeinheit, deren Ausrichtung relativ zum b-Ring von den gesetzten OH-/CH-Restraints abhängt.

Ein Vergleich der Φ/Ψ -Winkel für die Fructoseeinheit der Strukturen mit und ohne Berücksichtigung von OH-Restraints und literaturbekannter Daten aus Kristallstruktur und Lösung (für Saccharose) ergibt folgendes Bild:

Winkel	Saccharose Kristallstruktur ¹⁶	Saccharose in Lösung ¹⁷	MD Simulation Hexa ohne OH- Restrains	MD Simulation Hexa mit OH- Restrains
Φ	+107.9°	+99.7°	+106°	+92°
Ψ	-44.8°	-159.3°	-48°	-31°
Definition der Winkel:				
	Φ : O5b – C1b – O1b – C2a		Ψ : C1b – O1b – C2a – O5a	

Tab. 11. Vergleich der Φ/Ψ -Winkel von Saccharose mit der berechneten Struktur der „Kopfgruppe“ des Hexasaccharids (Fructose a und erste Glucoseeinheit b).

Werden keine zusätzlichen Restraints, die über die OH-Gruppen die Orientierung der Fructoseeinheit beeinflussen, gesetzt, so ist die Ausrichtung der Fructose ähnlich jener im Saccharosekristall. Mit OH-Restraints erhält man eine Fructose, die mehr zur Mitte der Helix hereingedreht ist, aber immer noch Φ -/ Ψ -Winkel vergleichbar mit jenen der Saccharosekristallstruktur aufweist.

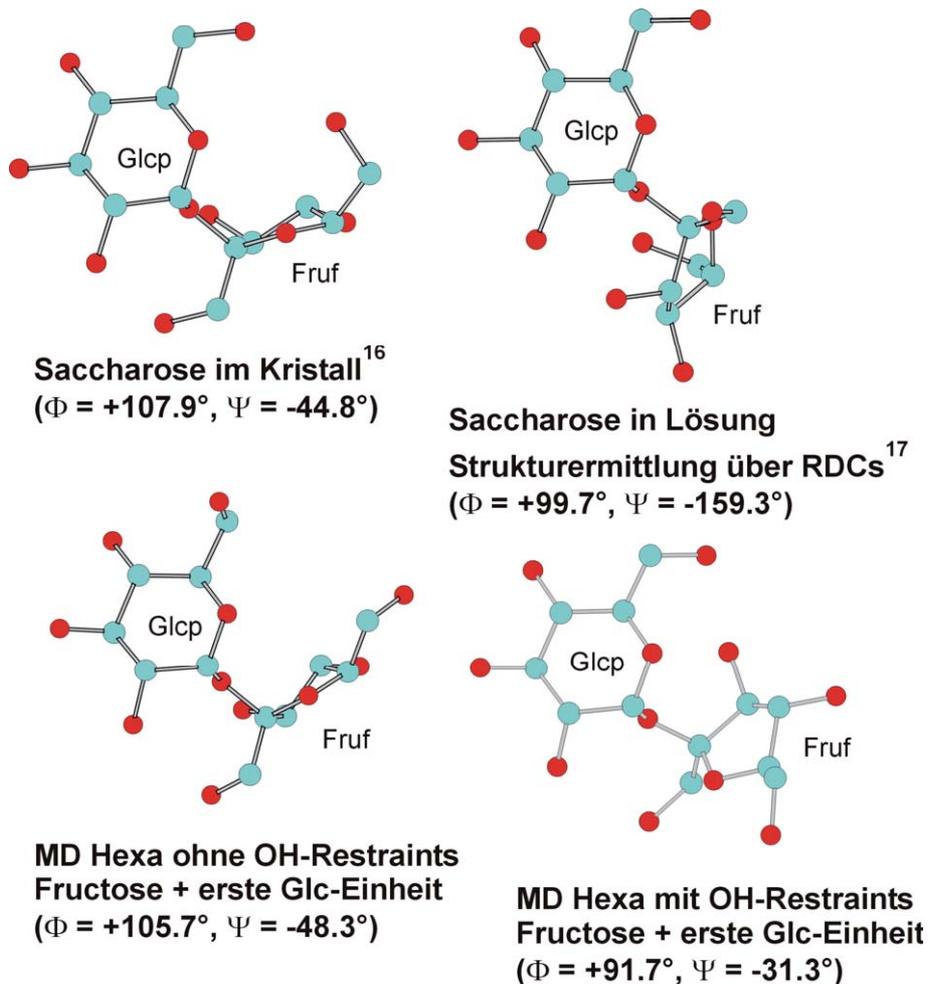


Abb. 30. Orientierung der Fructoseeinheit in Saccharose bzw. im Hexasaccharid.

2.4.3 Vergleich der Struktur mit einer gerechneten Modellhelix

Die Struktur als auch die gesetzten und berechneten ROEs des Hexasaccharids (ohne OH-/CH-Restraints) werden mit zwei verschiedenen, gerechneten Modellhelices verglichen. Diese sind, analog zu den hier untersuchten Oligosacchariden, aus Glc-Einheiten, mit α -(1 \rightarrow 2)-glykosidischen Bindungen, aufgebaut. Als einzige Restraints werden die Φ - und Ψ -Winkel dieser Modellhelices bei ihrer Strukturberechnung gesetzt:

Rechtsgängige Modellhelix: $\Phi = +60^\circ$ $\Psi = +120^\circ$

Linksgängige Modellhelix: $\Phi = +60^\circ$ $\Psi = +60^\circ$

(Definition der Φ - und Ψ -Winkel über die Schweratome)

→ daraus ergeben sich eine **rechts-** und eine **linksgängige Helix mit Ganghöhe 4**

Wichtig: die in der nachfolgenden Tabelle verwendete Nomenklatur ist nicht identisch mit der ansonsten verwendeten Nomenklatur für die Oligosaccharide. **Nachfolgend bezeichnet der a-Ring die erste Glucoseeinheit in der Kette.**

ROE	Modellhelix rechtsgängig [Å]	Hexa ohne OH-Restraints [Å]	Modellhelix linksgängig [Å]
H1a – H1b	2.8	3.4	2.1
H1b – H2a	2.3	2.1	3.0
H1b – H1c	2.9	2.9	2.2
H1c – H2b	2.3	2.2	3.1
H1c – H1d	2.9	3.1	2.3
H1d – H2c	2.2	2.1	3.1
H1d – H1e	2.9	2.6	2.2
H1e – H2d	2.3	2.5 (aus MD)	3.1
H1a – H3d	2.4	2.5	8.2
H1b – H3a	4.5	3.8 (aus MD)	4.3
H1c – H3b	4.5	2.8	4.3
H1b – H3e	2.8	2.4	8.5
H1d – H3a	7.8	8.0 (aus MD)	2.8
H1e – H3b	8.3	7.2 (aus MD)	2.8
H2e – H3b	8.6	7.4 (aus MD)	3.2
H1a – H3e	2.4	5.8 (aus MD)	9.2
H1a – H1d	4.4	5.7 (aus MD)	4.3
H1c – H1e	4.6	3.8 (aus MD)	3.8

Tab. 12. Vergleich der Daten für das Hexasaccharid mit zwei verschiedenen Modellhelices. Die Abstände für das Hexasaccharid stammen aus der Integration der ROESY Daten bzw. aus der gerechneten Struktur. Für den letzteren Fall ist dies angegeben (aus MD). Die long-range ROEs (fett gedruckt) sprechen deutlich für die Bevorzugung einer rechtsgängigen Helix.

Bemerkung: Die Abstände H1a – H1b und H1c – H3b liessen sich im Rahmen der Strukturberechnung nur schlecht fitten, wie dies bereits ohne Einbeziehung von OH-Restraints in die Rechnung der Fall gewesen war.

Übersicht über die, für die Orientierung der O-glykosidischen Bindung, wichtigen ROEs:

ROE	Modellhelix rechtsgängig	Hexasaccharid	Modellhelix linksgängig
1 – 1	2.8 – 2.9	2.6 – 3.1 (3.4)	2.1 – 2.3
1 – 2	2.2 – 2.3	2.1 – 2.2 (2.5)	3.0 – 3.1

Tab. 13. Zusammenfassung der wichtigsten ROE Abstände. In Klammern stärker abweichende Abstände, die von endständigen Glucoseeinheiten stammen.

	Modellhelix rechtsgängig	Hexasaccharid	Modellhelix linksgängig
Φ [°]	60 (~ -50)	72 ... 85 (-30 ... -45)	60 (~ -55...-60)
Ψ [°]	120 (~ 0)	90 ... 169 (-32 ... +55)	60 (~ 60)

Tab. 14. Vergleich der Φ - und Ψ -Winkel (Def. über Schweratome) der Modellhelices mit dem gerechneten Hexasaccharid. In Klammern die Winkel bei Definition über die Protonen ($\Phi = \text{H1} - \text{C1} - \text{O1} - \text{C2}'$, $\Psi = \text{C1} - \text{O1} - \text{C2}' - \text{H2}'$).

Über GlycoMaps¹⁸ (Datenbank mit Φ/Ψ Plots für Saccharide, DKFZ Heidelberg) erhält man für α -(1→2)-O-glykosidisch verknüpfte Glucoseeinheiten auf Basis einer MD Simulation eine Auftragung der Energie des entsprechenden Disaccharids in Abhängigkeit vom Φ - und Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindung. Es zeigt sich, dass es zwei Minima gibt, die durch eine Barriere von etwa 2 Kcal/mol voneinander getrennt sind. Trägt man nun die Φ -/ Ψ -Werte für beide Modellhelices und die des berechneten Hexasaccharids ein, so erkennt man, dass letzteres gemeinsam mit der rechtsgängigen Modellhelix mehr zu dem einen Minimum tendiert, wohingegen die linksgängige Modellhelix eindeutig im Bereich des zweiten Minimums liegt.

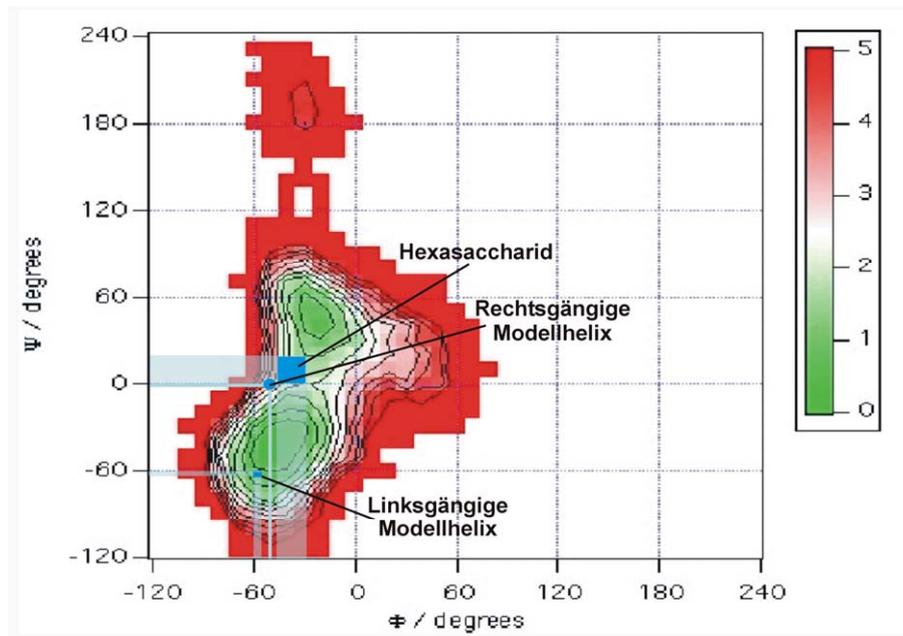


Abb. 31. Auftragung der Energie des Disaccharids α -D-Glcp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glcp aus der Datenbank GlycoMaps^{®18} mit Bereichen der hier erhaltenen Φ - Ψ -Winkelkombinationen (Winkel über Protonen definiert).

➔ Die Struktur für das Hexasaccharid stimmt in guter Näherung mit der Modellhelix einer rechtsgängigen Helix mit Ganghöhe 4 überein. Alle signifikanten ROEs und auch die Werte für den Φ -Winkel stimmen sehr gut überein, einzig die Werte des Ψ -Winkels weichen erheblich vom Modell ab. Dies liegt daran, dass durch die Fructoseeinheit der Anfangsbereich der Helix vom Modell abweicht. Dennoch ist ein deutlicher Unterschied zur linksgängigen Modellhelix zu erkennen.

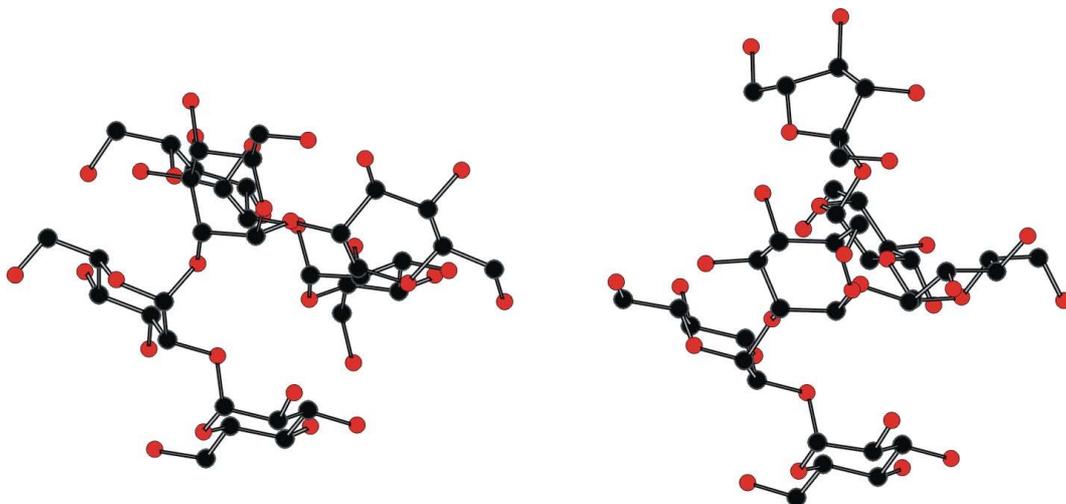


Abb. 32. Rechtsgängige Modellhelix (links) und Hexasaccharid (rechts). Die stärksten Abweichungen von der Modellhelix zeigen sich für das fructosylierte Ende.

3. Einfluss der Fructofuranose auf die Sekundärstruktur der Oligosaccharide

Da die Ausbildung einer sehr engen helikalen Struktur bei homooligomeren Zuckern bis dato nicht bekannt ist, lag die Vermutung nahe, dass die Fructofuranose am reduzierenden Ende der Glucosekette evtl. die vorliegende Helix induzieren und / oder stabilisieren könnte.

Daher wurde vom Pentasaccharid **HHZ34** die Fructoseeinheit abgespalten. Dies erfolgte durch partielle Säurehydrolyse mit TFA. Da die Abspaltung nicht vollständig war, erhielt man ein Gemisch aus drei verschiedenen Oligosacchariden – Pentasaccharid **HHZ34**, defructosyliertes Pentasaccharid, α -konfiguriert (**α -defruct**) und defructosyliertes Pentasaccharid, β -konfiguriert (**β -defruct**), d. h. das ursprüngliche Pentasaccharid und zwei Tetrasaccharide, wobei sich letztere nur in der Konfiguration des anomeren Zentrums ihres reduzierenden Endes unterscheiden.

3.1 Identifizierung und Zuordnung der defructosylierten Pentasaccharide

Diese Mischung wurde ebenfalls in D₂O und bei verschiedenen Temperaturen vermessen. Auch hier wurde die Zuordnung durch entsprechende 2D Spektren (HMQC, TOCSY, DQFCOSY und ROESY) getroffen.

Das nachfolgende Schema gibt die Numerierung für jene drei Verbindungen wieder:

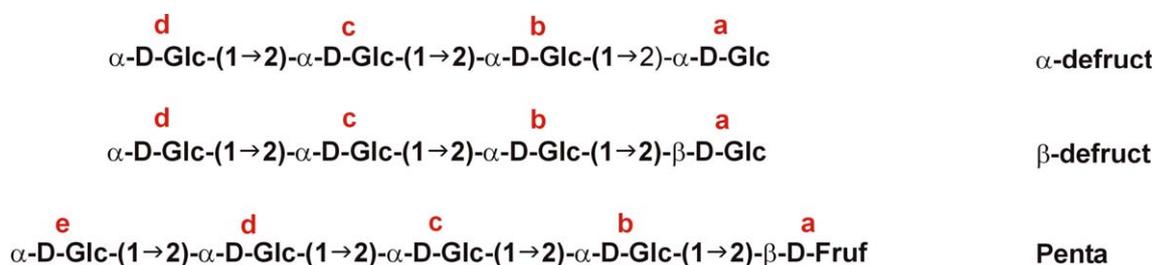


Abb. 33. Numerierung für α - und β -defructosyliertes und „normales“ Pentasaccharid.

Im Folgenden sind alle Signale für **HHZ34** in **grün**, die für **α -defruct** in **rot** und jene für **β -defruct** in **schwarz** dargestellt.

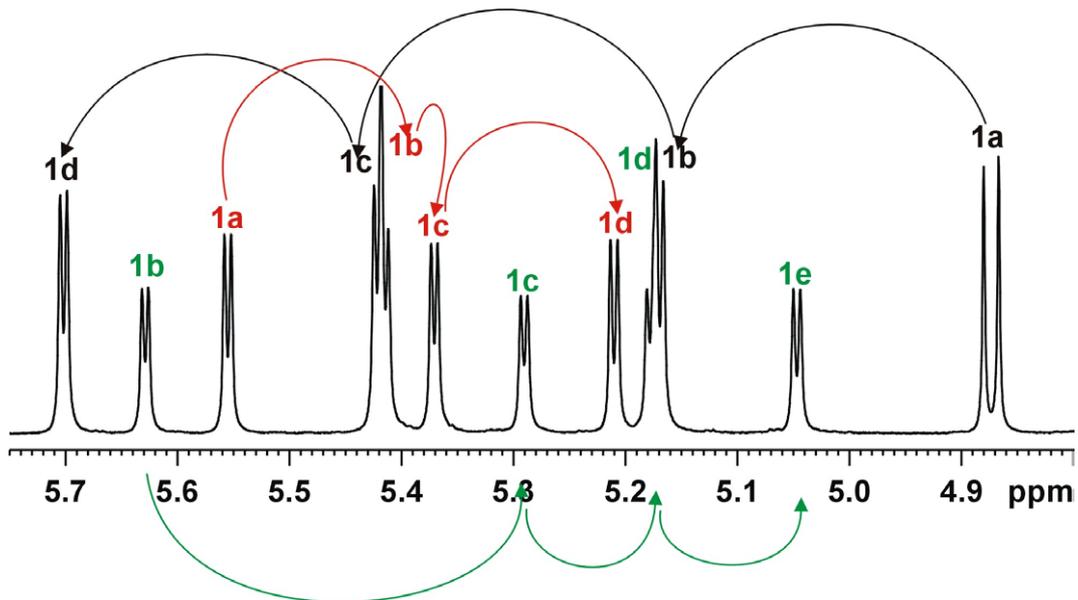


Abb. 34. ^1H des Anomerenbereichs des Gemisches aus **HHZ34**, α -defruct und β -defruct bei 300 K (600 MHz, D_2O).

Eine Integration der Anomeren signale ergibt ein Verhältnis von:

$$\beta\text{-defruct} : \alpha\text{-defruct} : \text{HHZ34} = 1.0 : 0.78 : 0.59$$

Dies bedeutet, dass ca. $\frac{3}{4}$ des vorhandenen Pentasaccharids defructosyliert wurden.

Alleine der Anomerenbereich des ^1H Spektrums zeigt deutlich, dass sich die Struktur der erhaltenen Tetrasaccharide nicht nur vom Pentasaccharid unterscheidet, sondern dass auch die Strukturen von α - bzw. β -konfiguriertem, defructosyliertem Produkt stark voneinander abweichen.

Da hier (Abb. 34) zweimal zwei Anomere überlagert sind und somit sowohl die Zuordnung als auch die Auswertung des ROESY Spektrums erschwert werden, wurden alle weiteren Messungen bei 310 K durchgeführt.

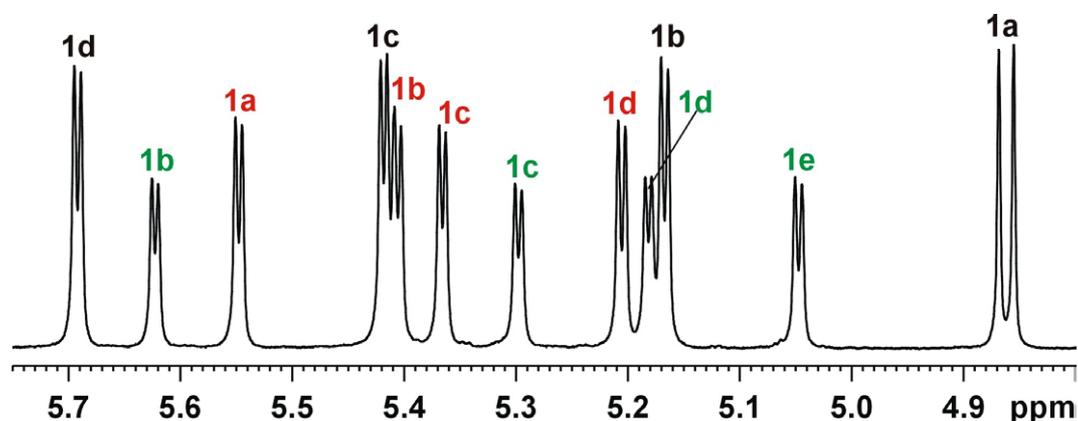


Abb. 35. ^1H des Anomerenbereichs für **HHZ34**, α -defruct und β -defruct bei 310 K (600 MHz, D_2O).

Bei 310 K sind alle 12 Anomerensignale so voneinander separiert, dass eine eindeutige Zuweisung der ROEs möglich ist.

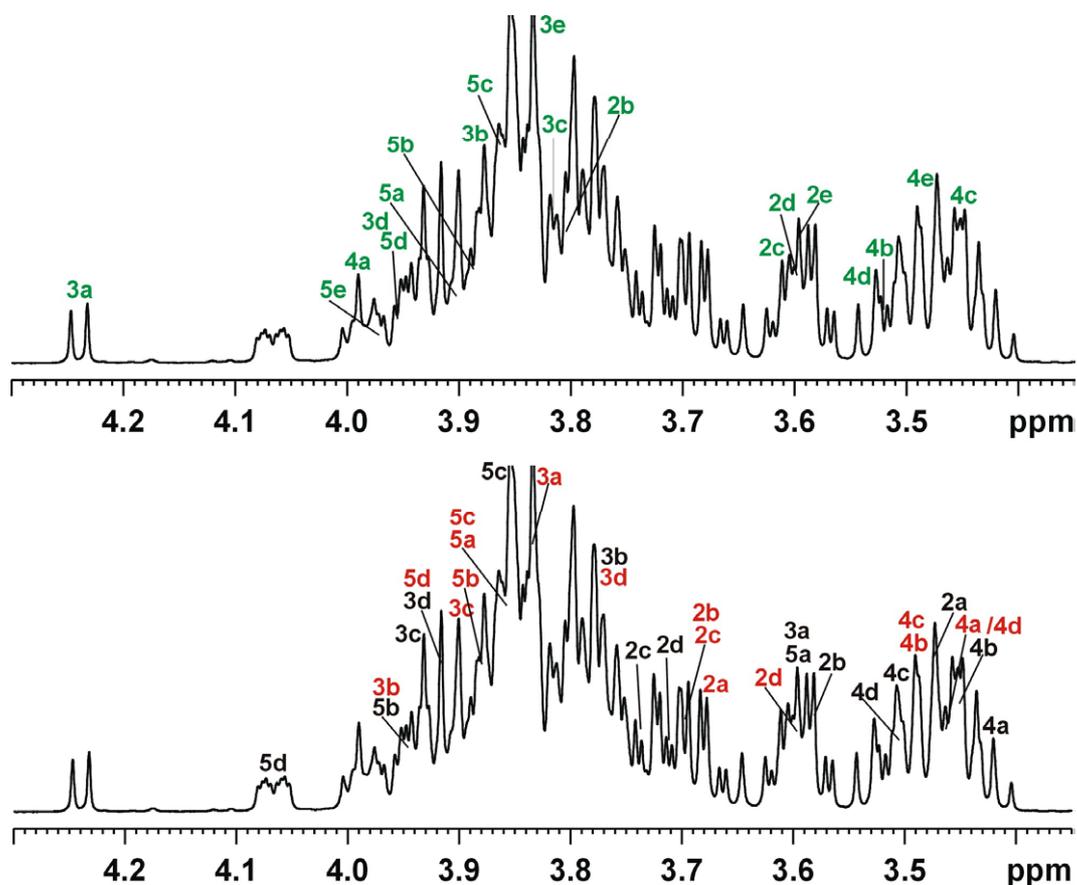


Abb. 36. ^1H des Alkylbereichs für **HHZ34**, α -defruct und β -defruct bei 310 K (600 MHz, D_2O). Auch hier sind die Unterschiede zwischen jenen drei Oligosacchariden eindeutig zu erkennen. Der Übersichtlichkeit halber sind die Zuordnungen in zwei ^1H Ausschnitten gezeigt.

3.2 Strukturanalyse der defructosylierten Saccharide und Vergleich mit Pentasaccharid

Die ersten Eindrücke aus dem ^1H Spektrum, dass sich die räumlichen Strukturen dieser drei Verbindungen erheblich voneinander unterscheiden, bestätigen sich auch im ROESY Spektrum – besitzen sie doch alle charakteristische, unterschiedliche ROE Fingerprintmuster.

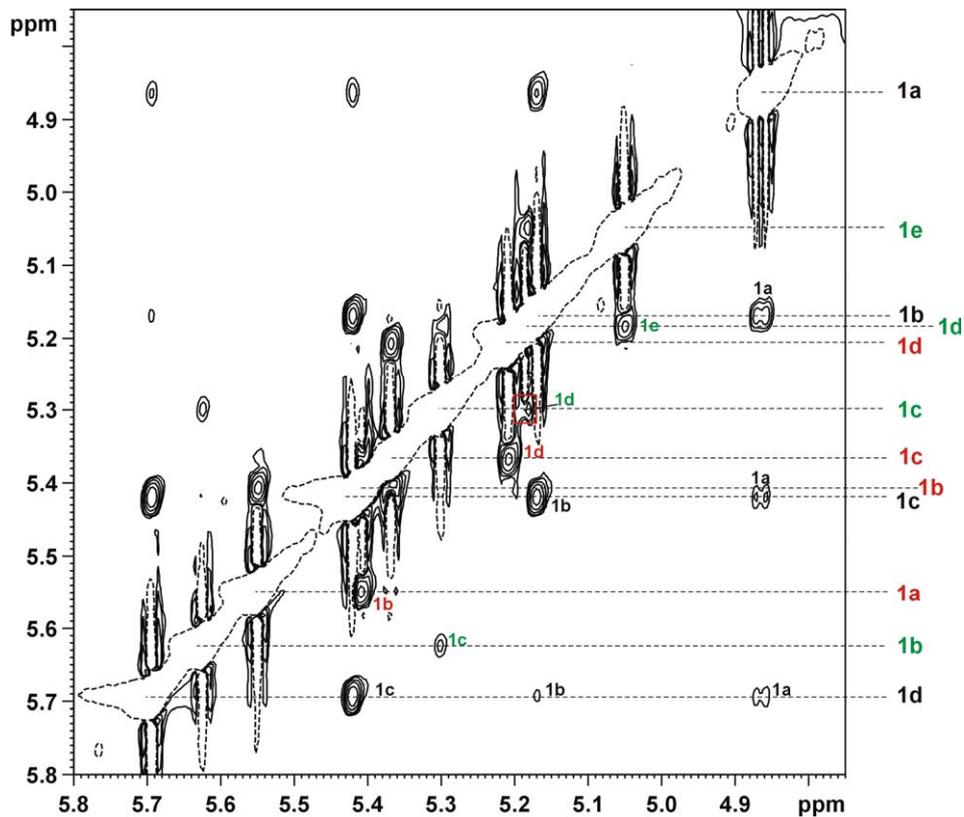


Abb. 37. Ausschnitt aus dem ROESY Spektrum für **HHZ34**, α -defruct und β -defruct bei 310 K – Darstellung der ROEs zwischen den anomeren Protonen (600 MHz, D₂O).

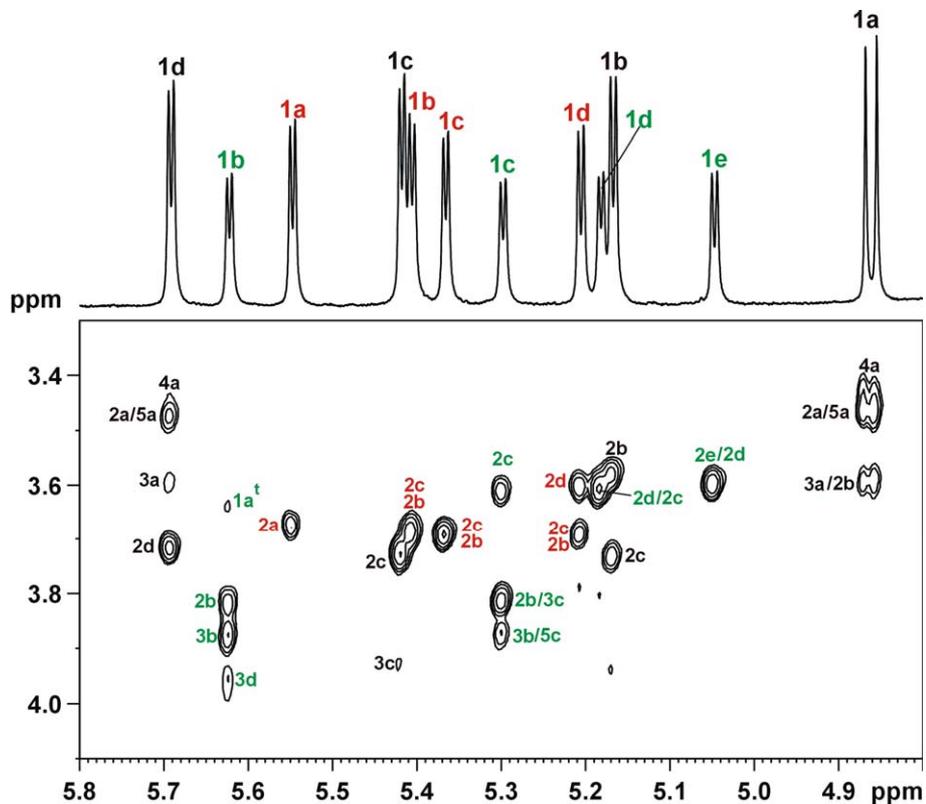


Abb. 38. ROEs zwischen den Anomeren von **HHZ34**, α -defruct und β -defruct und ihrem jeweiligen Alkylbereich bei 310 K (600 MHz, D₂O).

Aufgrund teilweiser Überlagerungen der ROE Signale (s. Abb. 38) konnte nur ein Teil dieser Signale integriert und für eine Strukturanalyse verwendet werden.

Auch für jedes Oligosaccharid ein geeignetes Signal für die Eichung zu finden, erwies sich als schwierig, folgende wurden schliesslich für die Kalibrierung der Integrale verwendet:

- Pentasaccharid HHZ34 :	H1c – H2c	≅ 2.40 Å
- β-defruct :	H1a – H3a	≅ 2.57 Å
- α-defruct :	H1a – H2a	≅ 2.40 Å

Durch Integration berechnete Abstände für:

1. α-defructosyliertes Pentasaccharid (**α-defruct**, eigentlich ein Tetrasaccharid)

ROE	Abstand [Å]	ROE	Abstand [Å]
Intraglykosidische ROEs		Transglykosidische ROEs	
H1a – H3a	3.1	H1a – H1b	2.3
H1a – H2a	≅ 2.40	H1c – H1d	2.3
H1c – H3c	3.5	H1b – H2b/H2c	2.0
H1d – H2d	2.4	H1c – H2b/H2c	2.1
H1d – H3d	3.55	H1d – H2b/H2c	2.4
H1d – H5d	3.3		
		Long-range ROEs	
		H1a – H1d	3.8
		H1a – H6b/H6c	3.55
		H1d – H3a	3.4

Tab. 15. Übersicht über alle berechneten Abstände für **α-defruct** bei 310 K (600 MHz, D₂O).

2. β-defruct Pentasaccharid (**β-defruct**, ein Tetrasaccharid)

ROE	Abstand [Å]	ROE	Abstand [Å]
Intraglykosidische ROEs		Transglykosidische ROEs	
H1a – H2a/H5a	2.3	H1b – H1a	2.8
H1a – H3a	≅ 2.57	H1c – H1b	2.5
H1a – H4a	2.85	H1d – H1c	2.4
H1b – H2b	2.2	H1b – H2c	2.55
H1b – H5b	3.3		
H1c – H2c	2.2	Long-range ROEs	
H1c – H3c	3.1	H1c – H1a	3.4
H1c – H5c	3.5	H1d – H1a	3.5
H1d – H2d	2.4	H1d – H1b	4.1

H1d – H3d	3.6	H1d – H2a/H5a	2.6
H1d – H5d	3.9	H1d – H3a	3.2
		H1d – H4a	3.55

Tab. 16. Alle aus ROESY Daten berechneten Abstände für β -defruct bei 310 K (600 MHz, D₂O). H2a und H5a haben annähernd identische chemische Verschiebungen im ¹H. Daher ist der ROE zu H1a bzw. H1d nicht eindeutig.

3. Pentasaccharid (HHZ34)

ROE	Abstand [Å]	ROE	Abstand [Å]
Intraglykosidische ROEs		Transglykosidische ROEs	
H1b – H2b	2.3	H1b – H1a [†]	3.1
H1b – H3b	2.3	H1c – H1b	3.25
H1c – H2c	≅ 2.40	H1d – H1e	2.55
Überlappende ROEs		Long-range ROEs	
H1c – H2b/H3c	2.2	H1b – H3d	2.8
H1e – H2e/H2d	2.1		
H1c – H3b/H5c	2.6		

Tab. 17. Berechnete Abstände für **HHZ34** bei 310 K (600 MHz, D₂O).

Der Vergleich dieser drei Verbindungen ergibt allgemein folgende ROE Muster, welche für die O-glykosidische Bindung von Bedeutung sind:

α-defruct:	1–1 ROEs kurz 1–2 ROEs kurz
β-defruct:	1–1 ROEs kurz 1–2 ROEs fehlen völlig
HHZ34/Hexa:	1–1 ROEs lang 1–2 ROEs kurz

Dies zeigt, dass hier drei völlig verschiedene Strukturen vorliegen müssen. Auch die long-range ROEs unterscheiden sich stark.

3.2.1 Berechnung der Struktur des α -defructosylierten Pentasaccharids anhand von ROESY Daten

Folgende Restraints wurden für die Berechnung der Struktur für α -defruct gesetzt:

ROE	gesetzter Restraint [Å]
H1a – H1b	2.3
H1a – H1d	3.8
H1c – H1d	2.3
H1d – H2c	2.4
H1d – H3a	3.4
Federkonstante = 7 (default)	

Tab. 18. Für die Strukturberechnung von α -defruct gesetzte Randbedingungen.

Es erfolgte wiederum eine MD Simulation von 10x10 ps bei 300 K. Das weitere Vorgehen ist wie schon zuvor beschrieben.

Vergleich von gesetzten und aus der MD Simulation erhaltenen Abständen:

ROE	gesetzter Restraint [Å]	Aus gemittelter Struktur [Å]	Abweichung [Å]
H1a – H1b	2.3	2.3	0
H1a – H1d	3.8	3.9	0.1
H1c – H1d	2.3	2.1	0.2
H1d – H2c	2.4	2.65	0.15
h1d – H3a	3.4	3.3	0.1

Tab. 19. Vergleich von gesetzten und berechneten Abständen in α -defruct.

Insgesamt konnten innerhalb der 10 x 10 ps MD Simulation die Restraints sehr gut gefittet werden. Einzig der Abstand H1c – H1d zeigt eine etwas grössere Abweichung. Leider können für α -defruct nicht besonders viele ROEs in die Strukturberechnung miteinbezogen werden, da wichtige ROEs, wie H1b – H2a und H1c – H2b, zwar vorhanden, aber aufgrund von Überlagerungen nicht sinnvoll integriert werden können.

Ein Vergleich der Φ - und Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen zeigt, dass diese innerhalb des Oligosaccharids einen bestimmten Wertebereich annehmen.

Winkel	aus gemittelter Struktur [°]
Φ (a – b)	50
Ψ (a – b)	71
Φ (b – c)	60
Ψ (b – c)	62
Φ (c – d)	77
Ψ (c – d)	72

Tab. 20. Übersicht über Φ - und Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen in α -defruct. Φ - und Ψ -Winkel sind über die zugehörigen Schweratome bestimmt.

→ $\Phi = 50 \dots 77^\circ$

→ $\Psi = 62 \dots 72^\circ$

Auch diese Winkel in die Auftragung der Energie des Disaccharids α -D-Glcp-(1→2)- α -D-Glcp in Abhängigkeit von der Φ -/ Ψ -Winkelkombination (aus GlycoMaps©¹⁸) eingetragen, zeigt eine deutliche Tendenz zu einem der beiden, möglichen Energie-minima.

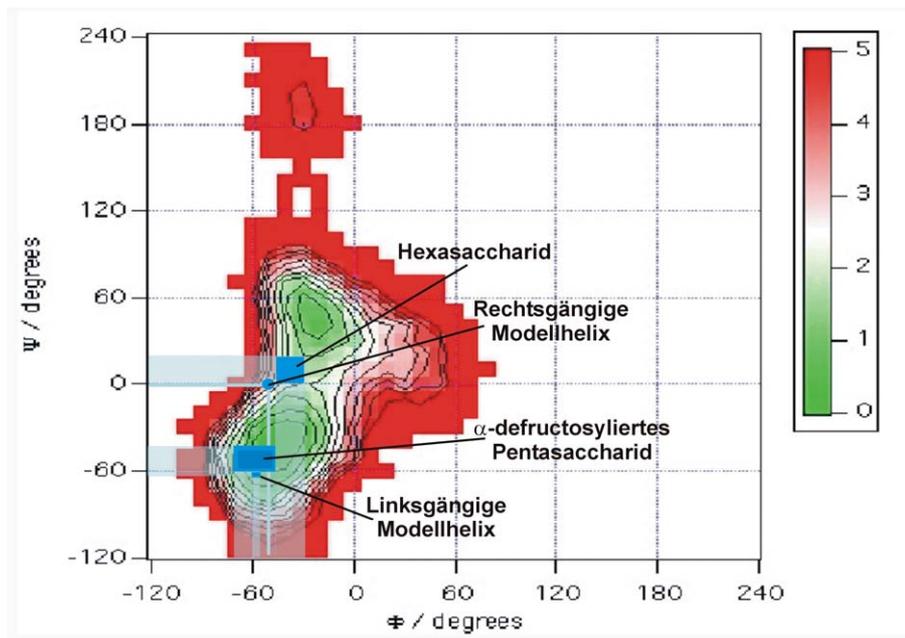


Abb. 39. Auftragung der konformationellen Energie der α -(1→2)-O-glykosidischen Bindung (aus GlycoMaps©) in Abhängigkeit von Φ - und Ψ -Winkel. **Hexa** und rechtsgängige Modellhelix tendieren zu einem Minimum, während α -defruct und die linksgängige Modellhelix eindeutig dem zweiten Minimum angehören.

→ die α -defructosylierte Form des Pentasaccharids liegt also im Bereich der links-gängigen Helix. Die Entfernung der Fructose Einheit hat also eine Änderung der bevorzugten Helizität zur Folge.

Somit ergibt sich aus obiger MD Simulation folgende Struktur für α -defruct:

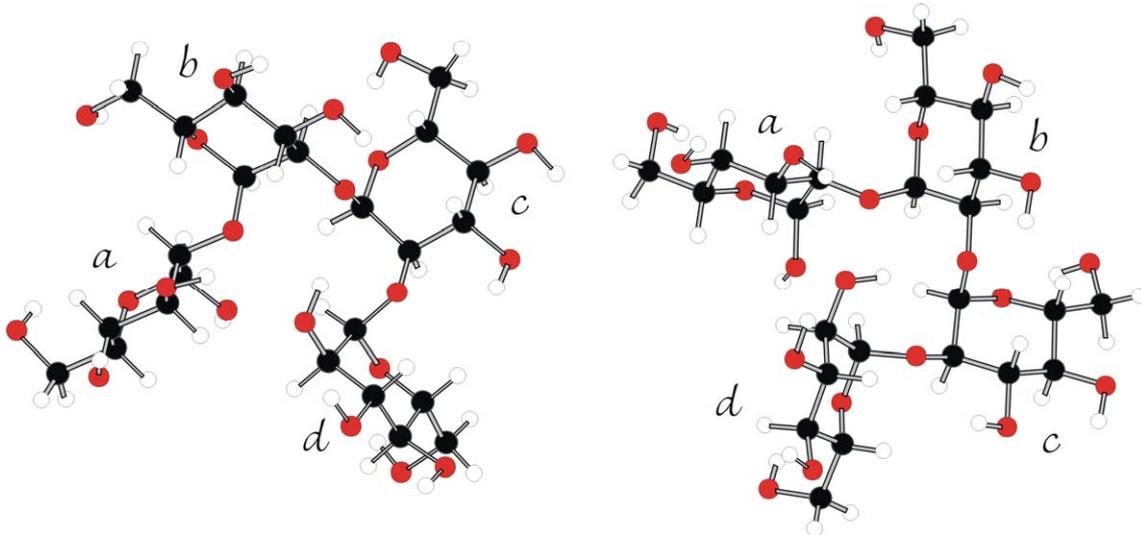


Abb. 40. Aus experimentellen Daten berechnete Struktur für α -defruct.

Vergleicht man die so erhaltene Struktur für das α -defructosylierte Pentasaccharid mit einer gerechneten linksgängigen Modellhelix ($\Phi = 60^\circ$, $\Psi = 60^\circ$, Ganghöhe = 4 Glc-Einheiten)(siehe auch 2.4.3), so kommt man zu einer relativ guten Übereinstimmung der beiden Strukturen:

- linksgängige Helices
- Φ - und Ψ -Winkel im Bereich von 60°
- relativ gute Übereinstimmung der long-range ROEs für α -defruct mit den Abständen in der Modellhelix

aber:

- ROEs für die O-glykosidischen Bindungen in α -defruct weichen stark von Werten für die Modellhelix ab

→ da die letztgenannten ROEs sehr empfindlich auf nur kleine Winkeländerungen der O-glykosidischen Bindungen reagieren und ihre Werte zudem zwischen den Werten der links- und der rechtsgängigen Modellhelix (siehe Kap. 2.4.3) liegen, ist es wahrscheinlich, dass das α -defructosylierte Pentasaccharid keine stabile helikale Struktur besitzt, sondern die Flexibilität für dieses Tetrasaccharid höher ist als für sein fructosyliertes Analogon. Dennoch kann von einer Bevorzugung der links-gängigen Helix ausgegangen werden.

ROE	Modellhelix linksgängig ($\Phi = 60^\circ$, $\Psi = 60^\circ$)	α -defruct	Abweichung [\AA]
H1a – H1b	2.1	2.3	0.2
H1b – H2a	3.0	Überlagert	-
H1b – H1c	2.2	Überlagert	-
H1c – H2b	3.1	Überlagert	-
H1c – H1d	2.3	2.3	0
H1d – H2c	3.1	2.4	0.7
H1d – H3a	2.8	3.4	0.6
H1a – H1d	4.3	3.8	0.5

Tab. 21. Vergleich charakteristischer ROEs von α -defruct und linksgängiger Modellhelix. Abstände mit einer Abweichung von mehr als 0.5 \AA sind fett gedruckt.

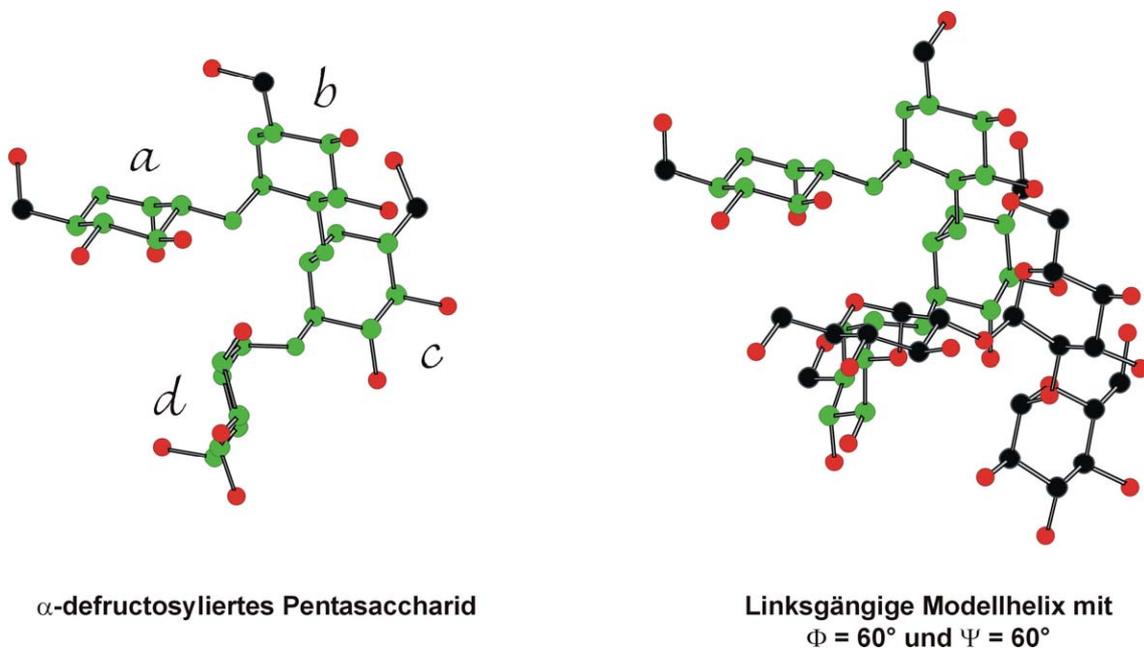


Abb. 41. Struktureller Vergleich von α -defruct und linksgängiger Modellhelix (als Heptasaccharid). Die zu vergleichende Tetrasaccharideinheit ist jeweils grün gekennzeichnet.

3.2.2 Berechnung der Struktur des β -defructosylierten Pentasaccharids anhand von ROESY Daten

Schon der Umstand, daß im $^1\text{H-NMR}$ (Abb. 35) die Abfolge der Signale der Anomeren a – b – c – d für β -defruct jetzt vom hochfeldigen zum tieffeldigen Bereich verläuft (z. Vgl. α -defruct tief zu hoch), zeigt deutlich, dass für das β -defructosylierte Pentasaccharid eine zu α -defruct und **HHZ34** völlig verschiedene Struktur vorliegen muss.

Bei der Berechnung der Struktur für β -defruct ergab sich das Problem, dass die aus der ROESY Integration ermittelten Abstände unmöglich zu einer fixen 3-dimen-

sionalen Struktur gehören konnten. So sind ROEs für H1d zu allen Protonen des a-Ringes in ähnlicher Stärke vorhanden, was bedeuten würde, dass H1d sowohl zu den Protonen auf der Unterseite des a-Ringes als auch zu jenen auf dessen Oberseite einen ähnlichen Abstand aufweist. Dies ist allerdings unmöglich.

Diese Schwierigkeit zeigte sich auch beim Versuch, eine Struktur für **β -defruct** zu berechnen. So war es nicht möglich, die berechneten ROE Abstände in einer gemittelten Struktur zu vereinen. Vielmehr konnte immer nur ein Teil der Abstände mehr oder weniger gut gefittet werden.

Folgende Restraints wurden für die Berechnung verschiedener, möglicher Strukturen von **β -defruct** verwendet:

1. Nur Interglykosidische Restraints gesetzt:

Gesetzte Restraints:

ROE	Gesetzter Abstand [Å]
H1a – H1b	2.8
H1b – H1c	2.5
H1b – H2c	2.55
H1c – H1d	2.4
Federkonstante = 7 (default)	

Tab. 22. Für die Berechnung der Struktur von **β -defruct** gesetzte Restraints.

Nach einer MD Simulation von 10 ps bei 300 K und einer anschließenden Energieminimierung ergaben sich folgende H-H-Abstände:

ROE	Aus Integration [Å]	Aus MD (10 ps) [Å]	Differenz Δ [Å]
H1a – H1b*	2.8	2.7	0.1
H1b – H1c*	2.5	2.8	0.3
H1b – H2c*	2.55	3.6	1.05
H1c – H1d*	2.4	2.3	0.1
H1a – H1c	3.4	4.9	1.5
H1d – H1a	3.5	4.6	1.1
H1d – H3a	3.2	6.7	3.5
H1d – H4a	3.55	8.4	4.85
H1d – H1b	4.1	3.1	1.0

Tab. 23. Vergleich der H-H-Abstände aus der ROESY Integration mit jenen aus der gerechneten Struktur für **β -defruct**. * = gesetzte Restraints

Nicht nur die nicht als Restraints in der Rechnung gesetzten Abstände sind sehr schlecht gefittet, auch ein gesetzter H-H-Abstand (H1b – H2c) konnte innerhalb dieser Struktur nicht erreicht werden.

Überblick über die Φ - und Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen innerhalb der gerechneten Struktur:

	Φ [°]	Ψ [°]
a – b	54	58
b – c	147	81
c – d	70	82

Tab. 24. Φ - und Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen in dieser gerechneten Struktur von β -**defruct** (Definition der Φ - / Ψ -Winkel über Schweratome).

Auch die Winkel der O-glykosidischen Bindungen innerhalb des Saccharids zeigen ein sehr uneinheitliches Bild, was wiederum für eine hohe Flexibilität spricht und diese Struktur nur eine von vielen Konformationen des β -**defruct** Moleküls sein kann.

2. Nur long-range ROEs gesetzt:

Gesetzte Restraints:

ROE	Gesetzter Abstand [Å]
H1a – H1c	3.4
H1a – H1d	3.5
H1d – H3a	3.2
H1b – H1d	4.1
Federkonstante = 7 (default)	

Tab. 25. Für die Berechnung der Struktur von β -**defruct** gesetzte Restraints. Zusätzlich wurden intraglykosidische Restraints für den a-Ring gesetzt, um dessen Sesselkonformation beizubehalten.

Nach einer MD Simulation von 10 ps bei 300 K und einer anschließenden Energieminimierung ergaben sich folgende H-H-Abstände:

ROE	Aus Integration [Å]	Aus MD (10 ps) [Å]	Differenz Δ [Å]
H1a – H1b	2.8	4.3	1.5
H1b – H1c	2.5	2.3	0.2
H1b – H2c	2.55	4.6	2.05
H1c – H1d	2.4	2.3	0.1
H1a – H1c*	3.4	4.5	1.1
H1d – H1a*	3.5	4.0	0.5
H1d – H3a*	3.2	4.0	0.8
H1d – H4a	3.55	2.0	1.55
H1d – H1b*	4.1	4.2	0.1

Tab. 26. Vergleich der H-H-Abstände aus der ROESY Integration mit jenen aus der gerechneten Struktur für β -**defruct**. * = gesetzte Restraints

Nicht nur die nicht als Restraints in der Rechnung gesetzten Abstände sind sehr schlecht gefittet, auch ein gesetzter H-H-Abstand (H1a – H1c) konnte innerhalb dieser Struktur nicht erreicht werden.

Überblick über die Φ - und Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen innerhalb der gerechneten Struktur:

	Φ [°]	Ψ [°]
a – b	162	163
b – c	53	51
c – d	62	78

Tab. 27. Φ - und Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen in dieser gerechneten Struktur von β -defruct (Definition über Schweratome).

Auch innerhalb dieser Struktur zeigt sich eine grosse Varianz in den Φ - und Ψ -Winkeln der O-glykosidischen Bindungen.

Auffallend ist, dass in beiden Strukturen der Abstand H1b – H2c schlecht bis gar nicht gefittet werden konnte und zwar unabhängig davon, ob er als Restraint gesetzt war oder nicht.

Die folgenden Abbildungen zeigen die aus den beiden zuvor vorgestellten MD Simulationen hervorgegangenen Strukturen für β -defruct. Diese stellen mit Sicherheit nur zwei von vielen möglichen Konformationen dar, ergeben doch die ROE Daten, dass es sich um ein sehr flexibles Molekül handelt, das keine bevorzugte 3-dimensionale Struktur aufweist.

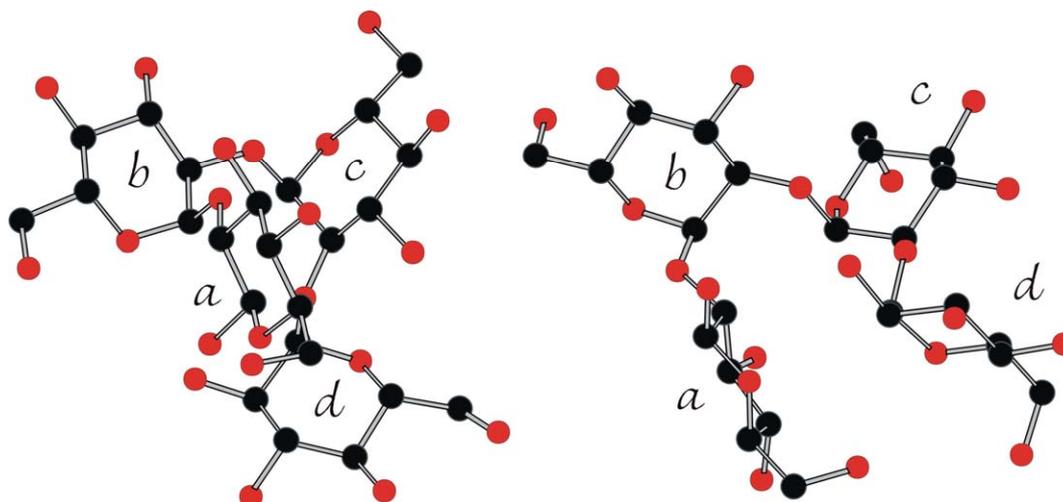


Abb. 42. Vergleich der beiden für β -defruct gerechneten Strukturen.

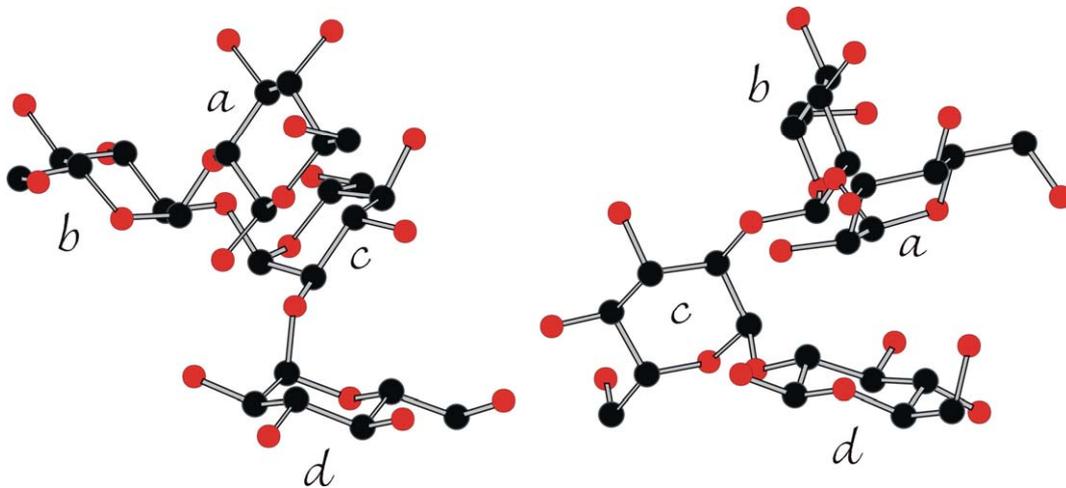


Abb. 43. Andere Ansicht der beiden gerechneten β -defruct Strukturen.

3.2.3 Vergleich der Strukturen für α -defructosyliertes Pentasaccharid und Hexasaccharid

Wie 2.4.1 und 3.2.1 gezeigt haben, liegen die fructosylierten Oligosaccharide in einer völlig anderen 3-dimensionalen Struktur in Lösung vor als das defructosylierte, α -konfigurierte Analogon. Ein Vergleich von Hexasaccharid und α -defruct ergibt:

Hexasaccharid:	1 – 1 ROEs eher lang (2.6 – 3.1 Å)
	1 – 2 ROEs kurz (2.1 – 2.2 Å)
	ROE Muster einer rechtsgängigen Modellhelix ($\Phi = 60^\circ$, $\Psi = 120^\circ$) stimmt sehr gut mit dem des Hexasaccharids überein (bes. long-range ROEs)
	Winkel der O-glykosidischen Bindung:
	$\Phi = 72 \dots 85^\circ$ $\Psi = 90 \dots 169^\circ$
	Ganghöhe der Helix: 4 Glucoseeinheiten
α-defruct:	1 – 1 ROEs kurz (~ 2.3 Å)
	1 – 2 ROEs kurz (~ 2.4 Å)
	→ beide Werte entsprechen Mittelwerten
	Long-range ROE Muster stimmt sehr gut mit einer linksgängigen Modellhelix ($\Phi = 60^\circ$, $\Psi = 60^\circ$) überein
	Winkel der O-glykosidischen Bindung:
	$\Phi = 50 \dots 77^\circ$ $\Psi = 62 \dots 72^\circ$
	Ganghöhe der Helix: 4 Glucoseeinheiten

→ Die Fructofuranose als abschliessender Baustein des reduzierenden Endes der Glucosekette ist entscheidend für die Ausbildung und Stabilisierung der helikalen Struktur.

Man könnte dieses Verhalten mit dem bis dato nur von Peptiden oder Proteinen bekannten Phänomen des Helix Capping¹⁹ vergleichen. Hierbei induziert bzw.

stabilisiert ein Capping durch Kompensierung des Helixdipols oder durch Bereitstellung von H-Brückendonoren oder-akzeptoren eine helikale Struktur. Ein abweichender Baustein an einem Ende eines Homooligomers führt zur Ausbildung einer bestimmten Sekundärstruktur (\rightarrow Induzierung einer Sekundärstruktur), die ohne diesen Baustein (siehe α -defruct) nicht ausgebildet bzw. stabilisiert wird. Im Falle der hier vorliegenden Oligosaccharide führt das Entfernen der Fructoseeinheit zu einer Umkehr des Helixdrehsinns, wobei ferner eine höhere Flexibilität der helikalen Struktur im defructosylierten Oligosaccharid zu beobachten ist.

4. Okta- und Dekasaccharid – Einfluss der Kettenlänge auf die dreidimensionale Struktur

Auch höhere Oligomere als das Hexasaccharid konnten bis einschliesslich des Undekasaccharids isoliert werden. Für die (beispielhaft) vermessenen Oligomere **Okta** und **Deka** zeigte sich auf den ersten Blick eine deutliche Abweichung des Protonenspektrums von dem der niedrigeren Oligomere.

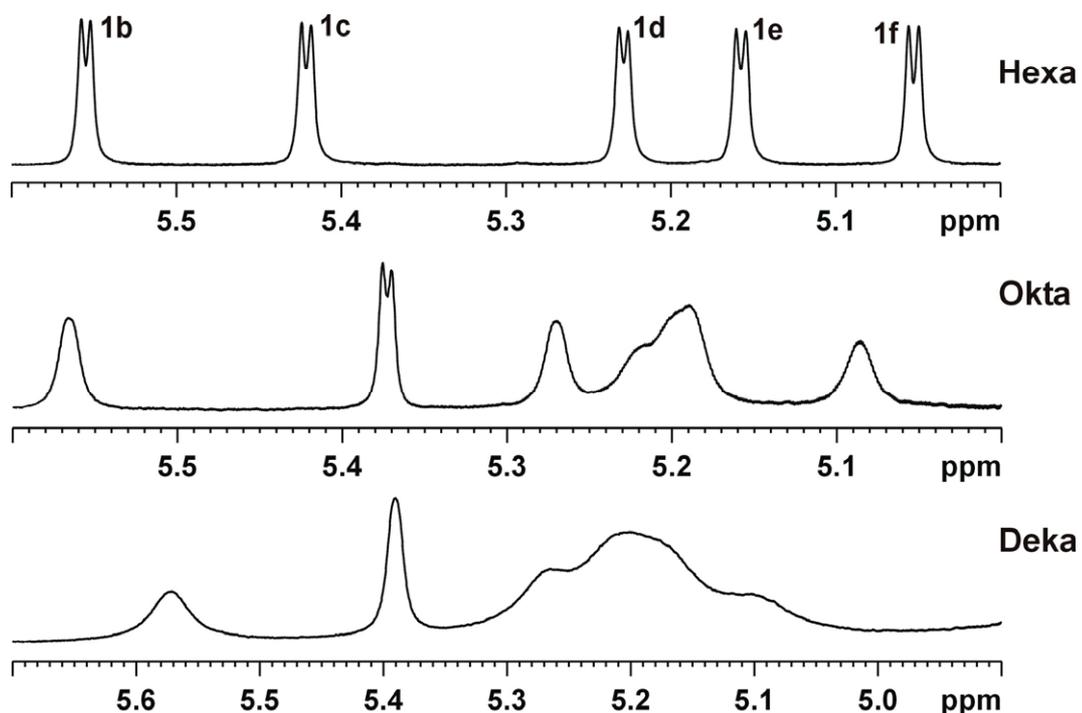


Abb. 44. ^1H Anomerenbereich von Hexa, Okta und Deka bei 300 K (600 MHz, D_2O).

Die Anomerensignale sind nicht mehr so eindeutig voneinander separiert und zudem relativ stark verbreitert.

4.1 Strukturanalyse des Oktasaccharids (Okta)

Bei Erhöhung der Temperatur kann eine etwas bessere Separierung der Anomeren-signale und eine etwas bessere Halbwertsbreite der Signale im ^1H erreicht werden. Die Dispersion der Signale bleibt hingegen unverändert.

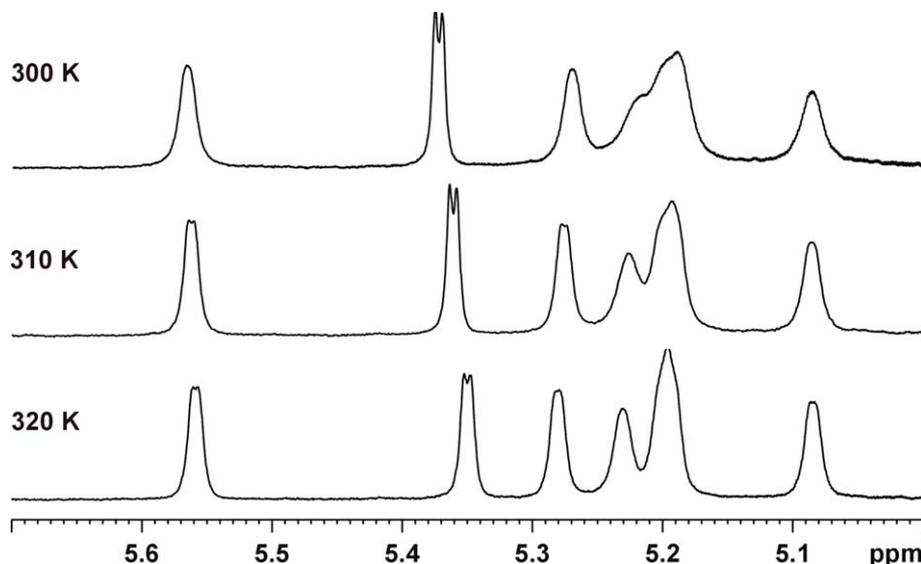


Abb. 45. ^1H Anomerenbereich von **Okta** (600 MHz, D_2O). Aufgrund der kleineren Halbwertsbreite der Signale sind die Überlagerungen bei höherer Temperatur nicht mehr so stark.

Für die 2D-Messungen muss über einen längeren Zeitraum bei erhöhter Temperatur gemessen werden. Da bei 320 K bei längerer Messdauer bereits Schwierigkeiten mit der Stabilität der Probe (teilweise Verdampfen des LM) auftraten, wurden alle Messungen bei 310 K durchgeführt.

Alle ^1H und ^{13}C Verschiebungen des Oktasaccharids können – insbesondere durch Vergleich mit **Hexa** – eindeutig zugeordnet werden. Lediglich die CH_2 -Gruppen sind, mit Ausnahme von CH_2 an Position 1a, nicht zuordenbar.

Für die ^{13}C Verschiebungen der Anomeren und der C2 Atome der Glucosen, die, wie in 2.2 gezeigt, in ihrer Abhängigkeit von der Position der Glucoseeinheit im Oligomer sehr charakteristisch sind, zeichnet sich ein analoges Verhalten ab. Allerdings ist die Dispersion der Anomeren-signale, wie schon im ^1H , auch im ^{13}C nicht mehr so stark ausgeprägt wie bei den kürzeren Oligomeren.

Die über 2D-TOCSY, -HMQC und -ROESY erfolgte Zuordnung ergibt, dass die ^1H Verschiebungen der anomeren Signale nicht mehr, wie bis einschliesslich des **Hexa** der Fall, in ihrer Abfolge der Abfolge im Oligomer entsprechen. Vielmehr sind einige der Signale „durcheinander durchgewandert“, lediglich die letzte Glucoseeinheit und die erste nach der Fructose haben ihre Position im Verhältnis zu den restlichen Anomeren-signalen beibehalten.

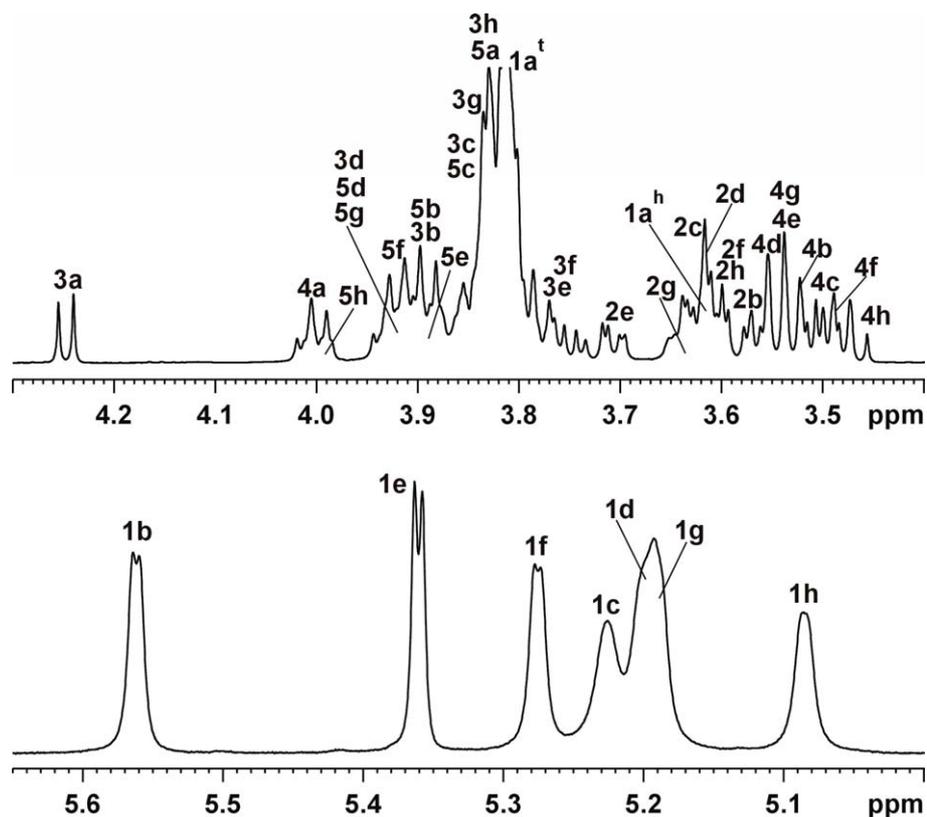


Abb. 46. ^1H Spektrum von **Okta** bei 310 K (600 MHz, D_2O). Bis auf 1a konnten die übrigen CH_2 -Gruppen nicht zugeordnet werden.

Obwohl im ^1H NMR doch deutliche Unterschiede zwischen **Hexa** und **Okta** zu erkennen sind, sind ihre ROESY Spektren sehr gut vergleichbar. Das für jede Glucoseeinheit charakteristische ROE Muster kann auch im Falle des **Okta** wiedergefunden werden. Lediglich die 1 – 1 ROEs sind aufgrund der geringeren Dispersion der Signale und der grösseren Halbwertsbreite nur teilweise identifizierbar.

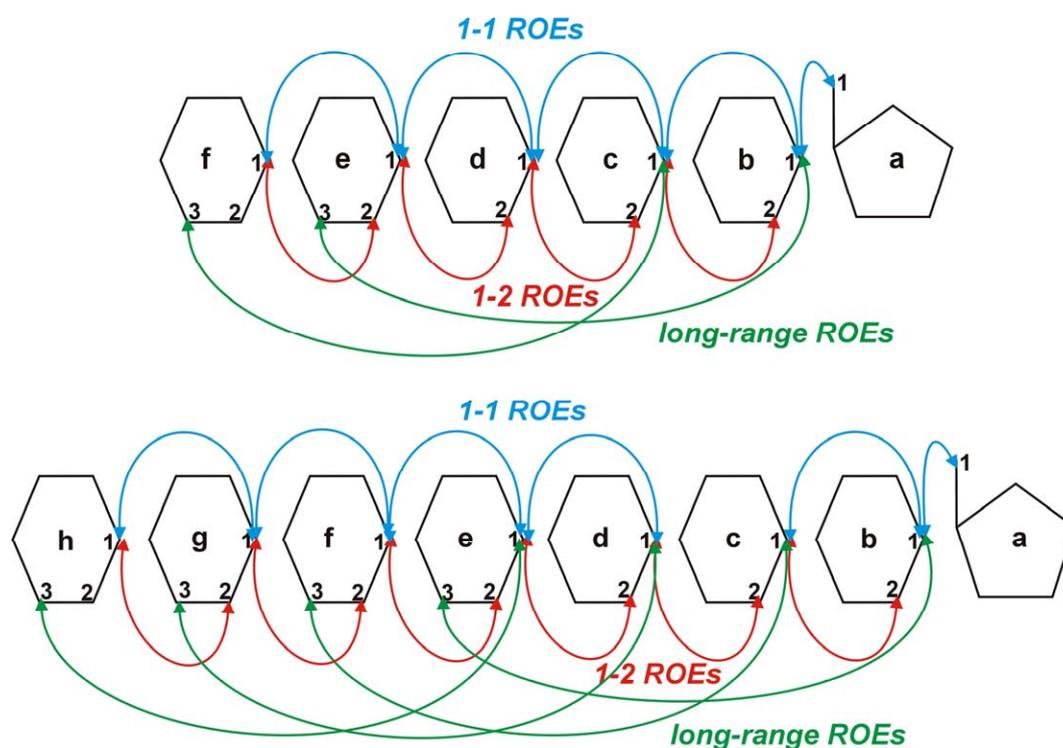


Abb. 49. Schematische Darstellung der strukturrelevanten ROEs in **Hexa** (oben) und **Okta** (unten). Das long-range ROE Muster des **Hexas** setzt sich im **Okta** logisch fort.

4.1.1 Berechnung der Struktur anhand von ROESY Daten

Nicht überlagerte ROEs konnten integriert und in Bezug auf einen Eichabstand ($H1h - H2h \equiv 2.40 \text{ \AA}$) die Abstände ermittelt werden.

ROE	Abstand [\AA] aus Integration
Intraglykosidisch	
H1b – H2b	2.5
H1e – H2e	2.5
H1f – H2f	2.4
H1h – H2h	$\equiv 2.4$
Transglykosidisch	
H1b – H1a ^h	3.0
H1b – H1a ^t	2.4
H1e – H2d	2.0
H1f – H2e	2.2
H1c – H2b	2.3
H1h – H2g	2.6
H1b – H1c	3.2
H1e – H1f	2.6
H1e – H1d	2.8
H1f – H1g	3.1
H1g – H1h	2.9

Long-range	
H1b – H2e	3.3
H1e – H3h	2.5
Alle anderen long-range ROEs sind aufgrund von Überlagerungen nicht integrierbar	

Tab. 28. Aus der Integration des ROESY Spektrums erhaltene H-H-Abstände in **Okta**.

Für die Berechnung der Struktur mittels MD Simulation (10 x 10 ps bei 300 K) wurden folgende Restraints gesetzt:

ROE	Gesetzter Abstand [Å]
H1b – H1c	3.2
H1d – H1e	2.8
H1e – H1f	2.6
H1f – H1g	3.1
H1g – H1h	2.9
H1c – H2b	2.3
H1e – H2d	2.0
H1f – H2e	2.2
H1h – H2g	2.6
H1e – H3h	2.5

Tab. 29. Im Rahmen der MD Simulation gesetzte Restraints – experimentell ermittelte H-H-Abstände als Randbedingungen der Strukturanalyse.

Durch Mittelung aller zehn erhaltenen Strukturen und anschließender Energieminimierung wurde folgende Struktur erhalten:

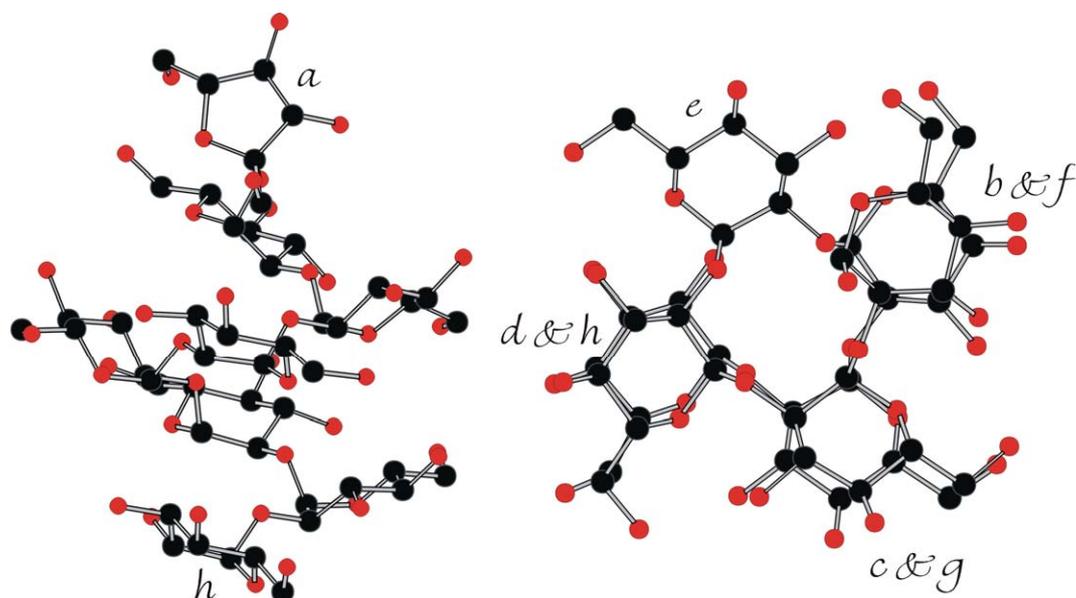


Abb. 50. Über MD Simulation berechnete Struktur des Oktasaccharids bei Berücksichtigung der experimentellen H-H-Abstände aus ROESY Daten. Links die Gesamtstruktur, rechts die sieben Glucoseinheiten (ohne Fructoseeinheit) in der Draufsicht.

Auch die Annäherung an die gesetzten H-H-Abstände und die Φ -/ Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen (Def. über die Schweratome) wurden aus dieser Struktur ermittelt:

ROE	Gesetzter Abstand [Å]	Abstand aus berechneter Struktur [Å]	O-glykosidische Bindung	Φ [°]	Ψ [°]
H1b – H1c	3.2	3.4	b – c	+95	+131
H1d – H1e	2.8	2.7	c – d	+84	+94
H1e – H1f	2.6	2.7	d – e	+85	+106
H1f – H1g	3.1	3.2	e – f	+76	+107
H1g – H1h	2.9	2.7	f – g	+86	+121
H1c – H2b	2.3	2.1	g – h	+73	+103
H1e – H2d	2.0	2.1			
H1f – H2e	2.2	2.2			
H1h – H2g	2.6	2.4			
H1e – H3h	2.5	2.4			

Tab. 30. Übersicht über die, aus der berechneten Struktur ermittelten, H-H-Abstände und Winkel der O-glykosidischen Bindungen.

Es zeigt sich, dass die Struktur in sehr guter Übereinstimmung mit jener des Hexasaccharids ist. Auch die 1 – 1 bzw. 1 – 2 ROEs – also jene für die O-glykosidische Bindung charakteristischen ROEs – stimmen in ihren Relationen mit jenen des Hexasaccharids überein. Dennoch muss ein struktureller Unterschied zwischen **Hexa** und **Okta** vorliegen, wie das ^1H Spektrum zeigt. Da das Vorliegen einer von der

rechtsgängigen Helix abweichenden Konformation zu einem Bruchteil der Zeit keinen Einfluss auf die Grösse der beobachteten ROE Signale, jedoch einen Einfluss auf das Erscheinungsbild des ^1H Spektrums hat, muss davon ausgegangen werden, dass für das Oktasaccharid ein konformationeller Austausch auftritt.

→ **Das Oktasaccharid ergibt, wie das Hexasaccharid, eine rechtsgängige Helix als bevorzugte Sekundärstruktur. Dennoch muss aufgrund der Signalverbreiterungen im ^1H Spektrum von einem langsamen, konformationellen Austausch für das Okta ausgegangen werden. Das heisst, dass im Falle der hier vorliegenden, höheren Oligomere eine Barriere zwischen den möglichen Konformationen vorliegen muss, die hoch genug ist, dass das System an die Grenze zum langsamen Austausch (Signalverbreiterung aufgrund doppelten Signalsatzes) gelangt. Dies ist für Saccharide eher ungewöhnlich, da sie im allgemeinen aufgrund ihrer O-glykosidischen Bindungen eher flexible Systeme darstellen.**

4.1.2 Anmerkungen

Da Oligosaccharide wie Carrageenan²⁰ durch Zugabe von CaCl_2 in einer relativ starren Helixkonformation einrasten, wurde zu **Okta** in D_2O CaCl_2 (wasserfrei) zugesetzt. Allerdings zeigte sich keinerlei Veränderung der Signale im ^1H Spektrum, wodurch eine Beeinflussung der Struktur des **Okta** durch Ca^{2+} Ionen ausgeschlossen werden kann.

Messung von **Okta** in DMSO_{d6} zeigte eine noch schlechtere Dispersion der Anomeren signale im ^1H als in D_2O . Zwar war auch in DMSO_{d6} mit steigender Temperatur eine bessere Dispersion der Signale zu beobachten, welche jedoch auch bei 340 K keinen Vorteil gegenüber D_2O bei 310 K erkennen liess.

Somit konnten aus Messungen in DMSO_{d6} keine weiteren Erkenntnisse über die Struktur des Oktasaccharids gewonnen werden.

4.2 Strukturermittlung des Dekasaccharids

Für das Dekasaccharid zeigt sich eine noch stärkere Verbreiterung v. a. der anomeren Signale. Auch bei Erhöhung der Temperatur ist die Überlappung der Signale stark.

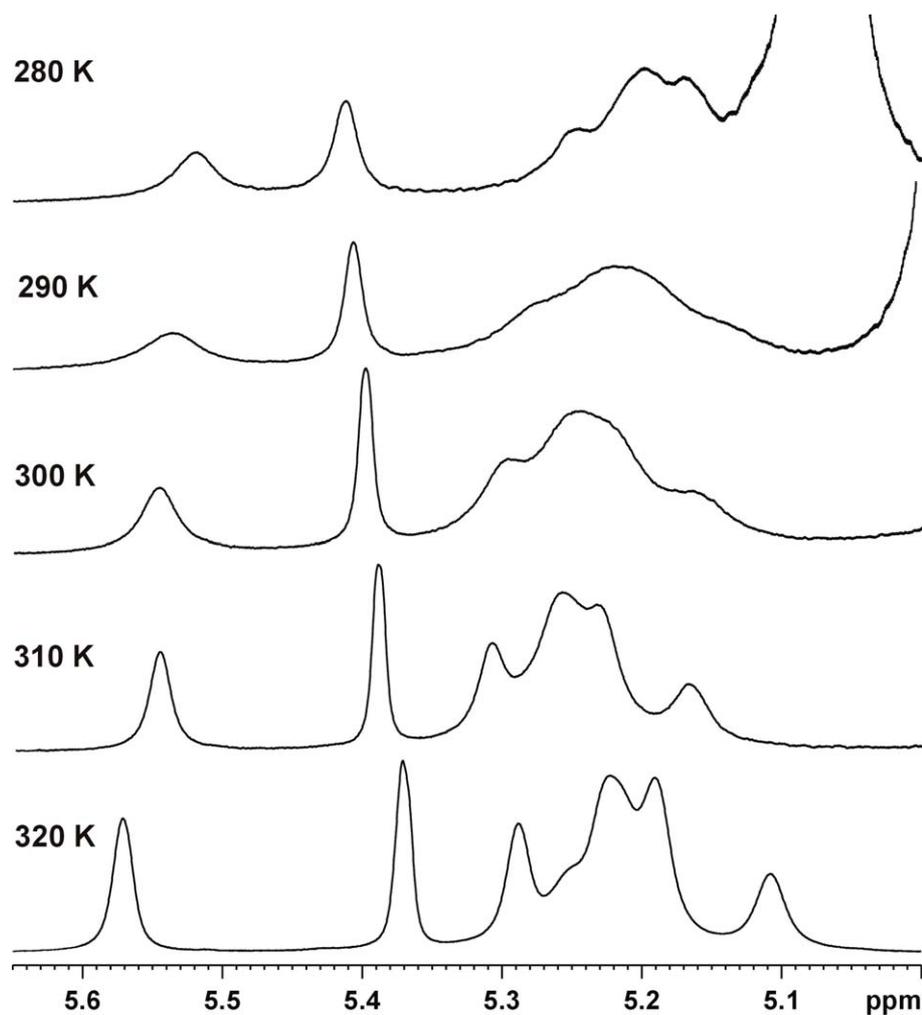


Abb. 51. ¹H Anomerenbereich des Dekasaccharids in D₂O (600 MHz).

2D-Messungen bei 320 K ergaben für die ¹³C Verschiebungen ein zu **Hexa** und **Okta** vergleichbares Muster. Besonders die Signale der Anomeren und der C2-Atome der Glucosen sind stark verbreitert. Alle übrigen Signale besitzen eine nur geringe Halbwertsbreite.

Aufgrund der starken Überlappungen konnte eine eindeutige Zuordnung über 2D-TOCSY und –ROESY nur teilweise erfolgen. Dadurch ist auch eine Ermittlung der Struktur des **Deka**, wie es für das **Okta** noch machbar war, nicht mehr durchzuführen.

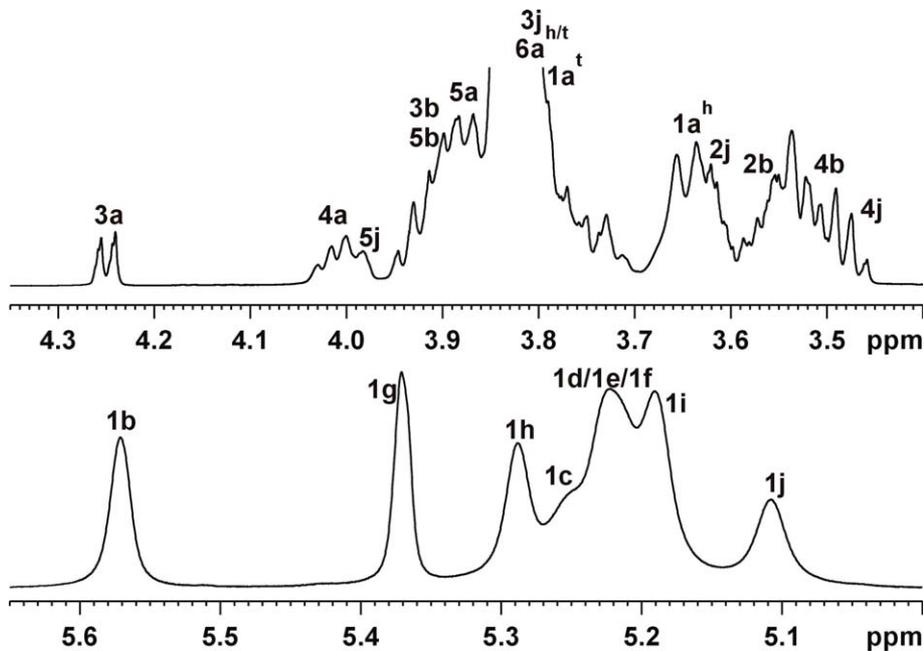


Abb. 52. ^1H Spektrum von **Deka** bei 320 K (600 MHz, D_2O). Nur die über 2D-Spektren sicher zuordenbaren Protonen sind eingetragen.

Aufschluss könnte die Untersuchung des defructosylierten Dekasaccharids – in Analogie zum defructosylierten Penta (siehe 3.1) – geben.

4.2.1 Strukturermittlung des defructosylierten Dekasaccharids und Vergleich mit Dekasaccharid

Der Vergleich von defructosyliertem Dekasaccharid (**defruct-Deka**) und Dekasaccharid (**Deka**) soll Aufschluss darüber geben, inwieweit die Fructoseeinheit einen Einfluss auf die Glucoseeinheiten des Oligomers hat. Ist aufgrund der Länge des Dekasaccharids überhaupt noch für alle Glucoseeinheiten der Einfluss der Fructose am reduzierenden Ende „spürbar“?

Die Messungen erfolgten bei 290 K, da bei dieser Temperatur alle Anomerensignale sichtbar waren. Sie zeigen im ^1H eine grössere Dispersion als die des **Deka** und zugleich eine kleinere Halbwertsbreite. Die, die Verbreiterung der Signale im **Deka** bedingende, konformationelle Energiebarriere, scheint in der defructosylierten Form nicht mehr vorhanden zu sein.

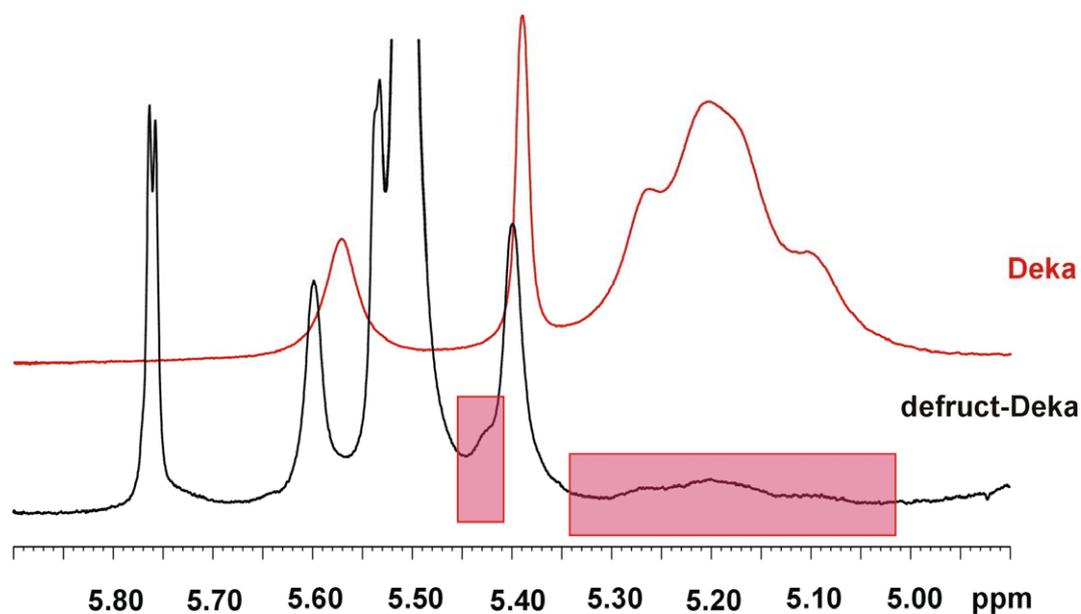


Abb. 53. ^1H Anomerenbereich von **Deka** und **defruct-Deka** bei 300 K (600 MHz, D_2O). Die rot unterlegten Bereiche markieren die Signale von nicht-defructosyliertem **Deka** in der **defruct-Deka** Probe. Deutlich zu erkennen deren starke Verbreiterung.

Der Vergleich der HMQC Spektren von **Deka** und **defruct-Deka** zeigt deutlich die nur noch geringe ^{13}C Dispersion der Anomeren und der C2-Atome der Glucosen. Da die Anomeren von **defruct-Deka** in ihren ^{13}C -Verschiebungen eher den (wenig strukturierten) Maltooligosacchariden ähneln, kann man daraus schliessen, dass eine bevorzugte Struktur im **defruct-Deka** nicht mehr vorliegt und somit die Fructoseeinheit durchaus auf die Struktur des gesamten **Dekas** einen Einfluss hat.

Eine genauere Zuordnung des **defruct-Deka** wurde nicht durchgeführt, da bei der Defructosylierung α - und β -Formen entstehen und dadurch insgesamt 18 Anomeren-signale von identischen Glucoseeinheiten mit einer nicht allzu grossen Dispersion im ^1H vorliegen.

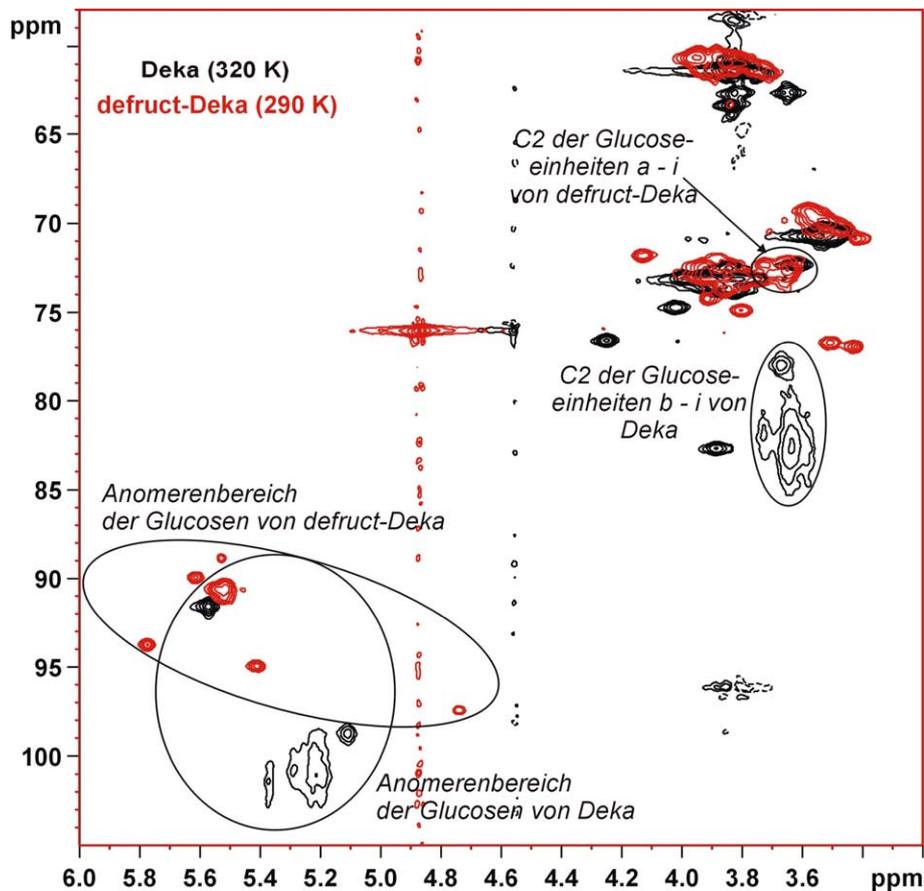


Abb. 54. Vergleich der HMQC Spektren von **Deka** (schwarz, 320 K) und **defruct-Deka** (rot, 290 K) (600 MHz, D₂O). Die grosse Dispersion im ¹³C Bereich geht für die Anomeren und die C2-Atome der Glucosen durch die Defructosylierung gänzlich verloren.

4.2.2 Anmerkungen

Auch die Messung von **Deka** in einer sog. Kryomischung (DMSO_{d6}:D₂O = 4:1 (v/v)) konnte keine weiteren Informationen über das Vorliegen verschiedener Konformere erbringen.

Der untersuchte Temperaturbereich lag zwischen 260 und 300 K, in welchem bei niedrigeren Temperaturen zwar eine noch stärkere Verbreiterung der Signale zu beobachten war, jedoch der Bereich des langsamen Austausches mit zwei separaten Signalsätzen für die unterschiedlichen Konformere nicht erreicht werden konnte.

4.3 Ermittlung der vorliegenden Konformere in höheren Oligosacchariden

Da mit grosser Sicherheit von einem langsamen Austausch zwischen verschiedenen Konformeren für **Okta** und **Deka** ausgegangen werden kann, stellt sich als erstes die Frage, welche Konformere könnten miteinander im Gleichgewicht stehen.

Eine Möglichkeit ist, dass die Wirkung der Fructoseeinheit auf die Helix nur begrenzt ist, so dass bei längeren Oligomeren kein Effekt mehr auf das freie Ende zu beobachten ist. Das würde bedeuten, dass das freie Ende entweder in Form einer links-

bzw. einer rechtsgängigen Helix vorliegt und zwischen diesen beiden Konformationen hin- und herwechselt.

Dazu wäre eine Glucoseeinheit zwischen den verschiedenen Helixabschnitten als Umkehrpunkt vonnöten, wie es in vielen Pflanzen, wie z. B. Hopfen,²¹ zu beobachten ist. Ein Beleg für diese Theorie ist das Vorhandensein eines weniger stark verbreiterten Anomerensignals für **Okta** und **Deka**, welches der Glucoseeinheit im Umkehrpunkt entspricht, wohingegen die Glucosen der beiden Helixabschnitte eine starke Signalverbreiterung im ¹H Spektrum zeigen.

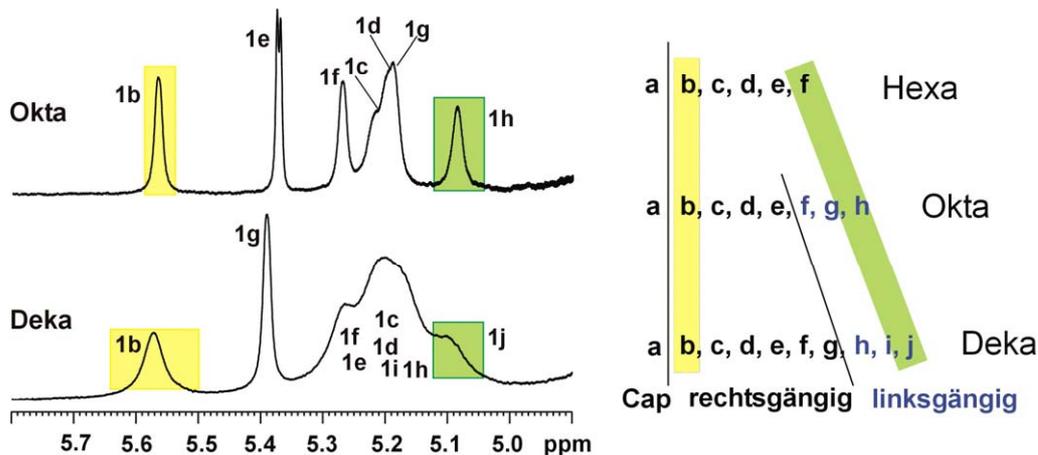


Abb. 55. ¹H Anomerenbereich für **Okta** und **Deka** und schematisch das Vorliegen eines linksgängigen Endes für höhere Oligomere.

Dies würde bedeuten, dass – falls der Umkehrpunkt bei Glucose e für **Okta** und Glucose g für **Deka** liegt – stets die drei letzten Glucoseeinheiten des freien Endes einem konformationellen Wechsel zwischen rechts- und linksgängiger Helix unterliegen. Experimentell lässt sich dies nicht beweisen, da wie schon zuvor gezeigt, die ROESY Signale auch für das **Okta** eindeutig auf eine rechtsgängige Helix hindeuten, was an der relativen Unempfindlichkeit dieser Messgröße liegt. Wie ebenfalls gezeigt, ist es zwischen 260 und 320 K nicht möglich, den konformationellen Austausch im Dekasaccharid entweder so zu beschleunigen, dass wieder Signale mit geringer Halbwertsbreite vorliegen, oder so zu verlangsamen, dass zwei separierte Signalsätze auftreten.

Zumindest eine Theorie, um welche Art von Energiebarriere es sich handelt, die so hoch ist, dass man sich im Bereich des langsamen Austauschs befindet, wäre sinnvoll.

Am besten eignet sich hier der Vergleich mit den Möglichkeiten für andere (helikale) Biopolymere, wie z. B. den Ramachandranplot²² für Peptide. Analog dazu müsste es möglich sein, auch für Saccharide in Abhängigkeit der, die O-glykosidische Bindung bestimmenden, Winkel bevorzugte Sekundärstrukturen zu ermitteln.

Der Ramachandranplot für L-Aminosäuren stellt sich wie folgt dar (aus: ²³):

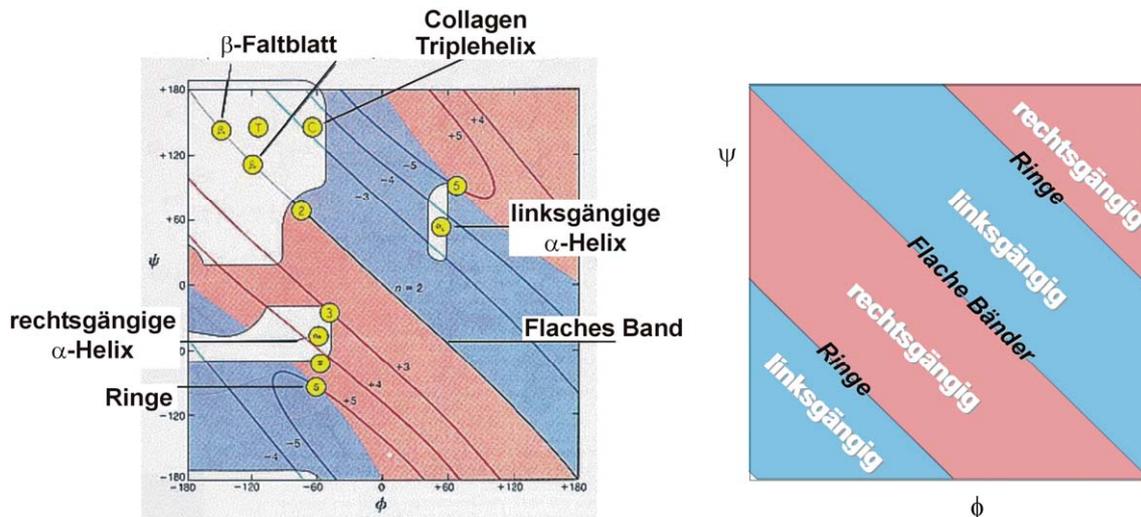


Abb. 56. Ramachandranplot für L-Aminosäuren. An den Grenzen zwischen links- und rechthängiger Struktur treten ringförmige oder blattartig flache Strukturen auf.

So, wie in Peptidbindungen zwei flexible Winkel – Φ und Ψ – getrennt von der nächsten flexiblen Φ/Ψ -Einheit durch ein fixes Element mit Winkel ω , vorliegen, kann dies auch für Saccharide mit O-glykosidischen Bindungen bestimmt werden. Allerdings erfolgt hier die Definition über die, an der O-glykosidischen Bindung beteiligten, Protonen, und nicht wie im Ramachandranplot ausschliesslich über (Schwer-)Atome des Backbones.

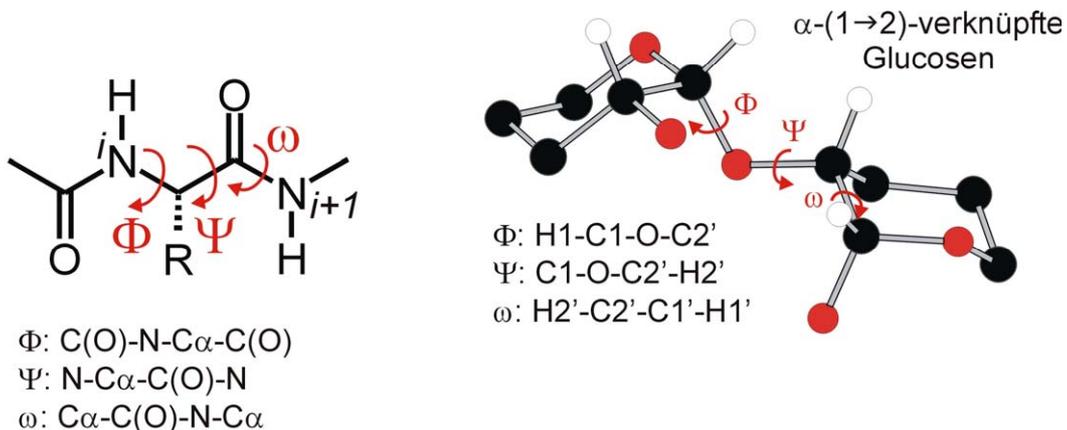


Abb. 57. Winkeldefinitionen in Peptidbindungen und in O-glykosidischen Bindungen.

Für eine α -(1 \rightarrow 2)-Verknüpfung zweier Glucosen erhält man für ω ungefähr 50° . Somit ist es möglich, wie bereits durch die GlycoMaps gezeigt, eine bevorzugte Orientierung in Abhängigkeit von Φ und Ψ zu bestimmen.

Da in GlycoMaps nur Disaccharide berücksichtigt werden, ist zu erwarten, dass in höheren Oligomeren aufgrund sterischer Hinderung nur kleine Φ/Ψ -Bereiche energetisch günstige Konformationen ergeben.

Die Berechnung verschiedener Sekundärstrukturen für ein Oktamer (homooligomer, acht α -(1 \rightarrow 2)-verknüpfte Glucosen) durch Variation von Φ und Ψ im Bereich, der durch GlycoMaps definiert ist, ergibt folgendes:

Φ [°]	Ψ [°]	3D-Struktur
-45	-80	Linksgängige Helix, sehr eng
-60	-60	Linksgängige Helix
-45	-60	Linksgängig, aber ringähnlich
-60	-35	Linksgängig, aber ringähnlich
-50	-50	Ring
-45	-45	Ring
-35	-35	Ring
-30	-30	Ring
-30	-60	Ring
-15	-30	Rechtsgängig, aber ringähnlich
-45	-15	Rechtsgängig, aber ringähnlich
-15	-15	Rechtsgängige Helix
-30	0	Rechtsgängige Helix
-50	0	Rechtsgängige Helix
-30	30	Rechtsgängige Helix
30	15	Rechtsgängige Helix
0	60	Rechtsgängige Helix, gestreckt
-45	80	Rechtsgängige Helix, gestreckt

Tab. 31. Φ/Ψ Kombinationen für Oktamer von α -(1 \rightarrow 2)-verknüpften Glucosen mit resultierender 3D-Struktur.

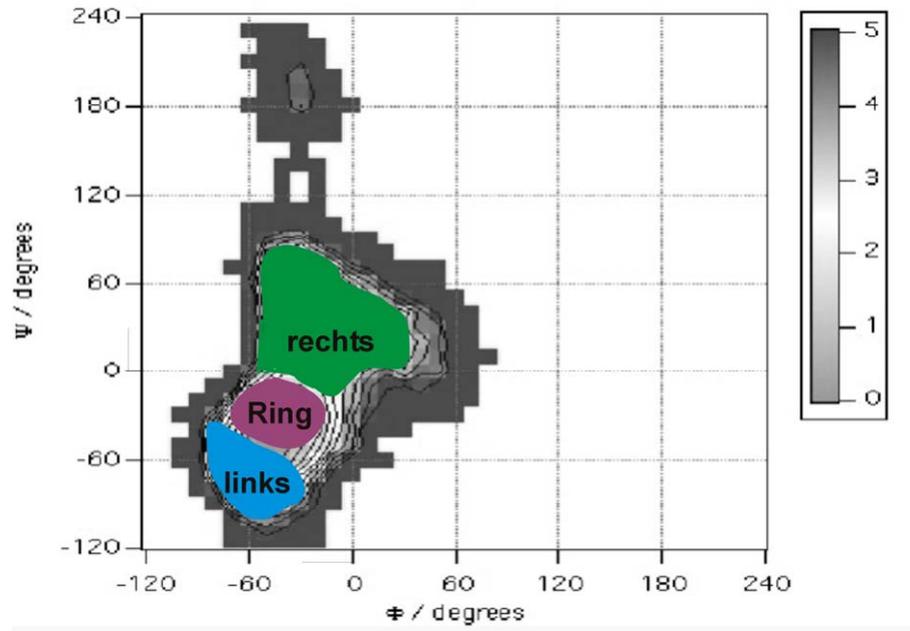


Abb. 58. Φ/Ψ -Plot aus GlycoMaps (f. α -(1 \rightarrow 2)-verknüpftes Glucose-Disaccharid) mit Bereichen der, für das Oktamer ermittelten, 3D-Struktur.

Mit dieser Auftragung lässt sich erklären, weshalb ein langsamer Austausch zwischen den Konformeren (also rechts- und linksgängig) zu beobachten ist. Der „Weg“ von rechts- zu linksgängig führt über einen Φ/Ψ Bereich, der sterisch nicht begünstigt ist (Ring!) und dadurch eine hohe Energiebarriere darstellt.

5. Kann für höhere Oligomere eine Membranaffinität nachgewiesen werden?

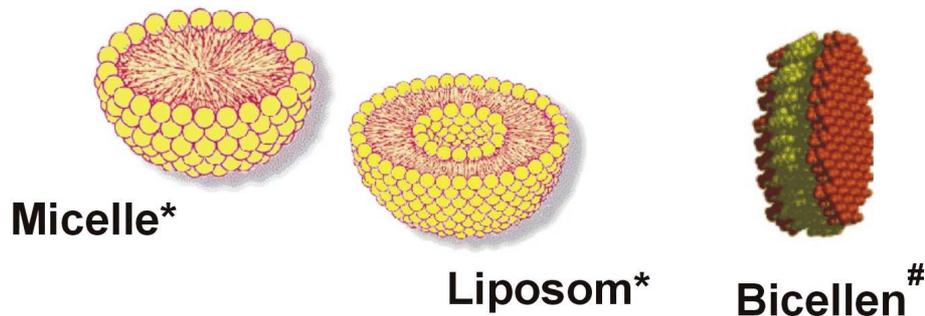
Da, wie im einleitenden Kapitel bereits erwähnt, nicht nur die komplexen Exopolysaccharide unter Extrembedingungen (wie Salz- oder Hitzestress) von den Cyanobakterien vermehrt gebildet werden, sondern dies auch für die hier vorgestellten Oligosaccharide der Fall ist, ist zu überlegen, ob und wenn ja in welcher Weise diese Saccharide eine Schutzfunktion für die Zellen bzw. die sie umgebende Zellmembran ausüben können.

Daher ist es sinnvoll, eines der höheren Oligomere (hier: **Deka**) mit einem kleineren Oligosaccharid (hier: **Hexa**) in verschiedenen Modellmembransystemen mittels NMR zu vergleichen.

Hierzu wurden folgende Systeme untersucht:

- SDS Micellen in D_2O : kugelförmige Vesikel mit Lipidmonolayer
- DMPC Liposomen in D_2O : kugelförmige Vesikel mit Lipidbilayer

- DMPC/DHPC–Bicellen in D_2O /Puffer: scheibenförmige Lipidbilayer, die im magnetischen Feld eine Ausrichtung erfahren (\rightarrow flüssig-kristalline Phase) (siehe Kapitel IV)



* saints.css.edu/bio/schroeder/cell_membrane.html

<http://tesla.ccrcc.uga.edu/research/index.html>

Abb. 59. Micelle – Liposom – Bicelle: Vergleich ihres schematischen Aufbaus. (Quellen sind die angegebenen Internetseiten)

5.1 Hexa und Deka in SDS_{d25} Micellen

Hexa und **Deka** wurden separat in SDS_{d25} Lösung (ca. 25-30 mg/mL D_2O) vermessen, wobei sich für beide Saccharide weder eine Änderung ihrer Signalstrukturen noch ihrer chemischen Verschiebungen im 1H NMR beobachten liess.

1H NMR in D_2O und in SDS_{d25} Micellen sind sowohl für **Hexa** als auch für **Deka** identisch.

\rightarrow **Eine Wechselwirkung zwischen SDS_{d25} Micellen und den untersuchten Sacchariden konnte nicht festgestellt werden.**

5.2 Deka in DMPC Liposomen

Mit Hilfe eines Ultraschall-desintegrators wurden aus DMPC in D_2O Liposomen erzeugt.

Auch für diesen Fall zeigten sich keinerlei Veränderungen der chemischen Verschiebungen oder der Signalbreiten im 1H NMR des **Deka**.

Bei STD^{24} Messungen konnte – bei Einstrahlung auf den 1H Alkylbereich der DMPC Moleküle – keinerlei Sättigungstransfer zwischen **Deka** und Liposomen beobachtet werden.

\rightarrow **Auch in DMPC Liposomen waren keine Wechselwirkungen zwischen Sacchariden und Lipidbilayer nachweisbar.**

5.3 Hexa und Deka in Bicellen – Analyse der dipolaren Kopplungen

Wie in Kapitel IV gezeigt, kann für bestimmte Moleküle in Bicellenlösung eine Affinität zur Lipidbilayer dieser Bicellen über die Stärke ihrer Ausrichtung im Raum nachgewiesen werden.

Da – wie verschiedene Enzymtests vermuten lassen* – die höheren Oligomere (besonders **Deka**) einen Effekt auf das Enzym besitzen, wurde in Bicellenlösungen untersucht, ob auch für jene Oligosaccharide eine stärkere Ausrichtung im Feld aufgrund von Wechselwirkungen mit der Modellmembran (= Bicellen) zu beobachten ist. Nähere Einzelheiten zu Bicellen und den Grundlagen der hier durchgeführten Messungen finden sich in Kapitel IV.

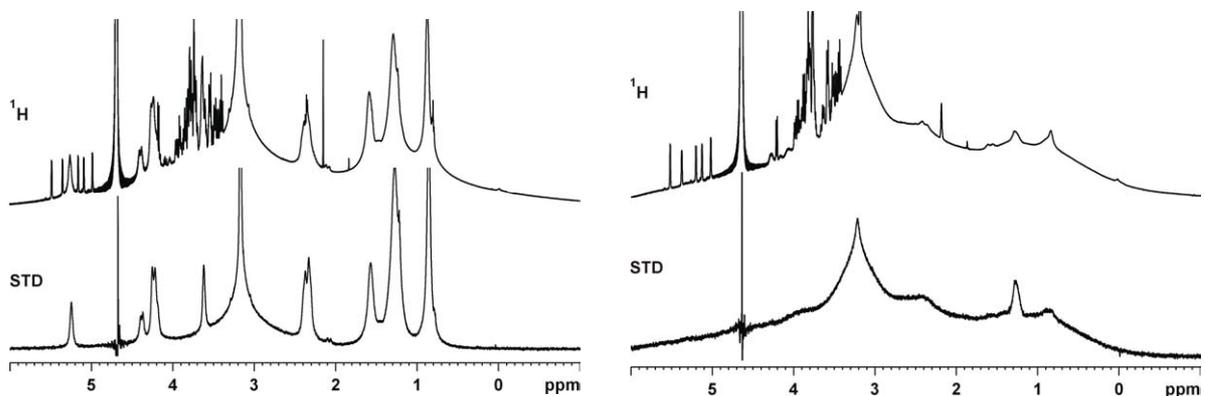


Abb. 60. ^1H und STD Spektrum für **Hexa** in Bicellen bei 300 K (links) – isotrope Lösung – und 308 K (rechts) – flüssig-kristalline Lösung (50 mM Phosphatpuffer, pH 7, 600 MHz).

Es zeigt sich in beiden Fällen im STD kein Sättigungstransfer von den Bicellen auf das Hexasaccharid. Zudem ist die Ausrichtung des **Hexa** in flüssig-kristalliner Phase nur schwach, da sich die beiden ^1H Spektren nur minimal voneinander unterscheiden, also keine grossen dipolaren Kopplungen im Protonenbereich zu beobachten sind.

Für das **Deka** zeigt sich ein ähnliches Bild: auch hier ist weder ein Sättigungstransfer, noch eine starke Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase zu beobachten.

* Arbeiten in der Gruppe von PD Dr. E. Loos.

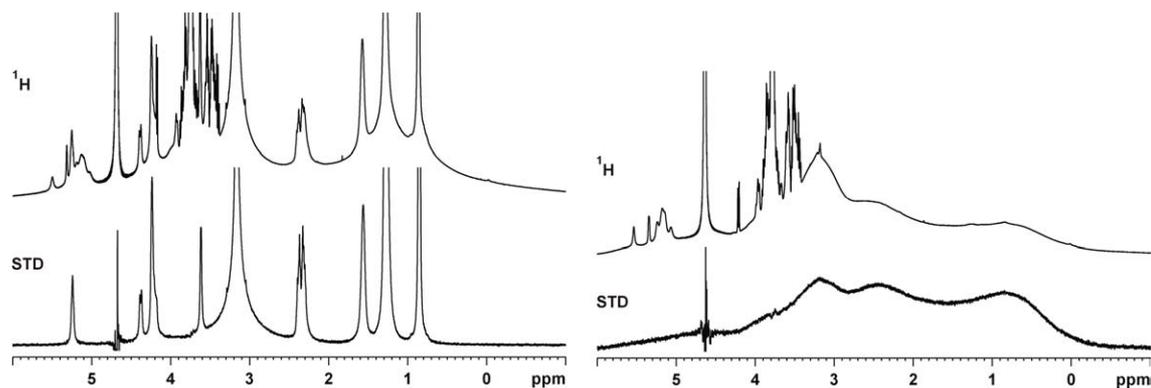


Abb. 61. Deka in Bicellen bei 300 K (links, isotrop) und 308 K (rechts, anisotrop) (50 mM Puffer, pH 7, 600 MHz).

Für den Fall des **Hexa** bleibt noch zu bemerken, dass die Probe zwar nicht vollständig in die anisotrope Phase übergegangen ist, sondern noch ein geringer Teil DMPC / DHPC in Form von Liposomen vorliegt. Dennoch können die, aus dem 2D HMQC Spektrum ermittelten, $|D_{CH}+J_{CH}|$ Werte als Maximalwerte der Ausrichtung angesehen werden, da durch längere Äquilibration schliesslich eine fast einheitliche anisotrope Phase erreicht werden konnte.

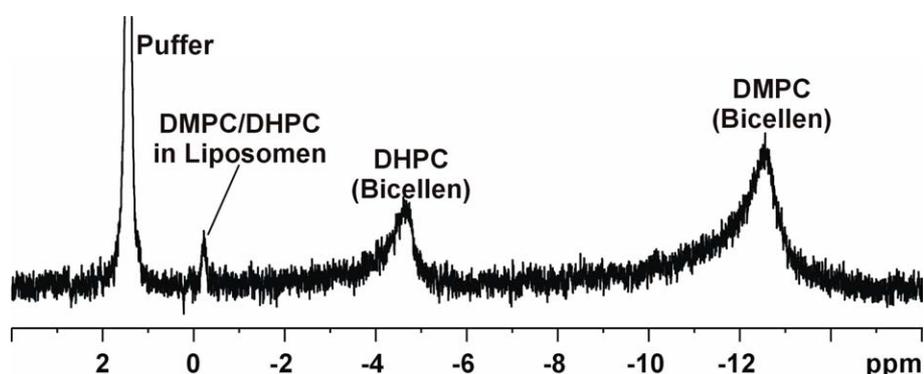


Abb. 62. ^{31}P Spektrum für **Hexa** in Bicellen bei 308 K (anisotrope Lösung). Deutlich zu erkennen das Phosphorsignal für nicht ausgerichtete DMPC / DHPC Moleküle, die als Liposomen vorliegen.

5.3.1 Ermittlung der $^1D_{CH}$ Werte aus 2D HMQC und ^{13}C INEPT Spektren

Für das Hexasaccharid ist die Auswertung der ^{13}C Spektren ohne weiteres möglich, so dass die entsprechenden Werte für $|D_{CH}+J_{CH}|$ (bei 308 K) und J_{CH} (bei 298 K) extrahiert werden können. Allerdings ist dies nur für nicht überlagerte Bereiche möglich.

Für das Dekasaccharid ist aufgrund der starken Signalverbreiterung der Anomeren und der HC2 Atome der Glucosen keinerlei Aussage über deren RDCs (**R**esidual **D**ipolar **C**oupling) möglich. Auch aufgrund der noch stärkeren Signalüberlagerungen sind nur RDCs für den a-Ring, also die Fructoseeinheit, eindeutig zu ermitteln.

Atom	$ D_{CH}+J_{CH} $ [Hz]	$^1J_{CH}$ [Hz]	$^1D_{CH}$ [Hz]
1b	175	175	0
1c	174	175	-1
1d	173	175	-2
1e	174	171	+3
1f	174	173	+1
2b	147.5	144	+3.5
2c	137	143	-6
2d	141	145	-4
2e	142	147	-5
2f	136	143	-7
3e	144	144	0
4b	148	144	+4
1a	138 / 147	151	-13 / -4
3a	144	143	+1
4a	144	143	+1
5a	147	148	-1
6a	142	140	+2

Tab. 32. Für **Hexa** ermittelte RDCs in Bicellen. Deutlich zu erkennen ist die nur schwache Ausrichtung, die sich in kleinen Werten für die dipolaren Kopplungen widerspiegelt (aus 2D HMQC Spektren, nicht- $\{^1H\}$ -entkoppelt).

Atom	$ D_{CH}+J_{CH} $ [Hz]	$^1J_{CH}$ [Hz]	$^1D_{CH}$ [Hz]
3a	151	143	+8
4a	153	147	+6
5a	152	150	+2
71.1 ppm	136	144	-8
CH ₂ -Gruppen	287.5	289	-1.5
nicht zugeordnet	285	289	-4
	284	289	-5
	293	287.5	+5.5
	286	288	-2
2er / 3er / 5er C-Atome	140	149	-9
der Glucosen	133	144	-11
nicht zugeordnet	135 / 142	149	-14 / -7
	132	144	-12
	139	147	-8
	144	145	-1

Tab. 33. Für **Deka** ermittelte RDCs in Bicellen. Die Werte für den a-Ring und 71.1 ppm (wahrscheinlich C2j) stammen aus dem nicht-entkoppelten 2D HMQC, die übrigen Werte aus ^{13}C INEPT Messungen.

Die Ausrichtung ist also eher schwach, so dass Wechselwirkungen der Saccharide mit der Modellmembran (den Bicellen), wie es in Kapitel IV für verschiedene Thiazolidinlactame gezeigt ist, ausgeschlossen werden können. Es handelt sich um eine, wie auch sonst in der Literatur beschriebene, rein sterisch bedingte Orientierung.

5.4 Deka + α -Amylase – Bindungsuntersuchungen mittels Sättigungstransfer (STD)

Da enzymatische Tests gezeigt hatten, dass **Deka**, ähnlich wie Trehalose oder Saccharose, einen Schutz des Enzyms (z. B. α -Amylase) bei erhöhter Temperatur bewirkt, wurde über STD Messungen²⁰ untersucht, ob das Dekasaccharid als schwachbindender Ligand für α -Amylase fungiert.

Messungen erfolgten ohne als auch mit Zusatz von Ionen, genauer CaCl_2 und NaCl , welche die Aktivität des Enzyms steigern.

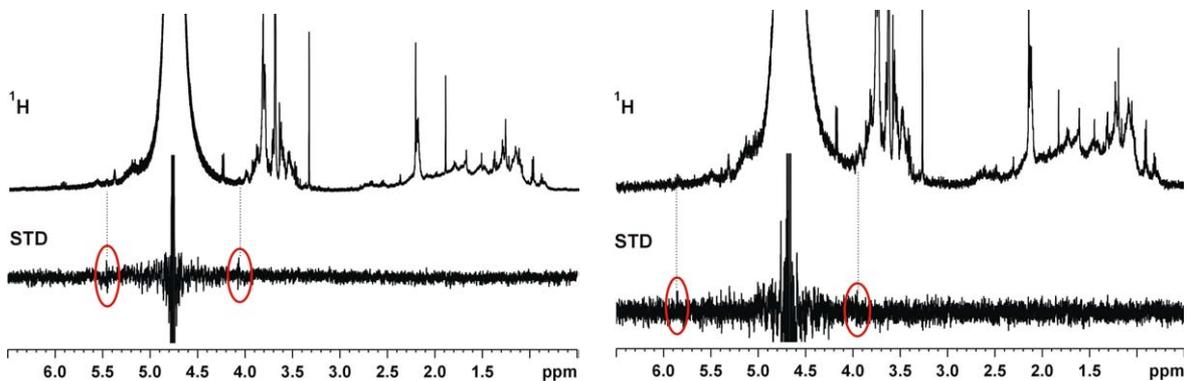


Abb. 63. ^1H und STD Spektren von **Deka** + α -Amylase links ohne, rechts mit CaCl_2 / NaCl (50 mM Phosphatpuffer, pH 7, D_2O , 600 MHz, 300 K).

Die beiden „Signale“ im linken STD Spektrum stimmen zwar in etwa mit der Lage von Signalen des **Deka** im ^1H überein; allerdings sind sie so schwach (und in etwa symmetrisch zum HDO-Signal), dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass es sich um einen Sättigungstransfer von α -Amylase auf das Dekasaccharid handelt, sondern um Artefakte.

Somit kann mit dieser Methode keinerlei (schwache) Bindung zwischen Enzym und Saccharid nachgewiesen werden, was nicht unbedingt gleichbedeutend ist mit einer nicht vorhandenen Bindung. Evtl. ist man mit der Messung des Sättigungstrfers ausserhalb des, für dieses System geeigneten, Messfensters.

6. Zusammenfassung

Die unbekannt, aus dem Cyanobakterium *Nostoc* isolierten, Oligosaccharide konnten als Mitglieder einer homologen Reihe identifiziert werden. Es handelt sich um eine Kette aus α -(1 \rightarrow 2)-verknüpften Glucosen, die an ihrem reduzierenden Ende eine β -D-Fructofuranose trägt. Vom Tri- bis zum Dekasaccharid konnte dieses Verknüpfungsmuster eindeutig identifiziert werden, wobei mit Hilfe von Massenspektren für Tri-, Tetra- und Dekasaccharid das Vorhandensein von anorganischen Seitengruppen, wie z. B. Phosphat oder Sulfat, ausgeschlossen werden konnte.

Die über 2D-NMR Daten bestimmte, bevorzugte 3D-Struktur erwies sich als rechtsgängige Helix mit Ganghöhe 4 im Falle von Hexa- und Oktasaccharid, wobei das **Hexa** die kürzestmögliche Einheit darstellt, um eine volle Helixwindung zu erhalten.

Für die, durch säurehydrolytische Abspaltung der Fructoseeinheit erhaltenen, defructosylierten Oligosaccharide (**defruct-Penta** und **defruct-Deka**) konnte im Falle des α -konfigurierten **defruct-Penta** (α am reduzierenden Ende) eine linksgängige Helix mit Ganghöhe 4 als bevorzugt eingenommene Struktur bestimmt werden. Allerdings ist die defructosylierte Form um einiges flexibler als die nicht-defructosylierte, so dass eine konformationelle Mittelung stattfindet, wobei für das α -defructosylierte eine schwache Bevorzugung der linksgängigen Helix postuliert werden kann. Das β -konfigurierte **defruct-Penta** zeigte eine hohe Flexibilität und keine einheitliche Struktur.

→ Die Fructoseeinheit am reduzierenden Ende induziert und stabilisiert eine Sekundärstruktur, die ohne sie nicht vorliegen würde. Diese Fructose ist der Grund für eine Änderung der helikalen Gangrichtung von bevorzugt links- (ohne Fructose) auf bevorzugt rechtsgängig (mit Fructose).

Oligosaccharid	1 - 1 ROE	1 - 2 ROE	Φ / Ψ Winkel Def. über Schweratome	Φ / Ψ Winkel Def. über Protonen
α -defruct linksgängige Helix	kurz (~ 2.4 Å)	kurz (~ 2.4 Å)	$\Phi = 50...77^\circ$ $\Psi = 62...72^\circ$	$\Phi = -42...-69^\circ$ $\Psi = -50...-61^\circ$
β -defruct sehr flexibel, keine bevorzugte 3D-Struktur	kurz/mittel (2.4 - 2.8 Å)	nicht vorhanden	nicht berechnet	nicht berechnet
Penta/Hexa rechtsgängige Helix	lang (2.6 - 3.4 Å)	kurz (2.1 - 2.2 Å)	$\Phi = 72...85^\circ$ $\Psi = 90...169^\circ$	$\Phi = -30...-45^\circ$ $\Psi = -32...+55^\circ$
Oktasaccharid rechtsgängige Helix	lang (2.7 - 3.4 Å)	kurz (2.1 - 2.2 Å) (letzte Glc-Einheit 2.4 Å)	$\Phi = 73...95^\circ$ $\Psi = 94...131^\circ$	$\Phi = -23...-44^\circ$ $\Psi = -28...15^\circ$
Modellhelix rechtsgängig ($\Phi = 60^\circ$, $\Psi = 120^\circ$)	lang (2.8 - 2.9 Å)	kurz (~ 2.3 Å)	$\Phi = 60^\circ$ $\Psi = 120^\circ$	$\Phi = \sim -50^\circ$ $\Psi = \sim 0^\circ$
Modellhelix linksgängig ($\Phi = 60^\circ$, $\Psi = 60^\circ$)	kurz (2.1 - 2.2 Å)	lang (3.0 - 3.1 Å)	$\Phi = 60^\circ$ $\Psi = 60^\circ$	$\Phi = -55...-60^\circ$ $\Psi = \sim -60^\circ$

Tab. 34. Vergleich der ROE Abstände und Winkel, die die O-glykosidische Bindung charakterisieren, der berechneten Oligomerstrukturen und zweier Modellhelices.

Für höhere Oligomere kann angenommen werden, dass das freie (nicht-fructosylierte) Ende zwischen der links- und der rechtsgängigen Konformationen hin- und herwechselt. Dies zeigt sich in verbreiterten Signalen im ^1H , da man aufgrund der hohen Energiebarriere, bedingt durch das Durchlaufen ungünstiger Φ/Ψ -Kombinationen beim Übergang zwischen rechts- und linksgängig, im Bereich des langsamen Austausches ist. Durch Variation der Temperatur kann weder der Bereich des schnellen Austausches, noch der Bereich mit stark verlangsamten Austausch und doppeltem Signalsatz, erreicht werden.

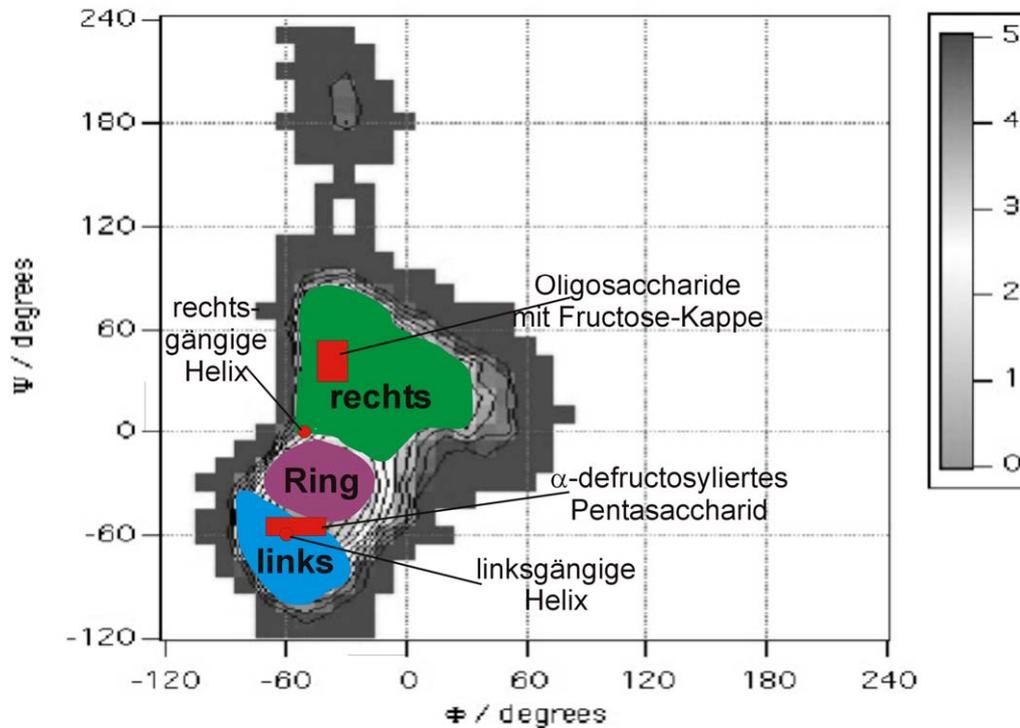


Abb. 64. Energie der O-glykosidischen Bindung in α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- α -D-Glc in Abhängigkeit von Φ - und Ψ -Winkel. Eingezeichnet die Winkelbereiche der berechneten Strukturen und der Modellhelices. (Energiekarte aus GlycoMaps©). Die auftretende Sekundärstruktur wurde für ein homooligomeres Oktamer berechnet.

Insgesamt handelt es sich v. a. bei den kürzeren Oligosacchariden um Zucker mit ungewöhnlich stabiler Sekundärstruktur, wie sie normalerweise in kürzeren Oligosacchariden nicht vorgefunden werden kann.

7. Literaturstellen

- [1] De Philippis R.; Vincenzini M. *FEMS Microbiology Reviews* **1998**, *22*, 151-175.
- [2] De Philippis R.; Margheri M. C.; Materassi R.; Vincenzini M. *Applied and Environmental Microbiology* **1998**, *64*, 1130-1132.
- [3] De Philippis R.; Sili C.; Paperi R.; Vincenzini M. *J. Appl. Phycology* **2001**, *13*, 293-299.
- [4] Garozzo D.; Impallomeni G.; Spina E.; Sturiale L. *Carb. Res.* **1998**, *307*, 113-124.
- [5] (a) Tsusue Y.; Fujita Y. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **1964**, *10*, 283-294. (b) Tsusue Y.; Yamakawa T. *J. Biochem.* **1965**, *58*, 587-594.
- [6] Mazor G.; Kidron G. J.; Vonshak A.; Abeliovich A. *FEMS Microbiology Ecology* **1996**, *21*, 121-130.
- [7] Padhi H.; Rath B.; Adhikary S. P. *Biologia Plantarum* **1997/98**, *40*, 261-268.
- [8] (a) Mikkat S.; Effmert U.; Hagemann M. *Arch. Microbiol.* **1997**, *167*, 112-118. (b) Page-Sharp M.; Behm C. A.; Smith G. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1472*, 519-528. (c) Wingler A. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 437-440.
- [9] Kromkamp J. *New Zealand J. Marine and Freshwater Res.* **1987**, *21*, 457-465.
- [10] Salerno G. L.; Porchia A. C.; Vargas W. A.; Abdian P. L. *Plant Science* **2004**, *167*, 1003-1008.
- [11] Meindl D.; Loos E. *Plant Science* **1990**, *72*, 283-288.
- [12] Mathews C. K.; van Holde K. E.; Ahern K. G. *Biochemistry*, 3rd Edition, Addison Wesley Longman, San Francisco, **1999**, 298-303.
- [13] Johnson S. Western Piedmont Community College, Chemistry Department, Vorlesungsreihe CHM132. URL: www.bt.wp.cc.nc.us/~chemdept/
- [14] Bock K.; Pedersen C.; Pedersen H. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1984**, *42*, 193-225.
- [15] Molinero V.; Goddard III W. A. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 1414-1427.
- [16] Immel S.; Lichtenthaler F. W. *Liebigs Ann.* **1995**, 1925-1937.
- [17] Neubauer H.; Meiler J.; Peti W.; Griesinger C. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 243-258.
- [18] <http://www.dkfz-heidelberg.de/spec/glycomaps/?PHPSESSID=e6dc88333d081335294c29e582fdc2df>
- [19] Aurora R.; Rose G. D. *Protein Science* **1998**, *7*, 21-38.
- [20] a) Janaswamy S.; Chandrasekaran R. *Carb. Res.* **2002**, *337*, 523-535. b) <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycar.html>

- [21] Botanik online – The Internet Hypertextbook, <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d00/inhalt.htm>, Stichwort: Rankenbewegungen
- [22] Ramachandran G. N.; Sasisekharan V. *Adv. Prot. Chem.* **1968**, 23, 283-438.
- [23] Mathews C. K.; van Holde K. E.; Ahern K. G. *Biochemistry*, 3rd Edition, Addison Wesley Longman, San Francisco, **1999**, Kapitel 6.
- [24] Klein J.; Meinecke R.; Mayer M.; Meyer B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5336-5337. b) Vogtherr M.; Peters T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6093-6099. c) Meyer B.; Peters T. *Angew. Chem.* **2003**, 115, 890-918.

Kapitel IV

Membranaffinität von Polyolen
Identifizierung der Stärke und Struktur-
abhängigkeit mittels RDCs

1. Einleitung

1.1 Partielle Orientierung und NMR – Allgemeines¹

In der Festkörper-NMR Spektroskopie werden häufig räumlich anisotrope, magnetische Parameter, wie Dipol-Dipol Wechselwirkungen, Anisotropie der chemischen Verschiebung oder Quadrupolwechselwirkungen, verwendet, um strukturelle Informationen von Molekülen zu erhalten.

Diese Arten von Wechselwirkungen treten prinzipiell auch bei Molekülen in Lösung auf, werden aber aufgrund der schnellen Reorientierung der Moleküle in Lösung (isotropes Tumbling) zu null gemittelt. NMR Spektroskopie in Lösung bedient sich meist dieser sog. isotropen Lösungen, die keine räumliche Vorzugsrichtung besitzen, und somit keine Ermittlung der, in der Festkörper-NMR zusätzlich verfügbaren, experimentellen Größen zulassen.

Es gibt jedoch verschiedene Möglichkeiten, auch in Lösung zumindest eine Teilausrichtung, also eine schwache räumliche Anisotropie, zu induzieren und dadurch Größen wie die Residualen Dipolaren Kopplungen (RDCs) als zusätzliche Informationsquelle nutzen zu können.

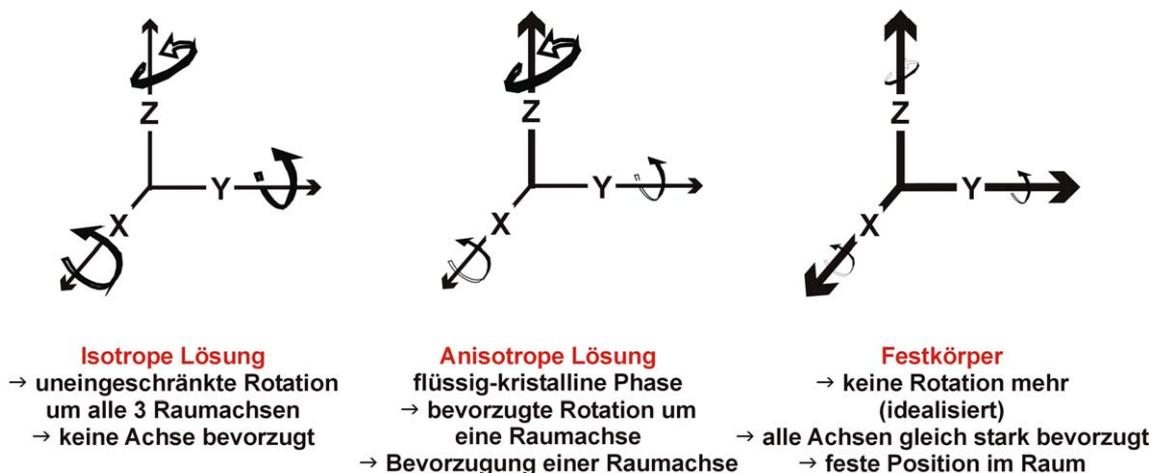


Abb. 1. Vergleich von isotroper und anisotroper Phase mit dem Festkörper. Die anisotrope Phase nimmt eine Zwischenstellung zwischen isotroper Lösung und Festkörper ein – sie besitzt zwar eine Teilausrichtung und eine Bevorzugung einer Raumachse, jedoch ist der Grad dieser Bevorzugung im Vergleich zum Festkörper gering.

Dies findet vor allem bei der Strukturaufklärung bzw. –optimierung grösserer Biomoleküle Anwendung, wenn z. B. nicht genügend Daten aus NOESY Messungen zur Verfügung stehen. Aber auch die Orientierung einzelner Molekülteile zueinander lässt sich mit Hilfe von RDCs vielfach eindeutiger bestimmen als nur unter Verwendung von NOESY Daten. Ferner können, v. a. in Proteinen, Einheiten identifiziert werden, die einem konformationellen Austausch unterliegen, oder es können auch Informationen über Ligand-Rezeptor Komplexe bei schwacher Ausrichtung des Rezeptors in der Lösung erhalten werden.

Damit können, eigentlich nur in der Festkörper-NMR zugängliche Parameter, auch in Lösung vielfältig verwendet werden.

1.2 Mathematische und physikalische Grundlagen der Residualen Dipolaren Kopplungen (RDCs)^{1, 2}

Wie bereits erwähnt, ist eine teilweise Orientierung der Moleküle in Lösung vonnöten, um RDCs detektieren zu können. D. h. eine der Raumachsen erfährt eine stärkere Bevorzugung gegenüber den beiden anderen; dadurch ist eine isotrope Bewegung in Lösung nicht mehr möglich. Somit weisen alle internuklearen Vektoren eine, wenn auch nur schwache, Bevorzugung einer bestimmten räumlichen Orientierung auf, was zur Folge hat, dass für jeden internuklearen Vektor eine bestimmte Ausrichtung in Bezug auf die Magnetfeldachse stärker populiert ist als andere.

Der hiermit verknüpfte, experimentelle Parameter, die residuale dipolare Kopplung D , zeigt sich als zusätzliche Kopplung sowohl im ^1H als auch im entsprechenden heteronuklearen Spektrum. Die in anisotroper, teilausgerichteter Lösung ermittelte Kopplungskonstante J_{eff} ist die Summe aus skalarer J Kopplung und dipolarer Restkopplung D .

$$\mathbf{J}_{\text{eff}} = |\mathbf{J} + \mathbf{D}| \quad (1)$$

Die Grösse von D ist abhängig vom Winkel θ des internuklearen Vektors (der Kerne i und j) mit dem Magnetfeld.

$$D_{ij} = - \frac{\mu_0 \gamma_i \gamma_j \hbar}{(2\pi r_{ij})^3} \left\langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right\rangle \quad (2)$$

wobei folgende Konstanten miteinfließen:

μ_0 Permeabilität im Vakuum, γ_i und γ_j die gyromagnetischen Verhältnisse der Kerne i und j und \hbar die Plancksche Konstante.

Zudem ist der Abstand r der beiden Kerne i und j , also die Länge des internuklearen Vektors, enthalten. Dieser Wert ist eigentlich keine feste Grösse, sondern aufgrund der Bindungsschwingungen, ein zeitlich gemittelter Wert. Da jedoch diese Bewegungen auf einer anderen Zeitskala liegen, kann ein effektiver Bindungsabstand gesetzt werden, der zeitunabhängig ist.

Allerdings sind, wie die eckigen Klammern für die Winkelabhängigkeit zeigen, die RDCs zeitabhängig. Die gemessenen Kopplungen in anisotroper Lösung sind das Resultat der zeitlichen Mittelung sowohl von Reorientierung der internuklearen Vektoren aufgrund der Reorientierung des gesamten Moleküls als auch von Bewegungen innerhalb des Moleküls oder einzelner Molekülbereiche.

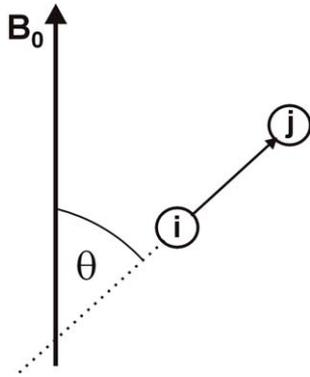


Abb. 2. Darstellung des Winkels θ zwischen internuklearem Vektor der Kerne i und j und dem Magnetfeld B_0 .

Der zeitlich gemittelte Term für den Winkel θ gibt die Verteilung der räumlichen Orientierung des internuklearen Vektors zwischen i und j relativ zum Magnetfeld wieder.

Da praktisch immer nur eine partielle Orientierung in Lösung vorliegt, kann es somit nie einen definierten Winkel θ für die Ausrichtung eines Bindungsvektors geben, sondern stets eine Mittelung über alle Orientierungen des Vektors über die Zeit, wobei durch die teilweise Ausrichtung eine Bevorzugung bestimmter Orientierungen auftritt.

1.3 Möglichkeiten der partiellen Orientierung in Lösung

Es gibt verschiedene Gründe, weshalb sich Moleküle im magnetischen Feld (teilweise) ausrichten:^{1a, 1b}

- Moleküle, die aufgrund ihrer Struktur eine anisotrope Verteilung ihrer Elektronendichte aufweisen, und infolgedessen einen sog. anisotropen, magnetischen Suszeptibilitätstensor besitzen, können sich in Abhängigkeit von der Feldstärke in einem magnetischen Feld (schwach) ausrichten. Dies ist besonders bei α -helikalen Peptideinheiten aufgrund der Orientierung der Peptidbindungen und bei DNA aufgrund der Stapelung der Basenpaare zu beobachten.
- Moleküle, die paramagnetische Gruppen enthalten, und somit ein permanentes, magnetisches Dipolmoment besitzen, richten sich ebenfalls im Magnetfeld aus. Meist tritt für diese Systeme noch (zusätzlich) der im ersten Punkt beschriebene Effekt auf.

Im Fall der paramagnetischen Systeme ist zwar die Ausrichtung deutlich stärker als für diamagnetische Moleküle, doch sind beide, im Vergleich zu den nun folgenden Möglichkeiten der Orientierung, im Magnetfeld nur schwach ausgerichtet, zudem ist der Grad der Ausrichtung nicht „einstellbar“.

- Phagen oder virale Partikel als „Lösungsmittelzusätze“. Einer der bekanntesten ist der Bakteriophage Pf1; hierbei handelt es sich um ein einsträngiges, zirkuläres DNA Genom, welches in einem Hüllprotein verpackt ist. Daraus ergeben sich kleine Stäbe mit ca. 60 Å Durchmesser und etwa 20000 Å Länge, die sich in Lösung mit ihrer Längsachse parallel zur Magnetfeldachse orientieren. Zudem zeichnen sie sich durch eine sehr hohe Stabilität unter verschiedenen experimentellen Bedingungen und durch einen grossen Temperaturbereich, in welchem die orientierte Phase stabil ist, aus. Da Pf1 negative Ladungen trägt, ist er besonders gut für Untersuchungen von, ebenfalls negativ geladener, DNA geeignet.
- Ternäre Phasen bestehend z. B. aus Cetylpyridiniumbromid (CPB), Hexanol und NaCl oder NaBr. Zu dieser Gruppe sollte man auch die Mischung aus n-Alkyl-Polyethylenglykol (z. B. C12E5: Pentaethylenglykolmonododecylether), n-Alkyl-Alkohol (z. B. n-Hexanol) und Wasser zählen, eine Mischung, die zuweilen auch als Otting Phase bezeichnet wird. Vorteil dieser Mischungen ist ihre geringe Nei-

gung zu Wechselwirkungen mit Makromolekülen. Zudem sind sie ungeladen, so dass weder Salzkonzentration, noch pH Wert grosse Auswirkungen auf die orientierte Phase haben.

- Polyacrylamidgele, die durch mechanische Belastung in Form von Stauchen oder Strecken in orientierte Gele überführt werden. Makromoleküle in Lösung können dann leicht in die Gele eindiffundieren.
- Bicellen – Lipidbilayer, die bei einer bestimmten Temperatur im magnetischen Feld einen Phasenübergang von einer isotropen zu einer flüssig-kristallinen Phase erfahren.

Da es sich bei diesen Bicellen um das, bei diesen Untersuchungen vorrangig verwendete, orientierende Medium handelt, soll hierauf im Folgenden näher eingegangen werden.

1.3.1 Bicellen – Aufbau und physikalische Eigenschaften

Bicellen (Bilayered (Binary) mixed Micelles)^{3a, 3b} bestehen aus einer Mischung von langkettigen und kurzkettigen Phosphatidylcholinen (PCs) in Wasser oder gepufferter, wässriger Lösung. Das kurzkettige wird auch als Detergens bezeichnet, da nur durch dessen Zusatz das langekettige PC in Wasser in Lösung gebracht werden kann.

Die gebräuchlichste Mischung besteht aus 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DMPC, zwei C₁₄ Ketten) als langkettigem und 1,2-Dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DHPC, zwei C₆ Ketten) als kurzkettigem PC, es finden jedoch auch C₁₂ bis C₁₈-kettige PCs – teilweise ungesättigt – als langkettige und Moleküle wie CHAPSO (3-(cholamidopropyl)dimethylammonio-2-hydroxy-1-propan-sulfonat) als Detergens Verwendung. Zudem ist es möglich, geladene, amphiphile Additive in geringer Menge zuzusetzen, welche dieselbe Ladung wie die zu untersuchenden Moleküle in Lösung aufweisen, um ladungsbedingte Wechselwirkungen mit der Bicellenoberfläche zu verhindern. Als positiv geladenes Amphiphil wird in der Regel Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), als negativ geladenes meist Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben.^{3c}

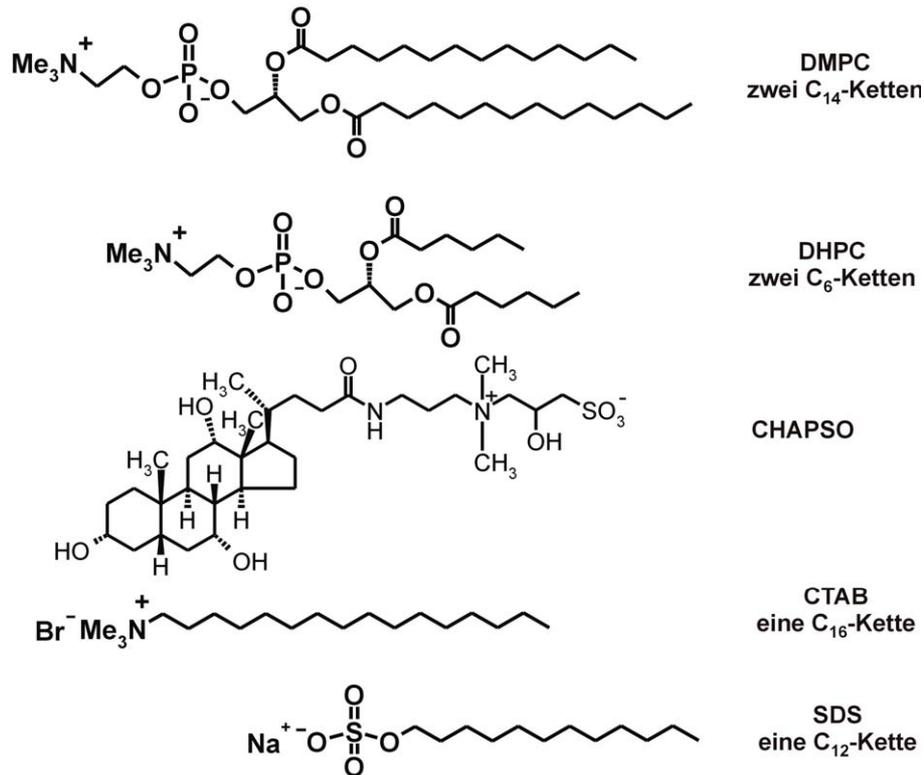


Abb. 3. Strukturformeln der am häufigsten verwendeten Substanzen für die Bicellenpräparation und der gängigen Additive.

Diese, auch als Modellmembranen aufzufassenden, Bicellen zeigen ein sehr komplexes Phasendiagramm, wobei die Übergänge zwischen einzelnen Phasen von mehreren Faktoren abhängen:^{4, 1a}

- molares Verhältnis q von DMPC zu DHPC (stabil in einem Bereich von 2.9 – 3.7 für $n(\text{DMPC}):n(\text{DHPC})$)
- Gesamtlipidkonzentration c in Lösung (3 – 10% (w/w), um einen relativ geringen Orientierungsgrad zu erreichen, der zu Spektren mit hoher Auflösung führt)
- Temperatur.

Voraussetzung, dass überhaupt jene Phasenübergänge auftreten können, ist das Vorhandensein eines magnetischen Feldes.

Über die Struktur/Morphologie der Bicellen, also jener Form, die in anisotroper, flüssig-kristalliner Phase, vorliegt, ist viel diskutiert worden. So werden sie meist als dünne Scheibchen („Discs“) beschrieben, deren Flächen von langkettigem DMPC, ihre Ränder hingegen von DHPC gebildet werden.^{3b, 5} Sie erfahren eine Ausrichtung mit ihrem Normalenvektor senkrecht zur Magnetfeldachse. Aber auch ein schwammartiges Aussehen mit DMPC Doppelschichten, die von, mit DHPC abgesättigten, Löchern unterbrochen werden („swiss cheese model“), wird diskutiert.⁶

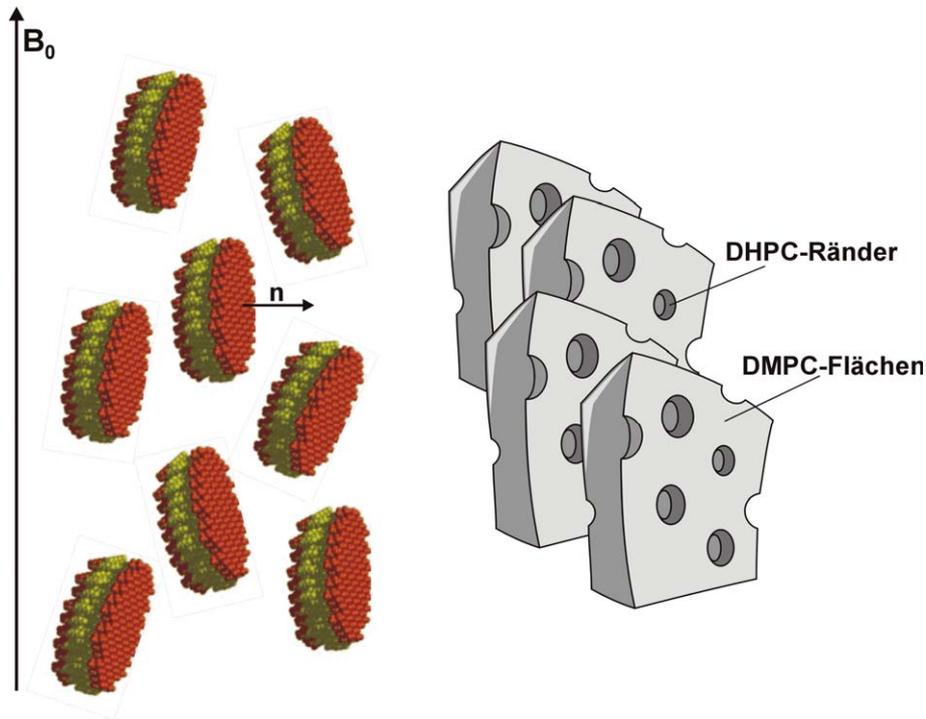


Abb. 4. Bicellen (links, übernommen von <http://tesla.ccruc.uga.edu/research/index.html>) dargestellt als dünne Scheibchen orientiert im Magnetfeld. Der Normalenvektor n der Bicellenfläche steht senkrecht zur Magnetfeldachse. Auf der rechten Seite eine schematische Darstellung der schwammartigen Struktur mit DHPC-„Löchern“.

Für die isotrope Lösung von DMPC/DHPC in Wasser wird eine Mischung aus Micellen angenommen. Allerdings gibt es nicht nur einen einzigen Phasenübergang innerhalb des, i. a. für NMR Messungen von Biomolekülen interessierenden, Temperaturbereichs (ca. 20 – 40 °C), sondern mehrere, wobei auch Mischungen aus verschiedenen Phasen vorliegen können. Sternin et al.^{4c} fanden für ihr System die stabile Bicellenphase in einem sehr schmalen Temperaturbereich von 34 – 36 °C.

Da Bicellen in flüssig-kristalliner Phase in etwa 40 Å dick sind und einen Durchmesser von ca. 200 – 250 Å aufweisen,^{1a} bewegen sie sich in einer Größenordnung, in der die betreffenden Aggregate aufgrund ihrer schnellen Relaxation nur mehr als breite Untergrundsignale zu beobachten, aber keine separierten DMPC- bzw. DHPC-Signale mehr vorhanden sind. Zudem erfahren sie eine Orientierung im Feld, was zu einer zusätzlichen Verbreiterung der Signale aufgrund (starker) dipolarer Kopplungen führt. Auch das ^{31}P Spektrum der orientierten Phase unterscheidet sich deutlich von dem der isotropen Phase. In isotroper Lösung gibt es nur ein Signal für DMPC und DHPC im ^{31}P Spektrum, wohingegen aufgrund der Orientierung in flüssig-kristalliner Phase zwei Signale im ^{31}P zu beobachten sind, für DMPC in den planaren Flächen und für DHPC an den Rändern der Bicellen.

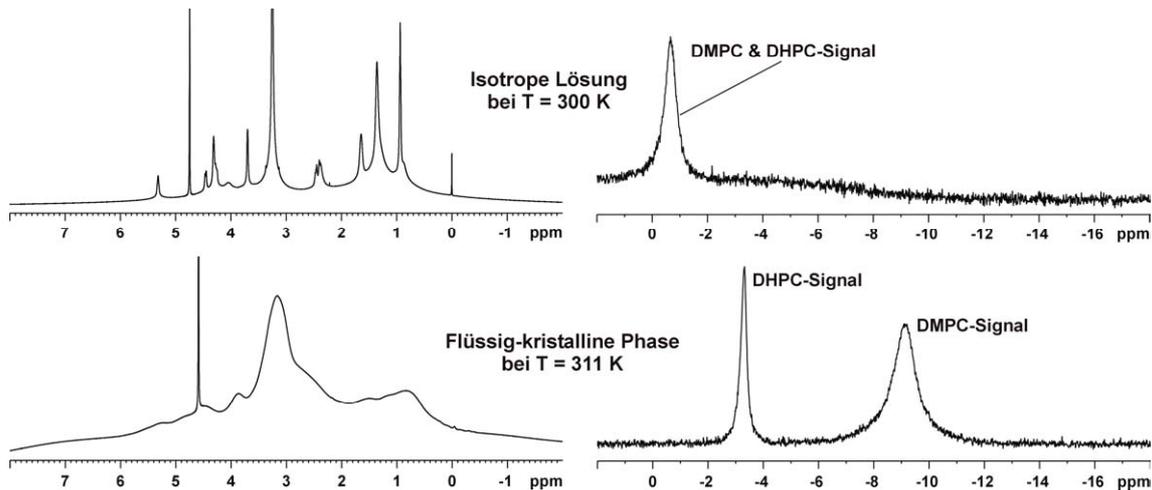


Abb. 5. ^1H (links) und ^{31}P (rechts) NMR Spektren für DMPC/DHPC in wässriger Lösung. Oben in isotroper Lösung bei 300 K – also in Form nicht orientierter micellarer Strukturen. Unten in flüssig-kristalliner Phase bei 311 K als Bicellen.

Ein Vorteil der Bicellen als Mittel, um eine schwache Orientierung in Lösung zu gewinnen, ist ihre relativ leichte Präparation und die Option, den Grad der Orientierung durch die experimentellen Parameter q und c zu variieren.

Von Nachteil ist hingegen

- die schnelle Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen bei nicht optimal eingestelltem pH Wert.
- ein nur eingeschränktes Messfenster der Temperatur für die flüssig-kristalline Phase.
- die experimentellen Parameter q und c können nur in sehr engen Grenzen variiert werden.

Zu bemerken bleibt noch, dass bei ternären Systemen, wie z. B. der Otting Phase, die Ausrichtung der gelösten Moleküle nur von ihrer Form abhängt, wohingegen in Bicellen auch elektrostatische Wechselwirkungen bedacht werden müssen.⁷

1.4 Orientierung kleinerer Moleküle im magnetischen Feld

Die Anwendung von RDCs zur Strukturermittlung ist vor allem bei grossen (Bio-)Molekülen, i. d. Regel Proteinen, sinnvoll, für die nicht genügend andere NMR (z. B. NOESY) Daten vorhanden sind, um die Struktur in Lösung bestimmen zu können.

Aber auch kleine Moleküle, wie z. B. Kohlenhydrate, wurden vielfach untersucht. Da es sich bei den, in diesem Kapitel untersuchten, Molekülen ausschliesslich um kleine Moleküle ($M < 1000$) in Bicellenlösung handelt, möchte ich im Folgenden nur jene Systeme aus der Literatur aufgreifen, die als sinnvoller Vergleich herangezogen werden können.

Besonders eine Vielzahl an verschiedenen Oligosacchariden⁸ wurde in Bicellen untersucht. Zum einen, um auch für kleinere Moleküle eine Strukturoptimierung mittels RDCs durchführen,^{8a-c} zum anderen, um vor allem die, in Sacchariden auftretende,

Flexibilität der O-glykosidischen Bindungen oder gepuckerter Fünfringe exakter bestimmen zu können.^{8d-h} Bei den ausgewählten Literaturbeispielen handelt es sich um Messungen in „Standard“-Bicellenlösungen, also mit einem Gesamtlipidgehalt von 5 – 20% und einem molaren Verhältnis von DMPC:DHPC von ca. 3 in Wasser oder gepufferter, wässriger Lösung.

Von besonderer Bedeutung für die sich anschliessende Untersuchung kleiner, hydrophiler Polyole sind die Grössenordnungen der dipolaren Kopplungen ($^1D_{CH}$ bzw. D_{HH}). Gängige Grössenbereiche geben die Literaturbeispiele in Tab.1 wieder.

Molekül	$^1D_{CH}$ [Hz]	Bicellenbedingungen	Literatur
LNT	-2.7 ... +19.8	DMPC / DHPC	8d
LNF1	-18.4 ... +12.1	c = 7.5% / q = 3	
LND1	-26.5 ... +20.0		
(versch. Lewis Blutgruppenepitope)			
LNF2	-5.8 ... +15.3	DMPC / DHPC c = 7.5% / q = 3	8e
Tetrasaccharid (unverzweigt)	-17.7 ... +22.8	DMPC / DHPC c = 7.5% / q = 2.9	8a
Saccharose	-4.49 ... +1.99	DMPC / CHAPSO	8c
Raffinose	-6.54 ... +5.28	c = 7.5% / q = 3.5	
Lewis ^x	-11.0 ... +12.3	C ₁₃ / C ₆ Diether PCs	8g
Lewis ^a	-7.5 ... +16.7	c = 7.5% / q = 3	
Trimannosid	-17.4 ... +16.5	DMPC / DHPC c = 10% / q = 3	8f

Tab. 1. Übersicht über $^1D_{CH}$ Werte aus der Literatur für kleine Saccharide in Bicellen.

Auffallend ist, dass die $^1D_{CH}$ Werte allgemein relativ klein sind und nur für mehr gestreckte (zylinderförmige) Moleküle etwas grössere Werte um die +/- 20 Hz erreicht werden.

Ganz im Gegensatz dazu zeigen die, in dieser Arbeit untersuchten, polyhydroxylierten Thiazolidinlactame auch in verdünnter Bicellenlösung (c ~ 5%, q = 3) sehr grosse Werte für die $^1D_{CH}$ Kopplungen. Ihr Bereich reicht bis zu 400 Hz im Extremfall. Auch die H-H RDCs sind mit teilweise bis zu 200 Hz ausgesprochen gross, wohingegen Disaccharide wie Saccharose oder Raffinose nur Werte um –3 bis +3 Hz zeigen.^{8c}

Dies bedeutet, dass es sich im Falle der Thiazolidinlactame nicht nur um eine blosse, schwache Orientierung in der flüssig-kristallinen Phase (den Bicellen) handeln kann, sondern dass zusätzliche Kräfte oder Wechselwirkungen, z. B. mit den Bicellen, auftreten müssen, um eine derart starke Ausrichtung zu erhalten, wobei ein hydrophober Effekt aufgrund der zahlreichen Hydroxygruppen von vornherein ausgeschlossen werden konnte.

1.5 Affinität an Lipidmembranen – Art der Wechselwirkungen und Beispiele

Es gibt eine Vielzahl an Beispielen, in denen die Affinität kleinerer amphiphiler, oder auch lipophiler Moleküle an Lipidmembranen untersucht wurde.⁹ Die Ermittlung ihrer Affinität erfolgte mit Hilfe unterschiedlichster Methoden:

- Middleton et al.^{9a} ermittelten über ²H NMR Spektroskopie sowohl die Stärke der Wechselwirkung – ähnlich dem Verteilungskoeffizienten K_p in Octanol/Wasser Systemen – als auch die Art der Wechselwirkung für ein amphiphiles, schwach basisches Molekül (1,2-dimethyl-3-cyanomethyl-8-[*o*-²H]phenylmethoxyimidazo[1,2-*a*]pyridinium). Sie konnten zeigen, dass in grossen, multilamellaren Phospholipidvesikeln Signale für die gebundene und die freie Form des „Liganden“ gleichzeitig vorhanden sind. Zudem zeigte die Substanz keinerlei Wechselwirkungen mit DMPC Membranen in der Gel-Phase, also bei niedrigen Temperaturen, unterhalb des Phasenübergangs in die L_α , die flüssig-kristalline Phase.
- Wang et al.^{9b} untersuchten die Einlagerungsrate und die Lage von Amantadin innerhalb der Membran mit DOSY und STD NMR Messungen in sehr kleinen „Bicellen“ ($q = 0.3$). Da Amantadin sich im schnellen Austausch zwischen Wasser- und Lipidphase befindet, kann über Diffusionsmessungen nur ein gewichteter Mittelwert – zu dem freie und Bicellen-assoziierte Amantadinmoleküle beitragen – für die Diffusionskonstante erhalten werden. Aufgrund nur sehr schwacher NOE Signale im NOESY Spektrum wurde postuliert, dass Amantadin in der Membran frei beweglich ist und ungehindert lateral diffundiert.
- Eine weitere Veröffentlichung von Middleton et al.^{9c} untersucht das Profil dipolarer Kopplungen mittels MAS NMR für Moleküle, welche auf unterschiedliche Art mit der Membran wechselwirken. Über das dipolare Profil der Lipidmoleküle kann eine Aussage über die Beweglichkeit der verschiedenen Regionen innerhalb des Lipidmoleküls und somit über den Zustand der Membran getroffen werden. Untersucht wurden in diesem Zusammenhang Moleküle, die entweder lipophil sind (z. B. Trifluoperazin), bekanntermassen mit anionischen Lipiden wechselwirken (Dekalysin) oder die Membran durchdringen (Transmembranproteine (z. B. Phospholamban)).
- Die Auswirkung von Trehalose auf DMPC Membranen wurde durch Lambruschini et al.^{9d} untersucht. Sie schlossen aus den ermittelten physikalischen Eigenschaften von Trehalose auf einen Einfluss auf die Ausbildung der flüssig-kondensierten Phase um die Membran. Allerdings handelt es sich hierbei um Untersuchungen auf der Ebene der Bulkeigenschaften, ohne dass Aussagen über die auftretenden molekularen Effekte gemacht werden.

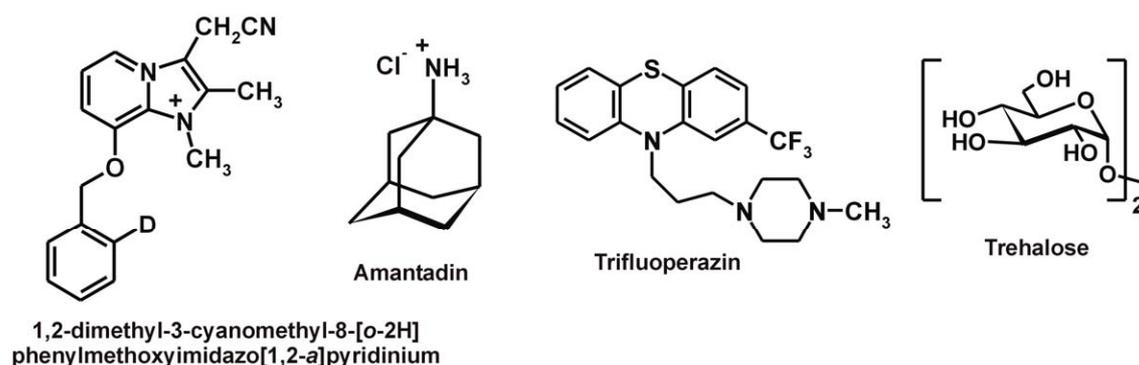


Abb. 6. Strukturen von einigen Substanzen aus der Literatur, die auf ihre Membranaffinität hin untersucht wurden.

Die gängige Methode der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten führt oft zu wenig zuverlässigen Ergebnissen, da bestimmte strukturelle Gruppen, wie z. B. basische, aromatische Amine, eine stärkere Affinität zu Phospholipidmembranen besitzen, als über den Verteilungskoeffizienten vorhergesagt.

Zudem sind die untersuchten Substanzen zumindest amphiphil bzw. teilweise auch lipophil, für die eine Membranaffinität beobachtet werden kann, wohingegen es sich bei den hier vorliegenden Thiazolidinlactamen um hydrophile, polyhydroxylierte Substanzen handelt – eine Substanzklasse, die eigentlich keinerlei Affinität zu Phospholipidmembranen aufweisen sollte.

Wie in den Beispielen bereits gezeigt, gibt es verschiedene Möglichkeiten in der NMR Spektroskopie, Affinitäten oder allgemein Wechselwirkungen zwischen Molekülen zu untersuchen. Daher seien nachfolgend die gängigsten Methoden kurz erläutert.

1.6 NMR Methoden zur Messung von „Ligand-Rezeptor“-Wechselwirkungen

Die einfachste Methode ist sicherlich die Titration eines Rezeptors mit seinem Liganden und die Untersuchung der dabei auftretenden Änderungen in den chemischen Verschiebungen δ . Hierbei ist zu berücksichtigen, dass nur innerhalb eines bestimmten Messfensters, welches durch die Dissoziationskonstante K_D eines Komplexes bestimmt ist, gearbeitet werden kann.

Handelt es sich um eine starke oder mittelstarke Bindung (sub-mikromolarer bis mikromolarer Bereich für K_D), so sind Änderungen in den chemischen Verschiebungen detektierbar, da ein hoher bzw. ausreichender Prozentsatz an Ligand in der gebundenen Form vorliegt.

Bei nur schwacher Bindung ($K_D > 1$ M) sind im Rahmen einer NMR Titration keinerlei Effekte mehr nachweisbar.^{10a}

Weitere Möglichkeiten, die zudem auch die Ermittlung des bindenden Epitops gestatten, basieren z. B. auf Messungen des Sättigungstransfers zwischen Rezeptor und Ligand (STD NMR).^{10b} Hierbei werden Frequenzen des Rezeptors gesättigt und durch Bindung eines Liganden an den Rezeptor teilweise diese Sättigung auf den Liganden übertragen. Wichtig dabei ist, dass der Ligand keine zu starke Bindung an

den Rezeptor aufweist, da das Messprinzip des STDs darauf beruht, dass der abdissoziierte Ligand in freier Form, also in Lösung, detektiert wird. Da die Zeitkonstante der T1/T2-Relaxation für kleine Moleküle ca. 1s beträgt, nimmt der Anteil an gesättigten Liganden in Lösung während der Sättigungszeit (wenige Sekunden) zu. Dies bedeutet aber auch, dass STD Messungen nur für bestimmte Bereiche von K_D möglich sind:

- Ist K_D kleiner als 1 nM, so ist die Bindung sehr stark, die Dissoziationsgeschwindigkeit des Liganden sehr klein und somit der Sättigungstransfer auf den Liganden in Lösung nicht effizient.
- Ist andererseits die Bindung sehr schwach, also K_D im Bereich von grösser 10 mM, so ist die Verweildauer des Liganden in der Bindungstasche zu kurz, um einen effektiven Sättigungstransfer zu gewährleisten.

Somit eignet sich der STD für die Untersuchung von Bindungsvorgängen, deren Dissoziationskonstante K_D im Bereich von ca. 100 nM bis max. 10 mM liegt.^{10b}

Um die Stärke einer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zu bestimmen, kann auch die Änderung der Diffusionskonstanten eines (kleinen) Liganden bei Bindung an einen (grossen) Rezeptor bestimmt werden.^{10b, c} Problematisch ist allerdings, dass nur eine gemittelte Diffusionskonstante für den Liganden ermittelt werden kann, die zudem vom molaren Verhältnis Ligand zu Rezeptor abhängig ist. Es werden also niedrige Ligand-Rezeptor-Verhältnisse benötigt, um entsprechende Diffusionskonstanten zu ermitteln. Zudem ist die Grösse des Rezeptors begrenzt, da bei sehr grossem Rezeptormolekül die Mittelung der Linienbreiten für den Liganden zu einer starken Verbreiterung führt.^{10b}

Weitere Verfahren zur Identifizierung der Bindung von Liganden an Rezeptormoleküle sind z. B. das sog. inverse NOE Pumping, Water-LOGSY (Messung des an Ligand und Rezeptor gebundenen Wassers) oder die Messung von Relaxationszeiten.^{10b} Erstere Methode ist eher für stärkere Bindungen geeignet und bedarf zudem einer genauen Optimierung der Mischzeit. Die Messung von Water-LOGSY ist nur für Bindung an grosse Proteine (> 30 kDa) geeignet, und die Relaxationsmessungen bedürfen separierter Signale, um den Effekt der Linienverbreiterung durch Bindung eines Liganden an ein Protein quantifizieren zu können.

Eine relativ neue Methode nutzt die zuvor beschriebenen RDCs aus, um Aussagen über die Orientierung eines Liganden zum Rezeptor treffen zu können.^{10d, e} Diese transferred RDCs (trDCs) treten zwischen einem im magnetischen Feld (partiell) orientierten Rezeptor (z. B. in Form eines membranverankerten Proteins) und einem kleinen Liganden auf, welcher durch Bindung an den orientierten Rezeptor ebenfalls eine Orientierung im Raum erfährt, die grösser ist, als jene ohne Rezeptor. Man erhält auch in diesem Fall das zeitgewichtete Mittel der trDCs von freiem und gebundenem Liganden. Eine Abschätzung der Bindungsaffinität des Liganden ist hiermit allerdings nicht möglich.

An diesem Punkt setzen die hier vorgestellten Untersuchungen an. Ist es möglich, die Affinität eines kleinen (polaren) Moleküls, in Abhängigkeit seiner strukturellen Eigenschaften, an hoch solvatisierte Modellmembranen mittels RDCs zu bestimmen? Dass RDCs als neuartige Methode in der Beurteilung von Bindungsaffinitäten an Lipidbilayer durchaus einsetzbar sind, soll im Folgenden gezeigt werden.

2. RDCs polarer, polyhydroxylierter Thiazolidinlactame

2.1 Thiazolidinlactame – Strukturelle Merkmale

Bei den untersuchten Thiazolidinlactamen handelt es sich um bityklische Systeme, bestehend aus einem 7- und einem 5-Ring, welche in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert und strukturell untersucht wurden.^{11a-d}

Durch Kondensation eines Uronsäurelactons (in diesem Fall γ -Glucuronolacton) mit Cystein oder Cysteamin wird ein bityklisches System erhalten, welches durch die vorhandenen, funktionellen Gruppen vielfältig modifiziert werden kann.

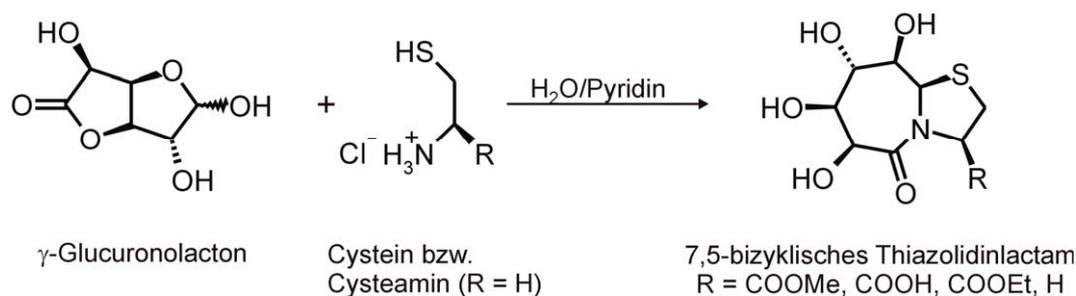


Abb. 7. Synthese des bityklischen Thiazolidinlactams.^{11a}

Die Aufklärung der 3-dimensionalen Struktur erfolgte sowohl über Analyse der Röntgenstrukturdaten als auch über NMR Spektroskopie.¹¹

Die hier untersuchten Systeme lassen sich – abhängig von der Konformation ihres 7-Ringes – in drei Gruppen einteilen:

- 7-Ring in Sesselkonformation
- 7-Ring mit invertierter Sesselkonformation
- 7-Ring in Boot-/Wannenkonformation

Dies hat auch entscheidenden Einfluss auf die Orientierung der Hydroxygruppen, welche sowohl abhängig von der 7-Ring Konformation als auch von der Art des eingesetzten Zuckers sind. So erhält man eine unterschiedliche Anzahl an axial orientierten OH-Gruppen, die bei geeigneter Ausrichtung H-Brücken zueinander ausbilden können.

Für eine Vielzahl an modifizierten Bityklen konnten Röntgenstrukturen erhalten werden, die die entsprechenden Konformationsanalysen anhand von NMR Daten bestä-

tigten. Das Grundgerüst – also der 7,5-Bizyklus – ist an sich starr und liegt im Kristall wie in Lösung in derselben Konformation vor.

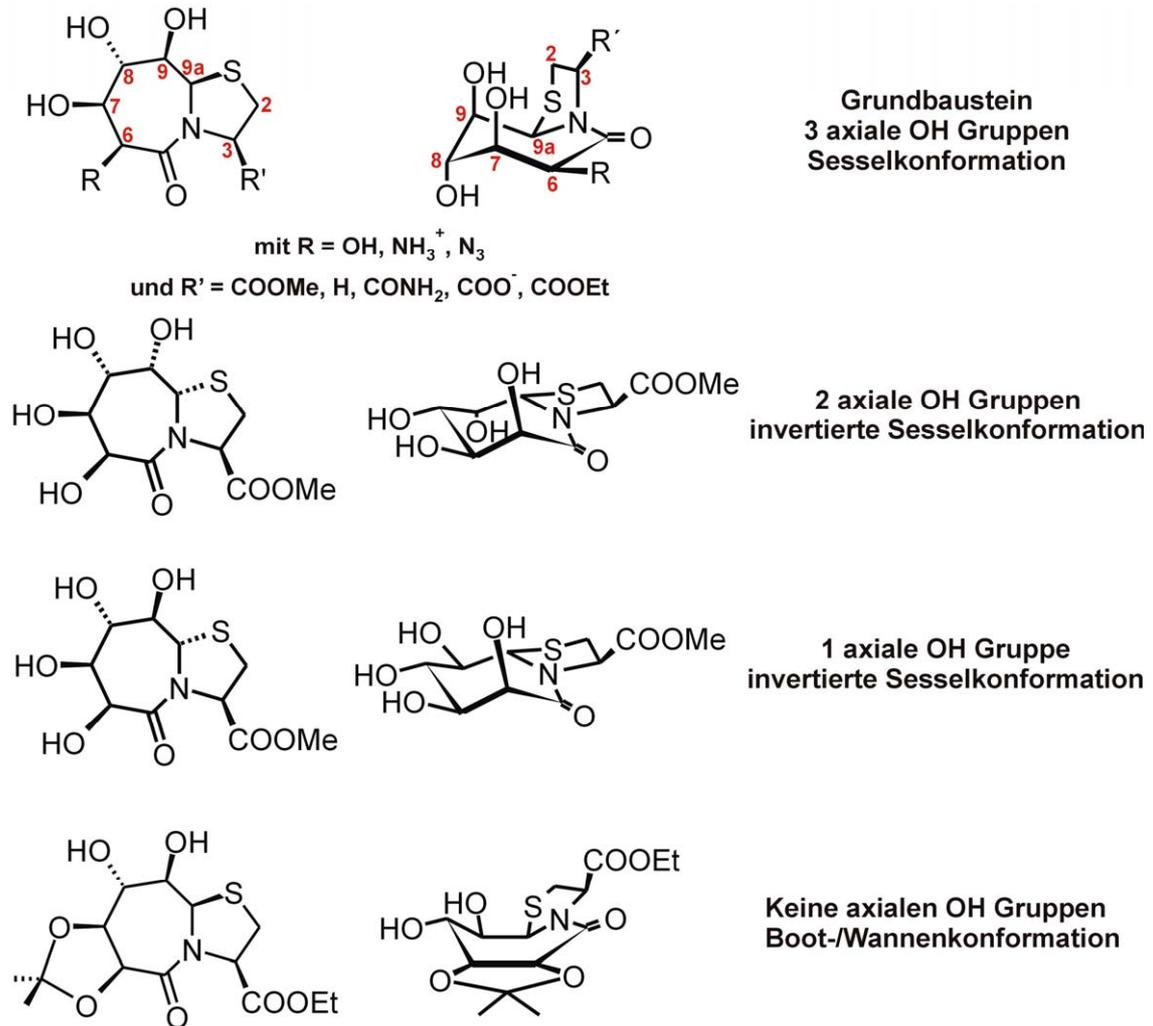


Abb. 8. Konformationen des 7-Ringes in Abhängigkeit von Substituenten, Konfiguration am Brückenkopf oder eingesetztem Lacton; dadurch bedingt auch die unterschiedliche Anzahl an axial orientierten OH-Gruppen. In der ersten Struktur ist auch die, im weiteren verwendete, Numerierung des Systems wiedergegeben.

Nachfolgend eine Übersicht über die verschiedenen, untersuchten Bizyklen mit Kennzeichnung ihrer Modifikationen.

Sesselkonformation

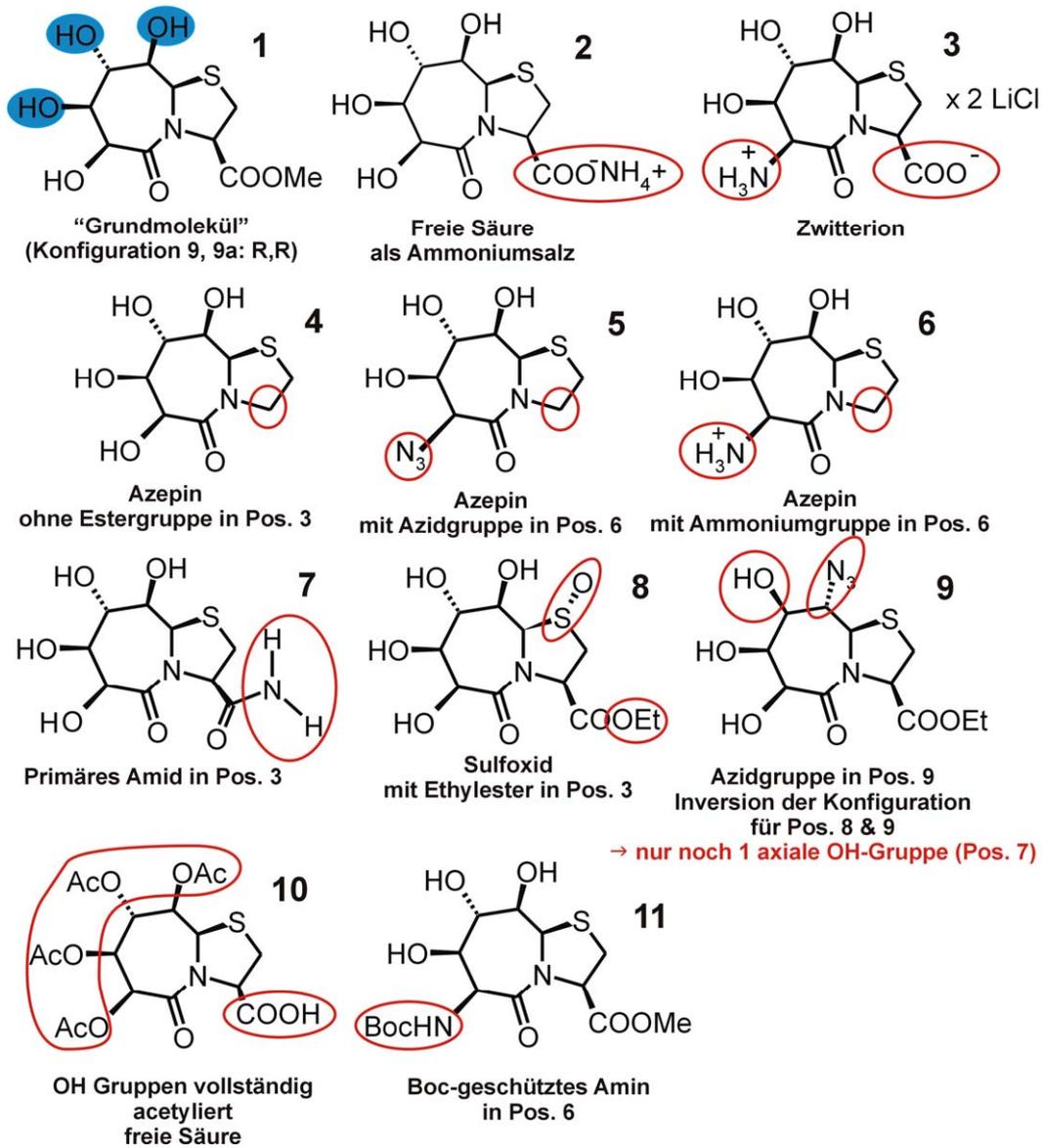


Abb. 9. Bicyklen mit 7-Ring in Sesselkonformation und „einfacheren“ Modifikationen.

Durch Carbonsäurefunktion in Position 3 und Amin in Position 6 (siehe 11) ist es möglich, Amidbindungen zu Standardamino-säuren zu knüpfen. Einige dieser, weitreichender modifizierten, Bicyklen sind nachfolgend gezeigt. Ihre Sesselkonformation bleibt dabei erhalten.

7-Ring in Sesselkonformation - mit zusätzlicher Aminosäure

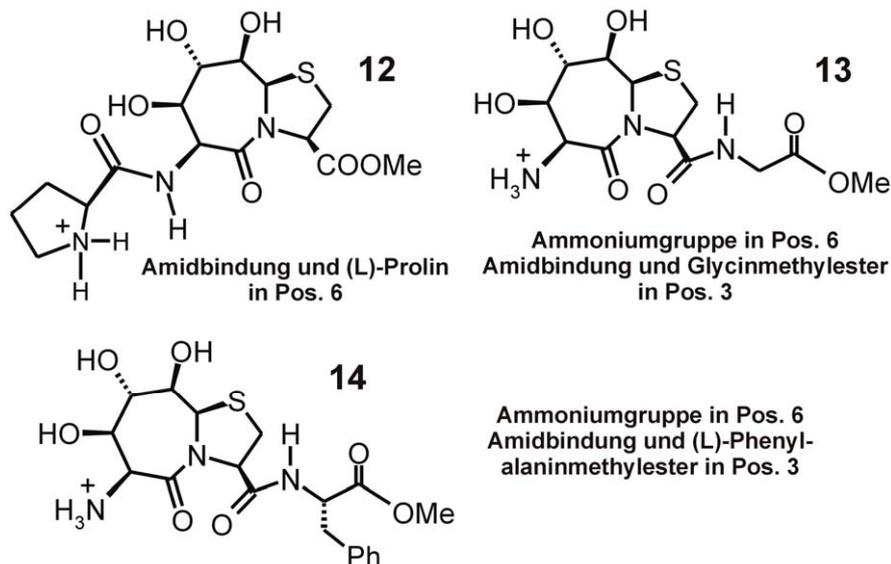
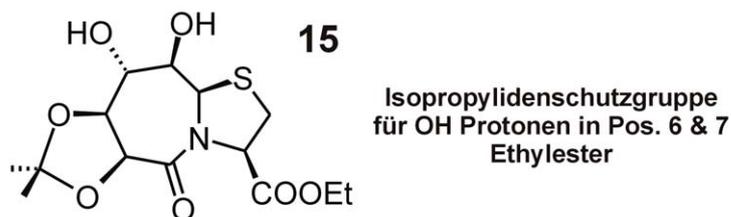


Abb. 10. Bizyklen mit zusätzlicher Aminosäure in Position 3 bzw. 6. Die freien Ammoniumgruppen in den Molekülen **13** und **14** können als Anknüpfungspunkte für weitere Aminosäuren dienen.^{11d}

Auch für andere 7-Ringkonformationen, abweichend von der oben gezeigten Sesselkonformation, gibt es einige Beispiele:

7-Ring in Boot-/Wannenkonformation



Invertierte Sesselkonformation

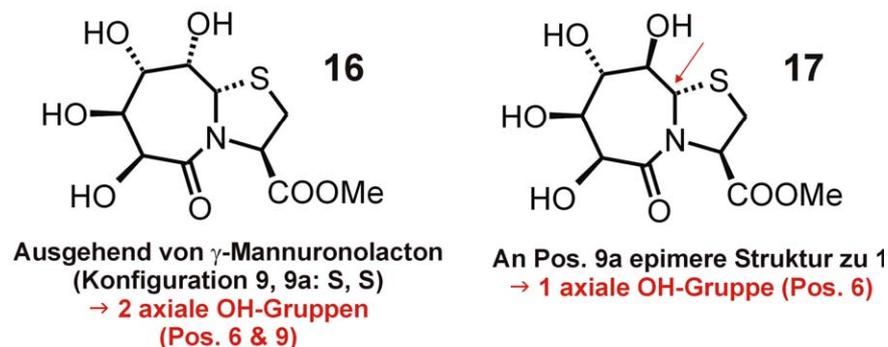
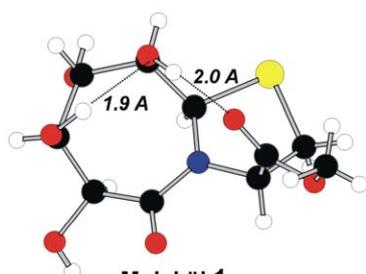


Abb. 11. Bizyklen mit im Vergleich zu **1** geänderter 7-Ringkonformation.

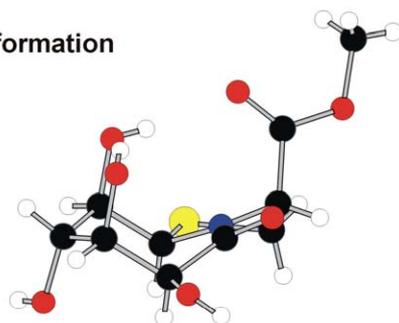
Vergleicht man die Orientierung der OH-Gruppen im Kristall mit jener, die in Lösung über die Analyse der NMR Daten, und hier insbesondere der $^3J_{\text{OH}, \text{H}}$ Kopplungen, erhalten wird, so zeigen sich deutliche Unterschiede. Dies ist insofern von entscheidender Bedeutung, da in Lösung somit teilweise ein anderes Wasserstoffbrückenmuster möglich ist.

H-Brücken im Kristall

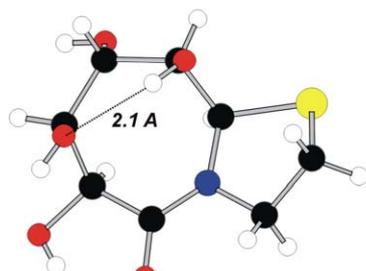
Thiazolidinlactame mit Sesselkonformation



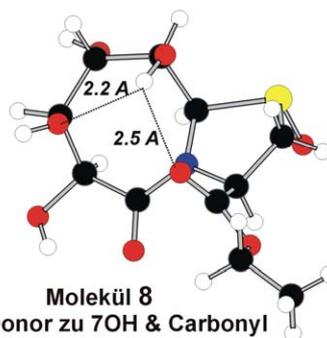
Molekül 1
7OH Donor zu 9OH
9OH Donor zu Carbonyl
(analoge Struktur für 2)



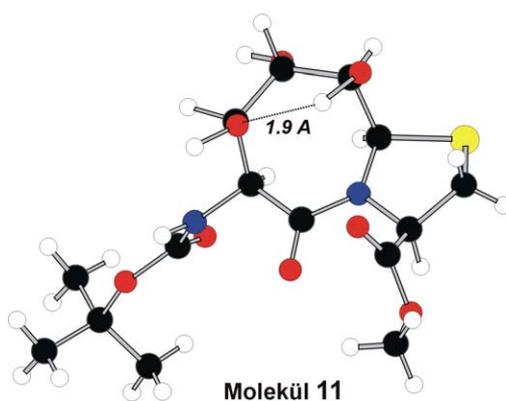
Sesselkonformation am Beispiel von 1



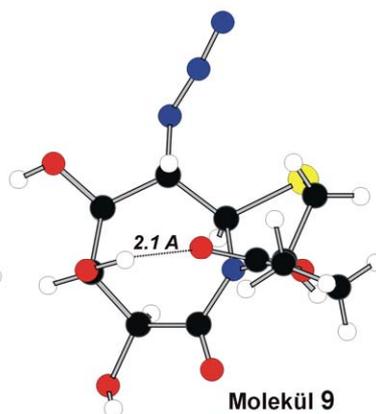
Molekül 4
9OH Donor zu 7OH



Molekül 8
9OH Donor zu 7OH & Carbonyl



Molekül 11
9OH Donor zu 7OH

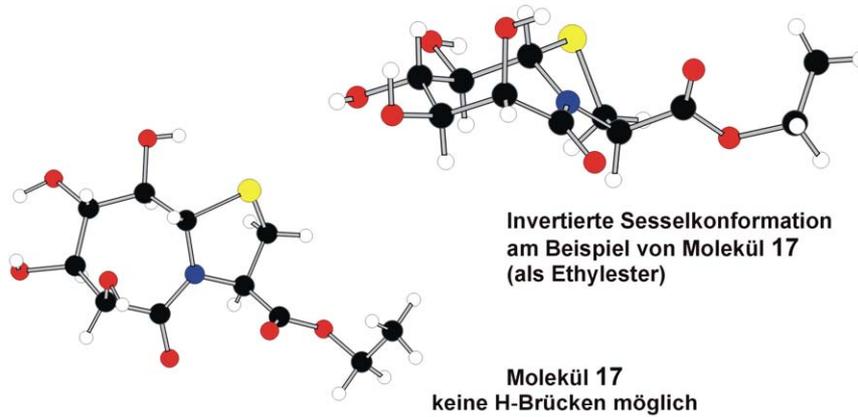


Molekül 9
7OH Donor zu Carbonyl

Abb. 12. Kristallstrukturen einfach modifizierter Bicyklen mit Sesselkonformation und die daraus resultierenden, möglichen H-Brücken.

H-Brücken im Kristall II

Thiazolidinlactam mit invertierter Sesselkonformation



Thiazolidinlactam mit Boot-/Wannenkonformation

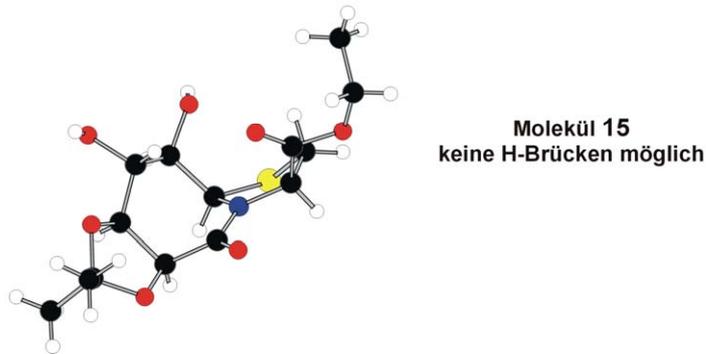


Abb. 13. Kristallstrukturen des invertierten Sessels und der Boot-/Wannenkonformation.

Mittels NMR Messungen konnte für die meisten Systeme das H-Brückenmuster in Lösung (in DMSO-d_6) bestimmt werden. Entscheidend sind bei der „normalen“ Sesselkonformation die OH-Gruppen an Position 7 und 9, da sie auf dieselbe Seite des Sessels orientiert sind, und somit H-Brücken zwischen ihnen aufgrund des geringen Abstands möglich sind. Die Orientierung der OH-Gruppen hängt auch davon ab, welche funktionellen Gruppen wie als Partner an den H-Brücken beteiligt sind – so macht es selbstverständlich einen Unterschied, ob sich eine Akzeptor- oder Donorgruppe als Partner anbietet.

Molekül → ³ J _{H, OH} [Hz]	1	2	3	4
6OH	6.6	Aufgrund der	-	5.6
7OH	5.4	Säurefunktion	Breit	5.9
8OH	3.9	sind die OH-	Breit	4.1
9OH	11.0	Protonensignale in DMSO _{d6} breit (Austausch!)	Sehr breit	8.5
H-Brücken	Gegabelte H- Brücken 9OH Donor für 7OH & Carbonyl	Sollte mit 1 vergleichbar sein Evtl. stärkere Orientierung von 9OH zum Carboxylat	Sollte mit 1 vergleichbar sein Evtl. stärkere Orientierung von 9OH zum Carboxylat	9OH nur Donor für 7OH keine Akzeptor- funktion

Molekül → ³ J _{H, OH} [Hz]	5	6	7	8
6OH	-	Keine Daten	6.3	~ 6.3
7OH	6.4	vorhanden	4.9	5.8
8OH	3.8	→ sollte mit 5	3.9	4.0
9OH	8.1	vergleichbar sein	7.3	10.6
H-Brücken	9OH nur Donor für 7OH keine Akzeptor- funktion	9OH nur Donor für 7OH keine Akzeptor- funktion	9OH Donor zu 7OH/Carbonyl & Akzeptor für AmidNH → Amidflip mit Umschalten des H- Brücken- musters	Wie bei 1 Gegabelte H- Brücken 9OH Donor für 7OH & Carbonyl

Molekül →	9	11	12	13
³ J _{H, OH} [Hz]				(Boc-geschützt)
6OH	6.1	-	-	-
7OH	4.3	4.5	Breit	4.4 (Δδ/ΔT = -1.9)
8OH	6.7	4.1	Breit	4.4
9OH	-	11.7	11.4 (aus COSY)	8.2
H-Brücken	Keine H-Brücken in Lösung	Wie bei 1 Gegabelte H- Brücken 9OH Donor für 7OH & Carbonyl	Wie bei 1 Gegabelte H- Brücken 9OH Donor für 7OH & Carbonyl	Amidflip 9OH mit Donor- (zu 7OH & Carbonyl) & Akzeptorfunktion (zu AmidNH)

Molekül →	14	15	16	17
³ J _{H, OH} [Hz]	(Boc-geschützt)			(als Ethyl- ester)
6OH	-	-	5.1	5.0
7OH	4.6	-	4.5	4.1
8OH	4.0	5.4	5.2	4.4
9OH	9.2	5.3	4.9	Überlagert
H-Brücken	Amidflip 9OH mit Donor- (zu 7OH & Carbonyl) & Akzeptorfunktion (zu AmidNH)	Keine H-Brücken aufgrund der Boot- /Wannenkonfor- mation	Aufgrund der invertierten Sesselkonfor- mation sind H- Brücken auszuschlies- sen	Aufgrund der invertierten Sesselkonfor- mation sind H- Brücken auszuschliessen

Tab. 2. Übersicht über die H-Brückenmuster der verschiedenen Bizyklen in DMSO_{d6}-Lösung. Für **10** sind keine Daten angegeben, da keine OH-Gruppen im Molekül mehr vorhanden sind (alle acetyliert).

Um die Unterschiede in den H-Brückenmustern nochmals zu verdeutlichen, sind die Daten aus Festkörper (Röntgenstruktur) und Lösung (NMR) nachfolgend gegenübergestellt.

Molekül	Im Kristall	In Lösung
1	7OH Donor für 9OH 9OH Donor für Carbonyl → sequentielle H-Brücken	7OH nur Akzeptorfunktion 9OH Donor zu 7OH und Carbonyl → gegabelte H-Brücken
2	7OH Donor für 9OH 9OH Donor für Carbonyl → sequentielle H-Brücken	Keine Aussagen aufgrund starker Signalverbreiterung Sollte aber mit 1 vergleichbar sein Evtl. stärkere Orientierung zum Carboxylat
3	Keine Daten vorhanden	Keine Aussagen aufgrund starker Signalverbreiterung Sollte aber mit 1 vergleichbar sein Evtl. stärkere Orientierung zum Carboxylat
4	9OH Donor zu 7OH	9OH Donor zu 7OH
5	Keine Daten vorhanden	9OH Donor zu 7OH
6	Keine Daten vorhanden	Keine Daten vorhanden Sollte mit 5 vergleichbar sein 9OH Donor zu 7OH
7	Keine Daten vorhanden	9OH Donor zu 7OH/Carbonyl & Akzeptor für AmidNH → Amidflip mit Umschalten des H- Brückenmusters
8	7OH nur Akzeptorfunktion 9OH Donor zu 7OH und Carbonyl → gegabelte H-Brücken	7OH nur Akzeptorfunktion 9OH Donor zu 7OH und Carbonyl → gegabelte H-Brücken
9	7OH Donor zu Carbonyl	Keine H-Brücken vorhanden
11	9OH Donor zu 7OH → keine Beteiligung des Carbonyls!	7OH nur Akzeptorfunktion 9OH Donor zu 7OH und Carbonyl → gegabelte H-Brücken
12	Keine Daten vorhanden	7OH nur Akzeptorfunktion 9OH Donor zu 7OH und Carbonyl → gegabelte H-Brücken
13	Keine Daten vorhanden	Amidflip 9OH mit Donor- (zu 7OH & Carbonyl) & Akzeptorfunktion (zu AmidNH)
14	Keine Daten vorhanden	Amidflip 9OH mit Donor- (zu 7OH & Carbonyl) & Akzeptorfunktion (zu AmidNH)
15	Keine H-Brücken möglich	Keine H-Brücken aufgrund der Boot- /Wannenkonformation

16	Keine Daten vorhanden	Aufgrund der invertierten Sesselkonformation sind H-Brücken auszuschliessen
17	Keine H-Brücken möglich	Aufgrund der invertierten Sesselkonformation sind H-Brücken auszuschliessen

Tab. 3. Vergleich der H-Brücken im Kristall und in Lösung.

Damit steht eine Vielzahl an strukturell sehr gut definierten Molekülen zur Verfügung, die sich nur durch geringe Modifikationen voneinander unterscheiden. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, Auswirkungen einzelner Strukturparameter auf die Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase zu untersuchen.

2.2 RDCs für Molekül 1 – Abhängigkeit von experimentellen Parametern

Die unter 1.3 näher beschriebenen Bicellen dienen als Modellmembranen für die Untersuchung der strukturabhängigen Orientierung der Bizeklen in flüssig-kristalliner Phase.

Verschiedene Parameter, nicht nur die strukturellen Veränderungen am bizeyklischen System, sondern auch die Bicellenlösung betreffende experimentelle Parameter sind von Bedeutung für den Grad der Ausrichtung.

Daher wurden folgende Parameter in zahlreichen Messungen variiert, um eine möglichst genaue Aussage über die Zusammenhänge zwischen flüssig-kristalliner Phase, Molekülstruktur und Grad der Orientierung in Lösung treffen zu können:

- das molare Verhältnis q von DMPC zu DHPC
- die Gesamtlipidkonzentration c ($m(\text{DMPC})+m(\text{DHPC})$) (w/w)
- das molare Verhältnis f von Substanz zu DMPC
- Zusatz von CTAB zur Stabilisierung der Bicellen
- Zugabe von NaCl

2.2.1 Grosse dipolare Kopplungen für das Grundmolekül 1

1 zeigt auffallend grosse dipolare Kopplungen sowohl im ^1H als auch im ^{13}C Spektrum, wobei deren Wert durch die oben genannten Faktoren beeinflusst werden kann.

Um zu verdeutlichen, dass die RDCs für **1** deutlich grösser sind als für die unter 1.4 beschriebenen Moleküle, sei beispielhaft das ^1H Spektrum einer Lösung von **1** in Bicellen gezeigt.

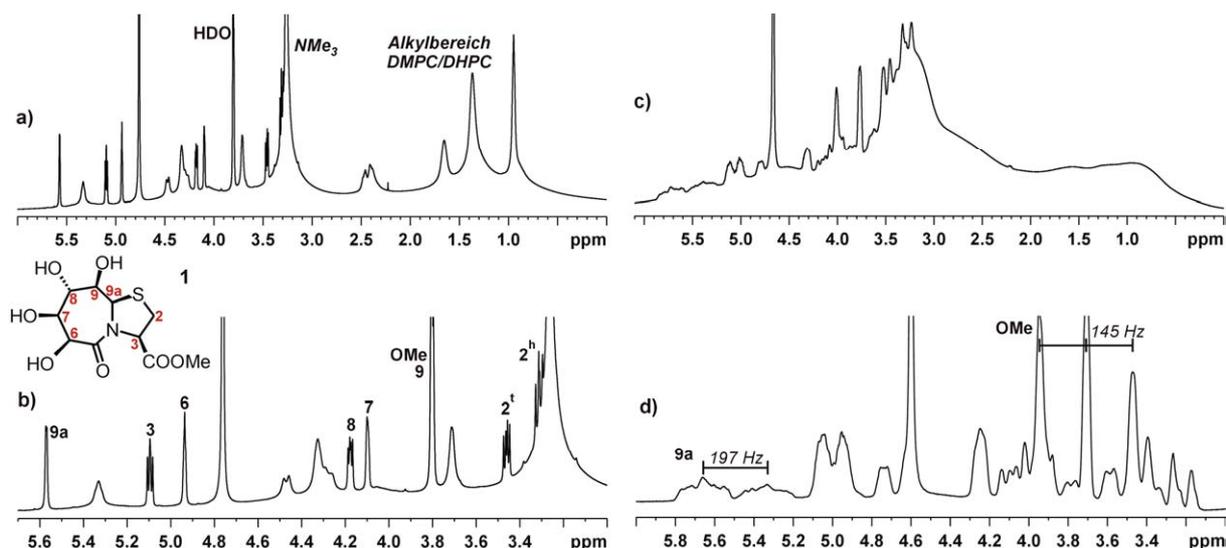


Abb. 14. 1 in Bicellen ($q = 2.7$, $c = 12.7\%$, $f = 0.36$, $700 \mu\text{L}$ Phosphatpuffer (30 mM, pH 7, D_2O)). ^1H Gesamtspektrum (a) und Ausschnitt (b) bei 300 K, also in isotroper Lösung. Chemische Verschiebung und Multiplettstruktur der Signale von **1** entsprechen jenen in reinem D_2O . c) und d) zeigen dieselbe Probe bei 308 K, in anisotroper Lösung. Die eingetragenen Werte der Kopplungen entsprechen dem Betrag der Summe von J_{HH} und D_{HH} . Um die stark aufgespaltenen und verbreiterten Signale von **1** besser darstellen zu können, wird – wie in d) der Fall – eine ^1H T1 Inversion Recovery Sequenz zur Unterdrückung des breiten Bicellenuntergrundes aufgenommen.

Da die Signale für H9a und H6 aufgrund der Ausrichtung zu ihren Nachbarprotonen H9 bzw. H7 als Singulets vorliegen ($^3J_{\text{H6}, \text{H7}}$ und $^3J_{\text{H9}, \text{H9a}} < 1 \text{ Hz}$) entsprechen die aus dem Spektrum in flüssig-kristalliner Phase ermittelten Kopplungen für H9a und H6 direkt dem Betrag ihrer dipolaren Kopplung. Wie hier gezeigt also z. B. 197 Hz für H9a, ein Wert der ca. um den **Faktor 100** grösser ist, als üblicherweise für homonukleare RDCs kleiner, polarer Moleküle in Bicellen ermittelt.^{8c}

Um einen Eindruck zu erhalten, in welchem Masse die experimentellen Parameter einen Einfluss auf die Grösse der RDCs und somit auf den Grad der Ausrichtung haben, seien hier die ^1H und ^{13}C Spektren dreier verschiedener Proben von **1** in Bicellen gezeigt.

Probe a): $q = 2.7$, $c = 12.6\%$, 3% CTAB, $700 \mu\text{L}$ D_2O , $f = 0.39$, 55 mM NaCl

Probe b): $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, $700 \mu\text{L}$ Puffer (50 mM, pH 7, D_2O), $f = 0.28$

Probe c): $q = 2.85$, $c = 5.1\%$, 3% CTAB, $700 \mu\text{L}$ Puffer (50 mM, pH 7, D_2O), $f = 0.79$

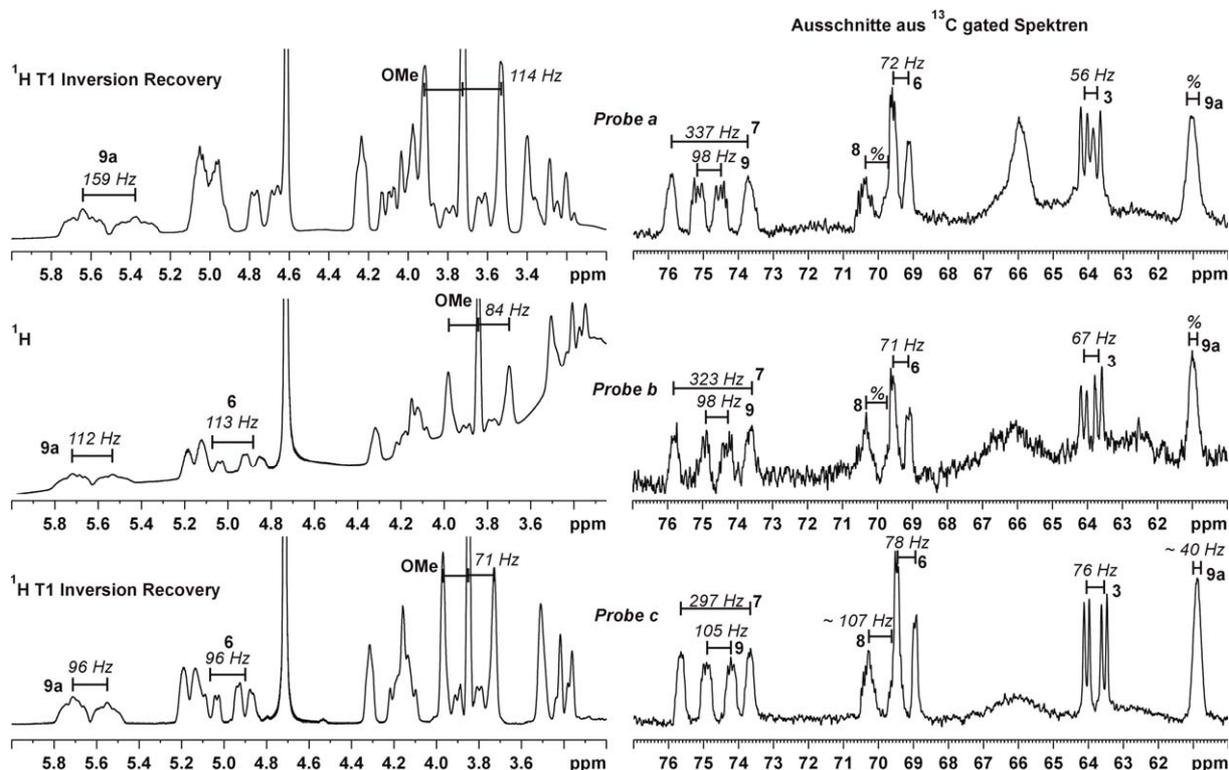


Abb. 15. ^1H bzw. ^1H T1 Inversion Recovery Spektren und ^{13}C gated Spektren für verschiedene Bicellenproben von **1**. Die angegebenen Zahlenwerte entsprechen dem Betrag von $J_{\text{HH}} + D_{\text{HH}}$ bzw. $J_{\text{CH}} + D_{\text{CH}}$.

Aufgrund der grossen Kopplungen im Protonenbereich können die $^1D_{\text{CH}}$ Kopplungen nur aus ^{13}C gated bzw. ^{13}C INEPT Spektren ermittelt werden. In nicht-entkoppelten 2D HMQC Spektren ist der Phasenfehler in der ^1H Dimension zu gross, um definierte Signale zu erhalten.

2.2.2 Einfluss von q und c auf den Grad der Ausrichtung

Wie in der Literatur beschrieben, ist der Grad der Ausrichtung linear abhängig von der zur Verfügung stehenden Oberfläche an flüssig-kristalliner Phase.¹² Somit ist die Stärke der Ausrichtung durch die experimentellen Parameter q und c beeinflussbar. Eine Erhöhung von q – also eine grössere Menge an DMPC im Vergleich zu DHPC – führt zu grösseren Bicellen, da mit DMPC mehr Substanz für die Bildung der planaren Bilayerbereiche vorhanden ist, jedoch im Verhältnis dazu nur wenig Substanz (DHPC), um die Ränder abzusättigen. Eine Erhöhung von c – also des Gesamtlipidgehaltes – führt insgesamt zu einer Vergrösserung der zur Verfügung stehenden flüssig-kristallinen Phase.

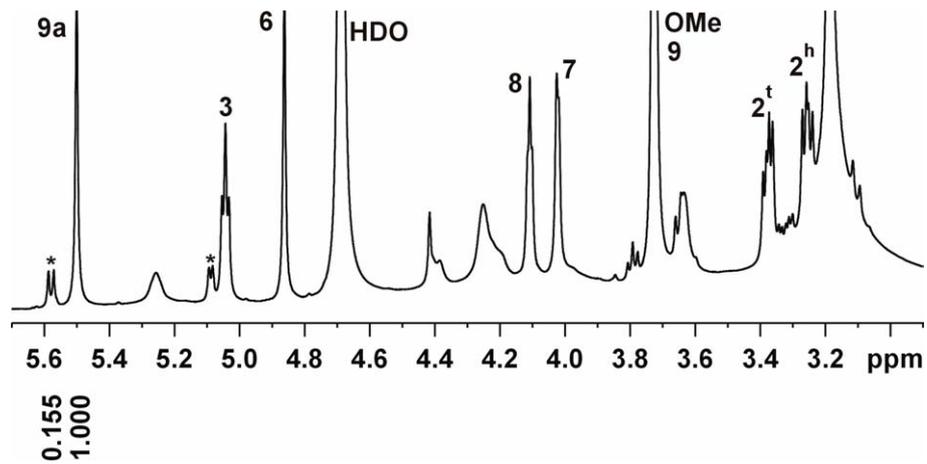


Abb. 16. ^1H Spektrum von **1** in isotroper Lösung bei 300 K. Die mit * gekennzeichneten Signale gehören zu Verbindung **17**. Die Intergration der H9a Signale der beiden Verbindungen ergibt einen Epimeranteil von ca. 15%.

Durch Titration einer Probe mit DHPC wird q variiert, wohingegen f konstant und c annähernd konstant bleibt.

- $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 4% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.88$
- $q = 2.7$, $c = 5.0\%$ (4.98%), 4% CTAB, 718 μL Puffer, $f = 0.88$

Mit „Puffer“ wird im weiteren Verlauf 50 mM Phosphatpuffer, pH 7, in D_2O bezeichnet.

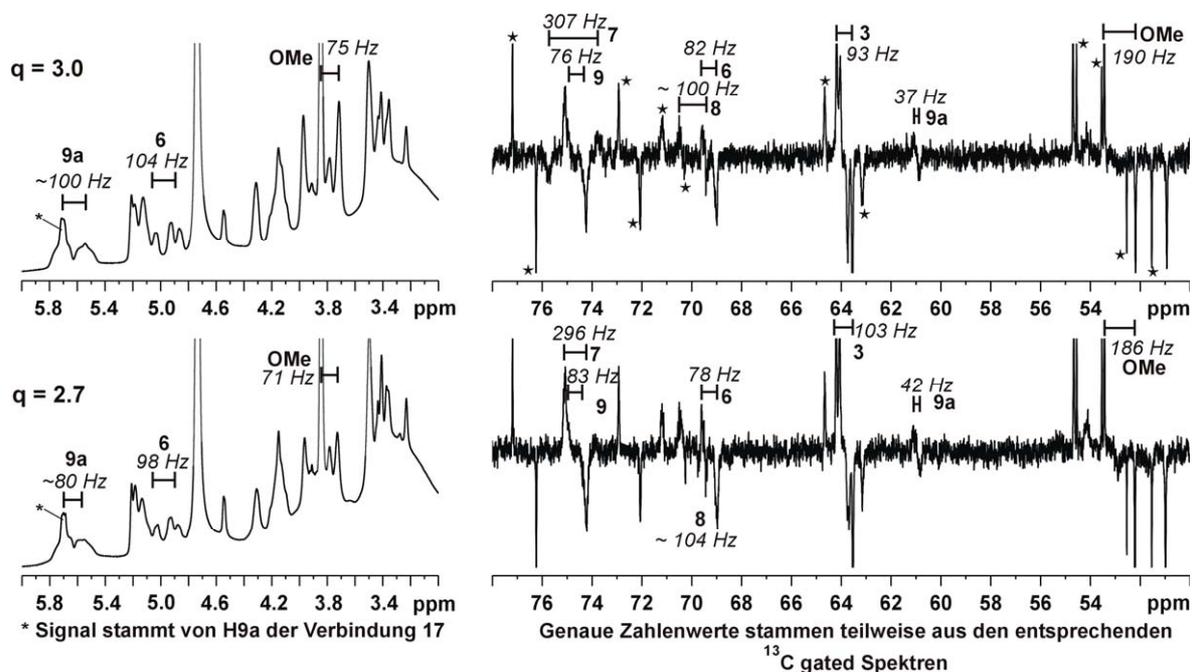


Abb. 17. ^1H und ^{13}C Spektren derselben Probe, wobei sich diese nur in ihrem Wert für q unterscheiden. Alle angegebenen Werte für die Kopplungen entsprechen den Beträgen aus $D+J$ (308 K, 600 MHz). Der Bereich des ^{13}C Spektrums bei ca. 30 ppm, in dem C2 von **1** liegt, ist nicht dargestellt. Die im ^{13}C Spektrum mit * gekennzeichneten Signale gehören zu Verbindung **17**.

Bei manchen Chargen an **1** ist auch Verbindung **17** zu einem geringen Anteil enthalten. Es handelt sich hierbei um das in Position 9a epimere Molekül zu **1**. In den hier gezeigten Spektren beträgt sein Anteil ca. 15%.

Da sich das Epimer **17**, wie im weiteren Verlauf gezeigt, nicht so stark ausrichtet wie Molekül **1**, ist sein H9a Signal in anisotroper Phase relativ scharf, wohingegen die Signale für **1** eine starke Verbreiterung erfahren (Abb. 17).

Die nachfolgende Tabelle gibt die $^1D_{\text{CH}}$ Werte zu obiger Abbildung wieder. Die verwendeten $^1J_{\text{CH}}$ Werte stammen von **1** in DMPC/DHPC Lösung unter isotropen Bedingungen (300 K, 600 MHz, INEPT).

	$q = 3.0$	$q = 2.7$	
C Atom	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]	$^1J_{\text{CH}}$ [Hz]
2	-76 / +129	-72 / +119	148
3	-79	-71	150
6	-62	-62	144
7	+159	+148	148
8	*	*	146
9	-20	-24	148
9a	-116	-111	153
OMe	+40	+36	150

Tab. 4. $^1D_{\text{CH}}$ Werte für **1** in Abhängigkeit von q bei ansonsten gleichbleibenden, experimentellen Bedingungen. * keine Ableseung des $|D_{\text{CH}}+J_{\text{CH}}|$ Wertes möglich.

Einen vergleichbaren Effekt hat auch die Variation des Gesamtlipidgehaltes c bei ansonsten vergleichbaren Bedingungen. Leider stehen für diesen Fall keine ^{13}C Spektren als Vergleich zur Verfügung.

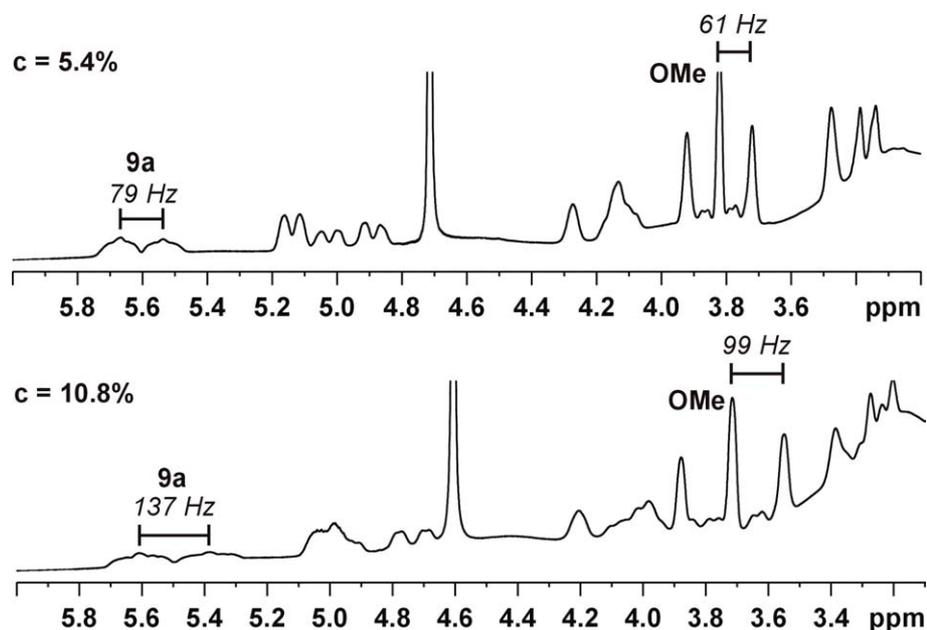


Abb. 18. ^1H Spektren von **1** in flüssig-kristalliner Phase bei Variation von c ($q = 2.6$, $f = 0.51$, $700 \mu\text{L D}_2\text{O}$, 308 K , 600 MHz).

Eine gleichzeitige Variation von c und q kann, bei dadurch unterschiedlichen Bedingungen für die flüssig-kristalline Phase, zu ähnlichen Werten für die dipolaren Kopplungen führen.

Probe a): $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, $3\% \text{ CTAB}$, $700 \mu\text{L Puffer}$, $f = 0.55$
 Probe b): $q = 2.6$, $c = 12.6\%$, ohne CTAB, $700 \mu\text{L D}_2\text{O}$, $f = 0.49$
 $\rightarrow |D_{\text{HH}} + J_{\text{HH}}| (\text{H9a}) = 105 \text{ Hz}$ (Probe a) und 99 Hz (Probe b)

C Atom	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]	
	Probe a	Probe b
2	-79 / +137	-75 / +140
3	-85	-88
6	-74	-69
7	+171	+170
8	~ -40	-
9	-45	-44
9a	-	~ -120
OMe	+43	+44

Tab. 5. Vergleich der dipolaren Kopplungen zweier Proben von **1**, die sich in c und q unterscheiden, jedoch einen ähnlichen f -Wert besitzen.

→ ein erhöhter Anteil an planarer Bilayerfläche – bedingt durch ein grösseres q – kann auch bei relativ niedrigem Gesamtlipidgehalt c zu einer ähnlich starken Ausrichtung führen wie bei hoher Gesamtlipidkonzentration c und kleinem q Wert.

→ Für den Grad der Orientierung von **1** in Bicellenlösung ist die Menge an planarer Membranfläche, gebildet von DMPC Molekülen, entscheidend. Bei gleichem f -Wert können also für grosses q / niedriges c bzw. kleines q / hohes c ähnlich grosse $^1D_{CH}$ Werte gemessen werden.

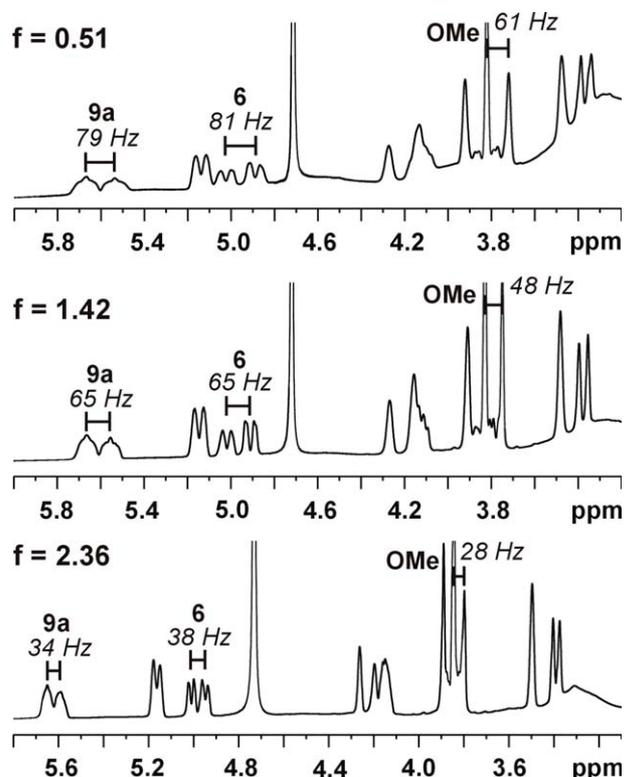
2.2.3 Einfluss des f -Wertes auf den Grad der Ausrichtung

Lässt man die experimentellen Parameter c und q unverändert und ändert nur das molare Verhältnis f von **1** zu DMPC, so führt auch dies zu einer Skalierung der gemessenen RDC Werte. Generell ist die Ausrichtung umso schwächer, je grösser der Quotient f wird, d. h. je mehr an Substanz **1** im Verhältnis zu DMPC in der Lösung vorhanden ist.

Probe a): $q = 2.6$, $c = 5.4\%$, 3% CTAB, 700 μL D_2O , $f = 0.51$

Probe b): $q = 2.6$, $c = 5.4\%$, 3% CTAB, 700 μL D_2O , $f = 1.42$

Probe c): $q = 2.6$, $c = 5.4\%$, 3% CTAB, 700 μL D_2O , $f = 2.36$



C Atom	$^1D_{CH}$ [Hz]	
	Probe b	Probe c
2	-45 / +83	-30 / +53
3	-56	-39
6	-46	-34
7	+110	+76
8	~ -63	~ -63
9	-30	-21
9a	-103	-72
OMe	+25	+18

Tab. 6. $^1D_{CH}$ Werte für $f = 1.42$ und $f = 2.36$ im Vergleich. Auch hier ist eine deutliche Skalierung in Abhängigkeit von f zu beobachten.

Abb. 19. ^1H Spektren von **1** in Bicellen bei unterschiedlichem, molarem Verhältnis von **1** zu DMPC (308 K, 600 MHz).

→ Da die gemessenen RDC Werte eine Mittelung aus allen Orientierungen (sowohl Stärke als auch Richtung) darstellen, wobei in anisotroper Phase eine bestimmte Orientierung leicht bevorzugt ist, zeigt die Abnahme der Ausrichtung mit steigender Konzentration an **1**, dass man dieses System – **1** + DMPC – als eine Art Ligand-Rezeptor Wechselwirkung auffassen kann. Je mehr Ligand im Verhältnis zum Rezeptor in Lösung vorhanden ist, desto mehr Ligand befindet sich frei in Lösung (wenn alle Bindungsstellen besetzt sind).

→ **1** tritt mit den planaren Bereichen der Bicellen, also dem DMPC Anteil in flüssig-kristalliner Phase, auf eine bis dato unbekannte Weise in Wechselwirkung.

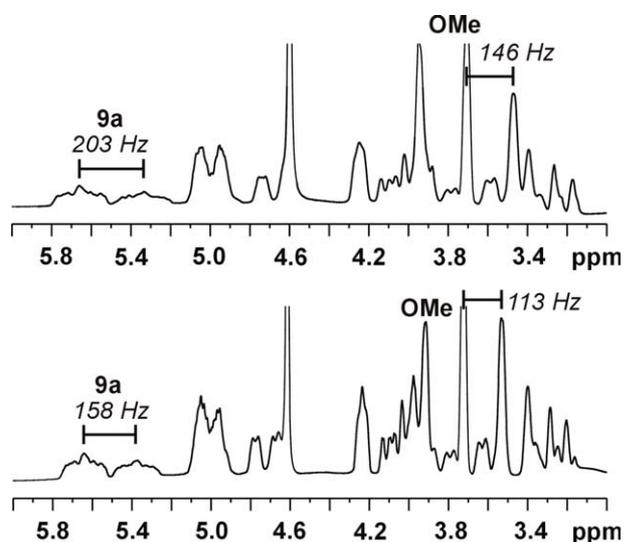
2.2.4 Einfluss erhöhter Ionenstärke – Zugabe von NaCl

Bei einer Probe von **1** mit hohem Gesamtlipidgehalt wurden 2.26 mg NaCl zugesetzt, was in Bezug auf das Gesamtvolumen (700 µL) einer 55 mM NaCl-Lösung entspricht.

Der Referenzwert der RDCs stammt von einer Probe mit vergleichbaren q, c und f.

Probe a): q = 2.7, c = 12.7%, ohne CTAB, 700 µL Puffer (30 mM), f = 0.36

Probe b): q = 2.7, c = 12.6%, 3% CTAB, 700 µL D₂O, f = 0.39, 55 mM NaCl



C Atom	¹ D _{CH} [Hz]	
	Probe a	Probe b
2	+40 / +40	-84 / +142
3	-101	-94
6	-	-72
7	+298	+189
8	-	-
9	-30	-50
9a	-25	-
OMe	+75	+48

Tab. 7. und Abb. 20. ¹D_{CH} Werte für **1** in Abhängigkeit von der Konzentration an NaCl bei ansonsten vergleichbaren experimentellen Bedingungen. ¹H Spektren von **1** ohne (oben) und mit (unten) NaCl-Zusatz bei 308 K (600 MHz).

→ Auch die Ionenstärke der Lösung hat eine Auswirkung auf den Grad der Ausrichtung von **1** in Bicellen.

→ Der Zusatz von CTAB entspricht zwar ebenfalls der Zugabe von Salz und somit der Erhöhung der Ionenstärke der Lösung. Berechnet man die Molarität von CTAB für die Standardzugabe von 3% CTAB (bezogen auf n (DMPC)), so erhält man eine ca. 2 mM CTAB-Bicellenlösung. Die Menge ist also im Ver-

gleich zur oben gezeigten NaCl Zugabe verschwindend gering, was erklärt, warum keine signifikanten Unterschiede zwischen Proben mit und ohne CTAB festgestellt werden konnten.

2.3 Auswirkungen struktureller Modifikationen auf die RDC Werte

Wie unter 2.1 gezeigt, stand eine Vielzahl an mehr oder weniger stark modifizierten Analoga zum Grundmolekül **1** zur Verfügung.

Um ableiten zu können, welche strukturellen Merkmale in **1** die aussergewöhnlich starke Ausrichtung in Bicellen und die aufgrunddessen postulierte, Affinität zur Modellmembran bedingen, wurden zunächst Bizeklen mit geänderter Konformation des 7-Ringes als Vergleich herangezogen.

2.3.1 Bizeklen mit geänderter 7-Ring Konformation

Insgesamt drei verschiedene Moleküle mit von **1** verschiedener 7-Ring Konformation konnten untersucht werden.

Molekül **15**: Aufgrund einer Isopropylidenschutzgruppe in Positionen 6 und 7 in die Boot-/Wannenkonformation „gedrängter“ 7-Ring → **keine axiale OH Gruppen.**

Molekül **16**: Ausgehend von γ -Mannuronolacton anstelle von γ -Glucuronolacton ergibt sich eine invertierte Sesselkonformation für den 7-Ring → **2 axiale OH Gruppen auf Ober- bzw. Unterseite des 7-Ringes.**

Molekül **17**: ein bei der Synthese von **1** entstehendes Nebenprodukt, welches beim Ringschluss des 5-Ringes das Epimer (am Brückenkopf) ergibt und da durch ebenfalls die invertierte Sesselkonformation als energetisch günstigere Konformation bevorzugt → **eine axiale OH Gruppe.**

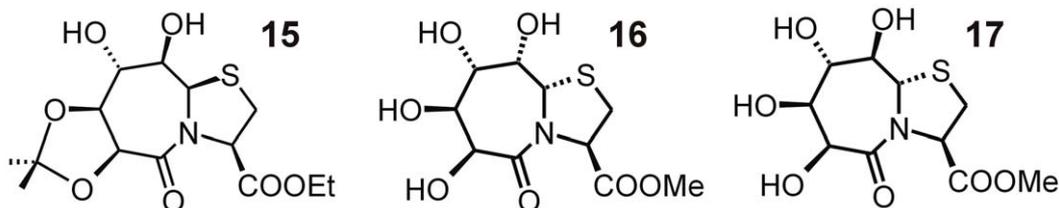


Abb. 21. Strukturen jener Bizeklen, die eine von **1** verschiedene 7-Ring Konformation aufweisen.

Folgende Bicellenproben wurden untersucht:

- Molekül **15**: $q = 2.5$, $c = 5.9\%$, ohne CTAB, 700 μL D_2O , $f = 0.94$
- Molekül **16**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.39$
- Molekül **17**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.15$; als Nebenprodukt in einer Probe von **1** enthalten

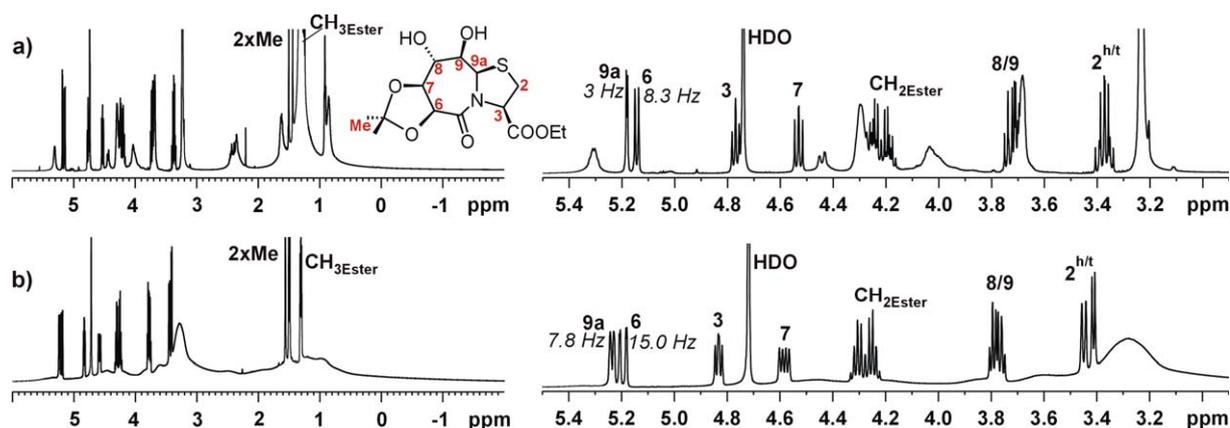


Abb. 22. Molekül **15** in Bicellenlösung. a) ^1H Spektrum unter isotropen Bedingungen bei 300 K (600 MHz). Die für H9a und H6 angegebenen Kopplungswerte entsprechen den $^3J_{\text{HH}}$ Kopplungen. b) ^1H Spektrum unter anisotropen Bedingungen bei 308 K (600 MHz). Die angegebenen Kopplungswerte entsprechen dem Betrag von $D_{\text{HH}}+J_{\text{HH}}$ für H9a und H6.

Schon das ^1H Spektrum von **15** zeigt, dass die Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase im Vergleich zu **1** nur minimal ist. Dennoch sind die homonuklearen Kopplungen ca. 3 – 4 mal so gross wie für Saccharose oder ähnliche Moleküle in der Literatur beschrieben.^{8c}

Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für **16** und **17**. Die homonuklearen RDCs sind im Vergleich zu **1** relativ klein.

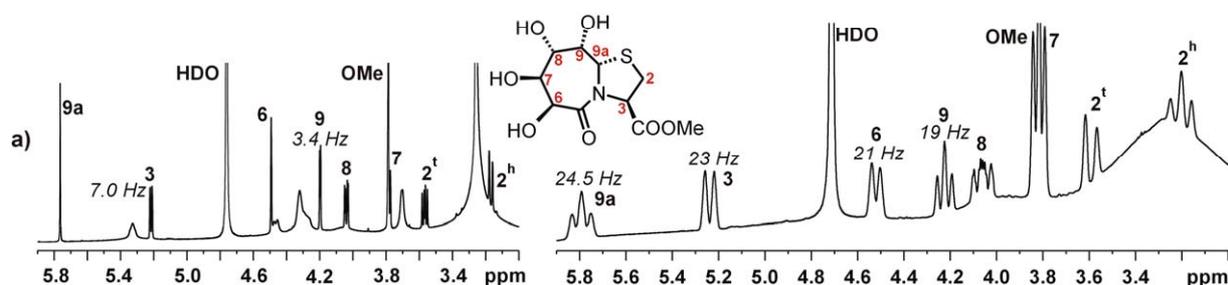


Abb. 23. ^1H Spektren von **16** in isotroper Lösung (links) bei 300 K und anisotroper Lösung (rechts) bei 308 K. Alle Kopplungen in isotroper Phase beziehen sich auf die $^3J_{\text{HH}}$ Kopplungen, in flüssig-kristalliner Phase ist der Betrag der Summe von $D_{\text{HH}}+J_{\text{HH}}$ gegeben.

Für **17** existiert kein brauchbares ^1H Spektrum mit ablesbaren Kopplungen, da seine Signale durch das gleichzeitig in Lösung vorhandene Molekül **1** zum grossen Teil überdeckt werden. Abb. 16 und 17 zeigen die ^1H Spektren der betreffenden Probe. Die ^{13}C Daten konnten jedoch ohne weiteres extrahiert werden, da in dieser Dimension die Überlagerungen nicht so ausgeprägt sind.

Die Ergebnisse der ^{13}C Messungen für **15** und **17** zeigen, dass die Ausrichtung zwar stärker ist als für sphärische, polare Moleküle zu erwarten, jedoch um Grössenordnungen schwächer als für **1**.

15			17	
C Atom	$ D_{CH}+J_{CH} $ [Hz]	$^1D_{CH}$ [Hz]	$ D_{CH}+J_{CH} $ [Hz]	$^1D_{CH}$ [Hz]
2	152	+4	144 / 181	-4 / +33
3	167	+15	142	-10
6	144	-8	142	-10
7	147	-6	103	-43
8	141	-6	126	-21
9	145	-2	128	-19
9a	135	+14	129	-33
CH ₂ Ester	154	+4.5	-	-
CH ₃ Ester	127	0	152	-
Me	129 / 131	+2 / +3	-	-

Tab. 8. $^1D_{CH}$ Werte für **15** und **17** in Bicellen. Die Werte für $^1J_{CH}$ stammen aus entsprechenden INEPT bzw. ^{13}C gated Spektren unter isotropen Bedingungen.

→ Die Sesselkonformation ist somit – wie die obigen drei Beispiele zeigen – eine unabdingbare Voraussetzung für die sehr starke Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase.

2.3.2 Bizyklen mit „normaler“ Sesselkonformation und Modifikation in Position 3

Die in Position 3 vorhandene Methylestergruppe in **1** kann zum einen chemisch durch Hydrolyse in die freie Säure bzw. das Carboxylat (Molekül **2**) überführt werden. Zum anderen ist es auch möglich, bei der Synthese des 7,5-Bizyklus anstelle von Cystein(methyl)ester das Cysteamin einzusetzen, was dazu führt, dass in Position 3 des Kondensationsproduktes anstelle einer Carboxyfunktion eine CH₂-Gruppe vorhanden ist (Molekül **4**).

Ferner ist es ebenfalls möglich, in Position 3 ein freies (primäres) Amid zu generieren (Molekül **7**).

Wie in Kapitel 2.1 gezeigt, haben diese Modifikationen auch Auswirkungen auf die, in Lösung vorliegenden, H-Brücken.

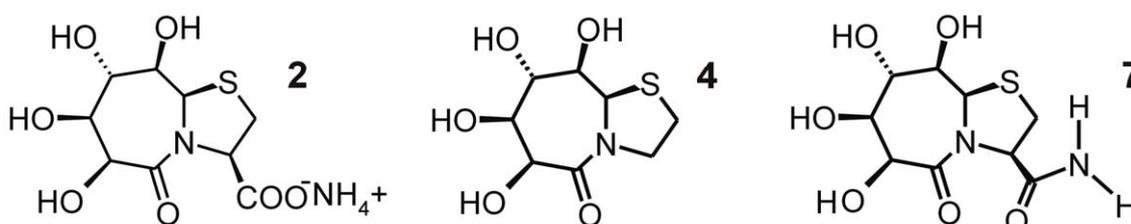


Abb. 24. Strukturen jener Bizyklen, die im Vergleich zu **1** eine Modifikation in Position 3 besitzen.

Für **2** ist ein zu **1** analoges H-Brückenmuster zu erwarten, wobei jedoch aufgrund des negativ geladenen Carboxylats die 9OH-Gruppe stärker zum Carbonyl orientiert sein dürfte.

Dieses Molekül zeigt jedoch eine nur geringe Ausrichtung mit homonuklearen RDCs ähnlich denen des Moleküls **16**, bei dem ein invertierter Sessel und keine H-Brücken vorliegen.

Molekül **2**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.82$

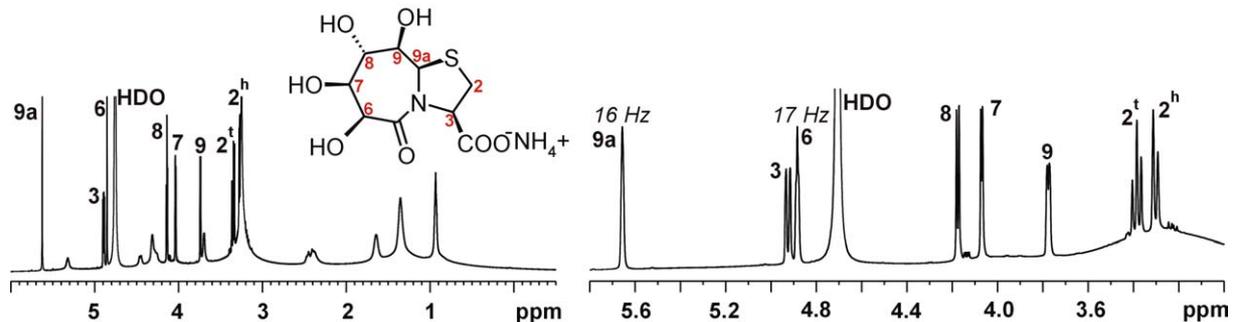


Abb. 25. ^1H Spektren von **2**. Links unter isotropen Bedingungen bei 300 K, rechts ein Ausschnitt des ^1H Spektrums unter anisotropen Bedingungen bei 308 K. Für H9a und H6 entsprechen die aus dem orientierten Spektrum ermittelten Kopplungen dem Betrag der dipolaren Kopplung ($|D_{\text{HH}}|$), da beide Signale in isotroper Lösung als Singulets vorliegen.

Ein Grund für die schwache Ausrichtung könnte die negative Gesamtladung des Moleküls **2** sein. Umso erstaunlicher, dass es keine stärkere Orientierung zeigt, da CTAB – ein positiv geladenes Additiv – zugesetzt ist, welches die Wechselwirkung zwischen einem negativ geladenen Solut und der positiv geladenen Membran noch verstärken sollte.

Molekül **4**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.76$

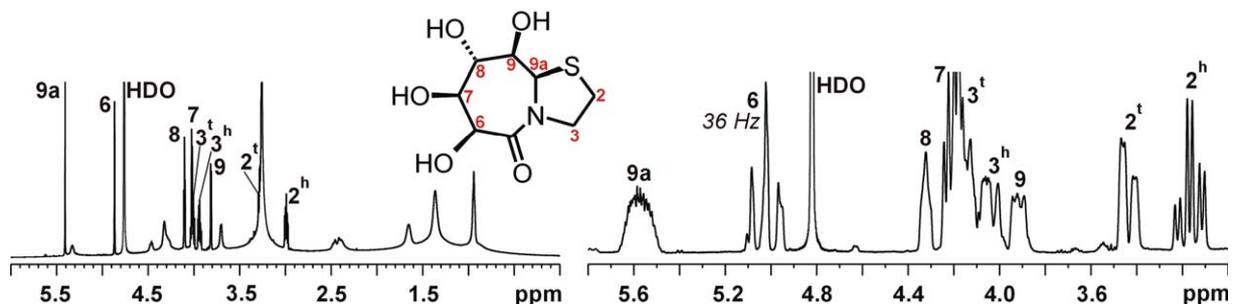


Abb. 26. ^1H Spektrum von **4** in isotroper Lösung (links, 300 K) und ^1H T1 Inversion Recovery Spektrum in anisotroper Lösung (rechts, 308K). Der für H6 angegebene Kopplungswert entspricht dem Betrag der dipolaren Kopplung ($|D_{\text{HH}}|$).

Die Ausrichtung ist auch für **4** deutlich kleiner als für **1**. Eine, in ihren experimentellen Parametern, zu der hier gezeigten Probe vergleichbare Probe von **1** liefert ca. 100 Hz D_{HH} für H9a bzw. H6.

Die Sesselkonformation von **1** und **4** ist identisch, auch sind beide Moleküle neutral, lediglich ihr H-Brückenmuster unterscheidet sich. Das würde bedeuten, dass die Orientierung der OH Gruppen ausschlaggebend für den Grad der Ausrichtung ist. Weitere Beispiele sollen dies klären.

Molekül **7**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 4.4% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.63$

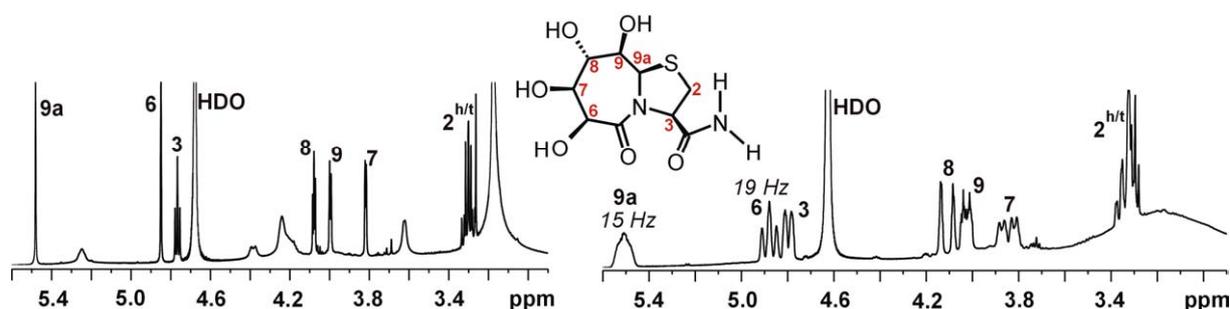


Abb. 27. Molekül **7** in Bicellen. Links ^1H Spektrum bei 300 K (isotrop), rechts ^1H Spektrum bei 308 K (anisotrop). Die Kopplungen im anisotropen Fall entsprechen für H9a und H6 wiederum dem Betrag der homonuklearen, dipolaren Kopplung $|D_{HH}|$.

Dieses System zeigt mit die geringsten Kopplungswerte und somit eine nur geringe Ausrichtung verglichen mit Molekül **1**.

Wie schon bei **4** ist auch im Falle von Molekül **7** die Sesselkonformation und die Gesamtladung des Moleküls identisch mit **1**, jedoch sind die Änderungen in der Orientierung der OH Gruppen noch gravierender als für **4**, da 9OH hier aufgrund des Amidflips des primären Amids zwischen Donor- und Akzeptorfunktion hin- und herwechselt.

Da es in **1** eine reine Donorfunktion besitzt, scheint die Orientierung, die für die Akzeptorfunktion von 9OH notwendig ist, einen ungünstigen Einfluss auf die Wechselwirkung des Bizyklus mit der Membranoberfläche zu haben.

Auch die ^{13}C Ergebnisse für **2**, **4** und **7** bestätigen die nur geringe Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase.

C Atom	$^1D_{CH}$ [Hz]		
	2	4	7
2	-10.1 / -12.2	-51 / +115	-38 / +8
3	+0.3	-45 / -21	-26
6	-5.3	-8	+37
7	+2.9	+89	+18
8	-2.4	+21	-8
9	-3.0	-60	-6
9a	-2.7	-113	-35

Tab. 9. Werte der dipolaren, heteronuklearen Kopplungen für 2, 4 und 7. Die entsprechenden $^1J_{CH}$ Werte für jedes der Moleküle stammen aus ^{13}C INEPT bzw. 2D HMQC Spektren unter isotropen Bedingungen.

→ Die Gesamtladung des Bicyklus hat einen Einfluss auf den Grad der Orientierung. Ein negativ geladener Bicyklus – wie 2 – richtet sich nur schwach aus. Von grösserer Bedeutung ist jedoch die Orientierung der OH Gruppen und hier besonders der 9OH Gruppe. Eine Ausrichtung wie sie für 9OH als Akzeptor vorliegt bzw. die reine Orientierung zu 7OH hin, führt zu einer Abnahme der Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase.

→ Die H-Brücken und ihre räumliche Orientierung sind also entscheidend für die Wechselwirkungen zwischen Bicyklus und DMPC Bilayer.

2.3.3 Bicyklen mit Sesselkonformation und Modifikation in Position 6

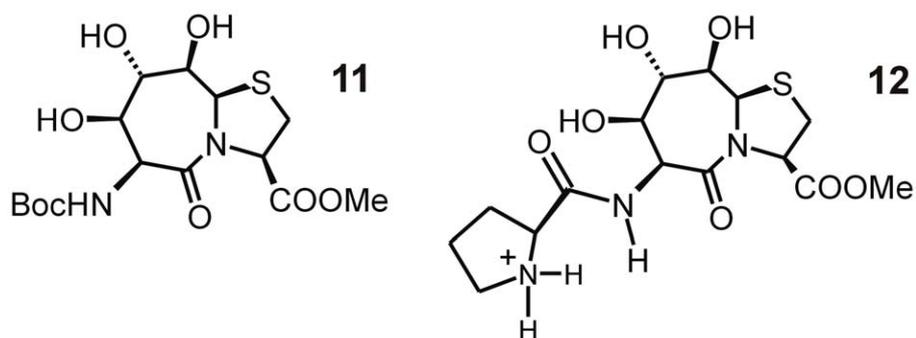


Abb. 28. Strukturen der, in Position 6 modifizierten, Bicyklen.

Molekül **11** mit einem Boc-geschützten Amin in Position 6 und ansonsten ohne Veränderungen im Vergleich zu **1** zeigt eine sehr starke Orientierung.

Molekül **11**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μ L Puffer, $f = 0.74$

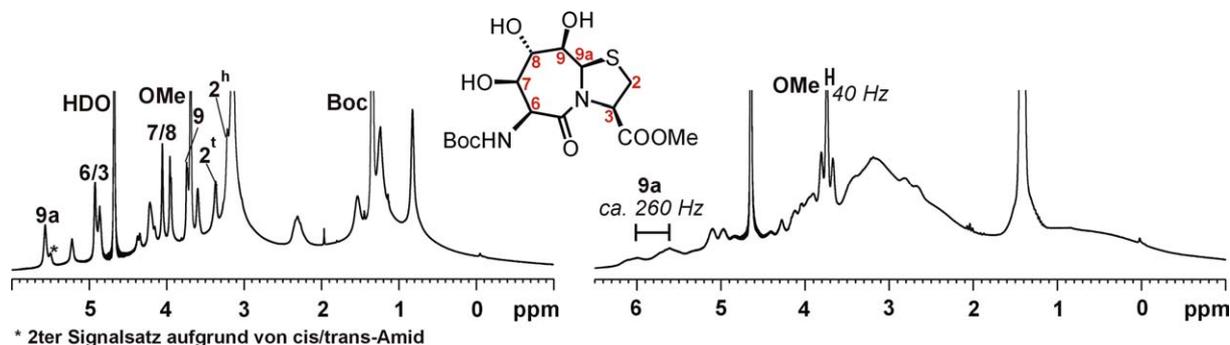


Abb. 29. ^1H Spektren von **11** in isotroper Lösung (links, 300 K) und anisotroper Lösung (rechts, 308 K). Das Molekül erfährt eine sehr starke Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase, auch zu erkennen an der extremen Signalverbreiterung im ^1H bedingt durch zahlreiche long-range RDCs.

Allerdings handelt es sich bei der Boc-Schutzgruppe um eine relativ grosse, unpolare Gruppe, die aufgrund ihrer höheren Lipophilie stärker mit der (lipophilen) Membran der Bicellen wechselwirken bzw. in sie eintauchen kann. Das erklärt auch die starke Signalverbreiterung, nicht nur im ^1H sondern auch im ^{13}C Spektrum. Letzteres liefert wegen jener Verbreiterungen keine Ergebnisse.

Dass eine massive, hydrophobe „Wechselwirkung“ mit den Bicellen bzw. eine Störung ihrer Struktur stattfindet, zeigt das ^{31}P Spektrum bei 308 K.

Sind bei allen anderen untersuchten Bicyklen die, in anisotroper Phase vorliegenden, Bicellen nicht beeinträchtigt, so ergibt sich bei Vorhandensein einer in die Membran eintauchenden, (relativ grossen) hydrophoben Gruppe eine Störung der flüssig-kristallinen Phase.

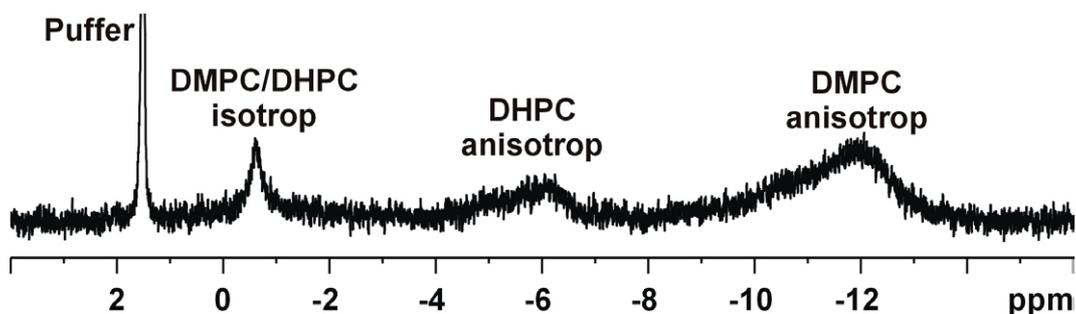


Abb. 30. ^{31}P Spektrum der Bicellenlösung mit Molekül **11** als Solut (308 K, 600 MHz). Der wässrige Phosphatpuffer gibt ein scharfes Signal. (Spektrum nicht geeicht)

Die ^{31}P Signale von DHPC und DMPC in anisotroper Phase sind verbreitert und wenig definiert. Zusätzlich taucht ein Signal für DMPC/DHPC im isotropen Zustand auf. D. h. die Phase ist nicht einheitlich und die Ausbildung der Bicellen wird, so lassen die Ergebnisse vermuten, durch das hydrophobe Molekül **11** gestört.

Die Kupplung einer Aminosäure – in diesem Fall (L)-Prolin (Molekül **12**) – an die Ammoniumgruppe in Position 6 ergibt ein ebenfalls nur in Position 6 (i. Vgl. zu **1**) modifiziertes Molekül.

Wie in Kapitel 2.1 gezeigt, besitzt **12** ein zu **1** analoges H-Brückenmuster in Lösung.

Molekül **12**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.26$

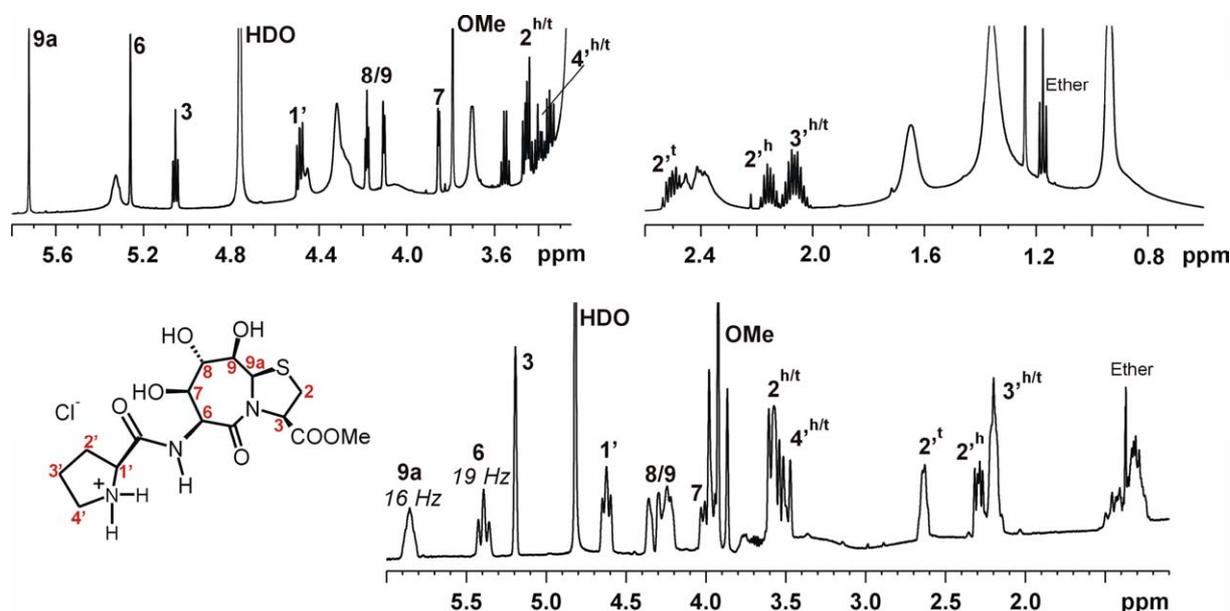


Abb. 31. ^1H Spektrum von **12** in isotroper Lösung (oben) und ^1H T1 Inversion Recovery Spektrum in anisotroper Lösung (unten). Die Ausrichtung ist, trotz niedrigem f - Wertes, nur minimal.

Da im Falle von Molekül **12** das H-Brückenmuster identisch ist zu dem sich stark ausrichtenden Molekül **1**, muss der Grund für die schwache Ausrichtung mit hoher Wahrscheinlichkeit wiederum in der Gesamtladung des Moleküls – dieses Mal mit positiver Gesamtladung – gesucht werden.

C Atom	$ D_{\text{CH}}+J_{\text{CH}} $ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]
2	346 (x2)	+24
3	141	-11
6	106	-34
7	229	+79
8	165	+16
9	113	-36
9a	93	-60
OMe	502 (x3)	+17

Tab. 10. ^{13}C RDCs für Molekül **12** aus ^{13}C INEPT Daten bei 308 K, ohne Berücksichtigung des Prolinrestes.

→ Im Fall von **11** ist kein direkter Vergleich der Orientierung mit **1** möglich, da es sich aufgrund der Boc-Schutzgruppe um ein sehr viel stärker hydrophobes

Molekül handelt, das aus diesem Grund mit der lipophilen Bicellenmembran wechselwirkt.

→ Für ein System mit positiver Gesamtladung ist – wie schon für das negativ geladene **2** – die Ausrichtung nur minimal im Vergleich zu **1**, selbst wenn H-Brückenmuster und Sesselkonformation mit **1** identisch sind.

2.3.4 Bizyklen mit Sesselkonformation und Modifikationen in den Positionen 3 und 6

Für diesen Fall standen eine Vielzahl von Molekülen zur Verfügung.

So konnte mit dem Azid **5** und dem Ammoniumsalz **6** der Einfluss dieser Gruppen im Vergleich zu Molekül **4** untersucht werden.

Auch die freie Säure (Molekül **2**), welche eine negative Gesamtladung aufweist, wurde in modifizierter Form als Zwitterion (Molekül **3**) – mit einer Ammoniumgruppe in Position 6 – eingesetzt, um den Einfluss der Ladung auf die Orientierung zu verifizieren.

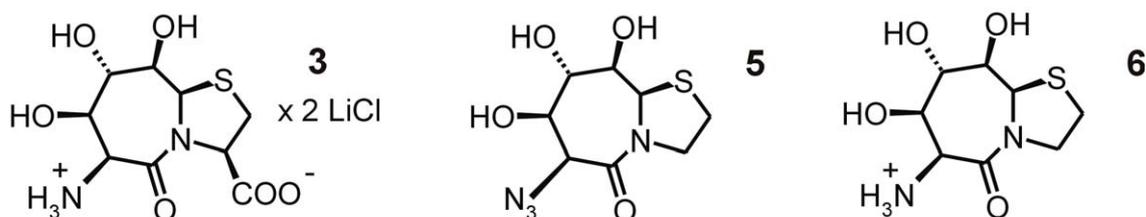


Abb. 32. Bizyklen, die im Vergleich zu **1**, in den Positionen 3 und 6 modifiziert sind.

Molekül **5**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.53$

Molekül **6**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 4.5% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.63$

Molekül **3**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = \sim 0.5$

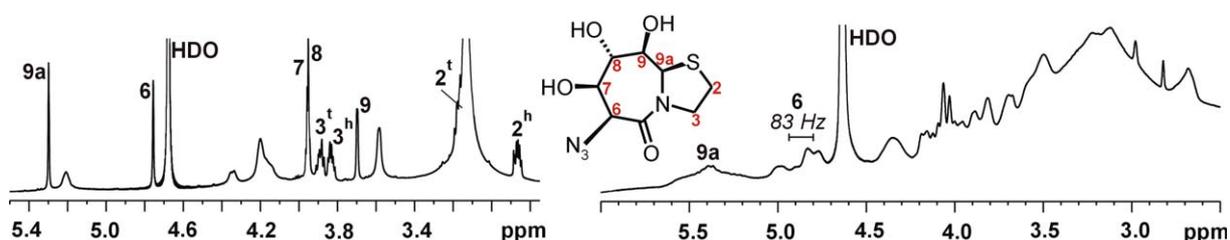


Abb. 33. ^1H Spektren von **5** in isotroper Lösung (links, 296 K) und anisotroper Lösung (rechts, 308 K). Es ist vor allem für H9a eine starke Signalverbreiterung in flüssig-kristalliner Phase erkennbar.

Für Molekül **5** wurden deutlich grössere Kopplungen ermittelt als für das unmodifizierte Molekül **4**. Eine Erklärung hierfür wäre, dass aufgrund der höheren Lipophilie der Azidgruppe die Wechselwirkungen mit der Membran rein auf die höhere Hydrophobizität zurückzuführen sind, ähnlich dem Boc-geschützten Amin. Für **5** zeigte sich

im ^{31}P Spektrum allerdings keine Beeinflussung der Struktur der flüssig-kristallinen Phase.

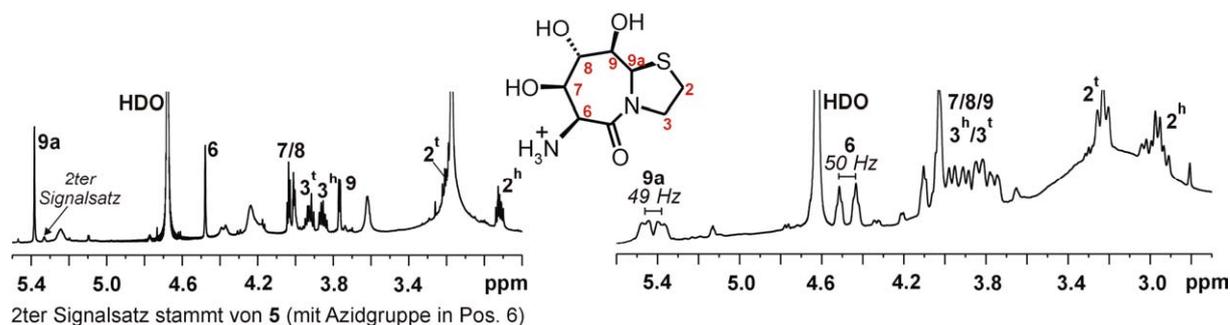


Abb. 34. ^1H Spektren von **6** in isotroper Lösung bei 300 K (links) und in anisotroper Lösung bei 308 K (rechts). Ein schwach erkennbarer, zweiter Signalsatz gehört zu nicht reduziertem Edukt – in diesem Falle entspricht dies Molekül **5**.

Die Proben für **5** und **6** sind annähernd identisch und dennoch zeigt sich ein sehr grosser Unterschied in der Ausrichtung, was durch die unterschiedliche Polarität der Azid- bzw. Ammoniumgruppe und die unterschiedliche Ladung verursacht wird. Molekül **6** zeigt zwar im Vergleich zu **1**, wie schon **4**, eine verminderte Ausrichtung, aber dennoch stärker als andere, untersuchte Systeme.

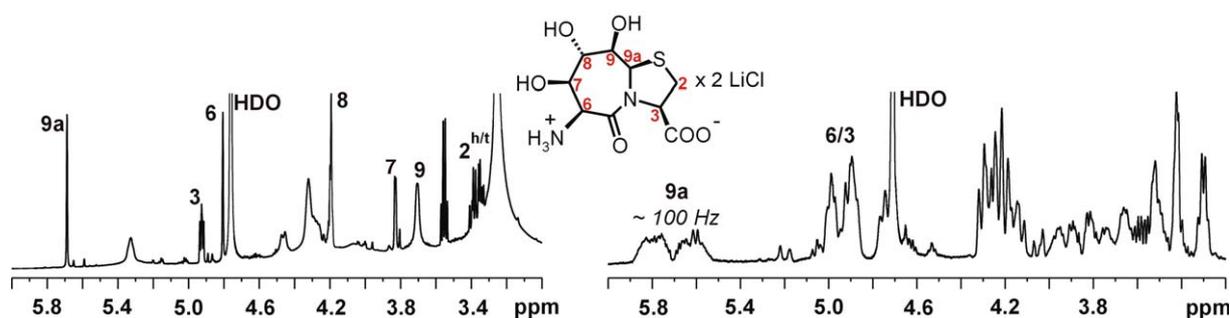


Abb. 35. ^1H Spektrum von **3** in isotroper Lösung (links, 300 K) und ^1H T1 Inversion Recovery Spektrum in anisotroper Lösung (rechts, 308 K).

Molekül **3** sollte – genau wie die freie Säure **2** – ein zu **1** vergleichbares H-Brückenmuster aufweisen. Seine Ausrichtung ist auch ähnlich stark wie für das Grundmolekül **1** und im Vergleich zur freien Säure **2** sehr viel stärker. Dies bedeutet, dass ein analoger Grundkörper mit gleichem H-Brückenmuster als neutrales Molekül bzw. als zwitterionisches Molekül eine sehr viel stärkere Ausrichtung erfährt als sein negativ geladenes Pendant.

C Atom	$^1D_{CH}$ [Hz]		
	3	5	6
2	-49	+164 / +204	-46 / +44
3	-	+155	-56 / -38
6	+6	+64	-31
7	+86	+386	+65
8	-73	-93	-42
9	+31	-42	-4
9a	~ -135	+34	-58

Tab. 11. $^1D_{CH}$ Werte für die in Position 3 und 6 modifizierte Moleküle **3**, **5** und **6**. $^1J_{CH}$ Werte für **3** wurden von Molekül **2** übernommen, jene für **6** von **5**.

→ Molekül **5** mit seiner unpolaren Azidgruppe ist für einen direkten Vergleich der Orientierung nicht geeignet, da aufgrund seiner Lipophilie andere Arten von Wechselwirkungen mit der Lipidmembran auftreten. Molekül **6** verhält sich wie schon Molekül **4**, und zeigt eine schwächere Ausrichtung als **1**. Die Ammoniumgruppe in Position **6** hat keinen grossen Einfluss auf die Orientierung, da **4** und **6** einen ähnlichen Grad an Ausrichtung zeigen. Auch die positive Gesamtladung des Systems **6** hat nur geringe Auswirkung.

→ Anders hingegen Molekül **3** – hier handelt es sich um ein System, das sich mindestens ebenso stark in Bicellen ausrichtet wie Molekül **1**. Sie besitzen beide dasselbe H-Brückenmuster und, im Unterschied zu **2**, welches ebenfalls identische H-Brücken besitzt, tragen diese Moleküle keine Gesamtladung. Sie sind also entweder neutral oder aufgrund zwitterionischer Struktur praktisch neutral. Dies bedeutet, dass die Gesamtladung eines Systems wesentlichen Einfluss auf seine Fähigkeit hat, mit der Bicellenmembran wechselzuwirken und somit eine starke Ausrichtung zu erfahren.

Weitreichender modifizierte Bicyklen, die in Position **3** eine zusätzliche Aminosäure aufweisen, und in Position **6** eine Ammoniumgruppe, sollten sich – aufgrund ihrer Amidbindung in Position **3** – ähnlich wie das primäre Amid **7** verhalten und nur eine schwache Orientierung zeigen.

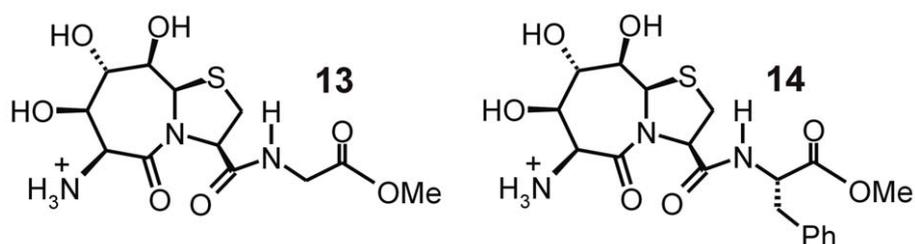


Abb. 36. Molekül **13** mit Glycin in Position **3** und Molekül **14** mit (L)-Phenylalanin in Position **3**.

Molekül **13**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.29$

Molekül **14**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.1$

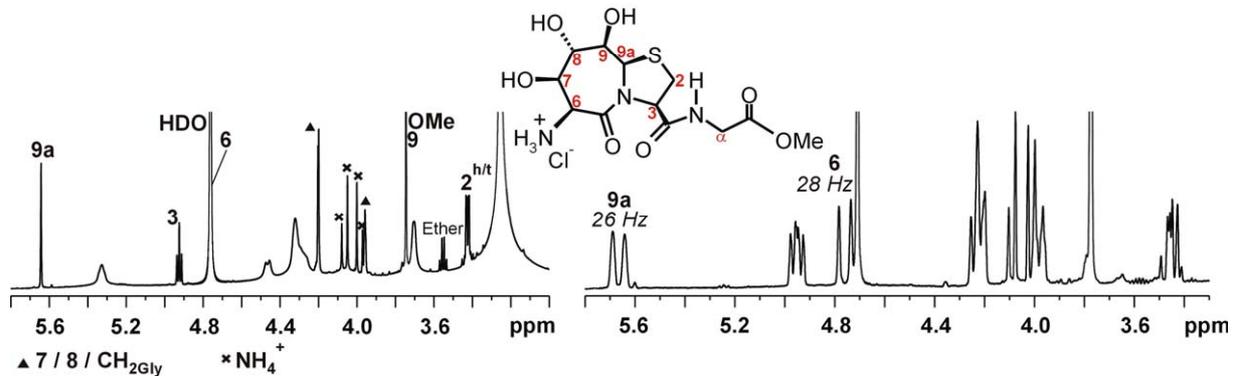


Abb. 37. ^1H Spektrum von **13** in isotroper Lösung (links, 300 K) und ^1H T1 Inversion Recovery Spektrum bei 308 K (rechts).

Die Ausrichtung ist im Vergleich zu **1**, wie zu erwarten, nur gering und trotz niedrigen f -Wertes sind die D_{HH} Beträge nur um die 25 – 30 Hz für H9a und H6. Zusätzlich zum geänderten H-Brückenmuster trägt das Molekül eine positive Gesamtladung, was, wie schon für **12** gesehen, ebenfalls zu einer verminderten Ausrichtung führt.

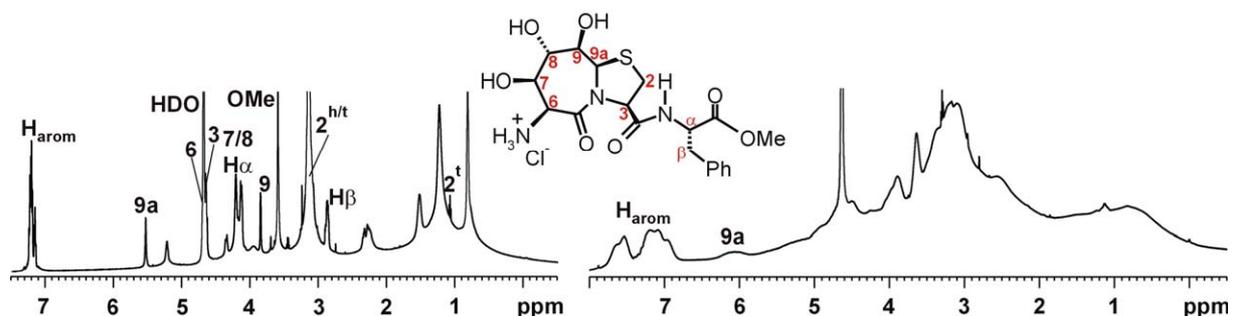


Abb. 38. ^1H Spektren von Molekül **14** in isotroper Lösung (links, 300 K) und anisotroper (rechts, 308 K).

Für **14** zeigt sich eine starke Signalverbreiterung und eine starke Ausrichtung im Feld. Dies sollte, wie schon für andere Systeme gezeigt, auf eine stark hydrophobe Gruppe – in diesem Fall den Phenylrest – zurückzuführen sein, der zu Wechselwirkungen mit der Bicellenmembran führt, die jedoch nur auf Polaritätseffekten beruhen.

C Atom	$ D_{CH}+J_{CH} $ [Hz]	$^1D_{CH}$ [Hz]
2	134 / 149	-16 / -1
3	133	-18
6	120	-19
7	168	+20
8	122	-26
9	163	+15
9a	122	-28
OMe	443 (x3)	-1

Tab. 12. Heteronukleare RDCs für Molekül **13**. Die $^1J_{CH}$ Werte stammen von der Boc-geschützten Form in D_2O .

Für **14** war aufgrund der starken Signalverbreiterung keine Analyse der ^{13}C Daten möglich.

→ Der Phenylrest in Molekül **14** lässt, aufgrund seiner Hydrophobizität, keinen direkten Vergleich der Stärke der Ausrichtung mit **1** zu.

→ Für **13** führt jedoch wie schon für **7** die geänderte Ausrichtung der H-Brücken – bedingt durch den Amidflip – und die zusätzliche positive Gesamtladung des Moleküls zu einer nur sehr schwachen Ausrichtung in anisotroper Phase.

2.3.5 Weitere, modifizierte Bizyklen

Hier noch drei weitere Bizyklen, die sich zwar nicht direkt in obiges Modifikationschema einordnen lassen, aber dennoch wegen ihres Verhaltens in anisotroper Phase weitere Hinweise auf die strukturellen Bedingungen für die spezifische Wechselwirkung zwischen Bizyklus und Membran geben.

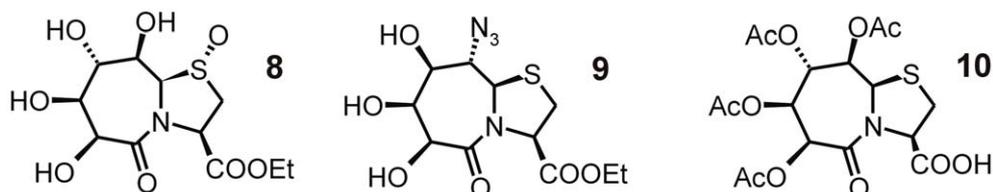


Abb. 39. Bizyklen mit verschiedenen Modifikationen. Alle drei besitzen einen 7-Ring in Sesselkonformation.

Alle drei Modifikationen besitzen einen 7-Ring in Sesselkonformation (analog zu **1**), doch nur **8** hat ein zu **1** analoges H-Brückenmuster. In **9** liegt nur noch eine axiale OH Gruppe in Position 7 vor, in Position 9 eine Azidgruppe, in **10** ist durch die Acetylierung aller OHs die Ausbildung von H-Brücken ebenfalls nicht gegeben.

Molekül **8**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.63$

Molekül **9**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.51$

Molekül **10**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.5$

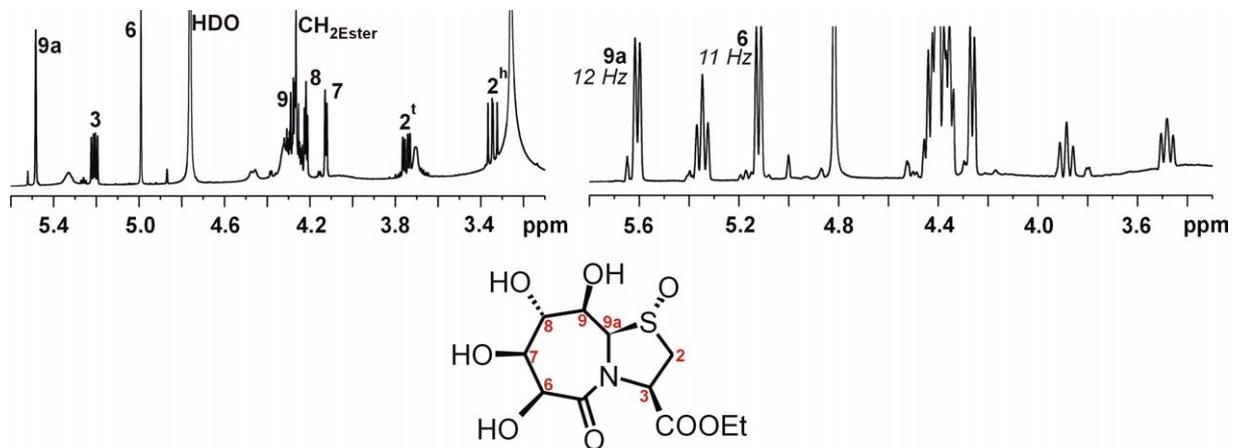


Abb. 40. ^1H Spektrum von **8** bei 300 K (links) und ^1H T1 Inversion Recovery Spektrum bei 308 K (rechts).

Auch die Unterseite des bicyclischen Systems scheint wichtig für eine spezifische Wechselwirkung mit der Bicellenmembran zu sein, denn **8** zeigt trotz gleichen H-Brückenmusters wie **1** eine nur schwache Ausrichtung im magnetischen Feld. Die nach unten – also auf die zu den H-Brücken entgegengesetzte Seite – orientierte Sulfoxidgruppe stört die Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase.

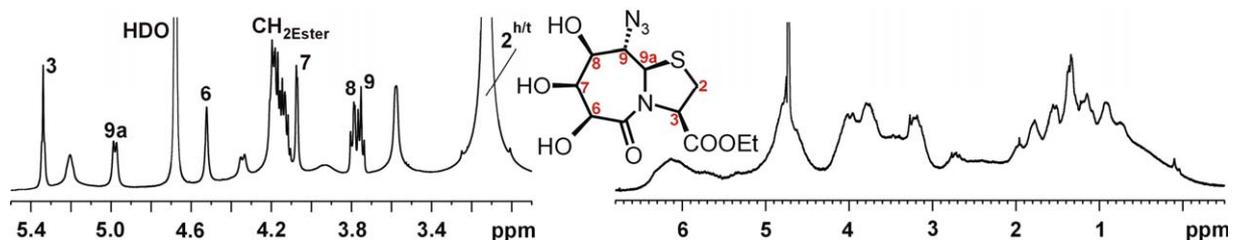


Abb. 41. ^1H Spektrum von **9** bei 296 K (links) und ^1H T1 Inversion Recovery Spektrum bei 308 K (rechts).

Dieses Molekül zeigt eine extrem starke Verbreiterung seiner Signale, was bis dato nur bei Molekülen mit grösseren, hydrophoben Gruppen beobachtet wurde. Zwar besitzt **9** zwei mehr oder weniger unpolare Gruppen – das Azid und den Ethylester – doch sollte dies nicht eine derartig starke, unspezifische Wechselwirkung mit der Membran hervorrufen.

Eine spezifische Wechselwirkung zwischen den Bicellen und **9** würde dem bisher gesagten widersprechen, da dieses System kein H-Brückenmuster wie **1** aufweist. Allerdings konnte für **9** keine genauere Aussage über das Warum getroffen werden, da die Signalverbreiterung im ^{13}C noch stärker ist, und somit die Auswertung von $^1\text{D}_{\text{CH}}$ Daten misslang.

Das ^{31}P Spektrum zeigt allerdings keine Störung der Bicellenstruktur, wie dies für **11** der Fall war.

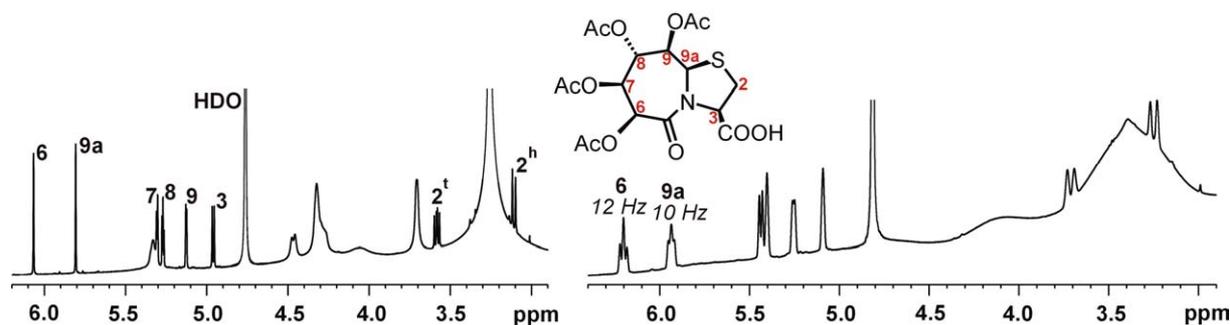


Abb. 42. ^1H Spektren für **10** bei 300 K (links) und 308 K (rechts).

Hier sind gleich zwei Effekte, die für eine nur schwache Ausrichtung sorgen sollten. Zum einen ist durch die vollständige Acetylierung keine Ausbildung von H-Brücken mehr möglich, zum anderen besitzt das Molekül aufgrund der Säuregruppe, die als Carboxylat vorliegen sollte, eine negative Gesamtladung.

Das Verhalten von Molekül **10** deckt sich mit den bisher gefundenen Ursachen starker Orientierung und zeigt, wie deswegen zu erwarten, eine sehr schwache Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase.

C Atom	$ D_{\text{CH}}+J_{\text{CH}} $ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]
2	137 / 171	-14 / +28 od. -6 / +20
3	147	-11
6	117	-29
7	183	+34
8	132	-17
9	124	-26
9a	161	+9
CH_2Ester	-	-
CH_3Ester	125	-1

Tab. 13. $^1D_{\text{CH}}$ Werte für Molekül **8**. Die $^1J_{\text{CH}}$ Werte stammen aus ^{13}C Messungen in isotroper Phase.

→ Eine Modifikation auf der Unterseite des bicyclischen Systems hat, wie Molekül **8** zeigt, ebenfalls Einfluss auf die Stärke der Ausrichtung. Somit ist auch die, den H-Brücken abgewandte, Seite des Bicyklus von Bedeutung.

Molekül **9** zeigt eine enorm starke Orientierung, obwohl die enthaltenen hydrophoben Gruppen – Azid und Ethylester – keinen derartig starken Effekt erwarten liessen. Das Verhalten von Molekül **9** ist nicht ohne weiteres zu erklären.

Mit Molekül **10** wurde nochmals bestätigt, dass das H-Brückenmuster entscheidend für eine Wechselwirkung mit der Bicellenmembran ist, und dass auch die Gesamtladung des Moleküls eine Rolle spielt, wobei diese unabhängig von zugesetztem, geladenem Additiv (hier: CTAB) Auswirkungen hat.

3. Vergleich mit verschiedenen Sacchariden

3.1 Die Cryozucker Trehalose und Saccharose – Disaccharide mit membranschützender Wirkung

Es gibt eine Vielzahl an Zuckern, darunter auch Saccharose und besonders Trehalose, die eine Schutzfunktion für Zellmembranen gegenüber verschiedenen Stressbedingungen, wie z. B. Kälte, Hitze oder osmotischen Druck, besitzen.

In der Literatur wird meist die Untersuchung der Identifizierung von solchen schützenden Sacchariden oder ihre Produktion in Abhängigkeit der Stressfaktoren beschrieben.^{13a-c} Auf strukturelle Merkmale wurde insofern eingegangen, dass z. B. die Auswirkung der Stereochemie von OH Gruppen in Zuckern^{13d} oder die Wirksamkeit verschiedener Struktur motive in Glycoproteinen^{13e} untersucht wurden. Allerdings war bis vor kurzem nicht klar, auf welche Art und Weise dieser Schutz funktioniert. Erst in jüngerer Zeit wurde postuliert, dass es sich um keine direkte Wechselwirkung zwischen dem Saccharid und der Membran handelt, sondern dass die Grösse der Hydrathülle des Zuckers ausschlaggebend ist für einen effektiven Schutz gegen diverse Stressfaktoren.^{13f} Dies beruht allerdings auf der Untersuchung von Bulk-Grössen und gibt keinen Aufschluss über Bedingungen auf molekularer Ebene.

Inwiefern dieser Einfluss auf Membranen auch auf Bicellen, und somit auf den Grad der Ausrichtung, Auswirkung hat, soll im Folgenden durch Vergleich mit den hier untersuchten Thiazolidinlactamen überprüft werden.

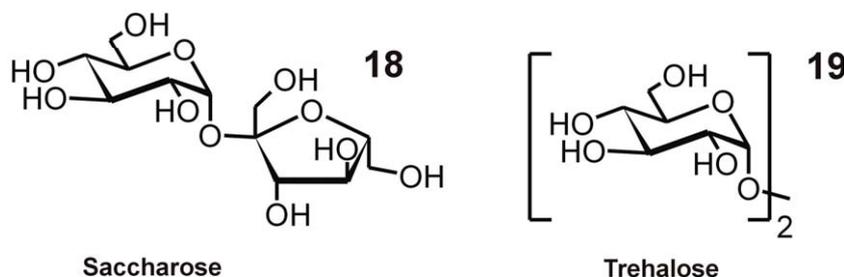


Abb. 43. Strukturen von Saccharose und Trehalose – den hier untersuchten Cryozuckern.

Moleküle **18** & **19**: $q = 2.7$, $c = 12.7\%$, 3% CTAB, 700 μL D_2O , $f = 0.4$ (jeweils)

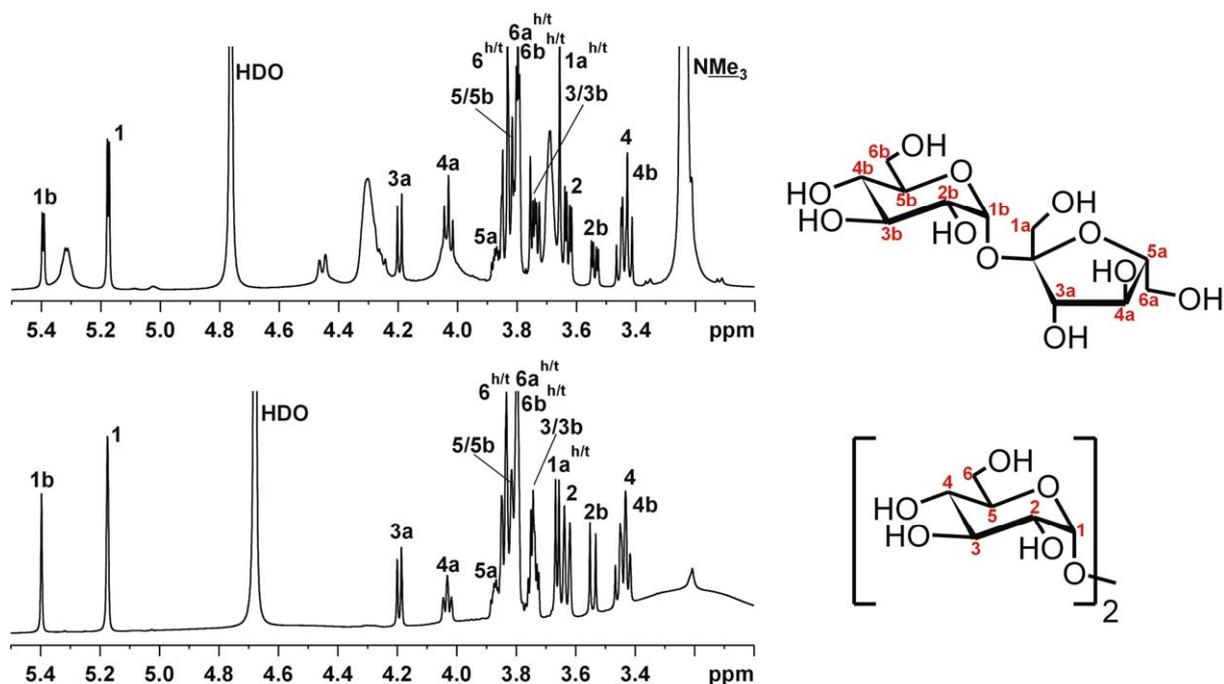


Abb. 44. ^1H Spektren von **18** und **19** gemeinsam in Bicellenlösung – oben bei 300 K, unten bei 308 K. Die homonuklearen HH-RDCs sind verschwindend klein.

18		19	
C Atom	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]	C Atom	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]
1a	+1	1	+3
3a	-5	2	0
4a	-5	3	-1
5a	-9	4	-3
6a	-3.5	5	-1
1b	+4	6	-0.5
2b	-1		
3b	+3		
4b	+3		
5b	-		
6b	-		

Tab. 14. $^1D_{\text{CH}}$ Werte für die Moleküle **18** und **19** in Bicellen. Die $^1J_{\text{CH}}$ Werte für **18** stammen aus der Literatur.^{8c}

→ Beide Moleküle zeigen im Vergleich zu allen (!) untersuchten bizyklischen Systemen eine nur sehr schwache Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase. Zwar ist die Gesamtmenge an Sacchariden (jeweils $f = 0.4$) relativ hoch, doch auch der Lipidgehalt mit 12.7% ist sehr hoch, so dass hier definitiv eine schwache Orientierung verglichen mit den Molekülen 1 – 17 besteht.

3.2 1,6- Anhydro- β -D-Glucose – ein Saccharid mit drei axialen OH Gruppen und Wasserstoffbrücken

Aufgrund der 1,6-Anhydro Form kann die β -D-Glucose **20** so in ihrer Ringkonformation eingefroren werden, dass drei axiale OH Gruppen – eine Situation, die normalerweise durch Umklappen des Sessels, um equatoriale Substituenten zu erhalten, vermieden wird – bestehen bleiben. Sie können laut Literatur die hier gezeigten, unterschiedlichen H-Brücken zueinander ausbilden.¹⁴

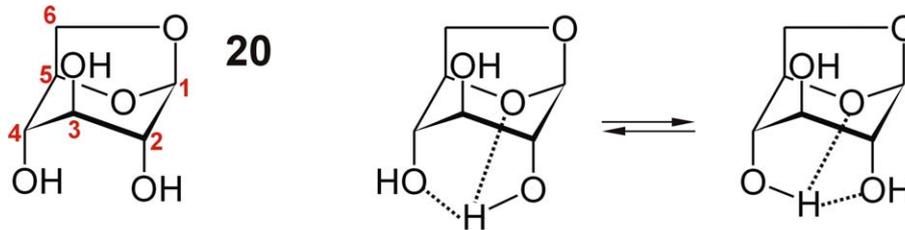


Abb. 45. Struktur von **20** mit Numerierung und die in der Literatur postulierten H-Brücken in DMSO_{d6} als gestrichelte Linien.

Da auch für die hier untersuchten Bizyklen die drei axialen OH Gruppen und die Orientierung der H-Brücken eine entscheidende Rolle spielen, soll geklärt werden, ob auch für **20** eine ähnlich starke Orientierung wie z. B. für **1** zu beobachten ist.

Molekül **20**: $q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.7$

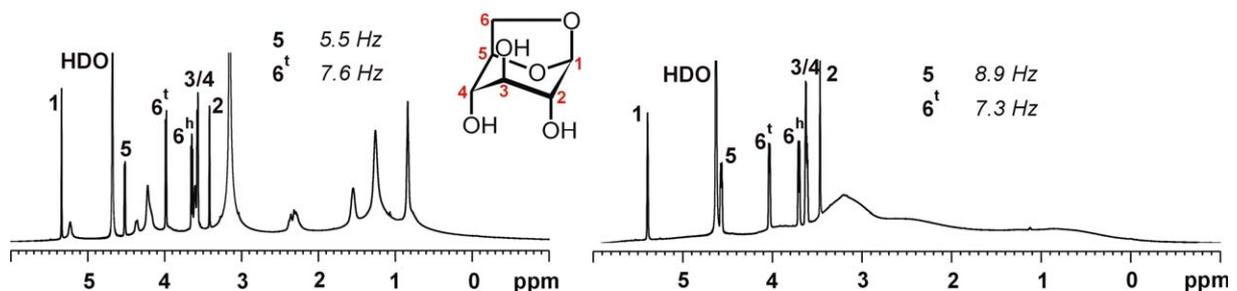


Abb. 46. ^1H Spektren von **20** bei 298 K (links) und 308 K (rechts). Für den isotropen Fall bei 298 K sind die J_{HH} Kopplungen für H5 und H6^t angegeben, für den anisotropen Fall der Betrag der Summe von $D_{\text{HH}}+J_{\text{HH}}$.

C Atom	$ D_{CH}+J_{CH} $ [Hz]	$^1D_{CH}$ [Hz]
1	164	-13
2	133	-15
3	175	+26
4	131	-16
5	147	-13
6	318 (x2)	+7 / +4

Tab. 15. $^1D_{CH}$ Werte für **20** in Bicellenlösung. Die Werte für $^1J_{CH}$ stammen aus 2D HMQC Daten von **20** in D_2O .

→ Obwohl **20** drei axiale OH Gruppen besitzt, die H-Brücken zueinander ausbilden, ist die Ausrichtung in Bicellenlösung nur gering. Sie entspricht in etwa dem zu erwartenden Grad an Ausrichtung für gängige Saccharide.

Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die für **20** postulierten H-Brücken sehr schwach ($\Delta\delta/\Delta T \sim -6.2$ ppb/K (in $DMSO_{d6}$)^{14b}; für **11** $\Delta\delta/\Delta T$ (OH9) = +0.7 ppb/K (in $DMSO_{d6}$)^{11d}) sind und evtl. daher trotz einer gegabelten Anordnung, wie sie auch für **1** in Lösung auftritt, keine starke Orientierung zu beobachten ist.

3.3 Titration von **1** mit Trehalose in Bicellen – Auswirkung auf den Orientierungsgrad von **1**

Obwohl **19** nur eine schwache Orientierung in Bicellen unter anisotropen Bedingungen zeigt, sollte der Effekt auf die Ausrichtung von **1** untersucht werden, um festzustellen, ob es zu einer Art „Verdrängungsreaktion“ kommt, wenn man davon ausgeht, dass die Bicellenoberfläche der Rezeptor und **1** der Ligand ist, wobei durch **19** jetzt ein weiterer (wenn auch sehr viel schwächerer) Ligand zugesetzt wird.

Ausgangssprobe: Vorlage von Molekül **1** in DMPC/DHPC-Lösung

$q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.55$ (**1**)

Zugabe von **19**: 1. + 0.25 eq ($\rightarrow f = 0.14$ (**19**))

2. + 0.51 eq ($\rightarrow f = 0.28$ (**19**))

3. + 0.98 eq ($\rightarrow f = 0.54$ (**19**))

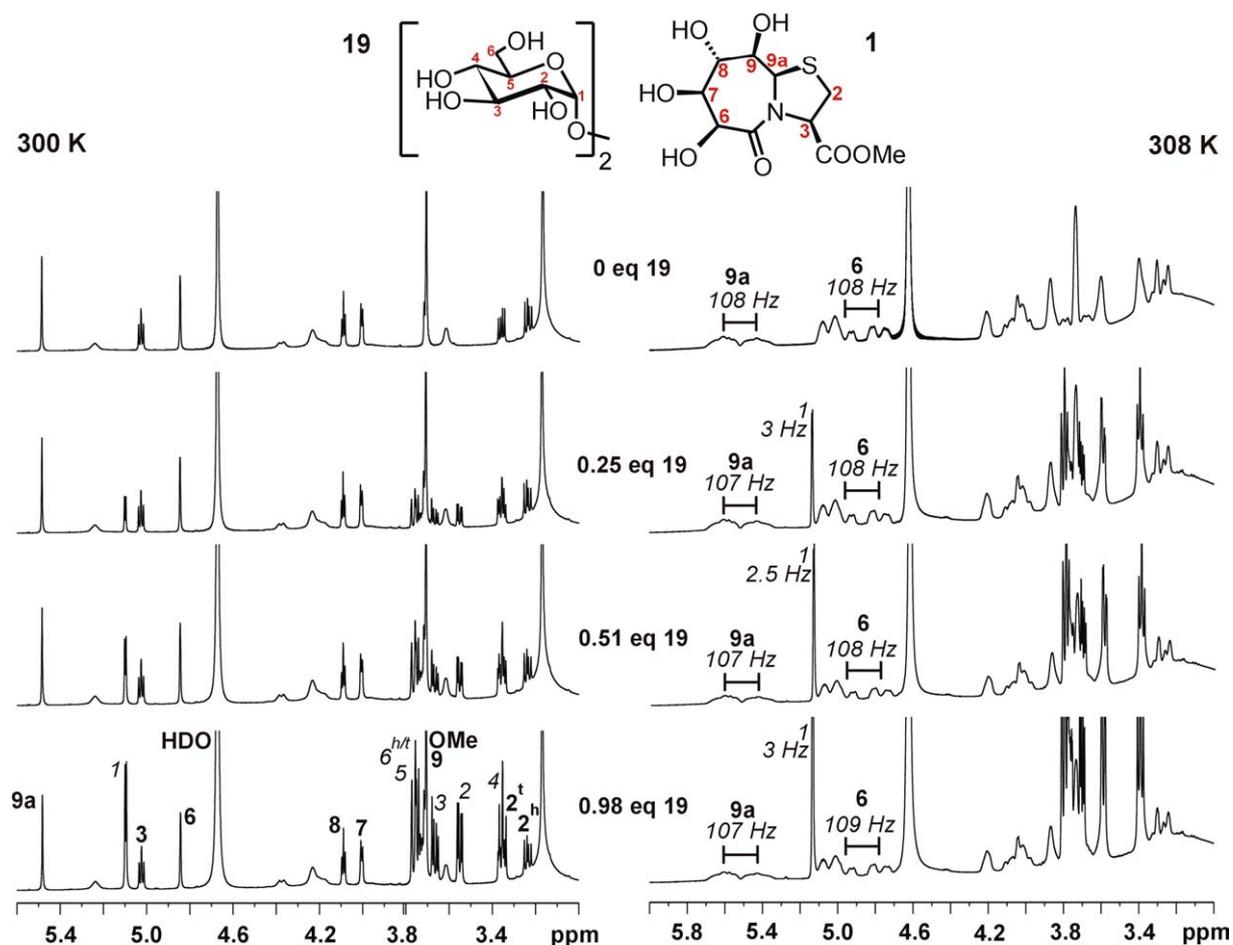


Abb. 47. ^1H Spektren der Titration von **1** in Bicellen mit **19**. Links in isotroper Lösung bei 300 K, rechts in anisotroper bei 308 K. Die angegebenen Kopplungen entsprechen dem Betrag der Summe von $D_{\text{HH}} + J_{\text{HH}}$, wobei dies für H9a und H6 des Bicyklus **1** identisch ist mit dem Betrag von D_{HH} . Die Zuordnung für **19** ist *kursiv*, die für **1** **fett** wiedergegeben.

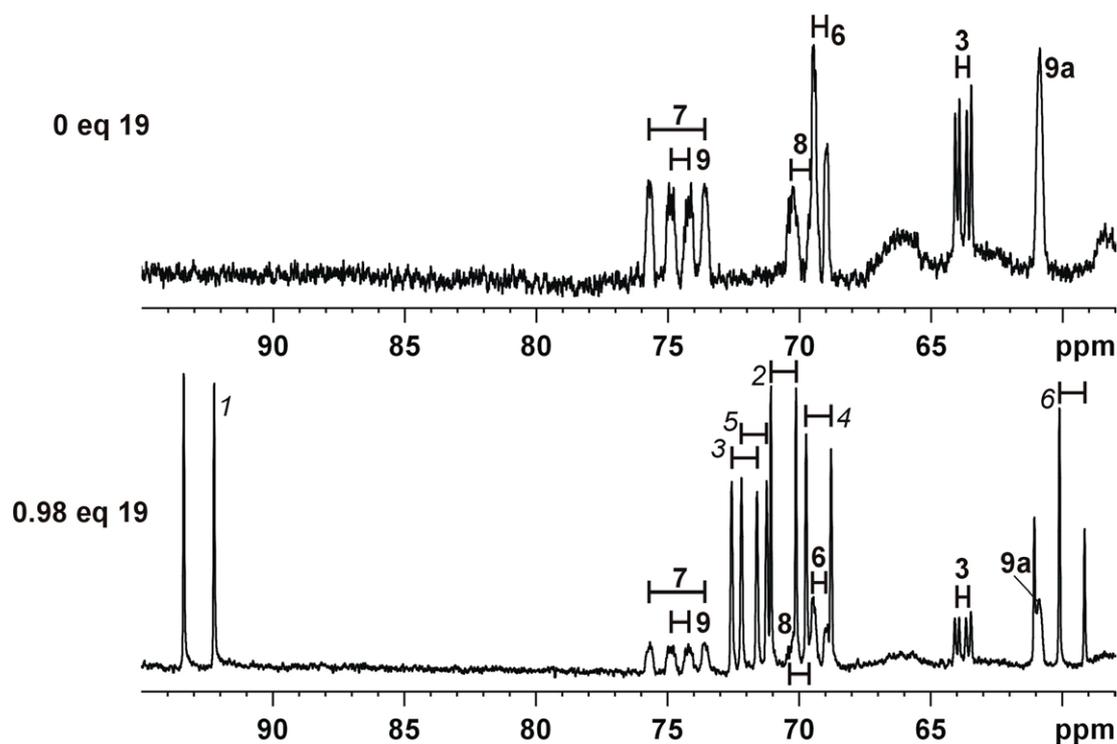


Abb. 48. ^{13}C gated Spektren von **1** ohne **19** bei 308 K (oben) und mit 0.98 eq **19** bei 308 K (unten) in Bicellen.

C Atom	Ohne 19		+ 0.98 eq 19	
	$ D_{\text{CH}}+J_{\text{CH}} $ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]	$ D_{\text{CH}}+J_{\text{CH}} $ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]
2	67 / 285	-81 / +137	70 / 285	-78 / +137
3	66	-84	65	-85
6	~ 65	-79	~ 74	-70
7	318	+170	319	+171
8	~ 105	-41	-	-
9	99	-49	103	-45
9a	~ 20	-133	-	-
OMe	192	+42	193	+43

Tab. 16. Dipolare Kopplungen von **1** mit und ohne Zusatz eines schwach ausrichtenden Saccharids.

C Atom	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz] + 1 eq 18	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz] + 1.02 eq 1
1	+3	-1
2	0	-1
3	-1	0
4	-3	-2
5	-1	-1
6	-0.5	-1

Tab. 17. $^1D_{\text{CH}}$ Werte für **19** im Vergleich in Bicellenlösung mit **18** bzw. **1**.

Weder für **1** noch für **19** ergeben sich signifikante Unterschiede in ihren Kopplungswerten. D. h. für **1** ist es unwichtig, ob sich andere, nur schwach ausrichtende Moleküle, in derselben Lösung befinden. Der Grad der Ausrichtung von **1** wird durch **19** weder gestört noch vermindert.

Für **19** ist es ebenfalls unbedeutend, welches andere Molekül neben ihm in derselben Lösung vorliegt. Auch hier ist die Ausrichtung von **19** unabhängig von vorhandenen Cosubstanzen.

Eigentlich wäre eine Titration ähnlich einer Verdrängungsreaktion zwischen verschiedenen stark bindenden Liganden (z. B. Moleküle **1** und **4**) eine sehr sinnvolle Messung, doch leider sind die chemischen Verschiebungen der ^{13}C Signale der meisten, hier untersuchten, Bicyklen so ähnlich, dass bei Vorliegen in gemeinsamer Lösung keine eindeutige Zuordnung und somit keine Extraktion der RDC Werte mehr möglich ist.

4. Modifikation der Bicellenoberfläche – Dotierung mit langkettigen Alkylglycosiden

Durch Ersetzen eines gewissen Anteils DMPC durch ein langkettiges Alkylglycosid kann der planare Bereich von Bicellen – der ja von DMPC Molekülen gebildet wird – in flüssig-kristalliner Phase durch Saccharide, ähnlich den Kopfgruppen von Blutgruppenantigenen, modifiziert werden.¹⁵

Diese Alkylglycoside lagern sich – bei optimal gewähltem Anteil – in die Membran analog zu DMPC ein, ohne die Ausbildung der flüssig-kristallinen Phase zu stören. Dies lässt sich z. B. daran erkennen, dass in anisotroper Lösung keine Signale für die Protonen der Saccharideinheit mehr detektierbar sind.

Hier wurde für die Dotierung n-Dodecyl- β -D-maltosid gewählt, da mit einem Disaccharid die Zuckereinheit etwas weiter aus der Bicellenoberfläche ragen sollte, als für ein Monosaccharid der Fall.

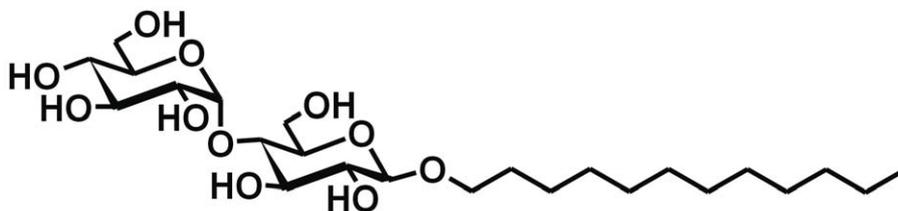


Abb. 49. Das für die Dotierung der Bicellen verwendete n-Dodecyl- β -D-maltosid.

Verschiedene molare Verhältnisse von DMPC zu Dodecylmaltosid ergaben schließlich, dass die flüssig-kristalline Phase dann am stabilsten ist, wenn dieses Verhältnis ca. 6:1 beträgt.

Für die Untersuchung der Ausrichtung von **1** in dotierten Bicellen wurde folgende Probenzusammensetzung gewählt:

Berechnung der Parameter ohne Berücksichtigung von Dodecylmaltosid:

$q = 2.8$, $c = 5\%$, 4% CTAB, 700 μL Puffer

Zugabe von 3.99 mg Dodecylmaltosid resultierte in:

$q = 3.25$, $c = 5.5\%$, 4% CTAB, 700 μL Puffer, $n(\text{Dodecylmaltosid})/n(\text{DMPC}) = 0.16$

Diese Probe zeigte eine stabile, flüssig-kristalline Phase in einem Temperaturbereich von 308 bis 324 K.

Ihr wurde schliesslich **1** zugesetzt, so dass der f-Wert – bezogen auf DMPC – 0.78 betrug. Dieser ist bereits um den Anteil an enthaltenem Epimer **17** (ca. 5%) korrigiert. Berücksichtigt man auch die zugegebene Menge an Dodecyl-maltosid so liegt der f-Wert bei 0.67.

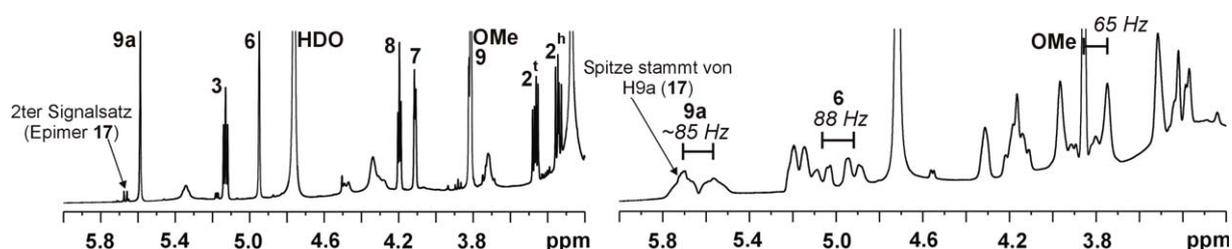


Abb. 50. ^1H Spektren von **1** in mit Dodecylmaltosid dotierten Bicellen bei 300 K (links) und bei 308 K (rechts).

C Atom	$ D_{\text{CH}}+J_{\text{CH}} $ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]
2	94 / 256	-54 / +108
3	87	-63
6	99	-45
7	~ 298	~ +150
8	145	-1
9	~ 120	~ -28
9a	46	-107
OMe	181	+31

Tab. 18. $^1D_{\text{CH}}$ Werte für **1** in, mit Dodecylmaltosid dotierten, Bicellen. Die verwendeten $^1J_{\text{CH}}$ Werte stammen aus einer normalen, isotropen Bicellenlösung.

→ Die Dotierung der planaren Bicellenanteile mit einem Maltosid führt zu keiner Verringerung der Orientierung von **1** in flüssig-kristalliner Phase.

D. h. die spezifische Wechselwirkung zwischen **1** und der Membranoberfläche wird dadurch nicht gestört. Allerdings beträgt der Anteil an Saccharidderivatisiertem, langkettigem Membranbaustein nur ca. 1/6.

5. Ausrichtung verschiedener Bizyklen in einem weiteren, flüssig-kristallinen Medium

Um herauszufinden, ob die ungewöhnlich starke Ausrichtung mancher untersuchter Thiazolidinlactame wirklich etwas mit der Struktur der Bicellen zu tun hat, wurde als weitere flüssig-kristalline Phase die sog. Otting Phase – eine Mischung aus Polyethylenglykol, Alkohol und Wasser – verwendet.⁷

Entscheidend ist hierbei, dass sie nicht aus PC Bilayern aufgebaut ist, sondern dass es sich vielmehr um eine lamellenartige Struktur gestapelter Schichten handelt. Zudem ist die Phase einfach und preisgünstig herzustellen und die in ihr ermittelten RDCs lassen sich gut mit RDCs in Bicellen vergleichen, wie Literaturbeispiele zeigen.⁷

Hier wurde eine Mischung aus Pentaethylenglykolmonododecylether (C12E5), n-Hexanol und D₂O verwendet.

Ebenso wie es für Bicellen charakteristische, experimentelle Parameter (q, c usw.) gibt, sind für die Otting Phase folgende Parameter von Bedeutung:

- Gewichtsprozent an C12E5 in Bezug auf den Gesamtgehalt an D₂O (% wt)
- Das molare Verhältnis r von C12E5 zu n-Hexanol

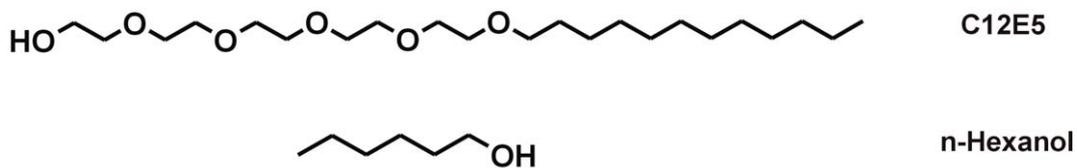


Abb. 51. Chemische Strukturen der Komponenten, die hier für die Herstellung der Otting Phase verwendet wurden. Weitere mögliche Komponenten sind: n-Octanol, C12E6 oder Glucopon.

Aufgrund des Fehlens von (Teil-)Ladungen in der flüssig-kristallinen Phase, beruht die Ausrichtung in ihr gelöster Stoffe ausschliesslich auf der Molekülgestalt, wohingegen bei Bicellen durchaus die Ladungsverteilung der Kopfgruppe und die damit verbundenen, elektrostatischen Wechselwirkungen berücksichtigt werden müssen.

Der Temperaturbereich, in dem der Phasenübergang zur flüssig-kristallinen Phase stattfindet, liegt etwas niedriger als im Falle der DMPC/DHPC-Bicellen. Isotrope Otting Phasen können bei Temperaturen unter 20 °C vermessen werden; die Stabilität der anisotropen Phase erstreckt sich über einen relativ grossen Temperaturbereich zwischen ca. 25 bis 40 °C.

Untersucht wurden exemplarisch drei, sich in Bicellen unterschiedlich stark ausrichtende, Bizeyklen.

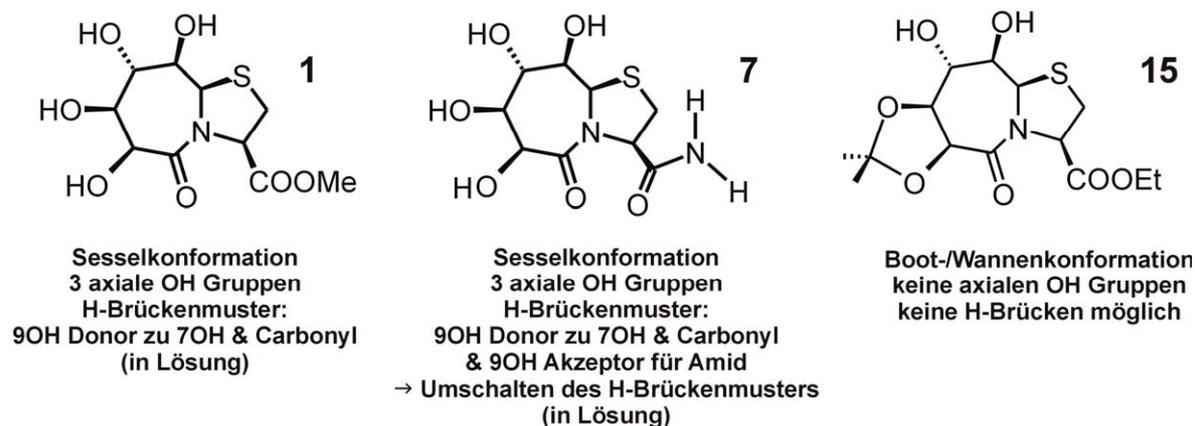


Abb. 52. Strukturen und kurze Charakterisierung der, in Otting Phase vermessenen, bicyclischen Systeme.

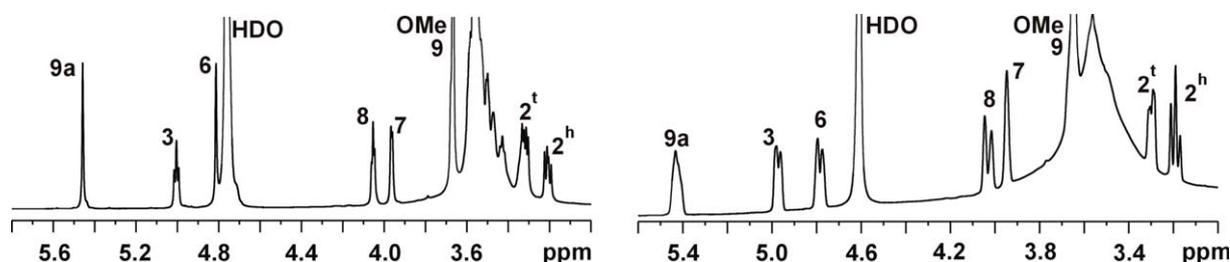


Abb. 53. ^1H Spektren von **1** in C12E5/n-Hexanol/ D_2O . Links in isotroper Phase bei 288 K (4.9% wt, $r = 0.99$, 700 μL D_2O , 40 mM **1**) und rechts in anisotroper Phase bei 300 K (5% wt, $r = 0.86$, 725 μL D_2O , 71 mM **1**).

C Atom	$ D_{\text{CH}}+J_{\text{CH}} $ [Hz]	$^1J_{\text{CH}}$ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz] in Bicellen
2	293 (x2)	296 (x2)	-1.5	-81 / +142
3	132	151	-19	-86
6	147	144	+3	-73
7	166	148	+18	+181
8	134	146	-12	-45
9	151	148	+3	-50
9a	133	153	-20	-
OMe	453 (x3)	150	+1	+43

Tab. 19. $^1D_{\text{CH}}$ Werte für **1** in Otting Phase (5% wt, $r = 0.86$, 725 μL D_2O , 71 mM **1**). Die $^1J_{\text{CH}}$ Werte stammen aus Messungen in isotroper Bicellenlösung. Zum Vergleich die $^1D_{\text{CH}}$ Werte in Bicellen ($q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 3% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.28$).

→ Das Grundmolekül **1** erfährt somit in der Otting Phase nur eine schwache Ausrichtung, wie sie eigentlich auch für Bicellen zu erwarten gewesen wäre. Dies bestätigt die Annahme, dass es sich bei den Wechselwirkungen zwischen Bicellenoberfläche und **1** um spezifische Wechselwirkungen handelt, die nicht durch Hydrophobizitätseffekte bedingt sind.

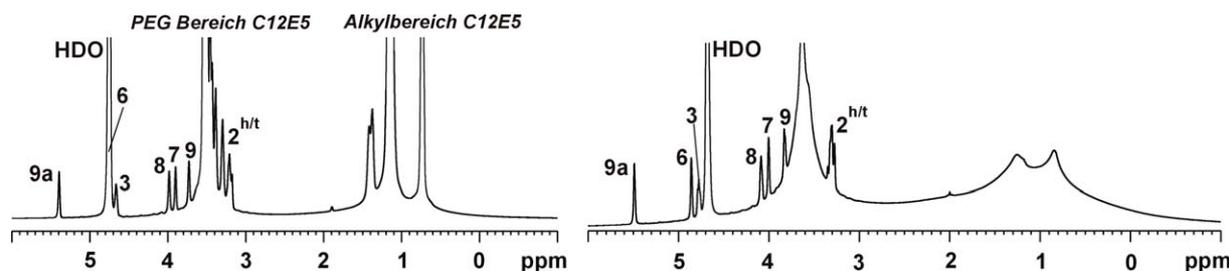


Abb. 54. ^1H Spektren von **7** in Otting Phase (5.1% wt, $r = 0.89$, 700 μL D_2O , 67 mM **7**) bei 285 K (links) und 300 K (rechts).

C Atom	$ D_{\text{CH}}+J_{\text{CH}} $ [Hz]	$^1J_{\text{CH}}$ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz]	$^1D_{\text{CH}}$ [Hz] in Bicellen
2	142	148	-6	-38 / +8
3	147	152	-5	-26
6	156	147	+9	+37
7	140	145	-5	+18
8	143	147	-4	-8
9	155	148	+7	-6
9a	147	152	-5	-35

Tab. 20. $^1D_{\text{CH}}$ Werte für **7** in Otting Phase und in Bicellen ($q = 3.0$, $c = 5.0\%$, 4.4% CTAB, 700 μL Puffer, $f = 0.63$) zum Vergleich. Die $^1J_{\text{CH}}$ Werte für die Otting Phase stammen aus Messungen in isotroper Otting Phase bei 285 K.

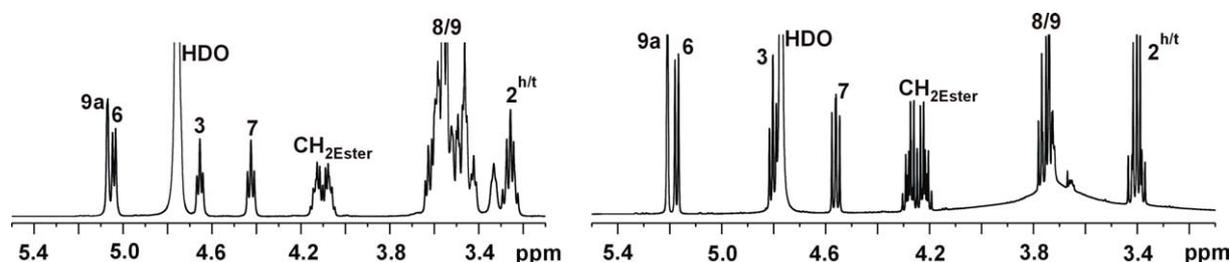


Abb. 55. ^1H Spektren von **15** in Otting Phase (4.8% wt, $r = 0.97$, 700 μL D_2O , 34 mM **15**). Links in isotroper Phase bei 288 K, rechts in anisotroper bei 300 K.

C Atom	$ D_{CH}+J_{CH} $ [Hz]	$^1J_{CH}$ [Hz]	$^1D_{CH}$ [Hz]	$^1D_{CH}$ [Hz] in Bicellen
2	300 (x2)	296 (x2)	+2	+4
3	145	152	-7	+15
6	148	152	-4	-8
7	156	153	+3	-6
8	151	147	+4	-6
9	150	147	+3	-2
9a	148	149	-1	+14
CH ₂ Ester	295 (x2)	300 (x2)	-2.5	+4.5
CH ₃ Ester	376 (x3)	128	-3	0
Me	384 (x3)	128	0	+2 / +3

Tab. 21. $^1D_{CH}$ Werte für **15** in Otting Phase und zum Vergleich in Bicellen ($q = 2.5$, $c = 5.9\%$, ohne CTAB, $700 \mu\text{L D}_2\text{O}$, $f = 0.94$). Die $^1J_{CH}$ Werte für die Berechnungen in der Otting Phase stammen aus isotropen Bicellenmessungen.

→ Alle drei untersuchten Bizyklen zeigen in Otting Phase im Vergleich zu Bicellen eine verminderte Ausrichtung, wobei dieser Effekt für **1** besonders stark ist. Die Moleküle **7** und **15** zeigen eine nur geringfügig schwächere Orientierung als in Bicellen.

Dies deutet daraufhin, dass **1** eine spezifische Wechselwirkung mit der Oberfläche der Bicellen eingeht und so eine besonders starke Orientierung erfährt.

6. Wechselwirkungen zwischen **1** und DMPC

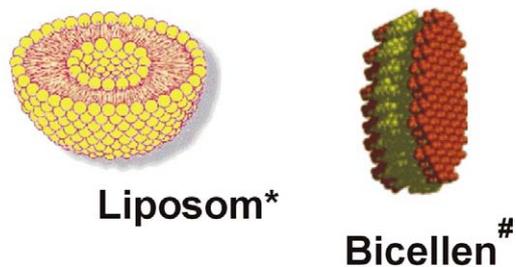
Um beurteilen zu können, ob die Form der Bicellen – also eine planare DMPC Bilayerschicht mit DHPC an den Rändern – entscheidend ist für die auftretenden, spezifischen Wechselwirkungen zwischen **1** und Bicellen, wurde der Einfluss von **1** auf DMPC in verschiedenen Aggregationszuständen untersucht.

6.1 DMPC Liposomen in D₂O

Mit Hilfe eines Ultraschall-desintegrators kann das, ansonsten in Wasser unlösliche, DMPC in Form von Liposomen in D₂O in Lösung gebracht werden. Liposomen besitzen ebenfalls eine Lipidbilayerschicht, die jedoch aufgrund der Kugelform der Liposomen stark gekrümmt ist.

Zu einer Liposomenlösung in D₂O (5 mg/mL) wird schrittweise **1** zugegeben und die Änderung der chemischen Verschiebungen $\Delta\delta_H$ beobachtet.

Die Identifizierung und Zuordnung der DMPC Signale erfolgte über 2D NMR Messungen (in CDCl₃) und durch Vergleich mit der Literatur.¹⁶



* saints.css.edu/bio/schroeder/cell_membrane.html

<http://tesla.ccrcc.uga.edu/research/index.html>

Abb. 56. Schematische Darstellung eines Liposoms und einer Bicelle.

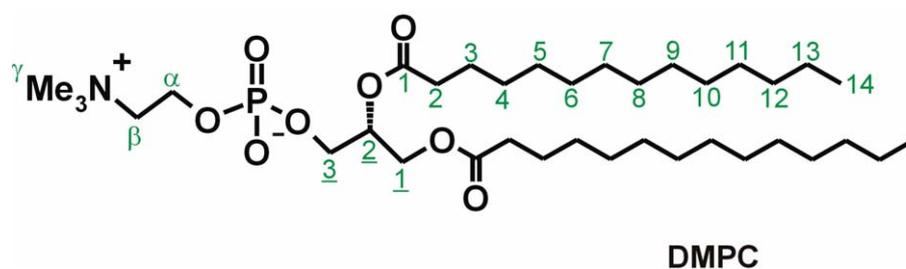
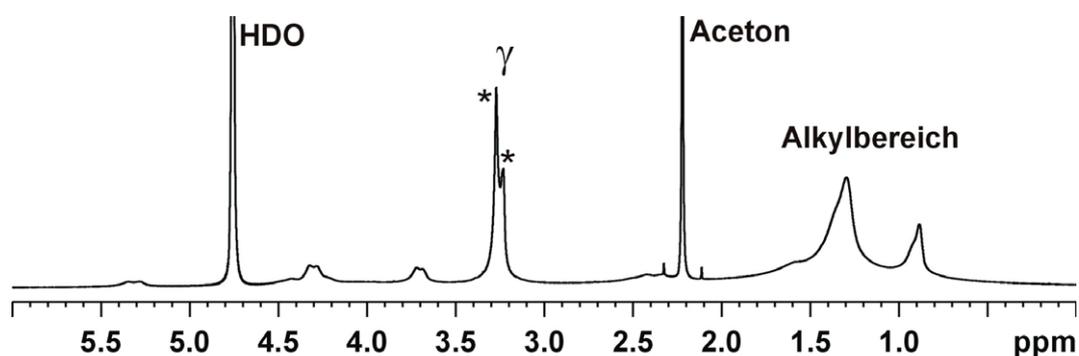


Abb. 57. DMPC Struktur mit der zur Literatur analogen Numerierung.



* 2 Signale für γ (NMe_3) - für Kopfgruppe auf der Aussen- und der Innenseite der Liposomenbilayer

Abb. 58. ^1H Spektrum von DMPC Liposomen (5 mg/mL D_2O) bei 300 K (600 MHz). Etwas Aceton-dampf wurde zur Eichung zugesetzt.

Die Zugabe von **1** führt zu keiner sichtbaren Veränderung der chemischen Verschiebungen δ_{H} der DMPC Signale. Auch die Signale von **1** bleiben im Verlauf der Titration unverändert.

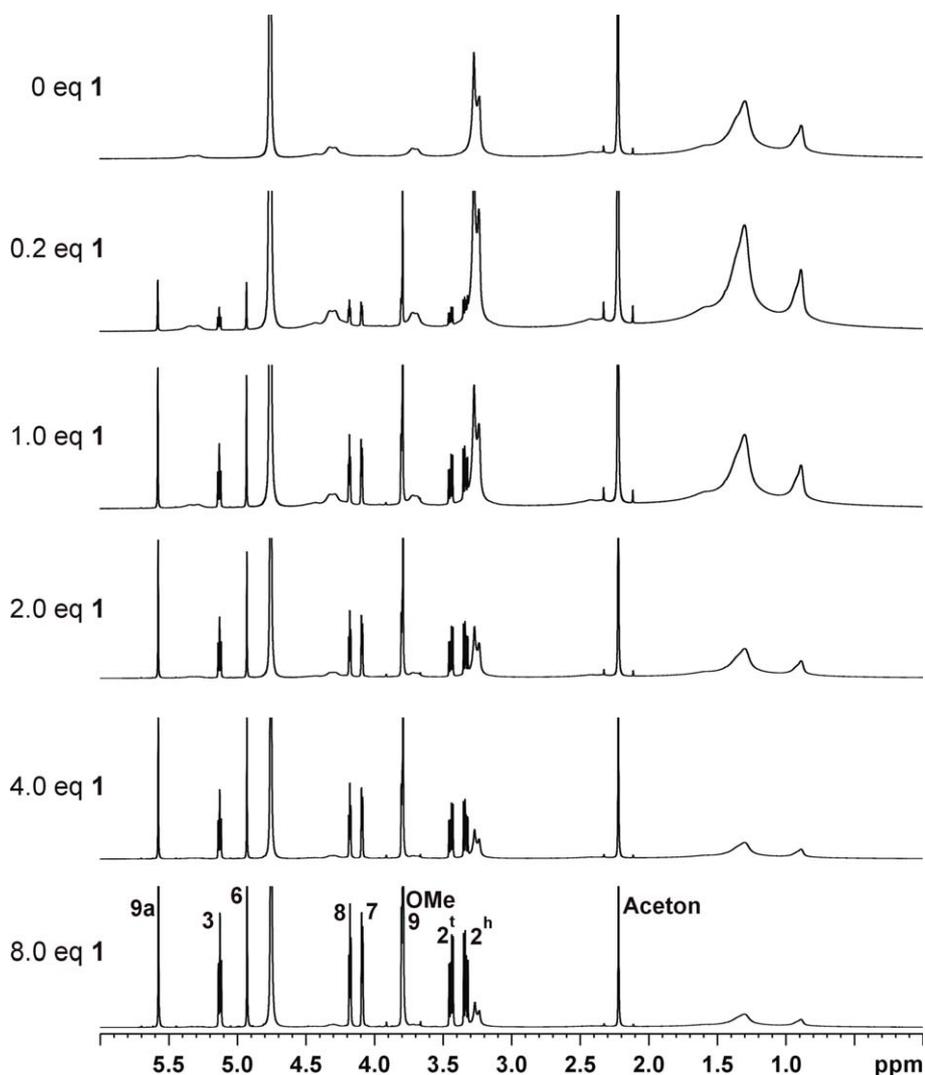


Abb. 59. ^1H Spektren der Titration von DMPC Liposomen in D_2O (5 mg/mL) mit **1** (300 K, 600 MHz). Acetondampf wurde zur Eichung zugesetzt.

→ Dieses Ergebnis lässt zwei mögliche Schlussfolgerungen zu:

- die Wechselwirkung zwischen **1** und DMPC als Liposomen in D_2O ist so schwach, dass dies zu keinen Änderungen in den chemischen Verschiebungen führt.
- es treten keine Wechselwirkungen zwischen **1** und DMPC Liposomen in D_2O auf. Dies würde bedeuten, dass in Bicellen die Planarität der DMPC-Bereiche ausschlaggebend ist.

6.2 DMPC in CDCl_3 – Titration mit **1**

DMPC löst sich sehr gut in unpolaren LMs wie Chloroform, wohingegen die polaren Thiazolidinlactame in unpolaren LMs nahezu unlöslich sind.

Im Folgenden soll **1** – als Feststoff zugegeben – mit Hilfe von DMPC in CDCl_3 in Lösung gebracht werden.

Es zeigt sich, dass **1** tatsächlich unter diesen Bedingungen in CDCl_3 gelöst werden kann, wenn auch nur in geringem Masse.

Zudem zeigt sich ein schwacher Effekt bei den chemischen Verschiebungen δ_H von DMPC und **1** in Abhängigkeit von der gelösten Menge an **1**.

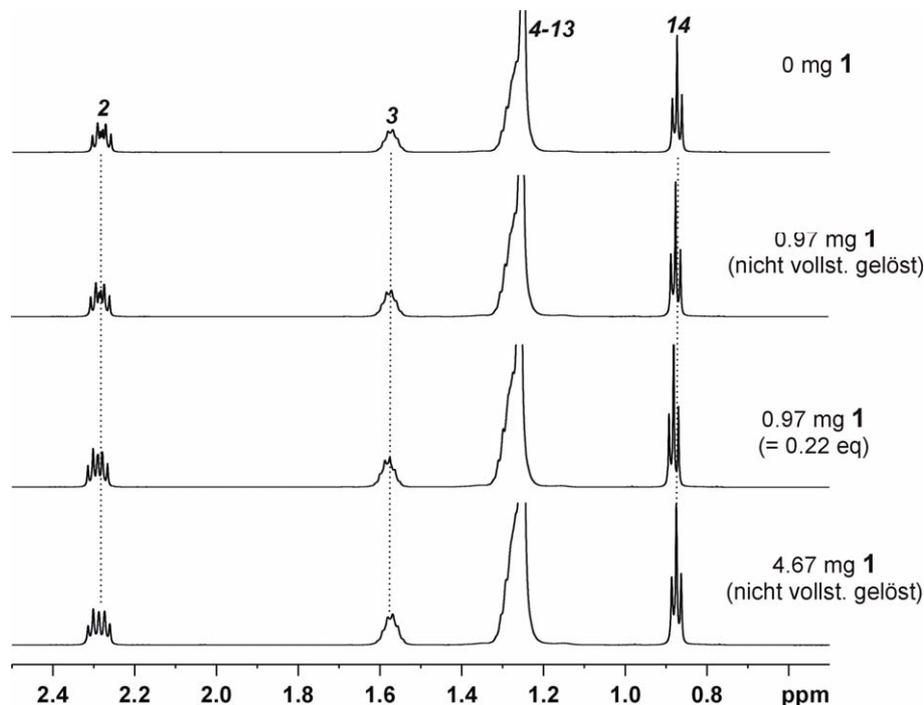


Abb. 60. Ausschnitt des Alkylbereichs von DMPC. ^1H Spektren bei Titration mit **1** (10.1 mg DMPC, 700 μL CDCl_3 , 300 K). Die Auswirkungen auf den Alkylbereich von DMPC sind minimal.

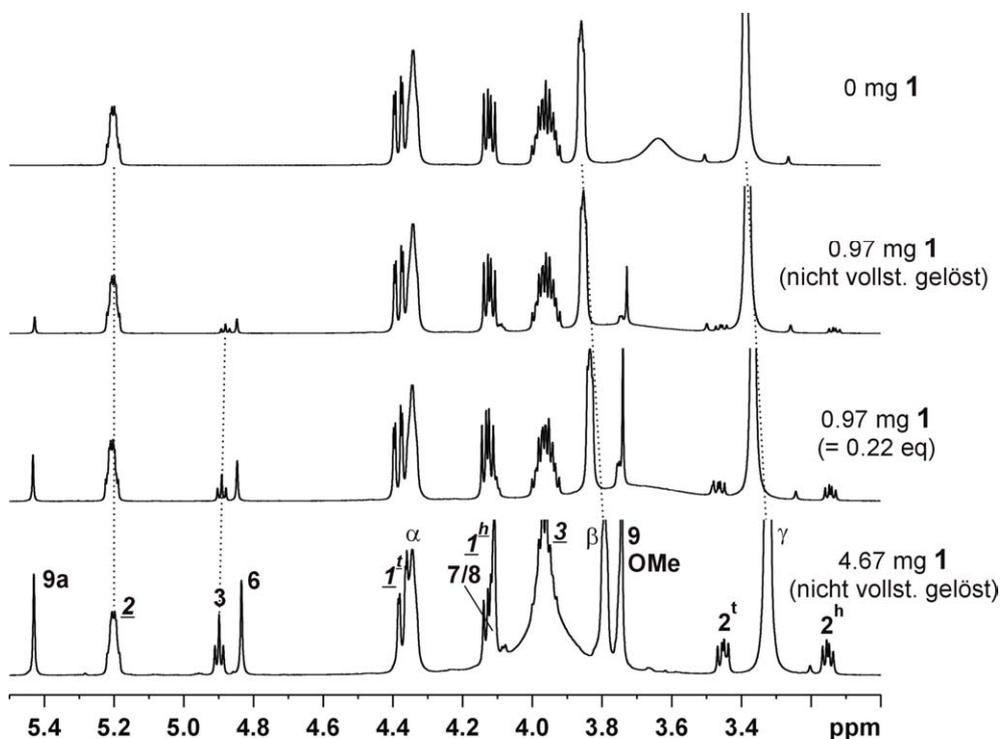


Abb. 61. ^1H Spektren des Bereichs der DMPC-Kopfgruppe und der Bicyklussignale. Hier sind Änderungen der chemischen Verschiebungen einiger Signale im Verlauf der Titration zu beobachten.

Atom	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]		
	0.97 mg 1 (nicht vollst. gelöst)	0.97 mg 1 (= 0.22 eq)	4.67 mg 1 (nicht vollst. gelöst)
14	0	0.3	0.4
13-4	0	0.5	0.3
3	0	0	0.8
2	0 / 0.5	0.6 / 2.3	0.8 / 5.1
α	0	2.5	2.8
γ	3.8	16.6	37.2
β	3.8	18.6	41.4
<u>3</u>	0.6	3.4	1.5
<u>2</u>	0	1.3	0.5
<u>1^h</u>	0	0.5	0.5
<u>1^t</u>	0.8	3.4	6.3

Tab. 22. Differenzen der ^1H Verschiebungen der DMPC Signale im Laufe der Titration mit **1**. Als Nullwert dient die Verschiebung vor Zugabe von **1**.

Atom	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]	
	0.97 mg 1 (= 0.22 eq)	4.67 mg 1 (nicht vollst. gelöst)
2 ^t	3.1	9.4
2 ^h	0	1.5
3	3.1	9.7
6	3.5	7.1
7 / 8	-	-
OMe / 9	3.1 / 1.0	8.0 / 1.8
9a	1.0	2.5

Tab. 23. Differenzen der ^1H Verschiebungen des Bizyklus **1** im Rahmen der Titration in DMPC/ CDCl_3 . Als Nullwert dient der erste Zugabeschritt der Titration.

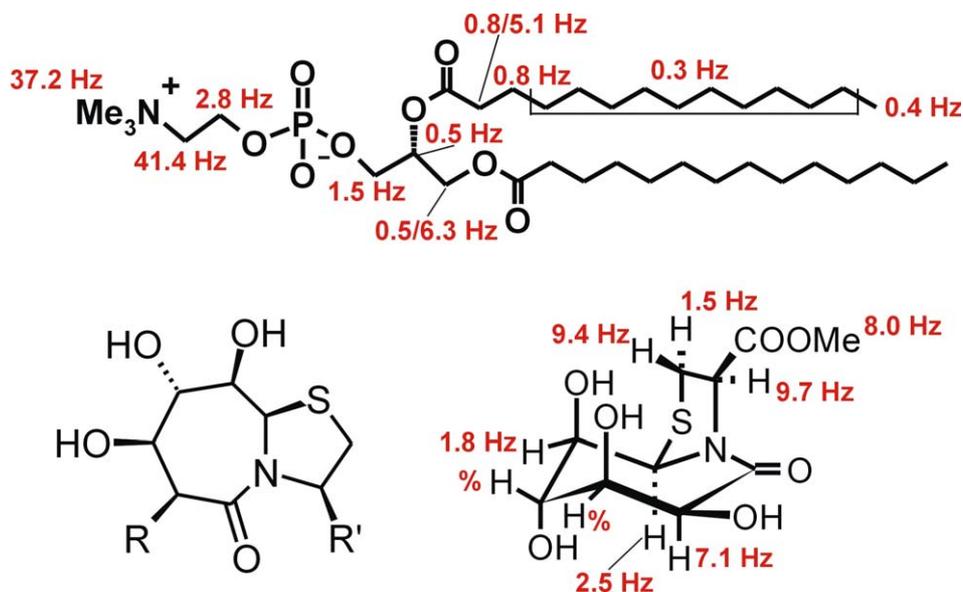


Abb. 62. DMPC und **1** mit Angabe der maximalen ^1H Verschiebungen in Hz. Die Zuordnung von $\text{H}2^{\text{h}}$ und $\text{H}2^{\text{t}}$ des Bicyklus erfolgte über 2D NOESY Daten.

→ Die stärksten Änderungen in der chemischen Verschiebung erfährt im DMPC Molekül der oberste Teil der Phosphocholinkopfgruppe (β und γ), wobei bereits die nächste CH_2 -Gruppe (α) eine nur noch schwache Änderung zeigt.

Im Bicyklus **1** zeigt der Bereich der Estergruppe – also der hydrophobste Teil des Moleküls – die stärksten Änderungen in der chemischen Verschiebung (H3, COOMe). Allerdings zeigen auch das nach oben orientierte H2 ($\text{H}2^{\text{t}}$) und das nach unten orientierte H6 grössere Änderungen in ihrer chemischen Verschiebung.

6.2.1 2D NOESY Spektren – Identifizierung der wechselwirkenden Gruppen

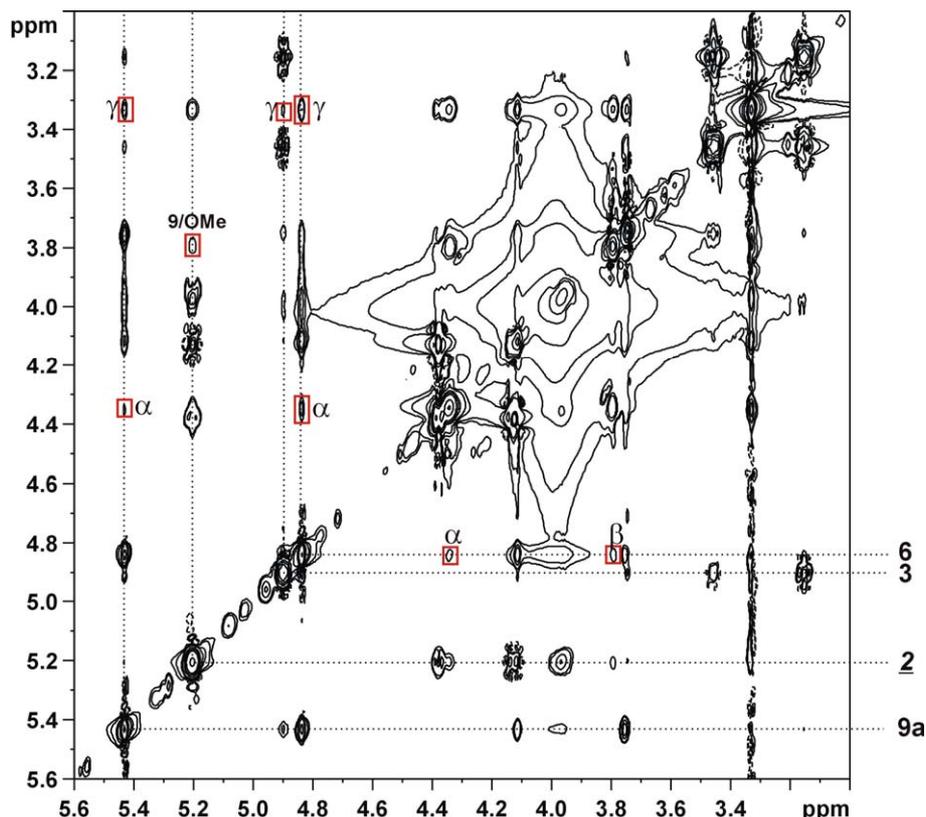


Abb. 63. 2D NOESY Spektrum von DMPC in CDCl_3 bei Zusatz von 4.67 mg **1** (nicht vollständig gelöst). In rot die intermolekularen NOEs ($t_m = 200$ ms, 300 K, 600 MHz).

Alle NOE Kreuzsignale – auch die des Bicyklus **1** – sind positiv (= negativer NOE), was typisch für Moleküle mit einer hohen molekularen Masse ist. D. h., dass sich der Bicyklus **1** nicht frei in Lösung befindet, sondern die Wechselwirkung mit DMPC Aggregaten in CDCl_3 so stark ist, dass er als ein Teil dieser Aggregate betrachtet werden kann.

Die auftretenden intermolekularen NOEs sind zwischen den Kopfgruppenprotonen $\alpha/\beta/\gamma$ und den Protonen H6, H3 und H9a. Die beiden ersteren hatten schon bei der chemischen Verschiebung eine deutliche Beteiligung gezeigt; H9a hatte im Rahmen der Titration allerdings eine nur sehr geringe Änderung seiner chemischen Verschiebung. Weiterhin tritt ein NOE Kreuzsignal zwischen **2** des DMPC und H9 bzw. OMe des Bicyklus auf.

→ Die Beteiligung der DMPC Kopfgruppe bei der Wechselwirkung mit **1** (in CDCl_3) konnte eindeutig gezeigt werden. Unklar ist allerdings weiterhin, welcher Teil des Moleküls **1** an der Wechselwirkung beteiligt ist. Die Änderung der chemischen Verschiebung während der Titration deutet auf den hydrophoberen Teil des Bicyklus, im Bereich der Estergruppe, hin. Die intermolekularen NOEs lassen eher den Schluss zu, dass die Unterseite des Bicyklus mit H3, H6 und H9a an der Wechselwirkung (stärker) beteiligt ist.

7. Weitere NMR Methoden zur Untersuchung von Wechselwirkungen

Wie in Kapitel 1.6 bereits beschrieben, gibt es NMR Messmethoden, die auch bei schwachen Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen eine Untersuchung (und teilweise Quantifizierung) dieser Wechselwirkungen gestatten.

Da die Affinität von Bizyklen zur Bicellenmembran mit Sicherheit sehr schwach ist – eine Titration von DMPC Liposomen mit **1** in D₂O zeigte keinerlei Auswirkungen (Kapitel 6.1) – wurden der Sättigungstransfer (STD) und die Diffusionsmessungen (DOSY) als geeignete NMR Methoden betrachtet, um die Wechselwirkung zusätzlich zu den RDCs zu charakterisieren.

7.1 Sättigungstransfermessungen – STD

Wie schon in 1.6 beschrieben, kann durch Sättigung von Frequenzen des Rezeptors eine teilweise Übertragung auf einen (schwach) gebundenen Liganden erreicht werden. Da die Einstrahlfrequenz mindestens ca. 1 ppm vom nächsten Ligandensignal entfernt sein muss, um keinen Sättigungstransfer von Ligand zu Ligand zu verursachen, kann im Falle der Bizyklen in Bicellenlösung nur auf den Alkylbereich der Bicellen bei ca. 1 ppm eingestrahlt werden, da sich im Bereich der NMe₃-Kopfgruppe Signale der Bizyklen befinden.

Die beiden verwendeten Pulsprogramme unterscheiden sich nur durch einen zusätzlichen T1 ρ Filter (er unterdrückt die breiten Resonanzlinien des Proteins bzw. des Rezeptors).¹⁷ Die Ergebnisse sind ohne weiteres vergleichbar.

Die Details zu den verwendeten Messparametern finden sich im experimentellen Teil.

Zwar wurde nicht für alle Verbindungen eine STD Messung durchgeführt, doch lässt sich auch anhand der ausgewählten Bizyklen der Zusammenhang von starker Orientierung in Bicellen und Effekt im STD erklären.

7.1.1 STD von **1** und weiterer, sich stark ausrichtender Bizyklen

Anhand der Ergebnisse von Kapitel 2 lassen sich zur Gruppe der stark oder mittelstark ausrichtenden Bizyklen folgende Derivate zählen:

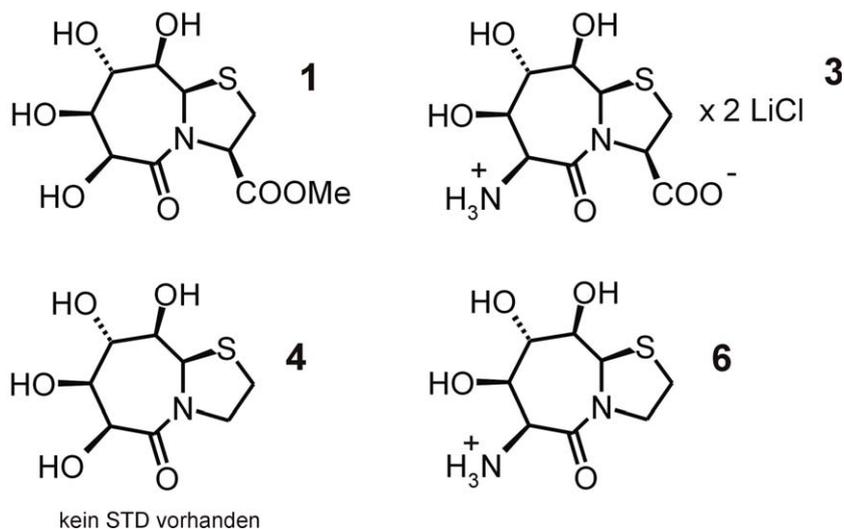


Abb. 64. Strukturen der stark und mittelstark ausrichtenden Bicyklen. Für **4** wurde kein STD Spektrum aufgenommen. Molekül **5** wird hier nicht berücksichtigt, da es aufgrund der erhöhten Hydrophobizität zusätzliche Wechselwirkungen mit den Bicellen eingeht.

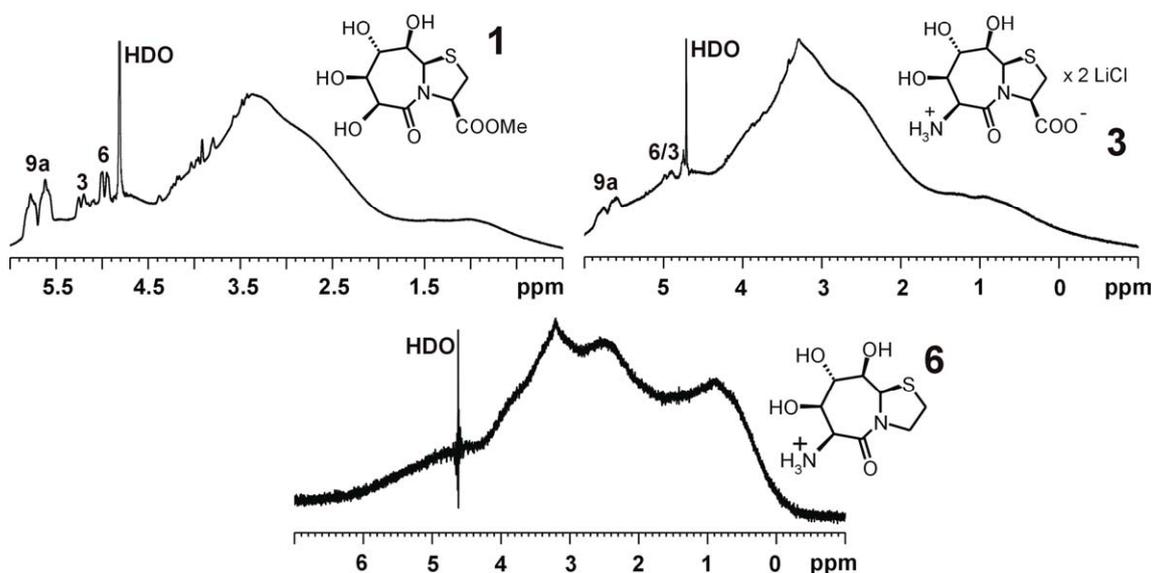


Abb. 65. STD Spektren verschiedener Bicyklen in Bicellenlösung bei 308 K. Die Einstrahlungsfrequenz liegt zwischen 0.5 und 1 ppm – im Alkylbereich von DMPC/DHPC.

→ Für die sich stark ausrichtenden Moleküle **1** und **3** kann auch im STD Spektrum ein Sättigungstransfer von den DMPC/DHPC-Bicellen auf die Protonen H9a, H6 und H3 beobachtet werden.

Das sich mittelstark ausrichtende Molekül **6** zeigt keinerlei Sättigungstransfer.

→ Da sich alle drei Protonen – H9a, H6 und H3 – auf der Unterseite des Bicyklus befinden, die OH Gruppen (jene für die H-Brückenbildung befinden sich auf der Oberseite) und ihre H-Brücken aber eine entscheidende Rolle spielen, kann gemutmasst werden, dass der Bicyklus **1** mehr oder weniger senkrecht bevorzugt in der

Lösung orientiert ist und deswegen Ober- und Unterseite aufgrund der Rotation um die Längsachse mit den Bicellen in Kontakt treten.

7.1.2 STD von Bizyklen mit hydrophoben Gruppen

Da durch die, in manchen Bizyklen vorhandenen, hydrophoben Gruppen eine zusätzliche Art von Wechselwirkung – nämlich rein auf der Polarität beruhend – ins Spiel kommt, können die Ergebnisse für diese Moleküle, also der Grad ihrer Orientierung in flüssig-kristalliner Phase, nicht direkt mit den restlichen Bizyklen verglichen werden.

Auch im Rahmen der STD Messungen sollte ein deutlicher Sättigungstransfer auf die hydrophoben Gruppen stattfinden, da diese mit der Membran bevorzugt unspezifisch wechselwirken.

Zu dieser Gruppe gehören folgende Bizyklen:

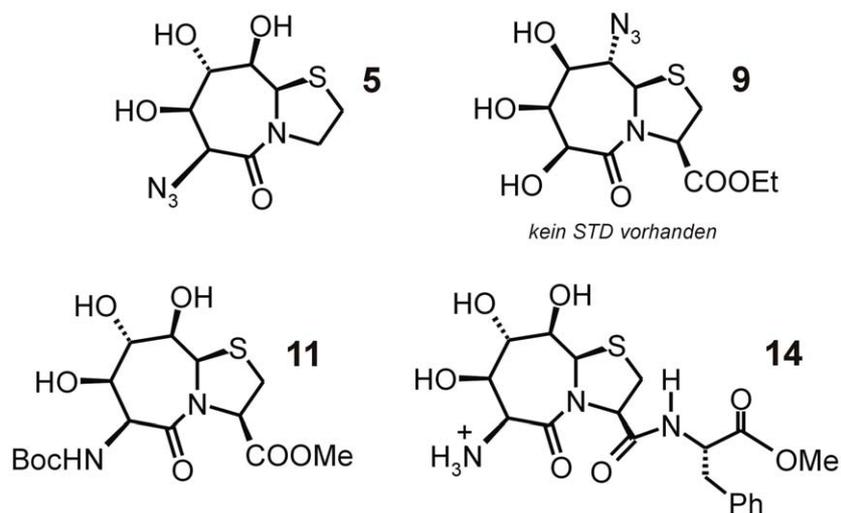


Abb. 66. Strukturen der Bizyklen, die aufgrund hydrophober Gruppen (Azid, Boc, Phenyl) zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran der Bicellen eingehen.

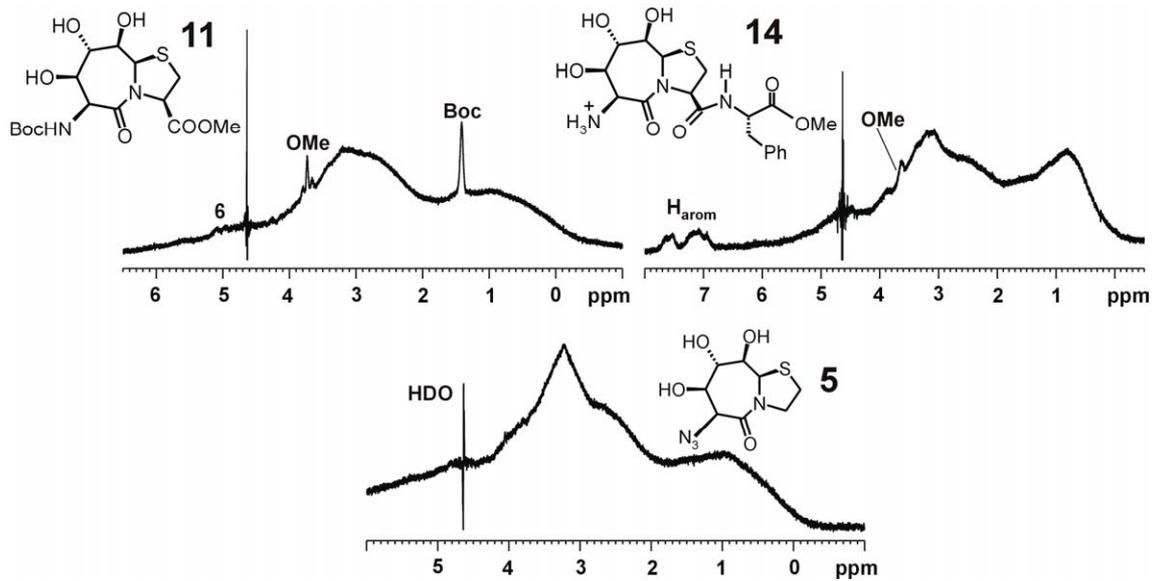


Abb. 67. STD Spektren für Bicyklen mit hydrophoben Gruppen in Bicellenlösung bei 308 K.

Wie zu erwarten erhält man bei Sättigung des Alkylbereichs der DMPC/DHPC Moleküle einen Transfer auf die hydrophoben Gruppen der Bicyklen. Dass in allen Fällen kein deutlicher Sättigungstransfer auf weitere Protonen der Bicyklen zu beobachten ist, kann daran liegen, dass aufgrund der starken Ausrichtung die Signale zu breit sind, um im STD Spektrum detektiert zu werden. Denn bereits im ^1H Spektrum von **11** ist z. B. H9a nur noch schlecht erkennbar.

7.1.3 STD von Bicyklen mit nur schwacher Ausrichtung in Bicellen

Zu dieser Gruppe gehören die meisten, der hier untersuchten Systeme.

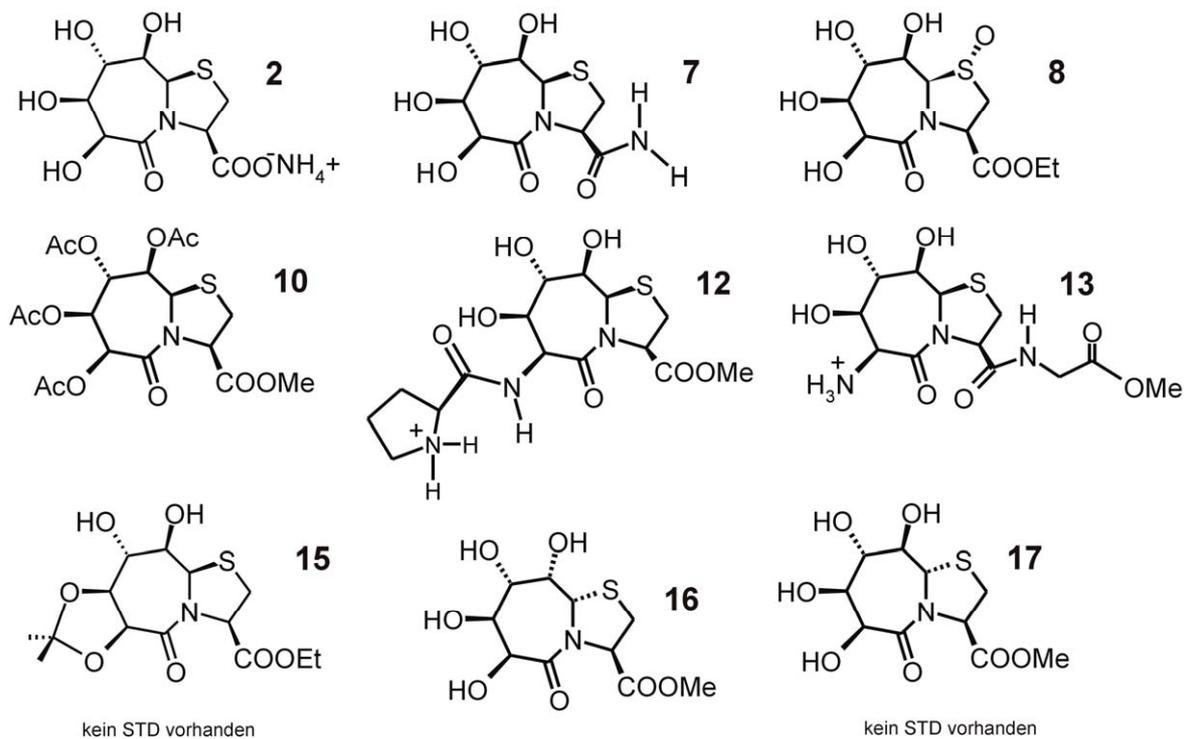


Abb. 68. Strukturen der Bicyklen, die in anisotroper Bicellenlösung eine nur schwache Ausrichtung im Vergleich zu Molekül **1** erfahren.

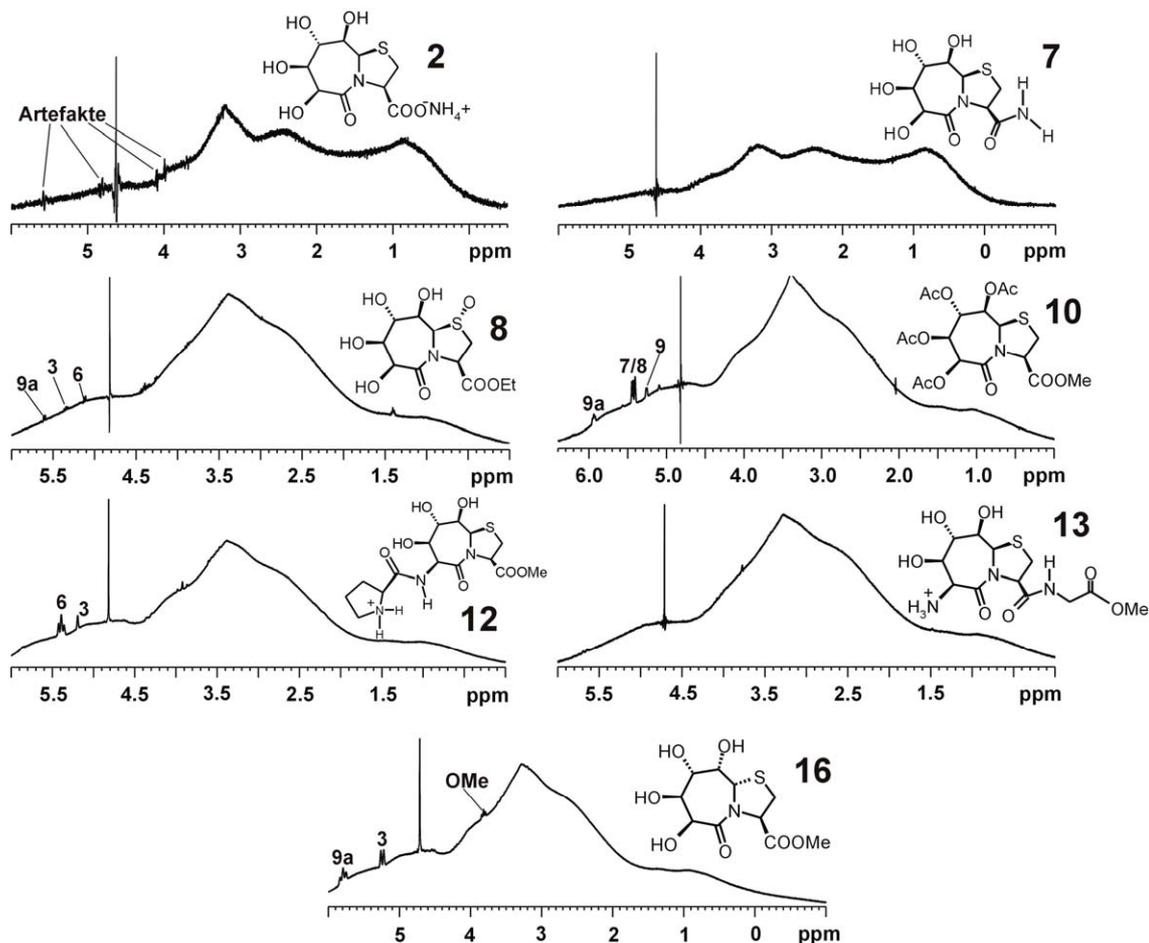


Abb. 69. STD Spektren bei 308 K für verschiedene Bicyklen, die sich in flüssig-kristalliner Bicellenphase nur schwach ausrichten. Einstrahlfrequenz war wiederum der Alkylbereich von DMPC/DHPC.

Auch für einige der sich nur schwach ausrichtenden Bicyklen kann ein Sättigungstransfer zwischen Bicellen und Bicyklus gezeigt werden. Dieser ist allerdings sehr gering im Vergleich zu den Molekülen **1** bzw. **3**.

Molekül **8**, das von Sesselkonformation, Brückenkopfkongfiguration und H-Brückenmuster mit **1** identisch ist, zeigt dasselbe Muster beim Sättigungstransfer, nämlich auf die Protonen H9a, H6 und H3 auf der Unterseite des Bicyklus.

Vergleichbar verhält es sich für Molekül **12**, bei dem der Sättigungstransfer allerdings nur mehr für H6 und H3 detektierbar ist.

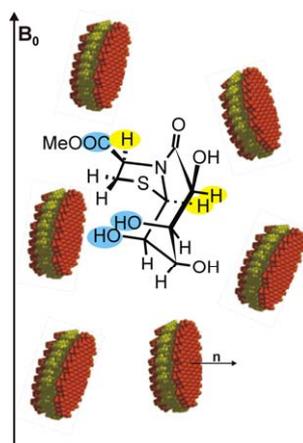
In Molekül **10**, bei dem alle OH Gruppen acetyliert vorliegen, weist das Muster für den Sättigungstransfer in keine eindeutige Richtung. Sowohl das H9a Proton auf der Unterseite des Bicyklus, als auch die äquatorial orientierten Protonen H7, H8 und H9 zeigen einen Sättigungstransfer. Dies ist mit keiner eindeutigen Orientierung in Bezug auf die Bicellen in Einklang zu bringen. Evtl. erweisen sich die acetylierten OH Gruppen als zu gross und somit störend um eine Orientierung wie für Molekül **1** zwischen den Bicellen einnehmen zu können.

Für Molekül **16**, dessen 7-Ring eine invertierte Sesselkonformation aufweist, ist der Sättigungstransfer nicht eindeutig. So zeigen sowohl H9a auf der Ringoberseite, wie

auch H3 auf der Ringunterseite einen schwachen Sättigungstransfer. Dies kann nicht mit einer bevorzugten Orientierung in Verbindung gebracht werden.

→ Wie für das Molekül 1 zuvor schon postuliert, könnte man sich eine bevorzugte Orientierung der stark bzw. mittelstark bindenden Bizyklen in der Weise vorstellen, dass die Längsachse parallel zur Magnetfeldachse und somit senkrecht zum Normalenvektor der Bicellen orientiert ist. Dies würde erklären, wieso die OH Gruppen und ihr H-Brückenmuster von entscheidender Wichtigkeit sind und zugleich, warum die Protonen auf der Unterseite des Bizyklus im STD Experiment einen Sättigungstransfer erfahren, wenn auf Signale der Bicellen eingestrahlt wird.

Rein schematisch könnte man sich die Ausrichtung von 1 in Bicellen wie folgt vorstellen:



Die gelb markierten Protonen zeigen einen Sättigungstransfer im STD Experiment. Die blau markierten Gruppen sind beteiligt an den H-Brücken auf der Oberseite des Bizyklus.

Protonen, die entlang der Längsachse orientiert sind, also besonders H7, H8 und H9 würden nur mit den Rändern der Bicellen, an denen nur DHPC Moleküle vorhanden sind und die zudem stark gekrümmt sind, in Kontakt kommen.

Abb. 70. Vorschlag für die Ausrichtung von 1 in Bicellen. Dieses Bild würde den ermittelten strukturellen Abhängigkeiten und den Ergebnissen der STD Experimente gerecht.

Beweisen lässt sich diese Hypothese mit den bisherigen experimentellen Daten nicht, aber es gibt mathematische Möglichkeiten (siehe Kapitel 9), die eine Aussage über die bevorzugte Orientierung eines Moleküls in flüssig-kristalliner Phase zulassen.

7.2 Bestimmung der Diffusionskonstanten für verschiedene Bizyklen in isotroper und anisotroper Phase

Die sog. Brownsche Molekularbewegung – also die Bewegung von gelösten Stoffen in Lösung – wird häufig auch als Selbstdiffusion bezeichnet. Sie ist von Faktoren wie Grösse und Gestalt der Moleküle, Temperatur oder Viskosität der Lösung abhängig. Geht man von einer kugelförmigen Molekülgestalt aus, so lässt sich der Diffusionskoeffizient mit der sog. Stokes-Einstein-Gleichung beschreiben:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_s} \quad (3)$$

mit k_B = Boltzmann Konstante, T = absolute Temperatur, η = Viskosität der Lösung, r_s = hydrodynamischer Radius eines sphärischen Moleküls

In der NMR Spektroskopie kann durch die Verwendung von Gradientenpulsen ein Molekül aufgrund seiner Position in der Lösung quasi „gelabelt“ werden. Während der anschliessenden Wartezeit (Diffusionszeit Δ) diffundieren die in der Lösung enthaltenen Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Gestalt und den Umgebungsbedingungen unterschiedlich schnell. Anschliessend wird wiederum ein Gradientenpuls benutzt, um sozusagen den Ort, bis zu welchem das Molekül gelangt ist, zu decodieren.^{18a-c}

Durch den ersten Gradienten herrscht an jeder Stelle in der Probe (in z-Richtung, falls der Puls aus z-Richtung kommt) ein unterschiedliches lokales Feld. Durch den zweiten Gradientenpuls wird ein entsprechendes NMR Signal nur für solche Protonen/Moleküle vollständig refokussiert, für die die erste und zweite Gradientenumgebung identisch ist, d. h. für Moleküle, die sich in der Wartezeit Δ nicht bewegt haben.^{18a-c}

Signale von sich bewegendenden Molekülen erfahren durch die unvollständige Refokussierung einen Verlust ihrer Signalintensität, welche wie folgt mit der ursprünglichen Intensität und den experimentellen Bedingungen zusammenhängt:^{18a}

$$I = I_0 \cdot \exp\left(-(\gamma\delta G)^2 \cdot D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right) \quad (4)$$

mit I = Signalintensität, I_0 = Signalintensität ohne Gradient, G = Gradientenstärke, D = Diffusionskoeffizient, γ = gyromagnetisches Verhältnis, δ = Dauer des Gradientenpulses, Δ = Zeit zwischen erstem und zweitem Gradientenpuls

Das Diffusionsverhalten von Molekülen kann z. B. dadurch beeinflusst werden, dass sie eine Bindungsaffinität zu einem ebenfalls gelösten Stoff besitzen. Bestes Beispiel hierfür sind (kleiner) Ligand –(grosser) Rezeptor Wechselwirkungen. Kleine Moleküle diffundieren relativ schnell in Lösung, grosse nur langsam. Bindet nun ein kleines Molekül an ein grösseres, so vermindert sich die Diffusionsgeschwindigkeit des kleineren Moleküls, weil ein bestimmter Anteil seiner Moleküle in gebundenem Zustand zu einem grossen Komplex gehören. Für solche Vorgänge, bei denen der Ligand nicht irreversibel gebunden wird und ein schneller Austausch zugrunde liegt (ein gemittelter Signalsatz im 1H), erhält man auch im DOSY Spektrum eine gemittelte Diffusionskonstante, die sich jedoch deutlich von der des freien Liganden unterscheidet.^{18d-g}

Diese auch als Affinitäts NMR bezeichnete Methode, meist Mischungen vieler, potentieller Liganden auf ihre Bindungsfähigkeit hin zu testen, kann auch im hier vorliegenden Fall benutzt werden, um die Affinität der stark ausrichtenden Bizyklen an die Bicellenmembran zu untersuchen.

Da die Änderung der untersuchten Proben in einer Temperaturerhöhung besteht – die mit einem rein physikalischen Phasenübergang und einer Änderung der Lösungseigenschaften einhergeht – muss die Diffusionskonstante der Bizyklen jeweils auf das enthaltene HDO bezogen werden.

Ändert sich die Diffusionskonstante des Bizyklus bei Übergehen von isotroper in die anisotrope Phase um denselben Prozentsatz, wie dies für HDO der Fall ist, so kann man davon ausgehen, dass die veränderte Diffusionskonstante nur auf veränderte Lösungseigenschaften zurückzuführen ist. Würde sich die Diffusionskonstante des Bizyklus unverhältnismässig stark zwischen den beiden Phasen unterscheiden, so müsste das Auftreten einer Wechselwirkung (z. B. mit den Bicellen) angenommen werden.

Untersuchte Proben:

- Molekül **1**: $q = 2.8$, $c = 13.1\%$, ohne CTAB, $700 \mu\text{L D}_2\text{O}$, $f = 0.35$
- Molekül **15**: $q = 2.7$, $c = 13.1\%$, 3% CTAB, $700 \mu\text{L D}_2\text{O}$, $f = 0.38$
- Molekül **17** (als Ethylester): $q = 2.7$, $c = 13.1\%$, 3% CTAB, $700 \mu\text{L D}_2\text{O}$, $f = 0.3$
- Molekül **1** in Otting Phase: 3% wt, $r = 0.89$, $700 \mu\text{L D}_2\text{O}$, $42 \text{ mM } \mathbf{1}$

- Molekül **1** in Bicellen:

Mittelwerte der Diffusionskonstanten D [m^2/s]:

bei 300 K: für **1**: $3.673 \cdot 10^{-10}$ für HDO: $1.791 \cdot 10^{-9}$

bei 308 K: für **1**: $4.410 \cdot 10^{-10}$ für HDO: $2.241 \cdot 10^{-9}$

→ Quotient D (**1**, 300 K): D (**1**, 308 K) = **0.83**

→ Quotient D (HDO, 300 K): D (HDO, 308 K) = **0.80**

- Molekül **15** in Bicellen:

Mittelwerte der Diffusionskonstanten D [m^2/s]:

bei 300 K: für **15**: $3.542 \cdot 10^{-10}$ für HDO: $1.750 \cdot 10^{-9}$

bei 308 K: für **15**: $4.488 \cdot 10^{-10}$ für HDO: $2.004 \cdot 10^{-9}$

→ Quotient D (**15**, 300 K): D (**15**, 308 K) = **0.79**

→ Quotient D (HDO, 300 K): D (HDO, 308 K) = **0.87**

- Molekül **17** in Bicellen:

Mittelwerte der Diffusionskonstanten D [m^2/s]:

bei 300 K: für **17**: $3.685 \cdot 10^{-10}$ für HDO: $1.813 \cdot 10^{-9}$

bei 308 K: für **17**: $4.693 \cdot 10^{-10}$ für HDO: $2.366 \cdot 10^{-9}$

→ Quotient D (**17**, 300 K): D (**17**, 308 K) = **0.79**

→ Quotient D (HDO, 300 K): D (HDO, 308 K) = **0.77**

- Molekül **1** in Otting Phase:

Mittelwerte der Diffusionskonstanten D [m^2/s]:

bei 293 K: für **1**: $3.648 \cdot 10^{-10}$ für HDO: $1.461 \cdot 10^{-9}$

bei 305 K: für **1**: $4.486 \cdot 10^{-10}$ für HDO: $1.624 \cdot 10^{-9}$

→ Quotient D (**1**, 293 K): D (**1**, 305 K) = **0.81**

→ Quotient D (HDO, 293 K): D (HDO, 305 K) = **0.90**

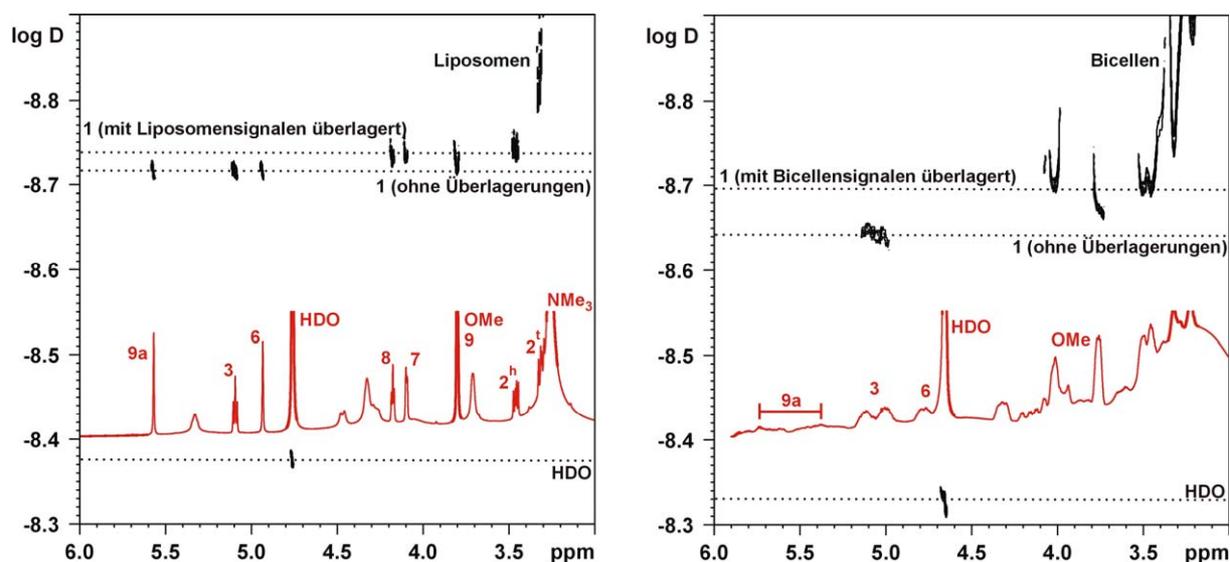


Abb. 71. 2D DOSY Spektren für **1** in Bicellen. Links in isotroper Lösung bei 300 K, rechts in anisotroper bei 308 K. Deutlich sind die unterschiedlichen Diffusionsgeschwindigkeiten von HDO und Bicyklus zu sehen. Für Liposomen (300 K) und Bicellen (308 K) erstrecken sich die Signale über einen sehr grossen Bereich, da für diese Aggregate eine Streuung ihrer Grösse vorhanden ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der DOSY Spektroskopie die, in STD Messungen und $^1D_{\text{CH}}$ Daten erkennbare, Wechselwirkung zwischen Bicyklus und Bicellenmembran nicht verifiziert werden kann. Im Rahmen der Messgenauigkeit besitzen alle Diffusionskonstanten der untersuchten Bicyklen dasselbe Verhältnis zueinander wie die Diffusionskonstanten der HDO Moleküle in ein und derselben Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur. Eine zusätzliche Verlangsamung der Bicyklen, die mit den Bicellen wechselwirken, kann nicht nachgewiesen werden. Fraglich ist allerdings, ob die – mit Sicherheit nur schwache – Wechselwirkung ausreichen würde, um eine experimentell messbare Änderung der Diffusionskonstanten zu bewirken.

8. Ist die Abschätzung der Bindungskonstante für Bicyklen in Bicellen mittels RDCs möglich?

Sicherlich ist die Abschätzung einer Bindungskonstante von **1** an die Bicellen mit sehr vielen Annahmen verbunden, da es sich bei der Bicellenoberfläche nicht um einen klassischen Rezeptor handelt, bei dem eine definierte Anzahl an Bindungsta-

schen vorhanden ist. Vielmehr muss die Fläche bzw. das Volumen, das von einem Bicyklusmolekül besetzt werden kann, in Relation zum planaren Bereich der Bicellen, also zum Anteil an DMPC, gesetzt werden.

Generell kann man sagen, dass die gemessenen Werte der RDCs einer Mittelung aus freiem und gebundenem Bicyklus **1** entsprechen. Dies liegt auch den Messungen zugrunde, wenn über sog. transferred RDCs (trDCs) die Bindung eines Liganden an einen in Lösung schwach orientierten Rezeptor untersucht wird.^{10d, e}

$${}^1D_{CH} = \chi_1 \cdot {}^1D_{CH(\text{frei})} + \chi_C \cdot {}^1D_{CH(\text{geb})} \quad (5)$$

mit χ_1 = Molenbruch von freiem Bicyklus, χ_C = Molenbruch des Komplexes, ${}^1D_{CH(\text{frei})}$ = dipolare Kopplung des freien Bicyklus, ${}^1D_{CH(\text{geb})}$ = dipolare Kopplung des gebundenen Bicyklus.

Hier müssen bereits die ersten Vereinfachungen und Annahmen gemacht werden. Denn welchen Wert besitzen die dipolaren Kopplungen im freien und gebundenen Zustand?

Für den freien Zustand lässt sich der in der Otting Phase ermittelte RDC Wert in guter Näherung annehmen, da in dieser Phase eine starke Ausrichtung von **1** und damit verbunden eine spezifische Wechselwirkung zwischen **1** und der flüssig-kristallinen Phase nicht auftritt.

Der über nachfolgende Gleichung definierte Wert für D_{CH}^{max} würde dann vorliegen, wenn 100% der Moleküle in anisotroper Lösung vollständig parallel zur Magnetfeldachse (senkrecht zum Normalenvektor der Bicellen) orientiert wären. Dieser Wert wird auch manchmal als maximaler, statischer Wert bezeichnet.

Dieser Fall tritt natürlich niemals ein, gibt aber die obere Grenze der dipolaren CH Kopplung wieder.

$$D_{ij} = - \frac{\mu_0 \gamma_i \gamma_j \hbar}{(2\pi r_{ij})^3} \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle \quad (6)$$

Mann berechnet den D^{max} Wert für einen Bindungsabstand von $r = 1 \text{ \AA}$. Hieraus ergibt sich für einen CH Vektor eine maximale dipolare Kopplung von:

$$D_{CH}^{\text{max}} = - 60380 \text{ Hz}$$

Diesen Wert kann man folglich als oberen Grenzwert für einen gebundenen Liganden betrachten.

Da die dipolaren Kopplungen Vorzeichen besitzen und dies eventuell bei der Berechnung der Bindungsaffinität Probleme bereiten kann, werden für alle in der Gleichung (5) vorkommenden D_{CH} Werte die Absolutbeträge gesetzt.

Bleibt noch die Frage, wieviele DMPC Moleküle pro Bizyklus als Rezeptor in der Rechnung berücksichtigt werden sollen.

Die Grösse der Phosphocholinkopfgruppe ist laut Literatur^{12, 19} in etwa 70 \AA^2 , ein Wert der auch für die Fläche veranschlagt werden kann, die ein Bizyklusmolekül einnimmt. Damit legt man also eine 1:1 Komplexierung zugrunde.



Aus dieser Annahme ergibt sich die Bindungskonstante K_a zu:

$$K_a = \frac{[C]}{[1]^0 [DMPC]^0} = \frac{[C]}{([1]^0 - [C])^0 ([DMPC]^0 - [C])} \quad (8)$$

mit:

[C]: Konzentration an Komplex C

[1]⁰: Gesamtkonzentration an 1

[DMPC]⁰: Gesamtkonzentration an DMPC

Auflösen dieser Gleichung nach [C] ergibt:

$$[C] = \frac{[1]^0 + [DMPC]^0 + 1/K_a}{2} \pm \left(\left(\frac{[1]^0 + [DMPC]^0 + 1/K_a}{2} \right)^2 - [1]^0 [DMPC]^0 \right)^{1/2} \quad (8a)$$

Nur eine Lösung der Gleichung (8a) – nämlich die mit Minuszeichen – liefert chemisch sinnvolle Ergebnisse.

Nun kann man die Molenbrüche in Gleichung (5) durch die entsprechenden Konzentrationen ersetzen und erhält:

$$\chi_1 = \frac{[1]}{[1]^0} \quad \text{und} \quad \chi_C = \frac{[C]}{[1]^0}$$

eingesetzt in Gleichung (5) ergibt:

$${}^1D_{CH} = \frac{[1]^0 - [C]}{[1]^0} \cdot {}^1D_{CH(\text{frei})} + \frac{[C]}{[1]^0} \cdot {}^1D_{CH(\text{geb})} \quad (5a)$$

Hauptteil

einsetzen von (8a) in (5a) liefert:

$${}^1D_{CH} = {}^1D_{CH(frei)} + \frac{{}^1D_{CH(geb)}}{[1]^0} * \left(\frac{[1]^0 + [DMPC]^0 + 1/K_a}{2} - \left(\left(\frac{[1]^0 + [DMPC]^0 + 1/K_a}{2} \right)^2 - [1]^0 * [DMPC]^0 \right)^{1/2} \right) \quad (9)$$

Mit Gleichung (9) ist es gelungen, den experimentell ermittelten Parameter ${}^1D_{CH}$ mit der zu bestimmenden Bindungskonstante K_a in Relation zu setzen. Alle weiteren Grössen in Gleichung (9) – ${}^1D_{CH(frei)}$, ${}^1D_{CH(geb)}$, $[1]^0$, $[DMPC]^0$ – sind entweder aufgrund der experimentellen Gegebenheiten bekannt oder werden näherungsweise gesetzt.

Für eine bestimmte Probe mit bekannten $[1]^0$ und $[DMPC]^0$ Konzentrationen kann eine Auftragung der Funktion von Gleichung (9) gemacht werden, aus der der K_a Wert zu einer gegebenen dipolaren Kopplung ${}^1D_{CH}$ abgelesen werden kann. Ebenso kann aus Gleichung (8a) die Konzentration an Komplex C ermittelt werden, wenn aus Gleichung (9) die Bindungskonstante K_a bekannt ist.

Einziges Problem ist, dass der Bereich kleiner und kleinster RDC Werte und damit natürlich niedriger K_a Werte nicht mehr graphisch dargestellt werden kann, obwohl die Gleichungen (8a) und (9) auch in diesem Bereich definiert sind. So bleibt als einzige Möglichkeit die numerische Lösung der Gleichungen für den experimentell ermittelten RDC Wert mit einem Mathematikprogramm – wie hier z. B. Maple V.

Ein Knackpunkt ist sicherlich noch die Wahl des ${}^1D_{CH}$ Wertes, der für die Bestimmung der Bindungskonstanten K_a verwendet wird. Theoretisch wäre ja jeder ermittelte Wert möglich, doch macht es Sinn, den betragsmässig grössten ${}^1D_{CH}$ Wert für die Bestimmung zu verwenden. In den meisten Fällen handelte es sich bei den Bizyklen dabei um den Wert für C Atom 7.

8.1 Molekül 1 in verdünnter Bicellenprobe (5% wt)

Für folgende Probe soll die Bindungskonstante beispielhaft berechnet werden:

$q = 3.0$, $c = 5.0\%$, $700 \mu\text{L}$ Puffer, $f = 0.55$

- $7.80 \text{ mg } \mathbf{1}$, $n = 2.659 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow \mathbf{38.0 \text{ mM}}$ in Lösung
- 32.78 mg DMPC , $n = 4.835 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow \mathbf{69.1 \text{ mM}}$ in Lösung

${}^1D_{CH}(\text{C7}) = +171 \text{ Hz}$ $D_{CH(frei)} = -20 \text{ Hz}$ (aus Messung in Otting Phase)

Lösung von Gleichung (9) mit Maple V ergibt

$$K_a = 3.6 \cdot 10^{-5} \text{ L/mmol} \quad \rightarrow \quad \underline{\underline{K_a = 3.6 \cdot 10^{-2} \text{ L/mol}}}$$

Entspricht einer Dissoziationskonstanten K_d von $\sim 27 \text{ M}$

Mit diesem K_d -Wert erhält man, eingesetzt in Gleichung (8a), einen Anteil an vorliegendem Komplex von ~ **0.2%**.

8.2 Molekül 1 in Bicellenlösung mit hohem Lipidgehalt (15% wt)

Für die Berechnung wichtige Probenparameter:

$q = 3.3$, $c = 15.0\%$, $700 \mu\text{L D}_2\text{O}$, $f = 0.24$

- $10.18 \text{ mg } 1$, $n = 3.471 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow \mathbf{49.6 \text{ mM}}$ in Lösung
- 98.04 mg DMPC , $n = 1.446 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow \mathbf{206.6 \text{ mM}}$ in Lösung

$^1D_{\text{CH}}(\text{C7}) = +400 \text{ Hz}$ $D_{\text{CH}(\text{frei})} = -20 \text{ Hz}$ (aus Messung in Otting Phase)

Lösung von Gleichung (9) mit Maple V ergibt

$$K_a = 3.1 \cdot 10^{-5} \text{ L/mmol} \quad \rightarrow \quad \underline{K_a = 3.1 \cdot 10^{-2} \text{ L/mol}}$$

Entspricht $K_d = \sim \mathbf{32 \text{ M}}$

Für diese Probe beträgt der Anteil des Komplexes ca. **0.6%**.

8.3 Molekül 7 – ein in Bicellen nur schwach orientiertes Molekül

Für die Berechnung wichtige Probenparameter:

$q = 3.0$, $c = 5.0\%$, $700 \mu\text{L Puffer}$, $f = 0.63$

- $8.48 \text{ mg } 7$, $n = 3.047 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow \mathbf{43.5 \text{ mM}}$ in Lösung
- 32.79 mg DMPC , $n = 4.837 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \rightarrow \mathbf{69.1 \text{ mM}}$ in Lösung

$^1D_{\text{CH}}(\text{C6}) = +37 \text{ Hz}$ $D_{\text{CH}(\text{frei})} = +9 \text{ Hz}$ (aus Messung in Otting Phase)

in Fall von 7 zeigt C6 die grösste, dipolare Kopplung

Lösung von Gleichung (9) mit Maple V ergibt

$$K_a = 0.7 \cdot 10^{-5} \text{ L/mmol} \quad \rightarrow \quad \underline{K_a = 0.7 \cdot 10^{-2} \text{ L/mol}}$$

Entspricht $K_d = \sim \mathbf{140 \text{ M}}$

Für das nur schwach orientierende 7 ergibt sich ein Komplexanteil von **unter 0.1%**.

→ Die K_d - bzw. K_a -Werte von 1 in verschiedenen Bicellenlösungen – also mit unterschiedlichem Lipidgesamtgehalt und damit unterschiedlichem Grad in der Ausrichtung – sind nahezu identisch. Für das nur sehr schwach orientierende Molekül 7 sind K_d - bzw. K_a -Wert ca. um einen Faktor 5 grösser bzw. kleiner.

Alle ermittelten K_d -Werte liegen in einem Bereich, der mit gängigen NMR Titrationmethoden nicht zugänglich ist, da für $K_d > 1$ M der prozentuale Anteil an Komplex deutlich unter 10% liegt.^{10a}

Trotz der gemachten, vereinfachenden Annahmen kann gezeigt werden, dass für die vorliegenden Systeme eine Abschätzung der Bindungsaffinität mittels RDC Werten möglich ist und ein bis dato nicht zugänglicher Bereich für schwache Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen hiermit offen steht.

9. Berechnung der Tensordaten mit REDCAT^{†20a}

Geht man davon aus, dass (kleine) Moleküle oder einzelne Molekülfragmente in sich starr sind, so besitzen alle Bindungen eine definierte Orientierung zueinander. Betrachtet man die residualen, dipolaren Kopplungen von CH-Bindungen, so spiegeln sie die gemittelte Orientierung dieser CH-Vektoren in anisotroper Phase wider. Hat man für ein starres Molekül/Molekülfragment mehrere $^1D_{CH}$ Werte ermitteln können, so geben sie in ihrer Gesamtheit sowohl eine bevorzugte, räumliche Orientierung des Moleküls(-fragments) als auch einen Grad für das Ausmass der Orientierung wieder.^{20a}

Die RDCs können als Elemente eines Ordnungstensors – also einer 3-dimensionalen Vektormatrix – geschrieben werden, die Informationen, sowohl über die Orientierung und den Grad der Ordnung in Form der Tensorelemente S_{kl} , als auch über die Richtung der verschiedenen Vektoren in Bezug auf ein beliebig gewähltes Molekülkoordinatensystem in Form ihrer Kosinusterme, enthalten. Da für die hier untersuchten Bicyklen sehr viele Kristallstrukturen zur Verfügung standen, war es das Einfachste, die Koordinaten aus den Kristallstrukturen als Basiskoordinaten für die Tensorberechnungen zu verwenden.

Jeder RDC Wert kann in Form seiner Tensorelemente dargestellt werden:^{20a, c}

$$D_{ij} = D_{ij}^{\max} * \sum_{k,l} S_{kl} * \cos(\theta_k) * \cos(\theta_l) \quad (10)$$

mit D_{ij} = experimentell ermittelte dipolare Kopplung der Kerne i und j, D_{ij}^{\max} = maximale dipolare Kopplung für die Kerne i und j (siehe Gleichung (6)), S_{kl} = Tensorelemente, θ_k bzw. θ_l = Winkel θ zwischen ij-Vektor und der kten bzw. lten Achse des Molekülkoordinatensystems, $k, l = \{x, y, z\}$

Um aus den RDCs strukturelle und dynamische Informationen erhalten zu können, werden ihre Abhängigkeiten in Form einer Ordnungsmatrix dargestellt.^{20b, c}

Um diese Ordnungsmatrix zu bestimmen, muss ein System an linearen Gleichungen in der Form

$$\underline{A} \mathbf{x} = \mathbf{b}$$

aufgestellt werden.

[†] Dieses Programm stammt von Prof. H. Valafar und Prof. J. H. Prestegard und ist über die Homepage des CCRC (tesla.crc.uga.edu) zu beziehen.

Die Matrix \underline{A} besteht aus den Kosinustermen für die Orientierung der internuklearen Vektoren.

Der Vektor x enthält die zu bestimmenden Elemente S_{kl} mit $k, l = x, y, z$.

Hierbei handelt es sich um fünf Unbekannte, nämlich S_{yy} , S_{zz} , S_{xy} , S_{xz} und S_{yz} .

Da die Ordnungsmatrix symmetrisch ($S_{ij} = S_{ji}$) ist und ihre Spur null ergibt ($S_{xx} + S_{yy} + S_{zz} = 0$), reduziert sie sich auf diese fünf unbekanntenen Werte.

Der Vektor b schliesslich enthält die experimentell ermittelten RDC Werte, in dem hier vorliegenden Fall ausschliesslich $^1D_{CH}$ Werte.

Die Bestimmung von fünf Unbekannten bedeutet, dass mindestens fünf linear unabhängige Gleichungen (und somit RDC Werte) vorhanden sein müssen, um das Gleichungssystem lösen zu können.

Dies geschieht häufig mit Hilfe von bestimmten Suchalgorithmen (z. B. Random Search oder Grid Search).

Das Programm REDCAT verwendet jedoch die sog. Einzelwertzerlegung (Singular Value Decomposition SVD). Eine genaue Erklärung des mathematischen Vorgehens findet sich in der Literatur.^{20c}

Wichtig ist in diesem Zusammenhang nur, dass die Lösungen dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate entsprechen.

Als Ergebnis gibt einem REDCAT bei Betrachtung der „Best Solution“ (im Sinne der Wurzel des mittleren Fehlerquadrates (rmsd)) die Lösung für folgende Parameter:^{20a}

- S_{xx} , S_{yy} , S_{zz} : sie geben die Stärke der Ausrichtung entlang der entsprechenden Orientierungsachse wieder.
- **GDO**: Generalized Degree of Order. Die Bedeutung dieser Grösse wird in 9.1 näher erläutert.
- α , β , γ : Die Euler Winkel, welche die Ausrichtung der Orientierung zu einem beliebigen Molekülkoordinatensystem (z. B. definiert über die Kristallstruktur) in Bezug setzen.

9.1 Der GDO Wert – Generalized Degree of Order^{1a, 20d}

Dieser Wert verdient etwas mehr Beachtung, da er im weiteren Verlauf als Kriterium herangezogen wird, um die Stärke der Ausrichtung verschiedener Bizyklen miteinander vergleichen zu können.

Der GDO ist ein skalarer Parameter – unabhängig von den räumlichen Koordinaten des Systems – der die Gesamtstärke der Orientierung wiedergibt. Diese ist unabhängig von der mittleren Orientierung eines Moleküls relativ zur Magnetfeldachse und berücksichtigt nur die Mittelung der Dynamik eines Systems, die sowohl die Bewegungen innerhalb des Moleküls als auch die Orientierung aufgrund von Ausrichtung beinhaltet.

Definiert ist der GDO – häufig auch mit ϑ bezeichnet – als

$$\vartheta = \sqrt{\frac{2}{3} \sum_{ij} S_{ij}^2} \quad (11)$$

Falls ein System axial symmetrisch ist reduziert sich ϑ zu S_{zz} .

9.2 Bestimmung der Tensorelemente aus den experimentellen $^1D_{CH}$ Daten

Für jene Bicyklen, die keine zu starke Orientierung und damit Signalverbreiterung erfahren, können genügend linear unabhängige $^1D_{CH}$ Werte erhalten werden, um das oben beschriebene Gleichungssystem lösen zu können.

Zu berücksichtigen ist, dass die CH Vektoren für CH6 und CH9a in der Sesselkonformation annähernd parallel sind und somit nicht als linear unabhängig betrachtet werden können.

Es ist möglich, nicht nur den Grad der Orientierung für verschiedene Bicyklen zu vergleichen, sondern auch für ein und denselben Bicyklus die Auswirkungen unterschiedlicher Probenbedingungen (z. B. Lipidgehalt) zu beurteilen.

9.2.1 Molekül 1 in Abhängigkeit von den Probenbedingungen

Für das Grundmolekül **1** steht eine Vielzahl an Daten für unterschiedlichste experimentelle Bedingungen zur Verfügung. Nicht nur die Auswirkung der Variation des Lipidgehalts, sondern auch die Änderung der Ionenstärke (NaCl-Zugabe) oder der Einfluss durch Dotierung der Bicellen mit Dodecylmaltosid, können bestimmt werden. Problematisch ist bei der Extraktion der $|D_{CH}+J_{CH}|$ Werte aus ^{13}C gated oder INEPT Spektren, dass aufgrund der relativ starken Ausrichtung auch sog. long-range dipolare Kopplungen auftreten, die dazu führen, dass es sich nicht mehr um Singulett mit geringer Halbwertsbreite handelt, sondern um teilweise stark aufgespaltene Multiplettstrukturen. Dadurch wird der Fehler beim Ablesen deutlich grösser als dies für nur schwach orientierte Systeme der Fall ist.

Proben, für die sich aufgrund ungenauer ^{13}C Ablesung – trotz nicht extrem starker Ausrichtung – bei den Berechnungen mit REDCAT grosse Fehler für die RDC Werte ergaben, wurden hier nicht berücksichtigt. Diese gesetzten Fehlergrenzen dienen bei der mathematischen Lösung des linearen Gleichungssystems als Grenzen innerhalb derer die RDC Werte variiert werden dürfen, um die bestmögliche Lösung zu finden.

Für die verschiedenen Bedingungen für Molekül **1** ergeben sich folgende Werte aus den Berechnungen mit REDCAT:

Probe (q, c, f)	GDO*10 ³	α [°]	β [°]	γ [°]	Fehlergrenzen [%]
2.6, 10.8, 0.51	5.19	-67.7	45.9	56.8	1.8 ... 6.2
2.6, 12.6, 0.49	5.17	-66.2	49.5	54.8	0.8 ... 5.9
2.6, 10.8, 0.51 (Probe gealtert)	4.42	-70.5	41.8	60.6	0.6 ... 5.0
2.7, 12.6, 0.39 NaCl (55 mM)	4.02	-70.5	40.5	68.1	1.5 ... 3.0
3.0, 5.0, 0.55	3.95	-69.4	41.5	60.3	0.5 ... 5.0
3.0, 5.0, 0.28	3.81	-72.6	40.3	64.0	1.1 ... 4.8
2.7, 8.4, 0.18	3.57	-70.8	39.9	64.5	0.7 ... 2.7
2.6, 12.6, 0.49 NaCl (42 mM)	3.35	-73.9	33.6	91.0	0.3 ... 0.7
2.6, 12.6, 0.49 NaCl (42 mM) (Probe gealtert)	3.16	-79.3	35.9	119.8	2.3 ... 5.7

Tab. 24. Vergleich der mit REDCAT ermittelten Werte für GDO und die Euler Winkel für verschiedene Proben von **1** in Bicellen.

Diese Zahlenwerte lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- die Proben mit hohem Lipidgehalt **c** zeigen die grössten GDO Werte.
- Das Altern einer Probe führt zu einer verschlechterten Ausrichtung und somit zu niedrigeren GDO Werten.
- Die Zugabe von NaCl – also die Erhöhung der Ionenstärke – führt ebenfalls zu einer geringeren Orientierung → niedrigere GDO Werte.
- Die Unterschiede in den GDO Werten lassen keinen Zusammenhang zwischen f-Wert und Grad der Ausrichtung erkennen.
- Die Euler Winkel α , β , γ sind für Proben mit vergleichbaren GDO Werten in etwa gleich, wobei sich eine schrittweise Änderung der Winkel mit abnehmendem GDO Wert zeigt:
 - α : ~ - 65° → ~ - 80°
 - β : ~ + 45° → ~ + 35°
 - γ : ~ + 55° → ~ + 120°

Für stark ausgerichtete Proben ergeben sich sehr grosse Fehler für die RDC Werte bei der Berechnung der Tensorelemente mit REDCAT. Dies liegt vor allem an dem grossen Fehler, der bereits bei der Ablesung der Werte aus dem ¹³C aufgrund der starken Signalverbreiterungen gemacht wird. Da für diese Systeme bereits weniger ¹D_{CH} Werte zur Verfügung stehen als für schwächer orientierte Systeme, müssen bei

der Berechnung meist die $^1D_{CH}$ Werte mit den grössten Fehlern ebenfalls miteinbezogen werden, da ansonsten ein unterdeterminiertes System – also mit weniger als fünf voneinander unabhängigen Gleichungen – vorliegt.

Daher sollen hier nur für zwei solche Proben die Zahlenwerte gegeben werden, wobei diese nicht mit den zuvor gezeigten verglichen werden können.

Probe (q, c, f)	GDO*10 ³	α [°]	β [°]	γ [°]	Fehlergrenzen [%]
3.2, 15.0, 0.27	14.6	0.8	297.7	-13.5	5.6 ... 400
2.7, 12.7, 0.36	11.3	10.4	294.1	-25.1	7.5 ... 285

Tab. 25. Mit REDCAT berechnete Werte für GDO und die Euler Winkel für sehr stark ausgerichtete Proben von **1** in Bicellen.

Noch ein Wort zu den in Kapitel 2.2.2 gezeigten Proben, die bis auf ihren q-Wert identisch sind.

Es zeigt sich eine Abnahme des GDO Wertes mit fallendem q-Wert – von $5.14 \cdot 10^{-3}$ für $q = 3.0$ auf $4.94 \cdot 10^{-3}$ für $q = 2.7$. Allerdings ist für diese Proben der Fehlerbereich für die RDC Werte im Rahmen der REDCAT Rechnungen relativ gross (für best. $^1D_{CH}$ Werte um 30%). Daher sind diese in Tab. 24 nicht dargestellt.

Auch die Probe von **1** in mit Dodecylmaltosid dotierten Bicellen wurde berechnet. Für sie ergaben sich folgende Werte:

Probe (q, c, f)	GDO*10 ³	α [°]	β [°]	γ [°]	Fehlergrenzen [%]
3.25, 5.5, 0.67	5.62	-57.0	43.3	47.9	5.6 ... 400

Tab. 26. Mit REDCAT berechnete Werte für **1** in dotierten Bicellen. Die q, c und f-Werte beziehen sich jeweils auf DMPC+Dodecylmaltosid.

Aufgrund der Kombination von hohem q- und niedrigem c-Wert, gibt es keine undotierte Probe als direkten Vergleich. Die Euler Winkel stimmen aber in guter Näherung mit den Werten für undotierte Bicellen mit ähnlichem GDO Wert überein.

9.2.2 Vergleich der verschiedenen Bizyklen

Wie für **1** soll auch für verschiedene Bizyklusderivate eine Aufstellung ihrer GDO Werte und Euler Winkel erfolgen:

Molekül	Probe (q, c, f)	GDO*10 ³	α [°]	β [°]	γ [°]	Fehlergrenzen [%]
2	3.0, 5.0%, 0.82	0.54	25.3	298.9	-19.1	7.3 ... 300(C3)
Die Werte für 2 können extrem schlecht gefittet werden → GDO Wert und Euler Winkel mit grosser Wahrscheinlichkeit stark fehlerbehaftet						
3	3.0, 5.0%, 0.5	5.87	-26.1	90.9	101.6	5.0 ...40(C6)
4	3.0, 5.0%, 0.76	3.61	151.6	142.3	-54.3	0.7 ... 32(C6)
6	3.0, 5.0%, 0.63	2.30	31.2	34.7	-48.7	0.7 ... 9.0
7	3.0, 5.0%, 0.63	1.90	212.5	149.2	10.4	8.4 ... 53.5(C2)
8	3.0, 5.0%, 0.63	1.46	-48.8	34.5	35.1	3.1 ... 28.2(C3)
12	3.0, 5.0%, 0.26	3.06	44.2	119.6	186.8	2 ... 12.5(C8)
13	3.0, 5.0%, 0.29	2.30	-38.0	43.0	47.5	6.4 ... 28.0(C9)
15	2.5, 5.9%, 0.94	0.51	17.4	72.3	68.7	1.1 ... 21.3(C8)
17	3.0, 5.0%, ~ 0.15	1.11	234.0	147.7	-11.1	1.2 ... 13.0(C3)
18	2.7, 12.7%, 0.4	0.20	57.6	31.3	-62.4	6 ... 120

Tab. 27. Die mit REDCAT berechneten Werte für verschiedene Bizeyklen. Alle Proben haben in etwa gleiche Zusammensetzung, mit Ausnahme von Molekül **15**, hier ist nur eine Probe mit niedrigem q-Wert verfügbar.

Die Daten für Molekül **5** konnten nicht verwendet werden, da – wahrscheinlich aufgrund des zusätzlichen hydrophoben Effekts – keine in sich schlüssige Berechnung möglich war.

Die so ermittelten GDO Werte der verschiedenen Bizeklusderivate können nun mit einer geeigneten Probe von **1** als Referenz verglichen werden.

Folgende Probe von **1** in Bicellen wurde aufgrund der guten Übereinstimmung der q-, c- und teilweise auch f-Werte gewählt:

$$q = 3.0, c = 5.0\%, \text{CTAB}, 700 \mu\text{L Puffer}, f = 0.55$$

$$\text{mit einem GDO Wert von } 3.95 \cdot 10^{-3}$$

Molekül	GDO*10 ³	Relative Stärke der Orientierung bezogen auf 1
1	3.95	≡ 1.0
2	0.54	0.14
3	5.87	1.49
4	3.61	0.91
6	2.30	0.58
7	1.90	0.48
8	1.46	0.37
12	3.06	0.77
13	2.30	0.58
15	0.51	0.13
17	1.11	0.28
18	0.20	0.05

Tab. 28. Vergleich der GDO Werte der verschiedenen Bizeyklen und Saccharose (**18**) mit Molekül **1**. Die relative Stärke ist bezogen auf **1**.

Hiermit lässt sich eine Reihenfolge der Bicyklen nach der Stärke ihrer Ausrichtung aufstellen. Um ersehen zu können, in wieweit ein Zusammenhang mit ihren strukturellen Merkmalen besteht, sind, neben der Strukturformel, noch die Konformation des 7-Ringes, das Muster der Wasserstoffbrücken und die Gesamtladung des Moleküls aufgeführt, jene Parameter, welchen im bisherigen Verlauf, eine Bedeutung für den Grad der Orientierung beigemessen wurde.

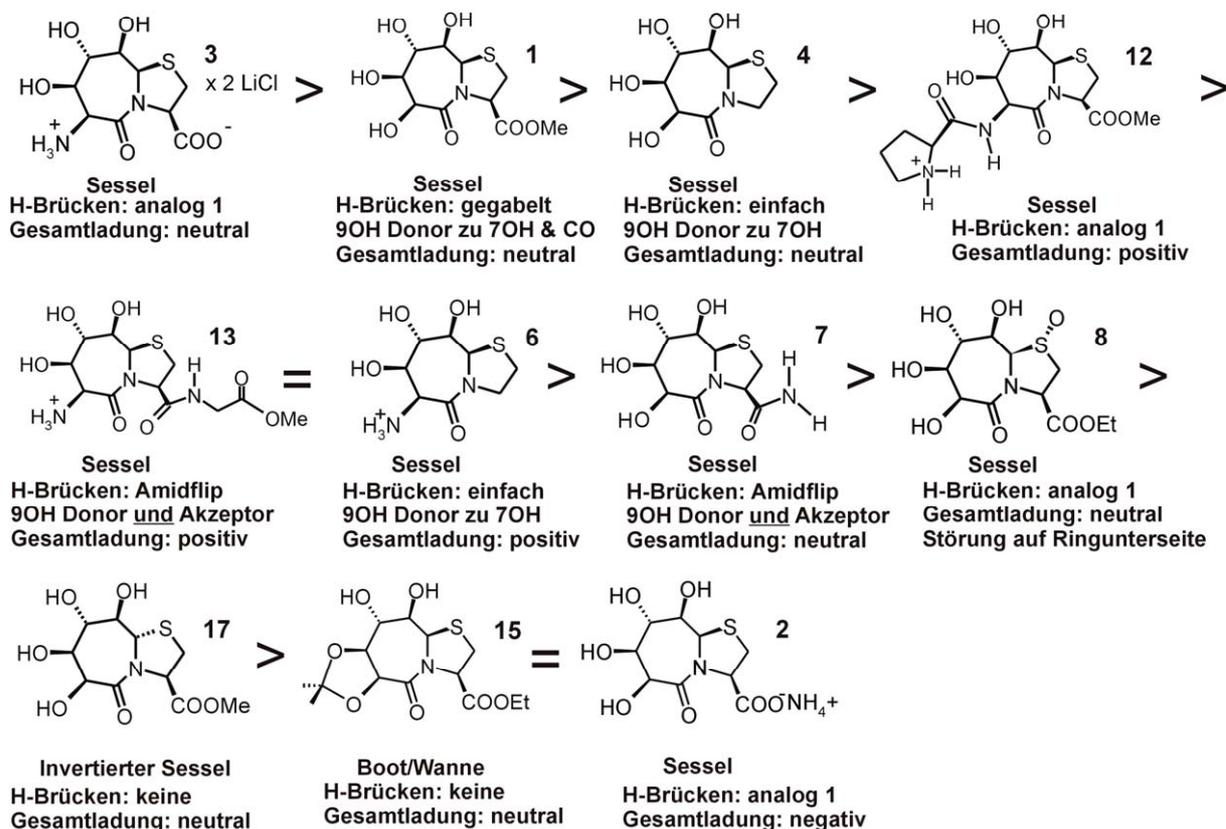


Abb. 72. Strukturen jener Bicyklen, für die ein GDO-Wert berechnet wurde, in der Abfolge ihrer GDO-Werte. Zusätzlich sind nochmals die charakteristischen Strukturmerkmale angegeben.

Die Berechnung der GDO Werte und ihre Darstellung in Abhängigkeit bestimmter Strukturmerkmale lässt folgende Schlussfolgerungen zu:

- **entscheidend ist das Vorhandensein gegabelter H-Brücken von 9OH zu 7OH und zum Carbonyl des Esters, wie sie nur für die „normale“ Sesselkonformation des 7-Ringes möglich ist.**
- **Ist nur eine H-Brücke von 9OH zu 7OH vorhanden, ändert dies den Grad der Ausrichtung geringfügig (Molekül 4).**
- **Ist 9OH sowohl als Donor als auch als Akzeptor an H-Brücken beteiligt (Amidflip) – d. h. ändert sich die „Richtung“ der H-Brücken – so ist ein deutlicher Verlust in der Orientierung zu beobachten.**
- **Systeme, die gar kein solches H-Brückenmuster aufweisen, richten sich mit am schlechtesten aus.**

- Auch die Ladung des Moleküls spielt eine Rolle. Neutrale oder auch zwitterionische Moleküle zeigen die stärkste Ausrichtung, eine positive Gesamtladung mindert die Ausrichtung nur wenig.
- Ist dagegen das Molekül negativ geladen, so besitzt es, trotz eines gegabelten H-Brückenmusters (Molekül 2) eine sehr schwache Ausrichtung, vergleichbar mit Molekülen ohne H-Brücken.
- Auch Störungen auf der Unterseite des Bizeklus, also auf der, den H-Brücken entgegengesetzten Seite, führt zu einer Verminderung der Ausrichtung (Molekül 8).

Somit belegt die Auswertung der RDC Daten durch Tensorbestimmung das Bild, welches bereits aus den Messungen in anisotroper Phase und den STD Messungen zu erkennen war.

9.2.3 GDO Werte für Messungen in Otting Phase

Drei Moleküle, nämlich Molekül **1**, **7** und **15** wurden auch in Otting Phase vermessen. Da die Ausrichtung in dieser Phase nicht so stark ist, waren genügend Daten zur Berechnung der Tensorelemente vorhanden.

Molekül	Probe (%wt, r, V, Konz.)	GDO*10 ³	α [°]	β [°]	γ [°]	Fehlergrenzen [%]
1	5.0, 0.86, 725 μ L, 71 mM	0.82	-57.1	58.9	81.6	1.8 ... 24.3(C9)
7	5.1, 0.89, 700 μ L, 67 mM	0.31	-35.8	271.4	26.3	6.7 ... 32.5(C8)
15	4.8, 0.97, 700 μ L, 34 mM	0.18	-86.4	264.5	-7.4	3 ... 33.3(C8)

Tab. 29. Die, für Moleküle in Otting Phase berechneten, Werte für GDO und die Euler Winkel.

Molekül	GDO*10 ³	α [°]	β [°]	γ [°]
1 in Bicellen	3.95	-69.4	41.5	60.3
1 in Otting Phase	0.82	-57.1	58.9	81.6
7 in Bicellen	1.90	212.5	149.2	10.4
7 in Otting Phase	0.31	-35.8	271.4	26.3
15 in Bicellen	0.51	17.4	72.3	68.7
15 in Otting Phase	0.18	-86.4	264.5	-7.4

Tab. 30. Vergleich der Ergebnisse von Bicellen und Otting Phase für die Moleküle **1**, **7** und **15**.

Für alle drei Moleküle ist die Ausrichtung deutlich schwächer als für die entsprechenden Moleküle in Bicellenlösung. Molekül **1** ist von diesen drei untersuchten Bicyklen immer noch jenes, das sich am stärksten ausrichtet, doch beträgt der GDO Wert für **1** nur ~ 20% des Wertes in Bicellen. Auch für die Moleküle **7** und **15** skaliert sich der GDO Wert ähnlich (**7**: 16%, **15**: 35%). Dass die Euler Winkel unterschiedlich sind, war zu erwarten, da in verschiedenen flüssig-kristallinen Phasen auch eine unterschiedliche räumliche Ausrichtung auftritt.

→ Eine verhältnismässig starke Abschwächung der Orientierung für Molekül **1** kann in Otting Phase nicht beobachtet werden. Alle Werte sind in Otting Phase in etwa um den gleichen Anteil schwächer als in Bicellen – unabhängig von der Stärke der Ausrichtung in Bicellen und von der Molekülstruktur.

9.3 Graphische Darstellung der, um die Euler Winkelwerte rotierten, Strukturen

Die Euler-Winkel α , β und γ überführen den Basiskoordinatensatz eines Moleküls – der in den hier vorliegenden Fällen aus den Kristallstrukturdaten besteht – in den sog. Principal Alignment Frame (PAF). Normalerweise ist dies von Nutzen, wenn ein grösseres Molekül in kleine, starre Untereinheiten zerlegt wird und für diese einzeln die Tensoraten bestimmt werden. Um nun ein den Ergebnissen der RDC Analyse gerechtfertigtes Gesamtsystem zu erhalten, müssen alle Fragmente in einen gemeinsamen Koordinatensatz überführt werden, der auch die Ergebnisse der Tensorberechnungen berücksichtigt. Dies ist der sog. PAF.^{20c, e}

Für die hier untersuchten kleinen Moleküle ist dies nur für Systeme möglich, die vom gleichen Basiskoordinatensatz ausgehen, für die also dieselben Kristallstrukturdaten zur Tensorberechnung verwendet wurden.

Hier ist es besonders sinnvoll, stark und schwach orientierende Systeme mit gleicher 7-Ringkonformation zu wählen.

Daher ist nachfolgend der Vergleich der rotierten Strukturen der Moleküle **1**, **2** und **7**, für die jeweils die Kristallstruktur von **1** als Basiskoordinatensatz verwendet wurde, dargestellt.

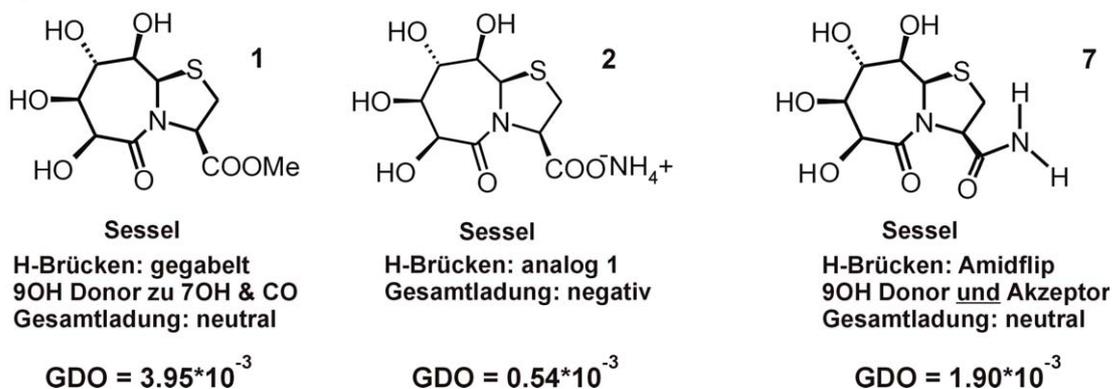
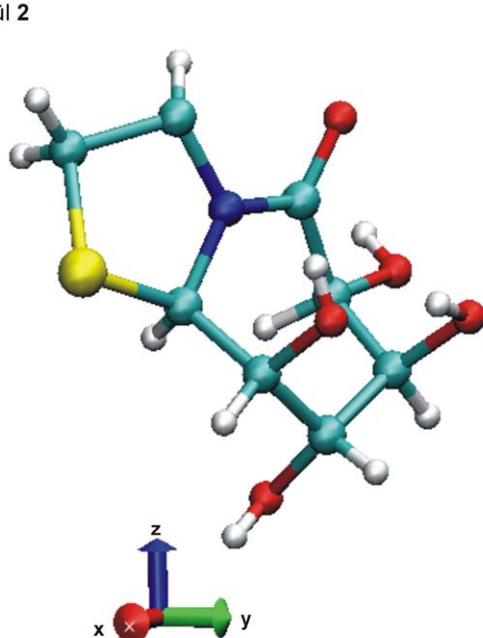


Abb. 73. Strukturen und kurze Charakterisierung der Moleküle, für die die rotierten Koordinaten verglichen werden können.

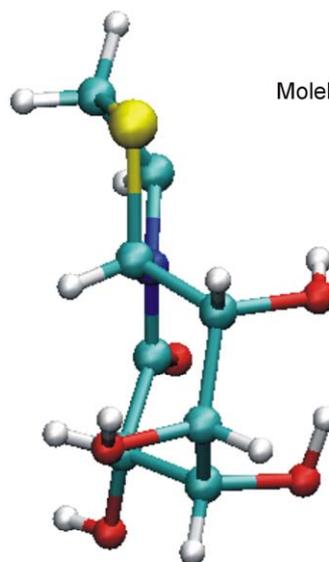
Die Strukturen sind in Form ihrer rotierten Koordinaten ohne die funktionelle Gruppe in Position 3 (COOMe, COOH, CONH₂) dargestellt. Die OH Gruppen sind dargestellt, um so die Unterscheidung von Ringober- und Unterseite zu erleichtern. Wie die OH Gruppen zueinander orientiert sind, hat mit ihrer tatsächlichen Orientierung in Lösung allerdings nichts zu tun.

Nur die Orientierung des 7,5-bizyklischen Grundgerüsts ist von Interesse.

Molekül 2



Molekül 1



Jeweils ohne Rest R in Position 3 (COOMe bzw. COOH)

Abb. 74. Molekül 1 und 2 in demselben Koordinatensystem (dargestellt mit VMD 1.8.2).

In Bezug auf die z-Achse ist **1** annähernd parallel dazu orientiert, wohingegen **2** fast um 90° um die z-Achse gedreht und zusätzlich leicht gegen z verkippt erscheint.

Die nicht dargestellte funktionelle Gruppe in Position 3 zeigt im Falle von Molekül **2** aus der Bildebene heraus, wohingegen diese für **1** in etwa in Richtung der y-Achse orientiert ist, also ca. 90° gedreht zur betreffenden Gruppe in **2**.

Wichtig ist auch, dass dies nicht die einzig mögliche Orientierung zueinander ist, denn eines oder beide Moleküle können um 180° gekippt sein (in Bezug auf die z-Achse) und selbstverständlich ist eine uneingeschränkte Rotation um die z-Achse möglich.

Das so entstandene Bild der Orientierung von **1** unter Berücksichtigung seiner RDC Daten, sieht jenem, das aufgrund von STD Daten und Strukturdaten in Abb. 70 gezeigt ist, sehr ähnlich.

Somit führen die strukturell abgeleiteten, aus NMR Daten resultierenden, und die gerechneten, ebenfalls aus NMR Daten resultierenden, Ergebnisse zu einem in sich schlüssigen Gesamtbild.

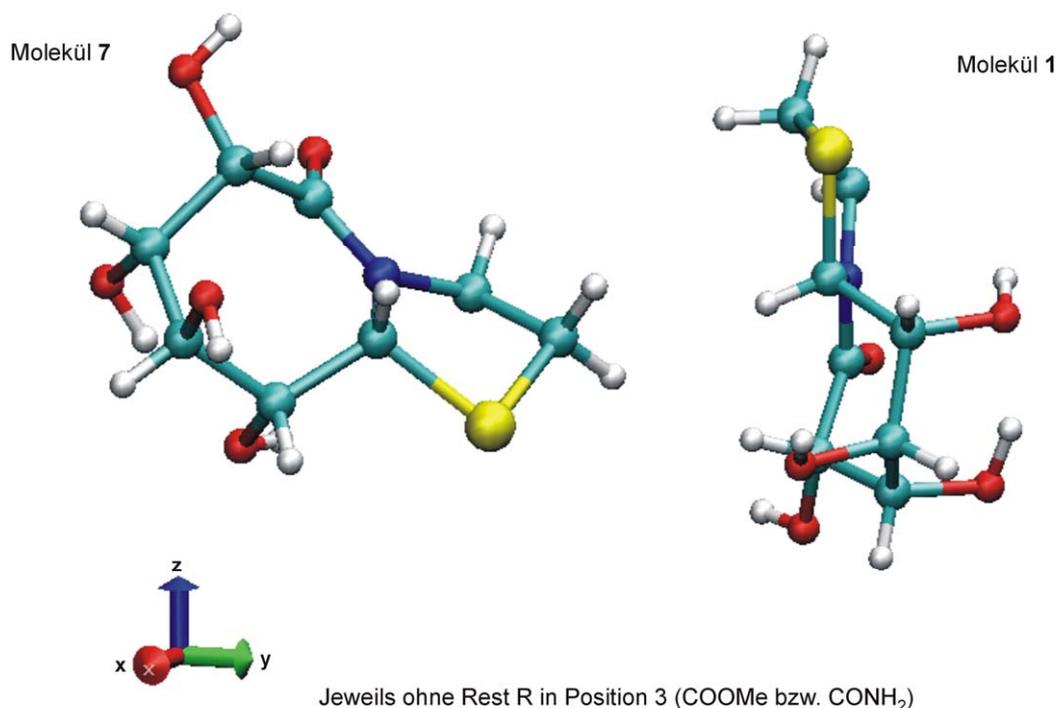


Abb. 75. Vergleich der rotierten Strukturen von **1** und **7**.

Molekül **7** ist wiederum um ca. 90° - wie schon Molekül **2** – im Vergleich zu **1** um die z-Achse gedreht und zusätzlich stark gegen die z-Achse gekippt.

Entscheidend ist, dass sowohl für Molekül **2** als auch für Molekül **7** die Oberseite des Ringes mit den OH-Gruppen im Vergleich zu **1** um 90° (bezogen auf z) gedreht ist. Man könnte mutmassen, dass im Falle eines geänderten H-Brückenmusters (Molekül **7**) dieses so ungünstig für die Wechselwirkung mit der Bicellenoberfläche ist, dass sich das betreffende Molekül maximal von dieser Orientierung zu entfernen versucht, was einer Drehung des Systems um 90° um die z-Achse entspricht.

Ebenso verhält es sich mit einer negativen Ladung in Position 3 (Molekül **2**). Auch hier ist die betreffende Gruppe um 90° um die z-Achse gedreht im Vergleich zu **1**.

10. Zusammenfassung

Für die hier untersuchten, bityklischen Thiazolidinlactame kann eine strukturabhängige, ultra-schwache Wechselwirkung mit planaren Phosphocholinbilayern gezeigt werden.

Diese ist so schwach, dass sie mit gängigen NMR Titrationsmethoden nicht verfolgt werden kann, da keine erkennbare Änderung der chemischen Verschiebung zu beobachten ist.

Nur mit Hilfe von STD Messungen und durch die Analyse der residualen, dipolaren Kopplungen kann die Strukturabhängigkeit untersucht werden, wobei letztere eine quantitative Abschätzung erlauben. Systeme mit Affinität an die Modellmembran von Bicellen zeigen eine ungewöhnlich starke Ausrichtung in flüssig-kristalliner Phase mit sehr grossen Werten für $^1D_{CH}$. Auch die Berechnung der entsprechenden Tensorparameter zeigt einen sehr hohen Orientierungsgrad – der sog. GDO Wert ist im Bereich von 10^{-3} , ca. eine Grössenordnung mehr, als für kleine, polare Moleküle üblich.

Für die strukturelle Abhängigkeit der Membranaffinität konnte gezeigt werden, dass die Orientierung der OH Gruppen zueinander und das hieraus resultierende H-Brückenmuster entscheidend sind, ebenso wie die Gesamtladung des Moleküls, wobei neutrale und zwitterionische Systeme die stärkste Ausrichtung (bei „passendem“ H-Brückenmuster) erfahren, eine positive Gesamtladung zu einer leichten Abschwächung der Ausrichtung und eine negative zu einer starken Abschwächung der Wechselwirkung mit der Membran führt.

Unter Zuhilfenahme einiger Annahmen konnte auch ein Wert für die Dissoziationskonstante dieser Komplexbildung ermittelt werden. Sie liegt im Bereich von 30 M – einem mit klassischen NMR Titrations unzugänglichen Bereich – mit einer Komplexkonzentration von unter 1% für ein sich stark orientierendes, also mit der Membran wechselwirkendes, Molekül. Im Vergleich dazu ist die Dissoziationskonstante eines Moleküls gleicher Konformation, jedoch geänderten H-Brückenmusters, mit nur geringer Ausrichtung um einen Faktor von ca. 4-5 grösser ($K_d \sim 140$ M), mit einem Komplexanteil von unter 0.1%.

Mit diesen Untersuchungen kann gezeigt werden, welche Auswirkungen auch nur geringste, strukturelle Änderungen auf eine so wichtige Eigenschaft wie die Membranaffinität von Substanzen haben. Dies ist von besonderem Interesse, um die Wirkungsweise von Medikamenten oder auch die Vorgänge an der Zellmembran auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

Mit dem Einsatz der residualen, dipolaren Kopplungen für die Beurteilung extrem schwacher, ansonsten über NMR nicht (oder nur qualitativ) zugänglicher, Wechselwirkungen, kann der Anwendungsbereich dieser NMR Grösse erweitert werden.

11. Literaturstellen

- [1] a) Prestegard J. H.; Al-Hashimi H. M.; Tolman J. R. *Quarterly Rev. Biophys.* **2000**, *33*, 371-424. b) Brunner E. *Concepts Magn. Res.* **2001**, *13*, 238-259. c) de Alba E.; Tjandra N. *Prog. Nuc. Magn. Res. Spectr.* **2002**, *40*, 175-197.
- [2] Prestegard J. H.; Bougault C. M.; Kishore A. I. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3519-3540.
- [3] a) Sanders C. R. II; Landis G. C. *Biochem.* **1995**, *34*, 4030-4040. b) Sanders C. R. II; Schwonek J. P. *Biochem.* **1992**, *31*, 8898-8905. c) Losonczi J. A.; Prestegard J. H. *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 447-451.
- [4] a) Vold R. R.; Prosser R. S. *J. Magn. Reson. B* **1996**, *113*, 267-271. b) Ottiger M.; Bax A. *J. Biomol. NMR* **1998**, *12*, 361-372. c) Sternin E.; Nizza D.; Gawrisch K. *Langmuir* **2001**, *17*, 2610-2616.
- [5] a) Struppe J.; Vold R. R. *J. Magn. Reson.* **1998**, *135*, 541-546. b) Prosser S. R.; Hwang J. S.; Vold R. R. *Biophys. Journal* **1998**, *74*, 2405-2418. c) Glover K. J.; Whiles J. A.; Wu G.; Yu N.-J.; Deems R.; Struppe J. O.; Stark R. E.; Komives E. A.; Vold R. R. *Biophys. Journal* **2001**, *81*, 2163-2171.
- [6] Rowe B. A.; Neal S. L. *Langmuir* **2003**, *19*, 2039-2048.
- [7] M. Rueckert, G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7793-7797.
- [8] a) Rundlöf T.; Landersjö C.; Lycknert K.; Maliniak A.; Widmalm G. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 773-776. b) Landersjö C.; Höög C.; Maliniak A.; Widmalm G. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 5618-5624. c) Neubauer H.; Meiler J.; Peti W.; Griesinger C. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 243-258. d) Martin-Pastor M.; Bush C. A. *Biochem.* **2000**, *39*, 4674-4683. e) Martin-Pastor M.; Bush C. A. *Carb. Res.* **2000**, *323*, 147-155. f) Tian F.; Al-Hashimi H. M.; Craighead J. L.; Prestegard J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 485-492. g) Azurmendi H. F.; Martin-Pastor M.; Bush C. A. *Biopolymers* **2002**, *63*, 89-98. h) Freedberg D. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2358-2362.
- [9] a) Middleton D. A.; Reid D. G.; Watts A. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 507-514. b) Wang J.; Schnell J. R.; Chou J. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *324*, 212-217. c) Middleton D. A.; Hughes E.; Madine J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9478-9479. d) Lambruschini C.; Relini A.; Ridi A.; Cordone L.; Gliozzi A. *Langmuir* **2000**, *16*, 5467-5470.
- [10] a) Gemmecker G. *NMR Spectroscopy in drug development and analysis*, Eds.: Holzgrabe U.; Waver I., Wiley, **1999**, 135-154. b) Meyer B.; Peters T. *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890-918. c) Chen A.; Shapiro M. J. *Analytical Chem. News and Features*

A **1999**, 669-675. d) Koenig B. W. *ChemBioChem* **2002**, 3, 975-980. e) Blommers J. J.; Ruedisser S. *BioNMR in Drug Research*, Ed.: Zerbe O., Wiley VCH, Weinheim, **2003**, 367-369.

[11] a) Dirk Bockelmann, *Diplomarbeit*, Universität Konstanz, **1998**. b) Frank Moser, *Diplomarbeit*, Universität Konstanz, **1999**. c) Peter Tremmel, *Diplomarbeit*, Universität Konstanz, **2000**. d) Peter Tremmel, *Dissertation*, Universität Regensburg, **2004**.

[12] Gaemers S.; Bax A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12343-12352.

[13] (a) Mikkat S.; Effmert U.; Hagemann M. *Arch. Microbiol.* **1997**, 167, 112-118. (b) Page-Sharp M.; Behm C. A.; Smith G. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1472, 519-528. (c) Wingler A. *Phytochemistry* **2002**, 60, 437-440. d) Turner S.; Senaratna T.; Touchell D.; Bunn E.; Dixon K.; Tan B. *Plant Science* **2001**, 160, 489-497. e) Tachibana Y.; Fletcher G. L.; Fujitani N.; Tsuda S.; Monde K.; Nishimura S.-I. *Angew. Chem.* **2004**, 116, 874-880. f) Sola-Penna M.; Meyer-Fernandes J. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 360, 10-14.

[14] a) Cerny I.; Budesinsky M.; Truka T.; Cerny M. *Carb. Res.* **1984**, 130, 103-114. b) Bernet B.; Vasella A. *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 995-1021. c) Uhlmann P.; Vasella A. *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 1979-1994.

[15] a) Sanders C. R. II; Prestegard J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1987-1996. b) Sanders C. R. II; Prestegard J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7096-7107. c) Aubin Y.; Prestegard J. H. *Biochemistry* **1993**, 32, 3422-3428. d) Aubin Y.; Ito Y.; Paulson J. C.; Prestegard J. H. *Biochemistry* **1993**, 32, 13405-13413.

[16] a) Martin S. F.; Josey J. A.; Wong Y.-L.; Dean D. W. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 4805-4820. b) Gröbner G.; Glaubitz C.; Watts A. *J. Magn. Reson.* **1999**, 141, 335-339. c) Martin S. F.; Pitzer G. E. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1464, 104-112.

[17] a) Klein J.; Meinecke R.; Mayer M.; Meyer B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 5336-5337. b) Vogtherr M.; Peters T. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6093-6099.

[18] a) Kerssebaum R. *DOSY and Diffusion by NMR, Users Guide for XWinNMR 3.1/3.5, Version 1.0*, Bruker: Rheinstetten, **2002**. b) Johnson Jr. C. S. *Prog. Nuc. Magn. Res. Spectr.* **1999**, 34, 203-256. c) Claridge T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon:Oxford, **1999**, 368-371. d) Lin M.; Shapiro M. J.; Wareing J. R. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 8930-8931. e) Bleicher K.; Lin M.; Shapiro M. J.; Wareing J. R. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8486-8490. f) Dolores Diaz

M.; Berger S. *Carb. Res.* **2000**, 329, 1-5. g) Yan J.; Kline A. D.; Mo H.; Zartler E. R.; Shapiro M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9984-9985.

[19] Tristram-Nagle S.; Petrache H. I.; Nagle J. F. *Biophys. J.* **1998**, 75, 917-925.

[20] a) Valafar H.; Prestegard J. H. *J. Magn. Reson.* **2004**, 167, 228-241. b) Saupe A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1968**, 7, 97-112. c) Losonczi J. A.; Andrec M.; Fischer M. W. F.; Prestegard J. H. *J. Magn. Reson.* **1999**, 138, 334-342. d) Tolman J. R.; Al-Hashimi H. M.; Kay L. E.; Prestegard J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 1416-1424. e) Valafar H. *Manual for REDCAT* at <http://tesla.ccruc.uga.edu/software/REDCAT/>

[21] Rauscher K.; Voigt J.; Wilke I.; Wilke K.-Th.; Friebe R. *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*, Verlag Harri Deutsch, Frankfurt/Main, 9. Auflage, **1993**, 162-168.

Kapitel V

Struktur und Dynamik zyklischer Jasplakinolid Analoga

1. Jasplakinolid – ein zyklisches Depsipeptid – Allgemeines

Bei Jasplakinolid – auch als Jaspamid bezeichnet – handelt es sich um einen aus dem marinen Schwamm Jaspis (Jaspis Johnstoni bzw. Jaspis splendans) isolierbaren 19-gliedrigen Makrozyklus. Wie Abb. 1 zeigt, ist Jasplakinolid aus den drei Aminosäuren *L*-Alanin, 2-bromo-*N*-methyl-*D*-Tryptophan und β -Tyrosin aufgebaut und enthält zusätzlich eine Polypropioneinheit, mit einer 11 Kohlenstoffe umfassenden Hydroxysäure. Letztgenannte Einheit ist über eine Esterbindung mit der β -Tyrosineinheit verknüpft.¹ Daher spricht man auch von einem Depsipeptid, d. h. es liegt eine peptidische Struktur vor, in der eine oder mehrere Amidbindungen gegen Esterbindungen ausgetauscht sind.

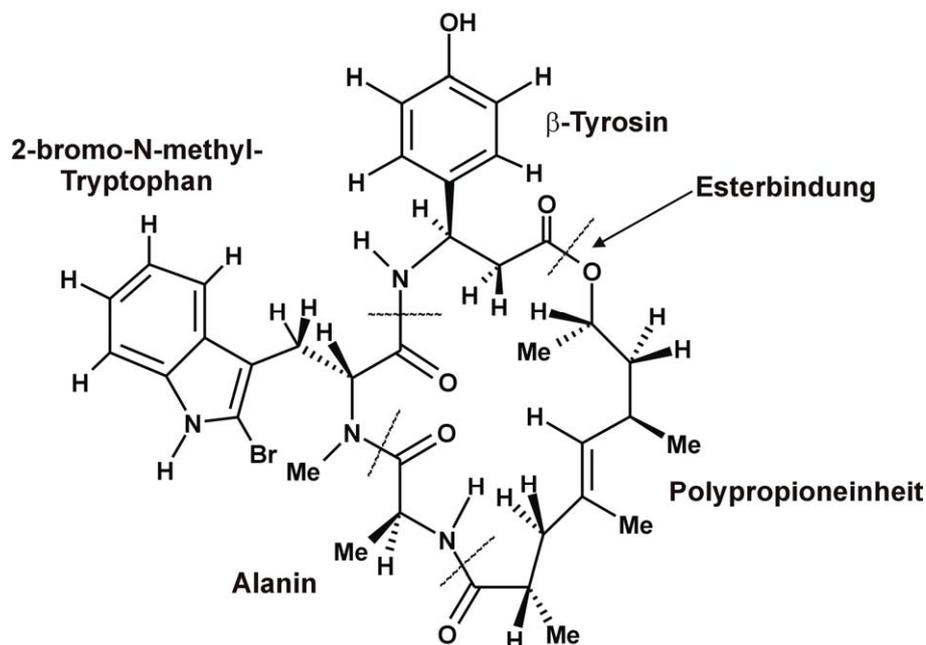


Abb. 1. Struktur und Untereinheiten von Jasplakinolid.

Es wurden auch Derivate des ursprünglichen Jasplakinolids, die Modifikationen in der Polypropioneinheit aufweisen, isoliert.²

Die asymmetrische Totalsynthese von Jaspamid wurde 1991 durch Chu et al.³ beschrieben, mit einer Gesamtausbeute von 6.6%.

Die Aufklärung der Struktur von Jasplakinolid wurde in¹ beschrieben, wobei hier auf eine genauere Untersuchung der Struktur in Lösung verzichtet wurde. Letzteres und die Dynamik des Makrozyklus in Lösung wurden durch Inman et al.⁴ mit Hilfe von NMR Spektroskopie und Molecular Modeling aufgeklärt. Hierauf wird noch genauer eingegangen werden, handelt es sich doch bei den untersuchten makrozyklischen Systemen um zu Jasplakinolid analoge Strukturen.

Jasplakinolid wurde, wie eine Vielzahl anderer, aus marinen Organismen isolierter, Makrozyklen, auf mögliche pharmakologische bzw. therapeutische Eigenschaften hin getestet. So zeigt Jasplakinolid z. B.

- in vitro eine hohe Cytotoxizität gegen Tumorzellen⁴
- in vitro und in vivo eine hohe Aktivität gegen *Candida albicans*, eine Pilzart¹
- einen stimulierenden Effekt auf die Polymerisation von Actin in vitro und in vivo⁵
- komplexierende Eigenschaften für Li⁺ Ionen⁶

Im Rahmen präklinischer Studien wurde Jasplakinolid bereits für die Behandlung von Prostata- und Hautkrebs in vivo getestet.⁷

Um die Wechselwirkungen zwischen einem biologisch aktiven Naturstoff und dem entsprechenden zellulären Rezeptor untersuchen zu können, bedarf es sehr häufig passender Analoga, welche sich in der einen oder anderen Weise von ihrem natürlichen Vorbild unterscheiden und im Labor synthetisiert werden können.

So hat die Arbeitsgruppe um Prof. Martin E. Maier, Universität Tübingen, schon verschiedene Analoga, wie z. B. zu Hapalysin, synthetisiert und strukturell untersucht.⁸ Hierbei werden die einzelnen Einheiten eines makrozyklischen Systems mit klassischer, asymmetrischer Synthese dargestellt; der Aufbau des Ringes oder seines Vorläufermoleküls erfolgt dann an der Festphase.

Eine wichtige Methode zur Untersuchung von biologischen Systemen ist der Einsatz von modifizierten Verbindungen, wobei die Auswirkungen der Modifikationen auf die Struktur/Konformation entscheidend sind. Die Methode der Wahl für Substanzen in Lösung ist die NMR Spektroskopie, auch weil durch diese Messmethode Aussagen über die Dynamik eines Systems möglich sind. Die so erlangten Ergebnisse geben, nach entsprechenden biologischen Tests, Aufschluss darüber, welche Strukturmerkmale essentiell für die biologische Wirksamkeit sind.

Im folgenden Kapitel soll auf vier zu Jasplakinolid analoge Makrozyklen genauer eingegangen werden. Ihre Struktur, als auch ihre Dynamik werden mit Hilfe der NMR Spektroskopie aufgeklärt und diese Ergebnisse mit den literaturbekannten Daten⁴ für Jasplakinolid verglichen.

2. 19-gliedrige, peptidische Jasplakinolid Analoga

2.1 Allgemeines

Vergleicht man die Strukturen der hier untersuchten Makrozyklen mit Jasplakinolid, so fällt unter anderem ins Auge, dass es sich nicht mehr um Depsipeptide handelt, sondern dass die in Jasplakinolid vorhandene Esterbindung durch eine Amidbindung ersetzt wurde. Ferner wurde 2-bromo-Indol, als Seitenkette des Tryptophans, durch eine Indoleinheit ersetzt und die Phenylseitenkette des Tyrosins in para-Position mit einer Methoxygruppe substituiert.

Anstelle der Polypropioneinheit findet sich jetzt eine 1,3-disubstituierte Phenyleinheit, die stärker fixierend sein soll.

Die Struktur der beiden synthetisierten Makrozyklen unterscheidet sich nur in einer einfachen N-Methylierung.

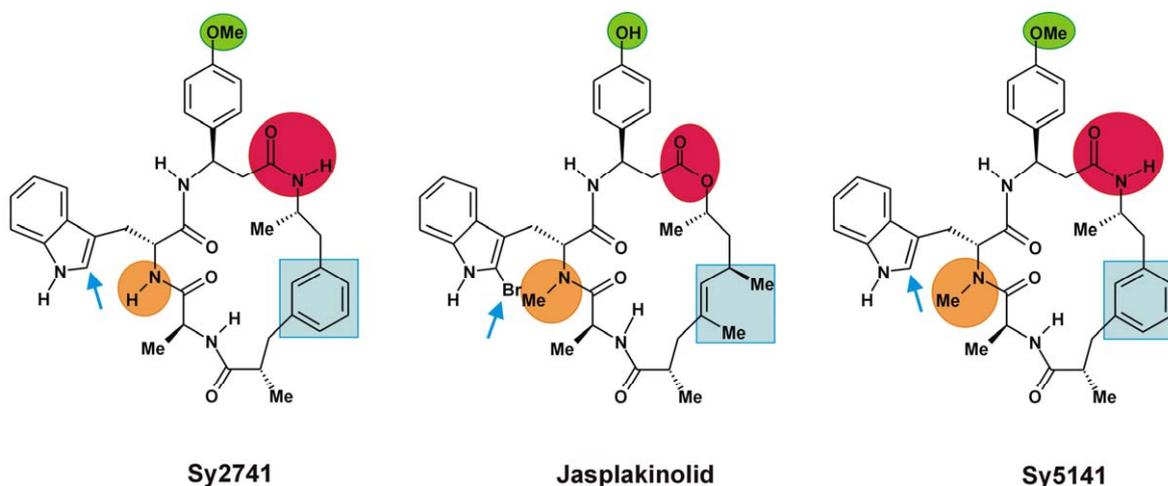


Abb. 2. Unterschiede zwischen dem Naturstoff Jasplakinolid und zwei Analoga aus der Arbeitsgruppe von Prof. M. E. Maier.

Somit ist der N-methylierte Makrozyklus **Sy5141** dem Jasplakinolid ähnlicher als **Sy2741**, welcher im Gegensatz zu **Sy5141** und dem Naturstoff für die betreffende Amidbindung ein freies Amidproton aufweist.

Die im Folgenden gezeigte und auch im weiteren Verlauf verwendete Numerierung für **Sy2741** und **Sy5141** ist nicht analog zur Jasplakinolid Numerierung in der Literatur und ist daher in Abb. 3 wiedergegeben.

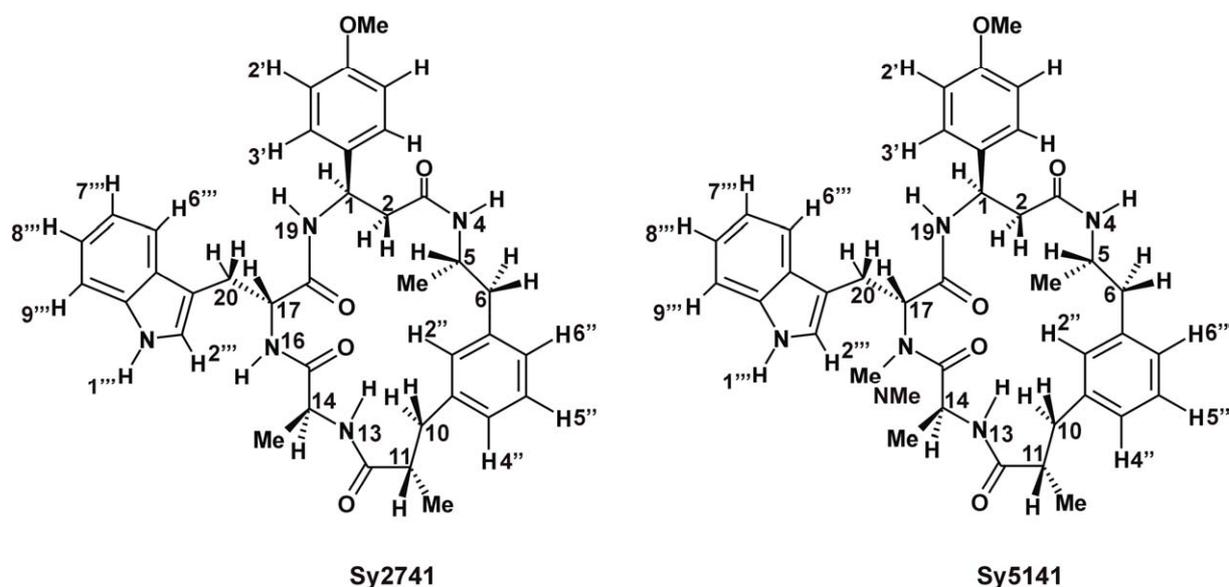


Abb. 3. Die für **Sy2741** und **Sy5141** verwendete Numerierung.

Alle Messungen sind – soweit nicht anders angegeben – bei 300 K und 600.13 MHz Protonenfrequenz in DMSO-d_6 durchgeführt worden. Geeicht ist auf DMSO-d_6 ($\delta_{\text{H}} = 2.49$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39.5$ ppm). Alle ^1H Spektren mit kompletter Zuordnung und alle 2D HMQC-, ROESY- und NOESY-Spektren sind inkl. der zugehörigen ^1H - und ^{13}C -Verschiebungstabellen im experimentellen Teil bzw. im Anhang wiedergegeben.

2.2 Der Makrozyklus **Sy2741**

Die Zuordnung konnte mit Hilfe von 2D DQFCOSY, HMQC und ROESY eindeutig erfolgen.

Wie im ^1H Spektrum (Abb. 4 & 5) von **Sy2741** zu erkennen ist, liegt nur ein Signalsatz vor.

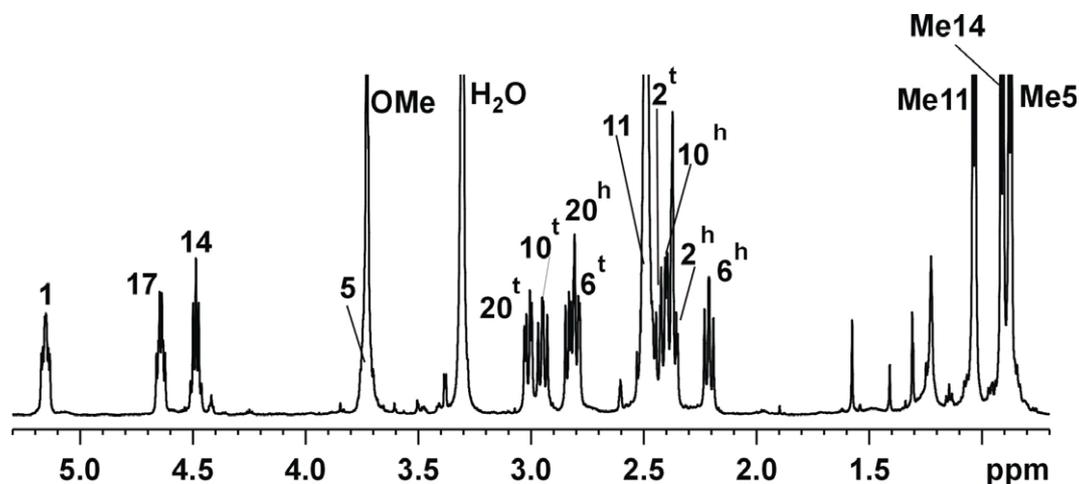


Abb. 4. ^1H Alkylbereich für **Sy2741** in DMSO-d_6 (300 K, 600 MHz).

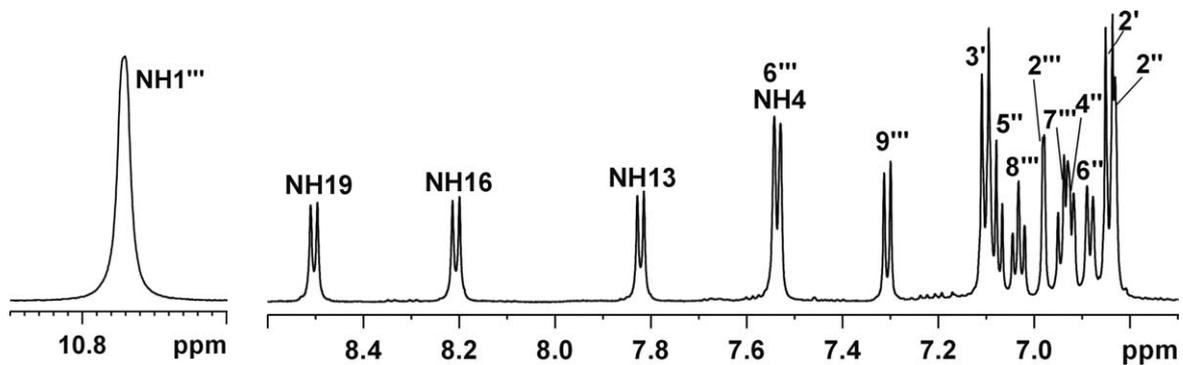


Abb. 5. NH der Indoleinheit (links) und ^1H Aromaten- und NH-Bereich (rechts) für **Sy2741** in DMSO_{d_6} (300 K, 600 MHz).

2.2.1 Temperaturkoeffizienten der NH-Protonen

Einen guten Anhaltspunkt dafür, ob ein NH-Proton an einer Wasserstoffbrücke beteiligt ist, liefert die Temperaturabhängigkeit seiner chemischen Verschiebung δ .⁹ H-Brücken sind generell ein wichtiger Strukturparameter, der Aufschluss über die Konformation eines Systems gibt. In zyklischen Peptiden unterstützen sie nicht selten die Ausbildung von β -Schleifen oder schleifenähnlichen Strukturen.

Es wurden ^1H Spektren zwischen 300 und 340 K, in Schritten von 10 K, aufgenommen und die Änderung der chemischen Verschiebung δ aller NHs gegen die Änderung der Temperatur aufgetragen. Die Steigungen (= Temperaturkoeffizienten) der resultierenden Geraden geben einen guten Anhaltspunkt dafür, ob das betreffende Proton an einer H-Brücke beteiligt ist, und meist ist auch eine grobe Abschätzung der Stärke der vorliegenden Wasserstoffbrücke möglich.

Die gängige Einteilung für Amidprotonen ist wie folgt:⁹

Steigung kleiner als $ -2 \text{ ppb/K} $:	Proton ist an einer H-Brücke beteiligt
Steigung $> -2 $ und $< -4 \text{ ppb/K} $:	transiente H-Brücke (GGW zwischen inter-/intramolekularer und zum LM hin orientierter H-Brücke)
Steigung grösser als $ -4 \text{ ppb/K} $:	keine H-Brücke vorliegend; Orientierung zum Lösungsmittel hin

Anhand der Auftragung der Differenz der chemischen Verschiebung δ gegen die Differenz der Temperatur konnten für die NH-Protonen in **Sy2741** nach einem linearen Fit der Daten folgende Steigungen erhalten werden:

NH-Atom	Steigung [Hz/K]	Steigung [ppb/K]
NH1'''	-2.2	-3.6
NH19	-2.2	-3.7
NH16	-3.0	-5.0
NH13	-3.6	-6.0
NH4	-2.4	-4.1

Tab. 1. Aus der Temperaturmessung ermittelte Steigungen für die NH-Protonen in **Sy2741**.

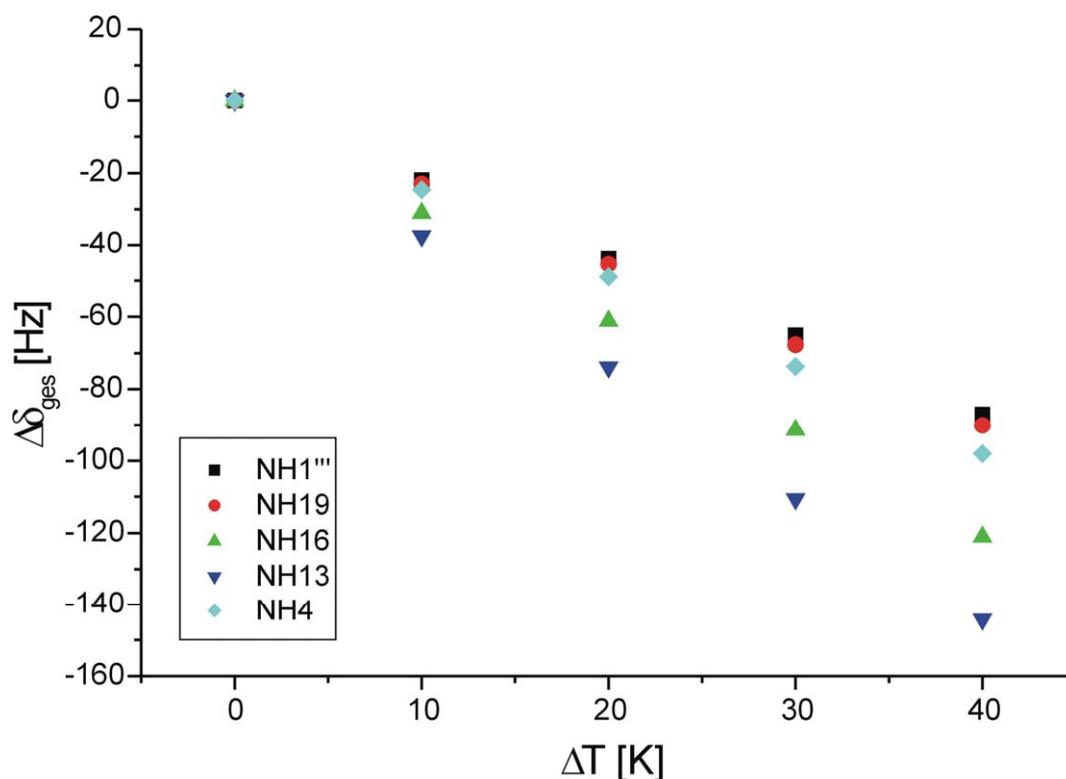


Abb. 6. Graphische Darstellung der Temperaturreihe für die NH-Protonen. $\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz] und ΔT [K] jeweils bezogen auf 300 K.

Die entsprechenden ^1H NMR Spektren der Temperaturmessung und eine Tabelle mit den exakten Werten für die Änderung der Verschiebung [Hz] sind im experimentellen Teil bzw. im Anhang wiedergegeben.

Ergebnis:

Für die Protonen **NH13**, **NH16** und **NH4** kann die Beteiligung an einer Wasserstoffbrücke mit grosser Sicherheit ausgeschlossen werden. Der Temperaturkoeffizient für **NH19** liegt im Grenzbereich zum Vorliegen einer transienten H-Brücke. Bei **NH1'''** handelt es sich nicht um ein amidisches Proton, so dass hier keine Aussage über eine Beteiligung an einer H-Brücke gemacht werden kann.

2.2.2 Prochirale Zuordnung der Methylenprotonen

Sy2741 besitzt vier verschiedene CH₂-Gruppen, welche an den Positionen 2, 6 und 10 innerhalb des makrozyklischen Rings bzw. an Position 20 in der Indolseitenkette lokalisiert sind.

Anhand der ³J_{HH} Kopplungen (CH₂/CH) zum nächsten Nachbarn und der unterschiedlichen ROE Muster kann sowohl eine prochirale Zuordnung der Methylenprotonen, als auch eine Bestimmung des Rotamerenverhältnisses erfolgen.

Wie schon Abb. 4 gezeigt hat, sind die Protonen der CH₂-Gruppen mehr oder minder stark aufgespalten, so dass eine Analyse ihrer J_{HH} Kopplungen möglich ist. Die Analyse der Kopplungen wurde in dem Programm 1D WINNMR mit der Funktion „Multi-plett Analysis“ durchgeführt.

${}^2J_{\text{H20h, H20t}} = 14.6 \text{ Hz}$	${}^3J_{\text{H20h, H17}} = 9.3 \text{ Hz}$ ${}^3J_{\text{H20t, H17}} = 5.3 \text{ Hz}$
${}^2J_{\text{H10h, H10t}} = 11 \text{ Hz}$	${}^3J_{\text{H10h, H11}} = 2.7 \text{ Hz}$ ${}^3J_{\text{H10t, H11}} = 13.7 \text{ Hz}$
${}^2J_{\text{H6h, H6t}} = 13 \text{ Hz}$	${}^3J_{\text{H6h, H5}} = 10.6 \text{ Hz}$ ${}^3J_{\text{H6t, H5}} = 3.7 \text{ Hz}$
${}^2J_{\text{H2h, H2t}} = 13.6 \text{ Hz}$	${}^3J_{\text{H2h, H1}} = 4.3 \text{ Hz}$ ${}^3J_{\text{H2t, H1}} = 10.4 \text{ Hz}$

Tab. 2. J_{HH} Kopplungen für CH₂-Protonen in **Sy2741**.

Tab. 2 zeigt bereits, dass die CH₂-Gruppen der Positionen 10, 6 und 2 relativ wenig Beweglichkeit aufweisen, da die ³J_{HH} Kopplungen mit einer grossen und einer kleinen Kopplung typisch für eine definierte anti- bzw. gauche-Anordnung zum Nachbarproton sind. Folglich ist also ein mögliches Rotamer eindeutig gegenüber den beiden anderen bevorzugt.

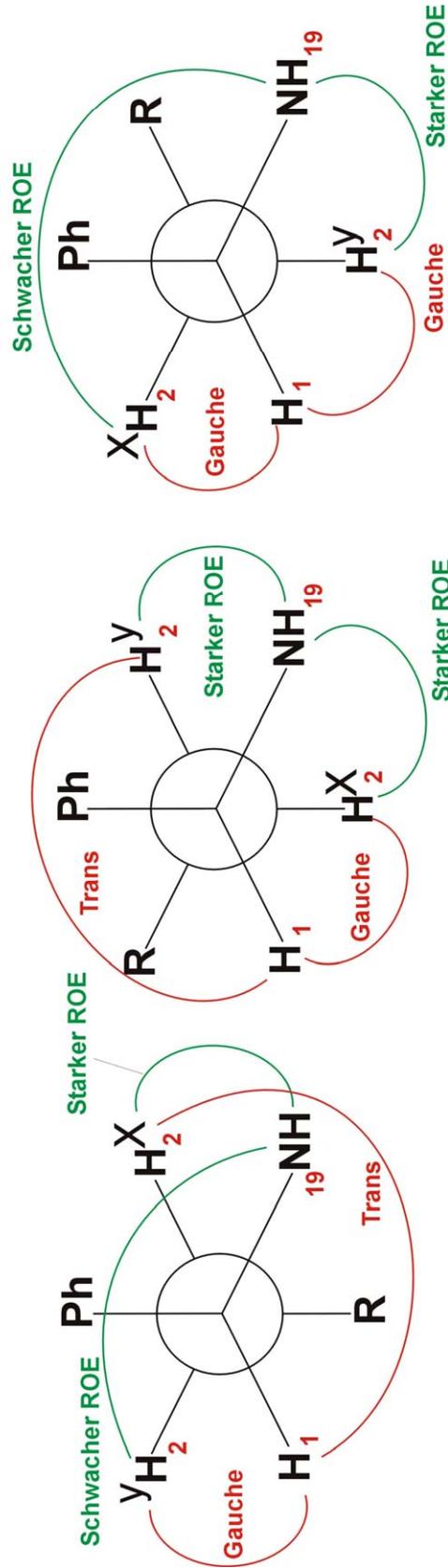
Für die CH₂-Gruppe an Position 20 ist dieses Verhalten nicht mehr ganz so deutlich ausgeprägt, d. h. hier kommt man bereits in den Bereich für gemittelte Kopplungen, welche aufgrund von mehreren, gleichberechtigt nebeneinander auftretenden, Rotameren zustande kommen.

Welches Rotamer als Hauptrotamer vorliegt bzw. welche Rotamere gleichberechtigt vorliegen, kann über die unterschiedlichen ROEs ermittelt werden.

Prochirale Zuordnung für H_2^h / H_2^t

Experimentelle Daten:

$^3J_{H_1, H_2} = 4.3 \text{ Hz} / 10.4 \text{ Hz}$ ROE NH19 - H_2^t → stärker (2.55 A) ROE NH19 - H_2^h → schwächer (3.05 A)
 ROEs: $H_1 - H_2^t$ 2.6 A, $H_1 - H_2^h$ 2.4 A, $H_2^t - NH_4$, $H_2^t - H_3' = H_2^h - H_3'$



Vorliegende Rotamere

3J 1x trans, 1x gauche

je nach Ausrichtung des N-H sind

2x starker ROE oder 1x starker, 1x schwacher ROE möglich

Prochirale Zuordnung über die zusätzlich vorhandenen ROEs möglich

($H_2^t - H_3' = H_2^h - H_3'$)

Nebenrotamer, da
 hier H_1 gauche zu H_2x
und gauche zu H_2y
 exp. Daten →
 3J 1x trans, 1x gauche

→ $H_2x = H_2^t = \text{proS}$ → $H_2y = H_2^h = \text{proR}$

Abb. 7. Ermittlung der prochiralen Zuordnung am Beispiel der CH_2 -Gruppe an Position 2.

Analog lassen sich die CH_2 -Gruppen der Positionen 6, 10 und 20 untersuchen. Die hierzu gehörigen Abbildungen sind im experimentellen Teil wiedergegeben.

Somit ergeben sich folgende prochiralen Zuordnungen der Methylenprotonen in **Sy2741**:

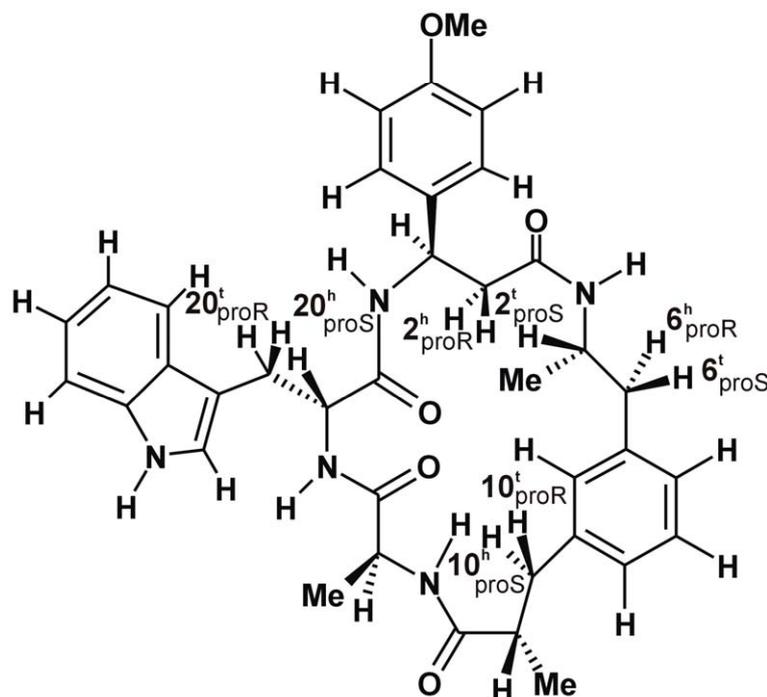


Abb. 8. Prochirale Zuordnung der Methylenprotonen in **Sy2741**.

2.2.3 Strukturermittlung mit Hilfe von ROESY- und NOESY-Daten

Eine Vielzahl von ROEs innerhalb des makrozyklischen Rings und zwischen Seitenketten und Ringprotonen konnten eindeutig identifiziert werden. Da wie in 2.2.2 bereits gezeigt, die CH₂-Gruppen alle aufgespalten sind, konnte der ROE zwischen den Protonen einer CH₂-Gruppe (ROE zwischen geminalen Protonen) als Eichabstand verwendet werden, in diesem Fall der ROE zwischen H6^h und H6^t ($\approx 1.8 \text{ \AA}$).

Die Liste mit allen ermittelten ROEs ist im Anhang wiedergegeben, ebenso weitere 2D ROESY-Ausschnitte, welche für die Strukturermittlung von Relevanz waren.

Als Schwierigkeit bei der weiteren Strukturermittlung zeigte sich, dass der aus dem ROESY erhaltene ROE zwischen H11 und H14 – die Integration ergab einen Abstand entsprechend 2.6 \AA – mit den restlichen ROEs dieser Messung und der daraus berechneten Struktur (siehe weiter hinten) nicht in Einklang gebracht werden konnte. Daher wurde noch ein 2D NOESY ($t_m = 600 \text{ ms}$) aufgenommen, in welchem der betreffende ROE diesmal nur sehr schwach war. Eine Integration der NOESY Daten ergab einen Abstand von 3.4 \AA . Dieser Wert erwies sich, wie im Folgenden erläutert werden wird, in guter Übereinstimmung mit der aus diesen Daten berechneten Struktur.

Es handelt sich bei diesem ROE um ein sog. „falsch positives“ Kreuzsignal. Nur durch das zusätzlich vorhandene NOESY Spektrum konnte dies eindeutig gezeigt werden. Dieser ROE war insofern von besonderem Interesse da es sich hierbei um

einen α - α ROE handelt, welcher nur für eine cis-Amidbindung so intensiv sein kann. Dies ist jedoch im Widerspruch zur ${}^3J_{\text{NH}13, \text{H}14}$ Kopplung, somit musste also eines dieser experimentellen Ergebnisse falsch sein.

Nachfolgend sind die ${}^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ Kopplungen für alle Amidbindungen in **Sy2741** wiedergegeben. Sie besitzen alle relativ grosse Werte, welche typisch sind für Φ -Winkel im Bereich von -120° , wie sie auch in β -Faltblättern vorliegen. Dieser Wert für Φ ist gleichbedeutend mit einem Winkel Θ von 180° . Der Winkel Φ ist definiert über die Protonen: $\text{HN}_i - \text{N}_i - \text{C}_{\alpha i} - \text{HC}_{\alpha i}$, wohingegen Θ ausschliesslich über die Schwertome definiert ist: $\text{C}_{\alpha i-1} - \text{N}_i - \text{C}_i - \text{C}_{\alpha i}$.¹⁰

D. h. alle vorliegenden Amidbindungen befinden sich in der trans-Anordnung.

NH-Proton	${}^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ [Hz]
NH19	8.6
NH16	8.8
NH13	8.1
NH4	7.9

Tab. 3. ${}^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ Kopplungen der amidischen NH-Protonen in **Sy2741**.

Untermuert kann dies dadurch werden, dass die für eine cis-Amidbindung zu erwartenden, intensiven α - α ROEs – für **Sy2741**

H1 – H17

H14 – H17

H11 – H14

nur sehr schwach (H11 – H14: 3.4 Å aus NOESY) sind bzw. gar nicht detektiert werden können.

Alles in allem belegen die NH-Kopplungen und NOESY Daten und die letztendlich hieraus berechnete Struktur somit eindeutig, dass es sich im Falle von H11 – H14 im ROESY Spektrum um einen „falsch positiven“ ROE handelt. Abb. 12 wird dies schematisch noch etwas verdeutlichen. Nur durch die zusätzliche Aufnahme eines NOESY Spektrums und die aus diesen Daten berechnete Struktur konnte dieser Sachverhalt bewiesen werden. Es handelt sich hierbei allerdings um ein in ROESY Spektren des öfteren auftretendes Phänomen, welches nur dann richtig interpretiert, also als solches identifiziert, werden kann, wenn entweder ein NOESY Spektrum, eine grobe Vorstellung von der Struktur des Moleküls oder die gesamte Relaxationsmatrix für das ROESY Spektrum zur Verfügung stehen.

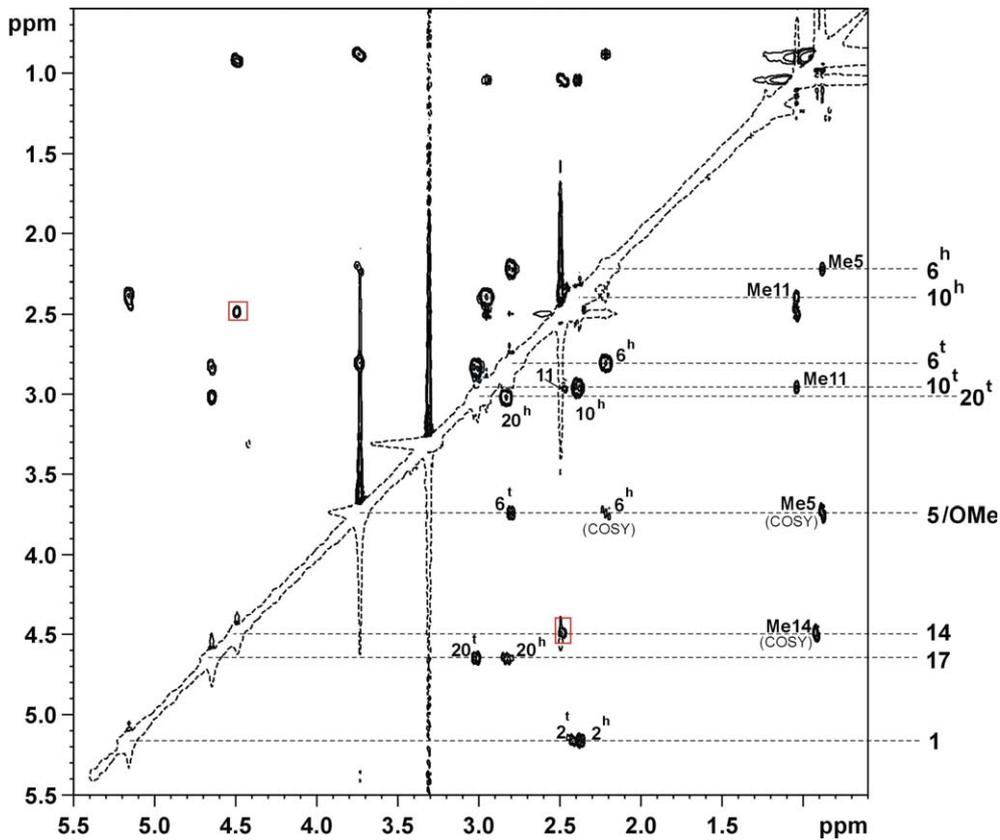


Abb. 9. Alkylbereich des ROESY Spektrums von **Sy2741** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}). Rote Kästchen zeigen den falsch positiven ROE H11 – H14.

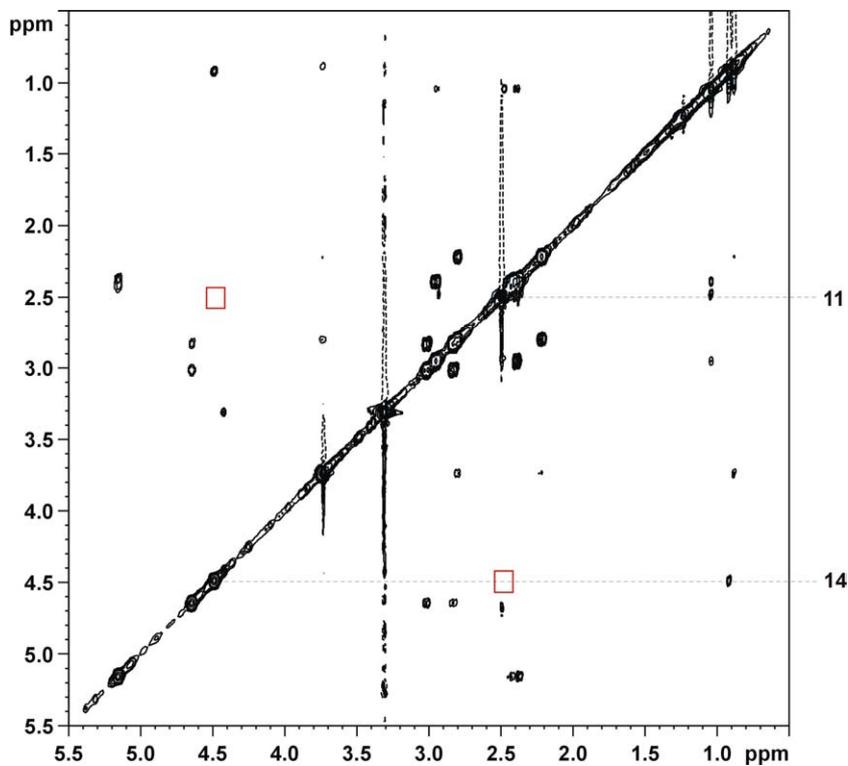


Abb. 10. Alkylbereich des NOESY Spektrums von **Sy2741** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}) bei einer Mischzeit von 600 ms. Auch hier ist der NOE H11 – H14 mit einem roten Kästchen gekennzeichnet. Dieser ist jedoch so schwach, dass er in der vorliegenden Darstellung nicht mehr erkennbar ist.

Ein weiterer Grund, zusätzlich ein NOESY Spektrum aufzunehmen, ist, dass in diesem vorhandene Austauschsignale zu einem zweiten, evtl. nur schwach populierten, Konformer, sehr viel besser zu erkennen sind als im entsprechenden ROESY Spektrum. Im Falle von **Sy2741** konnten keinerlei Austauschsignale im NOESY ($t_m = 600$ ms) identifiziert werden. D. h. **Sy2741** befindet sich in DMSO_{d6} mit keinem anderen Konformer im langsamen Austausch.

Für die durchgeführte MD Simulation (10 x 10ps bei 300 K) wurden folgende ROEs als Restraints gesetzt und aus der energieminierten Struktur (aus Überlagerung aller 10 Snapshots) folgende Abstände erhalten:

ROE	Experimentell ermittelte Abstände [Å]	Aus Rechnung erhaltene Abstände [Å]
NH16 – NH19	3.2	3.35
NH19 – H3'	2.5	2.4
NH16 – NH13	2.8	2.7
NH1'' – H9''	2.8	2.8
NH19 – H1	2.7	2.9
NH19 – H17	2.1	2.1
NH16 – H17	2.8	2.3
NH16 – H14	2.1	2.4
NH13 – H11	2.1	2.15
NH4 – H5	2.65	2.9
NH4 – H6 ^t	2.5	2.45
NH4 – H6 ^h	2.6	2.7
H6'' – H5	2.7	2.7
H4'' – H10 ^t	2.9	3.35
H2'' – H10 ^t	2.5	2.7
H6'' – H6 ^t	2.85	3.6
H2'' – H6 ^t	2.4	2.4
H2'' – H11	2.8	2.6
H4'' – H10 ^h	2.4	2.3
H2'' – H10 ^h	2.9	3.7
H6'' – H6 ^h	2.4	2.9
H2'' – H6 ^h	2.7	3.1
H5 – H6 ^t	2.5	2.6
H14 – H11	3.4	4.1
H20 ^t – H3'	3.4	3.4
H20 ^t – NH19	3.4	3.6
Federkonstante = 7 (default)		
Torsionen [°]		
C17 – C(O) – N – C1	180	-177
C2 – C(O) – N – C5	180	+177
C11 – C(O) – N – C14	180	+168
C14 – C(O) – N – C17	180	+179
Federkonstante = 16 (default)		

Tab. 4. Alle in der MD Simulation für **Sy2741** gesetzten Restraints. Fett gedruckt sind Restraints, die um mehr als 0.4 Å vom gesetzten Wert abweichen.

Die hier als energieminierte Struktur bezeichnete Struktur ergibt sich aus den zehn, während der insgesamt 100 ps dauernden MD Simulation, erhaltenen Snapshots, welche überlagert werden, um daraus eine gemittelte Struktur zu erhalten, die anschliessend noch energieminiert wird. Aus dieser Struktur stammen die ROEs in Tab. 4.

Die meisten schlecht gefitteten ROEs stammen aus dem Bereich des 1,3-derivatierten Phenylrings. Dies lässt darauf schliessen, dass der Phenylring keine definierte Orientierung aufweist, sondern dass er sich vielmehr in einer Pendelbewegung befindet.

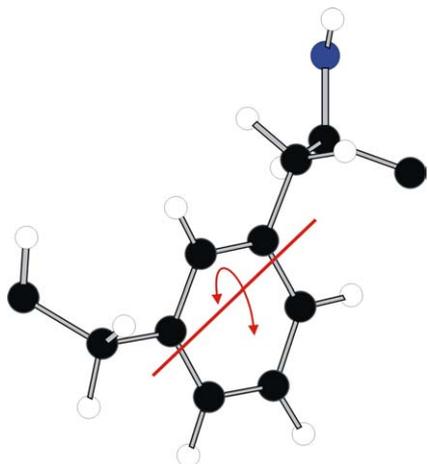


Abb. 11. Pendelbewegung des Phenylringes.

. Dadurch kommt es zu verschiedenen „Einstellungen“ des Phenylringes relativ zum makrozyklischen Rückgrat, so dass die zugehörigen ROEs als Mittel mehrerer verschiedener Orientierungen betrachtet werden müssen. Bei der Pendelbewegung des Phenylringes handelt es sich keineswegs um eine volle Drehung, sondern – so lassen die ROEs vermuten – nur um eine Auslenkung aus seiner Gleichgewichtslage.

Ebenfalls eine Abweichung von mehr als 0.4 Å weisen die ROEs NH16 – H17 und H14 – H11 auf. Für NH16 – H17 ist der Wert aus der gemittelten, gerechneten Struktur um 0.5 Å kleiner als der aus der ROESY Integration erhaltene Wert. Hier könnte evtl. ein gewisser Anteil an TOCSY Transfer zwischen den beiden direkt koppelnden Protonen NH16 und H17 zu einer Verringerung der Intensität des entsprechenden Kreuzsignals beigetragen haben. Für H14 – H11 ist der Wert aus der gerechneten Struktur um 0.7 Å grösser als der aus der NOESY Integration erhaltene Wert. Hierbei handelt es sich um den schon zuvor besprochenen NOE, der im ROESY ein viel zu intensives Signal ergeben hatte. Evtl. tritt für diese Protonen eine verstärkte Spindiffusion auf bzw. es handelt sich um die Kombination von TOCSY und ROESY Anteilen, was zu einem falsch positiven Ergebnis führt.¹¹

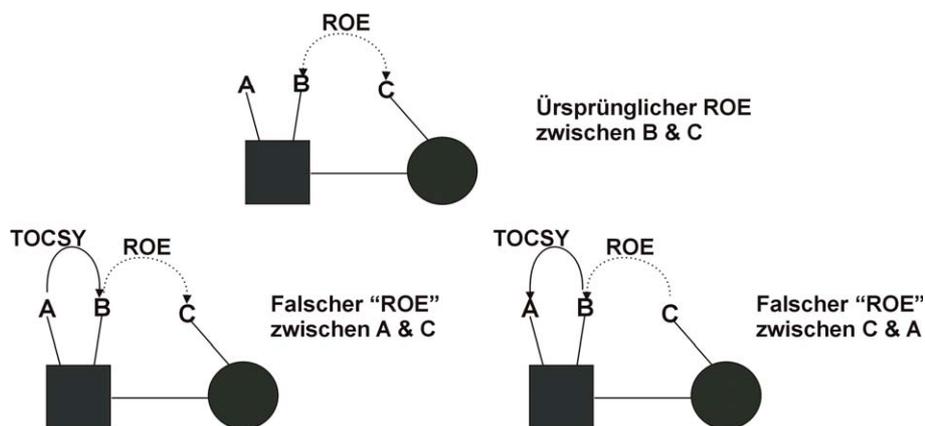


Abb. 12. Schematische Darstellung des Zustandekommens eines „falschen“ ROE Signals (nach ¹¹).

Ist die Struktur stimmig mit allen anderen ROEs, so kann der für H14 – H11 gesetzte Wert nicht erreicht werden, da er immer noch ein falsches Integrationsergebnis liefert und ein zu kurzer Abstand berechnet wird.

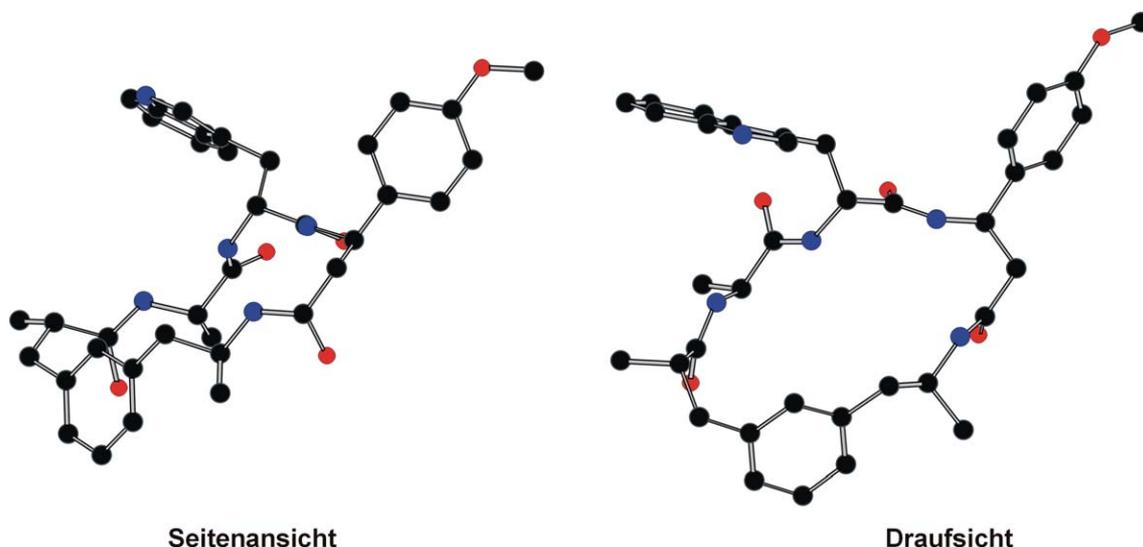


Abb. 13. Gemittelte, energieminierte Struktur für **Sy2741**.

Die durch Rechnung erhaltene Struktur stützt ebenfalls das zuvor experimentell ermittelte Ergebnis, dass keines der Amid-NHs an einer H-Brücke beteiligt ist. Wie besonders die Draufsicht in Abb. 13 zeigt, ist der Ring relativ weit und die Entfernung von NH und CO auf gegenüberliegenden Ringseiten zu gross für die Ausbildung von H-Brücken, wie es z. B. für einen β -Turn der Fall wäre.

Abschliessend noch ein Wort zur Dynamik der Seitenketten des Makrozyklus: Das Molekül weist eine einheitliche Dynamik auf, d. h. die Seitenketten (Indolrest, p-Methoxy-Phenylrest) zeigen keine erhöhte Rotation im Vergleich zum makrozyklischen Grundkörper. Dies ergibt sich

1. aus einem Vergleich fixer Abstände innerhalb der Indoleinheit mit den aus der Integration (Eichung auf geminale Protonen: H6^h – H6^t) erhaltenen Werte:

ROE	Standardwert [Å]	Aus Integration [Å]	Δ [Å]
NH1 ^{'''} – H9 ^{'''}	2.7	2.8	0.1
H6 ^{'''} – H7 ^{'''}	2.5	2.3	0.2

Tab. 5. Vergleich von fixen Abständen der Indoleinheit mit jenen aus der ROESY Integration.

2. aus dem Vergleich von Me_X – H_Y Abständen – erhalten aus der Integration bei Eichung auf geminale Protonen (H6^h – H6^t) – mit jenen bei Eichung auf Me14 – H14 (≅ 2.15 Å)

ROE	aus Me-Eichung [Å]	aus geminaler Eichung [Å]	Δ [Å]
NH16 – Me14	2.6	2.7	0.1
NH13 – Me11	3.0	3.1	0.1
NH13 – Me14	2.35	2.4	0.05
NH4 – Me5	2.5	2.55	0.05
5 ^{''} – Me5	3.5	3.7	0.2
2 ^{'''} – Me14	2.9	3.0	0.1
7 ^{'''} /4 ^{''} – Me11	3.4	3.55	0.15
4 ^{''} – Me5	3.3	3.45	0.15
6 ^{''} – Me5	2.7	2.8	0.1
2 ^{''} /2 ^{''} – Me5	3.0	3.15	0.15

Tab. 6. ROEs zwischen Protonen und Protonen einer Methylgruppe – Vergleich bei verschiedenen Eichabständen.

Würde für die Seitenketten eine vom Ring unabhängige Dynamik vorliegen, so wären die berechneten Abstände aus der Eichung auf geminale Protonen deutlich von den Fixabständen bzw. den Abständen bei Eichung auf Methylgruppen verschieden.

2.3 Der Makrozyklus Sy5141

Die Zuordnung erfolgte auch hier mit Hilfe von 2D-DQFCOSY, -HMQC und -ROESY Spektren, welche teilweise im Anhang abgebildet sind.

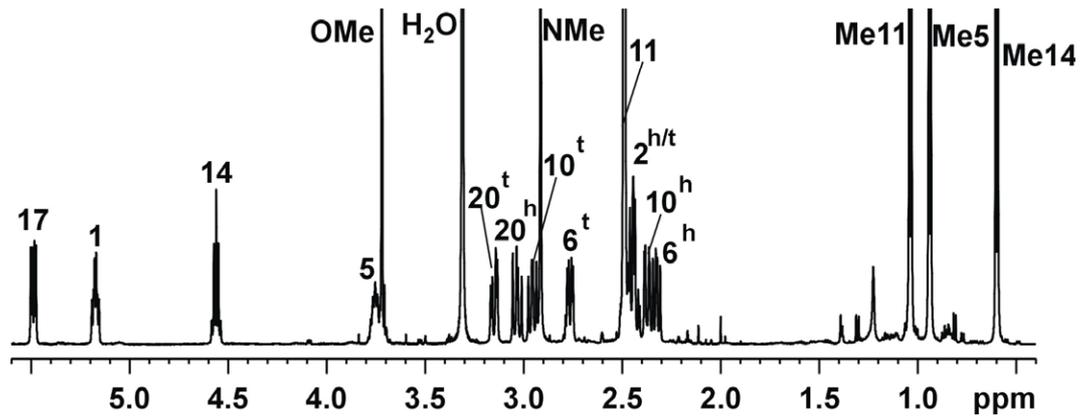


Abb. 14. ¹H Alkylbereich für **Sy5141** in DMSO_{d6} (300 K, 600 MHz).

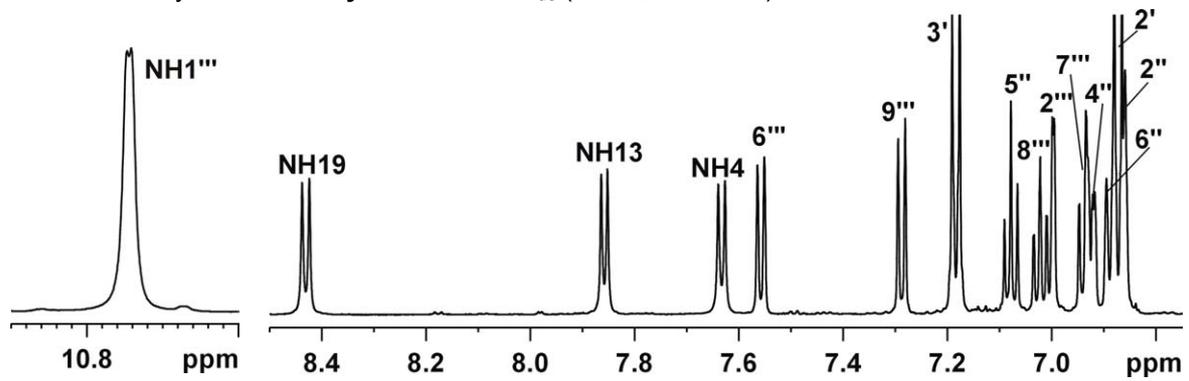


Abb. 15. NH der Indoleinheit (links) und ¹H Aromaten- und NH-Bereich (rechts) für **Sy5141** in DMSO_{d6} (300 K, 600 MHz).

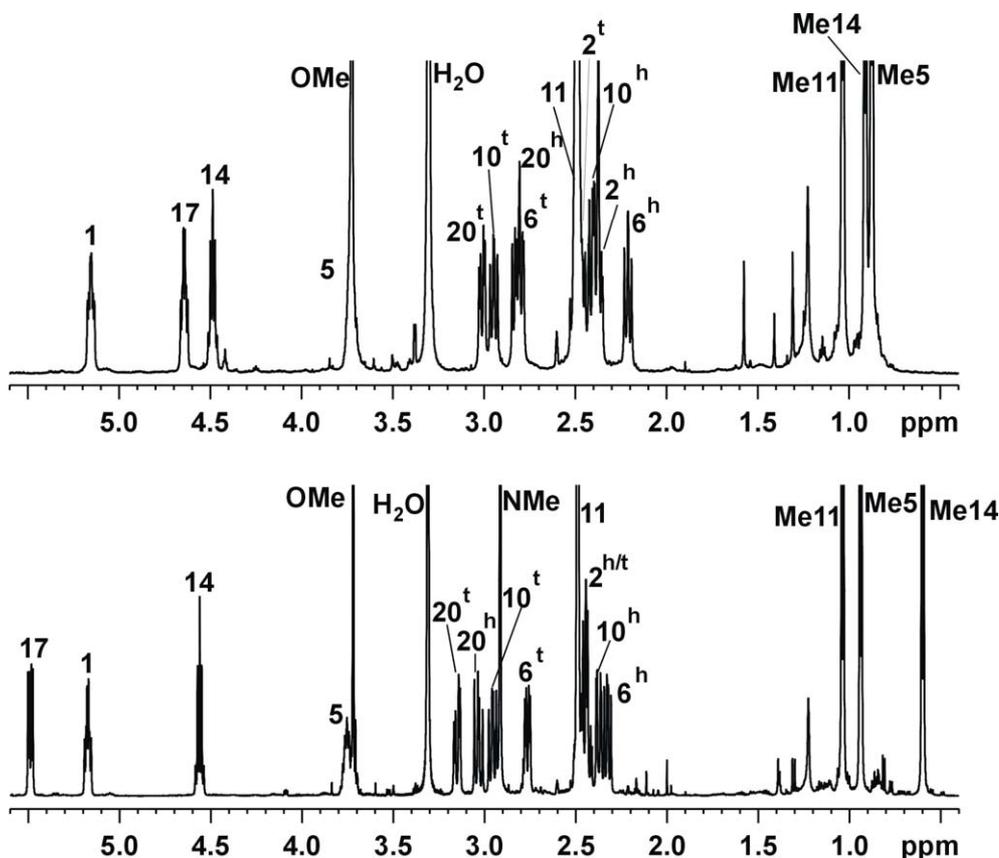
2.3.1 **Sy2741** und **Sy5141** – Vergleich der ^1H Spektren

Abb. 16. ^1H NMR des Alkylbereichs von **Sy2741** (oben) und **Sy5141** (unten) (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}).

Betrachtet man den Alkylbereich für **Sy2741** und **Sy5141**, so zeigen sich die grössten Unterschiede in den chemischen Verschiebungen δ der beiden Systeme für folgende Protonen:

17, 14, 20^t, 20^h, 6^h, Me5 und Me14

Änderungen im Bereich 14, 17 und 20 sind zum einen darauf zurückzuführen, dass sie von der strukturellen Änderung an Position 16 am stärksten betroffen sind. Zum anderen ist es durchaus möglich, dass die Methylierung in 16 zu einer anderen bevorzugten Orientierung der Indolseitenkette führt. Da $\Delta\delta$ für Me14 und 17 am stärksten ist, sind diese fett gedruckt.

Änderungen im Bereich 5 und 6 könnten möglicherweise von einer Änderung der bevorzugten mittleren Ausrichtung des 1,3-disubstituierten Phenylringes herrühren.

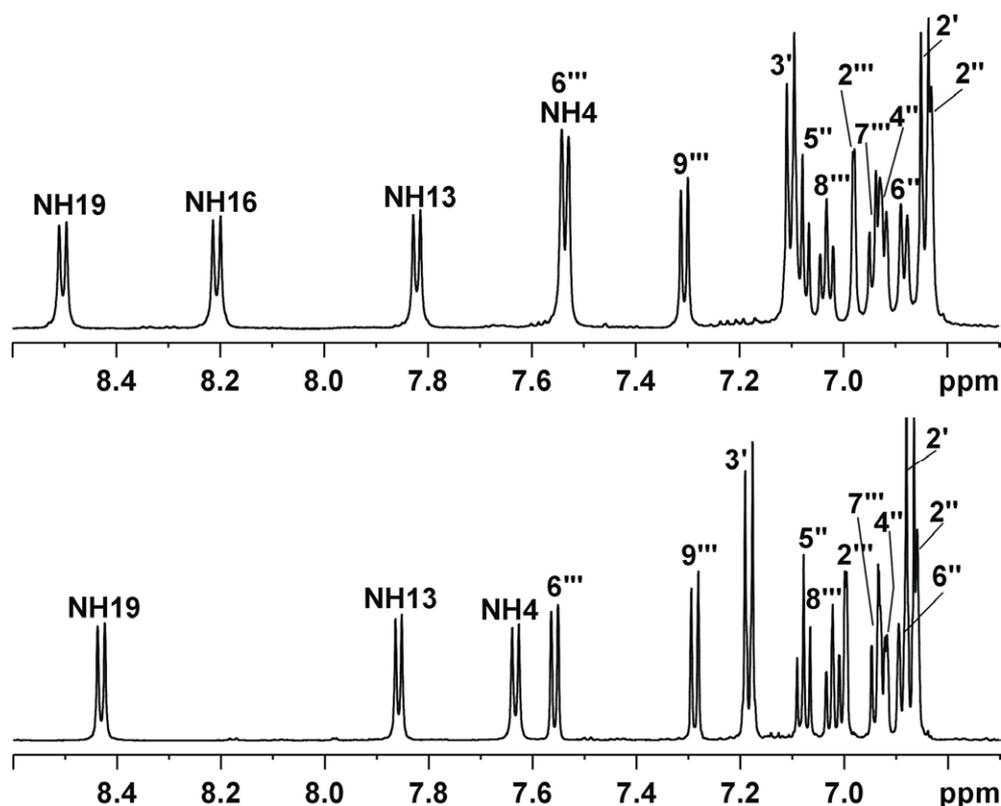


Abb. 17. ^1H Aromaten- und NH-Bereich von **Sy2741** (oben) und **Sy5141** (unten) (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}).

Auch im NH-/Aromatenbereich treten Änderungen in der chemischen Verschiebung auf:

NH19, NH13, NH4, 9''', 3', 2' und 2''

So deuten grössere Änderungen für 9''', 3' und 2' wiederum auf eine geänderte Orientierung der Indolseitenkette und dadurch beeinflusst auch der p-Methoxy-phenylseitenkette hin. 2'' könnte wieder auf ein anderes Pendel-Verhalten der 1,3-disubstituierten Phenyleinheit zurückzuführen sein. Die auffällige Änderung für sämtliche amidischen NH-Protonen rührt zum einen von der direkten Nachbarschaft der Modifikation (für NH19 und NH13) her, zum anderen lässt dies durchaus auf eine, wenn auch nur sehr geringe, Änderung der Makrozykluskonformation schliessen.

Für alle anderen Alkyl-, NH- oder aromatischen Protonen sind die Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen, bedingt durch die N-Methylierung in Position 16, vernachlässigbar klein.

2.3.2 Temperaturkoeffizienten der NH-Protonen

Wie schon in Kapitel 2.2.1 beschrieben, wurde auch für **Sy5141** untersucht, ob die Amidprotonen an H-Brücken beteiligt sind. Die zugehörigen Spektren der Tempera-

turreihe und eine Übersicht über die temperaturabhängige Verschiebung δ sind im experimentellen Teil bzw. im Anhang wiedergegeben.

NH-Atom	Steigung [Hz/K]	Steigung [ppb/K]
NH1'''	-2.1	-3.6
NH19	-2.7	-4.6
NH13	-3.4	-5.7
NH4	-2.4	-4.0

Tab. 7. Aus der Auftragung von $\Delta\delta$ [Hz] gegen ΔT [K] ermittelte Geradensteigungen (linearer Fit der experimentellen Daten).

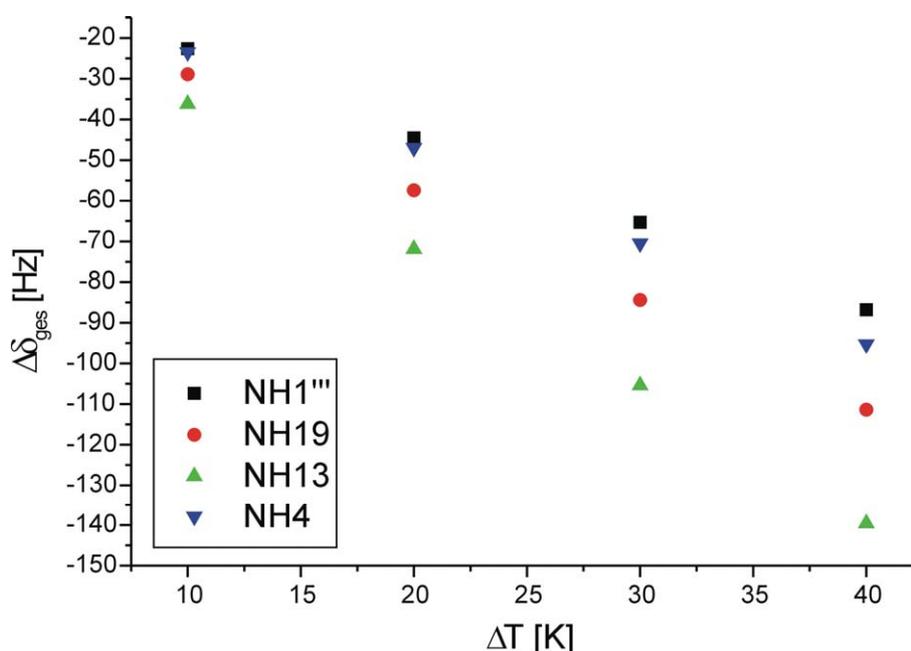


Abb. 18. Graphische Darstellung der Auftragung $\Delta\delta$ [Hz] gegen ΔT [K] für alle NH-Protonen von **Sy5141**.

Ergebnis:

Für die Protonen **NH19**, **NH13** und **NH4** kann die Beteiligung an einer Wasserstoffbrücke mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Der Temperaturkoeffizient für **NH1'''** kann wiederum nicht direkt verglichen werden, da es sich nicht um ein amidisches Proton handelt.

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit jenem für **Sy2741**, wengleich für letzteren eine transiente H-Brücke für **NH19** möglich sein könnte.

2.3.3 Prochirale Zuordnung der Methylenprotonen

Da dies auf dem, schon in Kapitel 2.2.2 beschriebenen, Vorgehen beruht, sollen an dieser Stelle nur die Liste mit den entsprechenden Kopplungen und die endgültige, prochirale Zuordnung für **Sy5141** wiedergegeben werden. Die Ermittlung der Rota-

merenverhältnisse anhand von ROE Daten ist – analog zu Abb. 7 – im experimentellen Teil dargestellt.

${}^2J_{\text{H}20^{\text{h}}, \text{H}20^{\text{t}}} = 15.3 \text{ Hz}$	${}^3J_{\text{H}20^{\text{h}}, \text{H}17} = 11.3 \text{ Hz}$ ${}^3J_{\text{H}20^{\text{t}}, \text{H}17} = 5.0 \text{ Hz}$
${}^2J_{\text{H}10^{\text{h}}, \text{H}10^{\text{t}}} = 14.0 \text{ Hz}$	${}^3J_{\text{H}10^{\text{h}}, \text{H}11} = 3.1 \text{ Hz}$ ${}^3J_{\text{H}10^{\text{t}}, \text{H}11} = 10.3 \text{ Hz}$
${}^2J_{\text{H}6^{\text{h}}, \text{H}6^{\text{t}}} = 12.9 \text{ Hz}$	${}^3J_{\text{H}6^{\text{h}}, \text{H}5} = 9.0 \text{ Hz}$ ${}^3J_{\text{H}6^{\text{t}}, \text{H}5} = 4.7 \text{ Hz}$
H2 ^h / H2 ^t	Überlagert
→ keine Analyse der Kopplungen möglich	

Tab. 8. J_{HH} Kopplungen für CH₂-Protonen in **Sy5141**.

Auch im Falle von **Sy5141** zeigen die Methylengruppen in Position 20 und 10 eine grosse und eine kleine Kopplung, gleichbedeutend mit einer starken Bevorzugung eines Rotamers, welches ein Proton in gauche- und eines in trans-Stellung zum Proton am Nachbar C Atom orientiert. Für die Methylengruppe an Position 6 ist dieser Effekt nicht so deutlich, man erhält gemittelte Werte für die Kopplungen, hier wird also ein Gleichgewicht verschiedener Rotamere vorliegen. Für die Methylenprotonen in Position 2 kann leider keine Aussage getroffen werden, da sie identische chemische Verschiebungen besitzen und somit weder Kopplungen abgelesen, noch ROEs eindeutig zugeordnet werden können.

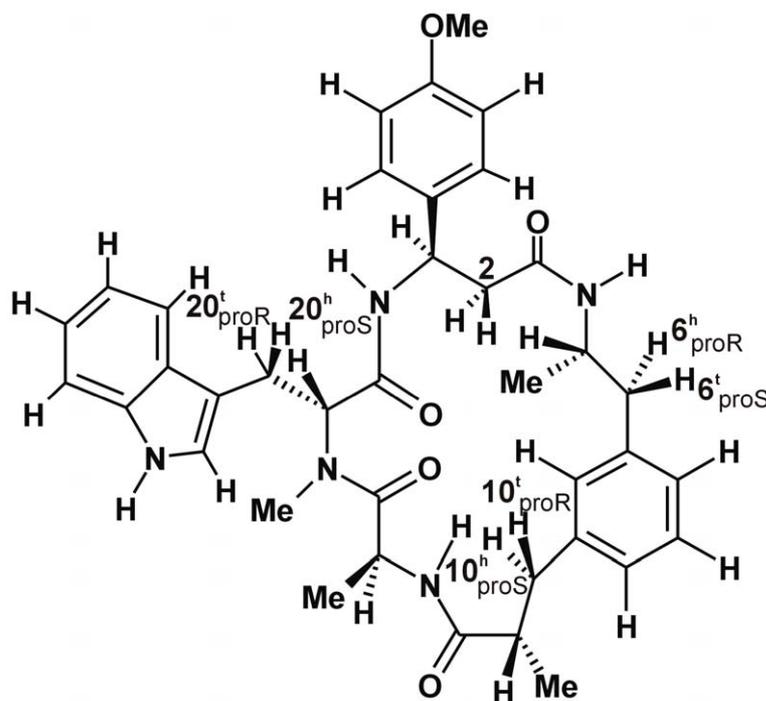


Abb. 19. Prochirale Zuordnung der Methylengruppen in **Sy5141**.

2.3.4 Strukturermittlung mit Hilfe von ROESY- und NOESY-Daten

Der zuvor betroffene ROE H14 – H11 ist für **Sy5141** gar nicht vorhanden. Alle anderen ROEs waren bei der Strukturermittlung in sich schlüssig. Dennoch wurde zusätzlich ein NOESY Spektrum aufgenommen – stellt eine N-Methylierung doch eine Barriere für die Rotation der Amidbindung dar (ca. 21 kcal*mol⁻¹ für N-methylierte Amidbindung¹²), so dass eine evtl. vorliegende cis-Konformation zu einem separaten zweiten Signalsatz führen sollte. Die dabei zu erwartenden Austauschsignale wären zwar auch im ROESY zu identifizieren, aber es zeigte sich für das NOESY Spektrum ein besseres Signal- zu Rauschen Verhältnis.

Zuerst soll jedoch die Struktur für **Sy5141** bestimmt werden, bevor auf evtl. vorliegende Nebenkonformere näher eingegangen wird.

Nachfolgende Tabelle zeigt die, aus der Integration des ROESY Spektrums erhaltenen, HH-Abstände – wobei ebenfalls wieder auf die geminalen Protonen H6^h – H6^t (≡ 1.8 Å) geeicht wurde – welche auch für die anschließende Strukturoptimierung als Restraints verwendet wurden.

Desweiteren erfolgt ein Vergleich aller erhaltenen Abstände mit denen von **Sy2741** im Anhang.

Es hatte sich gezeigt, dass, bis auf einige wenige ROEs, die ermittelten Protonenabstände für **Sy2741** und **Sy5141** sehr gut übereinstimmen. Dies bedeutet, dass die N-Methylierung in Position 16 keinen wesentlichen Einfluss auf die 3D-Struktur des Systems hat.

Die aus der 10 x 10ps MD Simulation erhaltene, gemittelte und im Folgenden energiminimierte Struktur ist in Abb. 20 wiedergegeben. Tabelle 9 stellt die aus jener Struktur erhaltenen HH-Abstände den gesetzten Werten gegenüber.

ROE	Experimentell ermittelte Abstände [Å]	Aus Rechnung erhaltene Abstände [Å]
NH1 ^{''''} – 9 ^{''''}	2.9	2.8
NH19 – 3 [']	2.6	2.6
NH19 – 17	2.2	2.2
NH19 – 1	2.7	2.9
NH19 – 20 ^t	3.0	3.8
NH19 – NMe	2.9	3.25
NH13 – 11	2.1	2.2
NH4 – 5	2.8	2.8
NH4 – 6 ^t	2.7	2.5
NH4 – 6 ^h	2.8	2.8
3 ['] – 20 ^t	3.3	3.45
4 ^{''} – 10 ^t	2.9	3.1
4 ^{''} – 10 ^h	2.4	2.4
6 ^{''} – 6 ^t	2.9	3.6
6 ^{''} – 6 ^h	2.4	2.4
2 ^{''} – 10 ^t	2.45	3.0
2 ^{''} – 6 ^t	2.3	2.4
2 ^{''} – 11	2.6	2.5
17 – NMe	3.1	3.2
5 – 6 ^t	2.6	2.6
NMe – Me14	2.6	3.1
NMe – 14	2.0	2.3
NMe – NH19	2.9	3.25
Federkonstante = 7 (default)		
Torsionen	[°]	
C17 – C(O) – N – C1	180	-179
C2 – C(O) – N – C5	180	+176
C11 – C(O) – N – C14	180	+178
C14 – C(O) – N – C17	180	-176
Federkonstante = 16 (default)		

Tab. 9. Die zur Strukturberechnung von **Sy5141** gesetzten Restraints und deren Vergleich mit den Werten in der energieminierten Struktur. ROEs, die um mehr als 0.4 Å vom gesetzten Wert abweichen, sind fett gedruckt.

Wie schon im Falle von **Sy2741**, so ist auch für **Sy5141** eine Abweichung der berechneten von den gesetzten Abständen im Bereich der 1,3-disubstituierten Phenyleinheit zu beobachten. Man kann davon ausgehen, dass wiederum eine Pendelbewegung des Benzolringes vorliegt, welche zu einer Mittelung der erhaltenen ROE Abstände führt. Ebenso könnte auch für die Abweichung des ROEs NH19 - H20^t eine Rotation der Indoleinheit bzw. eine stärkere Dynamik dieser Seitenkette der Grund

sein. Bleibt noch der ROE NMe – Me14, der mit einem Δ von 0.5 Å in der MD Simulation nur schlecht erreicht wird. An dieser Position befindet sich nicht nur die strukturelle Veränderung, sondern für diesen Bereich ergibt sich auch der grösste Unterschied in den gemodelten Strukturen von **Sy2741** und **Sy5141**. Für **Sy2741** ist das Proton von NH16 zur Ringmitte hin, für **Sy5141** die Methylgruppe von NMe(16) zur Unterseite des Rings hin orientiert (siehe Abb. 21). Setzt man für die Amidtorsion in diesem Bereich einen von 180° verschiedenen Wert, z. B. -120° , so kann der ROE NMe – Me14 besser gefittet werden. Es ist durchaus möglich, dass die N-Methylierung zu einem „Verdrehen“ der Amidbindung aus ihrer optimalen trans-Anordnung heraus führt. Allerdings scheint dies keinerlei Auswirkungen auf das Gesamtsystem zu haben.

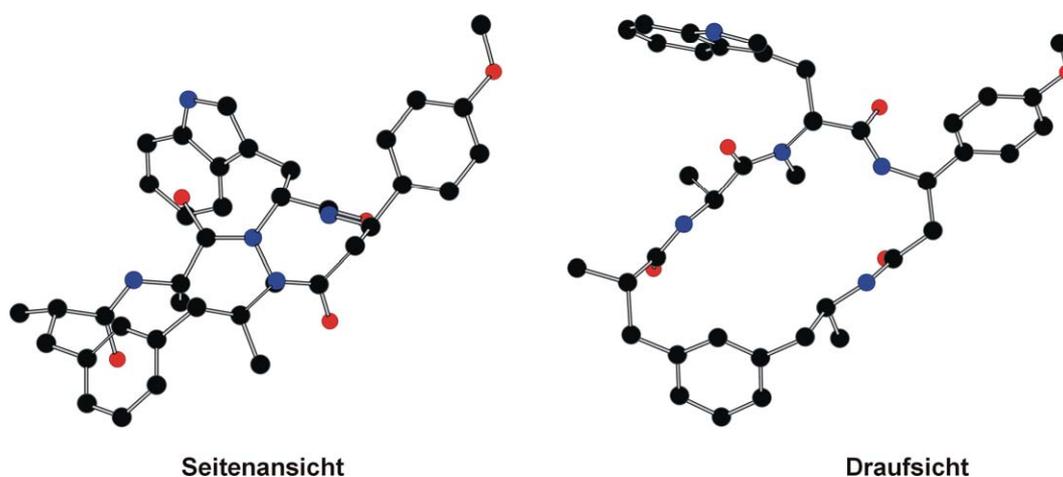


Abb. 20. Berechnete Struktur für **Sy5141** in Seitenansicht (links) und Draufsicht (rechts).

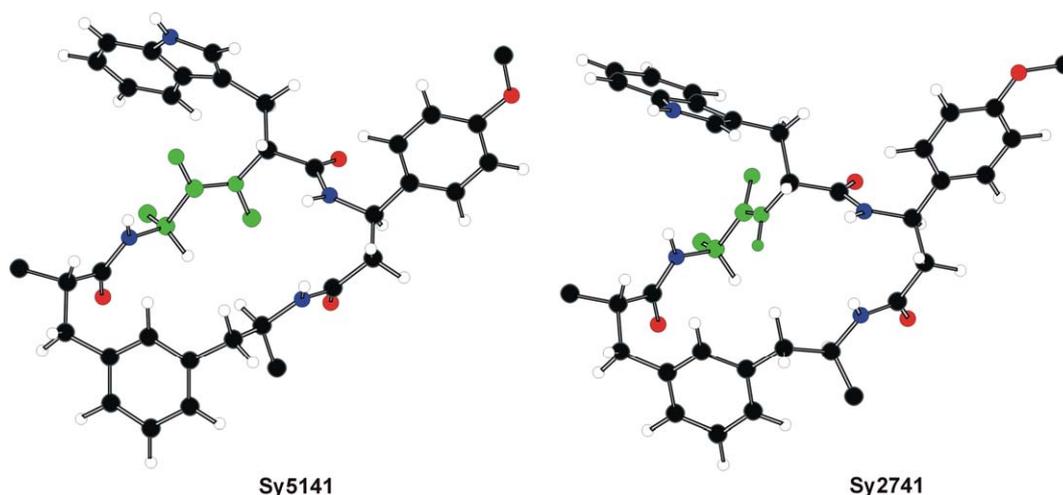


Abb. 21. Vergleich der Strukturen von **Sy2741** und **Sy5141** – der am stärksten voneinander abweichende Bereich ist in grün dargestellt. Es handelt sich um die Torsion C14 – C(O) – N(16) – C17.

Zur Dynamik kann auf die für **Sy2741** gemachten Aussagen verwiesen werden. Auch für **Sy5141** zeigen die Seitenketten eine einheitliche Dynamik mit dem Makrozyklus und die 1,3-disubstituierte Phenyleinheit vollführt eine Pendelbewegung. Bleibt nun noch die Frage nach einem Nebensignalsatz offen. Im NOESY Spektrum ist, soweit keine Überlagerungen auftreten, für jedes Proton ein Austauschsignal zu einem zweiten (Neben-)Signalsatz zu erkennen. Dieser ist von seiner Intensität her annähernd im Rauschen, so dass der Hauptsignalsatz – in dem auch die methylierte Amideinheit trans vorliegt – zu mehr als 99% populiert ist. Dies ist relativ ungewöhnlich, da man normalerweise durchaus grössere Anteile an Nebenkonformer erwarten könnte.¹³ Abb. 22 zeigt den Bereich der Methylgruppen im NOESY Spektrum in starker Vergrößerung. Haupt- und Nebensignalsatz sind eindeutig anhand ihrer Austauschsignale zueinander zu identifizieren.

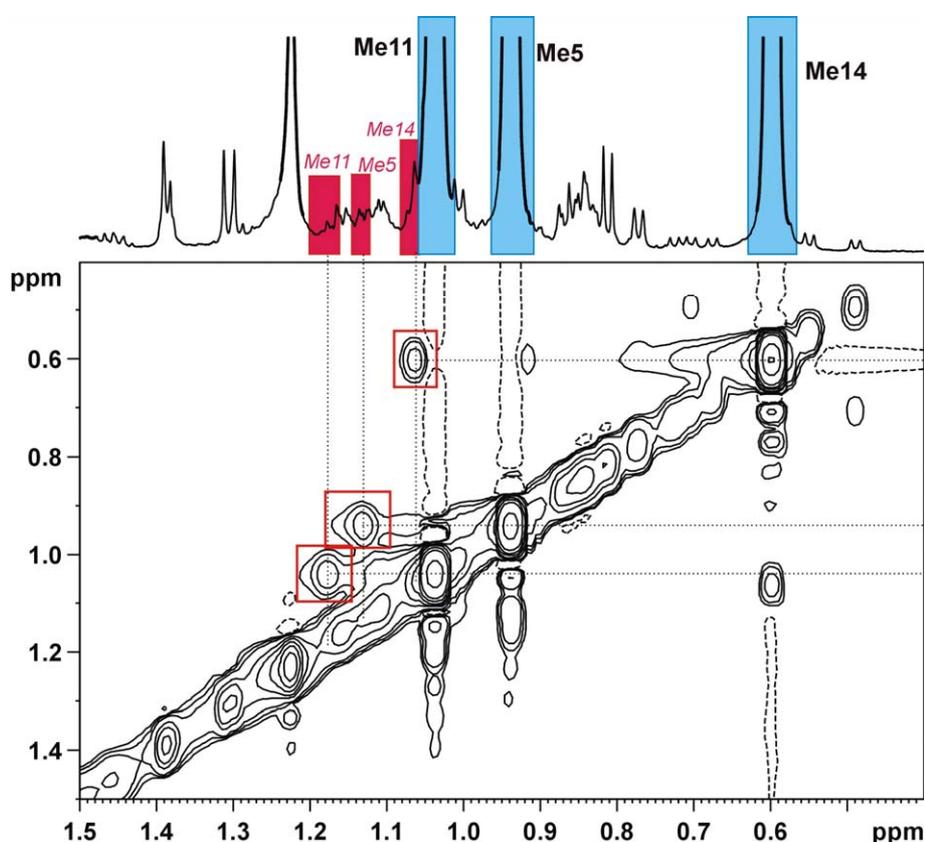


Abb. 22. Ausschnitt aus dem NOESY Spektrum von **Sy5141** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}). Der Hauptsignalsatz ist in **blau**, der Nebensignalsatz in **rot** gekennzeichnet.

Es kann davon ausgegangen werden, dass der zweite, sehr kleine Signalsatz zu **Sy5141** gehört, in dem die N-methylierte Amidbindung in cis-Anordnung vorliegt, da diese Modifikation eine genügend hohe Barriere darstellt, um zwischen cis- und trans-Amid einen langsamen Austausch und somit zwei Signalsätze zu bewirken.

2.4 Vergleich der für Sy2741 und Sy5141 erhaltenen Daten mit jenen für Jasplakinolid aus der Literatur⁴

Inman et al.⁴ haben sehr ausführlich die Konformation von natürlichem Jasplakinolid in Lösung untersucht, so dass ein Vergleich ihrer Daten mit den hier vorgestellten Ergebnissen die strukturellen Unterschiede zwischen Naturstoff und modifizierten Analoga herausstellen kann.

Nachfolgend ist die Numerierung für Jasplakinolid – wie von Inman et al. verwendet – mit jener, hier für **Sy2741** und **Sy5141** verwendeten, verglichen.

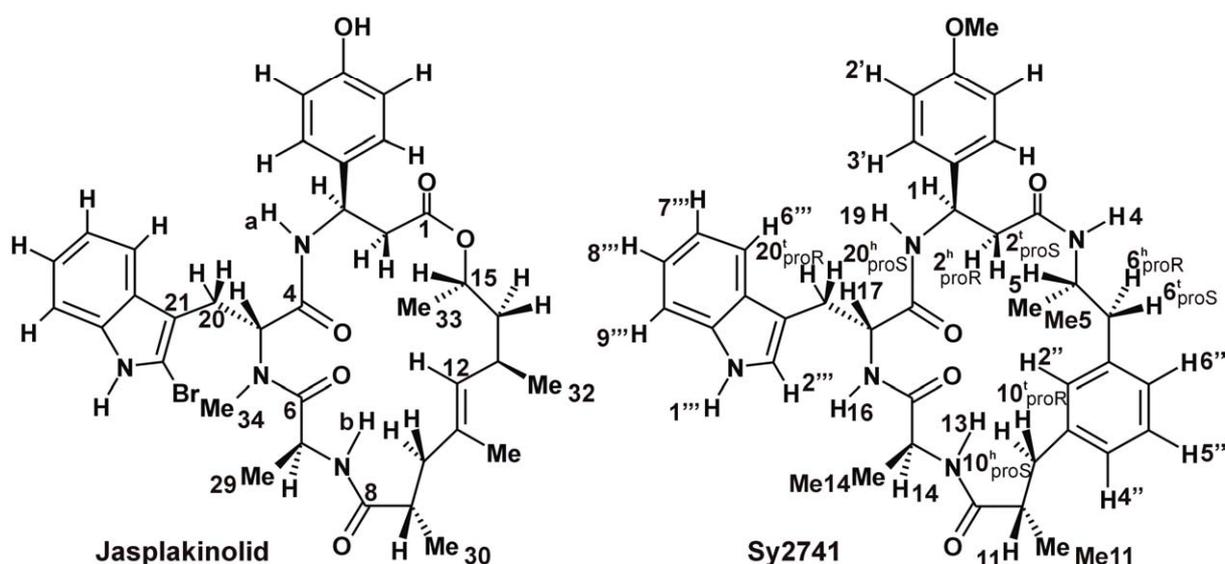


Abb. 23. Gegenüberstellung der für Jasplakinolid verwendeten Numerierung mit der hier verwendeten.

2.4.1 Vergleich der Temperaturkoeffizienten und $^3J_{\text{NH}, \text{H}_\alpha}$ Kopplungen der NH-Protonen

Jasplakinolid	$-\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/°C]	Sy2741/Sy5141	$-\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K] Sy2741	$-\Delta\delta/\Delta T$ [ppb/K] Sy5141
NHa	6.88	NH19	3.7	4.6
NHb	4.27	NH13	6.0	5.7
NHc	3.64	NH1'''	3.6	3.6
	N-methyliert	NH16	5.0	N-methyliert
	Esterbindung	NH4	4.1	4.0

Tab. 10. Gegenüberstellung der Temperaturkoeffizienten der NH-Protonen. Die Werte in der Tabelle sind direkt vergleichbar, da die zueinander analogen NHs jeweils in einer Zeile stehen, allerdings immer mit der Originalnumerierung.

Es ergibt sich ein einheitliches Bild mit dem Ergebnis, dass in keiner der drei hier verglichenen Strukturen H-Brücken im makrozyklischen System vorliegen.

Jaspla-kinolid	$^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ [Hz]	Sy2741/Sy5141	$^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ (Sy2741) [Hz]	$^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ (Sy5141) [Hz]
NHa	8.7	NH19	8.6	8.1
NHb	7.5	NH13	8.1	7.2
N-methyliert		NH16	8.8	N-methyliert
Esterbindung		NH4	7.9	7.9

Tab. 11. Vergleich der $^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ Kopplungen aller amidischen Protonen.

Auch im Bereich der $^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ Kopplungen zeigen sich keine auffälligen Unterschiede zwischen Naturstoff und den synthetischen Analoga.

2.4.2 Vergleich der diastereotopen Methylenprotonen – chemische Verschiebung, Kopplungen und Rotamerenverhältnis

Jaspla-kinolid	δ [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]	Sy2741 / Sy5141	δ [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]	δ [ppm]	$\Delta\delta$ [ppm]
H2 / H2'	2.90 / 2.85	0.05	H2 ^t / H2 ^h	2.42 / 2.37	0.05	2.44	0
H10 / H10'	2.32 / 2.00	0.32	H10 ^t / H10 ^h	2.95 / 2.39	0.56	2.96 / 2.37	0.59
H14 / H14'	1.73 / 1.48	0.25	H6 ^t / H6 ^h	2.80 / 2.22	0.58	2.76 / 2.33	0.44
H20 / H20'	n.d.	-	H20 ^t / H20 ^h	3.02 / 2.83	0.19	3.11 / 3.04	0.07

Tab. 12. Vergleich der chemischen Verschiebungen der diastereotopen Protonenpaare. Alle Werte stammen aus Messungen in DMSO_{d6}, für **Sy2741** und **Sy5141** bei 300 K, für Jasplakinolid ohne Temperaturangabe. (aus ⁴)

Erstaunlicherweise sind die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen δ ausserordentlich gross und zwar für alle untersuchten Methylengruppen. Der Grund hierfür ist unklar, da für die, in der Literatur⁴ angegebenen, Werte keine Temperaturangaben gemacht wurden. Auffallend ist allerdings, dass die Aufspaltung der diastereotopen Protonenpaare in den synthetischen Analoga sehr viel grösser ist als im Naturstoff, was durchaus ein Hinweis auf eine geringere Flexibilität und somit eine definiertere (starrere) Struktur sein kann.

Jasplakinolid	3J [Hz]	Sy2741/Sy5141	3J [Hz] Sy2741	3J [Hz] Sy5141
H2 / H3	4.2	H2 ^h / H1	4.3	H2 ^{h/t} überlagert
H2' / H3	9.0	H2 ^t / H1	10.4	
H9 / H10	9.9	H11 / H10 ^t	13.7	10.3
H9 / H10'	< 2.5	H11 / H10 ^h	2.7	3.1
H14 / H15	n.d.	H5 / H6 ^h	10.6	9.0
H14' / H15	6.3	H5 / H6 ^t	3.7	4.7
H5 / H20	n.d.	H17 / H20 ^h	9.3	11.3
H5 / H20'	n.d.	H17 / H20 ^t	5.3	5.0

Tab. 13. Vergleich der 3J Kopplungskonstanten erhalten aus Messungen in DMSO_{d6}.

Wie schon die Verschiebungen in Tab. 12 gezeigt haben, lassen auch die 3J Kopplungskonstanten den Schluss zu, dass die synthetischen Analoga **Sy2741** und **Sy5141** eine fixiertere, weniger bewegliche Konformation einnehmen als Jasplakinolid selbst. Besonders für die Methylengruppen 10 (= 10 (**Sy2741/Sy5141**)) und 14 (= 6) zeigen die Kopplungskonstanten weniger stark gemittelte Werte für **Sy2741** und **Sy5141** und somit eine eindeutigere Bevorzugung eines bestimmten Rotameren. Dies sind auch jene CH_2 -Gruppen mit der deutlichsten Dispersion ihrer Signale, wohingegen die Methylengruppe an Position 2 (= 2) für alle drei Systeme ähnliche Dispersion und Kopplungskonstanten aufweist. Daher sei nachfolgend die Bevorzugung bestimmter Rotamere untersucht.

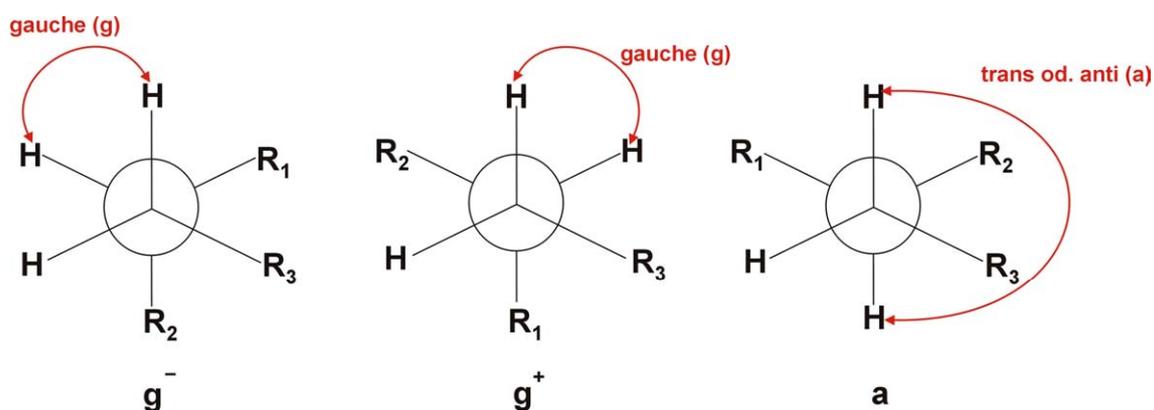


Abb. 24. Allgemeine Darstellung möglicher Rotamere.

	Jasplakinolid	Sy2741	Sy5141
H2 / H2' – H3 (= H2 ^h / H2 ^t – H1)	Flexibel mehrere Rotamere gemittelt Bevorzugt g⁻ / g⁺	Eingeschränkt flexibel Zwei Hauptrotamere Bevorzugt g⁺ / a	Keine Aussage möglich, da $\delta(\text{H2}^h)$ = $\delta(\text{H2}^t)$
H10 / H10' – H9 (= H10 ^t / H10 ^h – H11)	Starr Rotamere: g⁺ oder a NOE H9 – H12 intensiv \rightarrow g⁺	Starr Rotamer: g⁺ NOE Me11 – H10 ^h & Me11 – H10 ^t stark	Starr Rotamer: g⁺ NOE Me11 – H10 ^h & Me11 – H10 ^t stark
H14 / H14' – H15 (= H6 ^t / H6 ^h – H5)	Flexibel mehrere Rotamere gemittelt Bevorzugt a / g⁺	Starr Rotamer: a NOE Me5 – H6 ^h stark, Me5 – H6 ^t schwach	Starr Rotamer: a NOE Me5 – H6 ^h stark, Me5 – H6 ^t schwach
H14 / H14' – H13 (%)	3J LM abhängig in polaren LMs: bevorzugt g⁻ (NOE H13 – Me31 intensiv) geringe Anteile an g⁺	Keine analoge Einheit in Sy2741 bzw. Sy5141 vorhanden	

Tab. 14. Gegenüberstellung der bevorzugten Rotamere. Für **Sy2741** und **Sy5141** siehe auch Experimenteller Teil.

Auch die Gegenüberstellung der Rotamerenverteilung zeigt, dass **Sy2741** und **Sy5141** starrer sind als Jasplakinolid. Bis auf H2/H2' – H3 (= H2^h/H2^t – H1) werden in allen drei Substanzen, ob flexibel oder starr, dieselben Rotamere bevorzugt.

Abschliessend sei noch erwähnt, dass auch Inman et al.⁴ keine cis-/trans-Isomerisierung für die N-methylierte Position feststellen konnten und zwar in einem Bereich von –20 bis +150 °C. Zudem sind die von ihnen gefundenen, intensiven NOEs H7 – Me34 (= H14 – NMe)^{*} und Me29 – Me34 (= Me14 – NMe) nur für eine trans-Orientierung möglich.

Insgesamt kommen Inman et al.⁴ zu zwei Hauptkonformeren, die sich nur durch eine 120 ° Rotation um C1 – C2 – C3 – N unterscheiden. Für die aromatischen Seitenketten konnten sie zeigen, dass generell zwei verschiedene Konformationen vorliegen können – ein sog. Molecular Tweezer und eine close face-face Anordnung. Erstere wird als die, vom System bevorzugte, postuliert, wobei insgesamt die Seitenketten nur einen geringen Einfluss auf die relativen Energien der Strukturen haben und durch das enthaltene, relativ flexible β-Tyrosin eine Anpassung an sterische „Störungen“ möglich ist.

3. 18-gliedrige, peptidische Jasplakinolid „Analoga“

3.1 Allgemeines

Die nachfolgend als **Maclac1** und **Maclac2** – sie unterscheiden sich wiederum durch die N-Methylierung in Position 16 voneinander – bezeichneten Makrozyklen stellen keine direkten Jasplakinolid Analoga dar, da die vorgenommenen Veränderungen ziemlich weitreichend sind, was bereits in Abb. 25 klar erkennbar ist. Im Folgenden soll auf deren Struktur näher eingegangen werden, ohne jedoch die Brücke zurück zum Jasplakinolid, wie zuvor für **Sy2741** und **Sy5141** geschehen, zu schlagen.

* in Klammern die für **Sy2741/Sy5141** verwendete Numerierung zum besseren Vergleich.

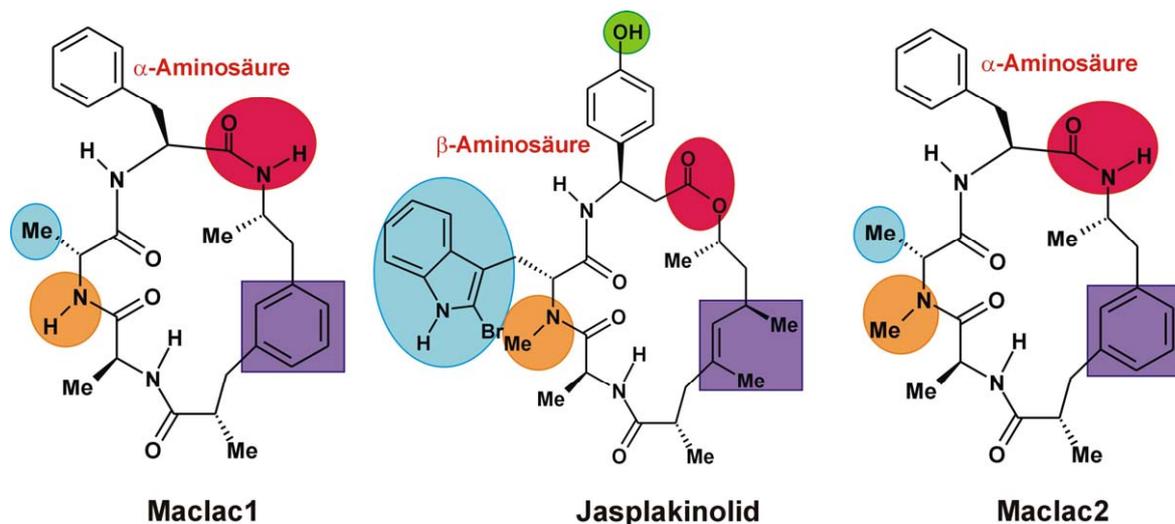


Abb. 25. Strukturelle Unterschiede zwischen dem Naturstoff Jasplakinolid und zwei weiteren makrozyklischen Systemen aus der Arbeitsgruppe von Prof. M. E. Maier.

Die Numerierung für **Maclac1** und **Maclac2** wurde analog, zu der bei **Sy2741** und **Sy5141** verwendeten, gesetzt.

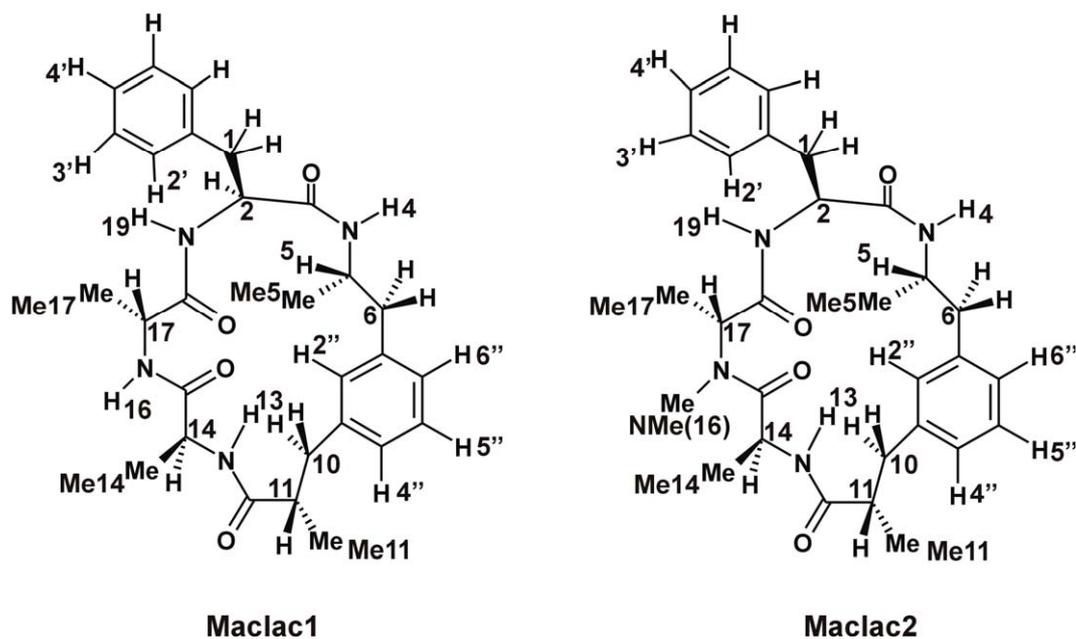


Abb. 26. Numerierung für **Maclac1** und **Maclac2**.

3.2 Makrozyklen **Maclac1** und **Maclac2** im Vergleich

Alle Messungen sind – soweit nicht anders angegeben – bei 300 K (**Maclac2**) bzw. 320 K (**Maclac1**) und 600.13 MHz Protonenfrequenz in DMSO-d_6 durchgeführt worden. Die Eichung erfolgte auf DMSO-d_6 ($\delta_{\text{H}} = 2.49$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39.5$ ppm). Alle Spektren,

2D HMQC, ROESY und NOESY sowie Tabellen mit ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen sind im Anhang zu finden, falls sie nicht hier im allgemeinen Teil vorgestellt werden. Die Zuordnung war für **Maclac2** mittels 2D DQFCOSY, HMQC und ROESY eindeutig möglich. Aufgrund zahlreicher Überlagerungen war die Zuordnung für **Maclac1** nur durch Vergleich mit **Maclac2** möglich.

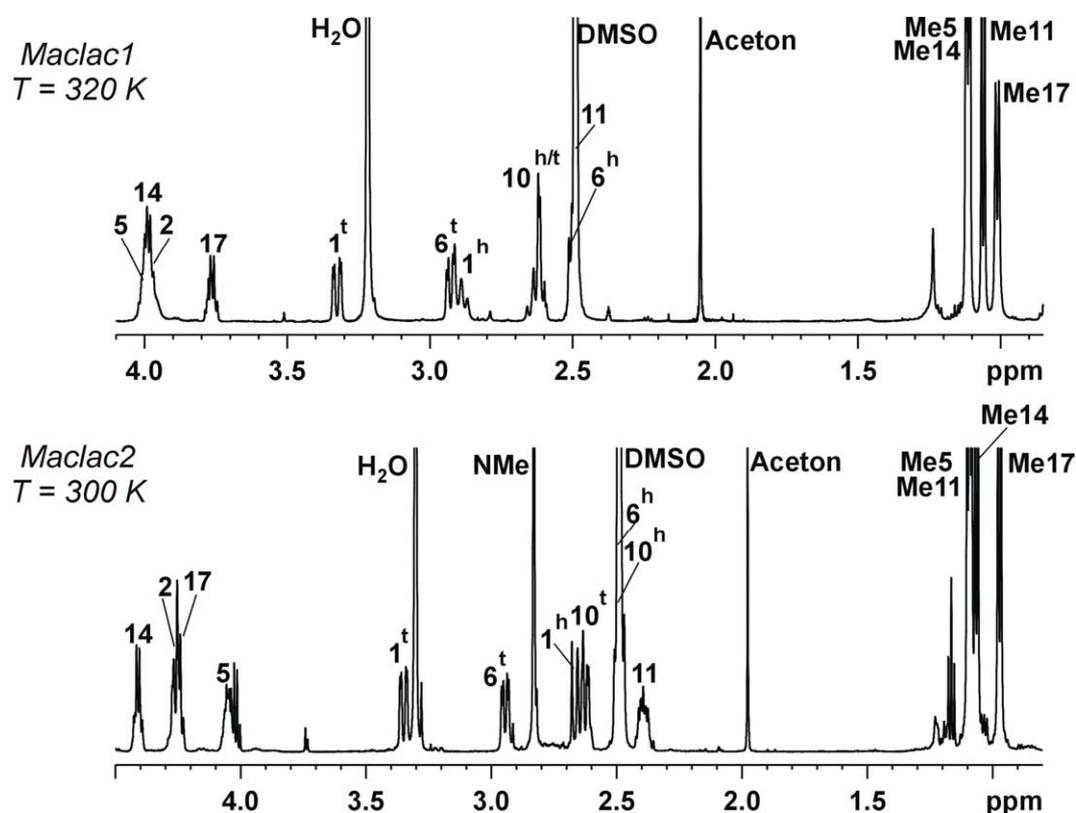


Abb. 27. ^1H Alkylbereich für **Maclac1** (320 K) und **Maclac2** (300 K) in DMSO-d_6 (600 MHz).

Wie in der nachfolgenden Abb. 28 zu erkennen ist, sind die NH Signale in ihrer Intensität im Verhältnis sehr viel schwächer (Integral: ca. 0.5:1 für **Maclac1**, ca. 0.2:1 für **Maclac2**) als die übrigen (CH-) Signale. Dies liegt daran, dass die Probe zuvor in MeOH-d_4 vermessen und somit schon ein erheblicher Teil der NH-Protonen durch Deuterium ersetzt worden war.

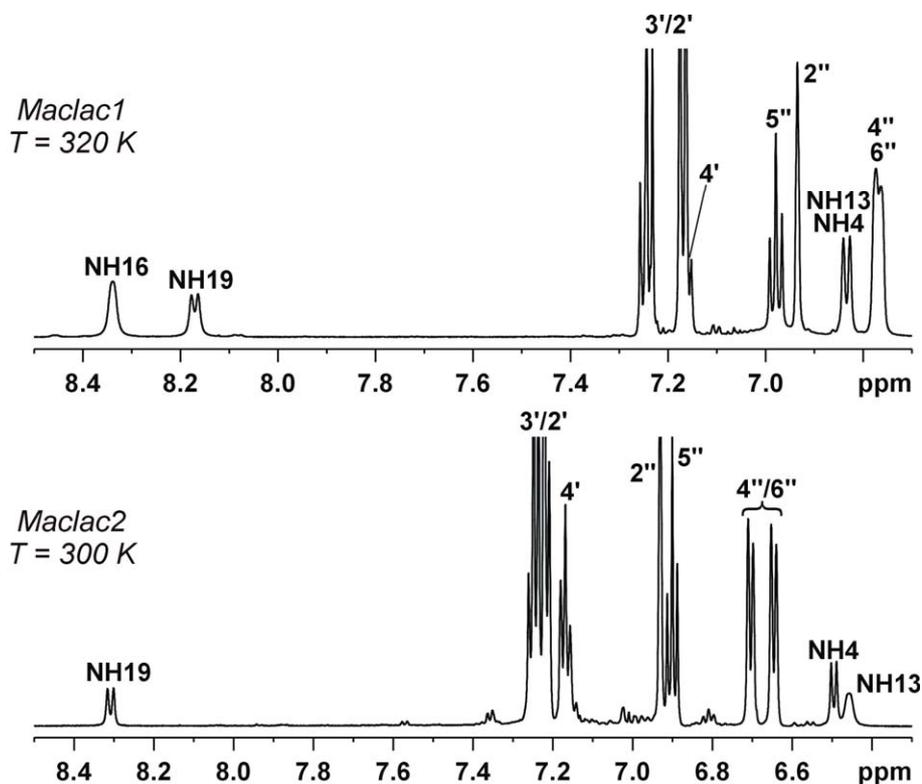


Abb. 28. ^1H Aromaten- und NH-Bereich für **Maclac1** (320 K) und **Maclac2** (300 K) in DMSO-d_6 (600 MHz).

3.2.1 Temperaturkoeffizienten der NH-Protonen

Es wurde für beide Substanzen eine Temperaturreihe in DMSO-d_6 zwischen 300 und 340 K – in 10 K Schritten – aufgenommen, um Aussagen über die Beteiligung der amidischen NH-Protonen an H-Brücken machen zu können. Entsprechende ^1H Spektren und Tabellen mit $\Delta\delta$ [Hz]/ ΔT [K] finden sich im experimentellen Teil bzw. im Anhang.

NH-Atom	Maclac1		Maclac2	
	Steigung [Hz/K]	Steigung [ppb/K]	Steigung [Hz/K]	Steigung [ppb/K]
NH19	-1.8	-3.0	-3.0	-5.0
NH16	-2.4	-4.0	- (methyliert)	-
NH13	-	-	+0.3	+0.4
NH4	-	-	-0.6	-1.0
NH4/NH13	-0.7	-1.1	-	-

Tab. 15. Übersicht über die Temperaturkoeffizienten der amidischen NH-Protonen in **Maclac1** und **Maclac2**.

Wie schon Abb. 28 zeigt, haben NH4 und NH13 für **Maclac1** die exakt gleiche, chemische Verschiebung δ_{H} und wie jetzt Tab. 15 zeigt, auch das gleiche Verhalten bei Temperaturänderung, so dass auch ihre Temperaturkoeffizienten identisch sind.

In beiden Verbindungen besitzen diese NH Protonen einen Temperaturkoeffizienten von $< |2 \text{ ppb/K}|$ und liegen somit wahrscheinlich in einer H-Brücke vor. Für NH19 in **Maclac1** wäre eine sehr schwache, transiente H-Brücke denkbar. Allerdings ist der Temperaturkoeffizient für NH19 (**Maclac1**) bereits an der Grenze zum völligen Fehlen einer intramolekularen H-Brücke und vollständiger Orientierung zum LM hin.

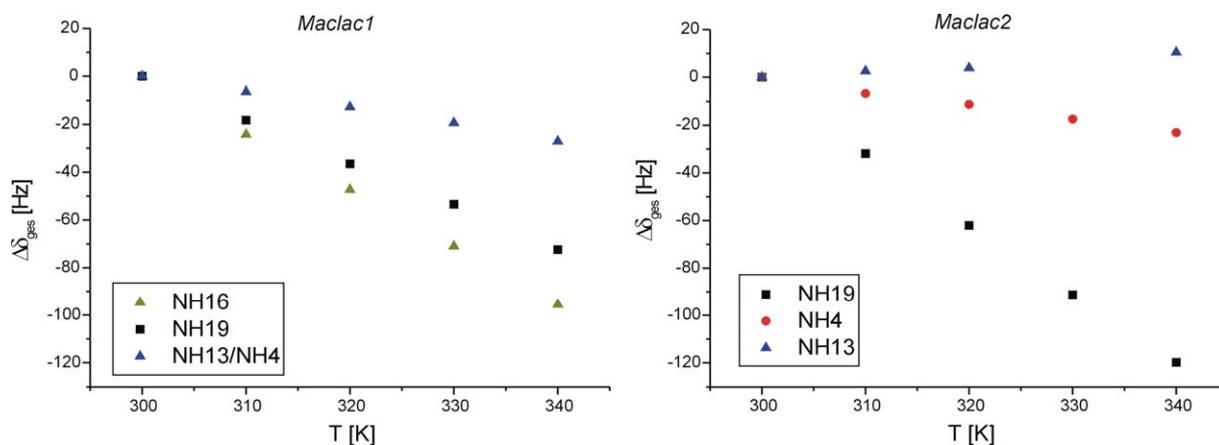


Abb. 29. Temperaturreihen der amidischen NH-Protonen für **Maclac1** und **Maclac2** in DMSO-d_6 zwischen 300 und 340 K (600 MHz).

Ergebnis:

Die Temperaturkoeffizienten von **NH4** und **NH13** sprechen in beiden Makrozyklen für die Beteiligung an einer Wasserstoffbrücke.

3.2.2 Prochirale Zuordnung der Methylenprotonen

Aufgrund der zahlreichen Überlagerungen im Protonenbereich (siehe Abb. 27 und 28) sowohl für **Maclac1** als auch für **Maclac2** ist eine eindeutige Bestimmung der Prochiralität der CH_2 -Gruppen nur in Ausnahmefällen möglich. Zumindest die 3J Kopplungen der CH_2 -Gruppen geben erste Hinweise auf die Dynamik der makrozyklischen Systeme.

	Maclac1 (bei 320 K)	Maclac2 (bei 300 K)
$^2J_{\text{H1h, H1t}}$	13.5	14.0
$^3J_{\text{H1h, H2}}$	n.d.	12.7
$^3J_{\text{H1t, H2}}$	3.7	3.6
$^2J_{\text{H6h, H6t}}$	13.1	13.1
$^3J_{\text{H6h, H5}}$	6.1	~ 7 (aus COSY)
$^3J_{\text{H6t, H5}}$	4.1	~ 5 (aus COSY)
$^2J_{\text{H10h, H10t}}$		12.6
$^3J_{\text{H10h, H11}}$	$\delta(\text{H10}^{\text{h}}) = \delta(\text{H10}^{\text{t}})$	11.3 (über H11)
$^3J_{\text{H10t, H11}}$		4.0

Tab. 16. J_{HH} Kopplungen für diastereotope CH_2 -Gruppen in **Maclac1** und **Maclac2**.

Die Kopplungen lassen den Schluss zu, dass

- in beiden Systemen der Bereich $H1^h/H1^t - H2$ relativ stark fixiert und ein Rotamer dadurch deutlich bevorzugt ist
- in beiden Systemen der Bereich $H6^h/H6^t - H5$ flexibel ist und aufgrund des vorliegenden Rotamerengleichgewichts nur gemittelte Kopplungen abgelesen werden können.
- für **Maclac2** auch der Bereich $H10^h/H10^t - H11$ in seiner Dynamik eingeschränkt ist und ein Hauptrotamer bevorzugt vorliegt.

	Maclac1	Maclac2
$H1^h / H1^t - H2$	Eingeschränkt flexibel Zwei Hauptrotamere Bevorzugt: a / g⁺ Keine eindeutigen ROEs für proR/proS	Eingeschränkt flexibel Zwei Hauptrotamere Bevorzugt: a / g⁺ Keine eindeutigen ROEs für proR/proS
$H10^t / H10^h - H11$	Keine Aussage möglich $\delta (H10^h) = \delta (H10^t)$	Eingeschränkt flexibel Zwei Hauptrotamere: a / g⁺ Keine eindeutigen ROEs für proR/proS
$H6^t / H6^h - H5$	Flexibel mehrere Rotamere gemittelt ROEs nicht eindeutig	Flexibel mehrere Rotamere gemittelt ROEs nicht eindeutig

Tab. 17. Prochirale Zuordnung und Bestimmung der Rotamerenverhältnisse der Methylenprotonen in **Maclac1** und **Maclac2**.

3.2.3 Strukturermittlung mit Hilfe von ROESY- und NOESY-Daten

Bei der Ermittlung der HH-Abstände aus ROESY- bzw. NOESY-Spektren ergaben sich mehrere Probleme:

- da die NH-Signale aufgrund von früherem Austausch mit Deuterium nicht die maximale Signalintensität aufwiesen, musste für deren integrierte Kreuzsignale ein entsprechender Korrekturfaktor berücksichtigt werden.
- Aufgrund zahlreicher Signalüberlagerungen konnten sehr viele ROEs nicht eindeutig zugeordnet werden.
- Da die Integration von Me-ROEs bei Eichung auf geminale Protonen eine teilweise sehr grosse Differenz zu jenen Werten bei Eichung auf einen Me-Eichabstand aufwies, muss für **Maclac1** und **Maclac2**, im Gegensatz zu **Sy2741** und **Sy5141**, davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um ein gleichmässig dynamisches System handelt, sondern dass vielmehr die Dynamik der Methylgruppen in den Seitenketten unabhängig von der des makrozyklischen Ringes ist.
- Wie schon das vorherige Kapitel gezeigt hatte, sind die Methyleneinheiten in den **Maclac** Ringen bei weitem flexibler und weniger eindeutig in ihrer Orientierung als dies für **Sy2741/Sy5141** der Fall war.

Aufgrund all dieser eben angeführten Fakten ist die Ermittlung einer eindeutigen Struktur nicht möglich. Die hohe Dynamik der Systeme lässt die Darstellung in Form einer einzigen 3D-Struktur nicht zu. Die für **Maclac2** nachfolgend gezeigten Daten sollen dies verdeutlichen.

Die entsprechenden ROESY Ausschnitte für **Maclac2** sind im Anhang wiedergegeben.

Aus der Integration des ^1H Spektrums bei 300 K von **Maclac2** ergaben sich folgende Signalintensitäten für die NH-Protonen:

	Signalintensität im ^1H	Faktor für Integration
NH19	0.17	1/0.17 \rightarrow 5.88
NH13	0.18	1/0.18 \rightarrow 5.56
NH4	0.25	1/0.25 \rightarrow 4.00
14	\equiv 1.000	1.000

Tab. 18. Korrekturfaktoren für NH-Protonen von **Maclac2**.

Diese berechneten Faktoren sind aber für eine möglichst genaue Ermittlung von HH-Abständen zu ungenau – ein Integrationsunterschied im ^1H von 0.01 bedeutet einen Unterschied im 2D-Integrationsfaktor von 0.3 – und somit können Restraints, die NH-Protonen betreffen, nicht in die Rechnung miteinbezogen werden.

Die Eichung der HH-Abstände erfolgte auf die geminalen Protonen $\text{H}1^{\text{h}} - \text{H}1^{\text{t}}$ (\equiv 1.8 Å) bzw. im Falle von Me-ROEs auf $\text{H}5 - \text{Me}5$ (\equiv 2.15 Å). Ferner war die Bestimmung der Me-Abstände mit einem entsprechenden Eichabstand nur aus dem NOESY Spektrum ($t_{\text{m}} = 600$ msec.) möglich, da im ROESY Spektrum alle möglichen Me-Eichabstände COSY-Artefakte anstelle von ROE-Kreuzsignalen aufwiesen.

Abstand	Aus ROESY (geminale Eichung) [Å]	Aus NOESY (Me-Eichung) [Å]	Differenz [Å]
14 – NMe(16)	2.0	2.85	0.85
Me14 – NMe(16)	2.5	2.7	0.2
Me17 – NMe(16)	2.25	2.5	0.25
$1^{\text{h}}/10^{\text{t}} - \text{Me}5/\text{Me}11$	2.5	2.5	0.0
$6^{\text{h}}/10^{\text{h}} - \text{Me}5/\text{Me}11$	2.3	2.3	0.0
NH4 – Me5/Me11	2.4	2.25	0.15
NH13 – Me14	2.6	2.2	0.4
NH19 – Me17	3.3	2.8	0.5

Für NH-ROEs sind die Korrekturfaktoren berücksichtigt

Tab. 19. Vergleich der Me-Abstände bei verschiedenen Eichungen.

Für ROEs zur N-Methyleinheit sind die Differenzen besonders gross, hier liegt wahrscheinlich eine veränderte Dynamik im Vergleich zum makrozyklischen Ring vor. Für ROEs zwischen NH und Methyl hat man zwei Unwägbarkeiten – die verminderte NH-Signalintensität und die unterschiedliche Me-Dynamik – so dass jene berechneten Abstände nur als grobe Richtwerte dienen sollten, und wie schon für die NH-ROEs der Fall, nicht als Restraints in der MD Simulationen eingesetzt werden können. Die ROEs zwischen Methylgruppen und CH-Protonen zeigen keinen grossen Unterschied, dennoch kann man von einer unterschiedlichen Dynamik – wie später noch für **Maclac1** gezeigt werden wird – ausgehen.

Für **Maclac2** wurden mehrere MD Simulationen (10 x 10ps bei 300K) durchgeführt, wobei die gesetzten Restraints – HH-Abstände und Torsionswinkel – variiert wurden. Allerdings zeigte sich deutlich, dass aufgrund der hohen Dynamik des Systems keine Struktur erhalten werden kann, die den experimentell ermittelten Werten (ROEs, J Kopplungen) gerecht wird.

Bleibt nur die Möglichkeit, auf einige experimentelle Werte, die eindeutige (Teil-)Aussagen über die Struktur zulassen, näher einzugehen.

Ein Punkt sind evtl. vorliegende cis-Amidbindungen. Wie die $^3J_{\text{NH,H}\alpha}$ Werte in Tabelle 20 zeigen, besitzt NH13 eine Kopplung von nur ca. 5.5 Hz – ein Wert, der eher Richtung cis-Amidbindung tendiert. Da das betreffende NH-Signal relativ breit ist und auch aus dem Lorentz-Gauss-transformierten ^1H Spektrum die Kopplung nur schlecht abgelesen werden kann, ist dieser Sachverhalt nur durch entsprechende ROE Daten zu be- oder widerlegen. Und in diesem Falle kann man nur über das Fehlen bestimmter ROEs Strukturaussagen treffen.

So sind für cis-Amidbindungen besonders intensive α - α -ROEs zu beobachten.¹⁴

Dies wären für **Maclac2**:

H2 – H5	→ kein ROE
H11 – H14	→ kein ROE (dieser wäre für NH13 in cis-Stellung vorhanden)
H14 – H17	→ nicht eindeutig; wenn ja, dann im Rauschen
H17 – H2	→ keine Aussage möglich, da 17 und 2 überlagert sind

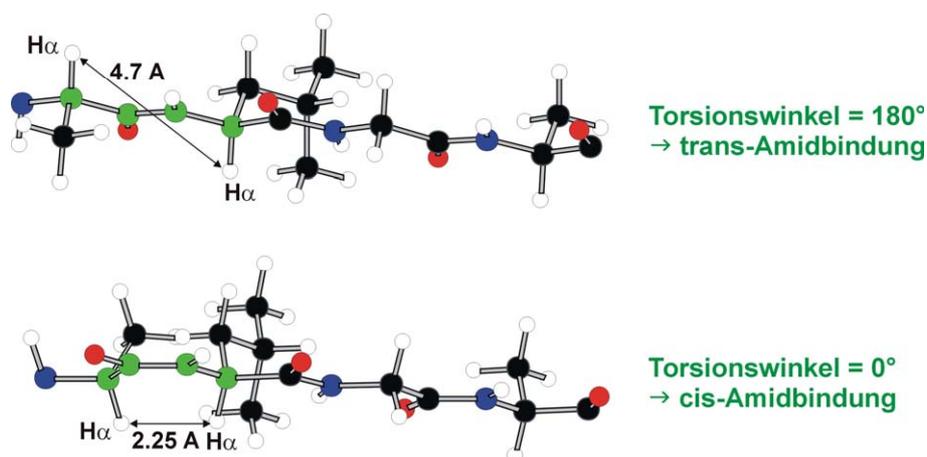


Abb. 30. Darstellung des α - α -Abstandes bei cis- bzw. trans-Amidbindung am Beispiel eines Tetrapeptids.

Somit liegen im Hauptkonformer von **Maclac2** ausschliesslich trans-konfigurierte Amidbindungen vor.

NH-Proton	$^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ [Hz]	$^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ [Hz]
	Maclac1	Maclac2
NH19	8.3	9.0
NH16	~3.3 (breit)	N-methyliert
NH13	8.1	~5.5 (breit)
NH4	8.1	8.1

Tab. 20. $^3J_{\text{NH}, \text{H}\alpha}$ Kopplungen der amidischen NH-Protonen in **Maclac1** und **Maclac2**.

Diesen 18-gliedrigen Ringen und den zuvor vorgestellten 19-gliedrigen Systemen ist zudem die Pendelbewegung der 1,3-disubstituierten Phenyleinheit gemein.

Die niedrigen Temperaturkoeffizienten von -1.0 ppb/K für NH4 und $+0.4$ ppb/K für NH13 machen deren Beteiligung an H-Brücken wahrscheinlich. Für NH4 ist dies auch in Einklang mit ROE Daten, die die Ausbildung einer $\beta\text{II}'$ -Turn ähnlichen Struktur, wie in Abb. 31 gezeigt, stützen (siehe Experimentaltteil). Dabei bildet NH4 eine transannulare H-Brücke zu CO(15) aus.

Der niedrige Temperaturkoeffizient für NH13 ist nicht in Einklang zu bringen mit den übrigen, experimentellen Daten, also den ROEs, die all-trans Amidbindungen stützen. Für NH13 ist kein Partner für eine H-Brücke in geeigneter Entfernung oder geometrischer Anordnung vorhanden.

Somit ist zwar NH13 stärker vom LM abgeschirmt (dies ist die eigentliche Bedeutung eines niedrigen Temperaturkoeffizienten) als NH19, eine H-Brücke kann für NH13 jedoch nicht bestätigt werden.

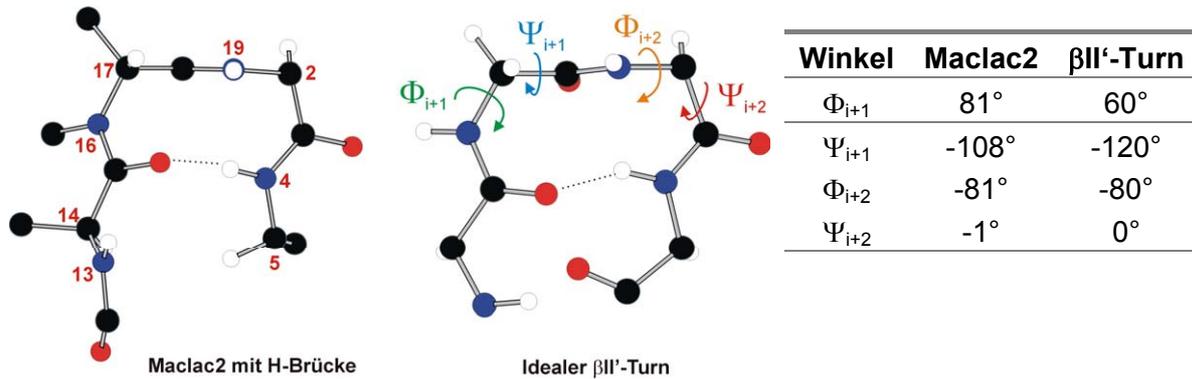


Abb. 31. und Tab. 21. Ausschnitt aus **Maclac2** Struktur (MD 2ps bei 400 K; gesetzte Restraints: postulierte H-Brücke, trans-Torsionswinkel für Amidbindungen) und idealer β II'-Turn. Die H-Brücke ist durch eine punktierte Linie dargestellt. Vergleich der Φ/Ψ Winkel der beiden Schleifenstrukturen.

Noch kurz ein Wort zum Vorliegen eines Nebensignalsatzes, wie es für eine N-methylierte Amidbindung zu erwarten ist. Für **Maclac2** erhält man sogar zwei weitere Signalsätze, allerdings sind diese – wie schon bei **Sy5141** der Fall – verschwindend klein und gehen annähernd im Rauschen unter, so dass der Hauptsignalsatz zu mehr als 99% populiert ist.

In nicht überlagerten Bereichen des NOESY Spektrums können zu jedem Signal des Hauptsignalsatzes eindeutig zwei Austauschsignale identifiziert werden. Um welches weitere Nebenkonformer (ausser cis-Amid in Position 16) es sich handeln könnte, ist nicht bekannt.

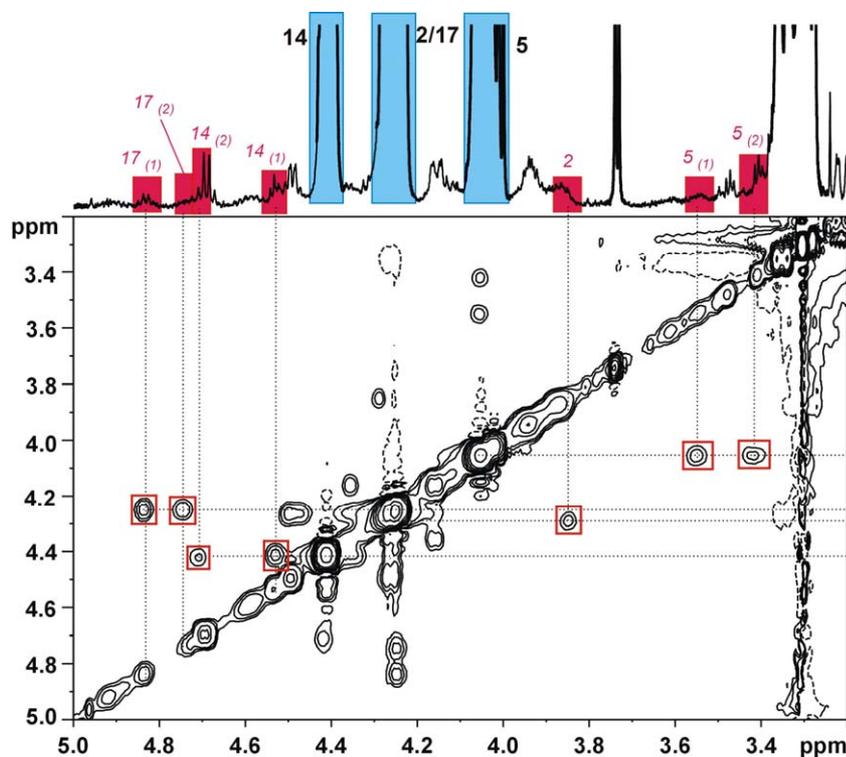


Abb. 32. NOESY Ausschnitt für **Maclac2** aus dem CH-Bereich. Der Hauptsignalsatz ist in **blau** dargestellt. Die entsprechenden Nebensignale in **rot** (300 K, DMSO-d_6 , $t_m = 600$ msec).

Eine ungewöhnliche Beobachtung konnte noch für **Maclac1** bei Aufnahme eines NOESY Spektrums bei 300 K gemacht werden. Hier besitzen die NOE Kreuzsignale der aromatischen Seitenkette und die NOE Kreuzsignale zu den Methylgruppen ein negatives Vorzeichen (positiver NOE), wohingegen alle übrigen Kreuzsignale positives Vorzeichen besitzen. Dieses „Phänomen“ tritt bei Messungen bei 300 K auf, ist bei Erhöhung der Temperatur auf 320 K jedoch verschwunden. Auch aufgrund dieses Ergebnisses kann von einer unterschiedlichen Dynamik von Seitenketten (inkl. Methylgruppen) und Makrozyklus ausgegangen werden.

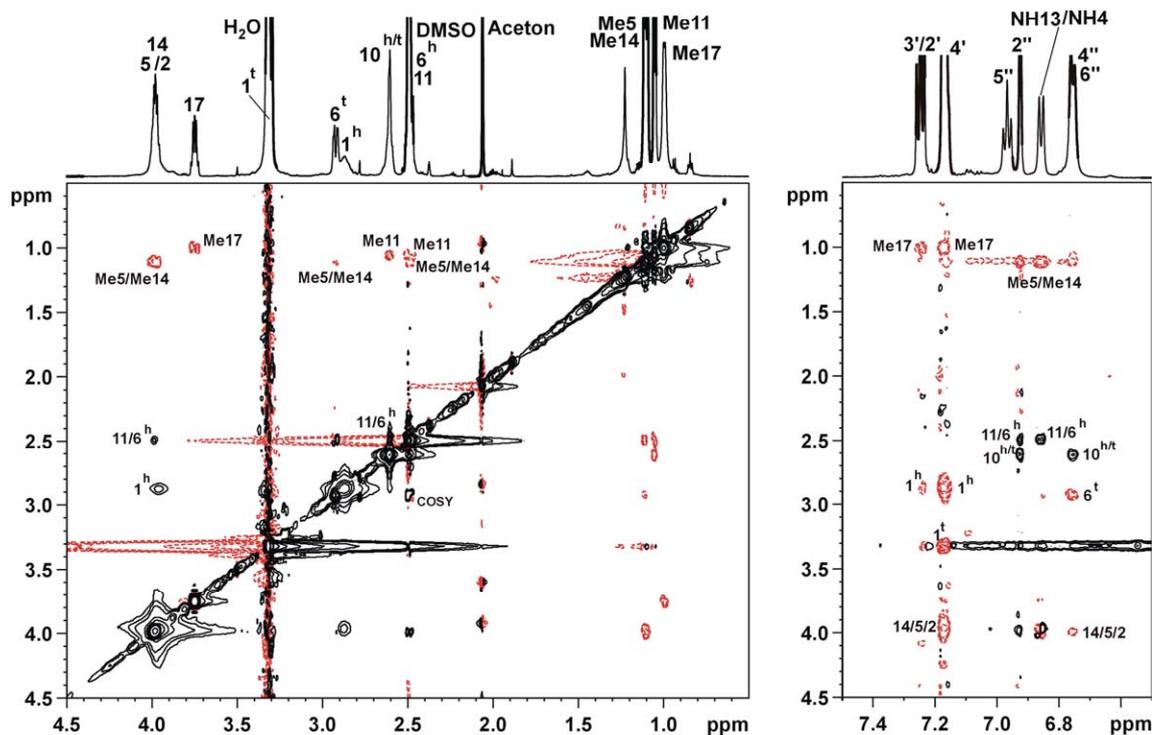


Abb. 33. Ausschnitte aus dem NOESY Spektrum von **Maclac1** bei 300 K. Deutlich zu erkennen die unterschiedlichen Vorzeichen der Kreuzsignale (300 K, DMSO_{d6}, t_m = 600 msec.).

4. Zusammenfassung

Für die untersuchten, peptidischen Jasplakinolid Analoga – **Sy2741**, **Sy5141**, **Maclac1** und **Maclac2** – konnte im Falle der 19-gliedrigen Makrozyklen **Sy2741** und **Sy5141** eine grössere Rigidität des Ringes im Vergleich zu Jasplakinolid festgestellt werden. Ansonsten sind diese Systeme sehr gut mit dem Naturstoff Jasplakinolid vergleichbar – sie zeigen wie dieser keine Ausbildung von Wasserstoffbrücken und keine Populierung des cis-Rotameren bei N-Methylierung in Position 16. Obwohl eine N-Methylierung eine genügend hohe Barriere darstellt, um im NMR für jedes Rotamer einen separaten Signalsatz zu erhalten, liegt der Anteil des Nebenrotamers für **Sy5141** im Bereich von < 1% und deckt sich damit mit den Ergebnissen für Jasplakinolid aus der Literatur.⁴

Die neu eingeführte 1,3-disubstituierte Benzyleinheit zeigt eine Pendelbewegung um eine Vorzugsachse, wobei es sich dabei nur um eine schwache Auslenkung und keine vollständige Rotation um diese Achse handelt.

Die Orientierung der beiden aromatischen Seitenketten wurde im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht untersucht, es konnte aber gezeigt werden, dass die Makrozyklen **Sy2741** und **Sy5141** eine einheitliche Dynamik aufweisen und die Seitenketten keine vom Rest unabhängige, beschleunigte Rotation besitzen.

Davon völlig verschieden verhalten sich die, um ein Kohlenstoffatom verkleinerten, Makrozyklen **Maclac1** und **Maclac2**. Sie weisen beide jeweils eine transannulare Wasserstoffbrücke auf, sind aber insgesamt sehr viel flexibler als die zuvor besprochenen Makrozyklen und das natürliche Analogon Jasplakinolid. Eine eindeutige Struktur konnte aufgrund der hohen Flexibilität und zahlreicher Signalüberlagerungen nicht ermittelt werden. Zudem hatte sich gezeigt, dass im Falle dieser 18-gliedrigen Makrozyklen die Dynamik von Seitenketten und Ring unterschiedlich ist. Deutlich war dies für **Maclac1** im NOESY Spektrum bei 300 K zu beobachten. Hier hatten die NOE Kreuzsignale unterschiedliche Vorzeichen, je nachdem ob es ein NOE Kontakt zu einem Proton einer Seitenkette oder einem Ringproton war.

Zu diskutieren wäre beim Vergleich der 19- mit den 18-gliedrigen Analoga, ob die in **Sy2741/Sy5141** vorhandenen aromatischen Seitenketten – Indol und p-Methoxyphenyl – tatsächlich einen Einfluss oder evtl. stabilisierenden Effekt auf das makrozyklische Ringsystem ausüben. Dies würde die stark erhöhte Flexibilität von **Maclac1** und **Maclac2** zumindest teilweise erklären.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die 19-gliedrigen Makrozyklen **Sy2741** und **Sy5141** strukturell in sehr guter Übereinstimmung mit dem Naturstoff Jasplakinolid sind und eine noch grössere Rigidität des Ringsystems besitzen. Wogegen die 18-gliedrigen Makrozyklen **Maclac1** und **Maclac2** sehr viel flexibler als alle anderen hier besprochenen Makrozyklen und nur wenig bis gar nicht mit dem natürlichen Analogon vergleichbar sind.

5. Literaturstellen

- [1] Zabriskie T. M.; Klocke J. A.; Ireland C. M.; Marcus A. H.; Molinski T. F.; Faulkner D. J.; Xu C.; Clardy J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3123-3124.
- [2] Zampella A.; Giannini C.; Debitus C.; Roussakis C.; D'Auria M. V. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 332-334.
- [3] Chu K. S.; Negrete G. R.; Konopelski J. P. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5196-5202.
- [4] Inman W.; Crews P. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2822-2829.
- [5] Spector I.; Braet F.; Shochet N. R.; Bubb M. R. *Microscopy Research and Technique* **1999**, *47*, 18-37.
- [6] Inman W.; Crews P.; McDowell R. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2523-2526.
- [7] Jaspers M. *Advances in Drug Discovery Techniques*; Harvey A. L., Ed, Wiley: Chichester, **1998**, 65-84.
- [8] Hermann C.; Giammasi C.; Geyer A.; Maier M. E. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8999-9010.
- [9] Kessler H. *Angewandte Chemie* **1982**, *94*, 509-520.
- [10] Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; J. Wiley & Sons: New York, **1986**; 166-167.
- [11] Claridge T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*; Pergamon, Elsevier Science Ltd.: Oxford, **1999**; 329-332.
- [12] Oki M. *Methods in Stereochemical Analysis 4, Applications of Dynamic NMR Spectroscopy to Organic Chemistry*, VCH Verlag: Weinheim, **1985**; 43-45.
- [13] Moriarty R. M. *Journal of Organic Chemistry* **1964**, *29*, 2748-2750.
- [14] Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; J. Wiley & Sons: New York, **1986**; 122-125.
- [15] (a) Venkatachalam M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-1436. (b) Lewis P. N.; Momany F. A.; Scheraga H. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *303*, 211-229. (c) Richardson J. S. *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167-339.

Kapitel VI

4'-modifizierte DNA Tetramere – Strukturanalyse für Einzel- und Doppelstrang

1. Allgemeines

Die DNA – der Träger unserer Erbinformation – besteht aus insgesamt ca. 3 Milliarden Basenpaaren und kodiert die Synthese für etwa 100.000 verschiedene Proteine. Aber nicht nur die fehlerfreie Synthese aller Proteine unseres Organismus ist von entscheidender Bedeutung, sondern auch die korrekte Vervielfältigung und Weitergabe des genetischen Materials.¹ Hierbei spielen die DNA Polymerasen eine wichtige Rolle. Seit der Entdeckung der doppelhelikalen Struktur der DNA vor mehr als 50 Jahren durch Watson und Crick² ist die Forschung auf dem Gebiet der Entschlüsselung und dem Verständnis über die Weitergabe des genetischen Materials enorm vorangeschritten. Ein Bereich, der seit geraumer Zeit intensiv bearbeitet wird, ist, die Struktur und Funktion der DNA mit strukturell veränderten Basen oder verändertem Backbone zu imitieren. Allgemein sind drei Ansatzpunkte für eine gezielte Änderung der DNA vorhanden: (1) die α -Phosphatgruppe, sie sitzt direkt am 5'OH der Desoxyribose, (2) die Zuckereinheit, im Falle der DNA die Desoxyribose und (3) die Nukleotidbasen.

Um die Purin- und Pyrimidinbasen der DNA zu variieren gibt es verschiedene Möglichkeiten^{1,3,4}, z.B.:

- Änderung des H-Brückenmusters durch Änderung des Donor- und Akzeptormusters paarender Basen (z. B. iso-C / iso-G)
- Neue Basen, die ein Watson-Crick H-Brückenmuster ausbilden
- Modifizierung der H-Brücken bildenden, funktionellen Einheiten, so dass keine H-Brücken zwischen den Basen mehr möglich sind
- Ersatz durch strukturell ähnliche, unpolare „Basen“, die keine H-Brücken mehr ausbilden können.

Die Variation der α -Phosphatgruppe besteht z.B. in einem Austausch ihres sp-hybridisierten Sauerstoffs durch Schwefel oder eine Methylgruppe.^{3,4}

Variationen des negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA sind über verschiedene Ansatzpunkte möglich:

- Änderung der Gesamtstruktur: zirkuläre DNA-Fragmente³
- peptidische Nukleinsäuren (PNA) als achirales, ungeladenes Analogon⁴
- Modifikation der Desoxyribose, z.B. in Form einer Alkylierung an C4'^{5,6}

Der letztgenannte Punkt – die Alkylierung des C4' der Desoxyribose – ist etwas näher erläutert, handelt es sich doch um die Modifikation der im Folgenden untersuchten DNA Tetramere. Dabei sind die, in der Arbeitsgruppe von Prof. A. Marx

* Bei den Literaturstellen [3] und [4] handelt es sich um Reviews zu diesem Thema. Die Literaturstellen zu den einzelnen Unterpunkten sind diesen zu entnehmen.

synthetisierten, Nukleotidbausteine ausschliesslich Thyminde, die an C4' unterschiedliche Substituenten tragen, z.B. Methyl, Ethyl, Isopropyl oder Vinyl (Abb. 1).

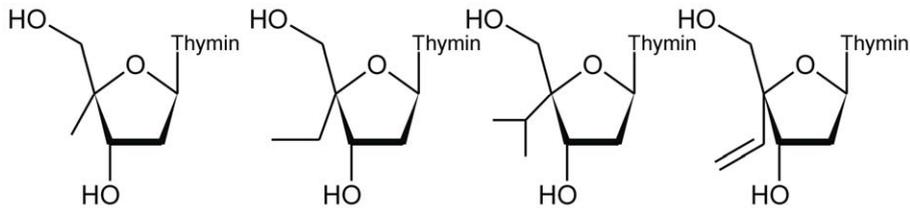
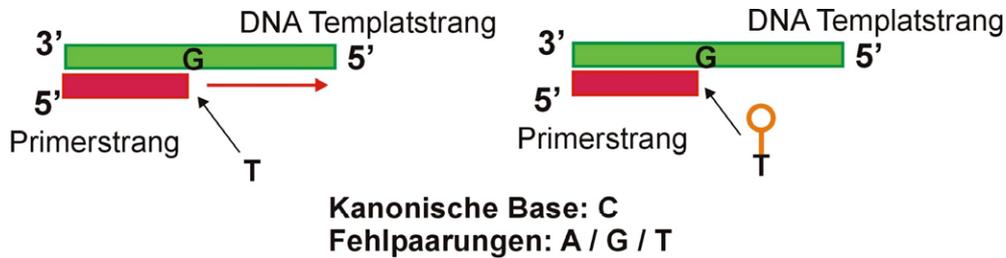


Abb. 1. Beispiele für C4'-modifizierte Thyminde aus der Arbeitsgruppe von Prof. A. Marx

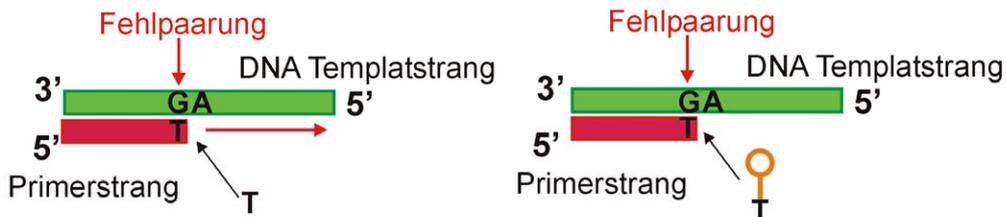
Von ihrem Potential als Therapeutikum im medizinischen Bereich abgesehen, haben sich C4'-alkylierte Nukleotidbausteine als hervorragendes Hilfsmittel bei der Untersuchung komplexer biologischer Prozesse erwiesen. So sind sie vor allem bei der Untersuchung der Funktion und des Wirkungsmechanismus des Enzyms DNA Polymerase von großer Bedeutung.⁵ Interessant sind besonders die Eigenschaften dieser modifizierten Bausteine. So behindert eine Alkylierung an Position C4' weder die Ausbildung des basenspezifischen H-Brückenmusters im Doppelstrang, noch die Nukleobasenstapelung benachbarter Basen im Strang.⁶ Der Alkylrest an C4' zeigt in Richtung der kleineren Furche doppelsträngiger DNA und führt zu keiner signifikanten Änderung bei der Ausbildung des Doppelstranges, wie die von Marx et al. gemessenen Schmelztemperaturen T_m zeigen.⁷ Weitere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von A. Marx haben gezeigt, dass der Einbau von C4' methyliertem Thyminintriphosphat (TTP) in den Primerstrang eine höhere Selektivität für die paarende Base aufweist als unmodifiziertes Thyminintriphosphat.⁸ Das heisst, der Einbau von Thymin gegenüber von Cytosin oder Guanin (also mit Thymin nicht paarenden Basen) ist für C4' methyliertes TTP um etwa Faktor 100 selektiver als für unmodifiziertes TTP. Ist die Alkylgruppe an Position C4' jedoch sterisch anspruchsvoller (z. B. iso-Propyl), so ist aufgrund der sterischen Hinderung der Einbau in den Primerstrang auch gegenüber von Adenin i. Vgl. zu unmodifiziertem TTP deutlich reduziert.⁶ Enthält jedoch der Templatstrang ein C4' modifiziertes Thymin, so ist die Unterscheidung für den Einbau einer fehlerhaften Base im Primerstrang ähnlich effektiv wie für nicht modifiziertes Thymin.⁹ Aus diesen Ergebnissen folgerten Marx et al., dass die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Substrat (= DNA), die für die Selektivität des Enzyms entscheidend sind, hauptsächlich den Zuckerbaustein des eintretenden Triphosphats betreffen.⁹

Eine interessante Anwendung ihrer Ergebnisse beschreiben Marx et al. in¹⁰, so dient C4' vinyliertes Thymin am 3' Ende des Primerstranges bei der PCR (Polymerase Chain Reaction) dazu, die ihm, im Templatstrang gegenüber liegende, Base mit höherer Selektivität zu erkennen als ein unmodifiziertes 3' Primerende. Daraus resultiert eine weitere Verlängerung des Primerstranges im Falle von Adenin, ein Abbruch der Strangsynthese im Falle von nicht kanonischen (also nicht mit Thymin paarenden) Basen. Dieser Effekt zeigt sich am stärksten für Vinyl in 4' Position. Diese Anwendung ist besonders interessant, um Variationen einzelner Basen im Genom des

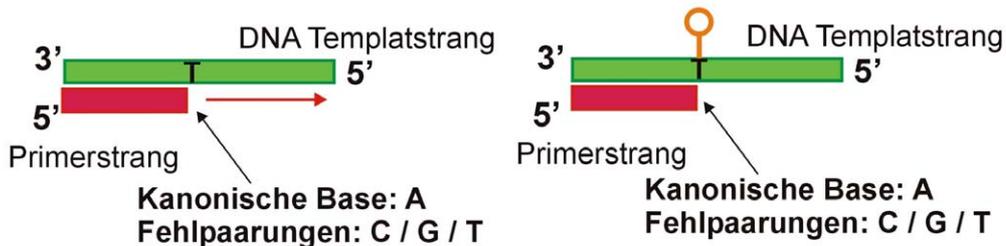
Menschen zu identifizieren, zumal diese minimalen Änderungen der Sequenz (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) für die von Patient zu Patient unterschiedliche Wirksamkeit von Medikamenten und eine Prädisposition für bestimmte Krankheiten mitverantwortlich gemacht wird.¹⁰



→ eine Basenfehlpaarung tritt mit dem 4' modifizierten Nukleotid um bis zu Faktor 100 seltener auf



→ die Strangfortführung nach einer Basenfehlpaarung wird durch ein 4' modifiziertes Nukleotid sehr viel effektiver unterbunden



→ Fehlpaarungen in beiden Fällen ähnlich häufig
→ keine Effekte durch 4' modifiziertes Nukleotid im DNA Templatstrang

Abb. 2. Graphische Darstellung der Auswirkungen des Einbaus eines 4' modifizierten Nukleotids in Primer- bzw. Templatstrang bei der DNA Replikation.

Auf struktureller Seite konnten Marx et al. ferner zeigen, dass durch Alkylierung an C4' zwar das Rückgrat aus Wassermolekülen, welche sich in den Furchen der DNA Doppelhelix befinden, unterbrochen wird, dies jedoch zu keinem Verlust an Stabilität der Duplexstruktur führt.¹¹ Verschiedene, untersuchte doppelsträngige Oligonukleotide zeigten annähernd keine Abhängigkeit ihrer Schmelztemperatur T_m vom Vorlie-

gen einer (oder mehrerer) C4' Methyl- bzw. Ethylgruppe(n) im Vergleich zum unmodifizierten Oligonukleotid. Auch die aufgenommenen CD Spektren sind nahezu deckungsgleich – unabhängig sowohl von der Größe der eingeführten Alkylgruppe als auch von ihrer Position im Strang.⁵ Dies ist gleichbedeutend mit einer nur geringen Abhängigkeit der Helixkonformation von einer C4' Alkyl Modifizierung.¹¹

Da die oben genannten Methoden sog. „Bulk“ Methoden sind, mit Hilfe derer nur eine grössere Änderung der Struktur beobachtet werden kann, wird im Folgenden die Untersuchung modifizierter und unmodifizierter DNA Tetramere aus der Arbeitsgruppe von Prof. A. Marx mittels hochauflösender NMR Spektroskopie vorgestellt. NMR gestattet eine Untersuchung der Tetramere auf atomarer Ebene und kann somit auch geringe Änderungen in der Struktur sichtbar machen. So ist zum Beispiel zusätzlich zu Aussagen über die Orientierung der einzelnen Basen für kürzere DNA Stränge auch das unterschiedliche Ringpuckering der Desoxyribosebausteine eindeutig zu bestimmen.

Eine grundlegende Änderung der Struktur durch Alkylierung an C4' ist aufgrund der Schmelztemperaturmessungen und der CD spektroskopischen Untersuchungen nicht zu erwarten; allerdings kann die NMR spektroskopische Untersuchung durch Messung im Schmelzbereich der DNA Tetramere Aufschluss über evtl. auftretende Unterschiede bei der Doppelstrangbildung geben.

Im Folgenden seien drei, in der Arbeitsgruppe von Prof. A. Marx synthetisierte, DNA Tetramere und deren NMR spektroskopische Untersuchung gezeigt.

2. Ermittlung der Konformation der Einzelstränge

2.1 Allgemeines zu den strukturellen Eigenschaften von DNA

Die Bausteine der DNA – die Nukleotide – bestehen aus einer Desoxyribose, die an C1' eine von vier möglichen Basen trägt (Abb. 3). Verknüpft werden die einzelnen Nukleotide über Phosphodiester an O3' und O5' – der daraus entstehende DNA Einzelstrang kann sich über Wasserstoffbrücken (Abb. 4), die von den Basen ausgebildet werden, mit einem zweiten Strang paaren. Dieser Doppelstrang weist, im Falle der DNA, eine helikale Struktur auf.¹²

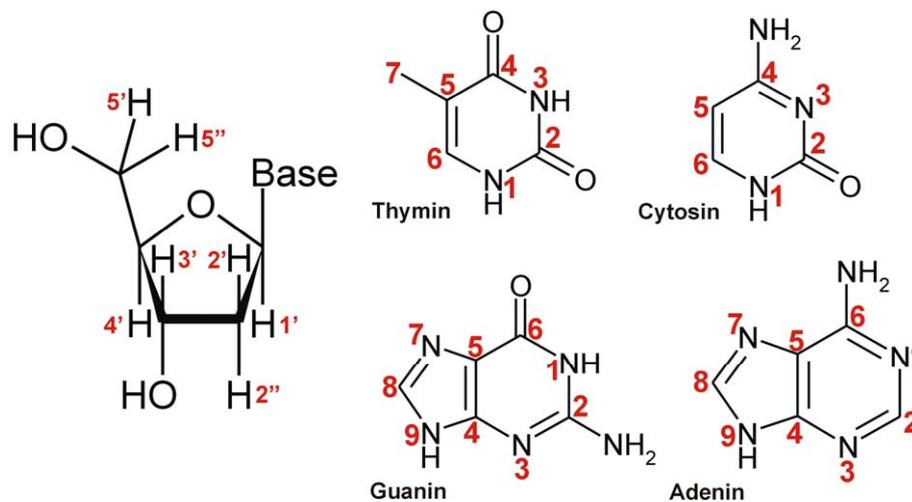


Abb. 3. Desoxyribose als Zuckereinheit der DNA-Bausteine (links) und die vier in der DNA vorkommenden Basen (rechts) mit ihrer Numerierung.

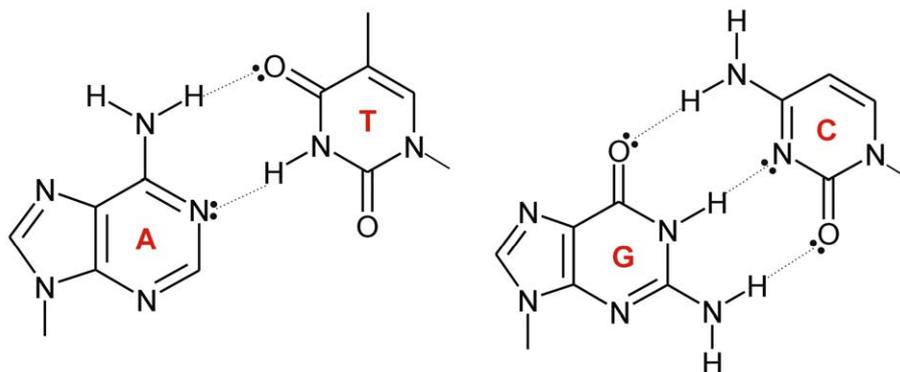


Abb. 4. Die klassischen Watson-Crick Wasserstoffbrücken zwischen Adenin (A) und Thymin (T) bzw. Guanin (G) und Cytosin (C), wie sie im DNA-Doppelstrang vorkommen. Neben diesen gibt es noch viele weitere, mögliche H-Brückenmuster, wie z. B. die sog. Hoogsteen Wasserstoffbrücken.¹³

Verschiedene Parameter charakterisieren die 3-dimensionale Struktur einer DNA Doppelhelix.

Bereits bei den einzelnen Nukleotidbausteinen gibt es verschiedene mögliche Konformationen, wie diese vorliegen können. Zum einen kann die Desoxyribose unterschiedliches Ringpuckering zeigen – sie liegt in einer sog. Envelope-Form vor, wobei sich eine oder mehrere Ecken des Rings ober- oder unterhalb einer definierten Ringebene befinden. In den gängigen DNA Helices liegt die Zuckereinheit bevorzugt als C2'-endo (B-DNA) oder als C3'-endo (A-DNA) vor (Abb. 6).¹⁴

Das bezeichnete C-Atom ist jenes, welches sich ausserhalb der von C1', O4' und C4' definierten Ebene befindet; endo bedeutet, dass sich jenes C-Atom auf derselben Seite des Ringes wie C5' befindet. Da die benötigte Energie für einen Übergang zwischen den einzelnen Puckering Konformationen relativ gering ist, hat man i.A. ein Gleichgewicht aus mehreren Konformationen vorliegen, wobei die oben genannten die in der DNA bevorzugten Konformationen darstellen.

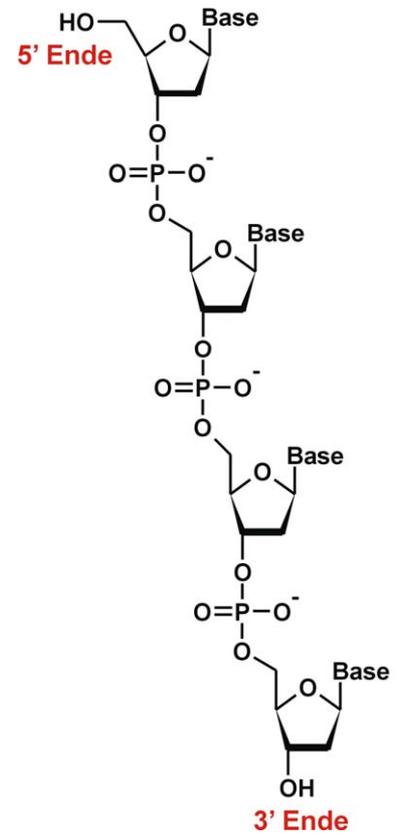


Abb. 5. DNA Einzelstrang mit Phosphodiesterbrücken

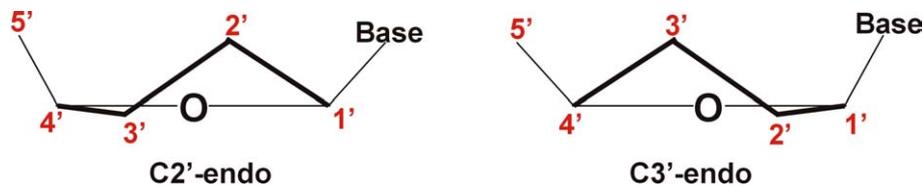


Abb. 6. Die in DNA bevorzugt auftretenden Ringpuckering Konformationen C2'-endo und C3'-endo.

Auch bei der Ausrichtung der Base relativ zu ihrer Zuckereinheit sind zwei Hauptorientierungen möglich, sie werden als syn ($\chi = \sim 60^\circ$) und anti ($\chi = \sim -130^\circ$) bezeichnet. Dies wird durch den Winkel χ zwischen O4'-C1'-N9-C4 für Purinbasen bzw. O4'-C1'-N1-C2 für Pyrimidinbasen definiert (Abb. 7). Die Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T) kommen ausschliesslich in anti Orientierung vor, die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) können beide Orientierungen einnehmen, kommen aber ebenfalls bevorzugt in anti Orientierung vor (Abb. 8).^{15, 16}

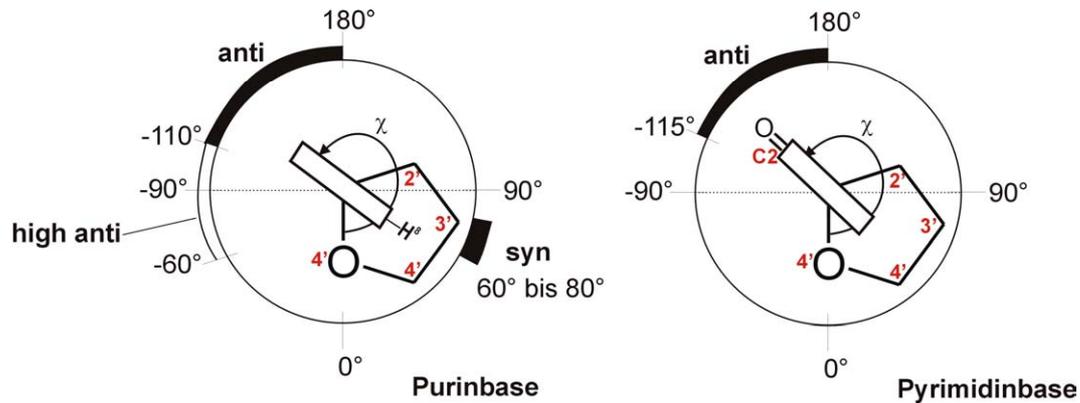


Abb. 7. Darstellung des Winkels χ für Purin- bzw. Pyrimidinbasen.¹⁷

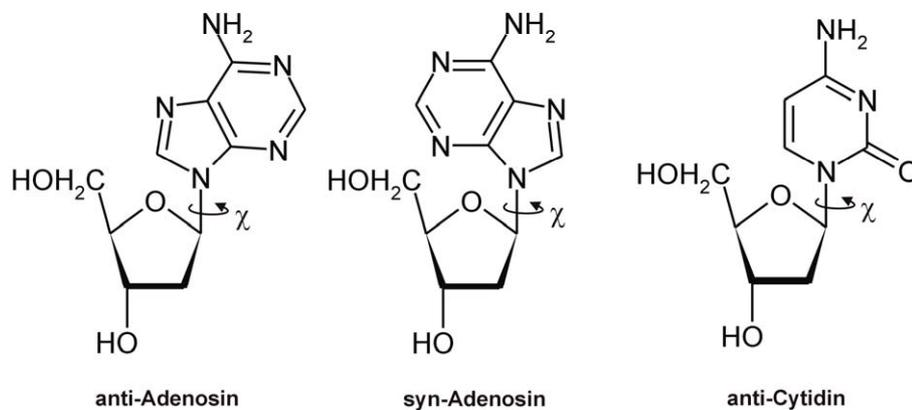


Abb. 8. syn- und anti-Konformation für Purinbasen am Beispiel von Adenin, und die bei Pyrimidinbasen ausschliesslich vorliegende anti-Konformation am Beispiel von Cytosin.

Bei der Ausbildung der doppelsträngigen DNA gibt es viele Parameter, welche für die 3-dimensionale Struktur der Helix entscheidend sind. Daher sei hier nur eine Übersicht über die, für die drei am häufigsten auftretenden Helixtypen, charakteristischen Parameter wiedergegeben (Tab. 1). Die als B-DNA bezeichnete Struktur ist die in kurzen DNA und DNA/RNA Hybriddoppelsträngen anzutreffende Helix; A-„DNA“ kommt nur in RNA vor und Z-DNA gelegentlich in DNA, falls (1) Substituenten an der C5 Position von Cytosin vorhanden sind, (2) hohe Salzkonzentrationen vorliegen oder (3) eine alternierende Sequenz von Purin- und Pyrimidinbasen der Fall ist.

Helix Parameter	B-DNA	A-DNA	Z-DNA
Helikaler Drehsinn	rechts	rechts	links
Basenpaare pro helikaler Windung	10.0	10.9	12.0
Helikaler Anstieg pro Basenpaar	3.4 Å	2.0 Å	GC 3.5 Å CG 4.1 Å
Helikale Ganghöhe	34.0 Å	31.6 Å	45.6 Å
Winkel χ (glykosidische Bindung)	anti	anti	C anti G syn

Desoxyribose Konformation	C2' endo	C3' endo	C C2' endo G C3' endo
Basenpaarung	Watson-Crick	Watson-Crick	Watson-Crick
Wiederholungseinheit	1 Basenpaar	1 Basenpaar	2 Basenpaare
Helikale Windung pro Basenpaar	36°	33°	GC -51° CG -9°
Achsenverschiebung	0	4 Å	-3 Å
Grosse Furche	tief, breit	sehr tief	flach
Kleine Furche	tief, eng	flach	sehr tief
Neigung der Basen	-2°	13°	9°

Tab. 1. Zusammenstellung wichtiger DNA-Doppelhelix Charakteristika.¹⁵

2.2 Wichtige NMR Parameter für DNA Strukturen

Um die hauptsächlich vorliegende Ringkonformation zu bestimmen, hat man zwei experimentelle Parameter:

1. die $^3J_{\text{HH}}$ Kopplungen für Protonen an C1', C2', C3' und C4' innerhalb der Desoxyribose; mit Hilfe der Karplusbeziehung (1) kann hieraus das Ringpuckering ermittelt werden.
2. signifikante ROEs, die innerhalb der Desoxyribose auftreten; nach Integration und Bezug auf einen Referenzabstand kann aus dem erhaltenen ROE Muster auf das Ringpuckering rückgeschlossen werden.

Die allgemeine Formel der Karplusbeziehung lautet:

$$^3J(\text{HCCH}) = A \cdot \cos^2\theta + B \cdot \cos\theta + C \quad (1)$$

Die Variablen A, B und C sind empirische Parameter und betragen für DNA:¹⁸

$$A = 11.7 \quad B = -0.4 \quad C = 0$$

Somit ergibt sich die für DNA gültige Karplusbeziehung zu:

$$^3J(\text{HCCH}) = 11.7 \cdot \cos^2\theta - 0.4 \cdot \cos\theta \quad (1.1)$$

Der aus den $^3J_{\text{HH}}$ Kopplungen ermittelte Torsionswinkel θ kann in nachfolgende Gleichungen eingesetzt werden und man erhält hieraus die Parameter P, den Phasenwinkel der Pseudorotation, und ψ_m , die Puckering Amplitude.¹⁹

$$\theta_{1'2'} = 121.4 + 1.03 \cdot \psi_m \cdot \cos(P-144^\circ) \quad (2.1)$$

$$\theta_{1'2''} = 0.9 + 1.02 \cdot \psi_m \cdot \cos(P-144^\circ) \quad (2.2)$$

$$\theta_{2'3'} = 2.4 + 1.06 \cdot \psi_m \cdot \cos(P) \quad (2.3)$$

$$\theta_{2''3'} = 122.9 + 1.06 \cdot \psi_m \cdot \cos(P) \quad (2.4)$$

$$\theta_{3'4'} = -124.0 + 1.09 \cdot \psi_m \cdot \cos(P+144^\circ) \quad (2.5)$$

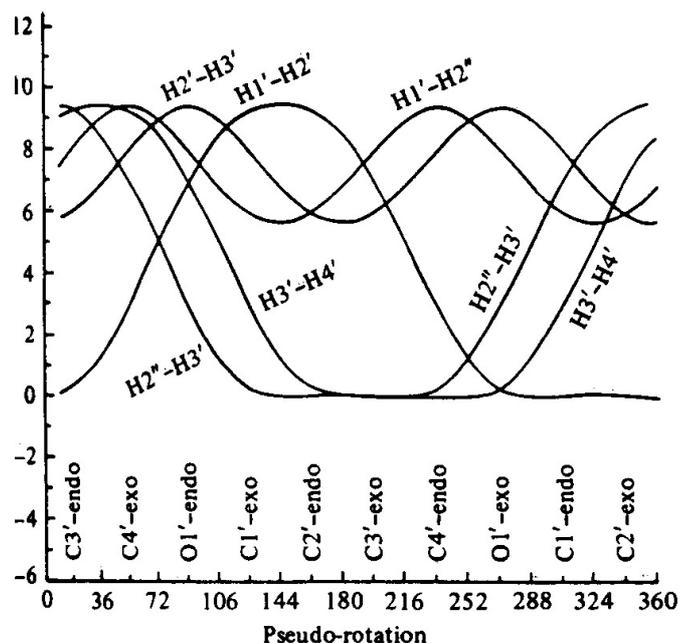


Abb. 9. Darstellung der Karpluskurven für Desoxyribose (aus ²⁰). Die y-Achse gibt den Wert für die ³J_{HH} Kopplung in Hz wieder.

Da jedoch die ³J_{HH} Kopplungen für H2'/H2'' sehr schlecht oder gar nicht ermittelt werden können – aufgrund eines vorliegenden AB Spinsystems – ist die Bestimmung des Ringpuckerings aus den ³J_{HH} Kopplungen nur begrenzt anwendbar.

Die zweite Möglichkeit, über das ROE Muster das Ringpuckering zu bestimmen, setzt voraus, dass eine geminale CH₂-Gruppe mit separierten Signalen oder ein anderer ROE als Eichabstand verwendet werden kann. Die Formel für die Ermittlung eines HH-Abstandes aus Integralen der ROESY-Kreuzsignale lautet:²¹

$$r_{kl} = r_{ij} * (V_{ij} / V_{kl})^{1/6} \quad (3)$$

mit r_{kl} = zu bestimmender Abstand
 V_{kl} = Integral des ROE-Kreuzsignals

r_{ij} = Abstand der Referenzprotonen
 V_{ij} = Integral d. ROE-Kreuzsignals
 der Referenzprotonen

Für diastereotope, geminale Protonen beträgt der Abstand (r_{ij}) 0.180 nm.²²

Nachfolgend seien die, für die beiden am häufigsten vorkommenden Ringkonformationen – C2'-endo und C3'-endo – relevanten HH-Abstände im Desoxyribosering gezeigt (Abb. 10 und Tab. 2).

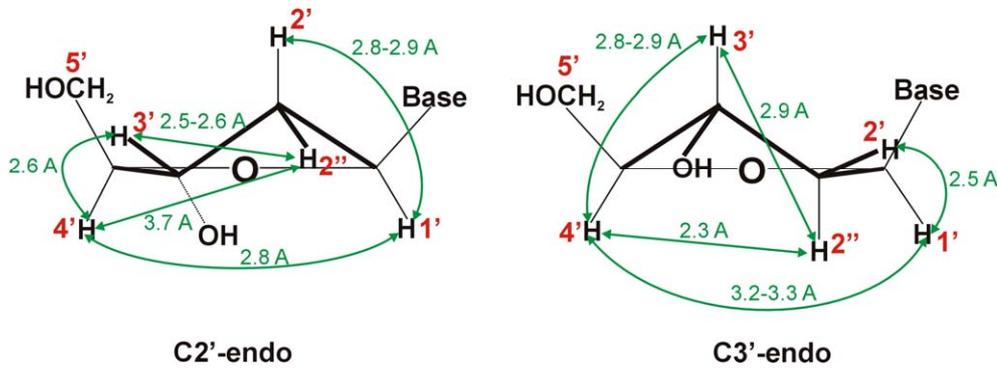


Abb. 10. Die in DNA/RNA-Nukleotiden am häufigsten vorkommenden Ringpuckerung Konformationen; nur die signifikant unterschiedlichen ROEs sind gezeigt. (Werte aus ²²)

ROE	für C2'-endo [Å] (P ~ 160°)	für C3'-endo [Å] (P ~ 20°)
H1' – H2'	2.8 – 2.9	2.5
H1' – H2''	2.2	2.2
H2' – H3'	2.3	2.3
H2'' – H3'	2.5 – 2.6	2.9
H3' – H4'	2.6	2.8 – 2.9
H1' – H4'	2.8	3.2 – 3.3
H2' – H4'	3.6	3.5 – 3.6
H2'' – H4'	3.7	2.3
H1' – H3'	3.5	3.6

Tab. 2. Übersicht über alle innerhalb des Desoxyribooserings vorkommenden HH-Abstände für C2'-endo und C3'-endo.

Anhand der experimentell ermittelten ROE Abstände kann man abschätzen, welches Konformer bevorzugt vorliegt.

Ein weiterer, wichtiger Faktor ist die Ausrichtung der Basen relativ zu ihrer Zuckereinheit. Auch dies ist über ROE Abstände ermittelbar. Wie zuvor bereits erwähnt, liegen die Pyrimidinbasen C und T ausschliesslich in anti-, die Purinbasen A und G sowohl in anti- als auch in syn-Anordnung vor. Nur für diese drei Fälle werden nachfolgend charakteristische ROEs dargestellt (Abb.11), wobei für die anti-Orientierung ein Bereich von $\chi = -90^\circ - -170^\circ$, für die syn-Orientierung ein Bereich von $\chi = 40^\circ - 90^\circ$ überstrichen wird. Sowohl für A-DNA als auch für B-DNA liegt χ für die anti-Orientierung im angegebenen Bereich. Im Falle von Thymin anstelle von Cytosin beträgt der Abstand der Protonen der Methylgruppe (H7) zu H1' der Zuckereinheit ca. 4.4 – 4.8 Å.²²

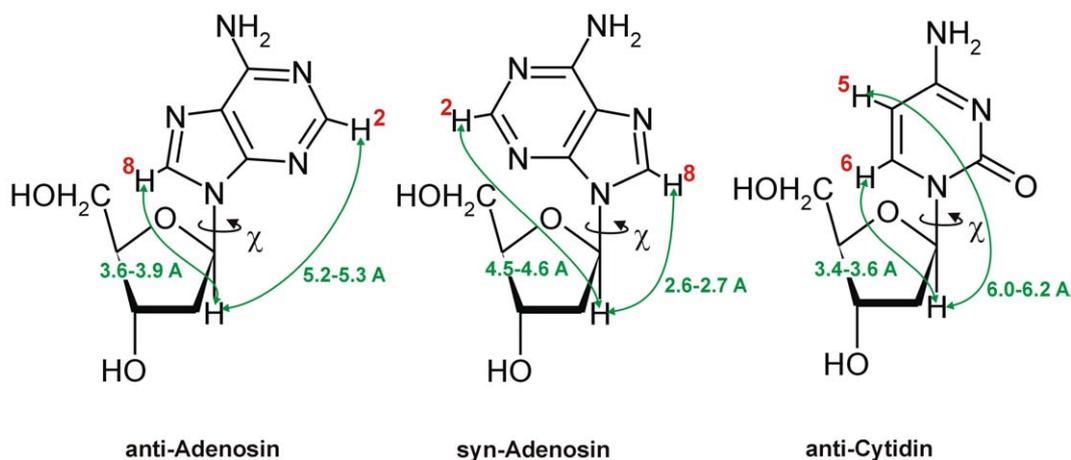


Abb. 11. Charakteristische ROE Abstände für die Orientierung der Base. (Werte aus ²²)

Um nun innerhalb eines DNA-Einzelstranges die Abfolge der Nukleotideinheiten bestimmen zu können, sind wiederum charakteristische ROEs zu suchen. Zieht man nur ROEs von nichtlabilen Basenprotonen in Betracht und beschränkt sich auf die B-DNA als Helixkonformation, so ist das in Abb. 12 abgebildete ROE Muster für die sequentielle Zuordnung von Bedeutung. Eine Übersicht über die charakteristischen ROEs, sowie die zugehörigen Abstände gibt Tab. 3 ergänzend zu Abb. 12 wieder.

ROE	Abstand [Å]
H6 / H8 – H2' (i)	-
H2'' – H6 (s)	2.2
H2'' – H8 (s)	2.1
H6 – H1' (i)	3.5
H8 – H1' (i)	3.7
H1' – H6 (s)	3.5
H1' – H8 (s)	3.6
H6 – H5 (s)	3.9
H6 – H7 (s)	3.8
H8 – H5 (s)	3.9
H8 – H7 (s)	3.8
H2 – H2 (s)	3.6

Tab. 3. ROEs zur sequentiellen Zuordnung im DNA-Doppelstrang (B-DNA). „i“ bedeutet „intranukleotid“ und „s“ bedeutet „sequentiell“. (Werte aus ²²)

In Abb. 12 sind die verschiedenen ROE-„Netze“ farblich unterschieden. So gelangt man immer vom Proton der eigenen Base zum H1' des zugehörigen Zuckers, von dort zum Proton der darauffolgenden Base. Ebenso ist es möglich, vom Proton der eigenen Base zum eigenen H2' zu sehen, vom H2'' desselben Kohlenstoffs weiter zum Proton der darauffolgenden Base. Diese beiden Ketten sollten zum gleichen Ergebnis bei der Sequenzanalyse des DNA-Stranges führen. Nur dann ist die getroffene Zuordnung in sich schlüssig. Als weitere Hilfe können die zwischen Protonen

benachbarter Basen auftretenden ROEs betrachtet werden. Allerdings sind diese oftmals sehr schwach und können im ROESY evtl. nicht detektiert werden.

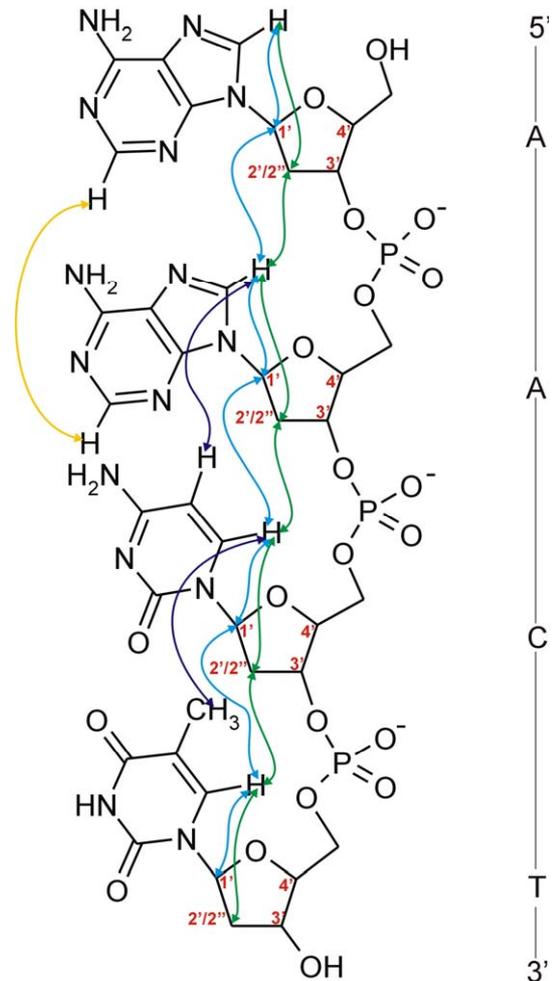


Abb. 12. DNA Einzelstrang mit sequentiellen ROEs.²³

Falls ein DNA-Doppelstrang vorliegt, werden immer die labilen, also aciden, Protonen (NH-Protonen) der Basen für ROE Abstände herangezogen. Zum einen gibt es ROEs zwischen den Basen innerhalb eines Basenpaares, zum anderen ROEs zwischen benachbarten Basenpaaren innerhalb des Doppelstranges. Hierfür ist es notwendig, in einem Lösungsmittel zu messen, in dem die NH-Signale der Basen detektierbar sind. Meist wird eine 90:10 (v/v) Mischung aus H₂O:D₂O oder ein analoger Puffer verwendet.

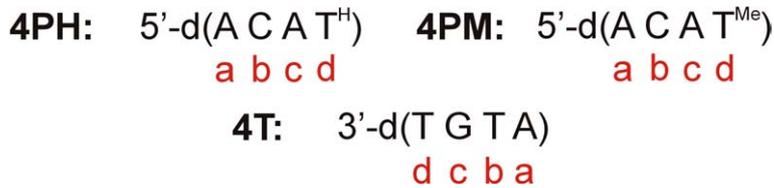
Da im vorliegenden Fall alle Messungen in reinem, gepufferten D₂O durchgeführt wurden, wird auf die, die labilen Basenprotonen betreffenden, ROEs nicht näher eingegangen.

Ein weiterer Parameter, der Aussagen über strukturelle Änderungen zulässt, ist die chemische Verschiebung δ der einzelnen Protonen. Diese reagiert äusserst empfindlich auf Änderungen und erlaubt eine Abschätzung der Reichweite vorhandener „Störungen“ (z. B. Methylierung an C4'). Allerdings liegt keine direkte Korrelation mit einer quantitativen Grösse vor, so dass man im Fall der chemischen Verschiebung δ nur rein qualitative Aussagen treffen kann.

2.3 Übersicht über die untersuchten DNA-Tetramere 4T, 4PH und 4PM

Bei den drei untersuchten DNA-Tetrameren handelt es sich im Falle von **4PH** und **4PM** um die Sequenz 5'-d(ACAT), wobei T am 3'-Ende in **4PH** unmodifiziert, in **4PM**

an C4' methyliert vorliegt. Bei **4T** handelt es sich um den zu **4PH** bzw. **4PM** komplementären Strang: 3'-d(TGTA).



Schema 1. Kurzschreibweise der untersuchten DNA Tetramere.

Alle drei Tetramere stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. A. Marx und wurden wie beschrieben synthetisiert.⁵

Abb. 13 zeigt die Strukturen der im folgenden untersuchten DNA-Tetramere.

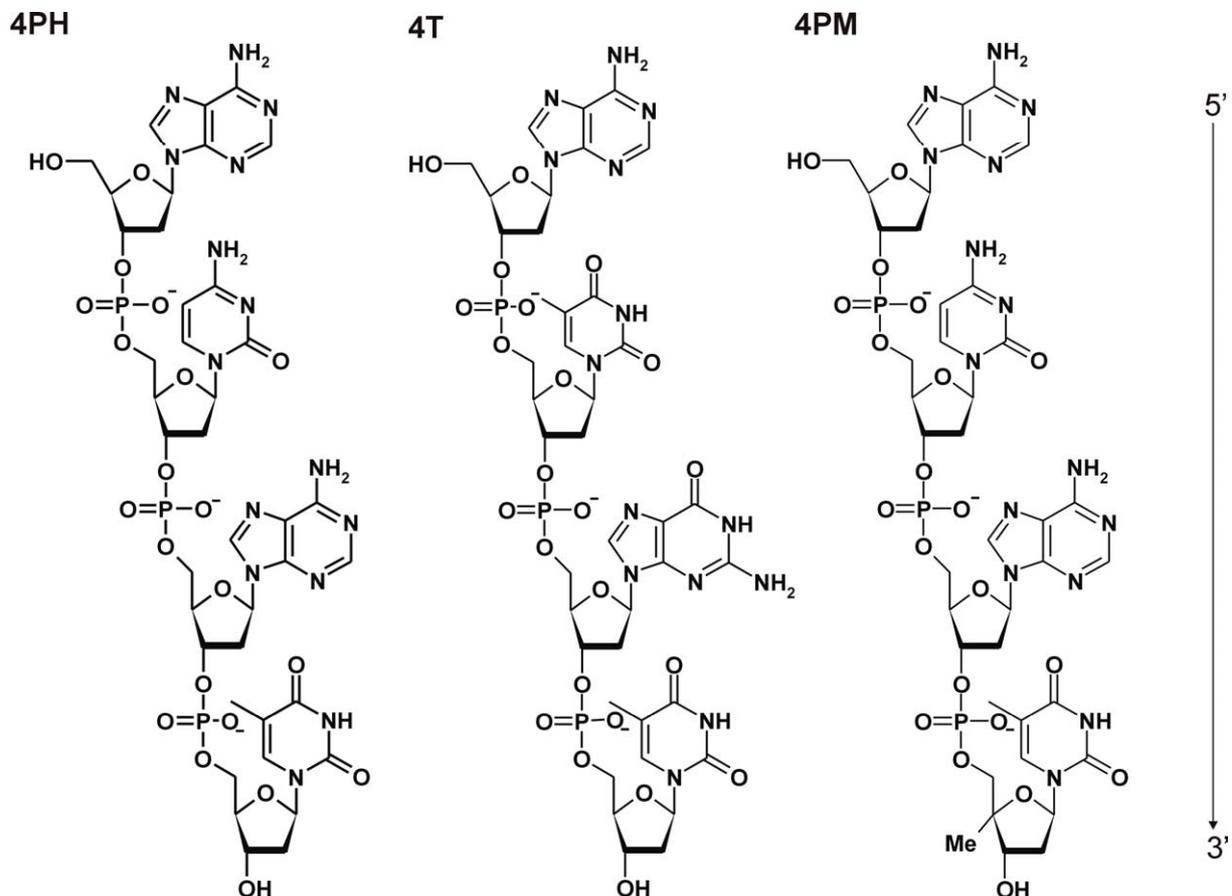


Abb. 13. Strukturen der untersuchten DNA-Tetramere **4PH**, **4PM** und **4T**.

2.4 Allgemeines zur Strukturermittlung der Einzelstränge

Alle Proben sind in reinem, gepufferten D₂O (Phosphatpuffer, 30 mM, pH 7) gemessen und enthalten zur Eichung TSP. Alle gezeigten Spektren und Daten beziehen sich auf Messungen bei 300 K und 600 MHz Protonenresonanz. Ausschnitte aus den jeweiligen ¹H Spektren sind mit Zuordnung im experimentellen Teil wiedergegeben.

Ausschnitte der 2D Spektren, sowie ^1H und ^{13}C Verschiebungstabellen finden sich im Anhang.

Die Zuordnung erfolgte über 2D-DQFCOSY, -TOCSY und -ROESY.

Letzteres wurde auch für die Bestimmung des Ringpuckerings und die Orientierung der Basen, sowie zur Überprüfung der Zuordnung herangezogen.

Um die Abstände aus den ROESY Signalen zu ermitteln, wurden alle entsprechenden ROESY Kreuzsignale integriert und auf die geminale CH_2 -Gruppe an $\text{C}2'$ des b-Ringes ($\cong 1.8 \text{ \AA}$) geeicht. Die in Gleichung (3) angegebene Abhängigkeit wurde für die Ermittlung der HH-Abstände verwendet.

2.5 Strukturanalyse des unmodifizierten Tetramers 4PH

Um Vergleiche von unmodifiziertem Tetramer **4PH** und modifiziertem Tetramer **4PM** ziehen zu können, muss die Struktur der beiden Einzelstränge bestimmt werden. Wie oben bereits erwähnt, werden Ringpuckering und Basenorientierung ermittelt.

Die in Abb. 15 dargestellten ROEs sind entscheidend für die Bestimmung des Ringpuckerings (grüne ROEs) bzw. für die Orientierung der Base (rote ROEs).

Zudem kann über die ROEs eine eindeutige Zuordnung der diastereotopen Protonen an $\text{C}2'$ getroffen werden, falls deren chemische Verschiebungen δ nicht identisch sind. Tab. 4 stellt die erhaltenen HH-Abstände jenen Standard-HH-Abständen für $\text{C}2'$ -endo (Bereich f. $P \sim 150^\circ - 180^\circ$) und jenen für die Basenorientierung (Abb. 11) gegenüber. Die in Tab. 2 angegebenen HH-Abstände sind für $\text{C}2'$ -endo bei Vorliegen einer B-DNA mit $P \sim 160^\circ$. In Tab. 4 wird für P ein grösserer Bereich überstrichen, für den die Ringkonformation $\text{C}2'$ -endo typisch ist.

Die Nomenklatur der diastereotopen Protonen an $\text{C}2'$ folgt den allgemeinen Konventionen für Nukleotide.¹⁹ Ihre Prochiralität bleibt dabei jedoch unberücksichtigt; deshalb sei nachfolgend einmal die prochirale Zuordnung für $\text{H}2'$ und $\text{H}2''$ getroffen:

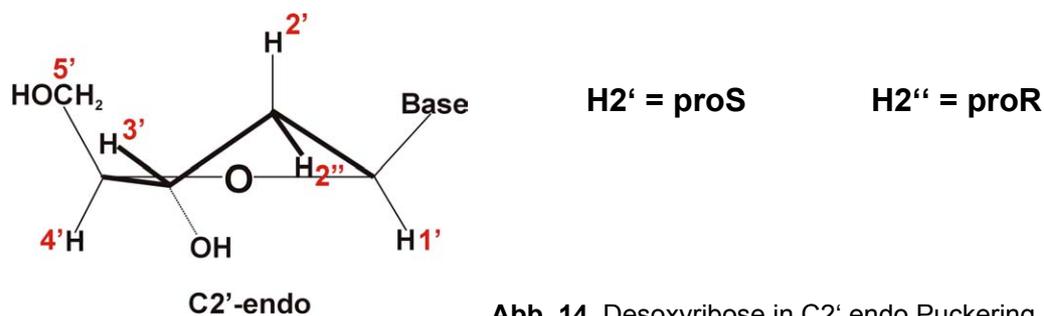


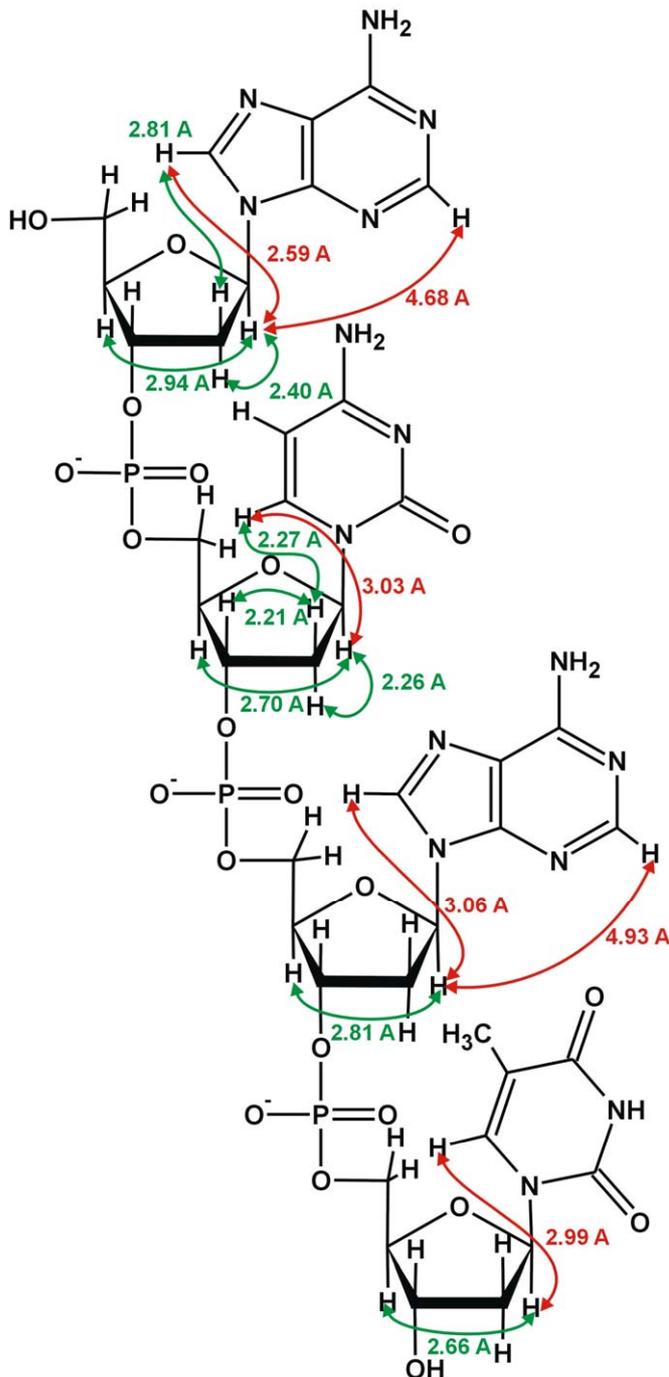
Abb. 14. Desoxyribose in $\text{C}2'$ endo Puckering.

ROE	Experimentell ermittelte Abstände [Å]	f. C2'-endo [Å] (P ~ 150° - 180°)
H1'a – H2'a ^h	2.4	2.1 – 2.2 (1' – 2'')
H1'a – H4'a	2.9	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H2'a ^h – H3'a	2.65	2.5 – 2.6 (2'' – 3')
H2'a ^t – H4'a	3.5	3.5 – 3.6 (2' – 4')
H2'a ^h – H4'a	3.2	3.7 – 3.9 (2'' – 4')
H1'a – H8a	2.6	2.6 – 2.7 (syn)
H1'a – H2a	4.7	4.6 (syn)
<p>→ H2'a^h entspricht H2''a (proR) und H2'a^t entspricht H2'a (proS)</p> <p>→ die ROE Abstände sprechen für C2'-endo (f. C3'-endo: H2'' – H3' ~ 2.9 Å und H2'' – H4' 2.3 – 2.4 Å) als Hauptkonformer</p> <p>→ Base ist syn orientiert (f. anti Orientierung H1' – H8: 3.6 – 3.9 Å)</p>		
H1'b – H2'b ^t	2.3	2.1 – 2.2 (1' – 2'')
H1'b – H3'b	3.7	3.5 – 3.6 (1' – 3')
H1'b – H4'b	2.7	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H2'b ^t – H3'b	2.7	2.5 – 2.6 (2'' – 3')
H2'b ^h – H3'b	2.2	2.2 – 2.3 (2' – 3')
H2'b ^t – H4'b	3.3	3.7 – 3.9 (2'' – 4')
H2'b ^h – H4'b	3.6	3.5 – 3.6 (2' – 4')
H1'b – H6b	3.0	3.4 – 3.6 (anti)
<p>→ H2'b^h entspricht H2'b und H2'b^t entspricht H2''b</p> <p>→ die ROE Abstände sprechen für C2'-endo (f. C3'-endo: H2'' – H3' ~ 2.9 Å und H2'' – H4' 2.3 – 2.4 Å) als Hauptkonformer</p> <p>→ für die Base liegt ein syn/anti Gleichgewicht vor; der Abstand H1'b – H6b entspräche einem χ-Winkel im Bereich von ~ -30° (reine syn Orientierung: 2.4 Å, reine anti Orientierung: ~ 3.6 Å)</p>		
H1'c – H4'c	2.8	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H2'c ^{h/t} – H4'c	2.7	-
H1'c – H8c	3.1	2.6 – 2.7 (syn)
H1'c – H2c	4.9	4.6 (syn)
<p>→ eine eindeutige Zuordnung der geminalen Protonen an C2' ist nicht möglich</p> <p>→ der H1'c – H4'c ROE Abstand spricht für C2'-endo (f. C3'-endo: H1' – H4' ~ 3.0 – 3.3 Å) als Hauptkonformer (basiert nur auf diesem einen ROE)</p> <p>→ für die Base liegt ein syn/anti Gleichgewicht vor; die Abstände H1'c – H8c und H1'c – H2c entsprechen einem χ-Winkel im Bereich von ~ 0° (Bevorzugung der syn Orientierung)</p>		
H1'd – H3'd	3.7	3.5 – 3.6 (1' – 3')
H1'd – H4'd	2.7	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H1'd – H2'd ^{h/t}	2.15	-
H2'd ^{h/t} – H3'd	2.3	-
H1'd – H6d	3.0	3.4 – 3.6 (anti)

- eine eindeutige Zuordnung der geminalen Protonen an C2' ist nicht möglich
 - der H1'd – H4'd ROE Abstand spricht für C2'-endo (f. C3'-endo: H1' – H4' ~ 3.0 – 3.3 Å) als Hauptkonformer; obwohl das Integral dieses ROEs durch Überlagerung mit einem anderen wahrscheinlich überbewertet ist und eher ein etwas längerer Abstand für H1'd – H4'd angenommen werden muss.
 - für die Base liegt ein syn/anti Gleichgewicht vor; der Abstand H1'd – H6d entspräche einem χ -Winkel im Bereich von $\sim -30^\circ$
-

Tab. 4. Ermittlung von Ringpuckering und Basenorientierung für **4PH** aus ROE Daten.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse aus Tab. 4 nochmals graphisch in Abb. 15 dargestellt.

**Nukleotid a:**

H2'a^h = H2''
 H2'aⁱ = H2'
 C2'-endo Puckering (~ 70%)
 Base: syn Orientierung

Nukleotid b:

H2'b^h = H2'
 H2'bⁱ = H2''
 C2'-endo Puckering (~ 60-80%)
 Base: syn/anti GGW

Nukleotid c:

Keine eindeutige Zuordnung für
 H2'/H2'' möglich
 C2'-endo Puckering
 Base: syn/anti GGW,
 syn Orientierung bevorzugt

Nukleotid d:

Keine eindeutige Zuordnung für
 H2'/H2'' möglich
 C2'-endo Puckering
 Base: syn/anti GGW

Abb. 15. Zusammenfassung des aus ROE Daten ermittelten Ringpuckerings und der Basenorientierung für 4PH.

Da einige ROEs von den erwarteten Werten abweichen, wurden als Kontrolle ROE Integrale von festen HH-Abständen berechnet, wie z. B. H5b – H6b. Dieser Abstand beträgt laut Literatur²² ~ 2.4 Å, die Integration der entsprechenden ROE Kreuzsignale ergibt 2.34 Å für H5b – H6b. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Integration und Eichung auf H2'b – H2''^b des ROESYs keinen grösseren Fehler aufweist.

Um die sequentielle Zuordnung durchzuführen, wurden die in Tab. 3 aufgelisteten ROEs zwischen nichtlabilen Basenprotonen und Protonen der vorhergehenden bzw.

nachfolgenden Zuckereinheit und zwischen nicht-aciden Basenprotonen benachbarter Basen (soweit vorhanden) identifiziert.

Die nachfolgende Tabelle gibt alle ermittelten sequentiellen ROEs von **4PH** und deren Vergleich mit Standard-Abständen ²² wieder.

ROE Abstand	Experimentell ermittelte Abstände [Å]	Sequentielle ROEs in B-DNA (C2'-endo, anti) [Å]
H2'a – H5b	3.9	3.6
H2''a – H6b	3.15	2.2
H3'a – H6b	3.6	4.6
H2''b – H8c	3.4	2.1
H3'b – H8c	3.4	4.6
H3'c – H7d(Me)	3.4	> 4.5
H3'c – H6d	3.5	4.6
H2c – H1'd	4.6	> 4.5
H8c – H7d(Me)	3.1	3.8

Tab. 5. Sequentielle ROEs in **4PH** und deren Vergleich mit Standard-HH-Abständen für C2'-endo, vorliegend in B-DNA. Fett gedruckt sind jene ROEs, die stärker von den Werten für B-DNA abweichen. Zu berücksichtigen bleibt natürlich, dass hier die Basenorientierung im Einzelstrang (Tetramer **4PH**) mit jenen im Doppelstrang (B-DNA) verglichen wird. Im Doppelstrang ist aufgrund der Basenpaarung deren Orientierung eindeutiger und weniger flexibel.

Wie schon Tab. 3 gezeigt hat, liegt für die Basen C (b-Ring), T (d-Ring) und A (c-Ring) ein syn/anti Gleichgewicht vor, wobei für letztere Base eine starke Bevorzugung der syn Orientierung vorhanden ist. Dies spiegelt sich auch in den sequentiellen ROEs wider; so weichen alle fett gedruckten experimentellen ROEs in Tab. 5 deutlich von den für B-DNA (C2'-endo Puckering, anti Orientierung) zu erwartenden ROEs ab.

Die berechneten ROE Abstände H2''a – H6b, H3'a – H6b und H3'c – H6d sind deutlich grösser bzw. kleiner als die zu erwartenden. Die Werte für H2''b – H8c und H3'b – H8c zeigen klar, dass für A am c-Ring eine deutlich bevorzugte syn Orientierung vorliegt.

Nachfolgend sind in Tab. 6 noch alle ermittelten ³J_{HH} Kopplungen der einzelnen Zuckereinheiten in **4PH** zusammengefasst. Ihre Auswertung erfolgt im Anschluss an das nächste Kapitel zusammen mit dem Vergleich mit den, für **4PM** erhaltenen, Kopplungen.

	$^3J_{HH}$ [Hz]			
	a-Ring	b-Ring	c-Ring	d-Ring
H1' – H2'	8	8	-	-
H1' – H2''	6	6	-	-
H2' – H3'	6	6	-	-
H2'' – H3'	3	3	-	-
H3' – H4'	3	3	3	4
H1' – H2'/H2''	-	-	6 / 7.5	7 / 7
H2'/H2'' – H3'	-	-	2 / 6	- / 6.5

Tab. 6. $^3J_{HH}$ Kopplungen der Desoxyriboseeinheiten von **4PH** – ermittelt aus dem Lorentz-Gauss transformierten 1H Spektrum.

2.6 Strukturanalyse des modifizierten Tetramers **4PM**

Auch im Falle des modifizierten Tetramers **4PM** werden wiederum die Daten aus dem ROESY herangezogen, um Aussagen über Ringpuckering und Orientierung der Basen der einzelnen Nukleotide machen zu können.

Analog zu Abb. 15 für **4PH** sind in Abb. 16 die zur Bestimmung des Ringpuckerings entscheidenden ROEs für **4PM** in grün, jene für die Orientierung der Base in rot dargestellt. Eine Übersicht über jene ROEs gibt Tab. 7 wieder, mit zusätzlichem Vergleich mit Standard-HH-Abständen für C2'-endo Puckering.

ROE	Experimentell ermittelte Abstände [Å]	f. C2'-endo [Å] (P ~ 150° - 180°)
H1'a – H2'a ^h	2.3	2.1 – 2.2 (1' – 2')
H1'a – H4'a	3.0	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H2'a ^h – H3'a	2.6	2.5 – 2.6 (2'' – 3')
H2'a ^t – H4'a	3.5	3.5 – 3.6 (2' – 4')
H2'a ^h – H4'a	3.3	3.7 – 3.9 (2'' – 4')
H1'a – H8a	2.6	2.6 – 2.7 (syn)
H2'a ^t – H8a	2.7	-
<p>→ H2'a^h entspricht H2''a (proR) und H2'a^t entspricht H2'a (proS)</p> <p>→ die ROE Abstände sprechen für C2'-endo (f. C3'-endo: H2'' – H3' ~ 2.9 Å und H2'' – H4' 2.3 – 2.4 Å) als Hauptkonformer</p> <p>→ ROE f. H2'a^h – H4'a (= H2''a – H4'a) ist deutlich kleiner als für C2'-endo zu erwarten (f. C3'-endo: 2.3 – 2.4 Å) → grössere Flexibilität des 5-Ringes (Puckering)</p> <p>→ Base ist syn orientiert (f. anti Orientierung H1' – H8: 3.6 – 3.9 Å)</p>		
H1'b – H3'b	3.85	3.5 – 3.6 (1' – 3')
H1'b – H4'b	2.8	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H2'b ^t – H3'b	2.7	2.5 – 2.6 (2'' – 3')
H2'b ^h – H3'b	2.2	2.2 – 2.3 (2' – 3')
H2'b ^t – H4'b	3.3	3.7 – 3.9 (2'' – 4')
H2'b ^h – H4'b	3.5	3.5 – 3.6 (2' – 4')

H1'b – H6b	3.1	3.4 – 3.6 (anti)
H2'b ^h – H6b	2.3	-
<p>→ H2'b^h entspricht H2'b und H2'b^t entspricht H2''b</p> <p>→ die ROE Abstände sprechen für C2'-endo (f. C3'-endo: H2'' – H3' ~ 2.9 Å und H2'' – H4' 2.3 – 2.4 Å) als Hauptkonformer</p> <p>→ für die Base liegt ein syn/anti Gleichgewicht vor; der Abstand H1'b – H6b entspräche einem χ-Winkel im Bereich von ~ -30°</p>		
H1'c – H2'c ^{h/t}	2.2	-
H1'c – H4'c	2.9	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H1'c – H3'c	3.25	3.5 – 3.6 (1' – 3')
H1'c – H8c	3.1	2.6 – 2.7 (syn)
<p>→ eine eindeutige Zuordnung der geminalen Protonen an C2' ist nicht möglich</p> <p>→ der H1'c – H4'c ROE Abstand spricht für C2'-endo (f. C3'-endo: H1' – H4' ~ 3.0 – 3.3 Å) als Hauptkonformer; dies stützt sich allerdings nur auf diesen einen ROE.</p> <p>→ für die Base liegt ein syn/anti Gleichgewicht vor; der Abstand H1'c – H8c entspräche einem χ-Winkel im Bereich von ~ 30°</p>		
H1'd – H3'd	3.8	3.5 – 3.6 (1' – 3')
H1'd – H4'd _{Me}	3.2	-
H2'd ^{h/t} – H3'd	2.2	-
H3'd – H4'd _{Me}	3.5	-
H1'd – H6d	2.9	3.4 – 3.6 (anti)
<p>→ eine eindeutige Zuordnung der geminalen Protonen an C2' ist nicht möglich</p> <p>→ die ROEs H1'd – H4'd_{Me} und H3'd – H4'd_{Me} sind auf eine andere Referenz – nämlich H6d – H7d(Me) (Lit.: 2.9 Å)²¹ – geeicht, da es sich um ROEs zwischen einem Proton und einer CH₃-Gruppe handelt und somit eine Referenzierung des Integrals auf eine geminale CH₂-Gruppe zu einem falschen Wert führen würde</p> <p>→ insgesamt ist also keine Aussage über das Ringpuckering des modifizierten Bausteins anhand der ROEs möglich</p> <p>→ für die Base liegt ein syn/anti Gleichgewicht vor; der Abstand H1'd – H6d entspräche einem χ-Winkel im Bereich von ~ -30°</p>		

Tab. 7. Ermittlung von Ringpuckering und Basenorientierung für **4PM** aus ROE Daten.

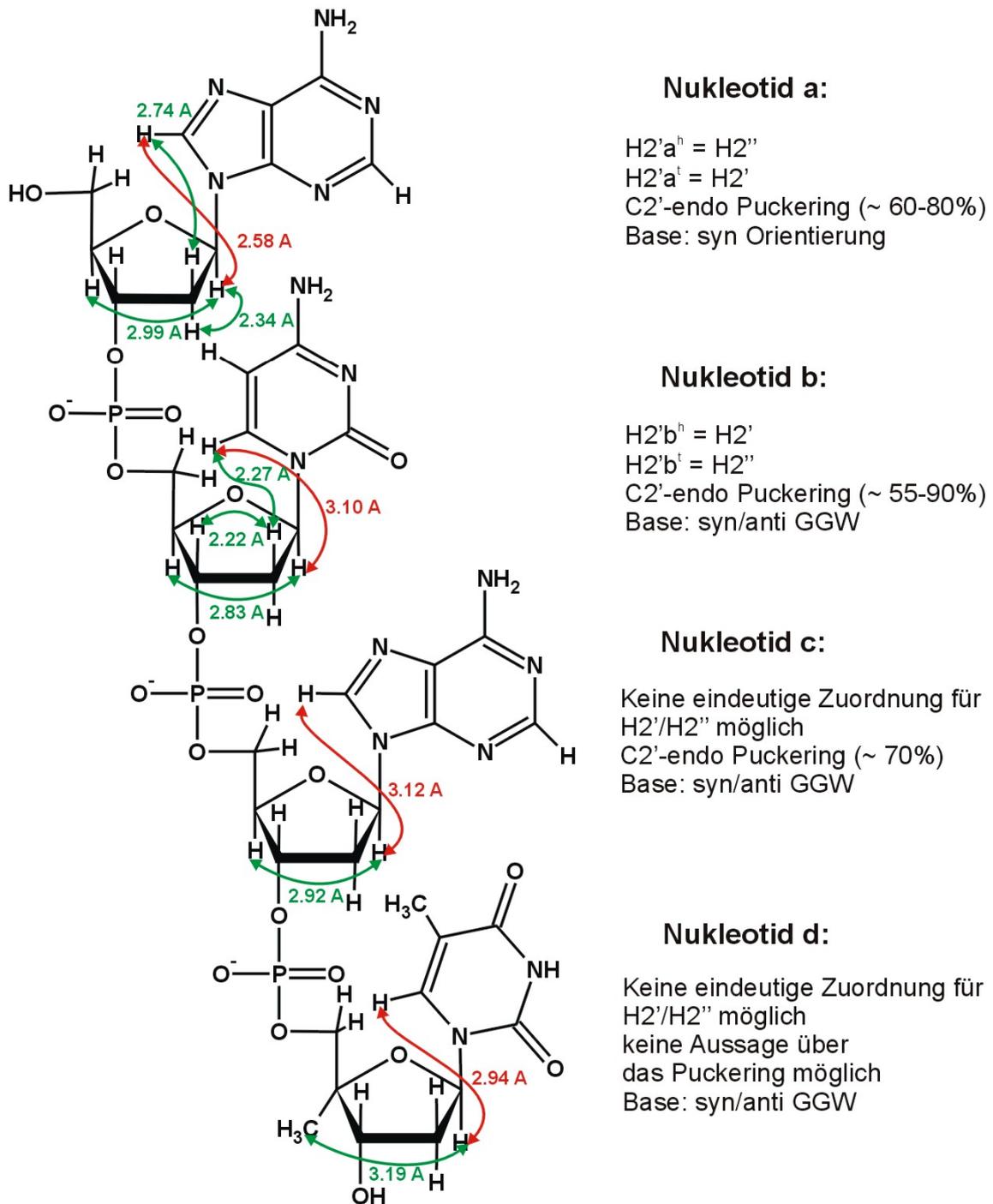


Abb. 16. Zusammenfassung des aus ROE Daten ermittelten Ringpuckerings und der Basenorientierung für **4PM**.

Im Folgenden wird die korrekte sequentielle Zuordnung mit Hilfe charakteristischer ROEs bestätigt. Tab. 8 zeigt die in **4PM** vorkommenden sequentiellen ROEs und deren Vergleich mit entsprechenden Literaturwerten für C2'-endo in B-DNA.²⁰

ROE	Experimentell ermittelte Abstände [Å]	Sequentielle ROEs in B-DNA (C2'-endo, anti) [Å]
H2'a – H5b	3.55	3.6
H2''a – H5b	4.1	2.7
H2''a – H6b	3.2	2.2
H2'b – H8c	3.9	3.8
H2''b – H8c	3.4	2.1
H3'b – H8c	3.3	4.6
H1'c – H7d(Me)	4.0	> 4.5
H3'c – H7d(Me)	3.2	> 4.5
H4'c – H7d(Me)	3.8	> 4.5
H8c – H7d(Me)	3.7	3.8

Tab. 8. Sequentielle ROEs in **4PM** und deren Vergleich mit Standard-HH-Abständen für C2'-endo, vorliegend in B-DNA. Die fett gedruckten Werte zeigen eine stärkere Abweichung von den Werten für B-DNA.

Wie schon Tab. 7 gezeigt hat und analog zu **4PH**, liegt für die Basen C (b-Ring), T (d-Ring) und A (c-Ring) ein syn/anti Gleichgewicht vor. Dies spiegelt sich auch in den sequentiellen ROEs wider; so weichen alle fett gedruckten experimentellen ROEs deutlich von den für B-DNA zu erwartenden ROEs ab.

Insgesamt zeigen die sequentiellen ROE Daten für **4PM** jedoch eine grössere Übereinstimmung mit den Literaturwerten²² als jene für **4PH**.

Da für den C4' modifizierten d-Ring in **4PM** aus den ermittelten ROE Daten keinerlei Aussagen über das Ringpuckering gemacht werden konnten, sind auch für dieses Tetramer in Tab. 9 alle $^3J_{HH}$ Kopplungen innerhalb seiner Zuckereinheiten wiedergegeben.

	$^3J_{HH}$ [Hz]			
	a-Ring	b-Ring	c-Ring	d-Ring
H1' – H2'	8	8	-	-
H1' – H2''	6	6	-	-
H2' – H3'	6	6	-	-
H2'' – H3'	3	2	-	-
H3' – H4'	3	3	3	-
H1' – H2'/H2''	-	-	7 / 7	6.5 / 6.5
H2'/H2'' – H3'	-	-	3 / n.d.	- / 7

Tab. 9. $^3J_{HH}$ Kopplungen der Zuckereinheiten von **4PM** – ermittelt aus dem Lorentz-Gauss transformierten 1H Spektrum.

$^3J_{HH}$ [Hz]					
	4PH	4PM		4PH	4PM
a-Ring			b-Ring		
H1' – H2'	8	8	H1' – H2'	8	8
H1' – H2''	6	6	H1' – H2''	6	6
H2' – H3'	6	6	H2' – H3'	6	6
H2'' – H3'	3	3	H2'' – H3'	3	2
H3' – H4'	3	3	H3' – H4'	3	3
c-Ring			d-Ring		
H1' – H2'/H2''	6 / 7.5	7 / 7	H1' – H2'/H2''	7 / 7	6.5 / 6.5
H2'/H2'' – H3'	3 / 6	3 / n.d.	H2'/H2'' – H3'	- / 6.5	- / 7
H3' – H4'	3	3	H3' – H4'	4	-

Tab. 10. Vergleich der $^3J_{HH}$ Kopplungen für **4PH** und **4PM**.

Wie aus Tab. 10 ersichtlich, gibt es für **4PH** und **4PM** keine signifikanten Unterschiede in ihren $^3J_{HH}$ Kopplungen. Dies bedeutet, dass auch der modifizierte d-Ring in **4PM** dem unmodifizierten strukturell sehr ähnlich ist und die eingeführte Methylgruppe an C4' weder Auswirkungen auf das entsprechende Nukleotid, noch auf den gesamten Einzelstrang hat.

2.7 Strukturanalyse des Komplementärstranges 4T

Um bei einer anschliessenden Auswertung der Doppelstränge **4PH** / **4T** und **4PM** / **4T** auch den paarenden Strang vergleichen zu können, wurde die Struktur des zu **4PH** und **4PM** komplementären Strangs **4T** ebenfalls untersucht.

Die für **4T** ermittelten ROE Daten und die daraus resultierenden Ergebnisse über Ringpuckering und Basenorientierung sind in Tab. 11 zusammengefasst und in Abb. 17 graphisch dargestellt.

ROE	Experimentell ermittelte Abstände [Å]	f. C2'-endo [Å] (P ~ 150° - 180°)
H1'a – H2'a ^{h/t}	2.3	-
H1'a – H4'a	3.0	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H2'a ^{h/t} – H3'a	2.15	-
H1'a – H8a	2.6	2.6 – 2.7 (syn)
H2'a ^{h/t} – H8a	2.6	-

→ eine eindeutige Zuordnung der geminalen Protonen an C2' ist nicht möglich
→ der einzige zur Ermittlung des Ringpuckerings verwendbare ROE H1'a – H4'a spricht für C2'-endo als Hauptkonformer
→ Base ist syn orientiert (f. anti Orientierung H1' – H8: 3.6 – 3.9 Å)

H1'b – H2'b ^t	2.2	2.1 – 2.2 (1' – 2'')
H1'b – H3'b	3.5	3.5 – 3.6 (1' – 3')
H1'b – H4'b	2.6	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H2'b ^t – H3'b	2.6	2.5 – 2.6 (2'' – 3')
H2'b ^h – H3'b	2.2	2.2 – 2.3 (2' – 3')
H3'b – H4'b	2.6	2.4 – 2.6 (3' – 4')
H1'b – H6b	2.9	3.4 – 3.6 (anti)
H2'b ^h – H6b	2.1	-

→ H2'b^h entspricht H2'b (proS) und H2'b^t entspricht H2''b (proR)

→ die ROE Abstände sprechen für C2'-endo (f. C3'-endo: H2'' – H3' ~ 2.9 Å, H3' – H4' ~ 2.8 – 2.9 Å) als Hauptkonformer

→ für die Base liegt ein syn/anti Gleichgewicht vor; der Abstand H1'b – H6b entspräche einem χ -Winkel im Bereich von ~ -20°

H1'c – H2'c ^h	2.2	2.1 – 2.2 (1' – 2'')
H1'c – H2'c ^t	3.0	~ 2.85 (1' – 2')
H1'c – H4'c	2.8	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H1'c – H3'c	3.6	3.5 – 3.6 (1' – 3')
H2'c ^t – H3'c	2.2	2.2 – 2.3 (2' – 3')
H2'c ^h – H3'c	2.6	2.5 – 2.6 (2'' – 3')
H2'c ^t – H4'c	3.8	3.5 – 3.6 (2' – 4')
H2'c ^h – H4'c	3.3	3.7 – 3.9 (2'' – 4')
H1'c – H8c	2.8	2.6 – 2.7 (syn)
H2'c ^t – H8c	2.3	-

→ H2'c^h entspricht H2''c und H2'c^t entspricht H2'c

→ die ROE Abstände H1'c – H4'c, H2'c^h – H3'c und H2'c^h – H4'c sprechen für C2'-endo (f. C3'-endo: H1' – H4' ~ 3.0 – 3.3 Å, H2'' – H3' ~ 2.9 Å, H2'' – H4' 2.3 – 2.4 Å) als Hauptkonformer

→ für die Base liegt ein syn/anti Gleichgewicht vor; der Abstand H1'c – H8c entspräche einem χ -Winkel im Bereich von ~ 50°, was für eine Bevorzugung der syn Orientierung spricht

H1'd – H2'd ^{h/t}	2.2	-
H1'd – H4'd	2.9	2.7 – 3.3 (1' – 4')
H2'd ^{h/t} – H3'd	2.3	-
H3'd – H4'd	2.5	2.4 – 2.6 (3' – 4')
H1'd – H6d	3.0	3.4 – 3.6 (anti)

→ eine eindeutige Zuordnung der geminalen Protonen an C2' ist nicht möglich

→ die ROEs H1'd – H4'd und H3'd – H4'd sprechen für C2'-endo als Hauptkonformer

→ für die Base liegt ein syn/anti Gleichgewicht vor; der Abstand H1'd – H6d entspräche einem χ -Winkel im Bereich von ~ -30°

Tab. 11. Ermittlung des Ringpuckerings und der Basenorientierung für 4T aus ROE Daten.

Wie für die beiden anderen Stränge **4PH** und **4PM**, wurden auch für **4T** die sequentiellen ROEs untersucht, um weitere Informationen über die Struktur des Einzelstranges zu erhalten. Tab. 12 zeigt die Zusammenfassung jener Ergebnisse.

ROE Abstand	Experimentell ermittelte Abstände [Å]	Sequentielle ROEs in B-DNA (C2'-endo, anti) [Å]
H2'a/H2''a – H6b	2.7	-
H3'a – H7b	3.1	> 4.5
H8a – H7b	3.8	3.8
H2''b – H8c	3.1	2.1
H2''c – H6d	3.15	2.2

Tab. 12. Sequentielle ROEs in **4T** und deren Vergleich mit Standard-HH-Abständen für C2'-endo, vorliegend in B-DNA.

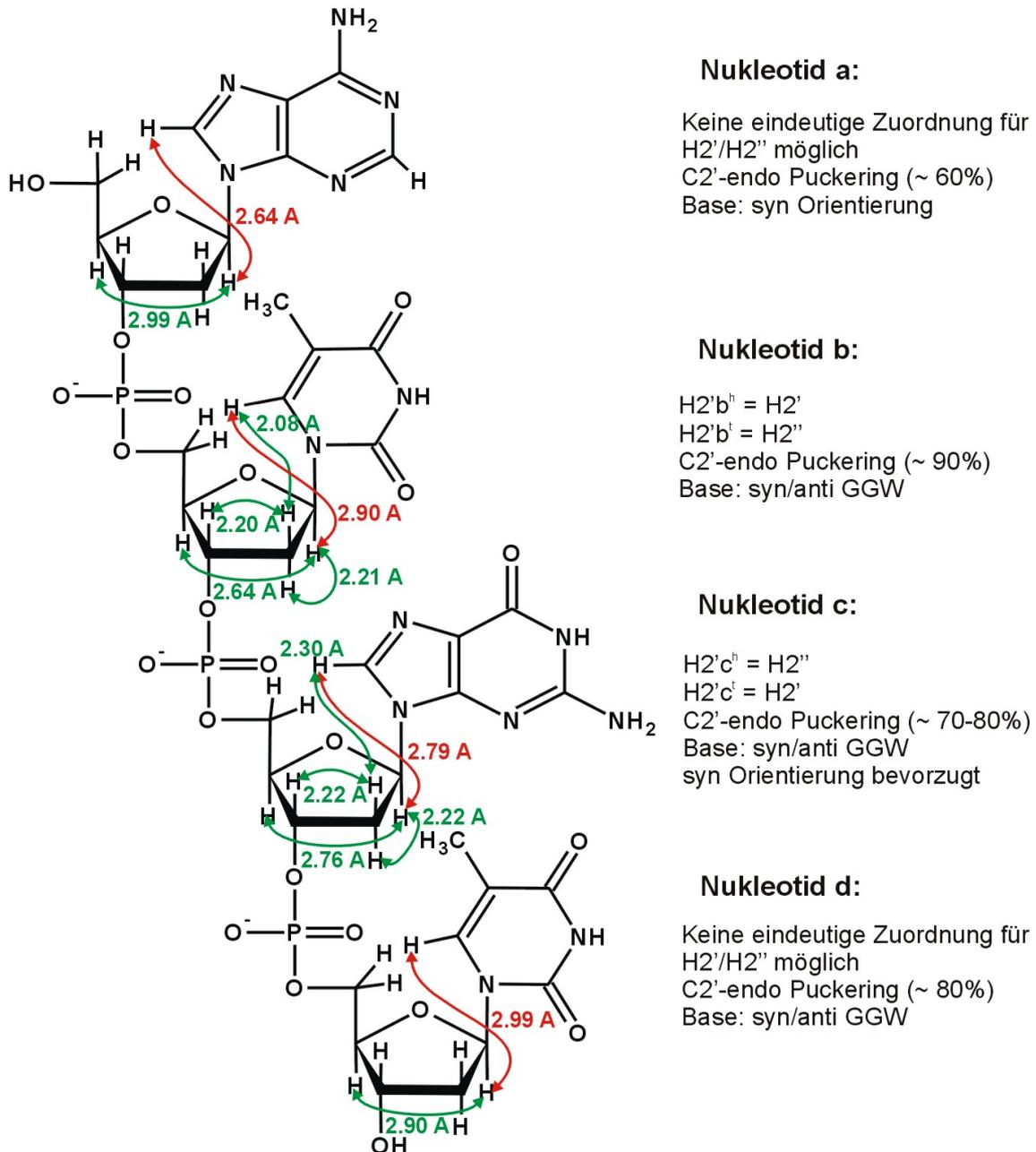


Abb. 17. Graphische Darstellung aller wichtigen ROEs für 4T.

Wie auch schon bei **4PH** und **4PM** ist aus den sequentiellen ROE Daten für **4T** ersichtlich, dass für die Basen T (b-Ring), T (d-Ring) und G (c-Ring) ein syn/anti Gleichgewicht vorliegt, wobei für G am c-Ring eine eindeutige Bevorzugung der syn Orientierung zu sehen ist. Der Vollständigkeit halber sind in nachfolgender Tabelle (Tab. 13) alle ermittelbaren $^3J_{HH}$ Kopplungen der Desoxyriboseeinheiten für **4T** aufgelistet.

	$^3J_{HH}$ [Hz]			
	a-Ring	b-Ring	c-Ring	d-Ring
H1' – H2'	-	9	8.5	-
H1' – H2''	-	5.5	6	-
H2' – H3'	-	6	6	-
H2'' – H3'	-	2	3	-
H3' – H4'	3	3	3	4
H1' – H2'/H2''	6 / 8	-	-	7 / 7
H2'/H2'' – H3'	6 / 8.5	-	-	4 / 6

Tab. 13. $^3J_{HH}$ Kopplungen der Zuckereinheiten von **4T** – ermittelt aus dem Lorentz-Gauss transformierten 1H Spektrum.

3. Ermittlung der Konformation der Doppelstränge

Zu den vorhandenen Lösungen an **4PH** bzw. **4PM** in Phosphatpuffer (30 mM, pH7, D₂O) wurden jeweils folgende Mengen an **4T** (Phosphatpuffer, 30 mM, pH7, D₂O) zugegeben:

4PH: + 455 μ L **4T** Lösung \rightarrow Gesamtvolumen: 1155 μ L,
molares Verhältnis 4T : 4PH = 0.95

4PM: + 515 μ L **4T** Lösung \rightarrow Gesamtvolumen: 1215 μ L,
molares Verhältnis 4T : 4PM = 0.96

Da die Untersuchungen am Doppelstrang ebenfalls in reinem D₂O durchgeführt wurden, können keine Aussagen über die, an den H-Brücken bei der Basenpaarung beteiligten, labilen Basenprotonen gemacht werden.

Daher werden die erhaltenen Daten mit jenen der Einzelstränge verglichen und die Unterschiede zwischen modifiziertem und unmodifiziertem Tetramer bei der Doppelstrangbildung aufgezeigt.

3.1 Temperaturreihen für **4PH / 4T** und **4PM / 4T**

Da ein Tetramer ein sehr kurzes DNA Fragment darstellt und die Temperatur, bei der zu 50% doppelsträngige DNA vorliegt (sog. Schmelztemperatur) von der Basensequenz aber auch von der Länge der beteiligten Einzelstränge abhängt, wurde eine Temperaturreihe zwischen 275 und 300 K in 5K Schritten aufgenommen.

Generell kann man sagen, dass die Schmelztemperatur umso niedriger liegt, je kürzer das DNA Fragment und je geringer der Anteil an G – C Basenpaaren ist.¹²

Für die Sequenz ACAT/ATGT (entspricht **4PH/4T** bzw. **4PM/4T**) berechnet sich die Schmelztemperatur, bei 50 mM NaCl Gehalt der Lösung und 2.65 mM Gesamt-DNA Konzentration, zu -15 °C.²⁴ Da dieser Temperaturbereich bei Messungen in D₂O

nicht möglich ist, wurden die Messungen bei 2 °C durchgeführt. Da die Schmelztemperatur eines DNA Doppelstranges von sehr vielen Faktoren abhängt, welche bei der Vorhersage der Schmelztemperatur niemals alle berücksichtigt werden können, sollte der berechnete Wert nur eine grobe Richtlinie für den Temperaturbereich der Doppelstrangbildung sein. Die aufgenommene Temperaturreihe zeigt sehr schön, dass nur ein kleiner Anteil der Tetramere als Duplex vorliegt.

Ein Vergleich der ¹H Spektren der jeweiligen Einzelstränge mit denen der Mischungen bei 300 K zeigt, dass sich für **4T** einige Verschiebungen relativ stark ändern, wohingegen die restlichen Verschiebungen für **4T** und alle Verschiebungen für **4PH** bzw. **4PM** nur minimale Änderungen aufweisen.

Die nachfolgende Tabelle gibt die Differenz der Verschiebungen von Einzelstrang und Einzelstrang in Lösung mit dem Komplementärstrang bei 300 K wieder.

	$\Delta\delta$ 4PH	$\Delta\delta$ 4PM		$\Delta\delta$ 4T (+ 4PH)	$\Delta\delta$ 4T (+ 4PM)
H2a	+1.0	+0.7	H2a	+29.8	+22.7
H8a	+0.7	+0.7	H8a	+8.3	+5.8
H5b	+1.0	+1.2	H6b	+1.0	+0.7
H6b	+0.7	+0.7	H8c	+11.6	+9.3
H2c	+0.4	+0.7	H6d	+5.6	+1.7
H8c	+0.7	+0.7			
H6d	+/-0	-			

Tab. 14. Änderung der chemischen Verschiebung der Basenprotonen im Vergleich zum Einzelstrang bei Vorliegen des Komplementärstranges (300 K) – angegeben in Hz.

Dies ergibt die stärksten Änderungen in der chemischen Verschiebung δ für H2a, H8c und H8a von **4T**. Auch wenn der Vergleich des ROESY Spektrums für **4T** als Einzelstrang (300 K) mit jenem für **4T** zusammen in Lösung mit **4PH** (300 K) keinerlei signifikante Unterschiede für **4T** in Ringpuckering, Basenorientierung oder sequentiellen ROEs ergibt, so ist doch die Änderung der chemischen Verschiebung – also des empfindlichsten Parameters – ein deutliches Zeichen, dass sich besonders im Bereich der Basen A am a-Ring und G am c-Ring zumindest minimale strukturelle Änderungen abspielen. Geht man davon aus, dass es sich um eine geringfügige Änderung der Basenorientierung handelt, welche für die Ausbildung des Doppelstranges anti orientiert sein müssen, so entspricht dies den Erwartungen. Denn die Basen A (a-Ring) und G (c-Ring) von **4T** sind genau jene, die ausschliesslich oder stark bevorzugt in syn Orientierung vorliegen. Allerdings müsste dann ein ähnlich starker Shift für die Protonen H2a, H8a von **4PM** und H2a, H8a, H2c und H8c von **4PH** zu erwarten sein.

Von Bedeutung ist jedoch, dass die Änderungen in der chemischen Verschiebung der Basenprotonen von **4T** unabhängig von einer Modifikation am C4' am d-Ring des Komplementärstranges sind.

Die nachfolgende Tabelle gibt zusätzlich die ermittelten ROEs für **4T** als Einzelstrang und in Lösung mit **4PH** bei 300 K wieder.

ROE Abstand	Für 4T (Einzelstrang, 300 K) [Å]	Für 4T (+ 4PH) (Zwei Einzelstränge, 300 K) [Å]
H1'a – H8a	2.6	2.6
H8a – H7b	3.8	4.0
H3'a – H7b	3.1	3.25
H1'a – H4'a	3.0	3.0
H1'b – H6b	2.9	2.9
H3'b – H6b	-	3.4
H1'b – H4'b	2.6	2.5
H2'b – H3'b	2.2	2.3
H2''b – H3'b	2.6	2.7
H3'b – H4'b	2.6	2.9
H2''b – H4'b	-	3.1
H1'c – H8c	2.8	2.8
H3'c – H8c	-	3.5
H8c – H7d	-	4.2
H1'c – H4'c	2.8	2.9
H1'c – H2''c	2.2	2.25
H1'c – H2'c	3.0	3.0
H1'c – H3'c	3.6	3.6
H2''c – H3'c	2.6	2.5
H2''c – H4'c	3.3	3.1
H2'c – H4'c	3.8	3.1
H1'd – H6d	3.0	3.2
H3'd – H6d	2.9	2.8
H1'd – H3'd	-	3.9
H1'd – H4'd	2.9	2.9

Tab. 15. Vergleich der für **4T** ermittelten ROE Abstände als Einzelstrang oder gemeinsam in Lösung mit **4PH** bei 300 K. Fett gedruckt sind jene Abstände mit einer grösseren Abweichung voneinander.

Wie durch Patel et al.²⁵ gezeigt, kommt es für die nichtlabilen Basenprotonen des Cytosins und Guanins zu einer deutlichen Änderung ihrer chemischen Verschiebung mit Änderung der Temperatur. Hieraus lässt sich die Schmelztemperatur für das jeweilige Oligomer ablesen. Wie in Abb. 18 gezeigt, kommt es beim Schmelzen des Duplexstranges zu einer sprunghaften Änderung in der chemischen Verschiebung vor allem der Protonen H5 und H6 des Cytosins. Es ist hierbei eine Änderung von bis zu 0.5 ppm zu beobachten. Während des Schmelzvorganges befinden sich Doppel- und Einzelstrang im schnellen Austausch. Wie bereits erwähnt, definiert die Schmelztemperatur eines Oligonukleotids die Temperatur, bei der 50% als Doppelstrang vorliegen.

Daher kann man davon ausgehen, dass für ein kurzes DNA Oligomer bei 300 K nur ein sehr geringer Anteil als Doppelstrang vorliegt.

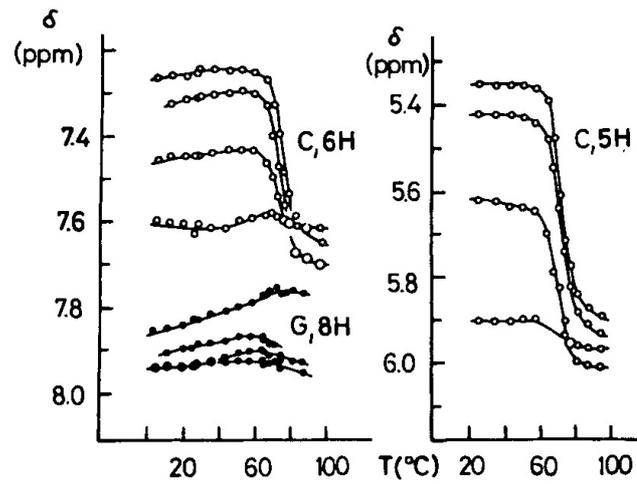


Abb. 18. Auftragung der chemischen Verschiebung ausgesuchter Basenprotonen gegen die Temperatur zur Ermittlung der Schmelztemperatur der DNA am Beispiel eines Dodecamers. (aus ²⁵)

Im folgenden seien daher die Temperaturreihen für **4PH / 4T** und **4PM / 4T** für den Basenbereich von 275 bis 300 K gezeigt. Eine analoge Abbildung für den Anomenbereich findet sich im Anhang.

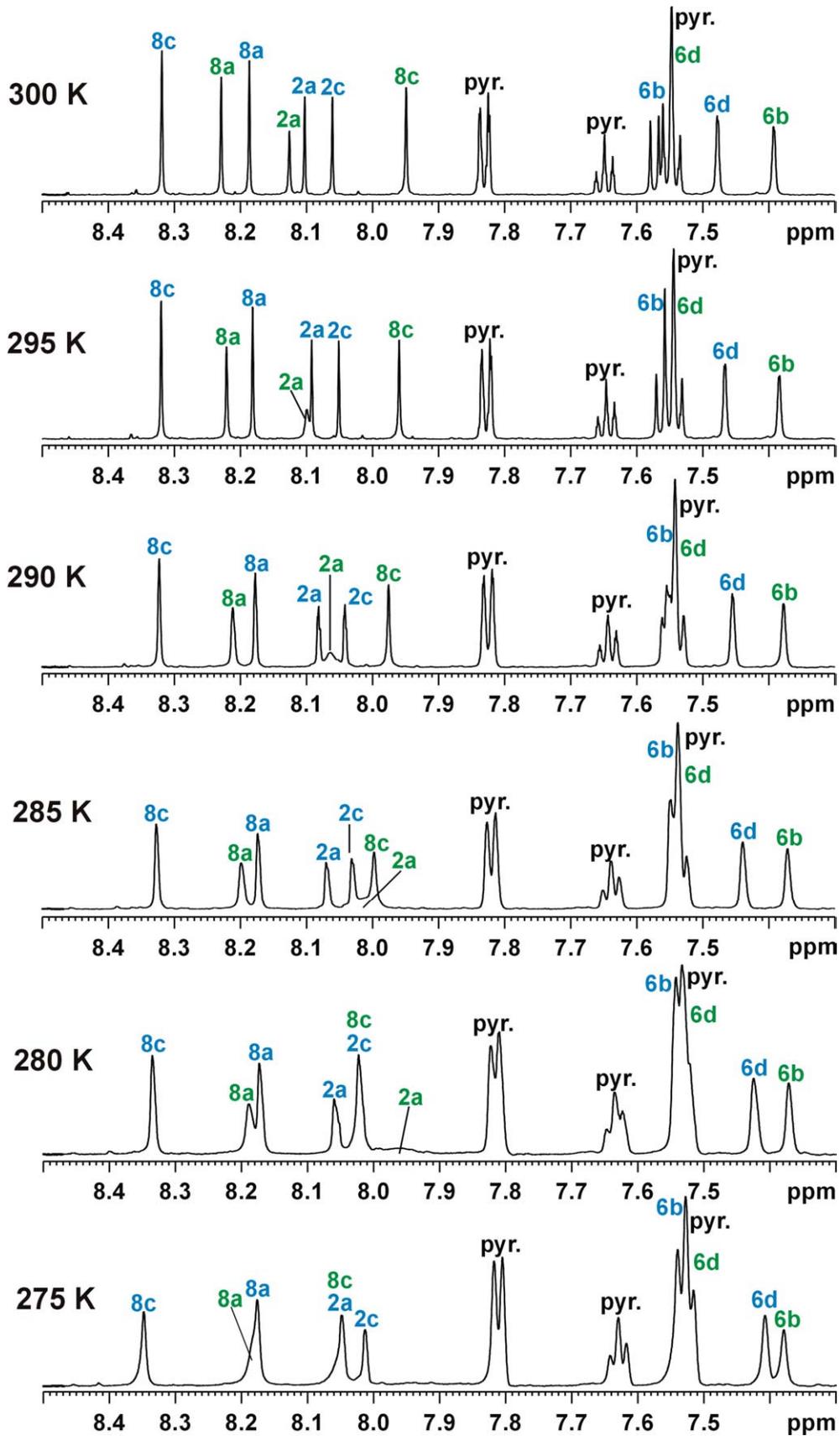


Abb. 19. Basenbereich für 4PH / 4T zwischen 275 und 300 K (600 MHz, 30 mM Phosphatpuffer/D₂O). Signale für 4T sind in grün, Signale für 4PH in blau gekennzeichnet.

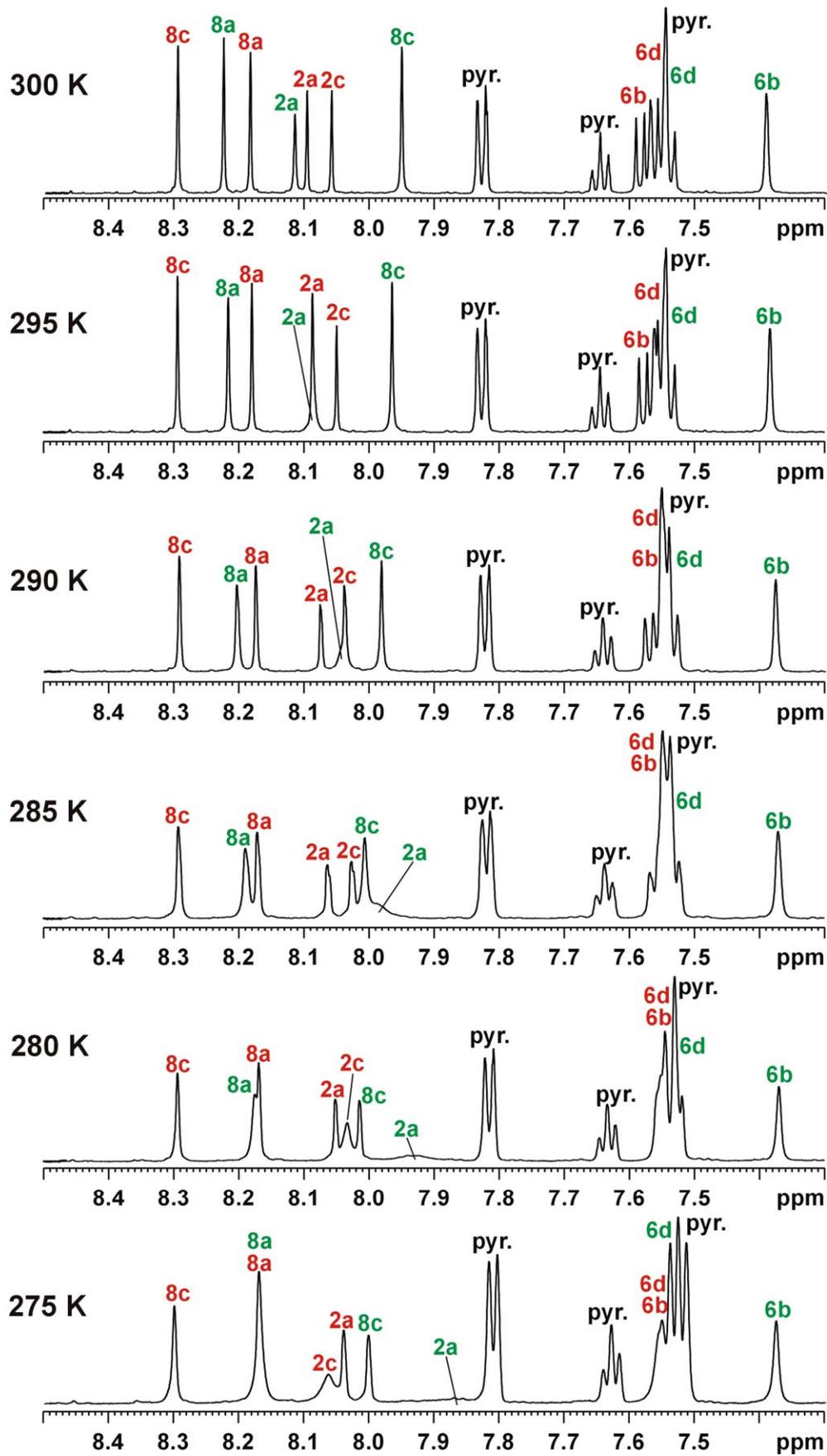


Abb. 20. Basenbereich für 4PM / 4T zwischen 275 und 300 K (600 MHz, 30 mM Phosphatpuffer/D₂O). Signale für 4T in grün, für 4PM in rot.

Wie die beiden vorangehenden Abbildungen zeigen, ist für keines der Basenprotonen eine grössere Änderung der chemischen Verschiebung zu beobachten. Den stärksten Shift erfahren die Protonen H2a (**4T**) in beiden Temperaturreihen und H2c (**4PM**) für **4PM** / **4T**, einhergehend mit einer starken Verbreiterung der Signale.

Eine zu Abb. 18 vergleichbare Auftragung (Abb. 21) für die Protonen H5b (**4PH**), H5b (**4PM**) und H8c (**4T**; für beide Temperaturreihen) zeigt, dass keine signifikante Änderung der chemischen Verschiebungen für jene Basenprotonen im Bereich von 275 – 300 K vorliegt. Die max. Änderung für den betrachteten Temperaturbereich beträgt 0.12 ppm im Falle von H5b (**4PH**).

Im hier vorliegenden Fall handelt es sich aber im Vergleich zu Abb. 18 um ein sehr kurzes DNA Fragment (Tetramer), welches aufgrund seiner geringen Länge keine extrem stabile Duplexstruktur ausbilden kann, die bei einer best. Temperatur „schmilzt“. Längere DNA Fragmente sind Strukturen mit hoher Kooperativität, welche das plötzliche Zusammenbrechen der doppelhelikalen Struktur (also definierte Schmelztemperatur) bedingt, wohingegen ein relativ kurzes DNA Oligomer keine starken, kooperativen Wechselwirkungen erfährt und somit nicht bei einer genau definierten Temperatur schmilzt, sondern langsam „aufweicht“.¹²

Dies würde das Temperaturverhalten der in Abb. 21 gezeigten Basenprotonen erklären. Dennoch dürften – zu einem geringen Grad – bei niedrigen Temperaturen Duplexstrukturen in Lösung vorhanden sein.

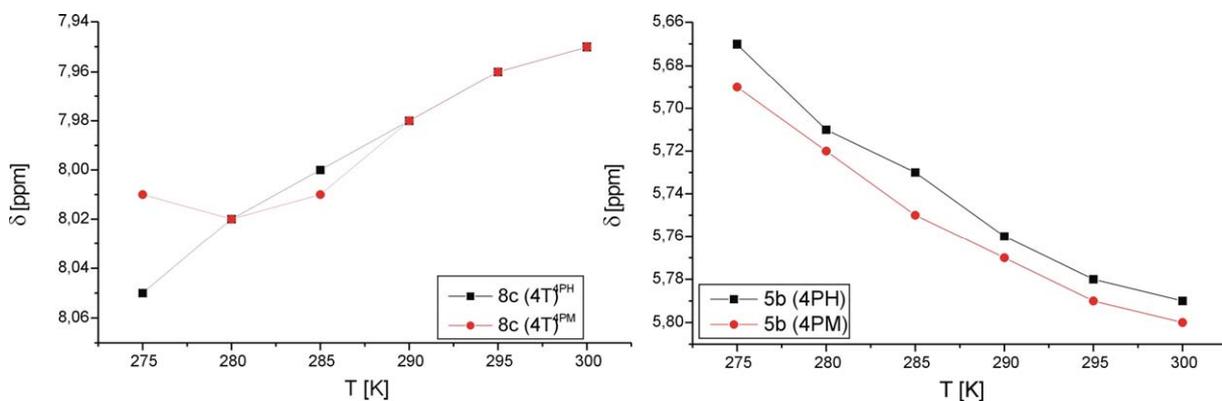


Abb. 21. Auftragung der chemischen Verschiebung δ [ppm] gegen die Temperatur [K] für ausgewählte Basenprotonen von **4PH**, **4PM** und **4T**.

3.2 Vergleich der ROESY Daten für **4PH** / **4T** bei 300 und 277 K

Für den Fall des unmodifizierten Tetramers **4PH** in Lösung mit **4T** wurden ROESY Spektren bei 300 K und bei 277 K aufgenommen. Für **4PH** lassen sich somit die ROE Daten aus der Messung des Einzelstranges (300 K) mit denen aus den Messungen in Lösung mit **4T** bei 300 K und 277 K vergleichen. Tabelle 16 stellt die, für Ringpuckering und Basenorientierung wichtigen, ROEs, sowie die sequentiellen ROEs gegenüber.

ROE	4PH (Einzelstrang, 300 K) [Å]	4PH (+ 4T, 300 K) [Å]	4PH (+ 4T, 277 K) [Å]
H1'a – H8a	2.6	2.6	-
H1'a – 2''a	2.4	2.4	
H2''a – H3'a	2.65	2.5	
H2'a – H3'a	-	2.1	n.d., da H2'a / H2''a überlagert
H2''a – H4'a	3.2	3.2	
H2''a – H6b	3.15	3.2	
H2'a – H6b	3.45	3.4	
H1'b – H6b	3.0	3.1	-
H1'b – H2''b	2.3	-	-
H1'b – H3'b	3.7	-	-
H1'b – H4'b	2.7	2.8	-
H2'b – H3'b	2.2	2.3	2.4
H2''b – H4'b	3.3	3.25	-
H2'b – H8c	3.3	3.6	4.0
H2''b – H8c	3.4	3.45	3.3
H1'c – H8c	3.1	3.1	3.5
H1'c – H3'c	3.3	3.3	-
H1'c – H4'c	2.8	2.95	3.0
H1'c – H2''c			2.5
H2''c – H3'c	n.d., da H2'c / H2''c überlagert		2.7
H2''c – H6d			2.9
H8c – H7d	3.1	3.5	3.3
H1'd – H6d	3.0	3.0	3.2
H1'd – H3'd	3.65	4.2	-
H1'd – H4'd	2.7	2.7	2.7

Tab. 16. Gegenüberstellung signifikanter ROEs für **4PH** im Einzelstrang (300 K) und in Lösung mit **4T** bei 300 K und bei 277 K. Fett gedruckt sind jene Abstände dargestellt, die eine grössere Abweichung voneinander aufweisen.

Das Problem bei der Ermittlung der ROE Daten für **4PH** in Lösung mit **4T** war eine teilweise sehr starke Überlagerung der Signale für **4PH** und **4T**, so dass keine quantitativen Aussagen über die betreffenden ROEs gemacht werden können. Bei der Messung bei 277 K waren zudem alle Signale verbreitert, was zu zusätzlichen Überlagerungen führte. Daher war für letzteren Fall nur eine geringe Anzahl an ROEs quantitativ auswertbar.

Tabelle 16 zeigt, dass die Unterschiede für **4PH** – sei es als Einzelstrang, in Lösung mit **4T** oder bei unterschiedlicher Temperatur – relativ gering sind. Nur für **4PH** / **4T** bei 277 K ergibt sich eine etwas abweichende Ausrichtung der Basen A (c-Ring) und T (d-Ring) von **4PH**. Das Gleichgewicht der Basenorientierung verschiebt sich auf die Seite der anti Orientierung. Ob auch für die Basen an a- und b-Ring nun eine Bevorzugung der anti Ausrichtung vorliegt, konnte aufgrund von Überlagerungen nicht ge-

klärt werden. Ferner unterscheiden sich die Verschiebungen der diastereotopen Protonen der CH₂-Gruppen an C2'; im Falle des Einzelstranges bzw. der Messung bei 300 K (**4PH** / **4T**) besitzen H2'c / H2''c bzw. H2'd / H2''d dieselbe Verschiebung, wohingegen bei 277 K die Verschiebungen für H2'a / H2''a bzw. H2'd / H2''d zusammenfallen.

Vergleichende ¹H Spektren und ROESY Spektren finden sich im Anhang.

3.3 Vergleich der ROESY Daten von **4PM** als Einzelstrang (300 K) und in Lösung mit **4T** (277 K)

Da die Unterschiede für **4PH** als Einzelstrang (300 K) und in Lösung mit **4T** bei 300 K sehr gering waren, wurde auf ein ROESY Experiment für **4PM** / **4T** bei 300 K verzichtet und lediglich bei 277 K eine quantitative Analyse der ROE Daten vorgenommen. Somit werden in Tabelle 17 die ROEs für **4PM** als Einzelstrang bei 300 K mit jenen für **4PM** in Lösung mit **4T** bei 277 K verglichen.

ROE	4PM (Einzelstrang, 300 K) [Å]	4PM (+ 4T, 277 K) [Å]
H1'a – H8a	2.6	-
H3'a – H8a	3.5	3.6
H1'a – H2''a	2.3	n.d.
H1'a – H4'a	3.0	-
H2''a – H3'a	2.6	
H2''a – H4'a	3.3	n.d., da H2'a / H2''a überlagert
H2'a – H4'a	3.5	
H3'a – H4'a	-	2.55
H1'b – H6b	3.1	-
H2'b – H6b	2.3	2.2
H1'b – H3'b	3.85	-
H1'b – H4'b	2.8	2.7
H2'b – H3'b	2.2	2.3
H2''b – H3'b	2.7	2.8
H2''b – H4'b	3.3	3.3
H3'b – H4'b	-	2.5
H2'b – H8c	3.9	4.0
H2''b – H8c	3.4	3.1
H1'c – H8c	3.1	3.1
H1'c – H2'c/H2''c	2.2	2.1
H1'c – H4'c	2.9	2.7
H3'c – H4'c	-	2.9
H3'c – H7d	3.2	3.2
H8c – H7d	3.7	3.4
H1'd – H6d	2.9	3.1
H1'd – H4'd _{Me}	2.7	2.6
H3'd – H4'd _{Me}	3.0	2.9

Tab. 17. Gegenüberstellung signifikanter ROEs für **4PM** im Einzelstrang bei 300 K und im „Doppelstrang“ mit **4T** bei 277 K.

Im Falle von **4PM** ist der Unterschied in den ROEs noch geringer als für **4PH** / **4T**, es ergab sich auch hier bei 277 K das Problem relativ breiter und teilweise stark überlappender Signale, so dass nicht alle signifikanten ROEs quantitativ ausgewertet werden konnten. Für die diastereotopen Protonen der CH₂-Gruppen an C2' zeigt sich als einziger Unterschied zwischen Einzel- und Doppelstrang, dass bei 277 K die Verschiebungen für H2'a und H2''a zusammenfallen. Die ROEs zwischen H1' und den Protonen der zugehörigen Base zeigen im Vergleich zu **4PH** keine bzw. nur eine minimale Änderung.

Die entsprechenden ¹H und ROESY Spektren finden sich auch für **4PM/4T** im Anhang.

Für die in 3.2 und 3.3 behandelten ROESY Spektren konnte leider keine quantitative Auswertung der ROE Signale für **4T** erfolgen, da keine Kreuzsignale für eine optimale Eichung zur Verfügung standen.

3.4 Vergleich der ROESY Daten von **4PH** und **4PM** bei 277 K in Lösung mit **4T**

Die Gegenüberstellung jener Daten gibt Aufschluss darüber, inwiefern eine Methylierung an Position C4' am 3'-Ende zu Änderungen in der Struktur bei Vorhandensein des entsprechenden Komplementärstranges führt.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 22) verdeutlicht rein qualitativ die sehr gute Übereinstimmung der ROE Muster für **4PH** (schwarze Kreuzsignale) und **4PM** (rote Kreuzsignale) bei 277 K und Zusatz des Komplementärstranges **4T**. Einziger Unterschied im hier gezeigten Basenbereich ist eine unterschiedliche chemische Verschiebung für H6d (**4PH** bzw. **4PM**), welches jedoch ein vergleichbares ROE Muster in beiden Tetrameren aufweist. Auch für den Anomerenbereich sind die ROE Muster in ähnlich guter Übereinstimmung (siehe Anhang).

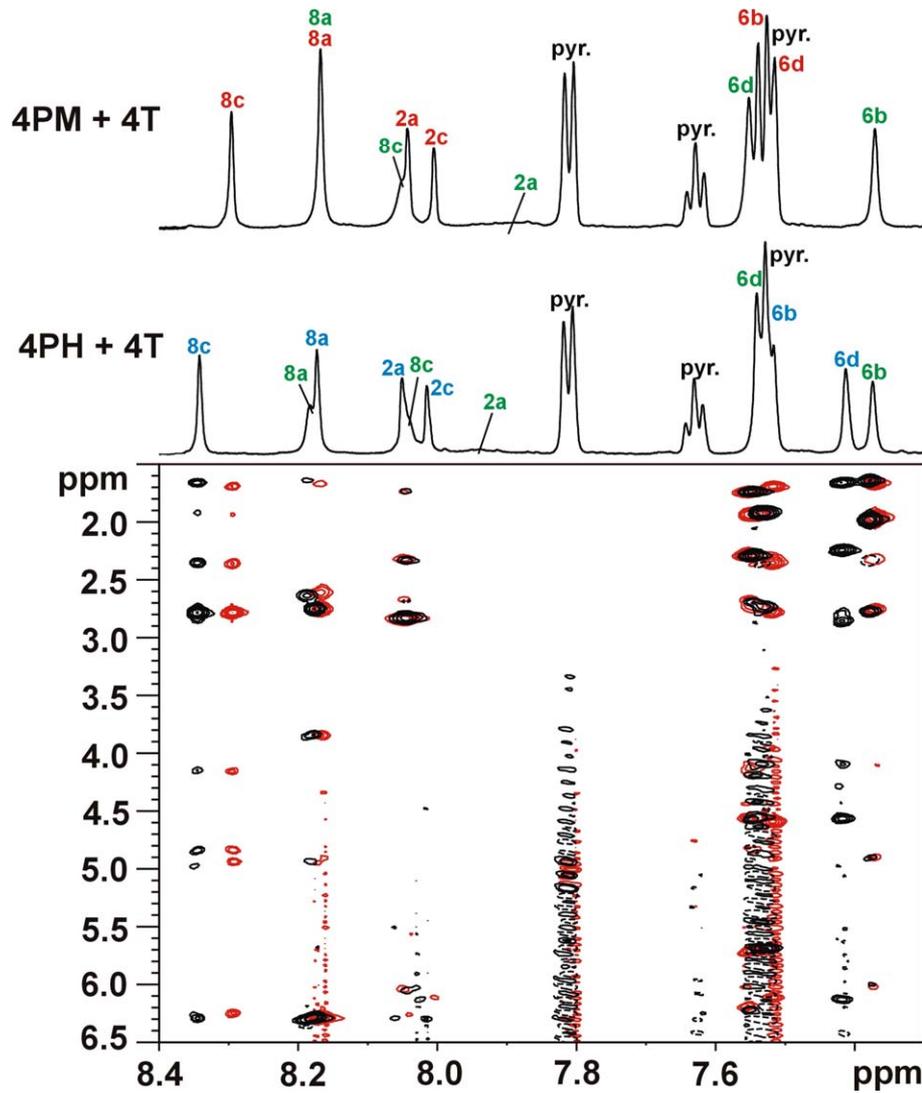


Abb. 25. ROESY Ausschnitt für den Basenbereich von **4PH / 4T** und **4PM / 4T** bei 277 K inkl. den zugehörigen ¹H Ausschnitten.

Betrachtet man quantitativ die, aus den ROESY Signalen ermittelten, Abstände für **4PH** und **4PM**, so sind auch hier nur wenige Unterschiede festzustellen. So weisen nur die nachfolgend aufgelisteten ROEs einen Unterschied von mehr als 0.25 Å bzw. 0.5 Å auf (Tab. 18). Eine Liste mit dem Vergleich aller ROE Abstände ist im Anhang wiedergegeben.

ROE Abstand	Δ [Å] ($ \Delta\text{ROE}_{4\text{PH}} - \Delta\text{ROE}_{4\text{PM}} $)
H3'a – H8a	> 0.25
H3'b – H6b	> 0.25
H3'b – H8c	> 0.25
H1'c – H8c	> 0.25
H3'c – H8c	> 0.5
H5'c ^{h/t} – H8c	> 0.25
H3'c – H7d	> 0.25
H3'c – H6d	> 0.5
H3'd – H6d	> 0.25

Tab. 18. Aus den Integrationen ermittelte ROE Abstände für **4PH** und **4PM**, die einen deutlichen Unterschied zueinander aufweisen.

Auffallend ist, dass es sich bei den ROEs um sequentielle bzw. ROEs zwischen Ringprotonen und zugehöriger Base handelt. Eine Änderung des Ringpuckerings ist daher, und bei Betrachtung aller ROEs für **4PH** und **4PM** bei 277 K (siehe Anhang), unwahrscheinlich. Vielmehr muss von einer unterschiedlichen Orientierung der Basen ausgegangen werden, wobei dies vor allem die Basen an den Ringen c und d betrifft. Betrachtet man die berechneten Abstände für H1'c – H8c und H1'd – H6d, so ergibt sich für den Winkel χ im Falle des c-Ringes eine Verschiebung des syn/anti Gleichgewichts, wohingegen für den d-Ring eine annähernd gleiche Basenorientierung vorliegt.

ROE Abstand	4PH	4PM
H1'c – H8c	3.5 → $\chi \sim -60^\circ$ → syn/anti GGW mit bevorzugter anti Orientierung	3.1 → $\chi \sim -10^\circ$ → syn/anti GGW mit bevorzugter syn Orientierung
H1'd – H6d	3.2 → $\chi \sim -45^\circ$ → annähernd kein Unterschied in der Basenorientierung → syn/anti GGW	3.1 → $\chi \sim -30^\circ$

Tab. 19. Vergleich der Basenorientierung an c- und d-Ring für **4PH** und **4PM** bei 277 K.

4. Zusammenfassung

Die Untersuchung der Einzelstränge **4PH** und **4PM** ergab, dass die Einführung einer Methylgruppe an C4' des 3'-Endes weder Auswirkungen auf das entsprechende Nukleotid, noch auf die Struktur des Einzelstranges hat. So sind für beide Tetramere Ringpuckering und Basenorientierung vergleichbar.

Liegen **4PH** bzw. **4PM** in Lösung mit ihrem Komplementärstrang **4T** vor, so zeigt sich auch hier ein vergleichbares Verhalten. In beiden Fällen ändern sich für **4T** dieselben Basenverschiebungen durch Zugabe von **4PH** bzw. **4PM** bei 300 K, also bei einer Temperatur, bei der nur geringe Mengen als Doppelstrang vorliegen. Die Änderung für Basenprotonen des a- und c-Rings von **4T** sind wahrscheinlich auf minimale Änderungen der Basenorientierung zurückzuführen. Diese sind jedoch so gering, dass ein Vergleich von ROESY Daten (**4T** als Einzelstrang bzw. in Lösung mit **4PH** bei 300 K) keinerlei Unterschiede erkennen lässt.

Auswirkungen der C4' Alkylierung auf den Komplementärstrang **4T** sind nicht feststellbar.

Im Verlauf der Temperaturreihe von 275 – 300 K zeigte sich für beide Systeme – **4T/4PH** und **4T/4PM** – dass es zur Ausbildung von doppelsträngiger DNA über einen relativ weiten Temperaturbereich kommt, wobei dies auf die kurzen DNA Stränge mit nur jeweils 4 Bausteinen zurückzuführen ist. Sie sind sehr viel flexibler als längere Oligonukleotide und besitzen keine so exakt definierte Schmelztemperatur. Die Temperaturabhängigkeit ausgewählter Basenprotonen entspricht qualitativ den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen, wobei die Änderung in der chemischen Verschiebung für diese kurzen DNA Fragmente weitaus geringer ist.

4PH und **4PM** zeigen in Lösung mit **4T** zu ihren Einzelsträngen vergleichbare Strukturen. Die ROEs sind bis auf einige, wenige Ausnahmen in guter Übereinstimmung.

Auch ein Vergleich von **4PH** und **4PM** – jeweils in Lösung mit **4T** und bei 277 K – zeigt gute Übereinstimmung, wobei jedoch eine grössere Anzahl an ROEs mehr oder weniger stark voneinander abweichen. Diese betreffen ausschliesslich sequentielle ROEs und ROEs zwischen Base und zugehörigen Ringprotonen, und hier besonders die Ringe c und d. Aufgrund der guten Übereinstimmung der restlichen ROEs kann man davon ausgehen, dass nicht ein verändertes Ringpuckering, sondern eine Verschiebung des syn/anti Gleichgewichts in der Orientierung der Basen der Grund für jene abweichenden Werte ist, wobei jedoch, wie Tab. 19 zeigt, diese Unterschiede sehr gering sind.

Insgesamt lassen die gezeigten Daten den Schluss zu, dass eine Methylierung an C4' des 3'-Endes weder das betreffende Nukleotid, noch den entsprechenden Einzelstrang in seiner Struktur ändert. Auch in Kombination mit dem entsprechenden Komplementärstrang waren die Unterschiede zwischen modifiziertem und unmodifiziertem Tetramer gering und die Auswirkungen auf den Komplementärstrang **4T** identisch.

5. Literaturstellen

- [1] Kool E. T.; Morales J. C.; Guckian K. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 990-1009.
- [2] Watson J. D.; Crick F. H. C. *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [3] Kool E. T. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2000**, 4, 602-608.
- [4] De Mesmaeker A.; Häner R.; Martin P.; Moser H. E. *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 366-374.
- [5] Detmer I.; Summerer D.; Marx A. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1837-1846.
- [6] Summerer D.; Marx A. *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3806-3808.
- [7] Summerer D.; Marx A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 910-911.
- [8] Strerath M.; Cramer J.; Restle T.; Marx A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11230-11231.
- [9] Strerath M.; Summerer D.; Marx A. *ChemBioChem* **2002**, 6, 578-580.
- [10] Strerath M.; Marx A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4766-4769.
- [11] Detmer I.; Summerer D.; Marx A. *Chem. Commun.* **2002**, 2314-2315.
- [12] Stryer L. *Biochemistry*; W. H. Freeman and Company: New York, **1996**; 75-94.
- [13] Vorlesung „Chemische Biologie 1 – Nukleinsäuren“, Vorlesungsnetz Chemische Biologie, Universität Marburg.
- [14] Stryer L. *Biochemistry*; W. H. Freeman and Company: New York, **1996**; 787-791.
- [15] Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; J. Wiley & Sons: New York, **1986**; 220-222.
- [16] Evans J. N. S. *Biomolecular NMR Spectroscopy*; Oxford University Press: Oxford, **1995**; 343-345.
- [17] Blackburn G. M.; Gait M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, 2nd Edition, Oxford University Press: New York, **1996**; 25.
- [18] Govil G.; Hosur R. V. *Conformation of Biological Molecules, New Results from NMR*, Springer-Verlag: Heidelberg, **1982**; 18-19 und 46-47.
- [19] Markley J. L.; Bax A.; Arata Y.; Hilber C. W.; Kaptein R.; Sykes B. D.; Wright P. E.; Wüthrich K. *Pure & Appl. Chem.* **1998**, 70, 117-142.
- [20] Evans J. N. S. *Biomolecular NMR Spectroscopy*; Oxford University Press: Oxford, **1995**; 353.
- [21] Claridge T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, Elsevier Science: Oxford, **1999**; 319-320.

[22] Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; J. Wiley & Sons: New York, **1986**; 203-219.

[23] Wüthrich K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; J. Wiley & Sons: New York, **1986**; 237.

[24] Zuker M. *Nucleic Acids Research* **2003**, 31, 3406-3415.

URL: <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>

[25] Patel D. J.; Pardi A.; Itakura K. *Science* **1982**, 216, 581-590.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Analyse von Struktur, Dynamik und Wechselwirkungen verschiedener, niedermolekularer Biomoleküle mittels NMR Spektroskopie und Molecular Modeling.

Sechs Teilgebiete, denen unterschiedliche biologische/funktionelle Fragestellungen zugrunde liegen, wurden durch ähnliches, methodisches Vorgehen und sich ergänzende Untersuchungen bearbeitet.

Die Methode, den Austausch acider Protonen in polar, protischen Lösungsmitteln durch geeignete Probenpräparation so weit zu verlangsamen, dass im NMR separierte Signale mit Multiplettstruktur detektiert werden können, ist vor allem für die Untersuchung von Kohlenhydraten von grosser Bedeutung.

So ermöglicht die Untersuchung der **Hydroxygruppen in Kohlenhydraten** den Gewinn zusätzlicher Informationen, die sowohl die Struktur, als auch vorhandene, schwache Wasserstoffbrücken betreffen.

An einfachen Sacchariden wie Glucose oder auch Saccharose konnte gezeigt werden, dass in einer Mischung aus $\text{MeOH}_{\text{d}3}$ und $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ die OH-Gruppen in all ihren Eigenschaften – chemische Verschiebungen, Kopplungskonstanten, Temperaturkoeffizienten, Verhalten bei Titrations und NOE Kontakte – vollständig charakterisiert werden können.

Dies fand Anwendung bei der Untersuchung der Ca^{2+} vermittelten Wechselwirkung zwischen Kopfgruppen der **Lewis Blutgruppenantigene**. Die, von zwei Lewis Trisaccharideinheiten gebildete, hydrophile Höhle zur kooperativen Bindung von Ca^{2+} Ionen konnte anhand der an ihr beteiligten OH-Gruppen näher bestimmt und die aus NOESY Messungen resultierende Struktur mit diesen zusätzlichen Informationen optimiert werden.

Durch Übertragung des Ca^{2+} Bindungsepitops zweier Lewis^X Einheiten auf verschiedene Lewis^X Analoga konnten in silico verschiedene Varianten der Bindung von Ca^{2+} postuliert werden. So ist in Abhängigkeit von der Orientierung der beiden Lewis^X Trisaccharide zueinander von einer unterschiedlich starken Komplexierung des Calciumions in den verschiedenen Modellsystemen auszugehen.

Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Einblick in die, in biologischen Systemen äusserst wichtigen, Kohlenhydrat-Kohlenhydrat Wechselwirkungen, wie sie z. B. im Rahmen der Zell-Zell-Erkennung von Bedeutung sind.

Eine Gruppe weiterer, wichtiger **Kohlenhydrate**, die z. B. von dem Cyanobakterium *Nostoc* besonders in Stresssituationen vermehrt gebildet werden, konnte erstmals identifiziert und strukturell charakterisiert werden.

Es handelt sich hierbei um Oligosaccharide bestehend aus α -(1 \rightarrow 2)-verknüpften Glucoseeinheiten, die an ihrem reduzierenden Ende eine Fructofuranose in α -(1 \rightarrow 2)-Verknüpfung besitzen.

Für diese Oligomere konnte eine relativ **fixe Sekundärstruktur** in Form einer rechtsgängigen Helix, mit Ganghöhe vier, ermittelt werden. Durch Abspaltung der Fructose und Untersuchung der defructosylierten Saccharide konnte zudem gezeigt werden, dass die Ausbildung einer rechtsgängigen Helix vom Vorhandensein der Fructoseeinheit abhängt. Die Fructose induziert bzw. stabilisiert eine Sekundärstruktur im Oligomer, die ansonsten nur partiell populiert wird, vergleichbar mit einer Cappingeinheit in Proteinen. Die defructosylierten Saccharide verhalten sich vielmehr wie gängige Homooligomere (z. B. Oligomaltose) und liegen in keiner bevorzugten Konformation vor. Sie sind sehr viel flexibler als die aus *Nostoc* extrahierten Oligosaccharide. Eine leichte Bevorzugung einer linksgängigen Helix konnte jedoch für das α -defructosylierte Analogon ermittelt werden.

Für höhere Oligosaccharide kann ein Aufwinden vom nicht-gecappten Ende postuliert werden, welches dazu führt, dass die letzten drei Glucoseeinheiten einem konformationellen Austausch zwischen links- und rechtsgängiger Helix unterliegen, der sich im Bereich des langsamen Austauschs befindet, so dass es zu einer starken Signalverbreiterung kommt. Dies ist gleichbedeutend mit einer, für Kohlenhydrate bis dato nicht gekannten, Energiebarriere bei Änderung der Φ - und Ψ -Winkel der O-glykosidischen Bindungen. Mit Hilfe eines Φ/Ψ -Plots kann gezeigt werden, dass der Übergang von rechts- zu linksgängiger Helix durch einen Bereich von Φ/Ψ Kombinationen verläuft, in dem eine sterisch äusserst ungünstige Ringstruktur zu beobachten ist.

Diese höheren Oligosaccharide stellen die ersten Kohlenhydrate dar, die eine derart hohe Energiebarriere zwischen ihren Konformeren aufweisen, dass bei Raumtemperatur kein schneller Wechsel zwischen diesen stattfinden kann.

Eine weitere, überraschende Beobachtung lieferte die Messung von kleinen, polaren Molekülen – polyhydroxylierten Thiazolidinlactamen – in sog. Bicellen. Hierbei handelt es sich um, in der NMR Spektroskopie häufig verwendete, Modellmembranen aus Phosphocholinen, die in einem bestimmten Temperaturbereich im Magnetfeld einen Phasenübergang von der rein isotropen Lösung hin zur flüssig-kristallinen Phase, mit anisotropen Eigenschaften, erfahren.

Zusätzlich detektierbare Kopplungen, die sog. residualen dipolaren Kopplungen (RDCs), die aus der Anisotropie der Probe resultieren, lagen um bis zu Faktor 100 höher als bis jetzt für vergleichbare kleine, polare Moleküle in der Literatur beschrieben. Die Ursache und die strukturellen Voraussetzungen dieses Verhaltens zu ermitteln, wurde mit Hilfe zahlreicher Modifikationen der Thiazolidinlactame erzielt.

Die kleinen, hydrophilen Moleküle weisen eine **Affinität zur lipophilen Membranoberfläche** der Bicellen auf, wobei diese stark von den strukturellen Gegebenheiten im Molekül abhängt. So ist nicht nur die Ladung des Moleküls, sondern vor allem ein zwischen seinen Hydroxygruppen bestehendes Wasserstoffbrückenmuster von ent-

scheidender Bedeutung für die Membranaffinität. Allein die Änderung der Orientierung der H-Brücken führt zu einem deutlichen Verlust der Affinität.

Die ungewöhnlich starke Ausrichtung, erkennbar an grossen RDC Werten, besteht nur in Bicellenlösungen mit ihren Phosphocholinbilayern. Für ein anderes flüssig-kristallines Medium, PEG/n-Hexanol/Wasser (Otting Phase), waren die Werte der RDCs nur wenig grösser als literaturbekannte Daten.

Mit der zusätzlichen Methode der Messung des Sättigungstransfers (STD) konnte gezeigt werden, dass eine Wechselwirkung zwischen, sich in Bicellen stark orientierenden, Molekülen und den Bicellen besteht.

Die Abschätzung einer Bindungskonstante führte in den Bereich extrem schwacher Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen ($K_d \sim 30 \text{ M}$), der mit anderen NMR Methoden, wie z. B. Titration, nicht zugänglich ist.

Mit Hilfe der mathematischen Auswertung der gemessenen dipolaren Kopplungen konnte mit dem sog. GDO Wert eine skalare Grösse bestimmt werden, die, unabhängig von den Probenbedingungen, den Grad der Orientierung eines Moleküls wiedergibt. Dies gewährte die Möglichkeit, eine Abfolge der Membranaffinitäten in Abhängigkeit von strukturellen Gegebenheiten zu ermitteln.

Diese Untersuchungen gestatten einen Einblick in die Wechselwirkungen kleiner Moleküle mit Membranen und könnten gerade für pharmazeutische Fragestellungen interessant sein.

Die strukturellen Untersuchungen an verschiedenen Analoga zu **Jasplakinolid**, einem, aus einem marinen Schwamm stammenden, Depsipeptid, zeigten eine hohe Übereinstimmung der peptidischen, 19-gliedrigen Makrozyklen mit dem Naturstoff, ohne dass in diesen, gut definierten, Strukturen Wasserstoffbrücken vorhanden wären. Die auf 18 Ringatome verkleinerten, makrozyklischen Analoga zeigten eine sehr hohe Flexibilität trotz vorhandener Wasserstoffbrücke; sie besitzen nur noch wenig Ähnlichkeit mit dem Naturstoff Jasplakinolid.

Modifizierte DNA Tetramere wurden auf ihre strukturellen Eigenschaften in Lösung hin untersucht. Durch Alkylierung des 4' C-Atoms des 3'-endständigen Nucleotids kam es zu keiner Änderung der Struktur des Einzelstranges in Lösung im Vergleich zum analogen, unmodifizierten Tetramer.

Auch bei Ausbildung des Doppelstranges mit dem entsprechenden Komplementärstrang konnten keine Unterschiede zwischen modifizierter und unmodifizierter DNA festgestellt werden. Die eingeführte, strukturelle Änderung bringt zwar vielfältige, biologisch wichtige Funktionen mit sich, wie Marx et al. gezeigt haben (Literatur: siehe Kapitel VI), wirkt sich jedoch nicht auf die dreidimensionale Struktur von Einzel- oder Doppelstrang aus.

EXPERIMENTALTEIL

Materialien und Methoden

1. Substanzen

- β -Methyl-galactopyranosid: > 98%, Fa. Sigma-Aldrich
- Saccharose: reinst, Fa. Merck, Darmstadt
- α/β -Glucose: D-(+)-Glucose wasserfrei, für Mikrobiologie, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Trehalose: für biochemische Zwecke, Fa. Merck, Darmstadt
- 1,6-anhydro- β -D-Glucose: 99%, Fa. Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI, USA
- Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC): Fa. Lipoid GmbH, Ludwigshafen
- Dihexanoylphosphatidylcholin (DHPC): - Fa. Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA
- Fa. Larodan AB, Malmö, Schweden
- Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB): 99+%, Fa. Acros Organics, New Jersey, USA
- Natriumdodecylsulfat-d25 SDS_{d25}: 98 atom% D, Fa. Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI, USA
- Pentaethylenglycolmonododecylether (C12E5): > 98%, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- 1-Hexanol: puriss., > 99%, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- 3-(Trimethylsilyl)-propionsäure Natriumsalz (TSP): Fa. Merck, Darmstadt
- Calciumchlorid Perlen: wasserfrei, 99.99+%, H₂O < 100 ppm, -10 mesh, Fa. Aldrich Chem. Co., Milwaukee, WI, USA
- Aluminiumoxid: ICN Alumina N – Super I, ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
- Dikaliumhydrogenphosphat K₂HPO₄: wasserfrei, > 99.5%, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Kaliumphosphat monobasisch KH₂PO₄: puriss. p. a., > 99.5%, Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
- Aceton: p. a., Fa. Merck, Darmstadt

In anderen Arbeitsgruppen synthetisiert oder isoliert:

- Makrozyklische Jasplakinolidanaloga: Prof. Martin E. Maier, Universität Tübingen
- DNA Tetramere: Prof. Andreas Marx, Universität Konstanz
- Kohlenhydrate aus *Nostoc*: PD Dr. Eckhard Loos, Universität Regensburg
- Lewis^X Glycopeptid: Prof. Horst Kunz, Universität Mainz
- Lewis^X Dimer, Monomer und Maltotetraose: Prof. Richard R. Schmidt, Universität Konstanz

In unserer Arbeitsgruppe synthetisiert (Prof. Armin Geyer, Universität Regensburg/Universität Marburg)

- Bicyklische Thiazolidinlactame

2. NMR Lösungsmittel und Zubehör

Alle verwendeten NMR Lösungsmittel wurden von Deutero GmbH, Kastellaun, bezogen.

- D₂O: 99.9%
- MeOH_{d3}: 99.5%
- MeOH_{d4}: 99.8%
- DMSO_{d6}: 99.8%
- CDCl₃: 99.8%

NMR-Röhrchen:

- 507-PP, 8 inch, Fa. Wilmad/Lab Glass, Buena, NJ, USA
- 505-PS, 8 inch, Fa. Wilmad/Lab Glass, Buena, NJ, USA
- 507-HP, 8 inch, Fa. Norell Inc., Landisville, NJ, USA

Septen: white rubber, 7 mm o.d., Fa. Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA

3. Reinigung der NMR Röhrchen

Die Reinigung erfolgte im Ultraschallbad mit Aceton, dest. Wasser, Aceton und anschließender Trocknung bei ca. 100 °C.

4. NMR Geräte und Software

- Bruker ARX 400 MHz (¹H: 400.13 MHz, ¹³C: 100.61 MHz), 5 mm QNP Probenkopf (¹H, ¹³C, ³¹P, ¹⁵N), Temperatureinheit: BVT 2000 Eurotherm
- Bruker AVANCE 400 MHz (¹H: 400.13 MHz, ¹³C: 100.61 MHz), 5 mm BBO Probenkopf, z-Gradienteneinheit, Temperatureinheit: BVT 2000 Eurotherm
- Bruker AVANCE 600 MHz (¹H: 600.13 MHz, ¹³C: 150.90 MHz), 5 mm BBI Probenkopf, z-Gradienteneinheit, Temperatureinheit: B-VT 3000
- Bruker DRX 600 MHz (¹H: 600.13 MHz, ¹³C: 150.90 MHz), 5 mm BBI Probenkopf, z-Gradienteneinheit

Für die Spektrenaufnahmen wurden die XWIN-NMR Versionen 2.6, 3.1 und 3.5 verwendet.

Für die Prozessierung und Auswertung der Daten wurden XWIN-NMR 2.6, 3.1 und 3.5, TOPSPIN 1.2 und 1D WINNMR verwendet.

5. Überblick über gängige 2D NMR Messungen und die verwendeten Standardparametersätze

Homonukleare 2D Techniken via Bindungen:¹

- **¹H-¹H COSY:** Identifizierung der skalaren Kopplung zwischen Protonen über zwei oder drei (in Ausnahmefällen vier) Bindungen (²J_{HH} bzw. ³J_{HH}).
- **¹H-¹H TOCSY:** Übertragung der skalaren Protonenkopplungen innerhalb eines Spinsystems, vorausgesetzt, es liegt ein kontinuierliches Netzwerk aus Kopplungen vor (z. B. ist für Protonen, die einen 90° Winkel zueinander aufweisen, die ³J_{HH} Kopplung annähernd null, so dass dies im TOCSY zu einer Unterbrechung des Netzwerkes aus Kopplungen innerhalb eines Spinsystems führt).

Heteronukleare 2D Techniken via Bindungen:¹

- **¹H-X HMQC bzw. HSQC:** Korrelation von Protonen und Kohlenstoffen über die ¹J_{CH} Kopplungskonstanten. Die Detektion erfolgt über die Protonen und ergibt daher eine grössere Signalintensität als bei Detektion über den Heterokern. Typischerweise ist X = ¹³C oder ¹⁵N.
- **¹H-X-HMBC:** long-range Korrelation von Protonen und Kohlenstoffen über ²J und ³J_{CH} Kopplungen (für X = ¹³C). Auch hier erfolgt die Detektion über die Protonen.

Homonukleare 2D Techniken – Korrelation „durch den Raum“:¹

- **¹H-¹H NOESY oder ROESY:** Korrelation nicht über Bindungen, sondern aufgrund räumlicher Nähe von Protonen zueinander. Sind Protonen aufgrund struktureller Gegebenheiten weniger als 5 Å voneinander entfernt, so treten dipolare Wechselwirkungen zwischen ihren Kernen auf. Die Intensität der so entstehenden Kreuzsignale im NOESY bzw. ROESY Spektrum ist proportional zu r_{ij}⁻⁶, mit r_{ij} gleich dem Abstand der beiden Protonen i und j. Dem ROESY Spektrum ist bei mittelgrossen Molekülen (1-2 kDa) der Vorzug zu geben, wohingegen das NOESY Spektrum für kleine bzw. grosse Moleküle generell Spektren mit weniger Artefakten liefert. Allerdings besitzt das ROESY Spektrum den Vorteil, dass stets zwischen ROE Kreuzsignalen und Austauschsignalen anhand ihrer Vorzeichen unterschieden werden kann.

Verwendete, experimentelle Parameter:

- DQFCOSY:² d1 = 2.0 s, TD(F2) = 2 k, TD(F1) = 256 / 384 / 512, NS = variabel, Prozessierung mit: quadratischer Sinusfunktion (π/2 Shift) in beiden Dimensionen
- TOCSY:³ d1 = 2.0 s, TD(F2) = 2 k, TD(F1) = 256 / 384 / 512, t_{mix} = 60 – 100 ms, NS = variabel, mit MLEV17 Sequenz, Prozessierung mit: quadratischer Sinusfunktion (π/2 Shift) in beiden Dimensionen

- NOESY:⁴ $d1 = 2.0$ s, $TD(F2) = 2$ k, $TD(F1) = 256 / 384 / 512$, $NS =$ variabel, $t_{mix} =$ variabel, Prozessierung mit: quadratischer Sinusfunktion ($\pi/2$ Shift) in beiden Dimensionen
- ROESY kompensiert:⁵ $d1 = 2.0$ s, $TD(F2) = 2$ k, $TD(F1) = 256 / 384 / 512$, $NS =$ variabel, $t_{mix} = 200$ ms, Spinlock = cw, Prozessierung mit: quadratischer Sinusfunktion ($\pi/2$ Shift) in beiden Dimensionen
- HMQC, mit Gradientenpulsen:⁶ $d1 = 2.0$ s, $d2 = 3.45$ ms, $cnst2 = 145$ Hz, $TD(F2) = 1$ k, $TD(F1) = 256 / 384$, $NS =$ variabel, Gradientenpuls $p16 = 1000$ μ s, Prozessierung mit: quadratischer Sinusfunktion ($\pi/2$ Shift) in beiden Dimensionen
- HMBC mit low-pass J Filter und Gradientenpulsen:⁷ $d1 = 2.0$ s, $TD(F2) = 1$ k, $TD(F1) = 256 / 384$, $NS =$ variabel, $cnst2 = 145$ Hz, $cnst13 = 1$ Hz, Prozessierung mit: Sinusfunktion (ohne Shift) in beiden Dimensionen, halbphasensensitiv, magnitude Rechnung in F1
- HMBC ohne low-pass J Filter und mit Gradientenpulsen:⁷ analog zu HMBC mit low-pass J Filter

Unterdrückung von Lösungsmittelsignalen mit:

- Vorsättigung: 50 – 60 dB
- Watergate:^{2, 8} 3-9-19 Sequenz, mit Gradientenpulsen

6. Massenspektren

Finnigan MAT TSQ 7000 (ESI)

Messung in $H_2O/MeOH$ unter Zusatz von 10 mM Ammoniumacetat

7. Verwendete Software

Für allgemeine Berechnungen wurden die Programme Maple V (Release 4) und Origin 5.0 verwendet.

Zum Zeichnen von Molekülstrukturen ISIS Draw 2.4, zur dreidimensionalen Moleküldarstellung VMD 1.8.2.

Die Berechnung der Tensoraten in Kapitel IV erfolgte mit REDCAT for Windows (näheres siehe Kapitel IV), das Modeling von Molekülstrukturen, basierend auf experimentellen Parametern als Randbedingungen, wurde mit HyperChem Professional 6.03 for Windows durchgeführt.

8. Molekülstrukturberechnungen mit HyperChem⁹

Den ersten Schritt nach Aufbau der Struktur stellt eine Geometrieoptimierung dar. Dabei werden jene Atomkoordinaten ermittelt, die einem Minimum der potentiellen Energie entsprechen. Die Ableitung der potentiellen Energie V nach den kartesischen Koordinaten r_i ist null für die optimierten Koordinaten.

Folgende zwei Algorithmen wurden im Rahmen der Geometrieoptimierung verwendet:

1. **Steepest Descent:** Minimierung erster Ordnung. Berücksichtigt wird die erste Ableitung der potentiellen Energie in Bezug auf die Koordinaten. Im Rahmen dieser Methode bewegt man sich entlang des steilsten Abfalls auf der Oberfläche, welche die potentielle Energie repräsentiert.
2. **Conjugate Gradient (Polak-Ribiere):** Minimierung erster Ordnung. Hier wird jedoch zusätzlich zur momentanen ersten Ableitung der potentiellen Energie die Richtung der vorherigen Minimierungsschritte berücksichtigt (*minimization history*).

Die Geometrieoptimierung wurde als erfolgreich angesehen, wenn der RMS Wert des Gradienten (also der ersten Ableitung) kleiner als $0.1 \text{ kcal/mol}\cdot\text{\AA}$ war.

Die so erhaltene, geometrieoptimierte Struktur dient als Ausgangspunkt für Moleküldynamik Simulationen.

Das, den hier durchgeführten Rechnungen zugrundeliegende, Kraftfeld gehört zu den sog. Molekülmechanikmethoden. Diese benutzen die Gleichungen der klassischen Mechanik, um die Oberfläche der potentiellen Energie und die physikalischen Eigenschaften eines Moleküls zu beschreiben. Die Auffassung eines Moleküls als Ansammlung von Atomen, die auf bestimmte Weise miteinander wechselwirken, und deren Beschreibung im Form von analytischen Funktionen bezeichnet man als Kraftfeld.

Verwendet wird das Mm+ Kraftfeld, eine Weiterentwicklung des von Allinger¹⁰ entwickelten MM2 Kraftfeldes.

Die potentielle Energie eines Moleküls in einem Kraftfeld setzt sich aus der Summe individueller Energieterme zusammen.

Hierzu gehören z. B. die Energien für Bindungen, Bindungswinkel, Dipol-Dipol Wechselwirkungen, van der Waals.

Im Gegensatz zu quantenmechanischen Rechnungen werden Wechselwirkungen zwischen Elektronen im Rahmen der Molekülmechanik Rechnungen nicht berücksichtigt.

Bei der Moleküldynamik Simulation werden die zukünftigen Koordinaten und Geschwindigkeiten der Atome berechnet, basierend auf ihren momentanen Koordinaten und Geschwindigkeiten. Als erstes wird die auf jedes Atom wirkende Kraft als Funktion der Zeit bestimmt, dies entspricht dem negativen Wert der ersten Ableitung der potentiellen Energie nach den Koordinaten. Hieraus lassen sich Beschleunigung, Änderung der Geschwindigkeit und Änderung der räumlichen Position berechnen. Die kinetische Energie ist definiert als die Summe der Geschwindigkeiten der Atome. Die Gesamtenergie eines Systems setzt sich zusammen aus kinetischer und potentieller Energie.

Die MD Simulationen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- im Vakuum
- bei konstanter Temperatur (300 K)
- mit einer Relaxationszeit für die Badtemperatur von 0.1 ps
- Dauer der MD Simulation: 10 ps in Schritten von 0.001 ps
- Aufheiz- und Abkühlzeit = 0 ps
- Datenaufnahme für jeden Zeitschritt

Gesetzte Restraints, also auf experimentellen Daten beruhende Randbedingungen (wie z. B. HH-Abstände, Bindungswinkel) wurden mit den Standardwerten für die Federkonstanten implementiert:

- 7.0 kcal/mol*Å² für interatomare Abstände
- 12.5 kcal/mol*degree² für Winkel

Für Torsionswinkel wurde ein Wert von 20.0 kcal/mol*degree² gesetzt.

9. Literaturstellen

- [1] Claridge T. D. W. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, Elsevier Science Ltd.: Oxford, **1999**; 1-12.
- [2] Derome A.; Williamson M. *J. Magn. Reson.* **1990**, *88*, 177-185.
- [3] Bax A.; Davis D. G. *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*, 355-360.
- [4] Macura S.; Huang Y.; Suter D.; Ernst R. R. *J. Magn. Reson.* **1981**, *43*, 259-281.
- [5] Griesinger C.; Ernst R. R. *J. Magn. Reson.* **1987**, *75*, 261-271.
- [6] Bax A.; Griffey R. H.; Hawkins B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7188-7190.
- [7] a) Bax A.; Summers M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093-2094. b) Summers M. F.; Marzilli L. G.; Bax A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4285-4294. c) Kogler H.; Sorensen O. W.; Bodenhausen G.; Ernst R. R. *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 157-163.
- [8] a) Piotto M.; Saudek V.; Sklenar V. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661-666. b) Sklenar V.; Piotto M.; Leppin R.; Saudek V. *J. Magn. Reson. Serie A* **1993**, *102*, 241-245. c) Liu M.; Mao X.; Ye C.; Nicholson J. K.; Lindon J. C. *J. Magn. Reson.* **1998**, *132*, 125-129.
- [9] *HyperChem Computational Chemistry Handbook*, Hypercube, Inc. Kanada: **1996**.
- [10] Allinger N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8127-8134.

KAPITEL I: Hydroxyprotonen in polar, protischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur

1. Probenvorbehandlung

1.1 In Methanol leicht lösliche Saccharide

Die hier beschriebene Vorgehensweise ist die, nach etlichen Optimierungen, als am effektivsten anzusehende Methode.

- Substanz in $\text{MeOH}_{d3} : \text{MeOH}_{d4}$ 1:1 (v/v), Gesamtvolumen 1 mL, lösen.
- Aluminiumoxid N Super I (0% Wassergehalt) ca. 2-3 h im Trockenschrank (160-180 °C) ausheizen und noch heiss zur methanolischen Lösung zugeben.
- Gut durchmischen und über Nacht bei RT stehen lassen.
- Nochmals gut durchmischen, abzentrifugieren und Überstand abpipettieren.
- Dieser kann so im NMR vermessen werden. Eine besondere Vorbehandlung der NMR Röhren war nicht nötig.

Wichtig: Durch Zugabe von heissem Aluminiumoxid kommt es zu einem Verlust an Lösungsmittel durch Verdampfen, zudem konnte nicht restlos geklärt werden, ob und wenn ja wieviel Substanz an das Aluminiumoxid adsorbiert.

Dies bedeutet, dass die Endkonzentration nicht genau bekannt ist.

Wie jedoch die im Allgemeinen Teil beschriebenen Titrationen mit CaCl_2 und deren Auswertung gezeigt haben, bewegen sich die Verluste in einem geringen Bereich.

1.2 In Methanol schwer lösliche Saccharide

- Substanz in $\text{MeOH}_{d3} : \text{MeOH}_{d4}$ 1:1 (v/v), Gesamtvolumen 1 mL, suspendieren
- Zugabe von möglichst wenig CaCl_2 -Perlen (wasserfrei), bis sich die Substanz vollständig gelöst hat
- Das weitere Vorgehen ist wie unter 1.1.1 beschrieben.

1.3 Sättigen der Lösung mit CaCl_2

- portionsweise CaCl_2 -Perlen (wasserfrei) zugeben, bis sich diese im Ultraschallbad nur noch unter Erwärmen (ca. 40 °C) lösen.
- Die Probe „auf dem Kopf stehend“ langsam bei RT abkühlen lassen.
- Schliesslich den CaCl_2 -Überschuss im Kühlschrank auskristallisieren lassen.
- Der Kristallbrei befindet sich durch dieses Vorgehen im oberen Bereich des NMR Röhrens, so dass für die Messung eine klare Lösung zur Verfügung steht.

Wichtig: Der Art des Kristallbreis nach zu urteilen, kristallisiert CaCl_2 in Form eines seiner Hydrate aus. Ob dabei nur das im MeOH befindliche Restwasser oder auch MeOH mitauskristallisiert konnte nicht gezeigt werden.

2. Hydroxyprotonen verschiedener Monosaccharide in Methanol

2.1 Methyl-β-D-Galactopyranosid (βGalOMe)

Verwendete Proben:

- **ohne CaCl₂ & bei 28 eq CaCl₂:** 24.27 mg βGalOMe ($n = 1.25 \cdot 10^{-4}$ mol, $c = 83.3$ mM) werden in 1.5 mL MeOH d3:d4 = 1:1 gelöst. Aluminiumoxid N Super I (ohne Vorbehandlung) wird zugesetzt und die Probe über Nacht bei RT aufbewahrt. Am nächsten Tag wird über einen 0.45 µm Filter abfiltriert.
- **CaCl₂-Titration:** 10.92 mg βGalOMe ($n = 5.62 \cdot 10^{-5}$ mol, $c = 56.2$ mM) werden in 1.0 mL MeOH d3:d4 = 1:1 (v/v) gelöst. Aluminiumoxid N Super I (ohne Vorbehandlung) zugesetzt, wiederum die Probe bei RT über Nacht stehen lassen und am nächsten Tag über einen 0.2 µm Filter abfiltriert.
- **CaCl₂-gesättigt (inkl. Temperaturmessung):** 17.94 mg βGalOMe ($n = 9.24 \cdot 10^{-5}$ mol, $c = 115.5$ mM) werden in 0.8 mL MeOH d3:d4 = 1:1 (v/v) gelöst, Aluminiumoxid N Super I (ohne Vorbehandlung) zugesetzt, wiederum eine Nacht bei RT aufbewahrt und schliesslich abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Für die Sättigung mit CaCl₂ waren insgesamt 142.52 mg CaCl₂ ($n = 1.28 \cdot 10^{-3}$ mol, = 139 eq) vonnöten.

2.1.1 Auswertung der Titration mit CaCl₂ – Scatchardplot

Titrationauswertung mit Scatchardplot

Δmax=	612,4			βGalOMe(ges) [mol]=	5,62E-05
Δ(ges) (3OH) [Hz]	CaCl ₂ (ges) [mg]	CaCl ₂ (ges) [mol]	CaCl ₂ (frei) [mol]	V(ges) [µl]	
58,2	1,26	1,13534E-05	6,00858E-06	513	
134,9	3,14	2,82934E-05	1,59048E-05	532,5	
233,8	6,24	5,62263E-05	3,47552E-05	564,5	
359,4	12,48	0,000112453	7,94471E-05	629	
469,2	25,04	0,000225626	0,000182537	759	
534,8	43,42	0,000391242	0,000342128	949	
612,4	92,59	0,000834294	0,000778054	949	

$$\text{CaCl}_2(\text{frei}) = \text{CaCl}_2(\text{ges}) - \beta\text{GalOMe}(\text{ges}) \cdot v$$

(= Komplex C)

Komplex C =				
[CaCl ₂ (frei)] [mol/l]	v=Δ/Δmax	βGalOMe(ges)*v [mol]	v/[CaCl ₂ (frei)]	eq CaCl ₂
0,011712625	0,095035924	5,34482E-06	8,113973098	0,2
0,029868151	0,220280862	1,23886E-05	7,375108717	0,5
0,061568167	0,381776617	2,14711E-05	6,200876789	1
0,126306917	0,586871326	3,30056E-05	4,646391027	1,9
0,240496796	0,766165905	4,30892E-05	3,185763453	3,9
0,360514323	0,873285434	4,91136E-05	2,422332149	6,7
0,819867721	1	0,00005624	1,219708953	14,3

x-Achse

y-Achse

$$\text{Scatchard-Plot: } v/[\text{CaCl}_2(\text{frei})] = 1/K_D - (1/K_D) \cdot v$$

Abb. 1. Tabelle mit allen für die Auswertung mittels Scatchardplot nötigen experimentellen Daten.

2.2 α / β -D-Glucopyranosid

Verwendete Proben:

- **^1H Spektren und 2D NOESY:** 15.1 mg α/β -Glc ($n = 8.4 \cdot 10^{-5}$ mol, $c = 83.8$ mM) in 1.0 mL MeOH $d_3:d_4 = 1:1$ (v/v) lösen und Aluminiumoxid (N, Super I), welches zuvor im Trockenschrank bei ca. 220 °C ausgeheizt wurde, noch heiss zur Lösung im NMR Röhrchen zugeben. Das feine Aluminiumoxidpulver verbleibt als Bodensatz während der Messungen im NMR Röhrchen.
- **2D DQFCOSY:** 23.4 mg α/β -Glc ($n = 1.3 \cdot 10^{-4}$ mol, $c = 129.9$ mM) in 1.0 mL MeOH $d_3:d_4 = 1:1$ (v/v) lösen, Aluminiumoxid (N, Super I) (im Trockenschrank ausgeheizt) noch warm zugeben und die Probe über Nacht bei RT stehen lassen. Am nächsten Tag abzentrifugieren und den Überstand abpipettieren.

3. Saccharose in methanolischer Lösung

Verwendete Proben:

- **+ 4 eq CaCl_2 :** 7.87 mg **Saccharose** ($n = 2.3 \cdot 10^{-5}$ mol, $c = 23.0$ mM) in 1.0 mL MeOH $d_3:d_4 = 1:1$ (v/v) suspendieren und mit 10.62 mg CaCl_2 ($n = 9.6 \cdot 10^{-5}$ mol, = 4 eq) in Lösung bringen. Aluminiumoxid N Super I (im Trockenschrank ausgeheizt) noch heiss zugeben und über Nacht bei RT stehen lassen. Schliesslich abzentrifugieren und den Überstand abpipettieren.
- **Temperaturreihe und 2D ROESY (CaCl_2 -gesättigt):** 12.19 mg **Saccharose** ($n = 3.6 \cdot 10^{-5}$ mol, $c = 35.6$ mM) in 1.0 mL MeOH $d_3:d_4 = 1:1$ (v/v) suspendieren und mit 41.64 mg CaCl_2 ($n = 3.75 \cdot 10^{-4}$ mol, = 10.5 eq) in Lösung bringen. Das weitere Vorgehen ist wie bei der zuvor beschriebenen Probe. Um die Lösung mit CaCl_2 zu sättigen, müssen insgesamt 201.84 mg CaCl_2 ($n = 1.8 \cdot 10^{-3}$ mol, = 50.5 eq) zugegeben werden. Dies erfolgt wie unter 1.3 beschrieben.
- **^{13}C , 2D DQFCOSY und 2D NOESY (CaCl_2 -gesättigt):** 15.46 mg **Saccharose** ($n = 4.5 \cdot 10^{-5}$ mol, $c = 45.2$ mM) in 1.0 mL MeOH $d_3:d_4 = 1:1$ (v/v) suspendieren und mit 30.65 mg CaCl_2 ($n = 2.8 \cdot 10^{-4}$ mol, = 6 eq) in Lösung bringen. Diese Probe wurde **nicht** mit Aluminiumoxid behandelt, sondern nur bis zur Sättigung CaCl_2 zugegeben. Insgesamt waren 172.62 mg CaCl_2 ($n = 1.55 \cdot 10^{-3}$ mol, = 34.4 eq) nötig.

3.1 Saccharose + 4 eq CaCl₂

3.1.1 Temperaturreihe zwischen 280 und 310 K

T [K]	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]							
	1aOH	3aOH	4aOH	6aOH	2bOH	3bOH	4bOH	6bOH
280	0	0	0	0	0	0	0	0
283	-12.5	-19.1	-14.5	-8.3	-12.5	-19.1	-16.0	-13.4
286	-23.5	-38.6	-29.2	-18.8	-25.0	-38.2	-32.4	-27.2
289	-35.3	-57.7	-43.7	-29.2	-38.2	-49.3	-48.4	-41.0
292	-47.8	-77.4	-58.4	-40.4	-50.9	-68.8	-64.6	-55.5
295	-60.7	-96.3	-72.9	-51.4	-64.5	-87.6	-80.4	-70.4
298	-73.4	-115.4	-87.6	-63.2	-77.7	-107.1	-96.4	-
301	-86.8	-134.3	-102.1	-74.6	-92.0	-126.2	-112.2	-100.7
304	-100.8	-153.4	-116.6	-87.1	-106.3	-145.5	-128.2	-116.3
307	-114.4	-172.7	-131.3	-99.4	-120.1	-163.9	-143.1	-131.9
310	-128.0	-	-145.1	-112.1	-134.4	-172.1	-	-148.1

Tab. 1. Chemische Verschiebungen [Hz] der OH Protonen von **Saccharose** in Abhängigkeit von der Temperatur (600 MHz).

3.2 Saccharose in CaCl₂-gesättigter, methanolischer Lösung

3.2.1 Temperaturreihe zwischen 285 und 305 K

T [K]	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]					
	1aOH	3aOH/6bOH	4aOH	2bOH	3bOH/6aOH	4bOH
285	0	0	0	0	0	0
290	-16	-24	-13	-23	-19	-15
295	-31	-49	-25	-46	-38	-29
300	-49	-74	-39	-71	-59	-47
305	-67	-98	-51	-93	-79	-62

Tab. 2. Verschiebungen [Hz] der OH Protonen von **Saccharose** in Abhängigkeit von der Temperatur (MeOH 1:1, CaCl₂-gesättigt, 600 MHz).

4. BicOMe – ein Thiazolidinlactam – in Methanol 1:1

Verwendete Probe:

- **für alle Messungen:** 10.03 mg **BicOMe** ($n = 3.4 \cdot 10^{-5}$ mol, $c = 34.2$ mM) in 1.0 mL MeOH d3:d4 = 1:1 (v/v) lösen, Aluminiumoxid N Super I (ohne Vorbehandlung) zusetzen, über Nacht bei RT stehen lassen und schliesslich über einen 0.45 μm Filter abfiltrieren.

Um die Lösung mit CaCl_2 zu sättigen, waren 183.02 mg CaCl_2 ($n = 1.65 \cdot 10^{-3}$ mol, = 48.5 eq) nötig.

KAPITEL II: Ca²⁺ induzierte Wechselwirkungen zwischen Lewis Analoga. Analyse der 3D-Struktur

1. Le^X Mono

1.1 in MeOH_{d4}

10 mg **Le^X Mono** (M = 543.5 g/mol, n = 1.840*10⁻⁵ mol, c = 26.3 mM) werden in 0.7 mL MeOH_{d4} gelöst.

Übersicht über alle ermittelten ROEs:

ROE	Abstand [Å]	ROE	Abstand [Å]
H1b – NHAc	3.1	H4b – H5b	2.2
H5b – H6b	2.4	H3b – H5b	2.2
H4b – H6b	2.7	H1a – H2a	≅ 2.4
H2c – H6b	2.6	H1a – OMe	2.45
H1b – H1a	2.45	H1c – H5c	2.2
H1b – H2a	2.9	H1c – H5a	2.8
H1b – H3a	2.35	H1c – H6at	2.25
H1b – H4a/H6a ^h	2.3	H1c – H4a/H6a ^h	2.6
H1b – H2b	2.5	H3c – H4c	2.5
H2c – H5b	2.3	H4c – H5c	2.2

Tab. 1. Alle für **Le^X Mono** in MeOH_{d4} ermittelten Protonenabstände aus der Integration der entsprechenden ROESY Kreuzsignale.

1.2 in MeOH_{d3}:MeOH_{d4} 1:1 (v/v)

10 mg **Le^X Mono** (n = 1.840*10⁻⁵ mol, c = 18.4 mM) werden in 1.0 mL MeOH_{d3}:MeOH_{d4} = 1:1 (v/v) gelöst, neutrales Aluminiumoxid (Super I) zugesetzt und nach ca. 12 h über einen 0.2 µm Filter abfiltriert.

1.2.1 Titration mit CaCl_2

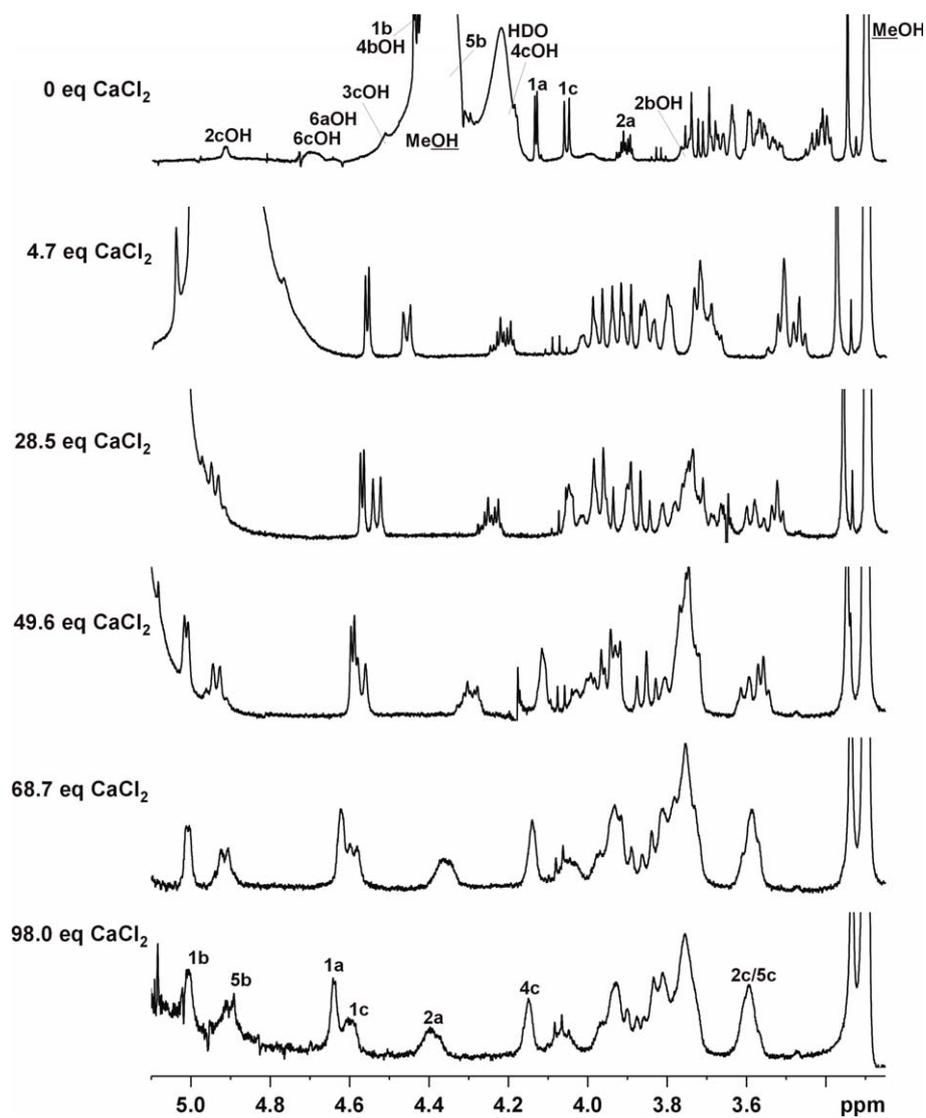


Abb. 1. ^1H Ausschnitte von Le^{X} Mono in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$ mit unterschiedlichen Mengen CaCl_2 (400 MHz, 294 K).

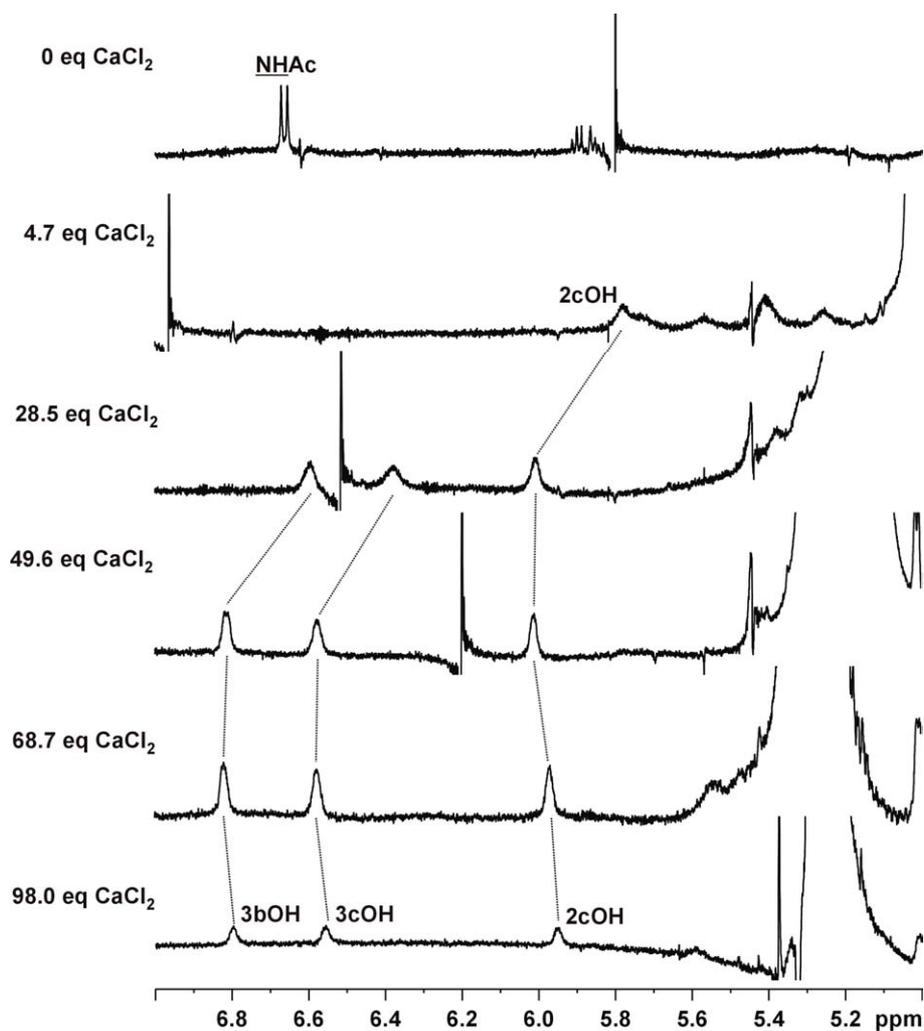


Abb. 2. ^1H Spektren des OH-Bereichs von Le^{X} Mono in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$ im Verlauf der CaCl_2 Titration (400 MHz, 294 K).

1.3 in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$ 1:1, CaCl_2 -gesättigt

Die in 1.2 beschriebene Probe wird mit insgesamt 98 eq CaCl_2 versetzt (unter Erwärmen, ca. 40°C) und schliesslich wie im experimentellen Teil zu Kapitel I das überschüssige CaCl_2 auskristallisiert.

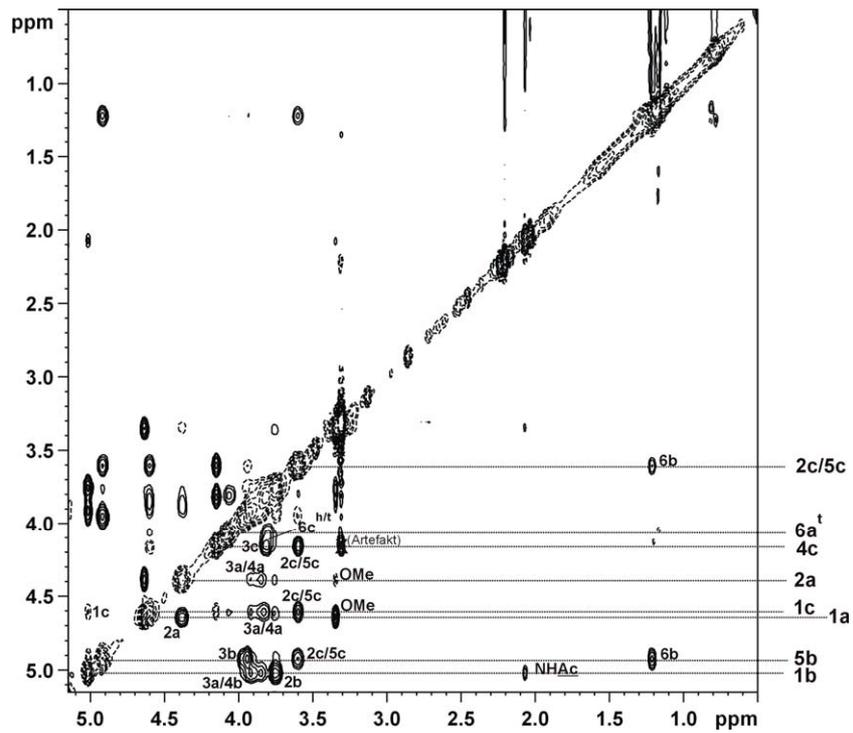


Abb. 3. ROESY Ausschnitt des Alkylbereichs von **Le^X Mono** in MeOH_{d3}:MeOH_{d4}, CaCl₂-gesättigt (400 MHz, 294 K).

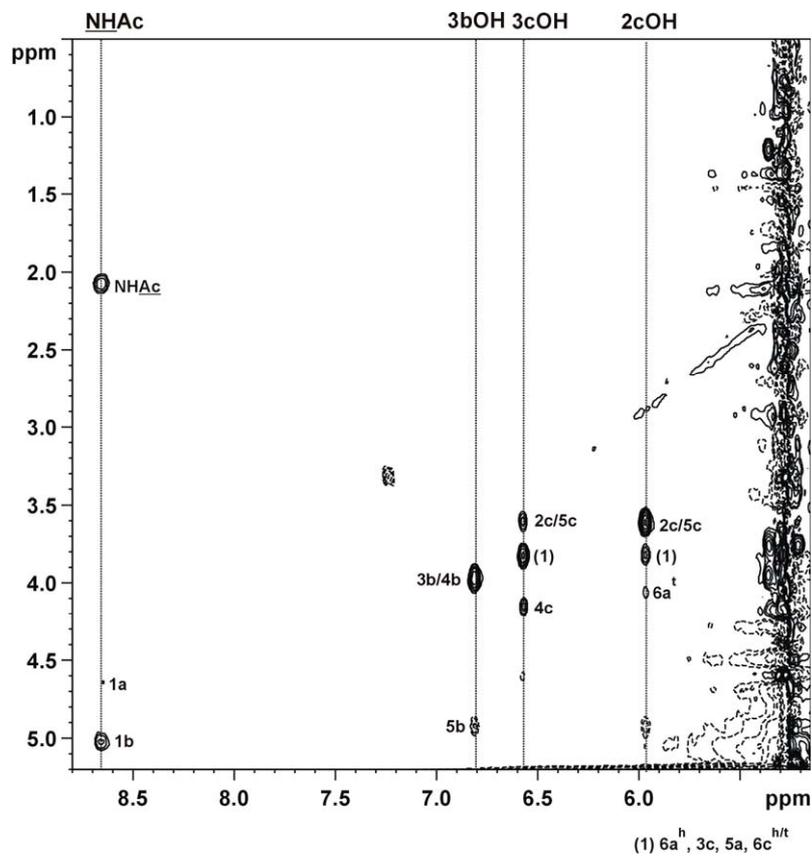


Abb. 4. ROESY Ausschnitt des NH-/OH-Bereichs von **Le^X Mono** (Probenbedingungen wie in Abb. 3).

2. Le^X Dimer (CH₂-Brücke)

2.1 in MeOH_{d3}:MeOH_{d4} 1:1 (v/v) + 22 eq CaCl₂

ca. 20 mg Le^X Dimer (M = 1099.1 g/mol, n ~ 1.8*10⁻⁵ mol, c ~ 18 mM) und 44.8 mg CaCl₂ (~ 22 eq) werden in 1.0 mL MeOH_{d3}:MeOH_{d4} 1:1 (v/v) gelöst, mit neutralem Aluminiumoxid (Super I) versetzt, nach ca. 12 h zentrifugiert und die Lösung abpipetiert.

Alle aus der Integration der ROESY Kreuzsignale erhaltenen Protonenabstände:

ROE	Abstand [Å]	ROE	Abstand [Å]
H1a – H2a	2.4	NH – H1b	
CH2 – H6a ^t	3.0	NH – H1a	
H1a – H2c	3.2	NH – H2a	
H1a – OMe	2.4	NH – Ac	
H1c – H5c	≅ 2.3	3bOH – H3b	nur qualitativ
H1c – H2c	3.0	4cOH – H4c	
H2a – H2c	2.7	2cOH – H2c	
H1c – H3c	2.5	4bOH – H4b	
H1c – H6a ^t	3.3	6cOH – H6c ⁿ /H6c ^t	
H3c – H5c	2.75	2bOH - Ac	
H5b – H6b	2.3		
H1a – H6b	3.1		
H4b – H6b	2.85		
H2c – H6b	2.8		

Tab. 2. Für Le^X Dimer in MeOH_{d3}:MeOH_{d4} + 22 eq CaCl₂ ermittelte Protonenabstände.

2.2 CaCl₂-Titration in MeOH_{d3}

7.8 mg Le^X Dimer (n = 7.097*10⁻⁶ mol, c = 14.2 mM) werden in 0.5 mL MeOH_{d3} gelöst und schrittweise CaCl₂ als Lösung in MeOH_{d3} (40.5 mg in 0.2 mL, c = 1.82 M) zugegeben.

2.3 in MeOH_{d3}:MeOH_{d4} 1:1, CaCl₂-gesättigt

Der unter 2.1 beschriebenen Probe werden in der Wärme (ca. 40 °C) insgesamt etwa 114 eq CaCl₂ zugesetzt und der Überschuss, wie im experimentellen Teil von Kapitel I beschrieben, auskristallisiert.

2.3.1 Temperaturreihe von 285 – 310 K

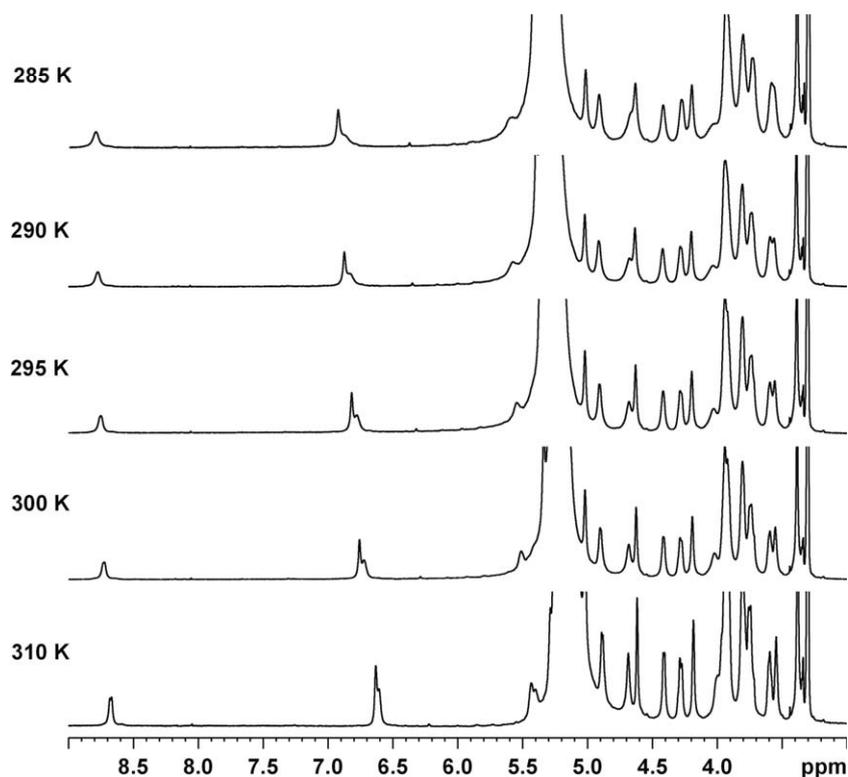


Abb. 5. ^1H Ausschnitte von **Le^X Dimer** in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$, CaCl_2 -gesättigt bei verschiedenen Temperaturen (600 MHz).

3. Le^X Glycopeptid

3.1 in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ + 30 eq CaCl_2

7.1 mg **Le^X Glypep** ($M = 1597.5 \text{ g/mol}$, $n = 4.44 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$, $c = 5.6 \text{ mM}$) werden unter Zugabe von 30 eq CaCl_2 in 0.8 mL $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ gelöst.

Übersicht über alle aus der Integration der ROE Kreuzsignale ermittelten Protonenabstände:

ROE	Abstand [Å]	ROE	Abstand [Å]
H4b – H5b	2.4	H1c – H3c/H5c	2.1
H3b – H5b	$\cong 2.55$	H1c – H6a ^{h/t} /H4a	2.2
H2c – H5b	2.8	H5b – H6b	2.6
H1a/H1b – H2b	2.3	H4b – H6b	3.1
H1a/H1b – H5a	3.5	H2c – H6b	3.2
H1a/H1b – H3a	2.5	H1a/H1b - <u>NHAc</u>	3.3

Tab. 3. Alle für **Le^X Glypep** in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ + 30 eq CaCl_2 ermittelten Protonenabstände.

3.2 in D₂O, ohne CaCl₂-Zusatz

8.55 mg **Le^x Glypep** ($n = 5.35 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 7.6$ mM) werden in 0.7 mL D₂O gelöst und TSP zur Eichung zugesetzt.

Übersicht über alle ermittelten Protonenabstände:

ROE	Abstand [Å]	ROE	Abstand [Å]
H1a/H1b – H2a	3.1	H1c – H6a [†]	2.4
H1a/H1b – H3a	2.6	H1c – H3c	2.6
H1a/H1b – H3b	3.5	H1c – H5c	2.45
H1a/H1b – H2b	2.5	H1c – H2c	3.3
H1a/H1b – H5a	2.6	H5b – H6b	2.6
H2c – H5b	2.7	H4b – H6b	3.0
H4b – H5b	2.5	H2c – H6b	3.0
H3b – H5b	≅ 2.55	H1a/H1b – <u>NHAc</u>	3.3
H3a – H5b	3.2	H1c – H4a	2.6
H1c – H2a	3.4		

Tab. 4. Für **Le^x Glypep** in D₂O, ohne CaCl₂ ermittelte Protonenabstände aus der Integration der ROESY Kreuzsignale.

3.3 Titration mit CaCl₂ in D₂O

9.90 mg **Le^x Glypep** ($n = 6.20 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 8.9$ mM) werden in 0.7 mL D₂O gelöst und TSP zur Eichung zugesetzt.

Die Titration erfolgt für kleine Mengen CaCl₂ mit einer CaCl₂/D₂O-Lösung, die letzten Schritte der Titration durch Zusatz von CaCl₂(s).

4. Bestimmung der Winkel zwischen Lewis^x Einheiten

Die dem Excel Arbeitsblatt zugrunde liegenden Formeln sind im Hauptteil zusammengefasst.

Bestimmung des Winkels zwischen den beiden GlcNAc-Einheiten definiert durch: Ring-O-GlcNAc, 2C-GlcNAc, 4C-GlcNAc			
Ring-O	2C	4C	
1,1304	0,101438	0,203931	4,4757895 Determ. A1
0,367731	-0,266737	-1,83132	1,7434513 Determ. B1
3,10397	5,19317	3,29069	1,674925 Determ. C1
0,184753	0,814585	-0,822329	3,8010512 Determ. A2
3,20452	5,17569	3,55959	2,5994686 Determ. B2
-1,00068	0,235292	1,15028	2,2087643 Determ. C2
cos (phi) = 0,9716593			hiervon der Betrag ergibt: 0,971659349
			zugehöriger Winkel phi = <u>13,673</u>

aus Datenfile: lexDimer_mitCa_Ion_MD10x10_291204 \013.hin

Bestimmung des Winkels zwischen den Vektoren von Ring-O-GlcNAc --> 4C-Fuc zwischen den beiden Lewis x Einheiten			
O-GlcNAc	4C-Fuc	zugehöriger Vektor	
1,1304	-1,81704	-2,94744	x
0,367731	-5,79298	-6,160711	y
3,10397	6,2206	3,11663	z
0,184753	-1,07134	-1,256093	
3,20452	6,28604	3,08152	Vektor b
-1,00068	5,75695	6,75763	
Skalarprodukt der beiden Vektoren a und b :		<u>5,778936978</u>	
Betrag von Vektor a:		<u>7,507006403</u>	
Betrag von Vektor b:		<u>7,532535984</u>	
Cosinus des Winkels zwischen Vektor a und Vektor b:		0,102197426	
Winkel in Grad:		<u>84,134278</u>	

Abb. 6. Excel-Worksheet zur Bestimmung des Winkels zwischen den beiden GlcNAc Flächen (oben) und des Winkels zwischen den Vektoren definiert durch Ring-O (GlcNAc) – 4C (Fuc) (unten).

KAPITEL III: Oligosaccharide aus dem Cyanobakterium *Nostoc*. Identifizierung und Strukturanalyse

1. Allgemeines

Für die Identifizierung und Strukturanalyse der untersuchten Oligosaccharide wurden für alle Verbindungen 2D DQFCOSY, TOCSY, HMQC und ROESY Spektren für alle Verbindungen aufgenommen. 2D HMBC (ohne Filter) konnten aufgrund der relativ geringen Mengen nur für das Trisaccharid **Z34** und das Tetrasaccharid **HZ34** aufgenommen werden. Soweit nicht ausdrücklich anders angegeben wurden die Messungen bei 300 K und einer Protonenfrequenz von 600.13 MHz durchgeführt.

Um die Oligosaccharide nach erfolgter Messung wieder rückgewinnen zu können, wurde als Eichsubstanz Aceton zugegeben, da dieses leicht und vollständig wieder entfernt werden kann.

Daher sind alle Spektren sowohl im Protonen- als auch im Kohlenstoffbereich auf Aceton geeicht ($\delta_{1H} = 2.22$ ppm, $\delta_{13C} = 30.89$ ppm (CH₃)).

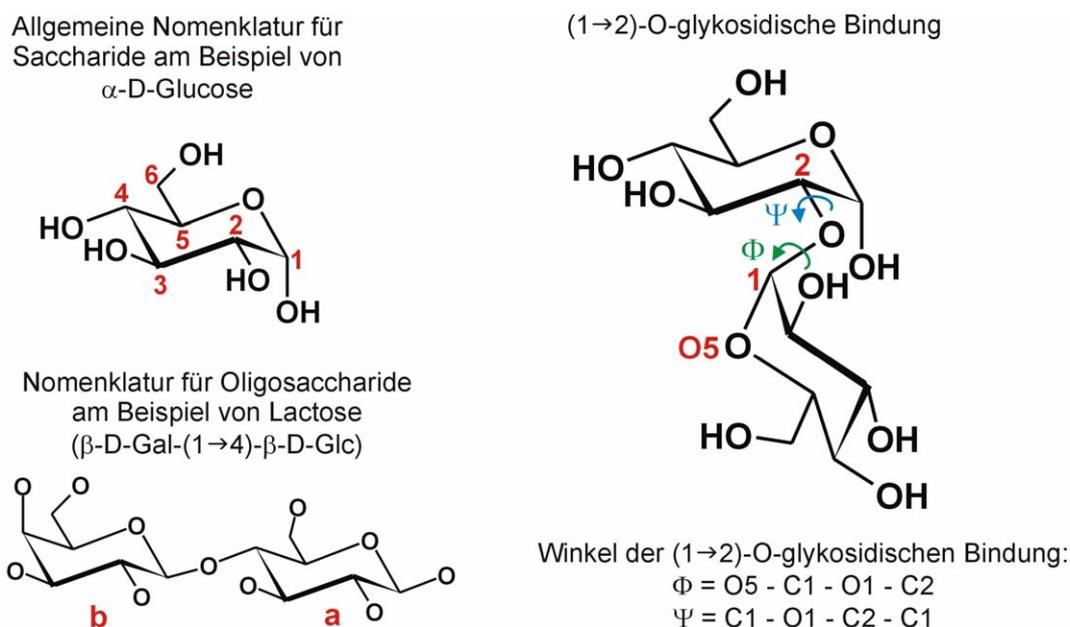


Abb. 1. Allgemeine Nomenklatur für Saccharide und Definition der für die O-glykosidische Bindung charakteristischen Winkel Φ und Ψ .

2. Das Trisaccharid **Z34**

2.1 In D₂O

Ca. 3 mg ($n = 5.95 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 8.5$ mM) **Z34** (lyophyllisiert) wurden in 0.7 mL D₂O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

2.2 In MeOH

2.8 mg ($n = 5.55 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 4.6$ mM) **Z34** wurden in 1.2 mL MeOH ($d_3:d_4 = 1:1$) unter Zugabe von etwas CaCl_2 in Lösung gebracht. Anschliessen wurde, wie in Kapitel I beschrieben, die methanolische Lösung „getrocknet“ und von Säurespuren befreit.

2.2.1 Z34 in MeOH, CaCl_2 -gesättigt

Die obige Lösung wurde in der Wärme (ca. 40°C , Ultraschallbad) solange mit CaCl_2 versetzt (ca. 200 mg), bis dieses nur noch sehr schwer in Lösung ging. Anschliessend liess man die Probe auf dem Kopf stehend zuerst bei RT, schliesslich im Kühlschrank abkühlen. Hierbei kristallisierte überschüssiges CaCl_2 aus, welches beim Umdrehen des NMR-Röhrchens als fester Kristallbrei am oberen Rand haften blieb. Dadurch erreicht man eine an CaCl_2 gesättigte Lösung, wobei der vorhandene Kristallbrei ausserhalb des Messfensters bleibt.

Dies entspricht einer ca. 1.5 M methanolischen CaCl_2 -Lösung.

3. Das Tetrasaccharid HZ34

3.1 In D_2O

Ca. 2 mg ($n = 3.00 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 4.3$ mM) **HZ34** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D_2O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

3.2 In DMSO_{d_6}

Ca. 1 mg ($n = 1.50 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 2.1$ mM) **HZ34** (lyophilisiert) wurde in 0.7 mL DMSO_{d_6} gelöst.

4. Das Pentasaccharid HHZ34 in D_2O

Ca. 0.5 mg ($n = 6.03 \cdot 10^{-7}$ mol, $c = 0.86$ mM) **HHZ34** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D_2O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

4.1 α - und β -defructosyliertes Pentasaccharid in D_2O

Das in wässriger Lösung vorgelegte Pentasaccharid (aufgereinigt wie im Allgemeinen Teil in Kapitel 1.2 gezeigt) wurde mit TFA (0.1 M Endkonzentration) versetzt und 5 min auf 80°C erwärmt. Um die Hydrolyse zu stoppen, wurde die Probe anschliessend auf Eis gegeben, MeOH zugesetzt und mit N_2 abgeblasen. Dieser Vor-

gang wurde mehrmals wiederholt, bis die Lösung neutral war. Die Aufreinigung des Hydrolysats erfolgte über eine Gelfiltrationssäule.

Es ergab sich ein Gemisch aus unhydrolysiertem Pentasaccharid (~ 25%), defructosyliertem Pentasaccharid in α -Konfiguration (~ 33%) und defructosyliertem Pentasaccharid in β -Konfiguration (~ 42%). Bei den beiden letztgenannten Zuckern handelt es sich daher jetzt genaugenommen um Tetrasaccharide. Eine Hydrolyse α -(1 \rightarrow 2) glykosidischen Bindungen zwischen den Glucoseeinheiten wurde nicht beobachtet.

4.2 Vergleich ^{13}C -Verschiebungen von HHZ34 und Maltopentaose in D_2O

Atom	1 \rightarrow 4 Verknüpfung	1 \rightarrow 2 Verknüpfung	Atom
	$\delta^{13}\text{C}$ für Maltopentaose [Lit]	$\delta^{13}\text{C}$ für HHZ34	
1a (α)	92.9	91.9	1b
2a (α)	72.3	82.1	2b
3a (α)	74.1	72.7	3b
4a (α)	78.6	70.0	4b
5a (α)	71.0	72.7	5b
6a (α)	61.6	60.8	6b
<hr/>			
1a (β)	96.8	-	-
2a (β)	75.0	-	-
3a (β)	77.1	-	-
4a (β)	78.4	-	-
5a (β)	75.6	-	-
6a (β)	61.8	-	-
<hr/>			
1b	100.6	100.2	1c
2b	72.6	81.4	2c
3b	74.2	72.6	3c
4b	78.4	70.5	4c
5b	72.3	72.7	5c
6b	61.6	60.8	6c
<hr/>			
1c	100.6	98.9	1d
2c	72.6	78.5	2d
3c	74.2	72.0	3d
4c	78.4	70.0	4d
5c	72.3	72.5	5d
6c	61.6	61.1	6d
<hr/>			
1d	100.8	99.0	1e
2d	72.8	71.9	2e ← Freie OH-Gruppe
3d	73.9	73.2	3e
Freie OH-Gruppe → 4d	70.5	70.0	4e
5d	73.7	72.5	5e
6d	61.6	n.d.	6e

Tab. 2. Vergleich der ^{13}C -Verschiebungen von **HHZ34** und Maltopentaose* in D_2O (300 K, 600 MHz). Rot umrandet die, an der O-glykosidischen Bindung beteiligten, Kohlenstoffe: für Maltose 1 \rightarrow 4, für **HHZ34** 1 \rightarrow 2 Verknüpfung.

* Daten aus der Datenbank Sugabase: <http://www.boc.chem.uu.nl/sugabase/sugabase.html>

5. Das Hexasaccharid in D₂O

1 mg ($n = 1.01 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.4$ mM) **Hexa** (lyophyllisiert) wurde in 0.7 mL D₂O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

5.1 Temperaturreihe 280 – 310 K

Atom	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]					
	285 K	290 K	295 K	300 K	305 K	310 K
H1b	-1.5	-2.8	-4.1	-5.1	-5.9	-6.9
H1c	-5.3	-10.4	-15.3	-19.6	-23.8	-28.0
H1d	+2.6	+5.3	+7.7	+10.4	+12.7	+14.8
H1e	+0.3	+0.5	+1.0	+1.8	+2.5	+3.3
H1f	-0.7	-1.0	-1.6	-1.8	-2.1	-2.3
H3a	-0.8	-1.5	-2.1	-2.5	-2.8	-3.1

Tab. 1. Ausgewählte chemische Verschiebungen des Hexasaccharids bei verschiedenen Temperaturen (D₂O, 600 MHz).

6. Das Oktasaccharid in D₂O

1.9 mg ($n = 1.46 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 2.1$ mM) **Okta** (lyophyllisiert) wurden in 0.7 mL D₂O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

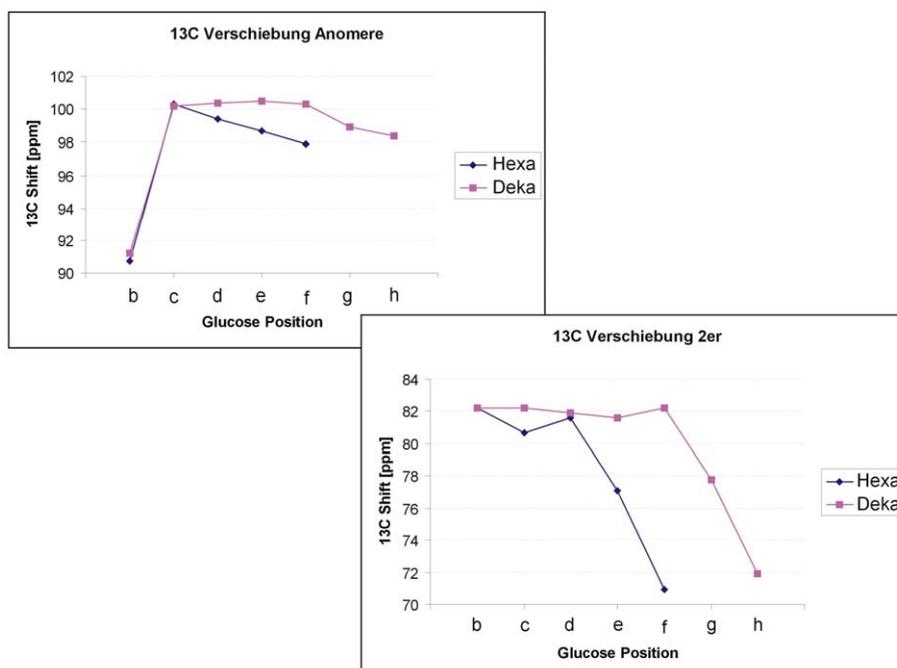


Abb. 2. Graphische Darstellung der ¹³C Verschiebungen für die Anomeren und die Position 2 in den Glucosen von **Hexa** und **Okta** im Vergleich.

6.1 Zugabe von CaCl_2 zu Okta

0.6 mg ($n = 4.56 \cdot 10^{-7}$ mol, $c = 0.65$ mM) **Okta** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D_2O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt. Zusätzlich wurden 13.41 mg CaCl_2 ($1.21 \cdot 10^{-4}$ mol, = 265 eq) (Perlen, wasserfrei) zugegeben.

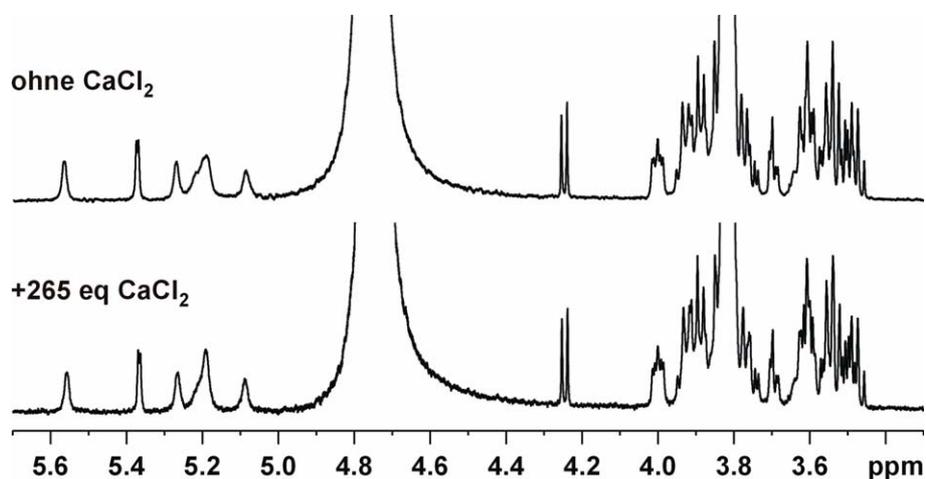


Abb. 3. Zugabe von CaCl_2 zu **Okta** in D_2O – ^1H Spektrum (600 MHz, 300 K, D_2O). Keinerlei Veränderungen durch die CaCl_2 -Zugabe feststellbar.

6.2 Temperaturreihe in DMSO_{d6}

1.3 mg ($n = 1.0 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.4$ mM) **Okta** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL DMSO_{d6} gelöst.

Obwohl in D_2O lyophilisiert wurde, haben die OH-Protonen noch nicht vollständig mit Deuterium ausgetauscht, so dass Signale für die OH-Protonen die Anomerensignale teilweise überlagern.

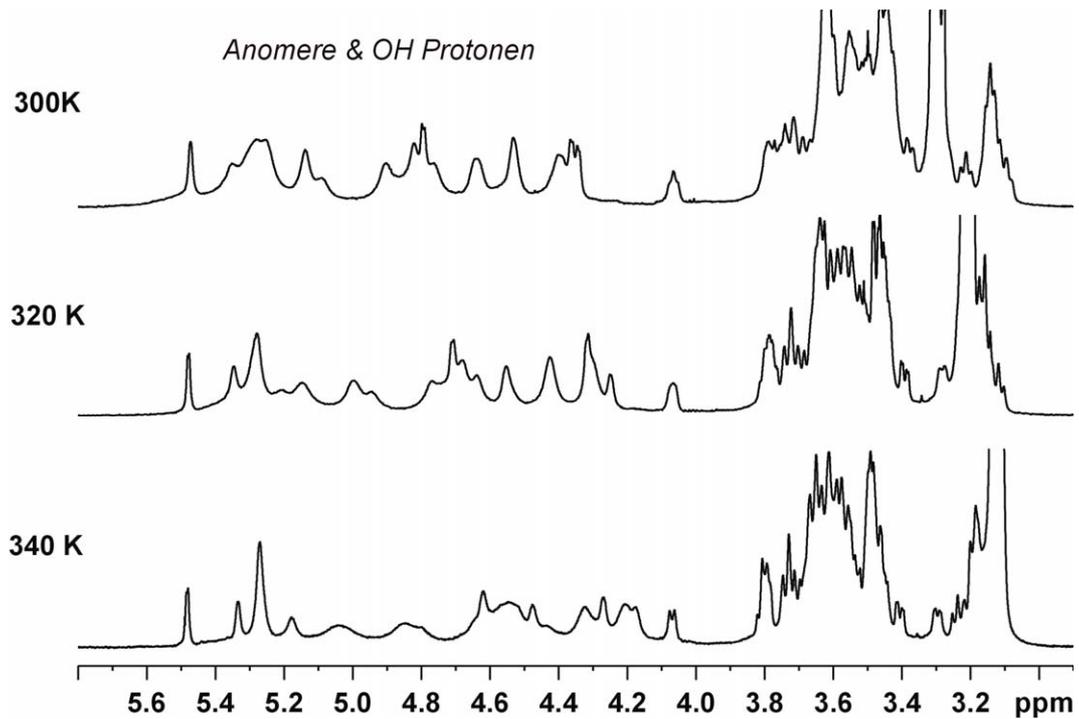


Abb. 4. Okta in DMSO-d_6 – ^1H Spektrum bei verschiedenen Temperaturen (600 MHz). Die OH Protonen haben noch nicht vollständig mit Deuterium ausgetauscht und sind daher noch vorhanden.

7. Das Dekasaccharid in D_2O

5.5 mg ($n = 3.35 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 4.8$ mM) **Deka** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D_2O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

7.1 In Kryomischung $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$ (4:1 (v/v))

5.5 mg ($n = 3.35 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 4.8$ mM) **Deka** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$ (4:1 (v/v)) gelöst.

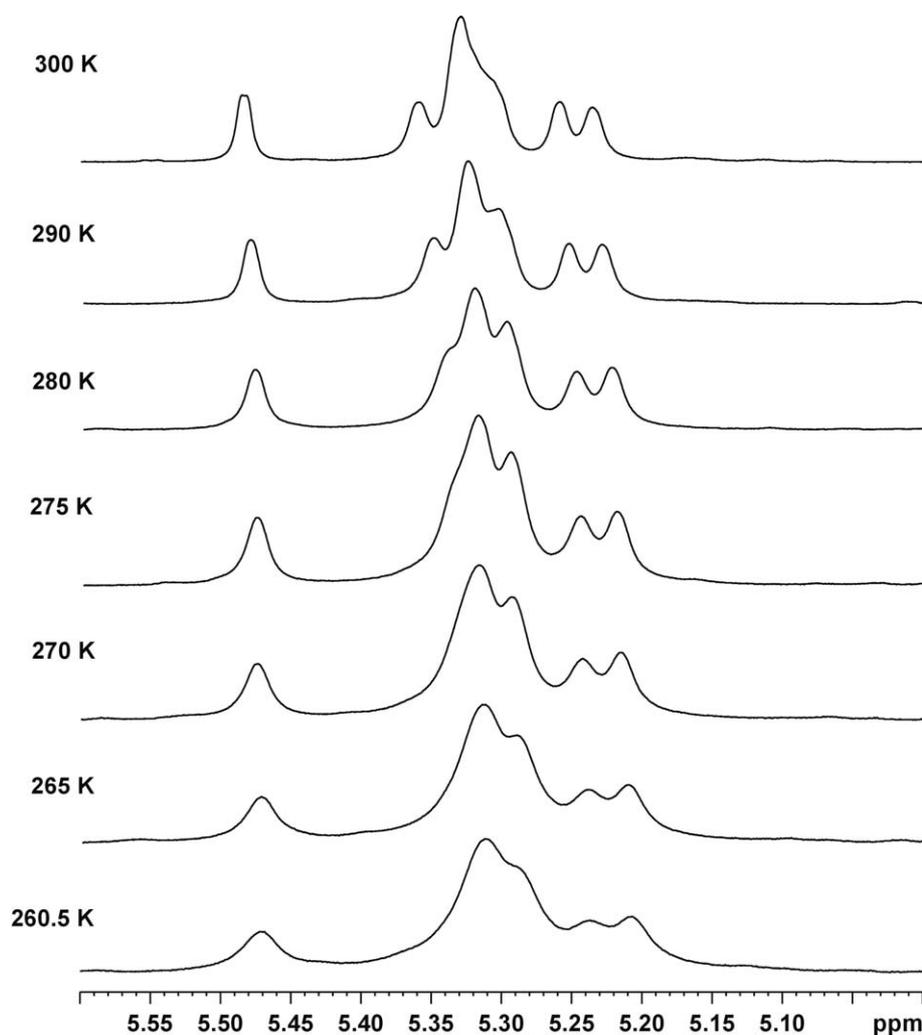


Abb. 5. ^1H Anomerenbereich von **Deka** in $\text{DMSO}_{d6}:\text{D}_2\text{O}$ (4:1) bei verschiedenen Temperaturen (600 MHz).

7.2 Defructosyliertes Deka in D_2O

6.03 mg ($n = 3.35 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 4.8$ mM) **defruct-Deka** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D_2O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

Es handelt sich um eine Mischung aus α -**defruct-Deka**, β -**defruct-Deka** und nicht defructosyliertes **Deka**.

8. Untersuchungen zur Membranaffinität von Hexa und Deka

8.1 Messungen in SDS_{d25} Micellen in D_2O

2.04 mg ($n = 2.06 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 2.9$ mM) **Hexa** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL $\text{SDS}_{d25}/\text{D}_2\text{O}$ Lösung ($c = 25.8$ mg SDS_{d25} / mL D_2O) gelöst.

4.84 mg ($n = 2.95 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 4.2$ mM) **Deka** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL $\text{SDS}_{d25}/\text{D}_2\text{O}$ Lösung ($c = 28.7$ mg SDS_{d25} / mL D_2O) gelöst.

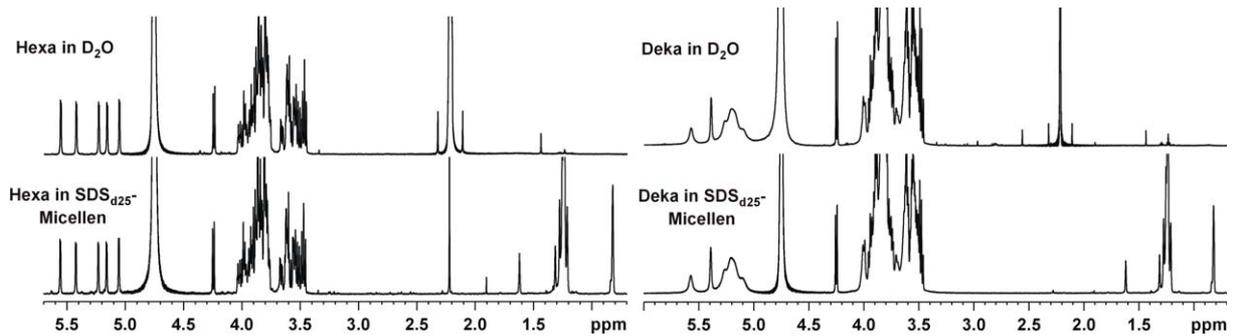


Abb. 6. Vergleich von ^1H Spektren in D_2O und in $\text{SDS}_{\text{d}25^-}$ -Lösung von **Hexa** und **Deka** (600 MHz, 300 K). Es zeigen sich keinerlei Unterschiede in Signalverschiebung oder –breite.

8.2 Deka in DMPC Liposomen in D_2O

2.64 mg ($n = 1.61 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 2.3$ mM) **Deka** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL DMPC/ D_2O Lösung ($c = 5$ mg DMPC / mL D_2O) gelöst.

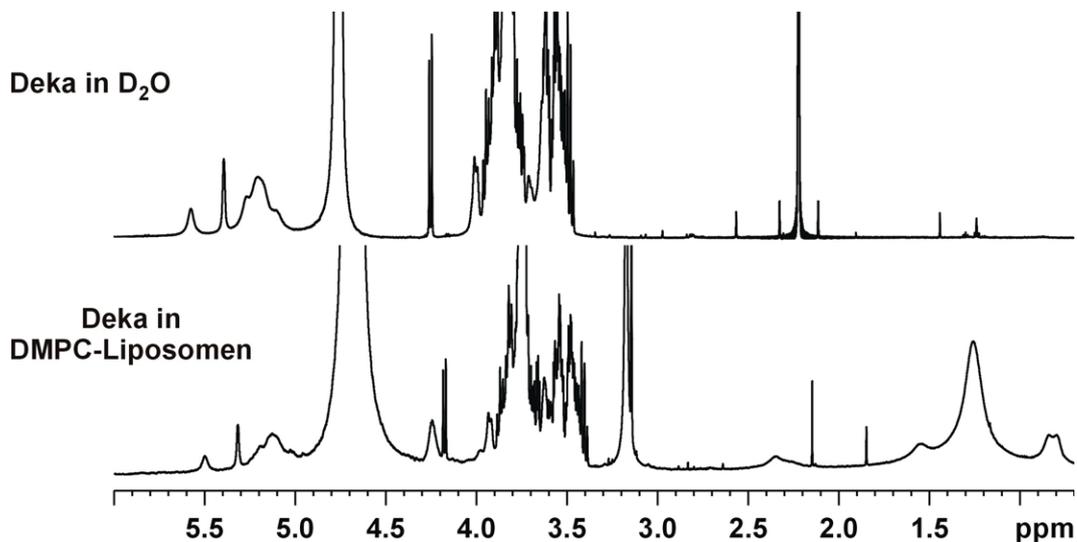


Abb. 7. ^1H Spektren für **Deka** in D_2O bzw. in DMPC Liposomenlösung (600 MHz, 300 K, D_2O). Es sind keine Veränderungen der Deka-Signale feststellbar.

8.3 Deka und Hexa in DMPC/DHPC Bicellen

Zu einer Bicellenlösung ($q = 3.02$, $c = 5\%$, 3.3% CTAB, 700 μL Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) in D_2O) wurden 4.18 mg ($n = 4.22 \cdot 10^{-6}$ mol) **Hexa** zugegeben.

Analog wurde **Deka** (9.48 mg, $n = 5.78 \cdot 10^{-6}$ mol) zu einer Bicellenlösung ($q = 3.0$, $c = 5\%$, 3.7% CTAB, 700 μL Phosphatpuffer (50 mM, pH 7) in D_2O) zugesetzt.

Das molare Verhältnis von gelöster Substanz zu DMPC beträgt:

- für **Hexa** = 0.09
- für **Deka** = 0.12

Die Messungen in isotroper Lösung erfolgten bei 298 K (**Hexa**) bzw. 300 K (**Deka**), in flüssig-kristalliner Phase bei 308 K (600 MHz).

8.4 Dekalösung mit α -Amylase

Bei der von Boehringer bezogenen α -Amylase handelt es sich um jene aus Schweinepankreas isolierte, die als Suspension in Ammoniumsulfatlösung (ca. 10 mg Protein / ml) geliefert wird. Die pankreatische α -Amylase besitzt ein durchschnittliches Molekulargewicht von 50 kDa.

Um die, für die STD Messungen üblichen Konzentrationen²⁰ an Protein und Ligand, zu erhalten, wurden folgende Mengen verwendet:

- 1.5 μ L α -Amylase Suspension (= \sim 0.3 nmol)
- 2.30 μ L Dekalösung (13.05 mM, Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7, D₂O)
→ entspricht einem ca. 100-fachen Überschuss an Ligand
in 700 μ L Phosphatpuffer (50 mM, pH 7, D₂O) lösen

Bei der Messung mit Enzymaktivierenden Ionen wurden der bestehenden Lösung folgende Mengen zugesetzt:

- 4.55 μ L einer 0.77 mM NaCl-Lösung (Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7, D₂O)
→ dies entspricht einer Gesamtkonzentration von 5 mM NaCl bezogen auf 700 μ L V_{ges}
- 2.00 μ L einer 0.35 mM CaCl₂-Lösung (D₂O)
→ entspricht einer Gesamtkonzentration von 1 mM CaCl₂ bezogen auf 700 μ L V_{ges}

KAPITEL IV: Membranaffinität von Polyolen. Identifizierung der Stärke und Strukturabhängigkeit mittels RDCs

1. Bicellen

1.1 Herstellung des Phosphatpuffers

Verwendet wird ein Phosphatpuffer aus KH_2PO_4 und K_2HPO_4 , bei dem anhand von Literaturdaten [21]* sowohl der pH Wert als auch die Konzentration eingestellt werden können. Sein pH Bereich reicht von pH 5.3 bis pH 7.7 und die Konzentration kann zwischen 10 mM und 1.2 M eingestellt werden.

Durch Boltzman Fit der Literaturdaten für pH = 7 können nun für jede Konzentration die einzuwiegenden Mengen an K_2HPO_4 und KH_2PO_4 bestimmt werden.

Menge an K_2HPO_4 :

$$m(\text{K}_2\text{HPO}_4) = M(\text{K}_2\text{HPO}_4) \cdot x(\text{K}_2\text{HPO}_4) \cdot \text{Konzentration}(\text{Puffer})$$

mit M = Molmasse und x = Molenbruch

$$m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = M(\text{KH}_2\text{PO}_4) \cdot (1-x(\text{K}_2\text{HPO}_4)) \cdot \text{Konzentration}(\text{Puffer})$$

$$M(\text{K}_2\text{HPO}_4) = 174.18 \text{ g/mol} \quad M(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 136.09 \text{ g/mol}$$

bezogen auf ein Gesamtvolumen von 1L.

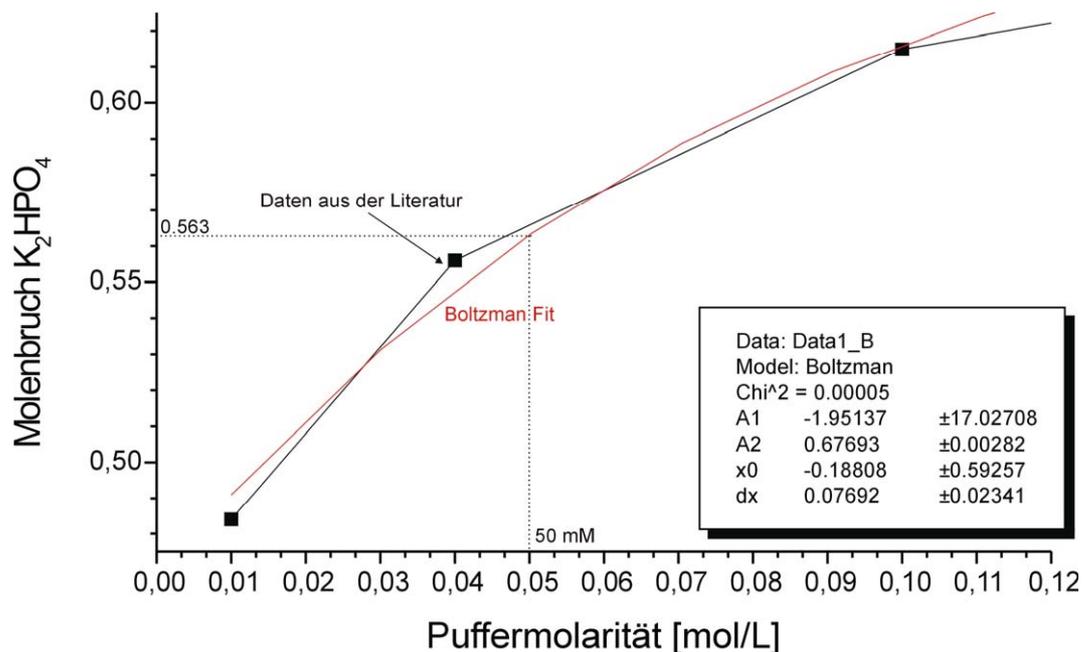


Abb. 1. Auftragung der Literaturdaten[21] für einen $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ Puffer bei pH = 7.

* Die hier zitierte Literatur findet sich beim entsprechenden Kapitel im Hauptteil wieder.

Daraus ergeben sich für **10 mL Puffer in D₂O** folgende Einwaagen:

$$m(\text{K}_2\text{HPO}_4) = \mathbf{49.02 \text{ mg}} \quad m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = \mathbf{29.74 \text{ mg}}$$

mit einem **pH von 7** und einer Molarität von **50 mM**.

1.2 Herstellung der Bicellenlösung

Entsprechend den Vorschriften in der Literatur[3b, 4c] werden die Bicellenlösungen wie folgt hergestellt:

Für eine Standardbicellenlösung mit $q = 3.0$ und 5% Gesamtlipidgehalt (w/w) bei einem Volumen von 700 μL Phosphatpuffer/D₂O ($\rho(\text{D}_2\text{O}) = 1.107 \text{ kg/L}$) sind folgende Einwaagen nötig:

- **DMPC: 32.86 mg**, $n = 4.8474 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$, $M(\text{DMPC}) = 677.95 \text{ g/mol}$
- **DHPC: 7.33 mg**, $n = 1.6158 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$, $M(\text{DHPC}) = 453.51 \text{ g/mol} \rightarrow = 1/3 n(\text{DMPC}) \rightarrow$ entsprechend einem q -Wert von 3.0
- **CTAB: 0.59 mg**, $n = 1.6158 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$, $M(\text{CTAB}) = 364.45 \text{ g/mol} \rightarrow = 1/30 n(\text{DMPC})$

Daraus ergibt sich eine Gesamtlipidmenge von **40.78 mg**

Bestimmung des Gesamtlipidgehalts:

$$c = \frac{m(\text{Lipid}_{\text{ges}})}{m(\text{Lipid}_{\text{ges}}) + m(\text{D}_2\text{O})}$$

$$\rightarrow c = 40.78 \text{ mg} / (40.78 \text{ mg} + 1.107 \text{ g/mL} \cdot 0.7 \text{ mL}) = 5\% \text{ (w/w)}$$

Das DHPC wird in 700 μL Puffer (50 mM, pH 7) gelöst und sofort auf Eis gestellt. Dann wird es zu der Mischung aus DMPC/CTAB (pulverförmige Feststoffe) zupipetiert und wiederum auf Eis gestellt.

Nun werden über mehrere Stunden folgende Schritte in Zyklen durchlaufen:

Eis (ca. 15 min) – Wasserbad (ca. 40 °C, ca. 20 min) – Vortexer (Schüttler)

Dies wird so lange wiederholt, bis alles DMPC in Lösung gegangen ist und die resultierende Lösung klar, jedoch schwach opak ist.

Schliesslich wird die zu vermessende Substanz zugegeben und durch Vortexen in Lösung gebracht.

Die so hergestellte Bicellenprobe ist im Kühlschrank für mehrere Wochen – ohne merkliche Hydrolyse der Estergruppen in den PCs – haltbar.

1.3 Herstellung dotierter Bicellen

Für die mit Dodecylmaltosid dotierten Bicellen muss ein Teil des DMPCs durch dieses langkettige Alkylmaltosid ersetzt werden.

Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass sich dieses vollständig in die Bicellenmembran integrieren lässt und pro Dodecylmaltosidmolekül ein DMPC-Molekül ersetzt wird – DMPC besitzt zwei Alkylreste, Dodecylmaltosid nur einen – muss die Lösung so hergestellt werden, dass sie auch stabil ist, wenn sich Dodecylmaltosid nur teilweise einlagern würde.

Ein Verhältnis von $n(\text{Maltosid})/n(\text{DMPC})$ von ca. 1/6 hatte sich als die stabilste Mischung erwiesen.

Zudem sollte der q -Wert sowohl mit als auch ohne Alkylglycosid im Bereich von ca 3 liegen und der Gesamtlipidgehalt nach Alkylglycosidzugabe ca. 5% betragen, wobei dieser Wert ohne Alkylglycosid nicht unter 3% liegen sollte.

Die Zugabe von CTAB hatte teils stabilisierende, teils destabilisierende Wirkung auf die dotierten Bicellen. Ein genauer Grund hierfür konnte nicht ermittelt werden.

Um die oben genannten Bedingungen zu erfüllen, sind z. B. folgende Einwaagen sinnvoll (bei einem Gesamtvolumen von 700 μL Puffer (50 mM, pH 7, D_2O):

- **DMPC: 32.44 mg**, $n = 4.785 \cdot 10^{-5}$ mol, $M(\text{DMPC}) = 677.95$ g/mol
- **DHPC: 7.76 mg**, $n = 1.711 \cdot 10^{-5}$ mol, $M(\text{DHPC}) = 453.51$ g/mol
- **CTAB: 0.66 mg**, $n = 1.811 \cdot 10^{-6}$ mol, $M(\text{CTAB}) = 364.45$ g/mol
- **Dodecyl-maltosid: 3.99 mg**, $n = 7.814 \cdot 10^{-6}$ mol, $M(\text{Dodecylmaltosid}) = 510.63$ g/mol

Daraus ergeben sich:

- eine Gesamtlipidmenge von **44.85 mg** entsprechend **c = 5.5% mit** Dodecylmaltosid
- eine Gesamtlipidmenge von **40.86 mg** entsprechend **c = 5.0% ohne** Dodecylmaltosid
- ein q -Wert von **q = 3.25 mit** Berücksichtigung und von **q = 2.8 ohne** Berücksichtigung des Dodecylmaltosids
- Das molare Verhältnis von Dodecylmaltosid zu DMPC beträgt **0.16 (ca. 1/6)**
- Der molare Anteil an CTAB, bezogen auf DMPC, ist **4%**.

1.3.1 Stabilität der dotierten Bicellen

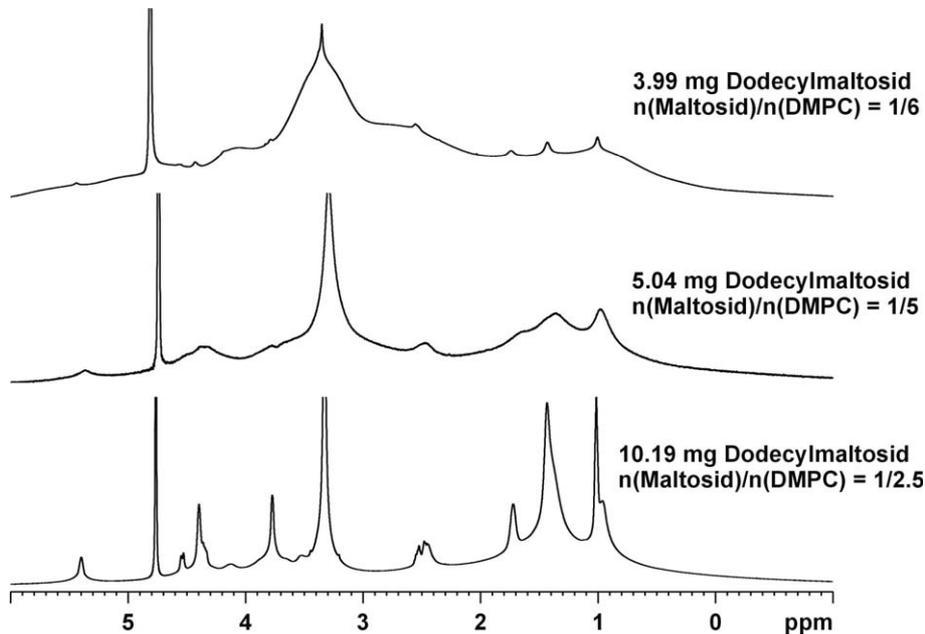


Abb. 2. ^1H Spektren von unterschiedlich stark dotierten Bicellen bei 308 K – also einem Bereich, in dem die flüssig-kristalline Phase stabil vorliegen sollte. Alle Proben enthalten 4% CTAB und sind in 700 μL Puffer (50 mM, pH 7) angesetzt. Ihre q -Werte betragen 3.2/3.1/3.4 und ihre c -Werte 5.5/5.6/6.2% unter Berücksichtigung des Dodecylmaltosids (für gezeigte Spektren von oben nach unten).

Für ein Verhältnis von 1/6 zeigen sich nur sehr kleine Spitzen im Alkylbereich des ^1H Spektrums, die typisch für (noch) vorhandene Liposomen sind. Lässt man diese Probe über längere Zeit (ca. 30 min) äquilibrieren, so erhält man eine einheitliche, flüssig-kristalline Phase.

Bei einem Verhältnis von 1/5 ist die Phase sehr instabil und kippt zwischen isotropem und anisotropem Zustand; sie ist somit für Messungen nicht zu verwenden.

Bei einem Verhältnis von 2/5 (1/2.5) kann überhaupt keine flüssig-kristalline Phase mehr erzeugt werden – unabhängig von der Temperatur.

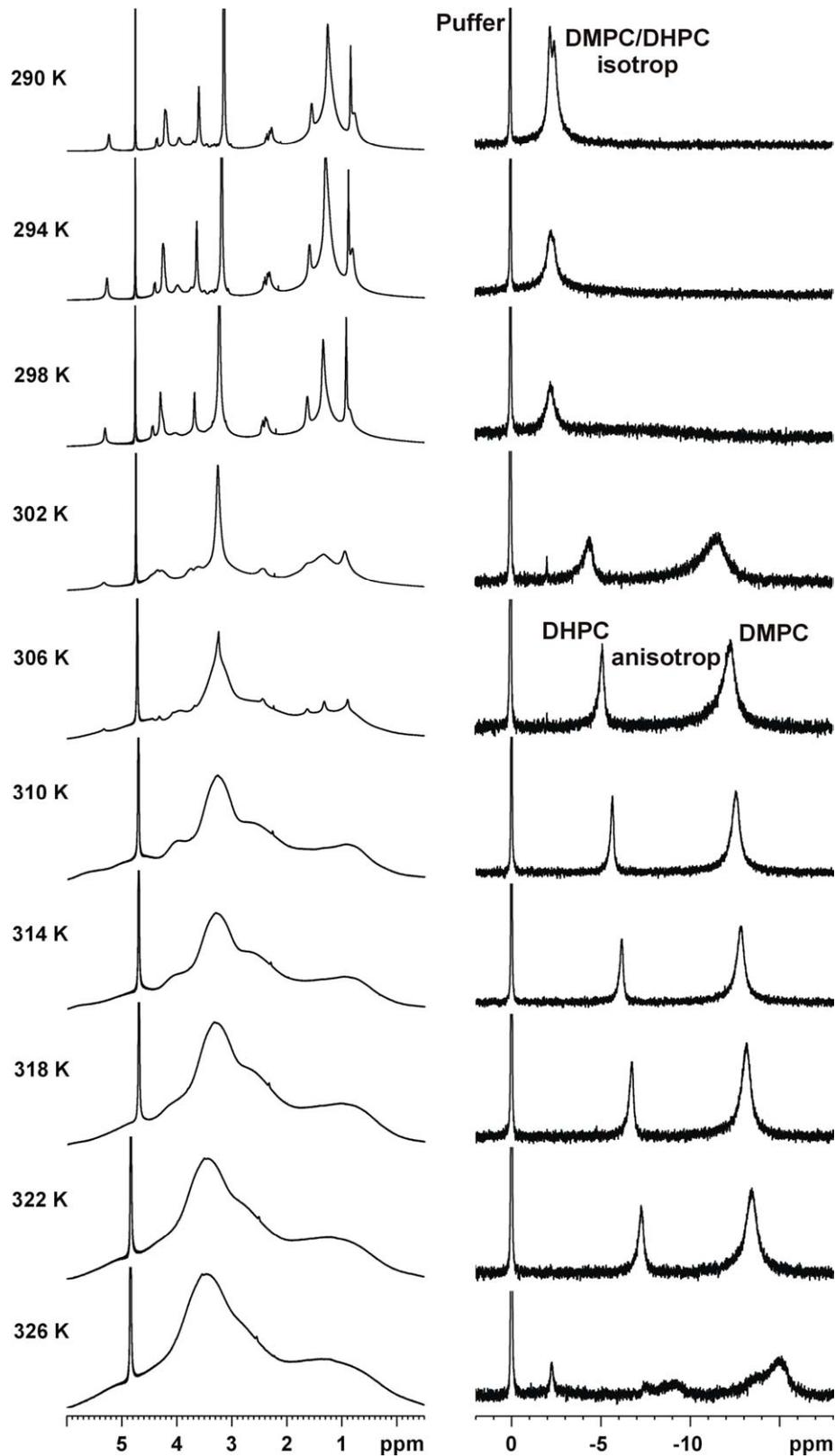


Abb. 3. ^1H und ^{31}P Spektren von dotierten Bicellen (3.2, 5.5%, 4% CTAB, 700 μL Puffer (50 mM, pH 7), $n(\text{Maltosid})/n(\text{DMPC}) = 1/6$).

Der stabile Bereich der anisotropen Phase liegt zwischen 308 und 322 K.

2. PEG/n-Alkohol/Wasser – Herstellung der Otting Phase

Dieses flüssig-kristalline Medium wurde wie in der Literatur beschrieben [7] hergestellt.

Es gibt die Möglichkeit, sowohl unterschiedliche Ethylenglykole, als auch unterschiedliche Alkohole zu verwenden.

Die hier eingesetzte Otting Phase besteht aus Pentaethylglykolmonododecylether (C12E5) und n-Hexanol in D₂O.

Wichtige Parameter der Phase sind:

- Gehalt an PEG in Bezug auf D₂O (% wt)
- Molares Verhältnis r von PEG zu Alkohol

Die Zusammensetzung mit dem, für den Vergleich mit Bicellenmessungen, günstigsten Temperaturbereich der flüssig-kristallinen Phase (ca. 22 – 40 °C) besitzt 5% wt an C12E5 und $r = 0.96$

Daraus ergeben sich folgende Mengen bezogen auf 700 μ L Gesamtvolumen D₂O:

Masse D₂O: $m(\text{D}_2\text{O}) = \rho(\text{D}_2\text{O}) \cdot V(\text{D}_2\text{O}) = 1.107 \text{ g/mL} \cdot 0.7 \text{ mL} = \mathbf{774.9 \text{ mg}}$

→ 5% wt von der Gesamtmasse entsprechen: $774.9 \text{ mg} \cdot 0.05 / 0.95$

→ dies entspricht **40.78 mg C12E5** ($M(\text{C12E5}) = 406.61 \text{ g/mol}$)

C12E5: 40.78 mg, $n = 1.003 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$

→ $r = n(\text{C12E5}) : n(\text{Hexanol}) = 0.96 \rightarrow n(\text{Hexanol}) = 9.628 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$

n-Hexanol: $9.628 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \rightarrow$ bei $M(\text{Hexanol}) = 102.18 \text{ g/mol}$ und einer Dichte $\rho(\text{Hexanol}) = 0.820 \text{ g/mL} \rightarrow V(\text{Hexanol}) = \mathbf{12 \mu\text{L}}$

Somit besteht eine C12E5/n-Hexanol/D₂O Probe mit 5% wt und $r = 0.96$ aus:

700 μ L D₂O, 40.78 mg C12E5 und 12 μ L n-Hexanol

Das Polyethylenglykol wird in D₂O gelöst und n-Hexanol in μ L-Schritten unter starkem Schütteln zugegeben. Bei niedrigen Alkoholkonzentration liegen zwei Phasen vor, ist jedoch die adequate Alkoholmenge erreicht, so wird die Lösung schlagartig klar und schwach opak und besteht nur mehr aus einer einzigen Phase.

Die so hergestellte Lösung ist über längere Zeit im Kühlschrank stabil.

3. DMPC Liposomen in D₂O – Herstellung

Da DMPC in Wasser unlöslich ist, muss es mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators in Form von Liposomen in Lösung gebracht werden.

Eine gängige Konzentration für DMPC-Liposomen ist 5 mg DMPC/mL Wasser.

20 mg DMPC werden in 4 mL D₂O suspendiert und solange mit 20000 Hz Ultraschallpulsen behandelt, bis die Lösung klar und schwach opak ist.

Sie kann für längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Bei der gewählten Konzentration wird ein Ausfällen von DMPC verhindert.

4. Einzelheiten zu den durchgeführten NMR Messungen

Alle Messungen wurden bei 600 MHz Protonenfrequenz durchgeführt. Bei 400 MHz hatte sich gezeigt, dass der Phasenübergang für Bicellen nicht vollständig erreicht werden konnte und die flüssig-kristalline Phase instabil war.

4.1 ¹H T1 Inversion Recovery Sequenz

Die unterschiedliche T1 Relaxationszeit von (kleinem) Liganden und (grossen) Bicellen wurde dazu genutzt, um nur die Signale des Liganden im ¹H zu detektieren. Insbesondere für Proben mit starker Ausrichtung und damit verbunden einer starken Signalverbreiterung erwies sich dies als sehr hilfreich, da besonders das breite Dublett von H9a so besser identifizierbar war.

Verwendet wurde das zugehörige Pulsprogramm der Fa. Bruker (t1ir) mit folgenden Parametern:

$$d1 = 2 \text{ s} \quad p1 = 7.60 \text{ bzw. } 7.85 \text{ } \mu\text{s} \quad p1 = -3 \text{ dB} \quad ns = 80$$

Der variable Delay vd, wurde für jede Probe separat optimiert, lag aber für alle untersuchten bizyklischen Systeme in einem Bereich von 350 – 450 ms.

4.2 Sättigungstransfermessungen – STD

Gemessen wurde der Sättigungstransfer mit einer 1D Pulssequenz, welche die Vorsättigung einer definierten Frequenz über einen Shape Puls erreicht.

Für diese Messung wurden zwei verschiedene Pulsprogramme verwendet, wobei der Unterschied in einem zusätzlichen T1_ρ Filter im Pulsprogramm von Prof. T. Peters / Prof. B. Meyer (Uni Lübeck / Uni Hamburg) besteht.

Ansonsten sind dieses und das STD Pulsprogramm von Dr. R. Kerssebaum (Fa. Bruker) identisch.

Bei dem enthaltenen Shape Puls handelt es sich um einen Gausspuls mit 49 ms Pulslänge bei einer Leistung von 65.2 dB. Letztere wurde über das Shape Tool in XWIN-NMR 3.1 berechnet.

Die Gesamtzeit der Sättigung beträgt, mit den oben genannten Werten, 2 s.

Standardmässig wurde die off-Resonance Frequenz auf 10000 Hz bzw. im weiteren auf 20 ppm gesetzt.

Der d1 wurde auf 2 s gesetzt.

4.3 DOSY – Diffusionsmessungen

Verwendet wurden die 1D und 2D DOSY Pulsprogramme der Fa. Bruker, welche bipolare Gradientenpulse und LED (Longitudinal Eddy Current Delay) als Sequenz für die Diffusionsmessung besitzen.

Zuerst wurde ein 1D DOSY Spektrum mit einer Gradientenstärke von 2% als Nullwert aufgenommen. Schliesslich wurden bei maximaler Gradientenstärke (95%) die Werte für die Diffusionszeit (d20) und den Gradientenpuls (p30) so optimiert, dass die Signale nur noch etwa 10% Intensität im Vergleich zum Nullwert hatten.

Mit diesen so optimierten Parametern wurde dann das entsprechende 2D DOSY Spektrum aufgenommen.

Werte der wichtigen Parameter:

Parameter	Wert
d1	2 s
d16	100 μ s
d20	Variabel, typischerweise ~ 100 ms
p1	7.60 μ s bzw. 7.85 μ s
p19	1100 μ s
p30	Variabel, typischerweise ~ 1.5 ms
GPZ6	2% ... 95%

Die Prozessierung der Daten und Berechnung der Diffusionskonstanten erfolgte wie in [18a] beschrieben mit XWINNMR bzw. Topspin.

4.4 ¹³C Spektren – ¹³C gated und INEPT Spektren

Da aufgrund der grossen homonuklearen, dipolaren Kopplungen (D_{HH}) die Auswertung von 2D HMQC bzw. HSQC Spektren unmöglich war (Phasenfehler in F2), wurden die heteronuklearen CH RDCs aus ¹³C gated und ¹³C INEPT Spektren ermittelt.

4.4.1 ¹³C gated Spektrum

Das von der Fa. Bruker verfügbare Standardpulsprogramm (zg0gd) wurden mit folgenden Werten für die Parameter aufgenommen:

d1 = 2 s p0 = 13.30 μ s pl1 = -4 dB

Waltz16 ist die verwendete Entkopplersequenz mit einem 90° Puls von 103 µs Dauer bei 19 dB Leistung.

4.4.2 ¹³C INEPT Spektrum

Ebenfalls um das Bruker Standardpulsprogramm handelt es sich im Falle des INEPTs ohne Entkopplung und mit nicht-selektivem Polarisationstransfer (ineptnd).
Verwendete Parameter:

Parameter	Wert
d1	2 s
cnst2 (= ¹ J _{CH})	145 Hz
p1	-4 dB
p1	13.30 µs
p2	-3 dB
p3	7.60 bzw. 7.85 µs

5. Details zur Abschätzung der Bindungskonstanten K_a

5.1 Berechnung von D_{CH}^{max}

Der Wert der maximalen dipolaren Kopplung für einen CH Vektor ist definiert als

$$D_{CH}^{max} = - \frac{\mu_0 \gamma_H \gamma_C \hbar}{(2\pi r_{CH})^3}$$

mit:

- μ_0 : Permeabilitätskonstante des Vakuums = $4\pi \cdot 10^{-7}$ H/m
 - γ_H : gyromagnetisches Verhältnis für Protonen = $26.7522 \cdot 10^7$ rad/(sT)
 - γ_C : gyromagnetisches Verhältnis für Kohlenstoff = $6.7283 \cdot 10^7$ rad/(sT)
 - \hbar : Plancksches Wirkungsquant = $6.626 \cdot 10^{-34}$ Js
- und wird für eine CH Bindungslänge r_{CH} von 1 Å (= $1 \cdot 10^{-10}$ m) berechnet.

→ hiermit ergibt sich für $D_{CH}^{max} = -60380$ Hz

5.2 Graphische Darstellung der Gleichungen (8a) und (9)

Da [1]⁰ und [DMPC]⁰ in die Gleichungen miteingehen, muss für jede Probenzusammensetzung diese Ausprägung separat gemacht werden.

In diesem Beispiel verwendete Probe:

q = 3.03, c = 5.0%, 4% CTAB, 700 µL Puffer (50 mM), f = 0.55

$$\begin{aligned}
 [1]^0 &= 38.0 \text{ mM} & [\text{DMPC}]^0 &= 69.1 \text{ mM} \\
 |D_{\text{CH}(\text{geb})}| &= |-60380 \text{ Hz}| (= |D_{\text{CH}}^{\text{max}}|) & |D_{\text{CH}(\text{frei})}| &= |-20 \text{ Hz}| \text{ (Wert für C7 in Otting Phase)} \\
 |^1D_{\text{CH}}| &= |+171 \text{ Hz}| \text{ (Wert für C7 in Bicellen)}
 \end{aligned}$$

Gleichung (8a):

$$[C] = f(x) = \frac{[1]^0 + [\text{DMPC}]^0 + 1/x}{2} \pm \left(\left(\frac{[1]^0 + [\text{DMPC}]^0 + 1/x}{2} \right)^2 - [1]^0 [\text{DMPC}]^0 \right)^{1/2}$$

Gleichung (9):

$$^1D_{\text{CH}} = f(x) = ^1D_{\text{CH}(\text{frei})} + \frac{^1D_{\text{CH}(\text{geb})}}{[1]^0} * \left(\frac{[1]^0 + [\text{DMPC}]^0 + 1/x}{2} - \left(\left(\frac{[1]^0 + [\text{DMPC}]^0 + 1/x}{2} \right)^2 - [1]^0 [\text{DMPC}]^0 \right)^{1/2} \right)$$

mit $x = K_a$ [L/mmol] und $[1]^0$ und $[\text{DMPC}]^0$ in [mM]

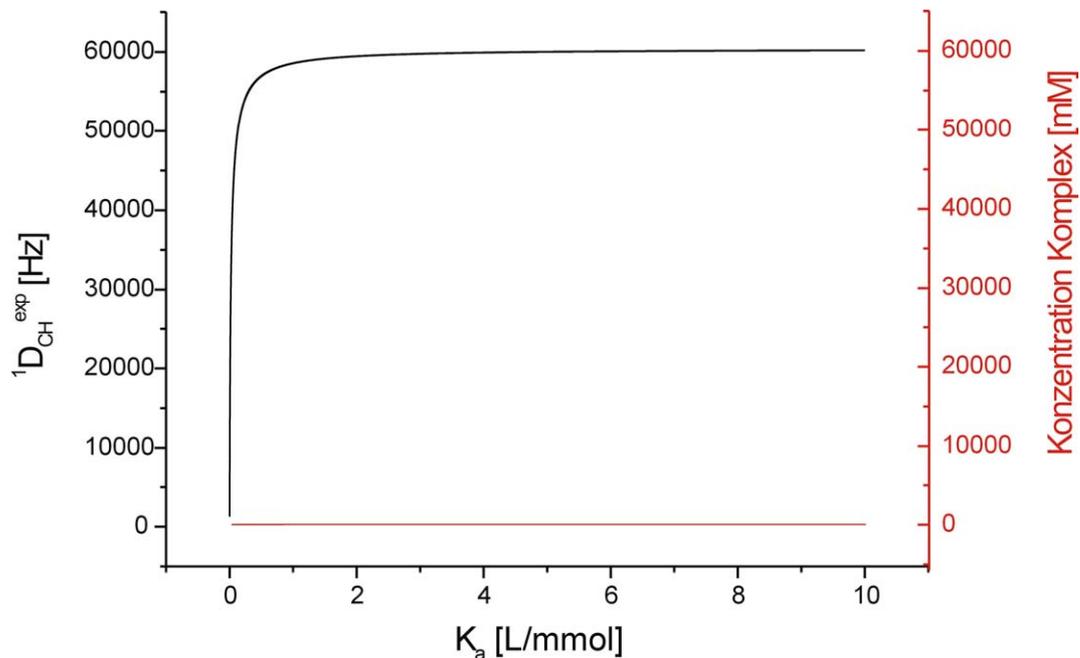


Abb. 4. Auftragung von Gleichung (8a) in rot und Gleichung (9) in schwarz für obige Probe.

5.3 Berechnung in Maple V

Zuerst muss mit Hilfe der experimentell ermittelten dipolaren Kopplung die Assoziationskonstante aus Gleichung (9) berechnet werden. Hierzu muss Gleichung (9) folgendermassen umgeformt werden:

Inputfile für REDCAT:

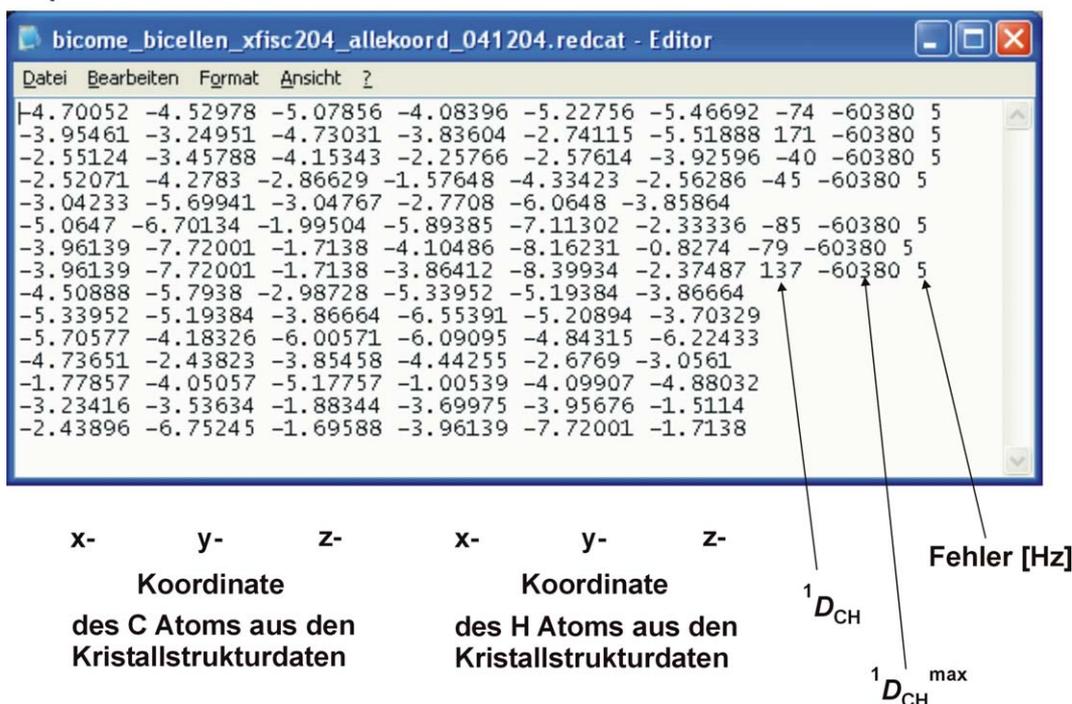


Abb. 6. Inputfile für REDCAT mit den, für die Berechnungen, nötigen experimentellen Daten.

Der Fehlerwert von 5 Hz ist nur pro forma gesetzt, da dieser über die Fehleranalyse später in REDCAT für jeden einzelnen $^1D_{CH}$ Wert bestimmt wird.

Mit den so gegebenen Ausgangsdaten wird versucht, mittels SVD dieses lineare Gleichungssystem zu lösen.

Hierbei werden innerhalb des gesetzten Fehlerrahmens 10000x aus den experimentellen RDC Werten nach dem Zufallsprinzip neue RDC Werte generiert. Im Output wird angegeben, wie oft innerhalb dieser 10000 Versuche jede einzelne Gleichung einen gültigen Wert ergibt.

Daraufhin wird eine Fehleranalyse durchgeführt, die eine Anpassung der Fehlerwerte und die Identifizierung von evtl. falsch oder ungenau abgelesenen $^1D_{CH}$ Werten erlaubt.

Diese neuen Fehlergrenzen müssen nun so angepasst werden, dass das lineare Gleichungssystem gelöst werden kann. Die Zahl der Lösungen hängt von den gesetzten Fehlergrenzen ab.

Eq#	X1	Y1	Z1	X2	Y2	Z2	Dipol	Error	Comments
1) <input checked="" type="checkbox"/>	-4.7005	-4.5297	-5.0785	-4.0839	-5.2275	-5.4669	-74	1.59	
2) <input checked="" type="checkbox"/>	-3.9546	-3.2495	-4.7303	-3.8360	-2.7411	-5.5188	171	2.06	
3) <input checked="" type="checkbox"/>	-2.5512	-3.4578	-4.1534	-2.2576	-2.5761	-3.9259	-40	1.65	
4) <input checked="" type="checkbox"/>	-2.5207	-4.2783	-2.8662	-1.5764	-4.3342	-2.5628	-45	1.75	
5) <input type="checkbox"/>	-3.0423	-5.6994	-3.0476	-2.7708	-6.0648	-3.8586		0.29	
6) <input checked="" type="checkbox"/>	-5.0647	-6.7013	-1.9950	-5.8938	-7.1130	-2.3333	-85	0.29	
7) <input checked="" type="checkbox"/>	-3.9613	-7.7200	-1.7138	-4.1048	-8.1623	-0.8274	137	4.66	
8) <input checked="" type="checkbox"/>	-3.9613	-7.7200	-1.7138	-3.8641	-8.3993	-2.3748	-79	0.15	

Fehlergrenzen aus der Fehleranalyse

Rejection during diagonalization: 0
 System is fully determined (rank = 5)
 Total number of rejections out of 10000: 9996 → Anzahl an Lösungen: 4
 Rejections by equation 1: 4638
 Rejections by equation 2: 4629
 Rejections by equation 3: 4609
 Rejections by equation 4: 4608
 Equation 5 excluded
 Rejections by equation 6: 5608
 Rejections by equation 7: 4686
 Rejections by equation 8: 4740
 Equation 9 excluded
 Equation 10 excluded
 Equation 11 excluded
 Equation 12 excluded

Abb. 7. Outputfiles von REDCAT nach Fehleranalyse und Versuch, das lineare Gleichungssystem zu lösen. Koordinaten, für die keine RDC Werte vorhanden sind oder deren Werte als „falsch“ ermittelt wurden, sind von den Berechnungen ausgenommen (grau).

Die Lösungen können angezeigt und eine sog. „Best Solution“ berechnet werden. Diese besitzt bezogen auf den quadratischen Mittelwert die geringste Abweichung (rmsd = Root Mean Squared Deviation).

Rejection during diagonalization: 0
 Sxx Syy Szz a b c Eta GDO
 2.149358e-003 9.998709e-004 -3.149229e-003 -69.417047 41.508833 60.341023 -3.650059e-001 3.941716e-003
 2.148745e-003 9.997672e-004 -3.148512e-003 -69.430304 41.517736 60.260187 -3.649272e-001 3.940783e-003
 2.169298e-003 9.959990e-004 -3.165297e-003 -69.155027 41.553420 60.130598 -3.706759e-001 3.964464e-003
 2.153548e-003 9.992379e-004 -3.152786e-003 -69.385881 41.506152 60.268445 -3.661239e-001 3.946683e-003
 Sxx Syy Szz a b c Eta GDO
 2.154905e-003 9.982482e-004 -3.153153e-003 -69.367958 41.513758 60.279414 -3.668254e-001 3.947466e-003

Euler Winkel α , β und γ

Abb. 8. REDCAT Output für die berechneten Lösungen. Die „Best Solution“ muss nicht einer der Lösungen entsprechen.

6.1 Bestimmung der rotierten Koordinaten

Um das gesamte Molekül in den Principal Alignment Frame (PAF) zu überführen, müssen alle Koordinaten, auch die zuvor von der Berechnung ausgeschlossenen, markiert sein.

The image shows two windows from the REDCAT software. The 'Main window' displays a table with 15 rows of coordinate data. The 'Rotate Coord...' dialog box is open, showing Euler rotation parameters: a = -69.36, b = 41.51, and c = 60.27.

Eq.#	X1	Y1	Z1	X2	Y2	Z2	Dipol	Error	Comments
1)	-2.5788	-7.5751	-2.0908	-1.8405	-8.2005	-1.8048	-74	1.59	
2)	-2.0424	-6.1967	-2.4499	-1.6925	-6.2246	-3.3281	171	2.06	
3)	-0.8992	-5.6983	-1.5610	-0.7335	-4.8078	-1.8690	-40	1.65	
4)	-1.2594	-5.5929	-0.0811	-0.4658	-5.2403	0.4012	-45	1.75	
5)	-1.6331	-6.9329	0.5426	-1.0953	-7.6221	0.2254		0.29	
6)	-3.8457	-7.5867	1.4800	-4.4999	-8.2986	1.2884	-85	0.29	
7)	-2.8549	-7.9636	2.5801	-3.2633	-7.8335	3.4847	137	4.66	
8)	-2.8549	-7.9636	2.5801	-2.5178	-8.8534	2.5292	-79	0.15	
9)	-3.0328	-7.3165	0.3039	-3.5525	-7.5477	-0.9206		0.15	
10)	-3.5525	-7.5477	-0.9206	-4.7514	-7.7507	-1.0726		0.15	
11)	-3.2370	-8.0735	-3.2347	-3.5013	-8.8066	-3.0791		0.15	
12)	-3.1016	-5.2408	-2.4800	-3.0767	-4.8991	-1.6654		0.15	
13)	0.1908	-6.5706	-1.7798	0.8247	-6.2559	-1.3465		0.15	
14)	-2.2863	-4.6135	0.0279	-2.8304	-4.8380	0.4585		0.15	
15)	-1.4644	-6.8379	2.3489	-2.8549	-7.9636	2.5801		0.15	

Enthält jetzt ausgehend vom Basiskoordinatensatz um die Euler Winkel rotierte Koordinaten

Abb. 9. Output von REDCAT zur Bestimmung der rotierten Koordinaten.

Da im Falle der hier untersuchten Moleküle keine pdb-Files erzeugt werden konnten, mussten die rotierten Koordinaten anschliessend von Hand in den entsprechenden Ausgangskoordinatensatz kopiert werden, um das rotierte Molekül graphisch darstellen zu können.

Die Darstellung der so generierten ent-Files (entspricht pdb) erfolgte mit dem Programm VMD 1.8.2.

KAPITEL V: Struktur und Dynamik zyklischer Jasplakinolid Analoga

1. Allgemeines

Für die Strukturanalyse der untersuchten Makrozyklen wurden 2D DQFCOSY, HMQC, NOESY und ROESY Spektren für alle Verbindungen aufgenommen. Soweit nicht ausdrücklich anders angegeben wurden die Messungen bei 300 K und einer Protonenfrequenz von 600.13 MHz durchgeführt.

Die Messungen erfolgten in DMSO_{d6}, auf welches sowohl im Protonen- als auch Kohlenstoffbereich geeicht wurde ($\delta_{\text{H}} = 2.49$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 39.5$ ppm).

2. Der Makrozyklus Sy2741

4.62 mg (M= 637.8 g/mol, n= 7.24×10^{-6} mol, c= 10.3 mM) **Sy2741** wurden in 0.7 mL DMSO_{d6} gelöst.

2.1 Temperaturreihe für die NH Protonen

Temp. [K] →	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]				
	300	310	320	330	340
Atom ↓					
NH1'''	0	-21.9	-43.9	-65.1	-87.0
NH19	0	-23.0	-45.4	-67.7	-90.1
NH16	0	-31.1	-61.2	-91.4	-121.0
NH13	0	-37.5	-73.9	-110.7	-144.3
NH4	0	-24.6	-48.9	-73.7	-98.0

Tab. 1. Verschiebungen der NH-Protonen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Die zugehörigen ¹H Ausschnitte des NH-/Aromatenbereichs sind im Anhang abgebildet.

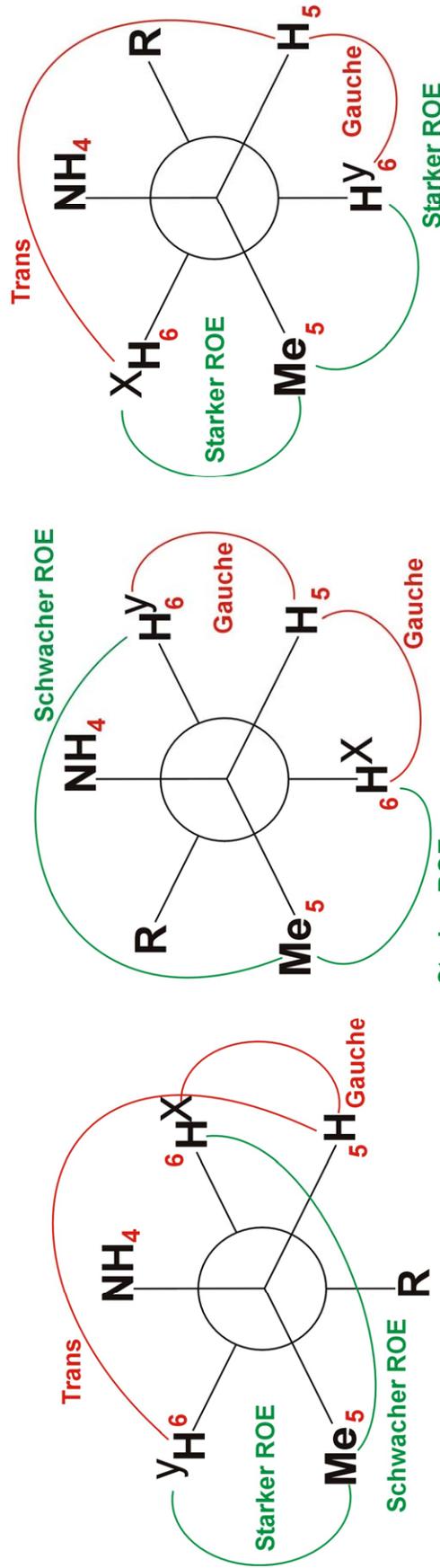
2.2 Rotamerenverhältnisse der diastereotopen CH₂-Gruppen

Um besser nachvollziehen zu können, auf welchen Daten die prochirale Zuordnung der Methylenprotonen beruht, sind nachfolgend alle dafür entscheidenden experimentellen Parameter zusammengefasst.

Prochirale Zuordnung für H_6^h / H_6^t

Experimentelle Daten:

$^3J_{H_5, H_6} = 3.7 \text{ Hz} / 10.6 \text{ Hz}$ ROE Me5 - H_6^h → stark ROE Me5 - H_6^t → schwach



Hauptrotamer, da

- 3J 1x trans, 1x gauche
- 1x starker ROE Me5 - H_6y
- 1x schwacher ROE Me5 - H_6x

Nebenrotamer, da

- H_5 gauche zu H_6x und gauche zu H_6y
- exp. Daten →
- 3J 1x trans, 1x gauche

Nebenrotamer, da

- 2x ROE Me5 - H_6 stark
- exp. Daten →
- 1x schwach, 1x stark

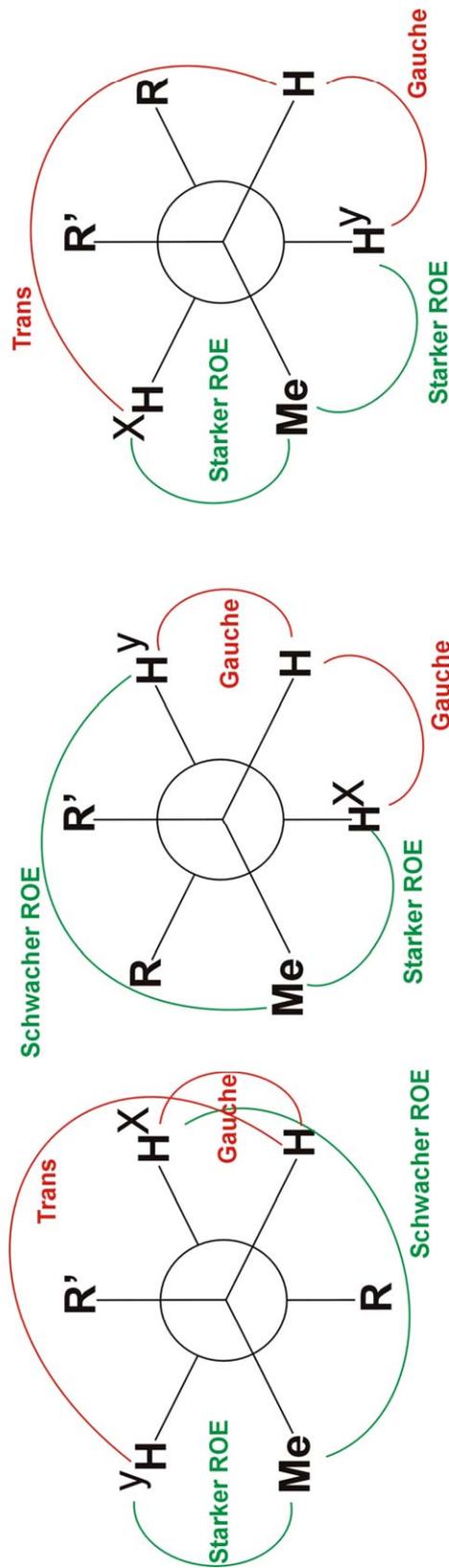
→ $H_6x = H_6^t = \text{proS}$ → $H_6y = H_6^h = \text{proR}$

Abb. 1. Prochirale Zuordnung für H_6^h/H_6^t von Sy2741.

Prochirale Zuordnung für H10^h / H10^t

Experimentelle Daten:

$^3J_{H10, H11} = 2.7 \text{ Hz} / 13.7 \text{ Hz}$ ROE Me11 - H10^h → stark ROE Me11 - H10^t → stark



Nebenrotamer, da
hier 1 ROE schwach, einer stark
exp. Daten → beide ROEs stark

Nebenrotamer, da
H11 gauche zu H10y und H10x
exp. Daten →
 3J 1x trans, 1x gauche

Hauptrotamer
 3J 1x trans, 1x gauche
2x starker ROE Me11 - H10

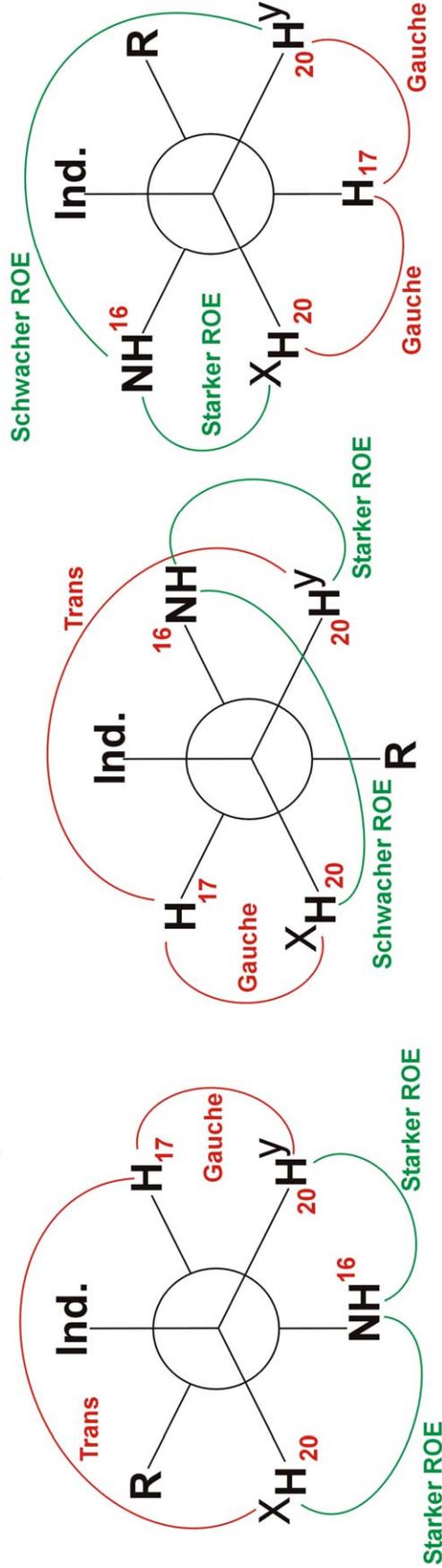
→ H10x = H10^t = proR → H10y = H10^h = proS

Abb. 2. Prochirale Zuordnung für H10^h/H10^t von Sy2741.

Prochirale Zuordnung für H20^h / H20^t

Experimentelle Daten:

$^3J_{H^{17}, H^{20}} = 5.3 \text{ Hz} / 9.3 \text{ Hz}$ ROE NH16 - H20^h → stärker (2.4 A) ROE NH16 - H20^t → schwächer (3.2 A)
 ROEs: H17 - H20^h = H17 - H20^t, H20^t - H3' = 3.35 A, H20^t - NH19 = 3.3 A



Vorliegende Rotamere, da
 3J 1xtrans, 1xgauche
 je nach Ausrichtung des N-H
 2x starker ROE
 1x starker, 1x schwacher ROE

Prochirale Zuordnung über die zusätzlich vorhandenen ROEs möglich

→ H20x = H20^t = proR → H20y = H20^h = proS

Nebenrotamer, da
 hier H1 gauche zu H2x
 und gauche zu H2y
 exp. Daten →
 3J 1x trans, 1x gauche

Abb. 3. Prochirale Zuordnung für H20^h/H20^t von Sy2741.

3. Der Makrozyklus Sy5141

8.87 mg ($M = 651.8 \text{ g/mol}$, $n = 1.36 \times 10^{-5} \text{ mol}$, $c = 19.4 \text{ mM}$) **Sy5141** wurden in 0.7 mL DMSO_{d6} gelöst.

3.1 Temperaturreihe der NH Protonen

Temp. [K] → Atom ↓	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]				
	300	310	320	330	340
NH1 ^{''''}	0	-22.6	-44.5	-65.3	-86.8
NH19	0	-28.9	-57.4	-84.4	-111.4
NH13	0	-36.2	-71.9	-105.4	-139.6
NH4	0	-23.5	-47.0	-70.5	-95.3

Tab. 2. Verschiebungen der NH-Protonen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Die entsprechenden ^1H Ausschnitte sind im Anhang abgebildet.

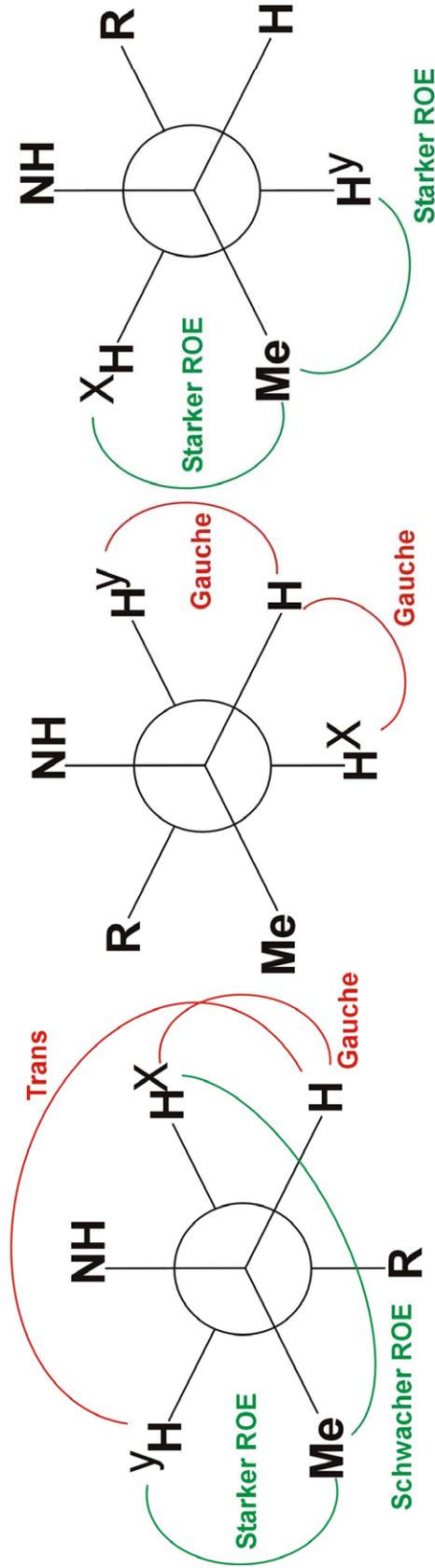
3.2 Bestimmung der Rotamerenverhältnisse der diastereotopen CH_2 -Gruppen

Um besser nachvollziehen zu können, auf welchen Daten die prochirale Zuordnung der Methylenprotonen beruht, sind nachfolgend alle dafür entscheidenden experimentellen Parameter zusammengefasst. Für $\text{H}_2^{\text{h}}/\text{H}_2^{\text{t}}$ ist dies im Fall von **Sy5141** nicht möglich, da ihre chemische Verschiebung identisch und somit keine Auswertung vorhandener ROEs möglich ist.

Prochirale Zuordnung für H6^h/H6^t

Experimentelle Daten:

$^3J = 4.7 \text{ Hz} / 9.0 \text{ Hz}$ ROE Me5 - 6h -> stark ROE Me5 - 6t -> schwach



Hauptrotamer, da

3J 1x trans, 1x gauche

1x starker ROE Me5 - H6y

1x schwacher ROE Me5 - H6x

Nebenrotamer, da

H5 gauche zu H6x und gauche zu H6y

exp. Daten -->

3J 1x trans, 1x gauche

Nebenrotamer, da

2x ROE Me5 - H6 stark

exp. Daten -->

1x schwach, 1x stark

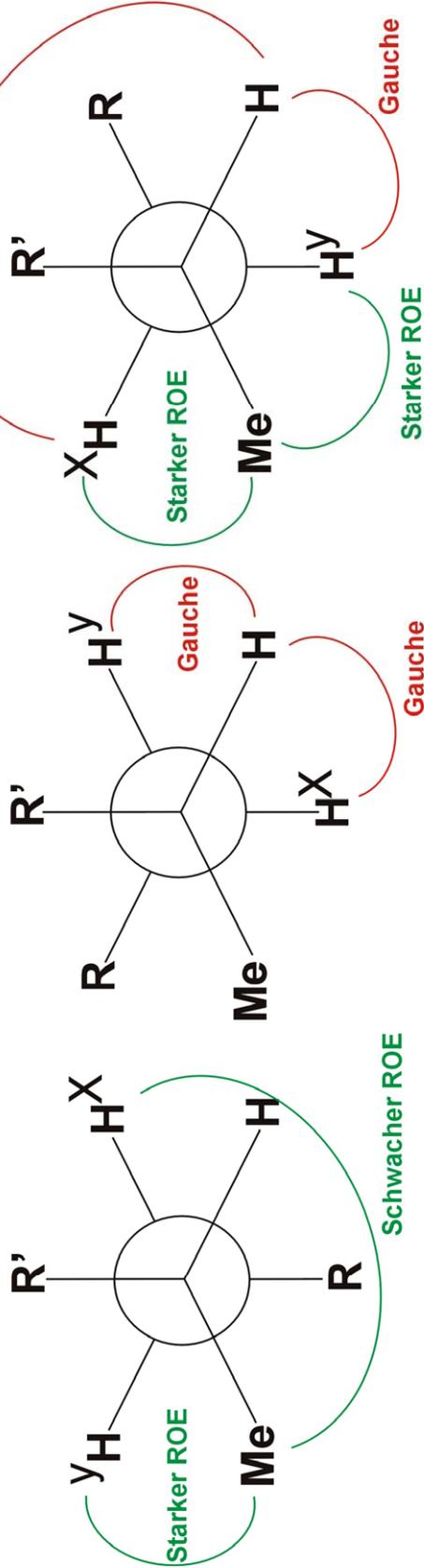
--> H6x = H6^t = proS --> H6y = H6^h = proR

Abb. 4. Prochirale Zuordnung für H6^h/H6^t von Sy5141.

Prochirale Zuordnung für H_{10}^h/H_{10}^t

Experimentelle Daten:

$^3J = 3.1 \text{ Hz} / 10.3 \text{ Hz}$ ROE Me11 - 10h -> stark ROE Me11 - 10t -> stark



Nebenrotamer, da hier 1 ROE schwach, einer stark exp. Daten --> beide ROEs stark

Nebenrotamer, da H_{11} zu beiden H_{10} gauche steht exp. Daten --> 3J 1x trans, 1x gauche

Hauptrotamer
 3J 1x trans, 1x gauche
 2x starker ROE Me11 - H_{10}

--> $H_{10}^x = H_{10}^t = \text{proR}$ --> $H_{10}^y = H_{10}^h = \text{proS}$

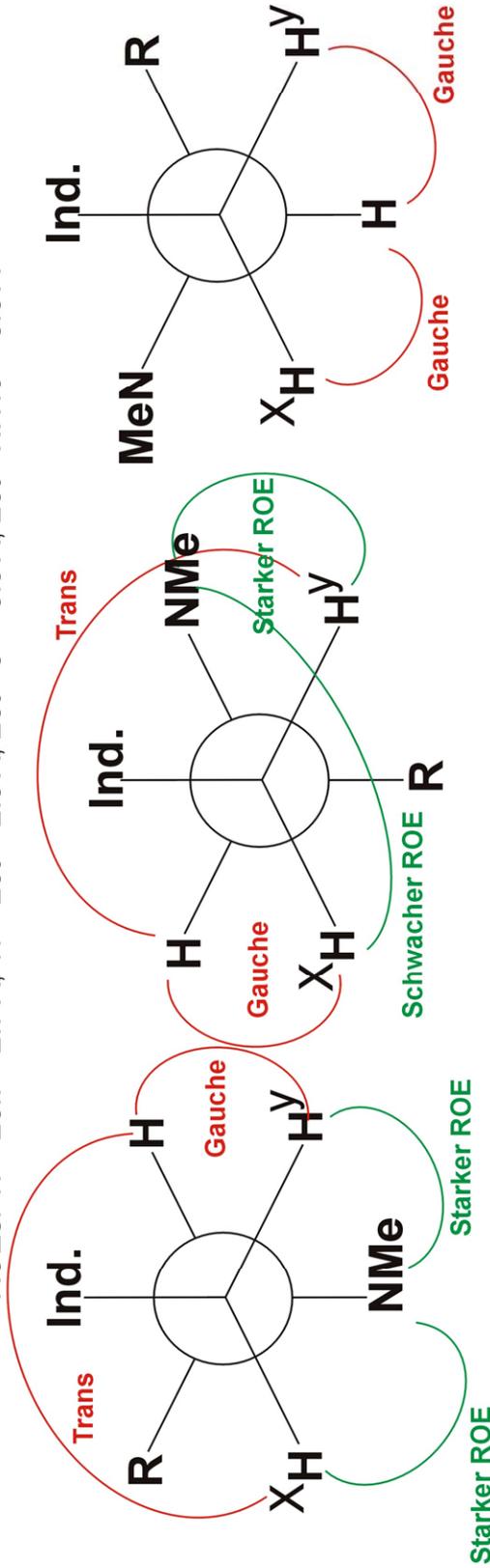
Abb. 5. Prochirale Zuordnung für H_{10}^h/H_{10}^t von Sy5141.

Prochirale Zuordnung für H20^h/H20^t

Experimentelle Daten:

³J = 5.0 Hz / 11.3 Hz ROE NMe (16) - 20h -> stärker (2.4 A) ROE NMe (16) - 20t -> schwächer (3.1 A)

ROEs: 17 - 20h = 2.7 A, 17 - 20t = 2.3 A, 20t - 3' = 3.3 A, 20t - NH19 = 3.0 A



Vorliegende Rotamere, da

3J 1xtrans, 1xgauche

je nach Ausrichtung der N-Me Gruppe

2x starker ROE

1x starker, 1x schwacher ROE

Nebenrotamer, da

hier H1 gauche zu H2x

und gauche zu H2y

exp. Daten -->

³J 1x trans, 1x gauche

Prochirale Zuordnung über die zusätzlich vorhandenen ROEs möglich

--> H20x = H20^t = proR --> H20y = H20^h = proS

Abb. 6. Prochirale Zuordnung für H20^h/H20^t von Sy5141.

4. Die Makrozyklen Maclac1 und Maclac2

4.61 mg ($n = 9.36 \times 10^{-6}$ mol, $c = 13.4$ mM) **Maclac1** wurden in 0.7 mL DMSO_{d6} gelöst.
 4.03 mg ($n = 7.95 \times 10^{-6}$ mol, $c = 11.4$ mM) **Maclac2** wurden in 0.7 mL DMSO_{d6} gelöst.

4.1 Temperaturreihe der NH Protonen von Maclac1

Temp. [K] → Atom ↓	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]			
	310 K	320 K	330 K	340 K
NH16	-24.2	-47.3	-71.0	-95.6
NH19	-18.2	-36.5	-53.4	-72.4
NH13 / NH4	-6.4	-12.7	-19.4	-27.1

Tab. 3. NH-Verschiebungen in Hz in Abhängigkeit von der Temperatur.

4.2 Temperaturreihe der NH Protonen von Maclac2

Temp. [K] → Atom ↓	$\Delta\delta_{\text{ges}}$ [Hz]			
	310 K	320 K	330 K	340 K
NH19	-31.9	-62.0	-91.2	-119.8
NH4	-6.6	-11.2	-17.4	-23.1
NH13	+2.6	+3.9	-	+10.5

Tab. 4. NH-Verschiebungen in Abhängigkeit von der Temperatur.

Die entsprechenden ¹H Ausschnitte sind im Anhang wiedergegeben.

4.3 Charakteristische HH-Abstände im $\beta\text{II}'$ -Turn

Vergleich der signifikanten HH-Abstände im $\beta\text{II}'$ -Turn mit jenen Abständen in Maclac2 in der turnähnlichen, postulierten (Teil-)Struktur:

HH-Abstand	Im idealen $\beta\text{II}'$ -Turn [Å]	In Maclac2 [Å]
H17 – NH19	2.2	2.0 (überlagert H17/H2)
NH19 – H1	2.5	2.5
NH19 – H2	2.9	2.0 (überlagert H17/H2)
NH19 – NH4	2.7	kein Kreuzsignal
NH4 – H14	4.4	kein Kreuzsignal
NH19 – H2'	2.3	2.3 (überlagert H2'/H3')

Tab. 5. Vergleich der charakteristischen HH-Abstände in Turnstrukturen.

KAPITEL VI: 4'-modifizierte DNA Tetramere – Strukturana-lyse für Einzel- und Doppelstrang

1. Allgemeines

Die Struktur der drei verschiedenen DNA-Tetramere – **4PH**, **4PM** und **4T** – als Einzelstränge wurde jeweils aus 2D DQFCOSY, 2D TOCSY, 2D ROESY und 2D HMQC bei 300 K ermittelt.

Die Zuordnungen der „Doppelstränge“ **4PM / 4T** und **4PH / 4T** wurden aus 2D Mes-sungen bei 300 K – im Fall von **4PH / 4T** – und durch Vergleich mit den Spektren der Einzelstränge im Fall von **4PM / 4T** getroffen. Die Zuordnungen beider Systeme bei 277 K erfolgte aus den Temperaturmessungen zwischen 275 und 300 K. Kontrolliert wurde die Richtigkeit der getroffenen Zuordnungen durch Vergleich mit 2D ROESY Spektren bei 277 K.

Alle Spektren sind für den Protonenbereich auf TSP ($\equiv 0.00$ ppm) geeicht, im Koh-lenstoffbereich auf als Verunreinigung enthaltenes Acetat ($\equiv 21.03$ ppm).

Die gezeigten Spektren wurden bei 600.13 MHz Protonenfrequenz aufgenommen.

Die Numerierung für Basen- und Desoxyriboseatome entspricht der in Abb. 1 ge-zeigten Nomenklatur.

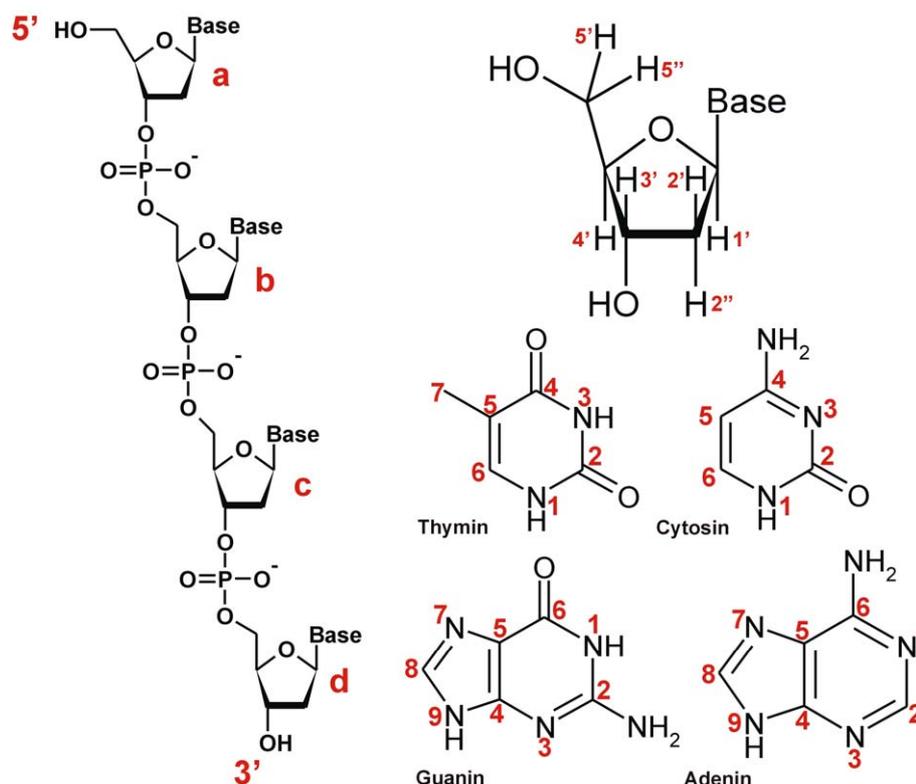


Abb. 1. Numerierung für Zuckereinheit und Basen in DNA.

2. Das unmodifizierte Tetramer 4PH

1.6 mg ($n = 1.09 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.66$ mM) **4PH** (als Triethylammoniumsalz) wurden in 0.7 mL Phosphatpuffer (30 mM, pH 7, D₂O) gelöst.

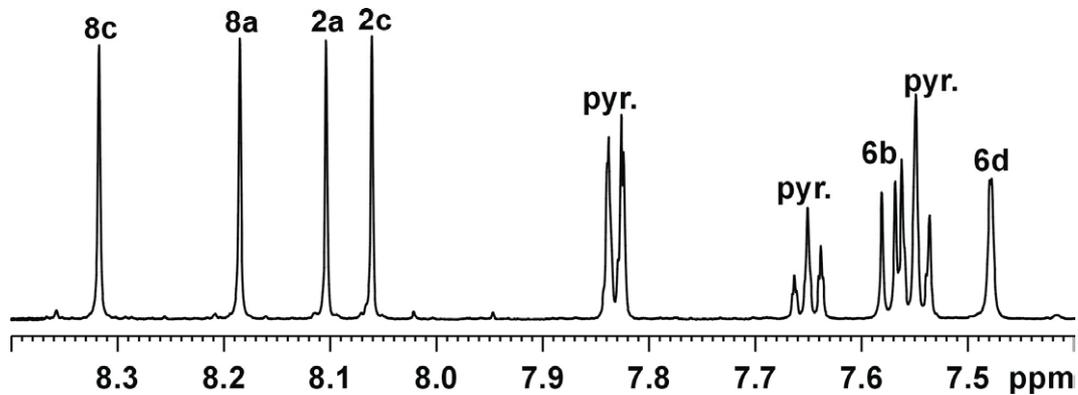


Abb. 2. ¹H Ausschnitt des Basenbereichs von **4PH** (600 MHz, 300 K). Die Bezeichnung der Basen- und Deoxyriboseprotonen entspricht der in Abb.1 dargestellten Nomenklatur. Pyridin (pyr.) ist als Verunreinigung enthalten. In **4PH** enthaltene Basen: (a) Adenin, (b) Cytosin, (c) Adenin, (d) Thymin

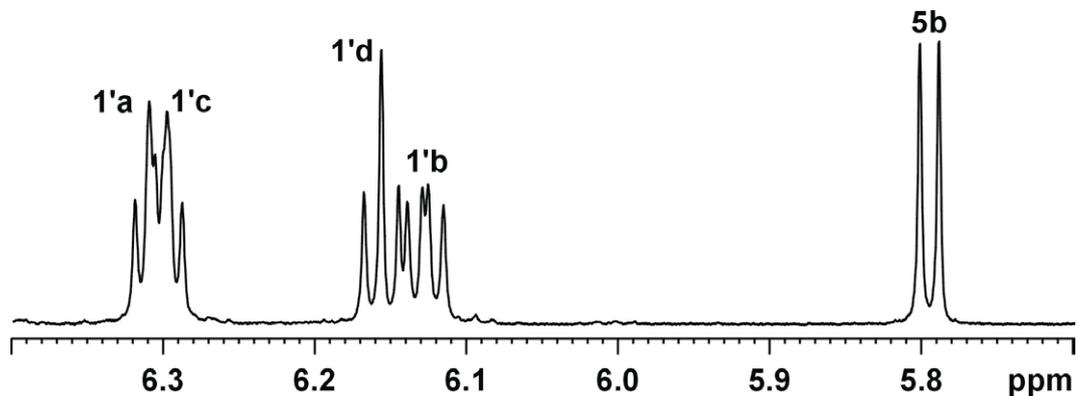


Abb. 3. ¹H Anomerenbereich für **4PH** (600 MHz, 300 K).

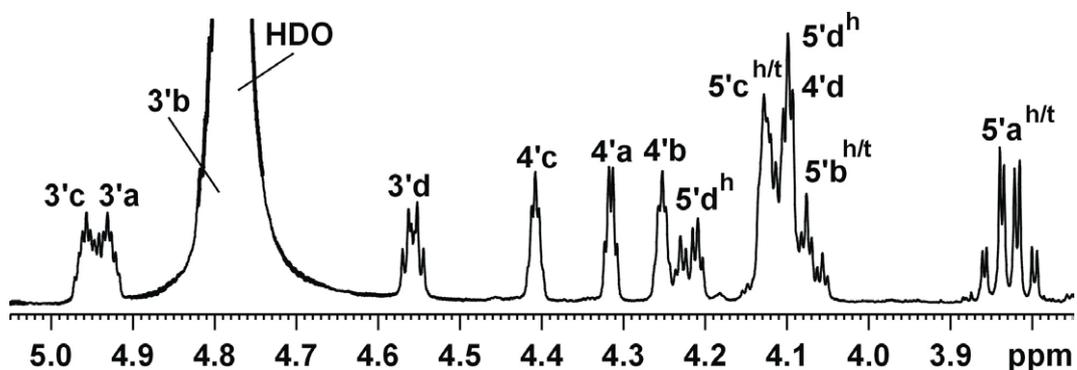


Abb. 4. Ausschnitt aus dem Alkylbereich von **4PH** (600 MHz, 300 K).

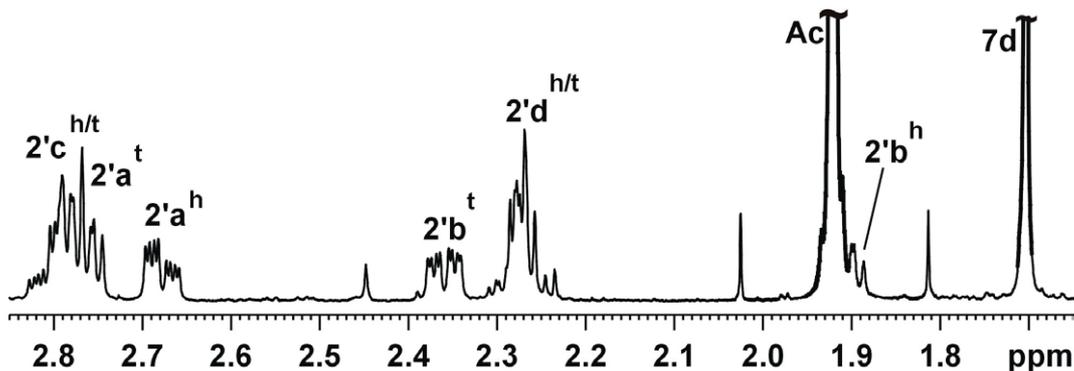


Abb. 5. Alkylbereich der für Desoxyribose typischen CH_2 -Gruppen an Position C2' in **4PH** (600 MHz, 300 K).

3. Das modifizierte Tetramer **4PM**

1.84 mg ($n = 1.25 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.79$ mM) **4PM** (als Triethylammoniumsalz) wurden in 0.7 mL Phosphatpuffer (30 mM, pH 7, D_2O) gelöst und TSP als Referenz zugesetzt.

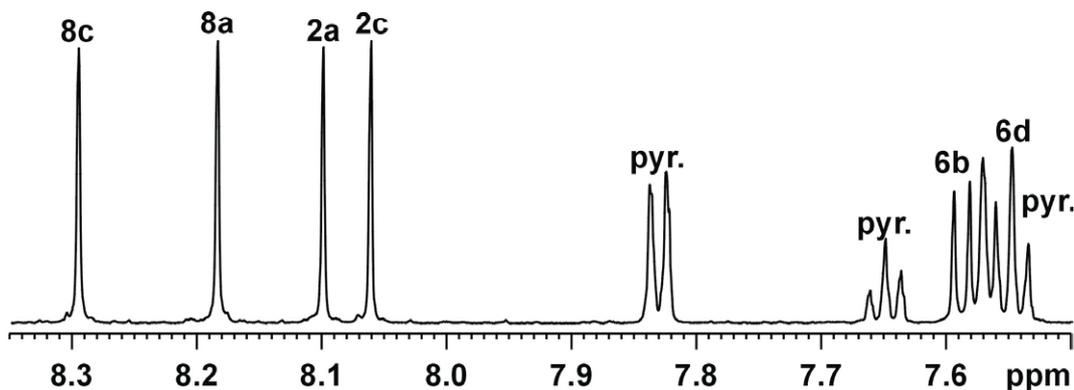


Abb. 6. ^1H Ausschnitt des Basenbereichs von **4PM**. Die Signale für zusätzlich enthaltenes Pyridin sind ebenfalls gekennzeichnet. In **4PM** vorhandene Basen: (a) Adenin, (b) Cytosin, (c) Adenin, (d) Thymin

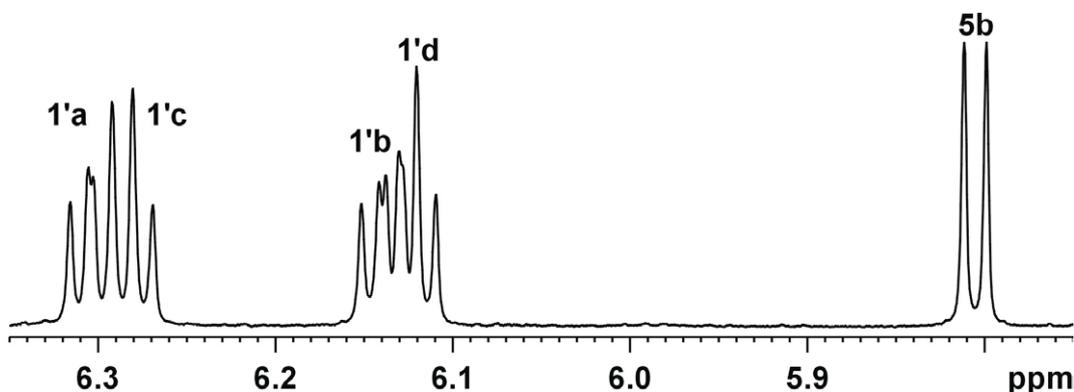


Abb. 7. ^1H Anomerenbereich für **4PM** (600 MHz, 300 K).

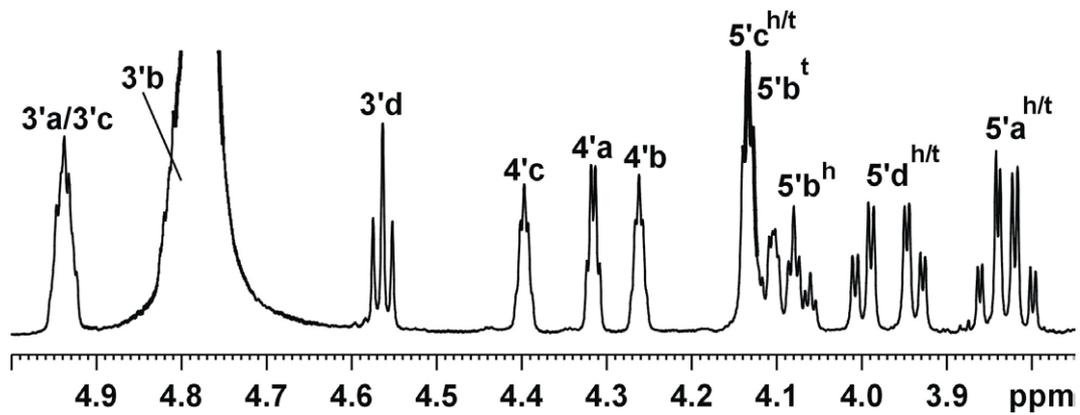


Abb. 8. Ausschnitt aus dem Alkylbereich für **4PM** (600 MHz, 300 K). Bei ca. 4.77 ppm befindet sich das Restwassersignal.

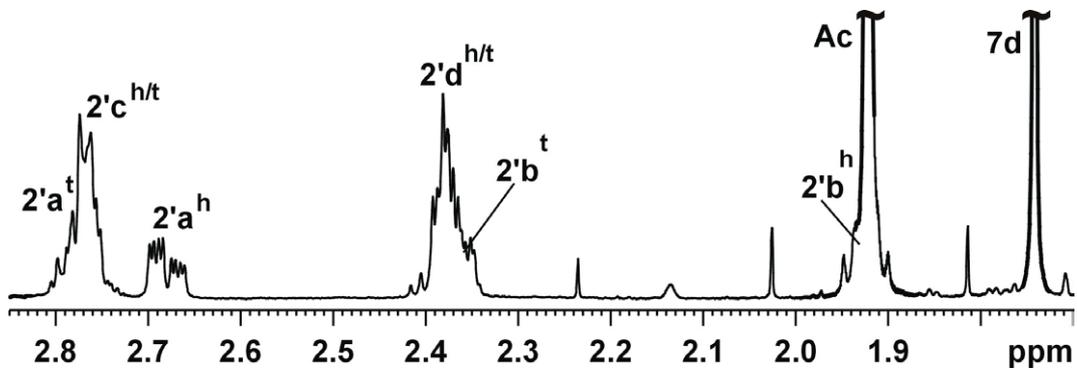


Abb. 9. Alkylbereich von **4PM** mit den für Desoxyribose typischen CH_2 -Gruppen an C2' (600 MHz, 300 K).

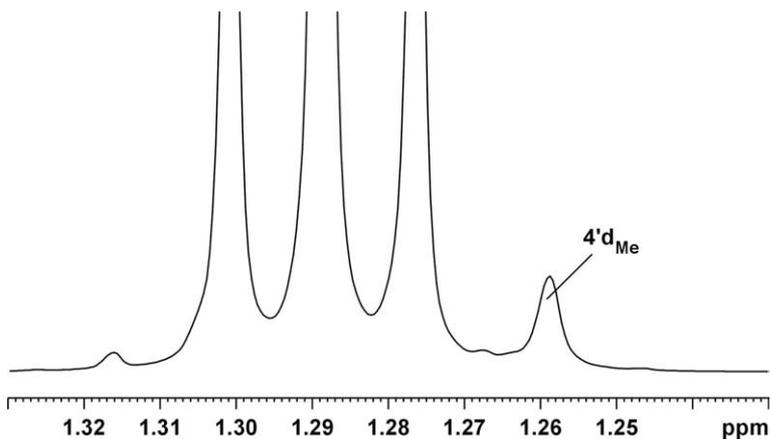


Abb. 10. Signal der Methylgruppe an C4' (d-Ring) – modifiziertes 3'-Ende in **4PM**. Das Triplet bei 1.29 ppm gehört zur Methylgruppe des Triethylammoniumions.

4. Das komplementäre Tetramer 4T

3.42 mg ($n = 2.29 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 3.27$ mM) **4T** (als Triethylammoniumsalz) wurden in 0.7 mL Phosphatpuffer (30 mM, pH 7, D₂O) gelöst.

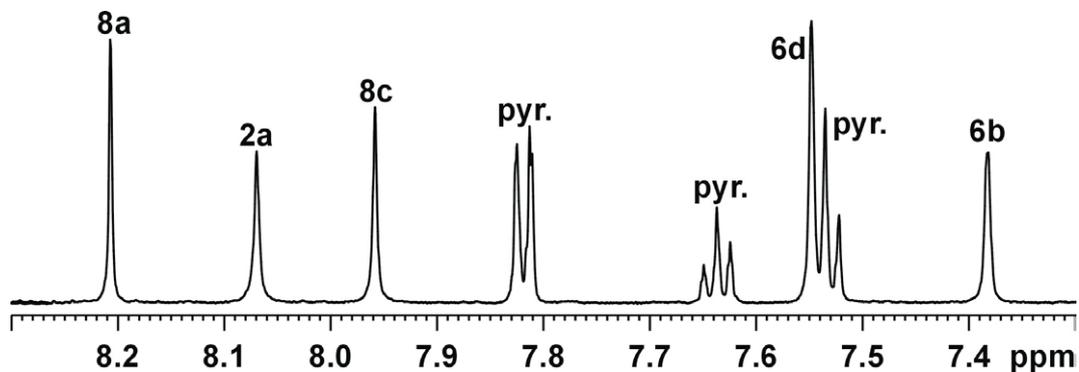


Abb. 11. ¹H Basenbereich des Komplementärstranges **4T** (600 MHz, 300 K). Die Signale des enthaltenen Pyridins sind gekennzeichnet. In **4T** vorhandene Basen: (a) Adenin, (b) Thymin, (c) Guanin, (d) Thymin

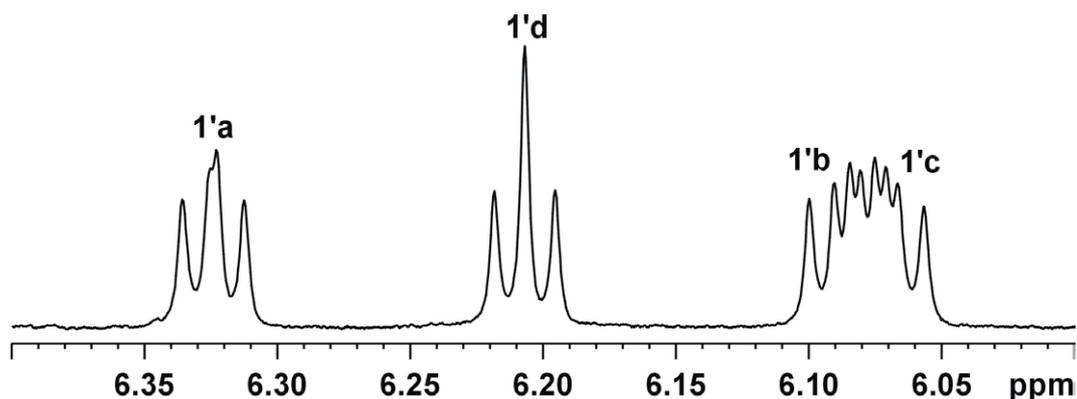


Abb. 12. ¹H Anomerenbereich von **4T** (600 MHz, 300 K).

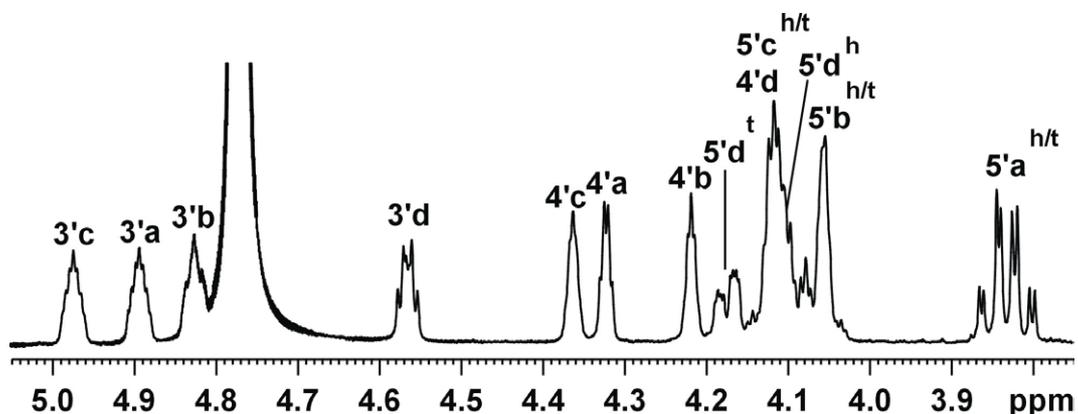


Abb. 13. Alkylbereich von **4T** (600 MHz, 300 K).

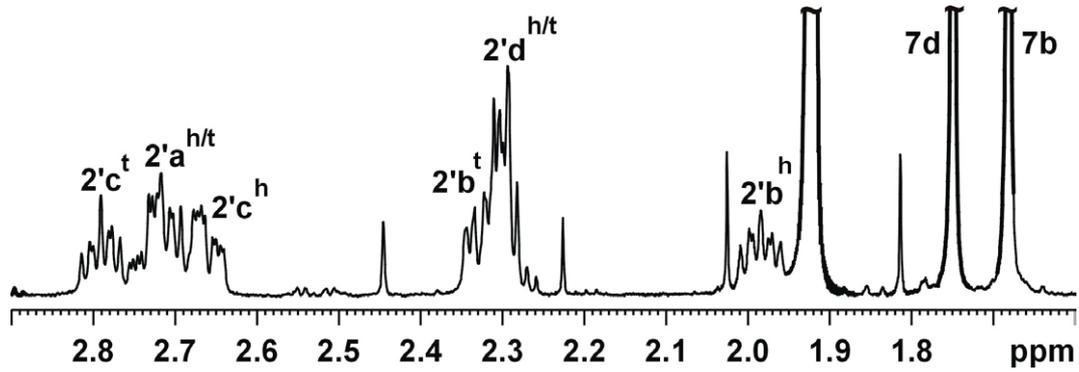


Abb. 14. Alkylbereich für **4T** mit den für Desoxyribosen typischen CH₂-Gruppen an Position C2'. Das Signal bei ca. 1.9 ppm gehört zum in der Probe enthaltenen Acetat (600 MHz, 300 K).

5. Sequentielle ROEs in den Einzelsträngen

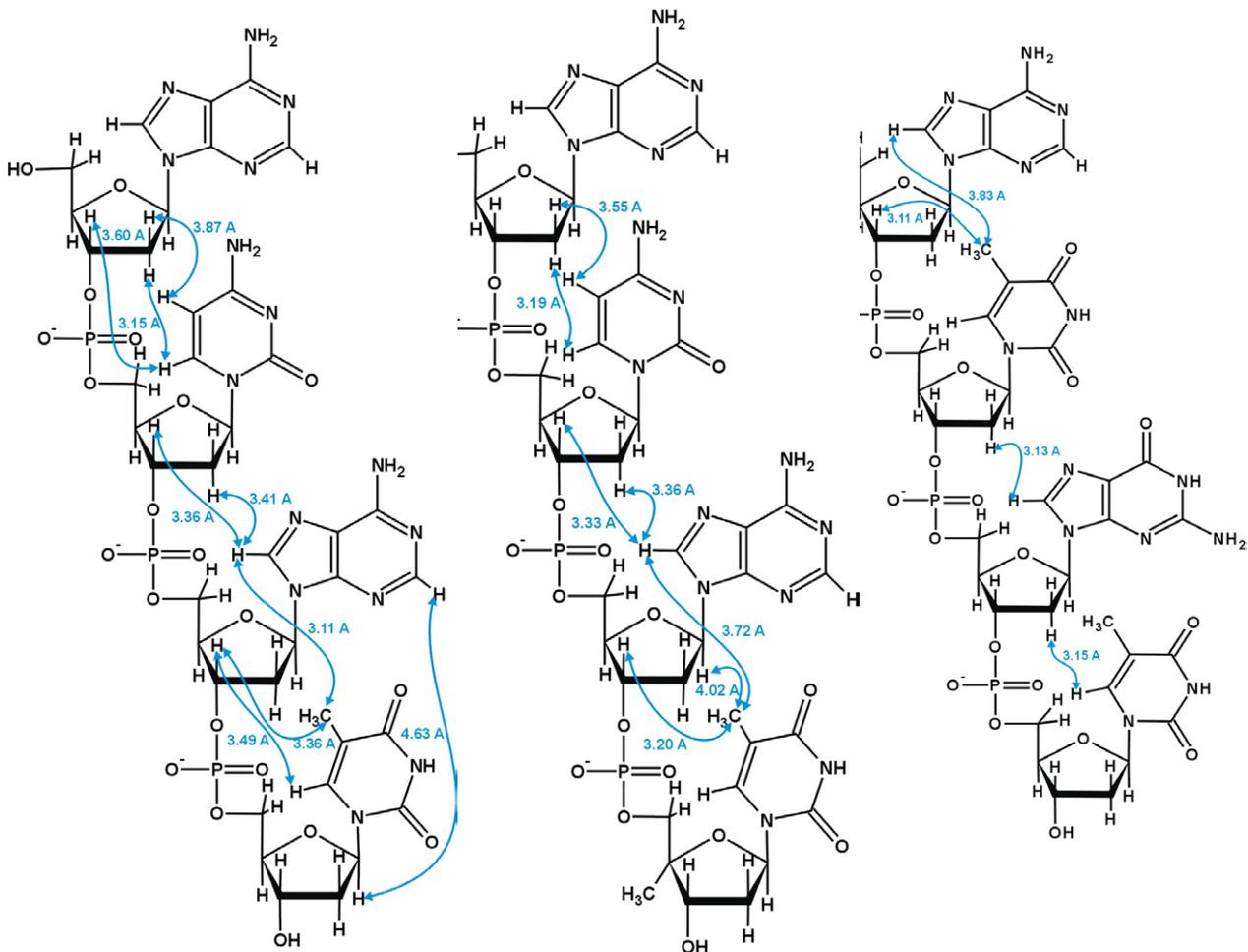


Abb. 15. Graphische Darstellung der sequentiellen ROEs für **4PH** (links), **4PM** (Mitte) und **4T** (rechts).

6. Zugabe des Komplementärstranges 4T zu 4PH bzw. 4PM

Zu **4PH** ($1.09 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.66$ mM, 700 μ L Phosphatpuffer (30 mM, pH7, D₂O)) werden 455 μ L **4T** in Phosphatpuffer (30 mM, pH7, D₂O) ($c = 2.52$ mM; $n = 1.15 \cdot 10^{-6}$ mol **4T**) gegeben.

→ Gesamtvolumen $V_{\text{ges}} = 1155$ μ L

→ **molares Verhältnis 4PH : 4T = 0.95**

Zu **4PM** ($1.25 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.79$ mM, 700 μ L Phosphatpuffer (30 mM, pH7, D₂O)) werden 515 μ L **4T** in Phosphatpuffer (30 mM, pH7, D₂O) ($c = 2.52$ mM, $n = 1.30 \cdot 10^{-6}$ mol **4T**) gegeben.

→ Gesamtvolumen $V_{\text{ges}} = 1215$ μ L

→ **molares Verhältnis 4PM : 4T = 0.96**

ANHANG

KAPITEL I: Hydroxyprotonen in polar, protischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur

1. Hydroxyprotonen verschiedener Monosaccharide in Methanol

1.1 β GalOMe + 28 eq CaCl₂ – weiterer ROESY Ausschnitt

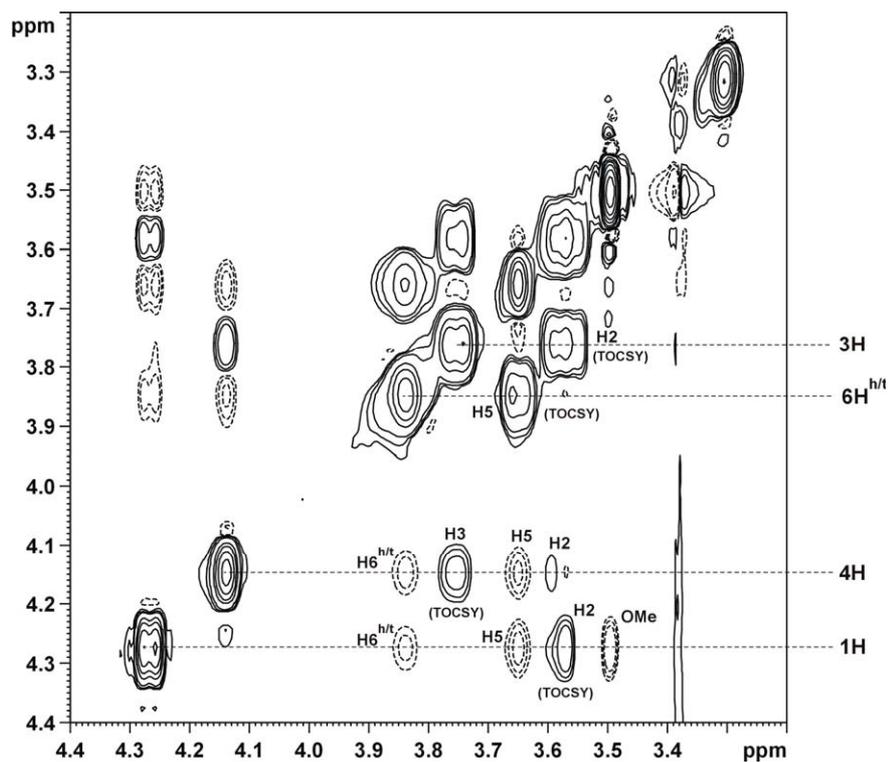
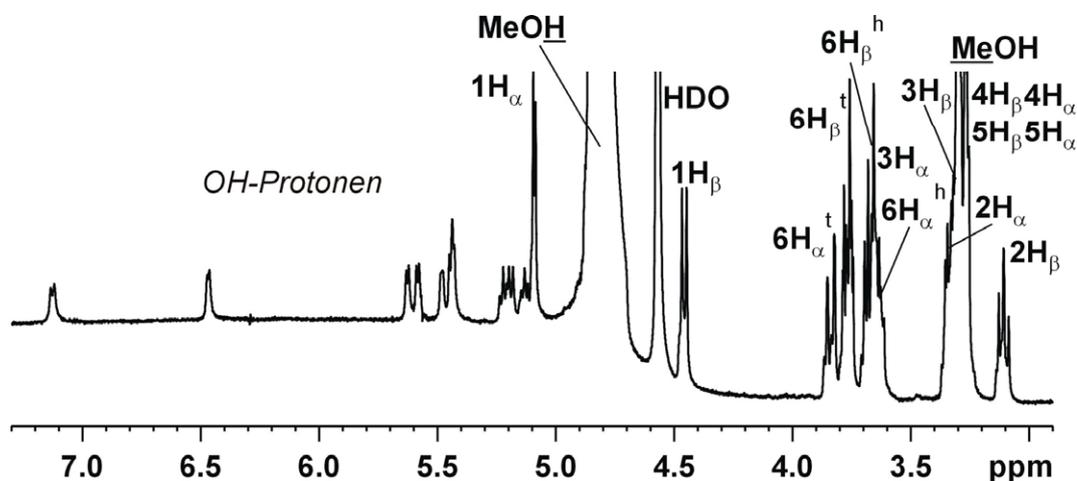


Abb. 1. Alkylbereich des ROESY Spektrums von β GalOMe in MeOH d₃:d₄ 1:1 (+ 28 eq CaCl₂, 400 MHz, 294 K).

1.2 ^1H Verschiebungen von βGalOMe in den untersuchten Proben

Atom	δ_{H} [ppm]			
	Ohne CaCl_2 (T = 294 K)	+ 28 eq CaCl_2 (T = 294 K)	CaCl_2 -gesättigt (T = 294 K)	CaCl_2 -gesättigt (T = 278 K)
1H	4.11	4.27	4.29	4.30
2H	-	3.57	3.58	3.57
3H	-	3.75	3.79	3.80
4H	3.81	4.13	4.14	4.15
5H	-	3.65	3.68	3.70
6H ^{h/t}	3.73	3.83	3.83	3.83
OMe	3.51	3.49	3.48	3.49
2OH	5.68	5.85	5.85	5.97
3OH	5.30	6.81	6.74	6.88
4OH	5.03	5.83	5.76	5.85
6OH	5.38	5.70	5.72	5.82

Tab. 1. ^1H chemische Verschiebungen für βGalOMe in den untersuchten Proben.1.3 α / β -D-Glucopyranosid – zusätzliche SpektrenAbb. 2. ^1H Spektrum von $\alpha/\beta\text{-Glc}$ in MeOH (d3:d4 = 1:1), ohne CaCl_2 -Zusatz (400 MHz, 294 K).

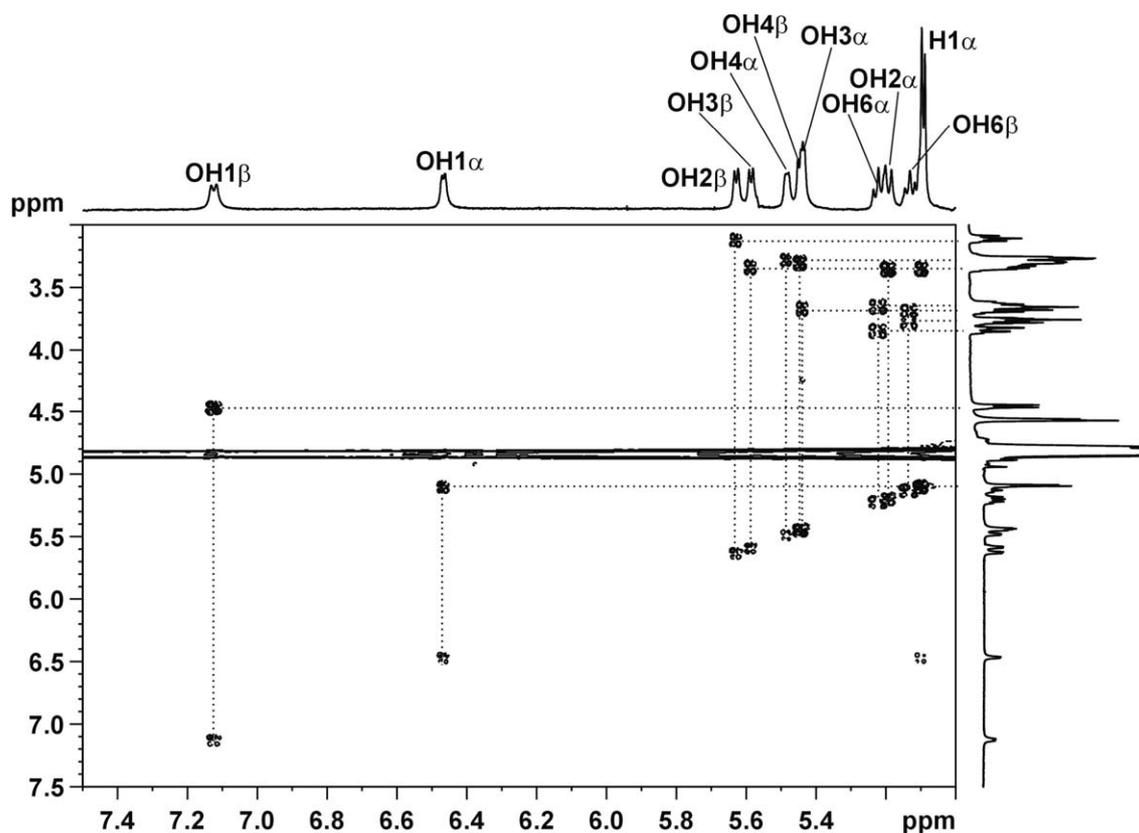


Abb. 3. OH Protonenbereich aus dem DQFCOSY von α/β -Glc in MeOH ($d_3:d_4 = 1:1$) (ohne CaCl_2 , 400 MHz, 294 K).

1.4 ^1H Verschiebungen für α/β -Glc

Atom	δ_{H} [ppm]	Atom	δ_{H} [ppm]
1H_{α}	5.09	1H_{β}	4.45
2H_{α}	3.3(4)	2H_{β}	3.11
3H_{α}	-	3H_{β}	3.3(2)
4H_{α}	*	4H_{β}	*
5H_{α}	*	5H_{β}	*
6H_{α}	t: 3.84 h: 3.63	6H_{β}	t: 3.77 h: 3.68
1OH_{α}	6.47	1OH_{β}	7.13
2OH_{α}	5.19	2OH_{β}	5.63
3OH_{α}	5.43	3OH_{β}	5.58
4OH_{α}	5.48	4OH_{β}	5.44
6OH_{α}	5.22	6OH_{β}	5.13

Tab. 2. ^1H Verschiebungen für α/β -Glc in MeOH 1:1 (ohne CaCl_2 , 400 MHz, 294 K). * = 3.24 – 3.29 ppm.

2. Saccharose in methanolischer Lösung

2.1 Temperaturreihe zwischen 280 und 310 K für Saccharose + 4 eq CaCl₂ in MeOH d3:d4 1:1

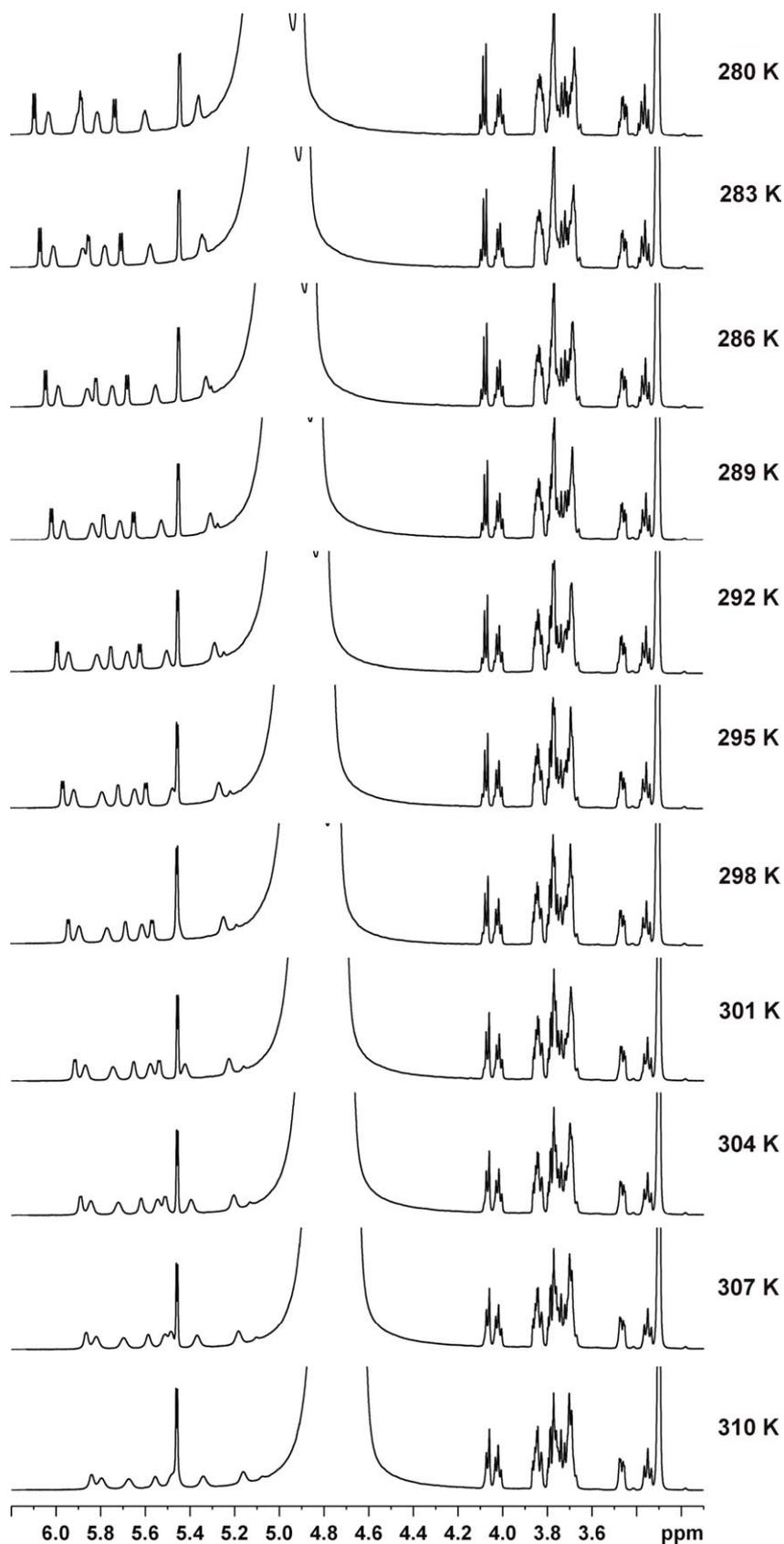


Abb. 4. ^1H Gesamtspektren von **Saccharose** in MeOH (d3:d4 = 1:1) im Temperaturbereich von 280 bis 310 K (+ 4 eq CaCl_2 , 600 MHz).

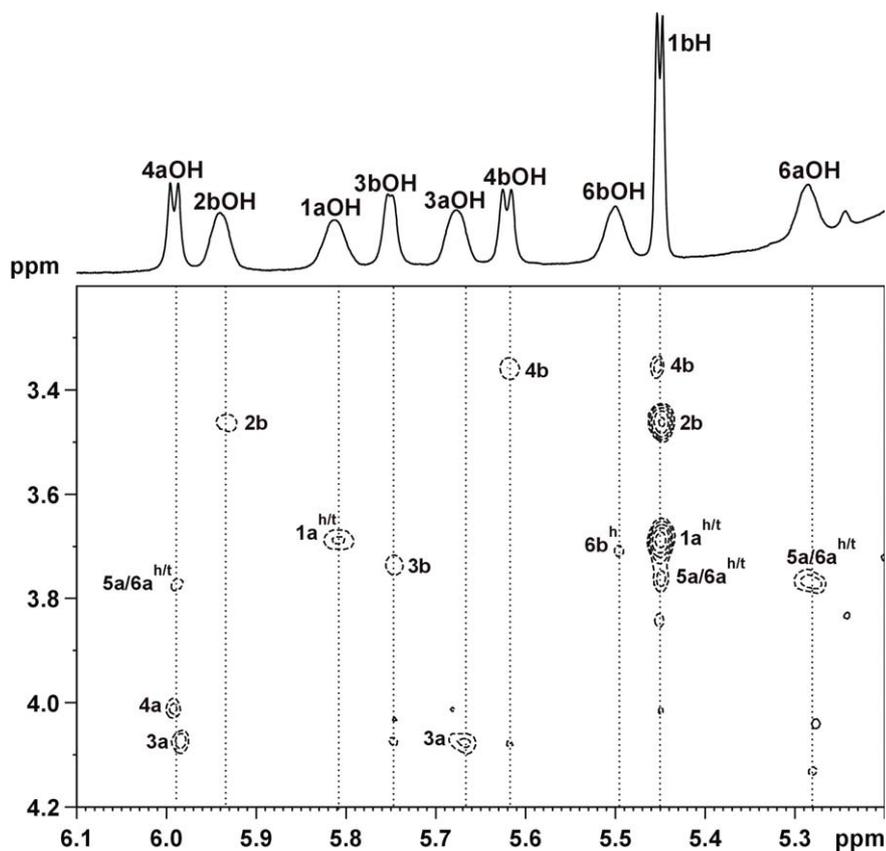
2.2 2D Spektren von Saccharose bei 292 K und 4 eq CaCl₂

Abb. 5. OH Protonen ROESY Ausschnitt für **Saccharose** in MeOH (d₃:d₄ = 1:1), + 4 eq CaCl₂ (600 MHz, 292 K).

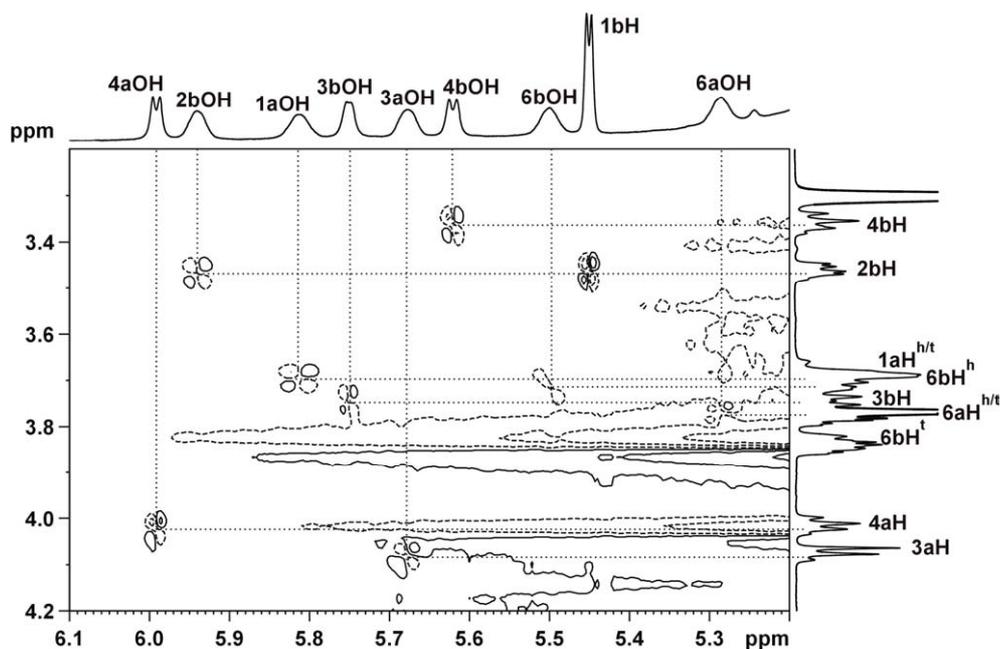


Abb. 6. OH Protonenbereich des DQFCOSY Spektrums von **Saccharose** in MeOH (d₃:d₄ = 1:1) (+ 4 eq CaCl₂, 600 MHz, 292 K).

2.3 ^1H Verschiebungen für Saccharose (+ 4 eq CaCl_2) in MeOH bei 292 K

Atom	δ_{H} [ppm]	Atom	δ_{H} [ppm]
1aH	h/t: 3.69	1bH	5.45
3aH	4.07	2bH	3.46
4aH	4.01	3bH	3.74
5aH	3.78	4bH	3.35
6aH	h/t: 3.77	5bH	3.85
1aOH	5.81	6bH	t: 3.82 h: 3.71
3aOH	5.68	2bOH	5.94
4aOH	5.99	3bOH	5.75
6aOH	5.28	4bOH	5.62
		6bOH	5.50

Tab. 3. ^1H Verschiebungen für **Saccharose** in MeOH 1:1 (4 eq CaCl_2 , 600 MHz, 292 K).

2.4 Temperaturreihe zwischen 285 und 305 K für Saccharose in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung

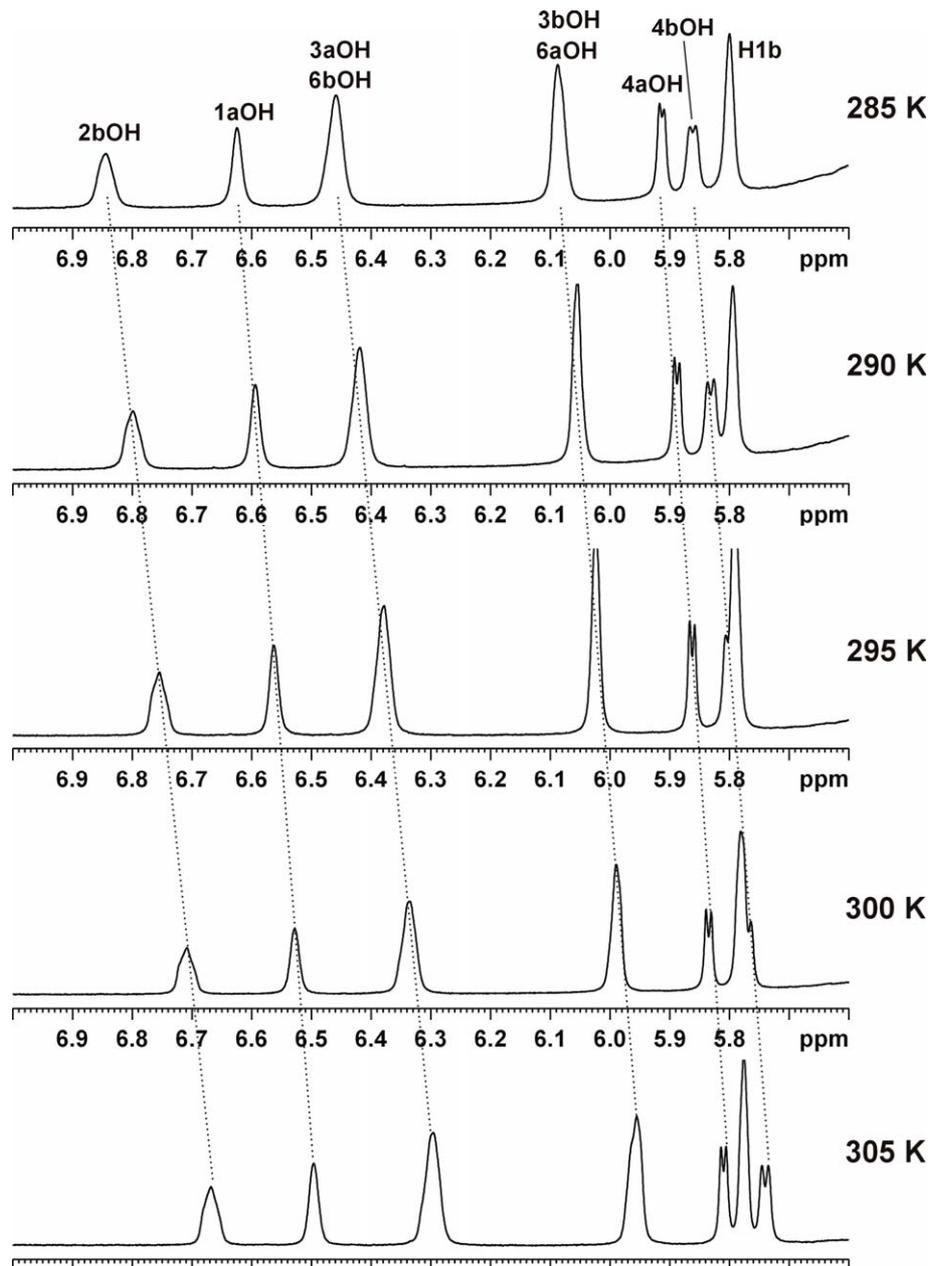


Abb. 7. ^1H OH Protonenbereich von **Saccharose** in Abhängigkeit von der Temperatur (MeOH d₃:d₄ = 1:1, CaCl₂-gesättigt, 600 MHz).

2.5 ^1H und ^{13}C Verschiebungen von Saccharose in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung (T = 294 K)

Atom	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]	Atom	δ_{H} [ppm]	δ_{C} [ppm]
1a	h: 4.02 t: 4.11	65.0	1b	5.77	95.6
2a	-	106.0	2b	3.72	72.6
3a	4.16	81.0	3b	4.02	73.3
4a	4.14	75.8	4b	3.42	71.7
5a	3.99	82.3	5b	4.00	74.9
6a	h: 3.72 t: 3.94	63.8	6b	h: 3.65 t: 4.02	63.0
1aOH	6.61	-	2bOH	6.71	-
3aOH	6.32	-	3bOH	6.08	-
4aOH	5.86	-	4bOH	5.78	-
6aOH	6.08	-	6bOH	6.41	-

Tab. 4. ^1H und ^{13}C Verschiebungen für **Saccharose** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung (MeOH 1:1, 400 MHz, 294 K).

3. BicOMe – ein Thiazolidinlactam – in Methanol 1:1

3.1 2D NOESY Spektrum bei CaCl_2 -Sättigung

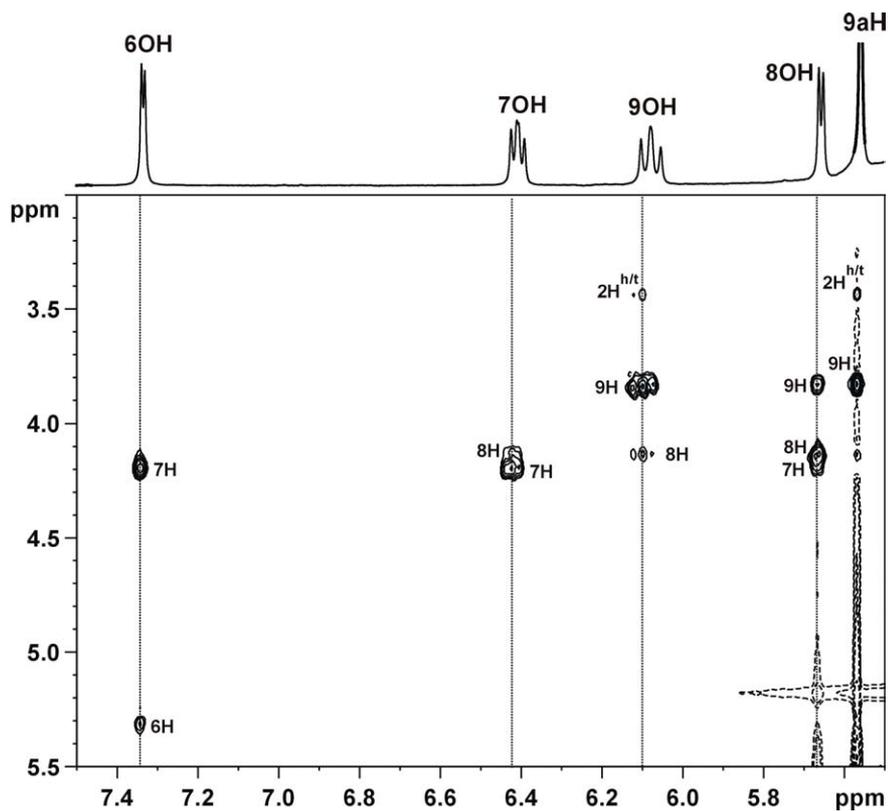


Abb. 8. Ausschnitt aus einem NOESY mit Vorsättigung ($t_m = 200$ ms) von **BicOME** in MeOH (d3:d4 = 1:1) (CaCl_2 -gesättigt, 400 MHz, 300 K).

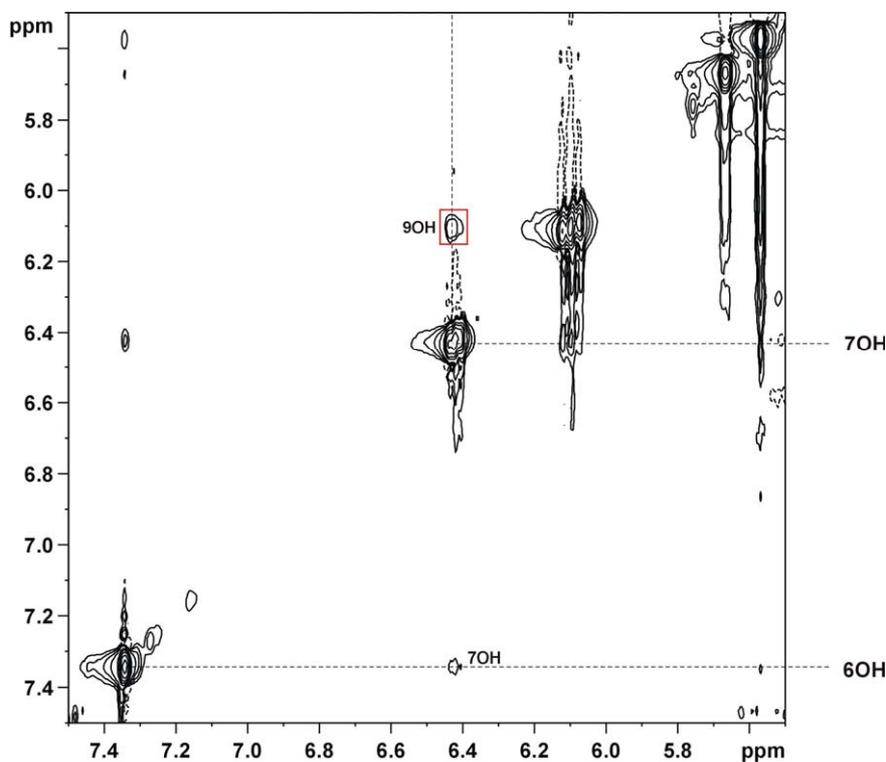


Abb. 9. OH Protonenbereich des NOESY Spektrums von **BicOME** in MeOH (d3:d4 = 1:1) (mit Vorsättigung, $t_m = 200$ ms, CaCl_2 -gesättigt, 400 MHz, 300 K).

3.2 ^1H Verschiebungen von BicOMe in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung

Atom	δ_{H} [ppm]
$2\text{H}^{\text{h/t}}$	3.42
3H	5.12
6H	~ 5.2 (unter MeOH Signal)
7H	4.18
8H	4.12
9H	3.82
9aH	5.56
OMe	3.81
6OH	7.33
7OH	6.41
8OH	5.66
9OH	6.07

Tab. 5. ^1H Verschiebungen für **BicOMe** in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung bei 300 K (MeOH 1:1, 400 MHz).

KAPITEL II: Ca^{2+} induzierte Wechselwirkungen zwischen Lewis Analoga. Analyse der 3D-Struktur

1. Le^{X} Mono

1.1 in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$

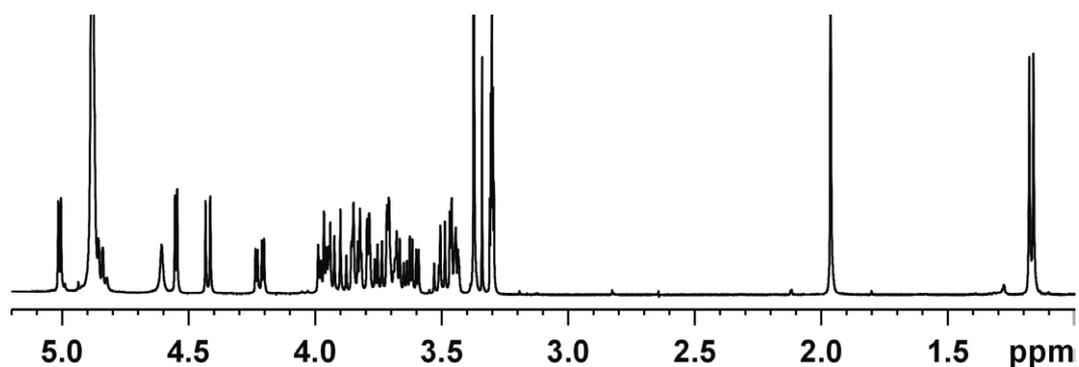


Abb. 1. ^1H Spektrum von Le^{X} Mono in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ (400 MHz, 294 K).

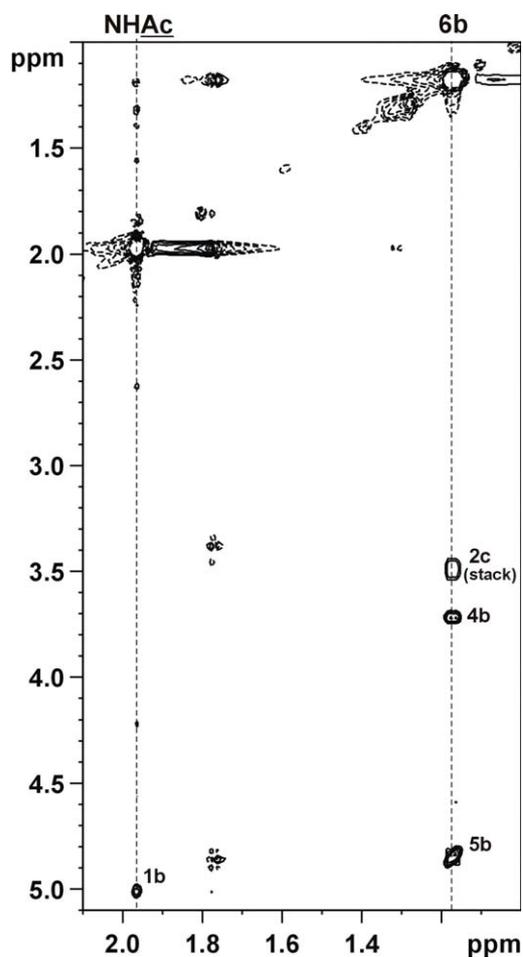


Abb. 2. ROESY Ausschnitt der Methylgruppen von Le^{X} Mono in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ (400 MHz, 294 K).

Proton	δ_H [ppm]	Proton	δ_H [ppm]
H1a	4.54	H5b	4.84
H2a	4.21	H6b	1.17
H3a	3.94	H1c	4.42
H4a	3.90	H2c	3.49
H5a	3.68	H3c	3.46
H6a	h: 3.82 / t: 3.96	H4c	3.79
H1b	5.01	H5c	3.43
H2b	3.60	H6c	h: 3.65 / t: 3.75
H3b	3.82	NHAc	1.96
H4b	3.71	OMe	3.37

Tab. 1. ^1H chemische Verschiebungen von Le^X Mono in MeOH_{d4} (400 MHz, 294 K).

1.2 in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ 1:1

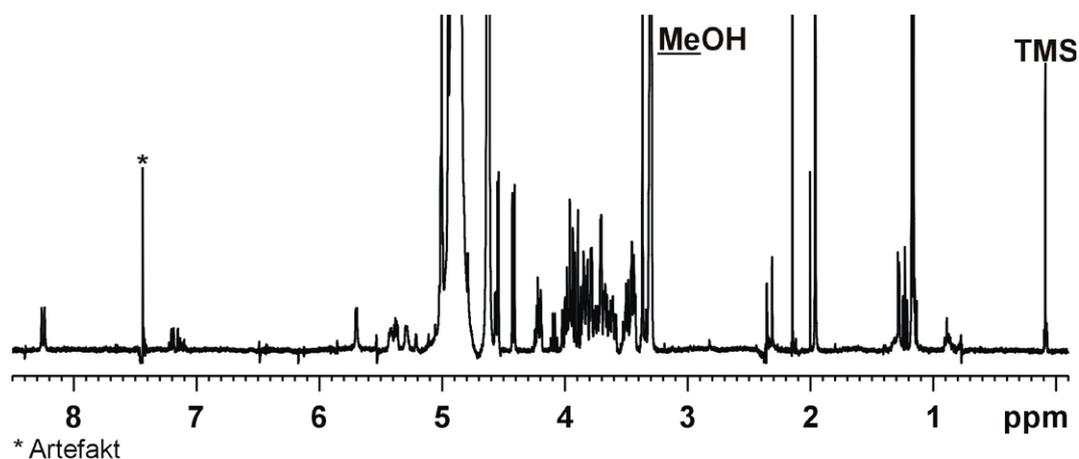


Abb. 3. ^1H Spektrum von Le^X Mono in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ 1:1 (400 MHz, 294 K).

1.3 Titration von Le^X Mono in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ mit CaCl_2

Für die Auswertung mittels Scatchardplot benötigte Daten am Beispiel der Verschiebungen für 2cOH:

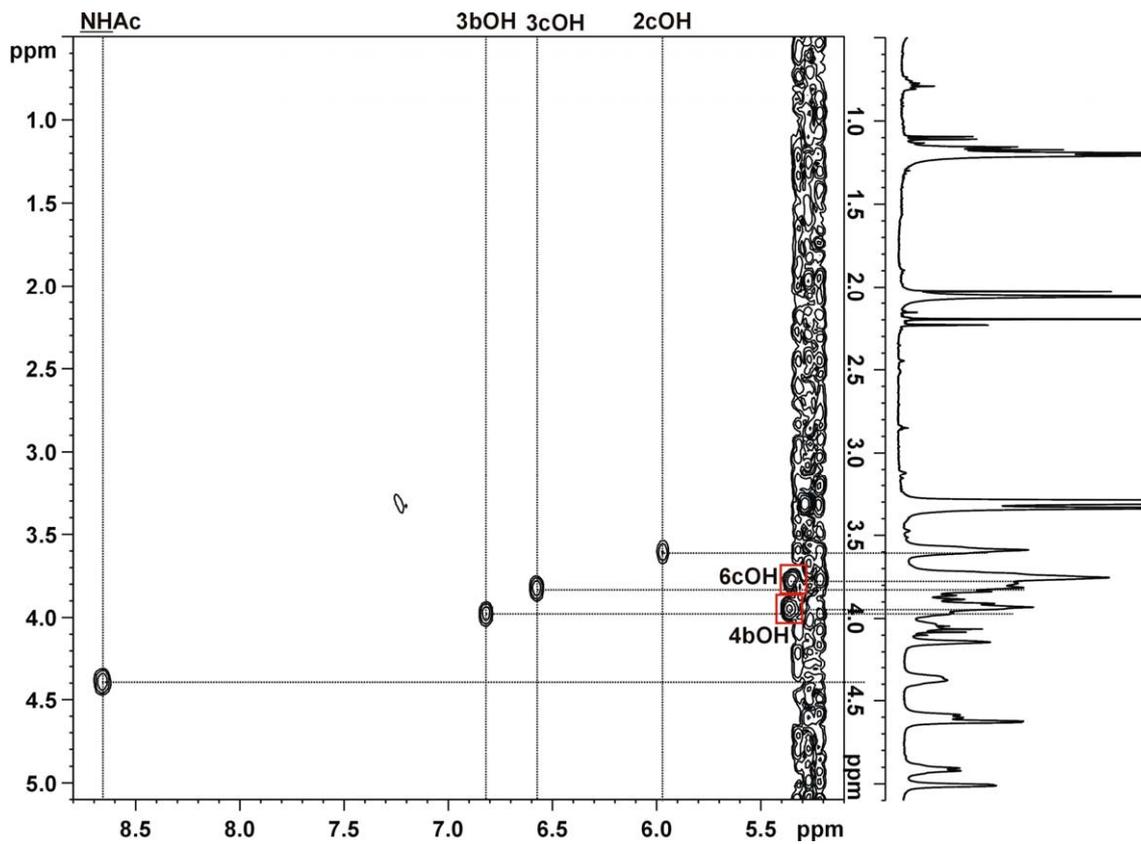


Abb. 5. Magnitude COSY mit Vorsättigung – Ausschnitt des NH-/OH-Protonenbereichs von **Le^x Mono** (MeOH_{d3}:MeOH_{d4}, CaCl₂-gesättigt, 400 MHz, 294 K).

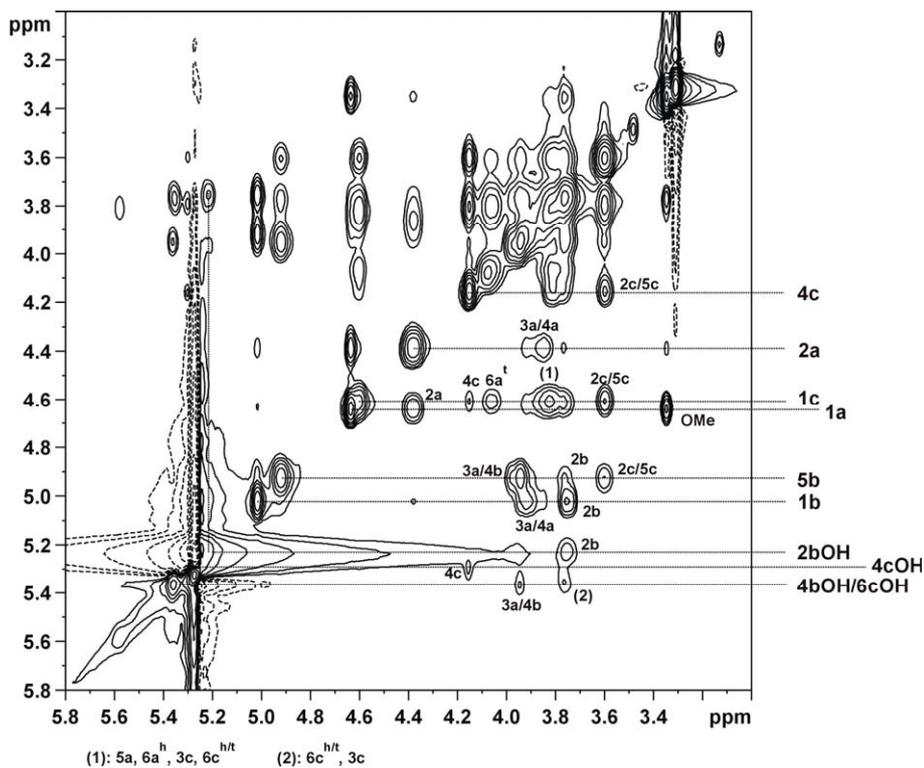


Abb. 6. NOESY Ausschnitt des Alkylbereichs von **Le^X Mono** in MeOH_{d3}:MeOH_{d4} (CaCl₂-gesättigt, 400 MHz, 294 K). Eine schwache Spindiffusion ist zu erkennen.

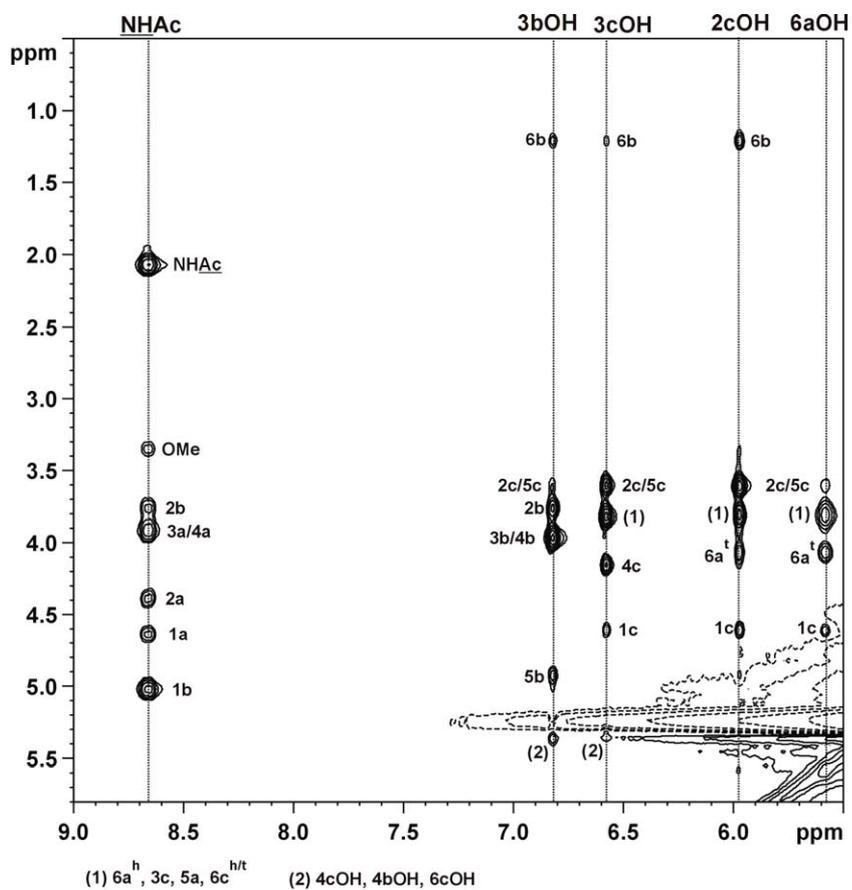


Abb. 7. OH-/NH-Protonenbereich des selben NOESY Spektrums wie in Abb. 6.

Proton	δ_H [ppm]	Proton	δ_H [ppm]
H1a	4.63	H5b	4.92
H2a	4.37	H6b	1.21
H3a	3.90	H1c	4.60
H4a	3.90	H2c	3.60
H5a	~ 3.8	H3c	3.81
H6a	h: 3.82 / t: 4.05	H4c	4.15
H1b	5.01	H5c	3.60
H2b	3.76	H6c	~ 3.80
H3b	3.97	NHAc	2.06
H4b	3.93	OMe	3.35
NH	8.65	2cOH	5.98
6aOH	5.59	3cOH	6.58
2bOH	5.21	4cOH	~ 5.35
3bOH	6.82	6cOH	~ 5.35
4bOH	~ 5.35		

Tab. 3. ^1H chemische Verschiebungen von **Le^X Mono** in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ (CaCl_2 -gesättigt, 400 MHz, 294 K).

2. Lewis^X Dimer

2.1 in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ 1:1 + 22 eq CaCl_2

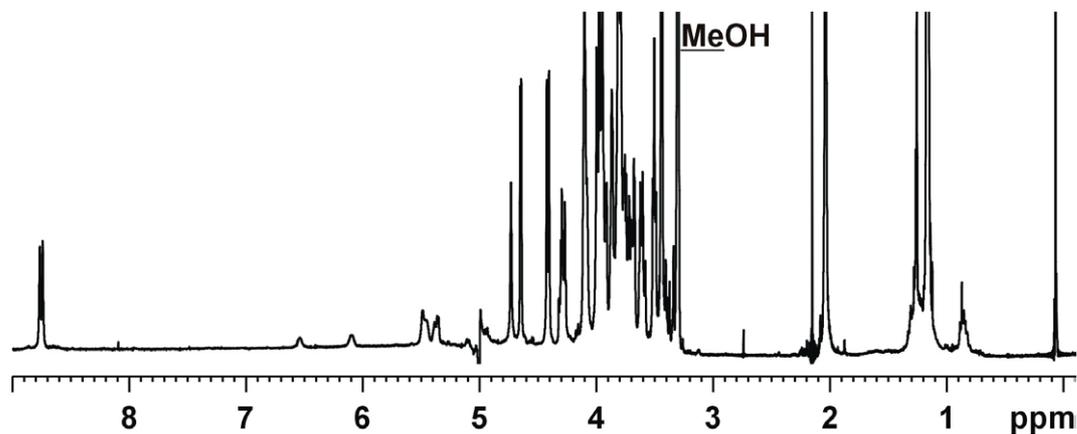


Abb. 8. ^1H mit Vorsättigung – **Le^X Dimer** in $\text{MeOH}_{d3}:\text{MeOH}_{d4}$ (22 eq CaCl_2 , 400 MHz, 294 K).

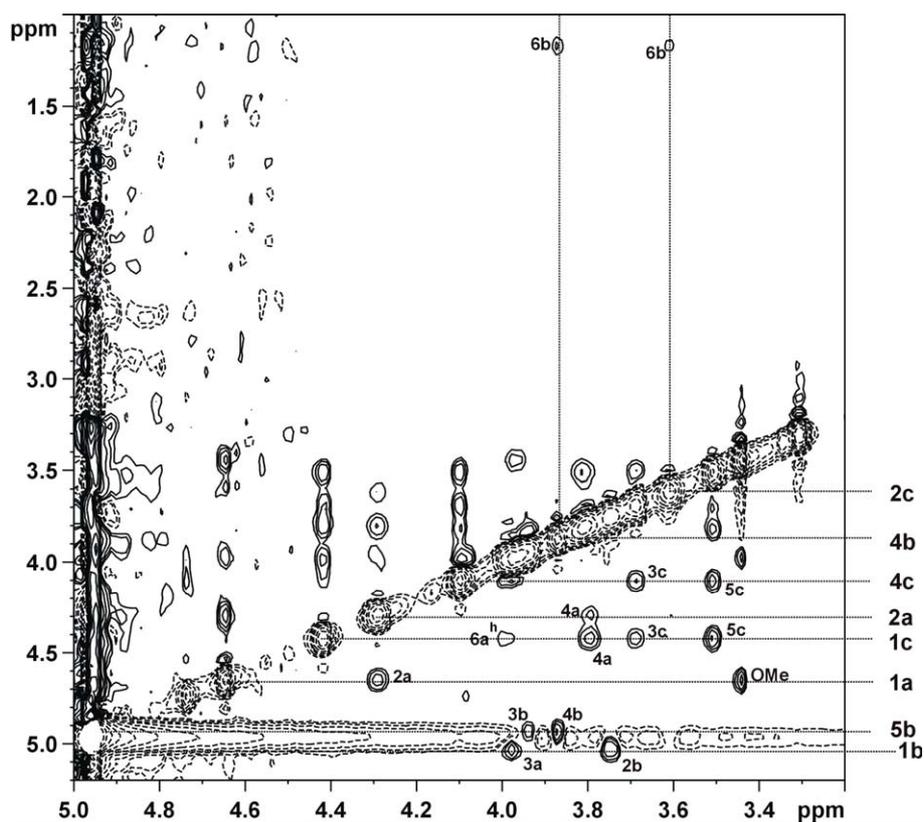


Abb. 9. ROESY Spektrum von Le^{X} Dimer in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4} + 22 \text{ eq CaCl}_2$ (600 MHz, 300 K).

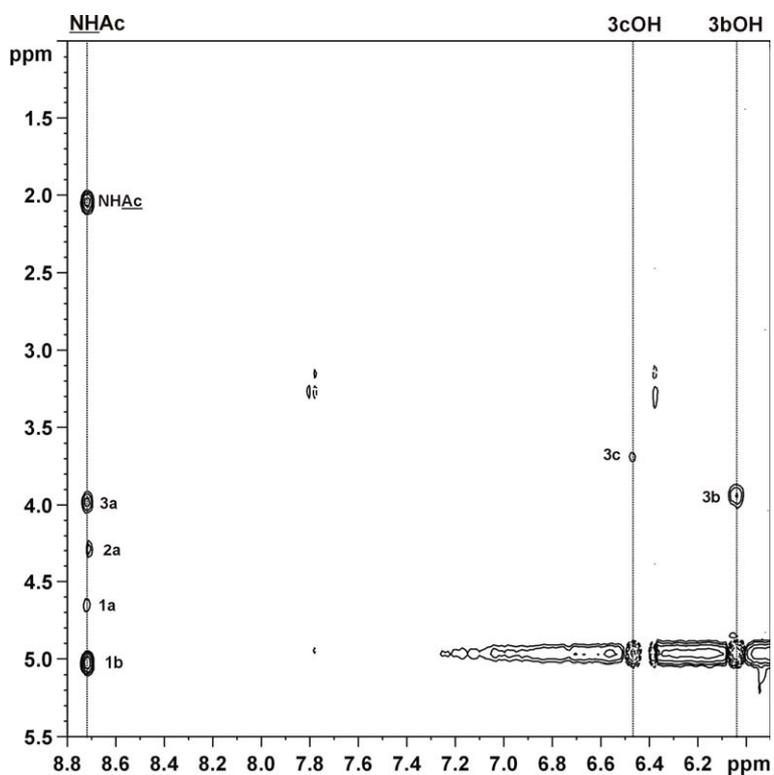


Abb. 10. ROESY Ausschnitt des NH-/OH-Protonenbereichs von Le^{X} Dimer ($\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$, 22 eq CaCl_2 , 600 MHz, 300 K).

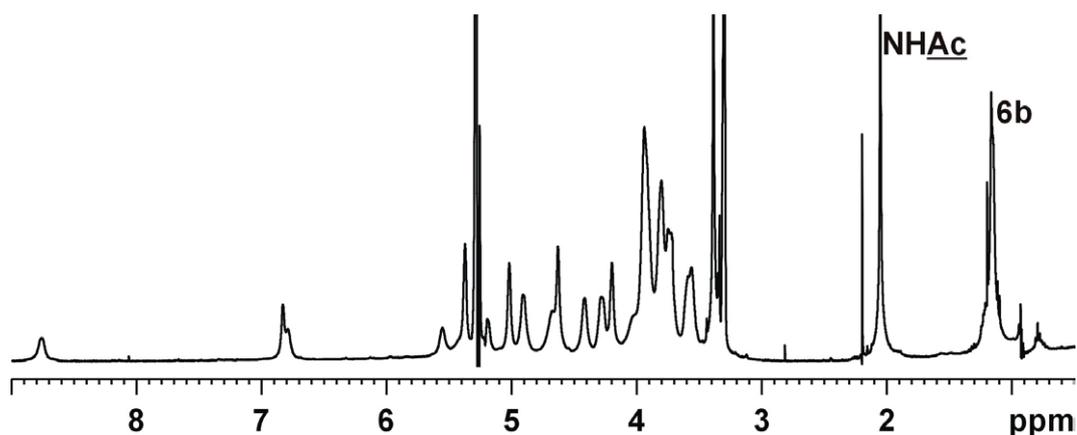
2.3 in CaCl_2 -gesättigter, methanolischer Lösung

Abb. 11. ^1H mit Vorsättigung – Le^{X} Dimer in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$, CaCl_2 -gesättigt (400 MHz, 294 K).

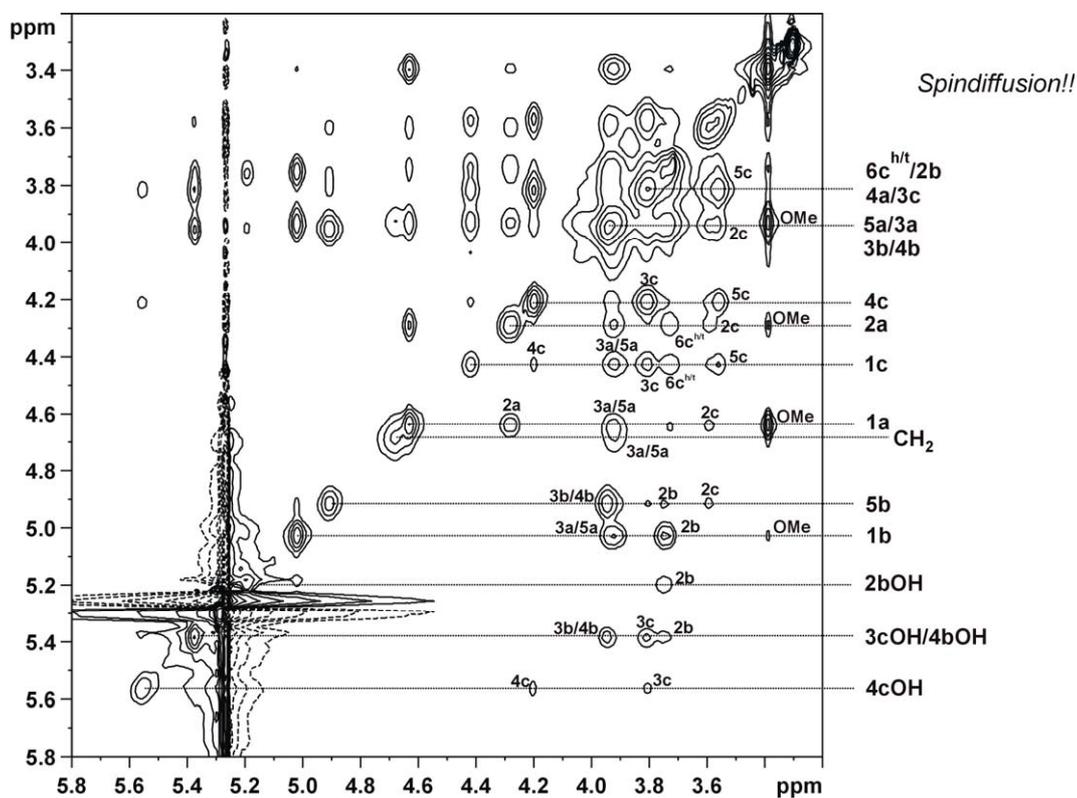


Abb. 12. NOESY Spektrum mit Vorsättigung – Le^{X} Dimer in $\text{MeOH}_{\text{d}3}:\text{MeOH}_{\text{d}4}$, CaCl_2 -gesättigt ($t_m = 100$ ms, 400 MHz, 294 K). Die Spindiffusion ist deutlich zu erkennen.

3. Le^x Glypep

3.1 in MeOH_{d4} + 30 eq CaCl₂

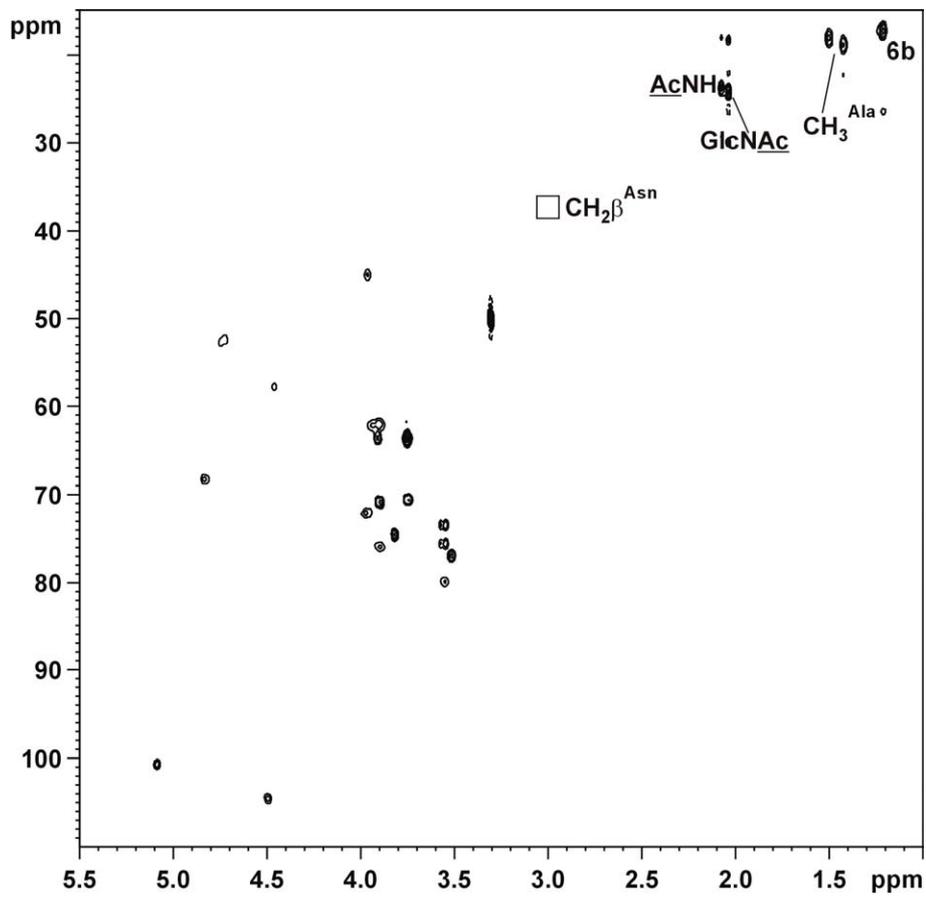


Abb. 13. HMQC von Le^x Glypep in MeOH_{d4} + 30 eq CaCl₂ (600 MHz, 300 K).

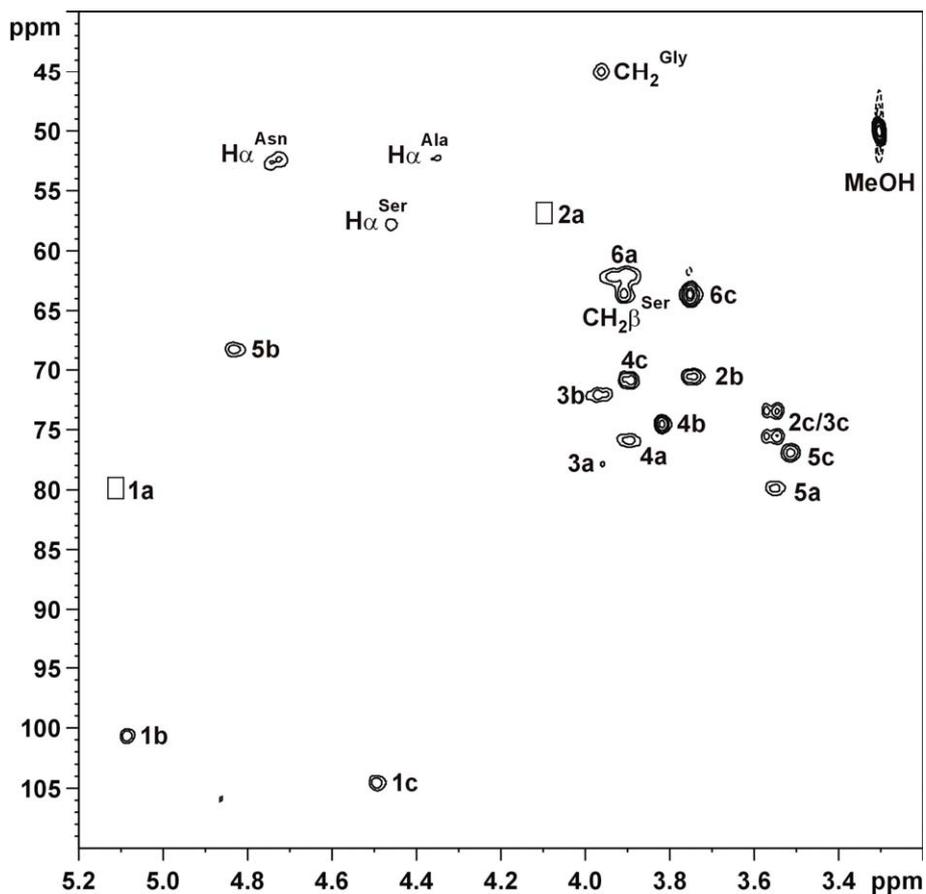


Abb. 14. Ausschnitt aus obigem HMBC – Le^{X} Glypep in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ + 30 eq CaCl_2 (600 MHz, 300 K).

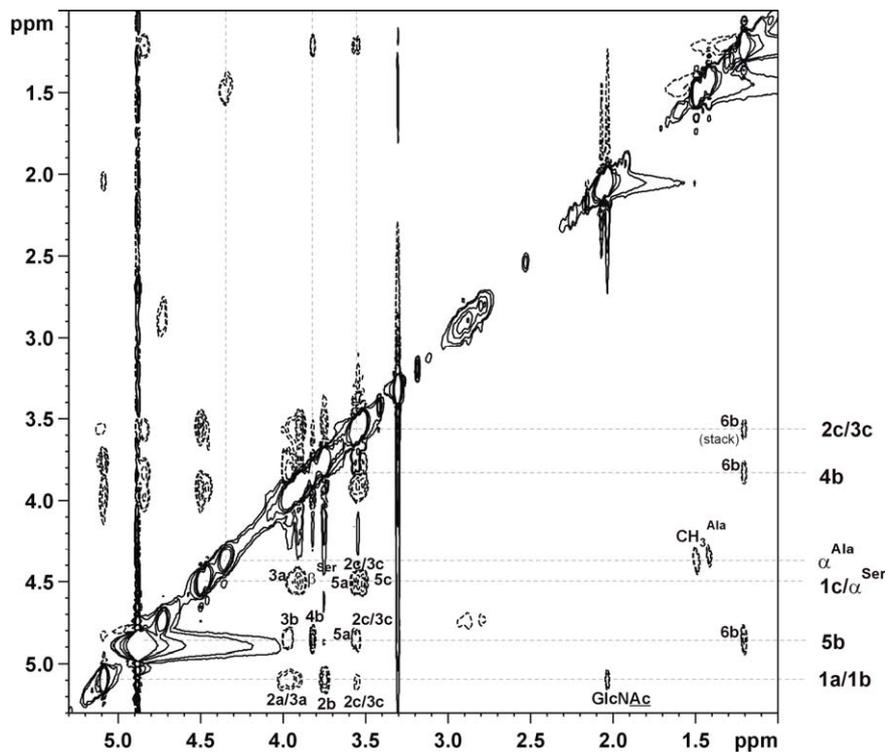


Abb. 15. ROESY Spektrum von Le^{X} Glypep in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ + 30 eq CaCl_2 (600 MHz, 300 K).

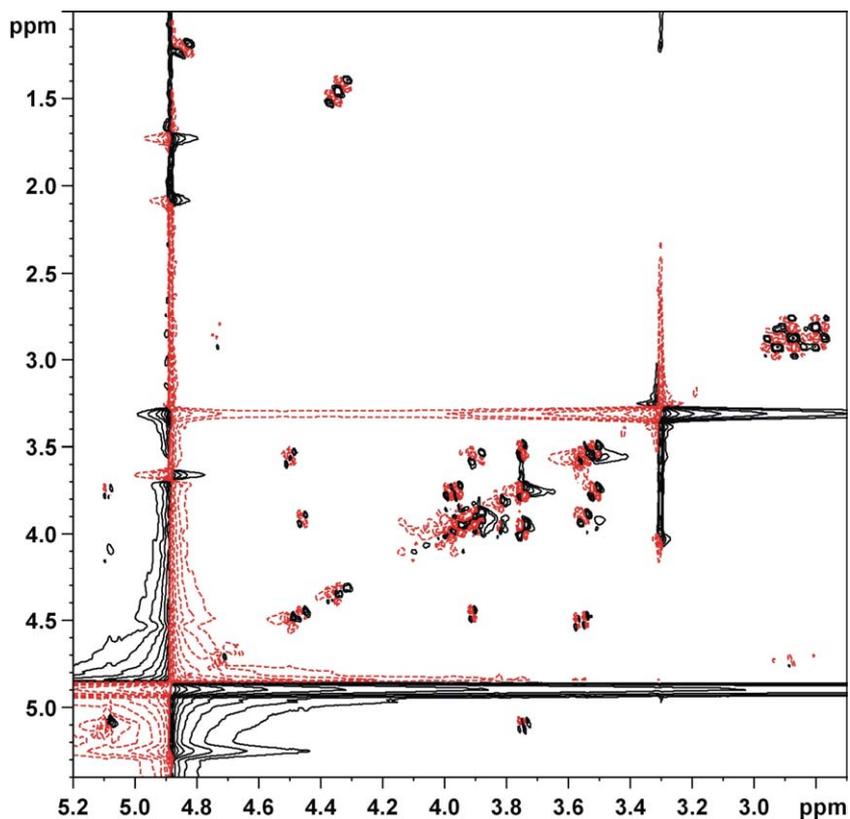


Abb. 16. DQF-COSY Spektrum von Le^{X} Glypep in $\text{MeOH}_{\text{d}4}$ + 30 eq CaCl_2 (600 MHz, 300 K).

3.2 in D_2O – ohne CaCl_2

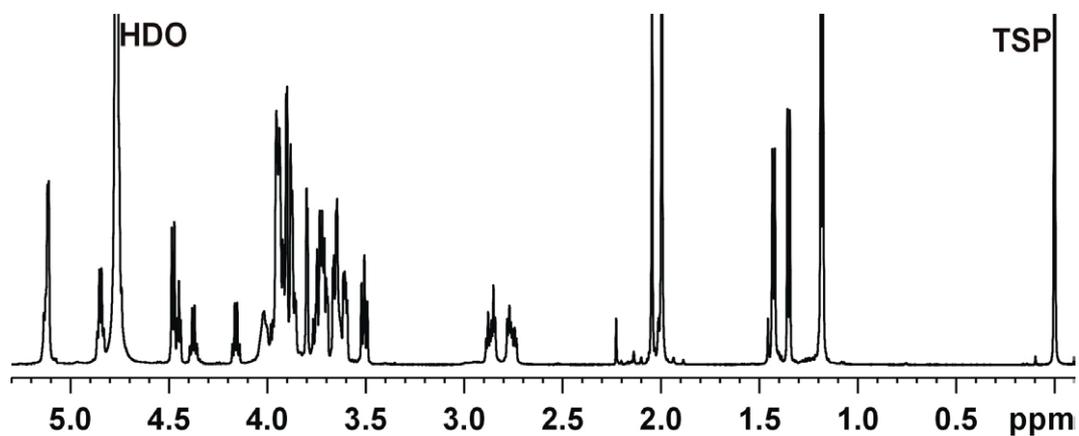


Abb. 17. ^1H Spektrum von Le^{X} Glypep in D_2O , ohne CaCl_2 (600 MHz, 300 K).

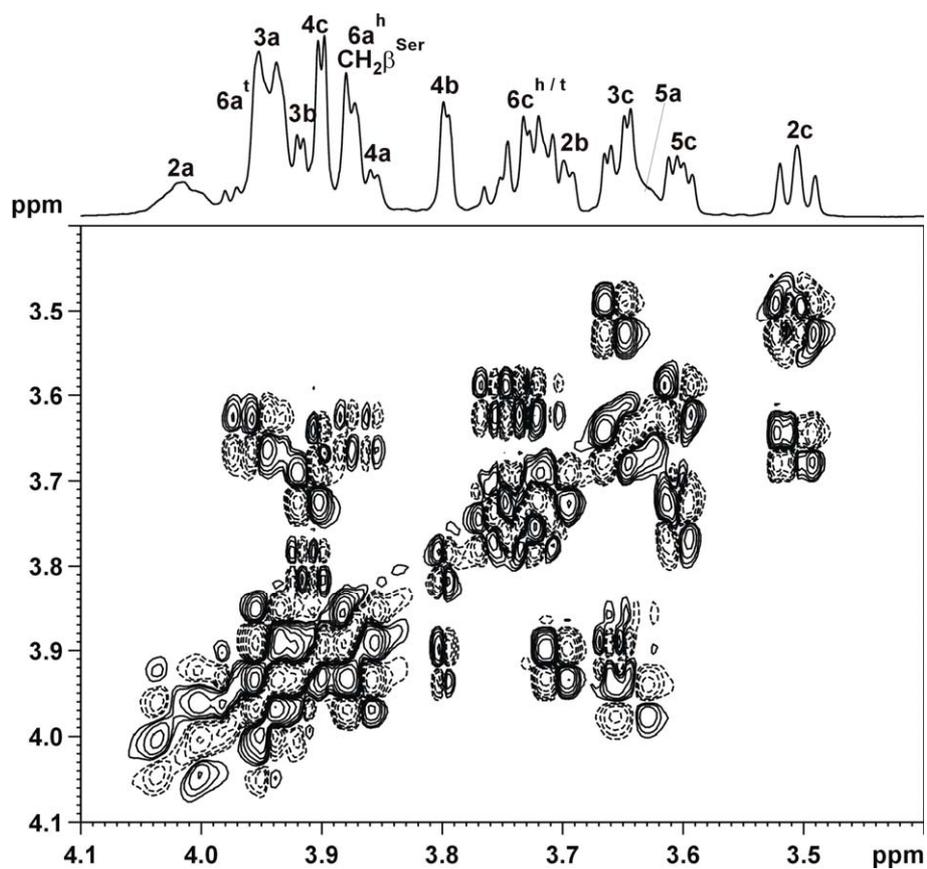


Abb. 18. Ausschnitt aus dem DQF-COSY Spektrum von **Le^x Glypep** in D₂O, ohne CaCl₂ (600 MHz, 300 K).

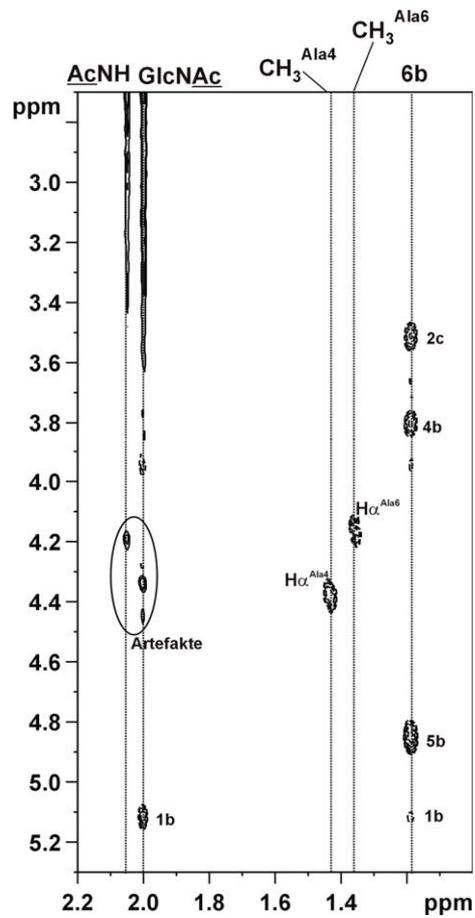


Abb. 19. Methylauschnitt aus dem ROESY Spektrum von Le^X Glypep in D₂O, ohne CaCl₂ (600 MHz, 300 K).

3.3 in D₂O – Titration mit CaCl₂

Auswertung der Titrationsdaten mittels Scatchardplot – Ergebnisse am Beispiel der Verschiebungen für H_α^{Ala4}:

max. Verschiebung Gesamtmenge
 $D_{\max} = 40,4$ $B(\text{ges}) = 6,20E-06$
 $\text{Le}^X \text{ Dimer} [\text{mol}]$

D(ges) [Hz]	Ca2+(ges) [mg]	Ca2+(ges) [mol]	Ca2+(frei) [mol]	V(ges) [µl]
0,7	0,68	6,12723E-06	6,01986E-06	702,45
2,2	2,76	2,48693E-05	2,45319E-05	709,9
3,3	8,25	7,43377E-05	7,38315E-05	729,65
4,6	10,99	9,90269E-05	9,83213E-05	739,5
4,95	13,75	0,000123896	0,000123137	749,4
5,7	19,24	0,000173365	0,00017249	769,15
6,05	24,74	0,000222923	0,000221995	788,5
6,05	27,5	0,000247792	0,000246864	798,8
6,4	41,6	0,000374842	0,000373861	798,8
6,5	54,7	0,000492882	0,000491885	798,8
8,3	107,8	0,000971346	0,000970073	798,8
20	212,99	0,001919175	0,001916107	798,8
29,1	255,93	0,002306091	0,002301628	798,8
40,4	296,98	0,002675978	0,002669781	798,8

Verschiebungen

$$\text{CaCl}_2(\text{frei}) = \text{CaCl}_2(\text{ges}) - \beta \text{GalOMe}(\text{ges})^* \nu$$

(= Komplex C)

Scatchard-Plot: $\nu/[\text{CaCl}_2(\text{frei})] = 1/K_D - (1/K_D)^* \nu$

[Ca2+(frei) [mol/l]	n=D/Dmax	B(ges)*n [mol]	n/[Ca2+(frei)]
0,008569801	0,0173267	1,07374E-07	2,021836173
0,034556818	0,0544554	3,3746E-07	1,575823469
0,101187594	0,0816832	5,06191E-07	0,807244892
0,132956393	0,1138614	7,05599E-07	0,856381431
0,164314	0,1225248	7,59286E-07	0,745674455
0,224260861	0,1410891	8,74329E-07	0,629129437
0,281540942	0,1497525	9,28016E-07	0,531903012
0,30904404	0,1497525	9,28016E-07	0,48456678
0,468027805	0,1584158	9,81703E-07	0,338475278
0,615779367	0,1608911	9,97042E-07	0,261280416
1,214412922	0,2054455	1,27315E-06	0,169172726
2,398731603	0,4950495	3,06782E-06	0,206379698
2,881356418	0,720297	4,46368E-06	0,249985398
3,342239176	1	0,000006197	0,29920061

= x-Achse = y-Achse

Tab. 5. Scatchardauswertung der Titration von Le^X Glypep mit CaCl_2 in D_2O am Beispiel der Daten für $\text{Ha}^{\text{Ala}4}$.

3.4 in D_2O + 40 eq CaCl_2

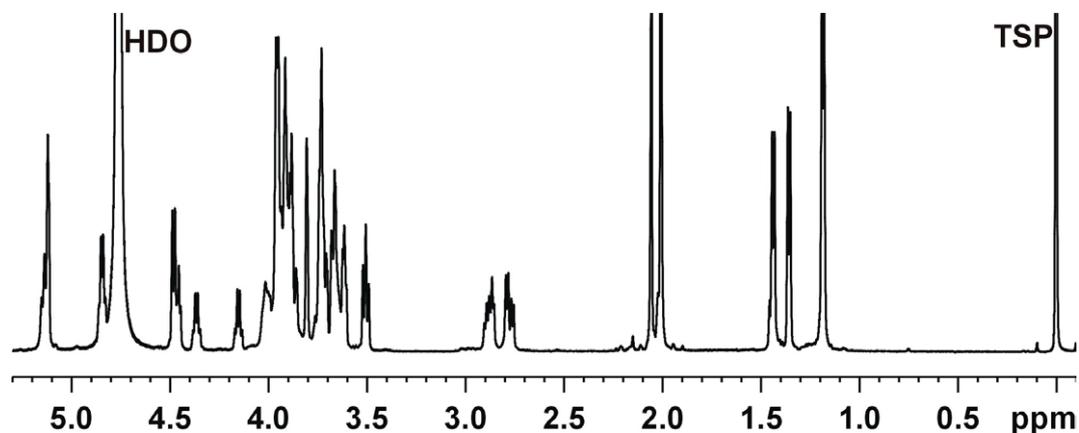


Abb. 20. ^1H Spektrum von Le^X Glypep in D_2O + 40 eq CaCl_2 (600 MHz, 300 K).

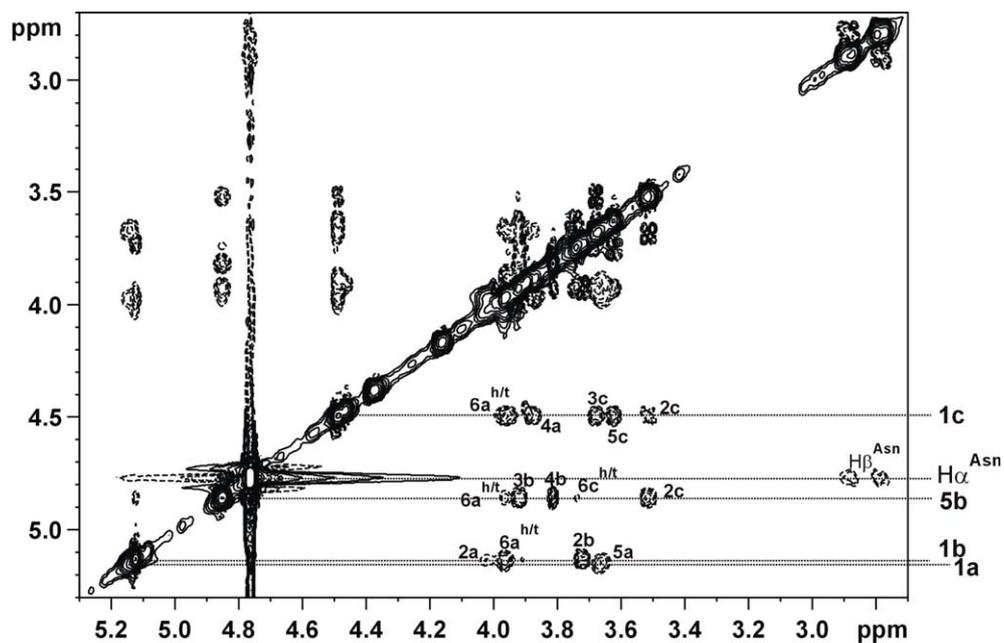


Abb. 21. ROESY Spektrum von Le^X Glypep in $\text{D}_2\text{O} + 40 \text{ eq CaCl}_2$ (600 MHz, 300 K).

3.5 in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O} 90:10$, + 40 eq CaCl_2

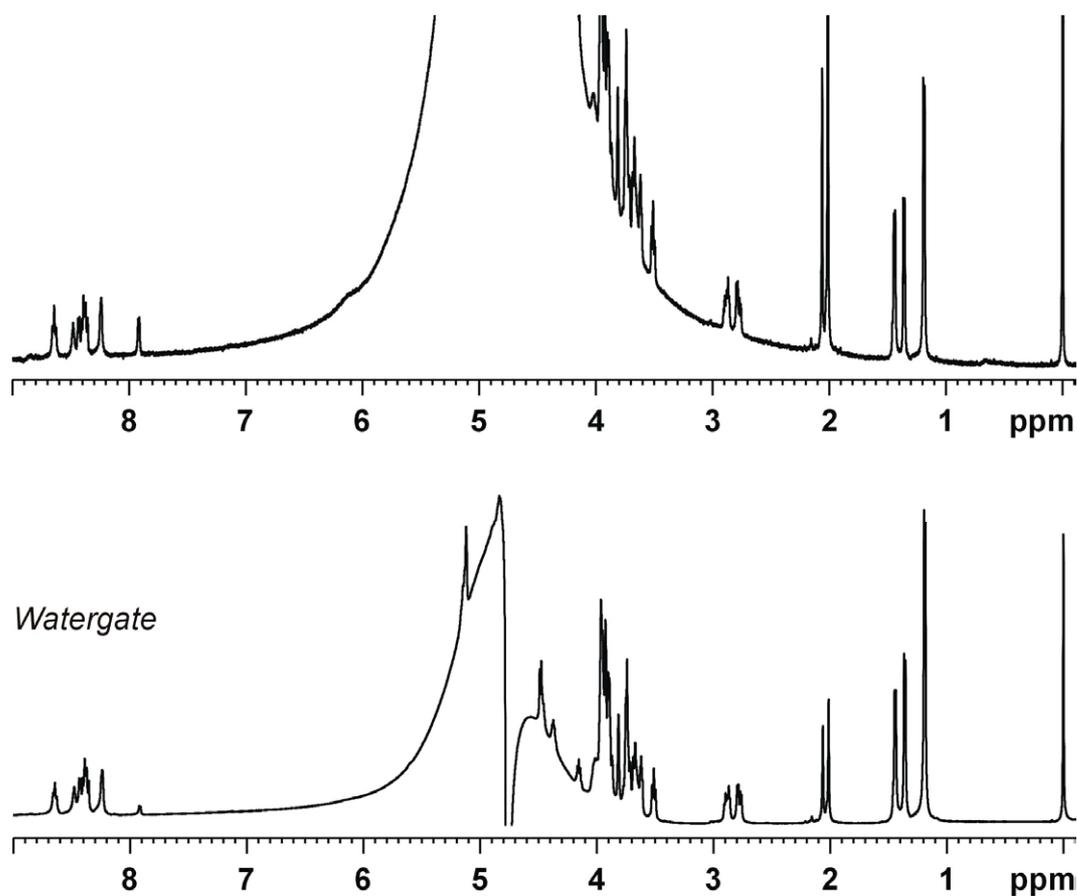


Abb. 22. ^1H Spektren ohne (oben) und mit (unten) Wasserunterdrückung mittels Watergate Sequenz – Le^X Glypep in $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O} 90:10$, + 40 eq CaCl_2 (600 MHz, 300 K).

KAPITEL III: Oligosaccharide aus dem Cyanobakterium *Nostoc*. Identifizierung und Strukturanalyse

1. Das Trisaccharid Z34

1.1 Das Trisaccharid Z34 in D₂O

Ca. 3 mg ($n = 5.95 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 8.5$ mM) **Z34** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D₂O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

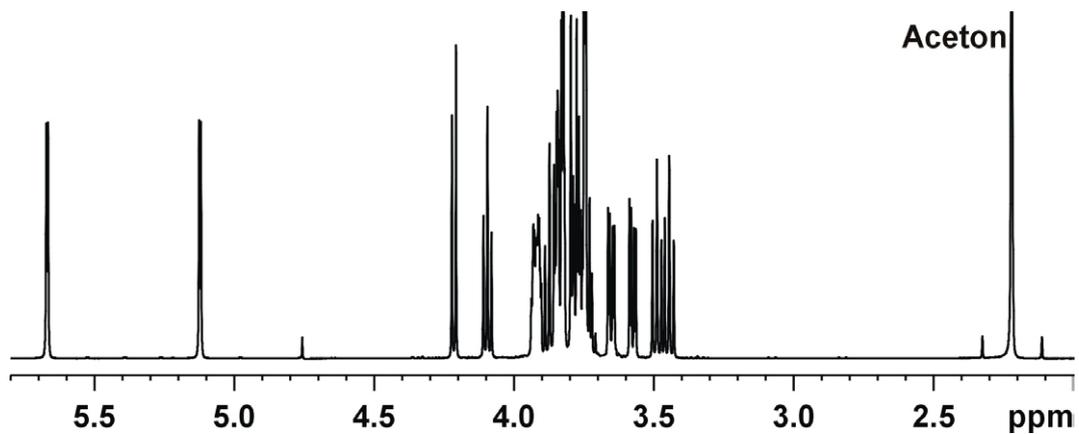


Abb. 1. ¹H Übersichtsspektrum (mit Vorsättigung) für **Z34** in D₂O bei 300 K (600 MHz).

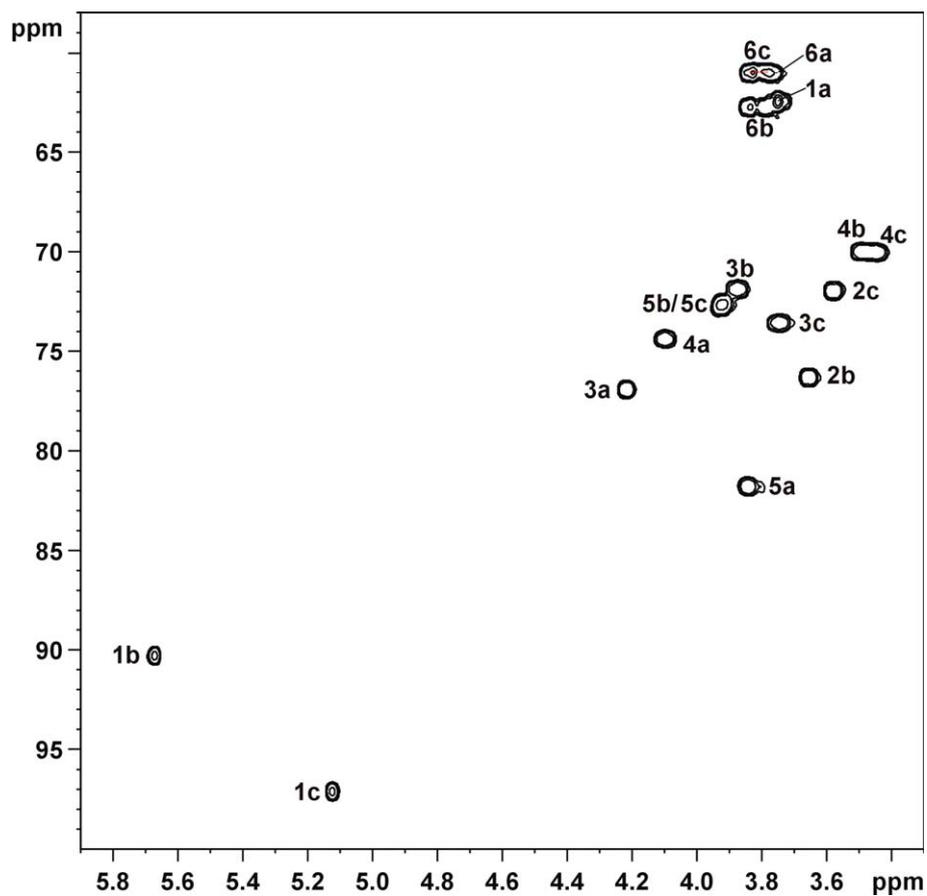


Abb. 2. 2D HMQC für **Z34** in D_2O (300 K, 600 MHz).

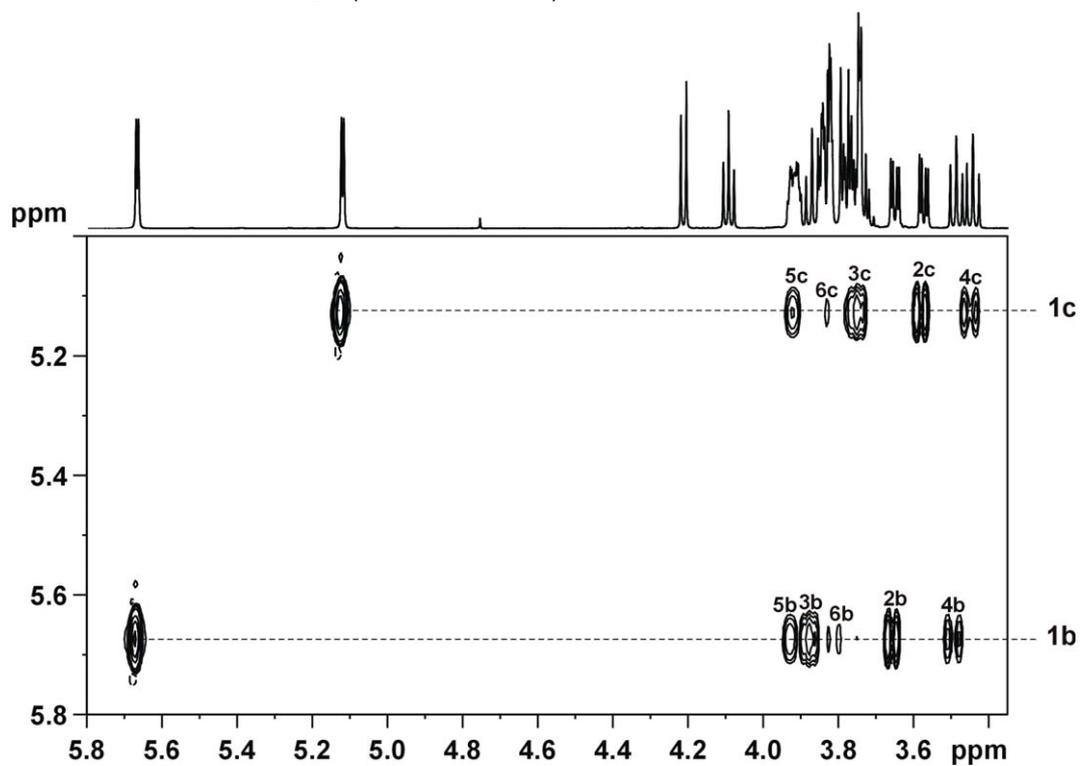


Abb. 3. 2D TOCSY Ausschnitt aus dem Anomerenbereich von **Z34** in D_2O (300 K, 600 MHz).

	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]		$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	
1a ^{h/t}	3.75	62.4		1c	5.12	97.1
2a	-	104.9		2c	3.58	71.9
3a	4.21	76.9		3c	3.75	73.5
4a	4.10	74.3		4c	3.45	70.0
5a	3.84	81.8		5c	3.91	72.6
6a ^{h/t}	3.77	60.9		6c ^h	3.77	60.9
1b	5.67	90.3		6c ^t	3.82	60.9
2b	3.65	76.3				
3b	3.87	71.8				
4b	3.49	70.0				
5b	3.93	72.6				
6b ^h	3.78	62.7				
6b ^t	3.83	62.7				

Tab. 1. ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für **Z34** (D_2O , 300 K, 600 MHz). Für das quartäre C Atom **2a** stammt die ^{13}C Verschiebung aus dem HMBC Spektrum.

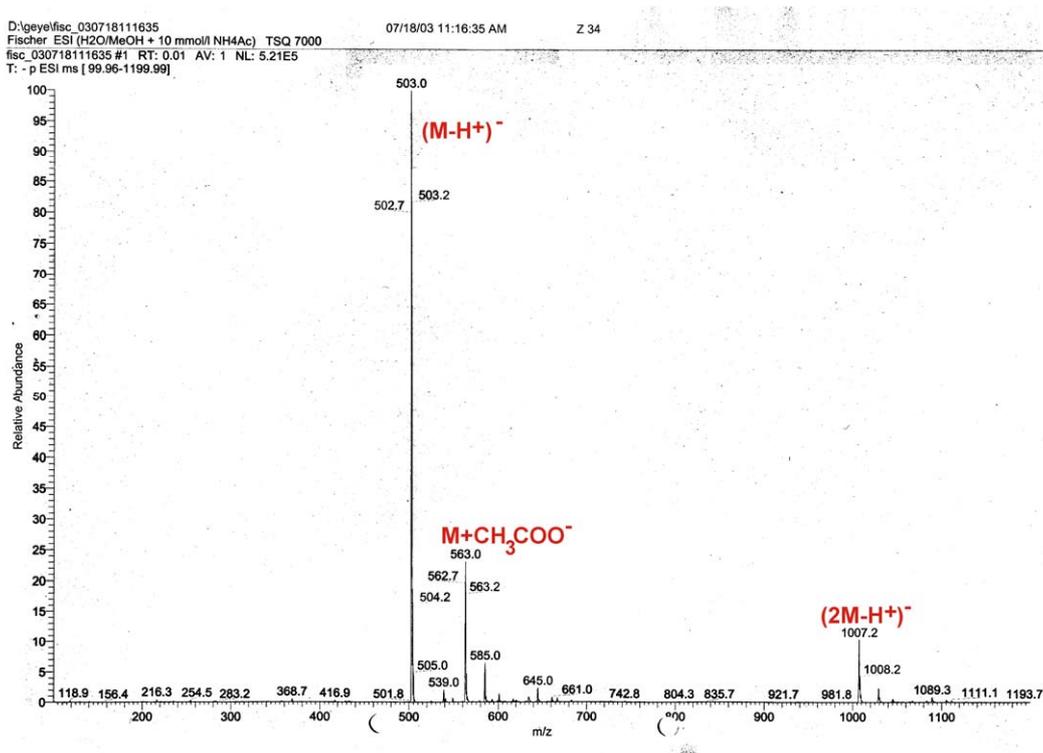


Abb. 4. Massenspektrum (Negativ-ESI) für **Z34** (im Spektrum mit M abgekürzt) in H_2O / MeOH + 10 mM NH_4Ac .

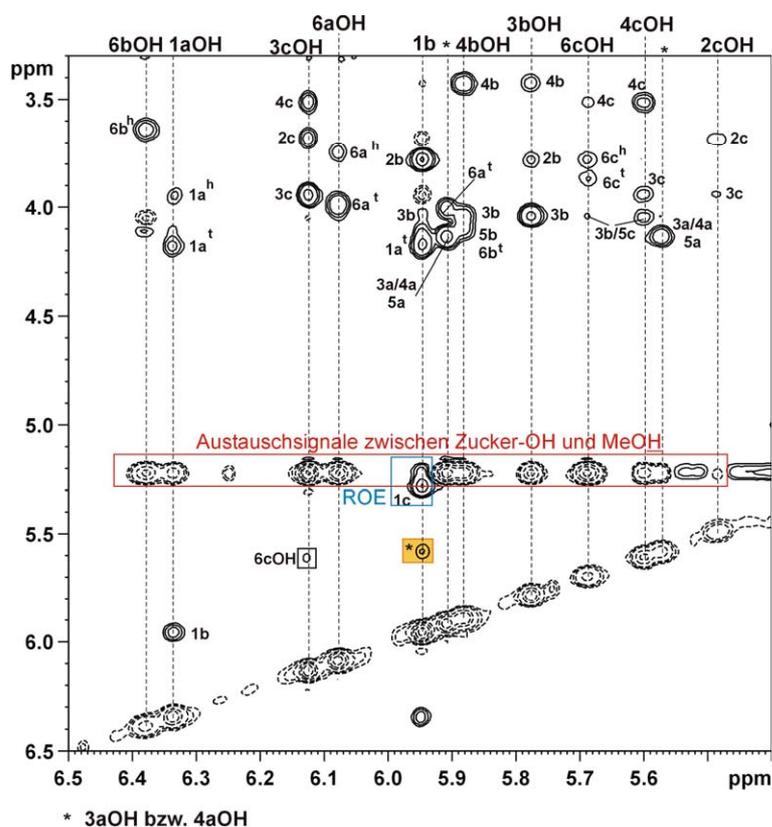
1.2 Das Trisaccharid Z34 in CaCl₂-gesättigter, methanolischer Lösung

Abb. 5. Ausschnitt aus dem OH-Bereich des ROESY Spektrums von **Z34** in MeOH (1:1, CaCl₂-gesättigt) bei 300 K (600 MHz). Orange gekennzeichnet ein CH-OH ROE, dessen eindeutige Zuordnung aber nicht gesichert sind.

$\delta^1\text{H}$ [ppm]		$\delta^1\text{H}$ [ppm]	
1a^h	3.97	1c	5.31
1a^t	4.20	2c	3.71
2a	-	3c	3.98
3a	4.17	4c	3.54
4a	4.17	5c	4.08
5a	4.17	6c^h	3.81
6a^h	3.77	6c^t	3.90
6a^t	4.02	1aOH	6.38
1b	5.99	3aOH/	5.95 bzw.
		4aOH	5.62
2b	3.81	6aOH	6.12
3b	4.07	3bOH	5.82
4b	3.45	4bOH	5.93
5b	4.13	6bOH	6.42
6b^h	3.67	2cOH	5.53
6b^t	4.13	3cOH	6.17
		4cOH	5.64
		6cOH	5.73

Tab. 2. ¹H-Verschiebungen von **Z34** in CaCl₂-gesättigter, methanolischer Lösung.

1.2.1 **Z34** in MeOH – Vergleich v. CaCl_2 -gesättigter Probe mit einer Probe mit wenig CaCl_2

Bei der oben beschriebenen Probe war, wie im Allgemeinen Teil bereits dargelegt, die Zuordnung von 3aOH und 4aOH nicht eindeutig möglich. Daher wurden Messungen derselben Probe bei geringem CaCl_2 Gehalt als Vergleich herangezogen.

Probe mit **wenig** CaCl_2 : 13.3 mg CaCl_2 ($n = 1.2 \cdot 10^{-4}$ mol), entspricht einer ca. 0.1 M methanolischen CaCl_2 -Lösung.

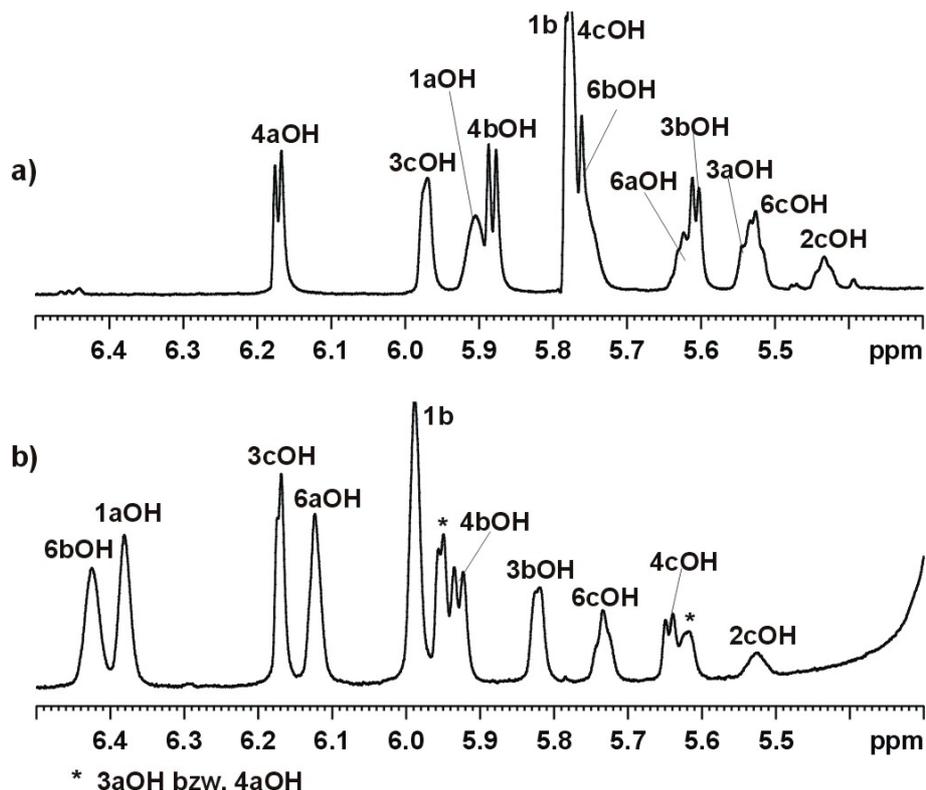


Abb. 6. Vergleich des OH-/Anomerenbereichs der ^1H Spektren von **Z34** in MeOH (1:1) mit wenig CaCl_2 (a) bei 280 K und CaCl_2 -gesättigt (b) bei 300 K (600 MHz).

Eine eindeutige Zuordnung durch Vergleich ist allerdings nicht möglich, da sich deutliche Unterschiede für die Verschiebungen der OH Protonen in Abhängigkeit von CaCl_2 -Gehalt und Temperatur zeigen.

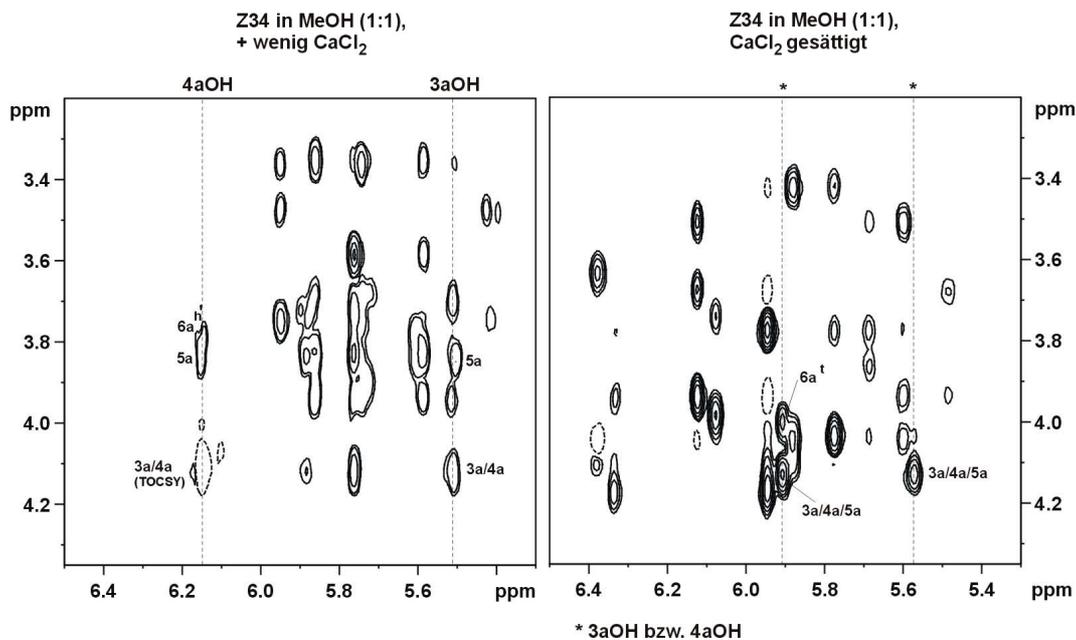


Abb. 7. Vergleich der ROE Muster für **Z34** in MeOH (1:1) – links, bei Zugabe von wenig CaCl₂ (280 K) und rechts, in CaCl₂ gesättigter Lösung (300 K).

2. Das Tetrasaccharid HZ34

2.1 in D₂O

Ca. 2 mg ($n = 3.00 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 4.3$ mM) **HZ34** (lyophyllisiert) wurden in 0.7 mL D₂O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

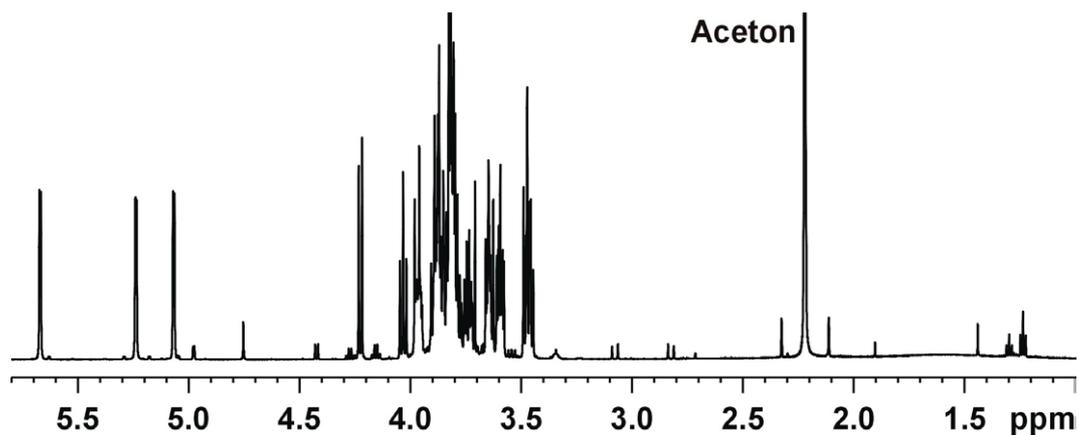


Abb. 8. ¹H Gesamtspektrum (mit Vorsättigung) von **HZ34** in D₂O (300 K, 600 MHz).

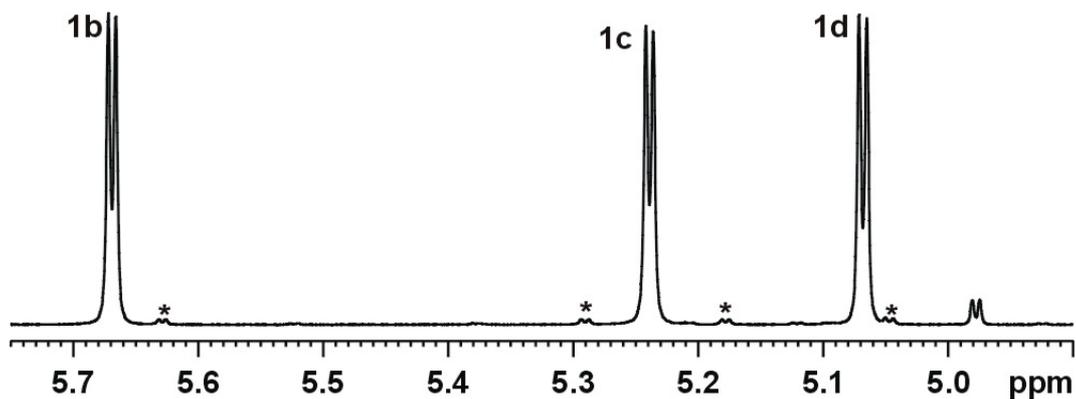


Abb. 9. ¹H Anomerenbereich für **HZ34** in D₂O (300 K, 600 MHz). Mit * gekennzeichnet sind die Anomeren-signale des Pentasaccharids **HHZ34** (Verunreinigung).

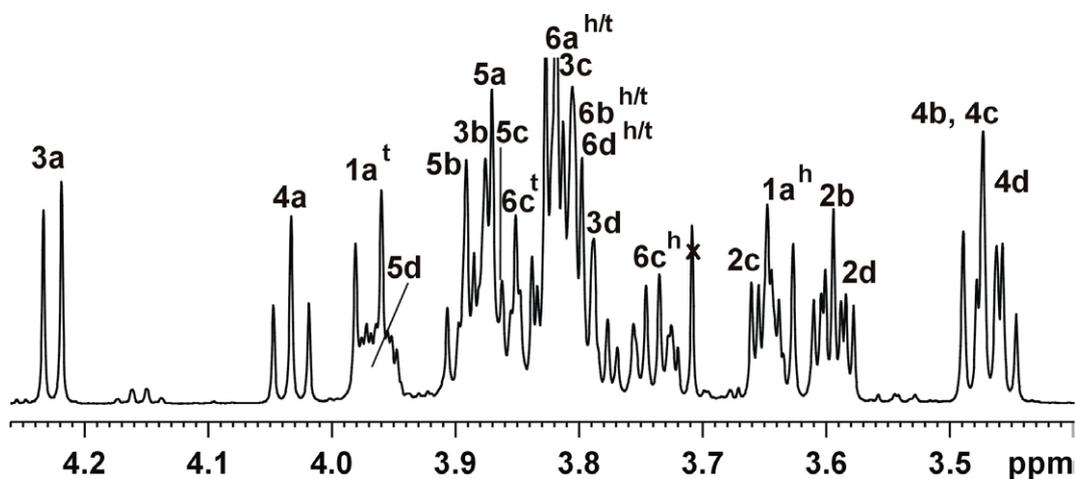


Abb. 10. ¹H Alkylbereich für **HZ34** in D₂O (300 K, 600 MHz).

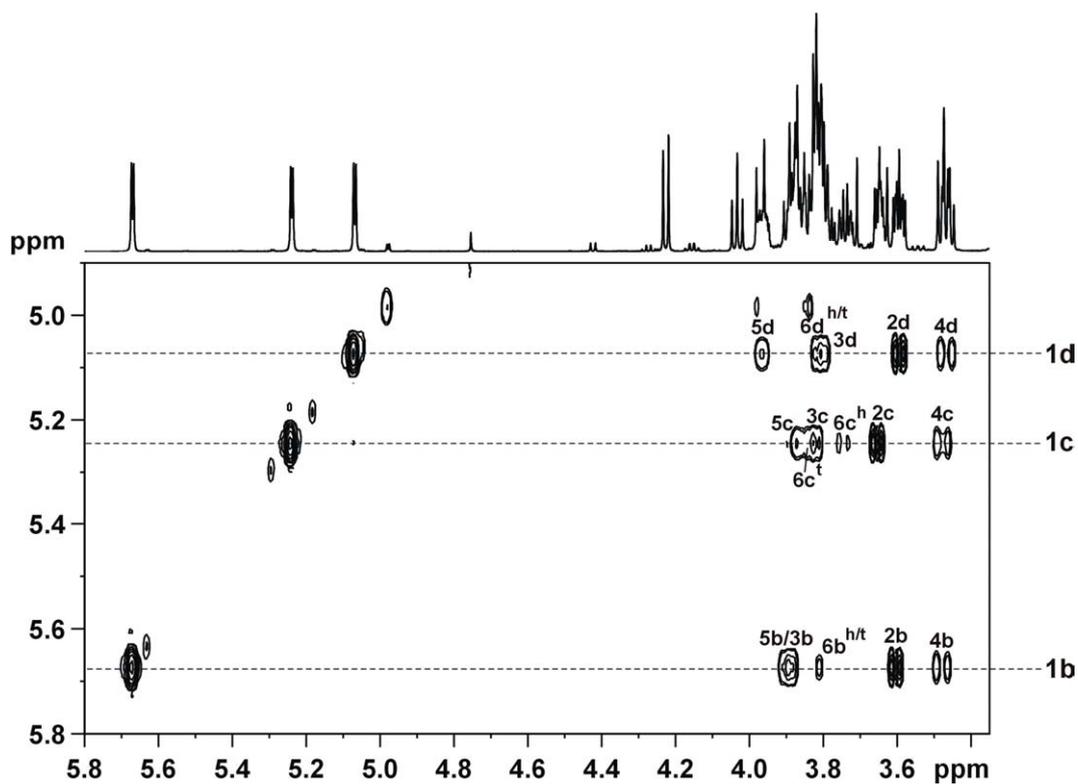


Abb. 11. 2D TOCSY Ausschnitt aus dem Anomerenbereich für **HZ34** in D₂O (300 K, 600 MHz).

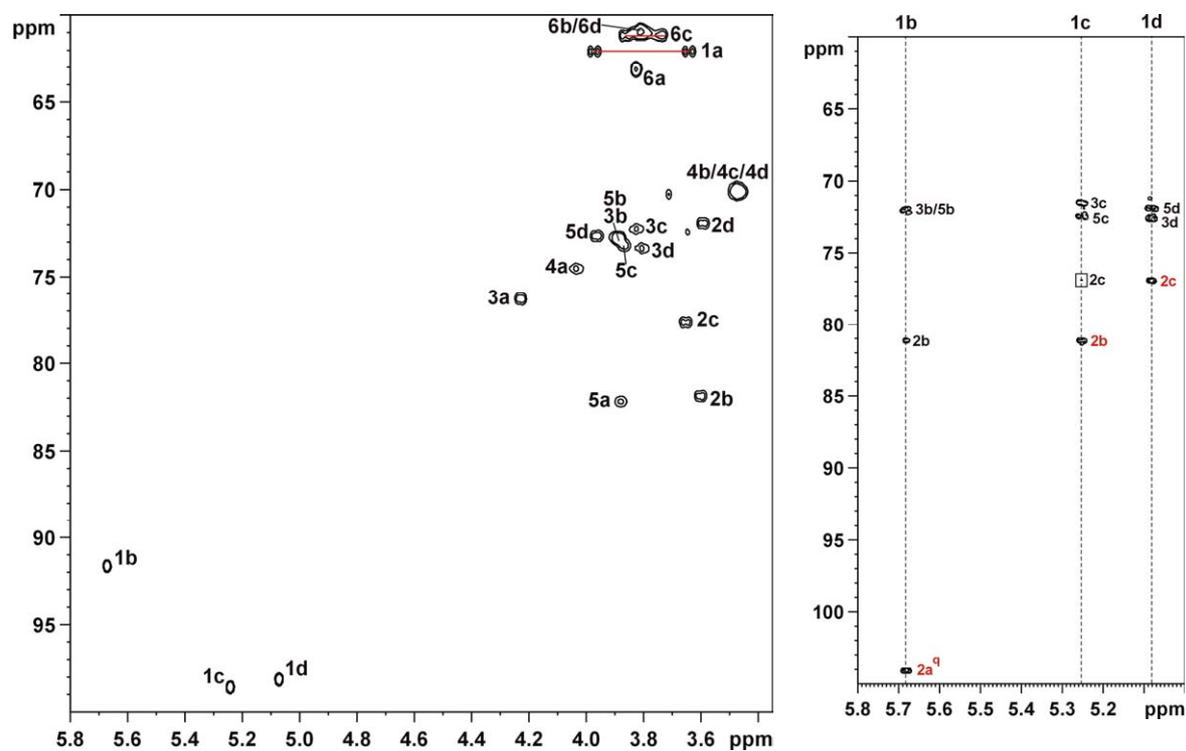


Abb. 12. HMQC (links) und Anomerenbereich aus dem HMBC (rechts) für **HZ34** in D₂O (300 K, 600 MHz). In rot die, für das Verknüpfungsmuster entscheidenden, transglykosidischen $^3J_{CH}$ Kopplungen.

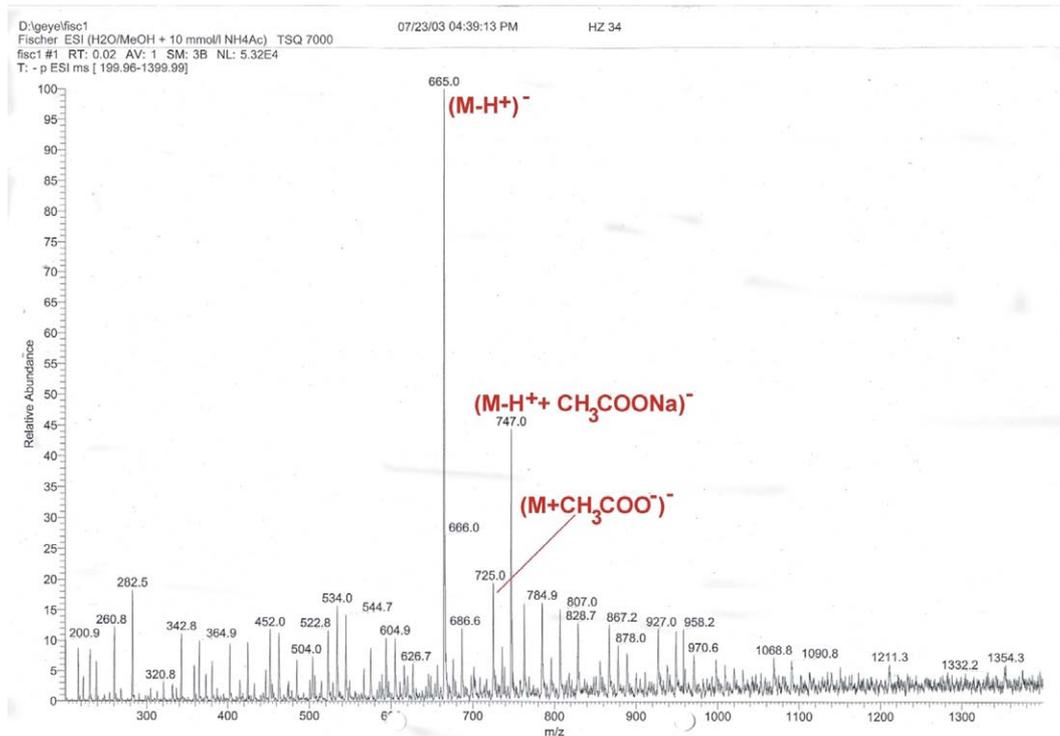


Abb. 13. Massenspektrum (Negativ-ESI) für **HZ34** (im Spektrum mit M abgekürzt) in H₂O / MeOH + 10 mM NH₄Ac.

2.2 In DMSO_{d6}

Ca. 1 mg ($n = 1.50 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 2.1$ mM) **HZ34** (lyophyllisiert) wurde in 0.7 mL DMSO_{d6} gelöst.

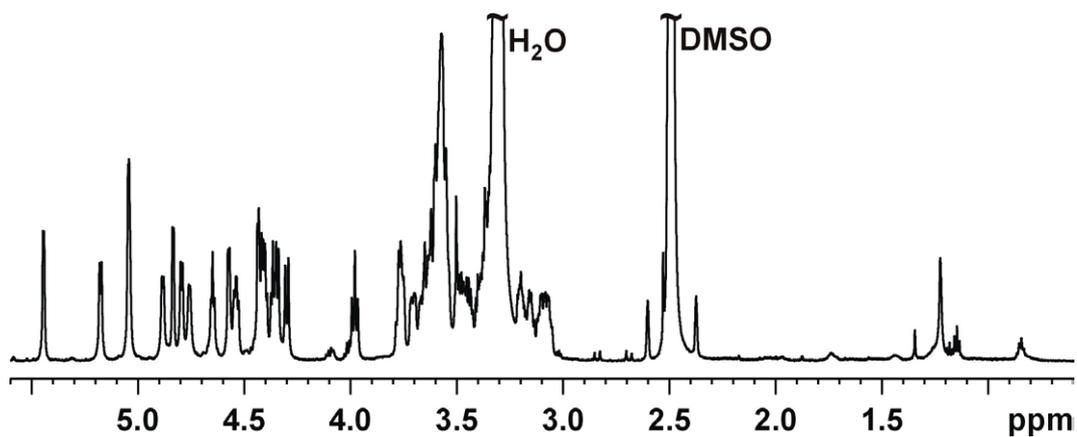


Abb. 14. Gesamtprotonenspektrum für **HZ34** in DMSO_{d6} (300 K, 600 MHz).

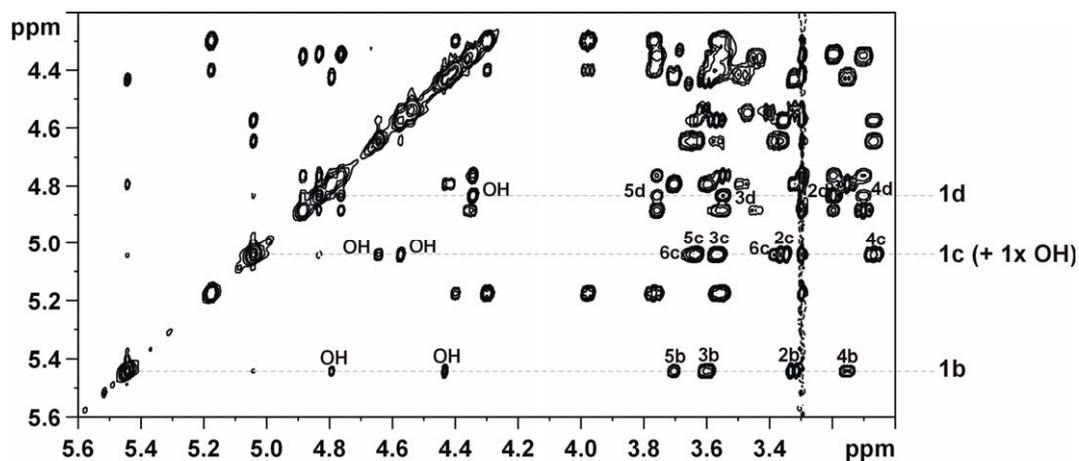


Abb. 15. 2D TOCSY Ausschnitt des OH- und Anomerenbereichs von **HZ34** in DMSO-d_6 . Nur die Signale für die 3 Anomeren sind gekennzeichnet (300 K, 600 MHz).

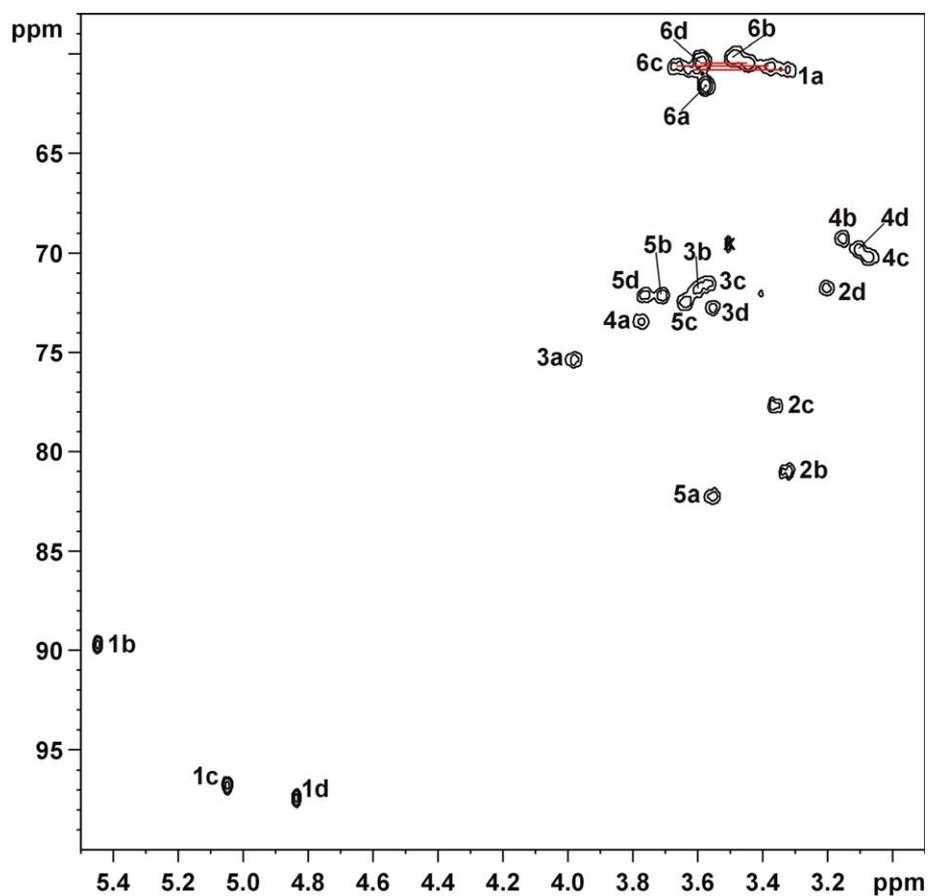


Abb. 16. HMBC für **HZ34** in DMSO-d_6 (300 K, 600 MHz).

	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]		$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	
1a^h	3.32	60.7		1c	5.05	96.7
1a^t	3.62	60.7		2c	3.36	77.6
2a	q	q		3c	3.57	71.7
3a	3.98	75.3		4c	3.07	70.2
4a	3.78	73.4		5c	3.64	72.4
5a	3.55	82.2		6c^h	3.38	60.6
6a^{h/t}	3.57	61.6		6c^t	3.66	60.6
1b	5.45	89.7		1d	4.84	97.4
2b	3.33	81.0		2d	3.20	71.7
3b	3.60	71.7		3d	3.55	72.7
4b	3.15	69.2		4d	3.10	69.8
5b	3.71	72.1		5d	3.76	72.1
6b^{h/t}	3.49	60.1		6d^h	3.44	60.4
				6d^t	3.58	60.4
1aOH	4.54	-		3cOH	4.57	-
3aOH	4.30	-		4cOH	5.04	-
4aOH	5.18	-		6cOH	4.65	-
6aOH	4.40	-		2dOH	4.34	-
3bOH	4.43	-		3dOH	4.76	-
4bOH	4.79	-		4dOH	4.88	-
6bOH	4.42	-		6dOH	4.35	-

Tab. 3. ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen von **HZ34** in DMSO_{d6} bei 300 K und 600 MHz.

3. Das Pentasaccharid HHZ34 in D_2O

Ca. 0.5 mg ($n = 6.03 \cdot 10^{-7}$ mol, $c = 0.86$ mM) **HHZ34** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D_2O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

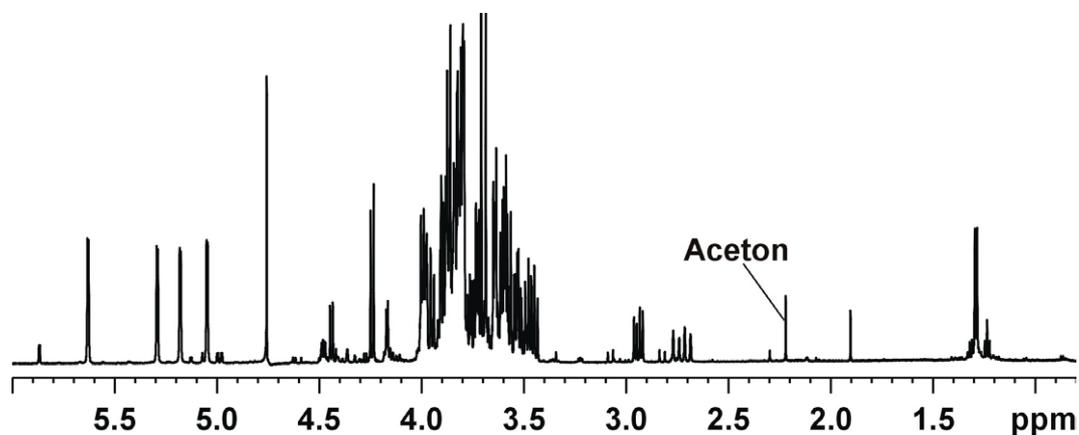


Abb. 17. Protonenspektrum (mit Vorsättigung) für **HHZ34** in D_2O bei 300 K (600 MHz).

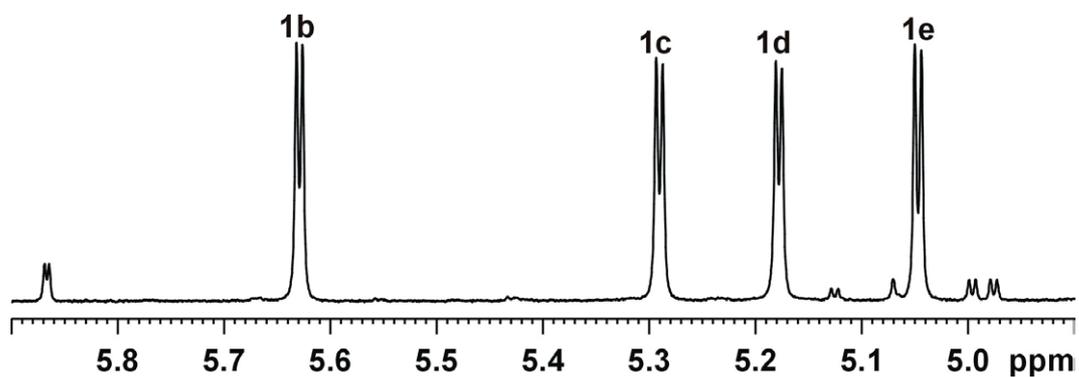


Abb. 18. Anomerenbereich von **HHZ34** in D_2O (300 K, 600 MHz). Signale einer Verunreinigung, wobei es sich wahrscheinlich um ein weiteres Oligomer handelt.

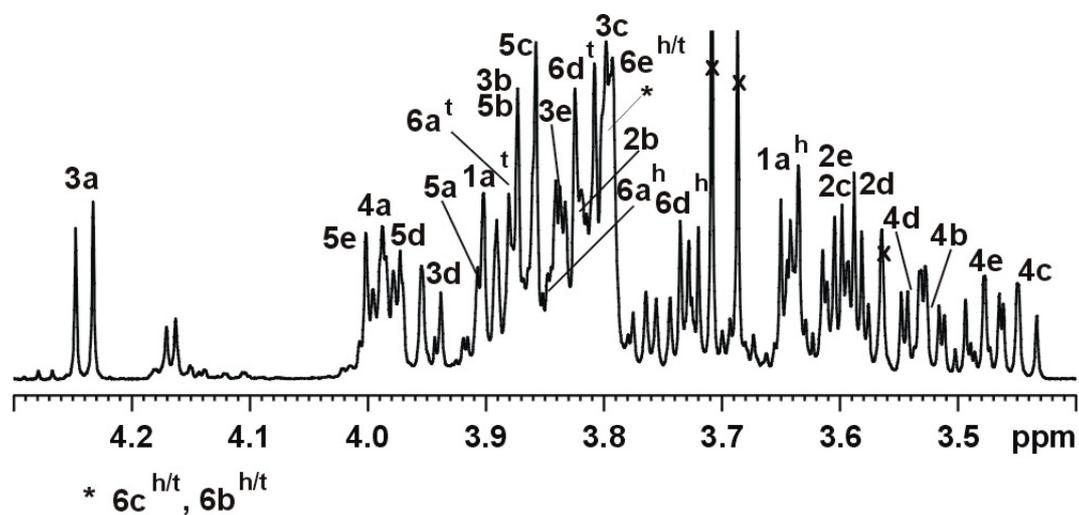


Abb. 19. 1H Alkylbereich für **HHZ34** in D_2O (300 K, 600 MHz).

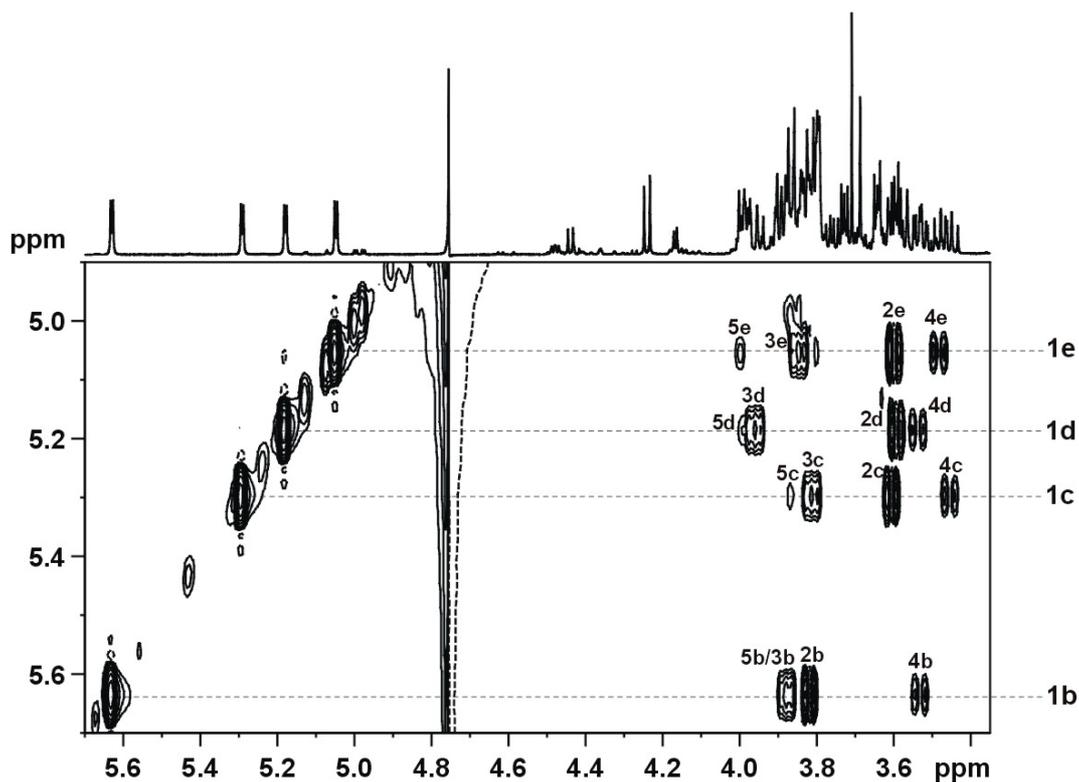


Abb. 20. ^1H mit Vorsättigung und 2D TOCSY Ausschnitt des Anomerenbereichs von **HHZ34** in D_2O (300 K, 600 MHz).

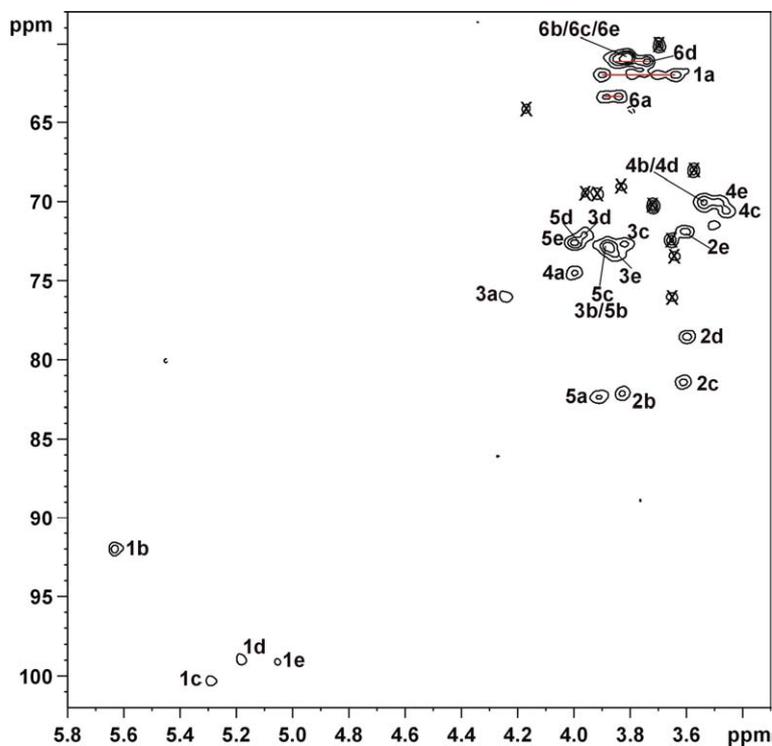


Abb. 21. Watergate HMQC für **HHZ34** in D_2O (300 K, 600 MHz). Die unterschiedliche Intensität der Anomerensignale erklärt sich aus der Verwendung der 3-9-19 Watergate Sequenz zur Unterdrückung des Restwassersignals, wobei in der Nähe des HDO Peaks befindliche Signale stärker geschwächt werden. Signale, die von Verunreinigungen herrühren, sind mit **X** gekennzeichnet.

4. Das Hexasaccharid (Hexa) in D₂O

1 mg ($n = 1.01 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.4$ mM) **Hexa** (lyophilisiert) wurde in 0.7 mL D₂O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

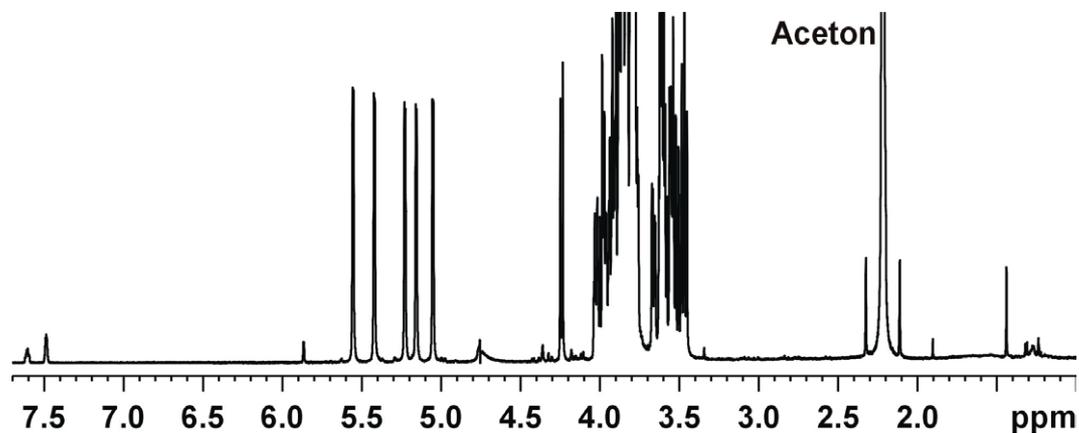


Abb. 22. Gesamtes Protonenspektrum (mit Vorsättigung) für **Hexa** in D₂O (300 K, 600 MHz).

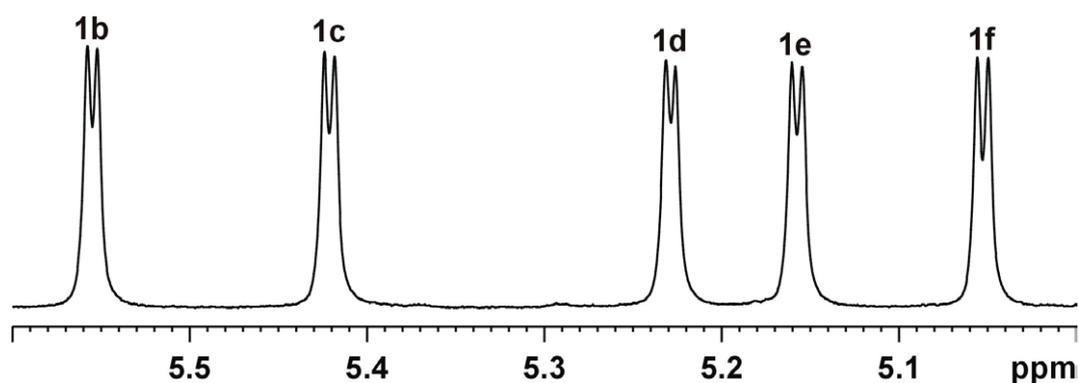


Abb. 23. ¹H Anomerenbereich von **Hexa** in D₂O (300 K, 600 MHz).

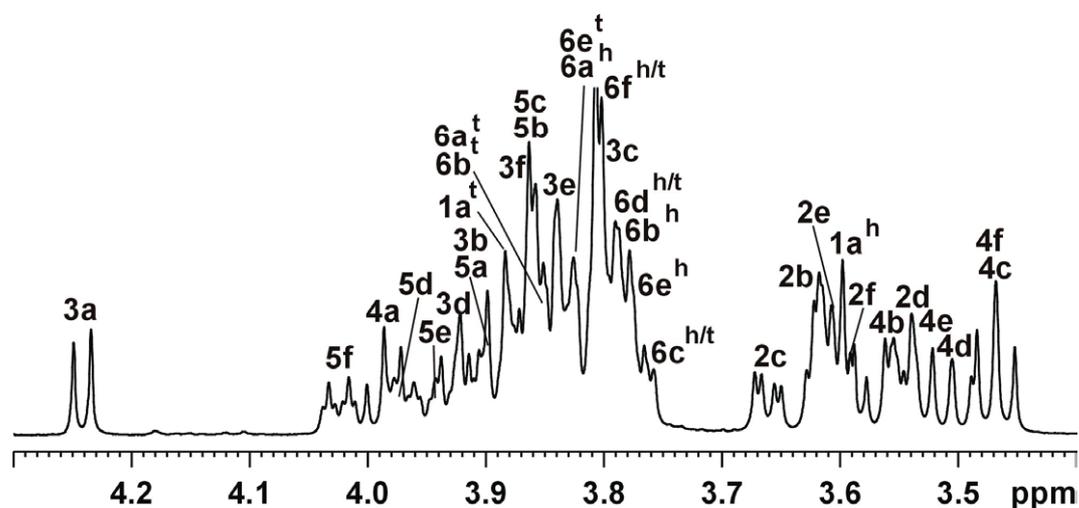


Abb. 24. ¹H Alkylbereich von **Hexa** in D₂O (300 K, 600 MHz).

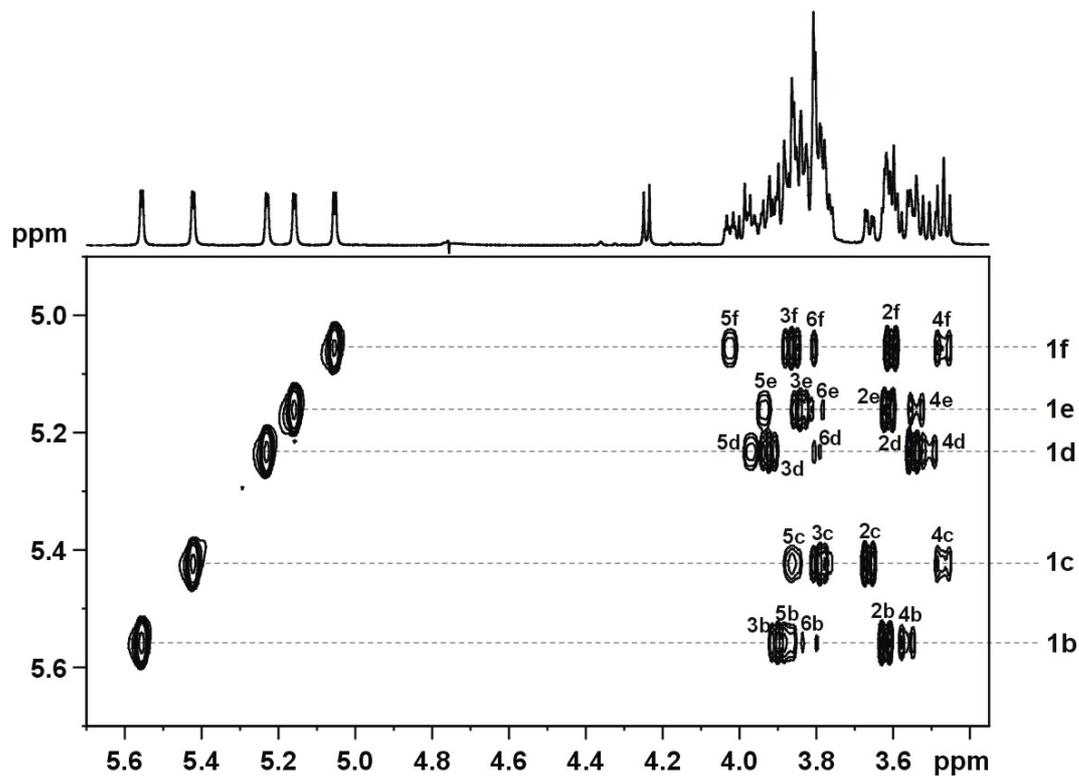


Abb. 25. Anomerenbereich des 2D TOCSY von Hexa in D₂O (300 K, 600 MHz).

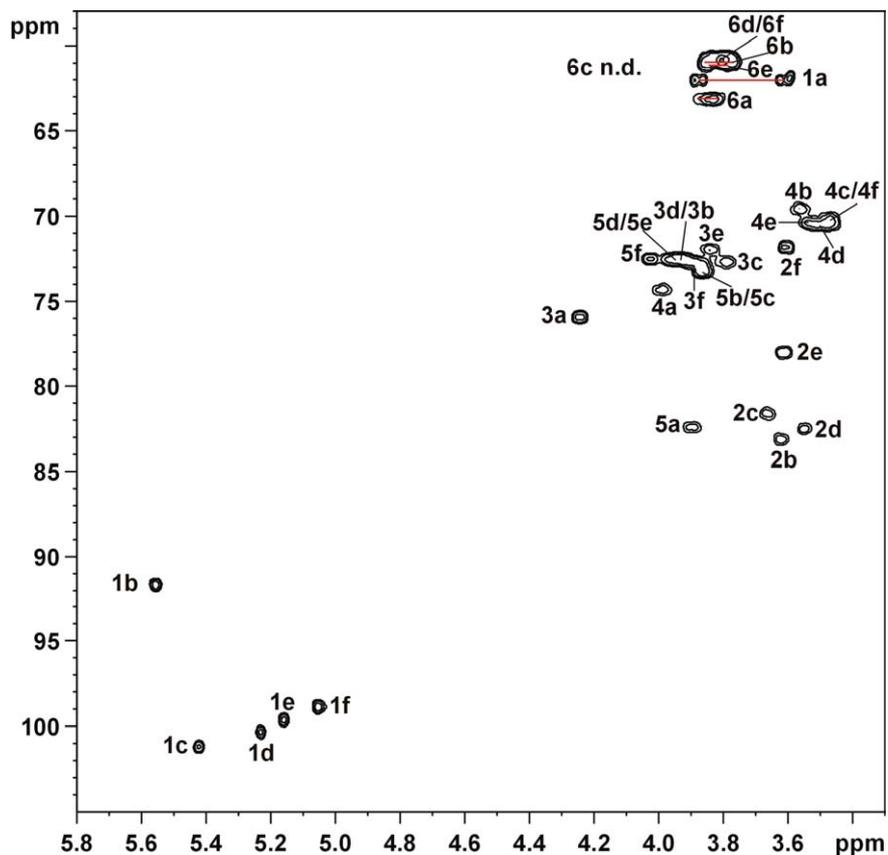


Abb. 26. HMBC für Hexa in D₂O (300 K, 600 MHz).

4.1 Temperaturreihe (280 – 310 K) für das Hexasaccharid

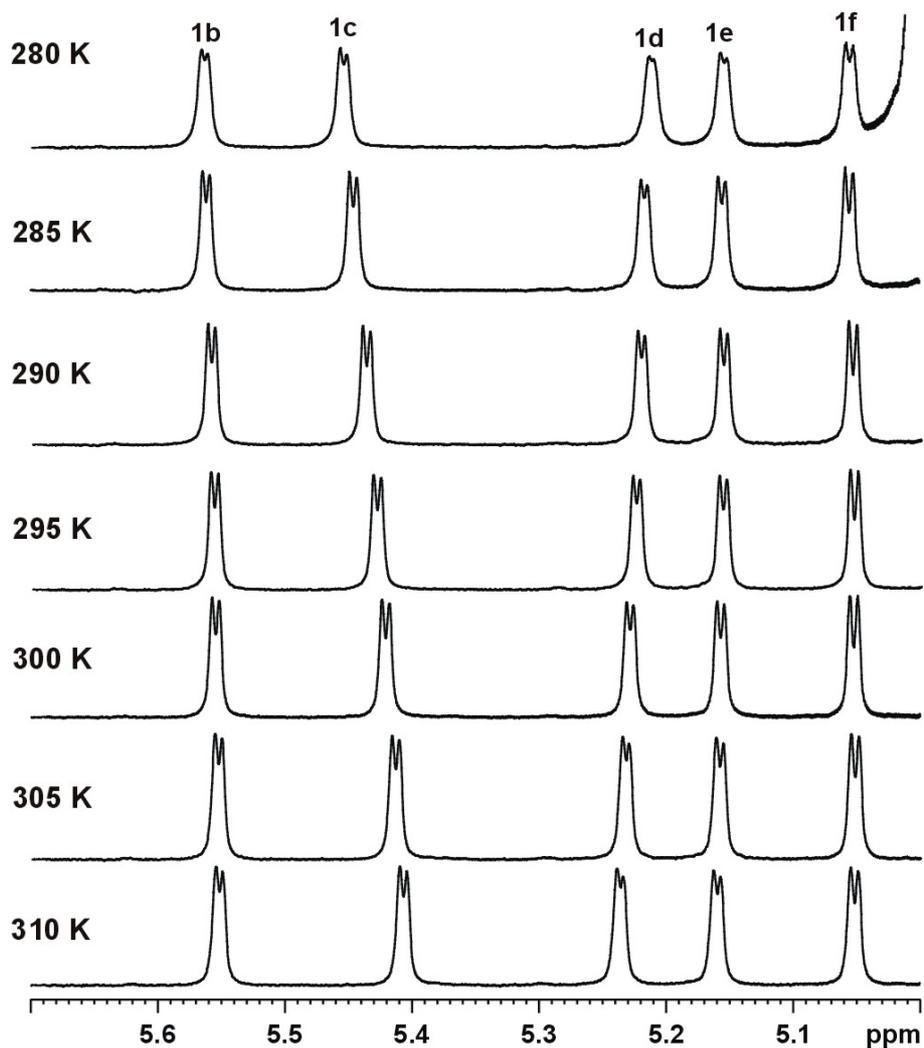


Abb. 27. ^1H Ausschnitte des Anomerenbereichs von **Hexa** in D_2O bei unterschiedlichen Temperaturen (600 MHz).

4.2 ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für HZ34, HHZ34 und Hexa in D_2O bei 300 K

Atom	$\delta_{1\text{H}}$ [ppm]			$\delta_{13\text{C}}$ [ppm]		
	HZ34	HHZ34	Hexa	HZ34	HHZ34	Hexa
1a	3.64 / 3.97	3.63 / 3.90	3.60 / 3.87	62.0	61.9	61.1
2a	q	q	q	q	q	q
3a	4.23	4.24	4.24	76.2	75.9	75.0
4a	4.03	4.00	3.99	74.4	74.5	73.4
5a	3.88	3.91	3.90	82.2	82.3	81.5
6a	3.82	3.84 / 3.88	3.82 / 3.85	63.0	63.3	62.2
1b	5.67	5.63	5.56	91.6	91.9	90.7
2b	3.60	3.82	3.62	81.8	82.1	82.2
3b	3.88	3.88	3.90	72.8	72.7	71.7
4b	3.47	3.53	3.56	70.1	70.0	68.6
5b	3.89	3.88	3.87	72.6	72.7	72.2
6b	3.81	3.81	3.79 / 3.84	60.9	60.8	60.0
1c	5.24	5.29	5.42	98.5	100.2	100.3
2c	3.65	3.61	3.66	77.6	81.4	80.7
3c	3.82	3.82	3.79	72.2	72.6	71.7
4c	3.47	3.45	3.47	70.1	70.5	69.4
5c	3.86	3.86	3.86	73.1	72.7	72.2
6c	3.73 / 3.86	3.81	3.76	61.1	60.8	n.d.
1d	5.07	5.18	5.23	98.1	98.9	99.4
2d	3.59	3.59	3.55	71.9	78.5	81.6
3d	3.81	3.96	3.93	73.3	72.0	71.6
4d	3.47	3.53	3.51	70.1	70.0	69.5
5d	3.96	3.98	3.97	72.6	72.5	71.6
6d	3.81	3.73 / 3.84	3.80	60.9	61.1	59.9
1e		5.05	5.16		99.0	98.7
2e		3.60	3.61		71.9	77.1
3e		3.84	3.84		73.2	71.0
4e		3.48	3.54		70.0	69.5
5e		3.99	3.94		72.5	71.6
6e		60.8	3.77 / 3.82		3.81	~ 60
1f			5.05			97.9
2f			3.60			70.9
3f			3.87			71.9
4f			3.47			69.4
5f			4.02			71.6
6f			3.81			59.9

Tab. 4. Alle ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für Tetra-, Penta- und Hexasaccharid in D_2O bei 300 K (600 MHz).

4.3 α - und β -defructosyliertes Pentasaccharid in D₂O

4.3.1 bei 300 K

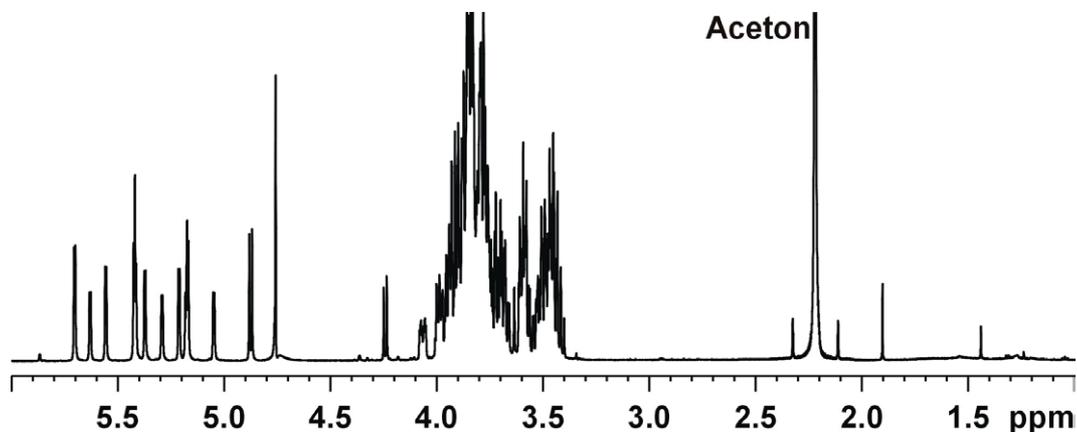


Abb. 28. ¹H Gesamtspektrum (mit Vorsättigung) für α -defruct, β -defruct und HHZ34 in D₂O bei 300 K (600 MHz).

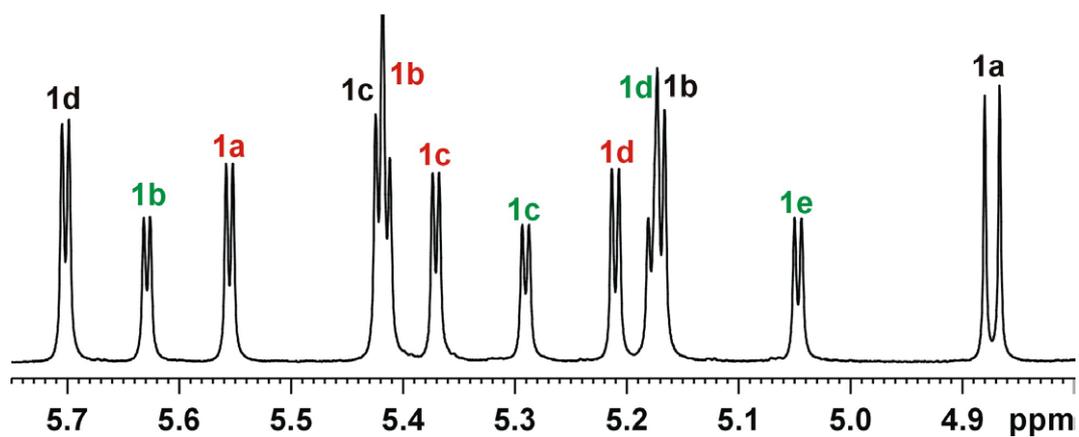


Abb. 29. ¹H Anomerenbereich für α -defruct, β -defruct und HHZ34 in D₂O bei 300 K (600 MHz). Signale für α -defruct sind in rot, für β -defruct in schwarz und für HHZ34 in grün gekennzeichnet.

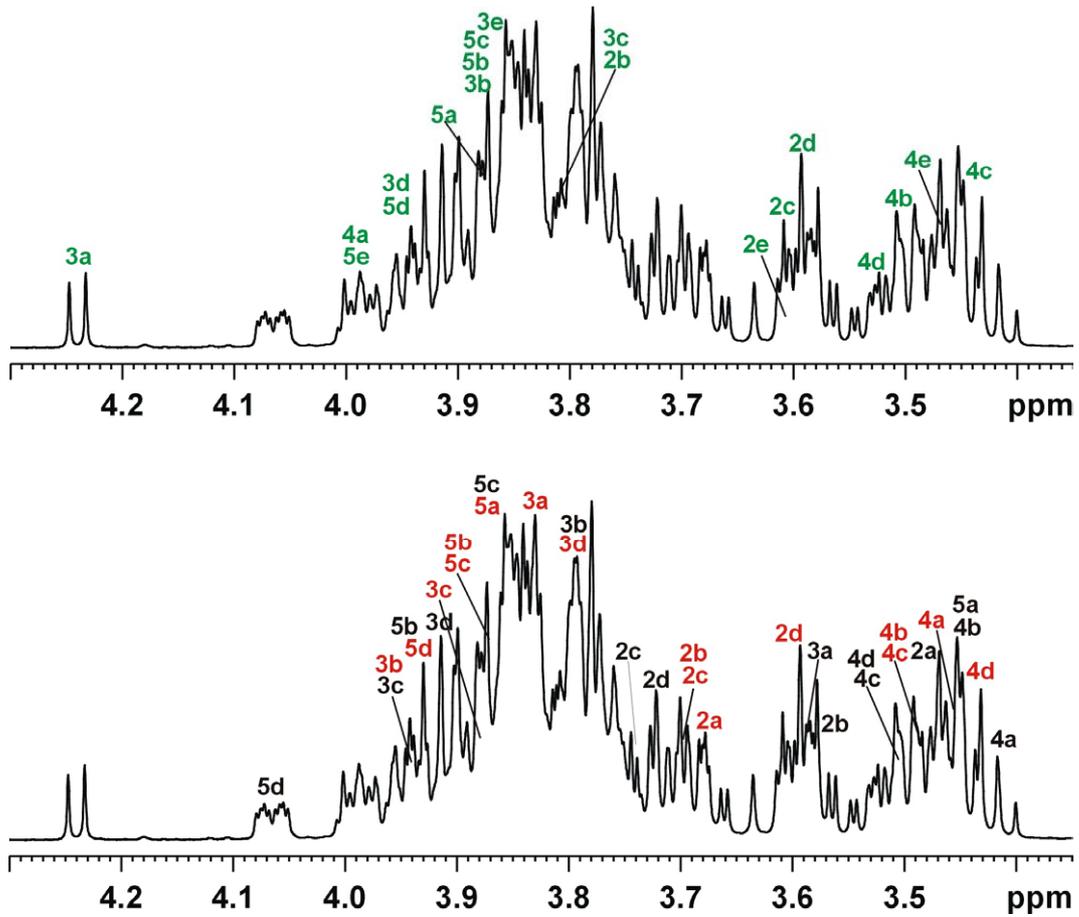


Abb. 30. ^1H Alkylbereich für α -defruct, β -defruct und HHZ34 in D_2O bei 300 K (600 MHz).

Atom	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	Atom	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]
1a	-	-	5b	3.95	71.8
3a	4.24	75.9	6b	-	-
4a	3.99	74.4	1c	5.42	92.8
5a	3.91	82.3	2c	3.73	75.4
6a	3.83 / 3.86	-	3c	3.94	72.5
1b	5.63	91.9	4c	3.50	69.9
2b	3.81	82.0	5c	3.85	72.6
3b	3.87	72.6	6c	-	-
4b	3.53	69.9	1d	5.70	94.3
5b	3.89	72.4	2d	3.72	74.5
6b	-	-	3d	3.91	71.8
1c	5.29	100.1	4d	3.51	69.9
2c	3.60	81.3	5d	4.06	72.0
3c	3.81	72.5	6d	3.78 / 3.84	-
4c	3.45	70.1	1a	5.55	89.9
5c	3.86	71.8	2a	3.67	75.4
6c	3.75	-	3a	3.83	72.4
1d	5.18	98.8	4a	3.45	76.5
2d	3.59	78.4	5a	3.86	72.4
3d	3.98	72.5	6a	3.77	-
4d	3.53	69.9	1b	5.41	93.3
5d	3.99	72.5	2b	3.69	75.9
6d	-	-	3b	3.93	72.5
1e	5.05	98.9	4b	3.49	70.0
2e	3.59	71.9	5b	3.89	72.5
3e	3.84	71.8	6b	3.76	-
4e	3.48	70.0	1c	5.37	94.0
5e	3.99	72.5	2c	3.69	75.9
6e	3.80	-	3c	3.90	71.8
1a	4.87	-	4c	3.49	70.0
2a	3.47	77.4	5c	3.85	72.6
3a	3.59	71.8	6c	3.77	-
4a	3.41	70.3	1d	5.21	96.4
5a	3.44	76.5	2d	3.59	74.9
6a	3.71 / 3.89	-	3d	3.79	73.4
1b	5.17	96.3	4d	3.45	70.0
2b	3.57	72.1	5d	3.92	71.8
3b	3.80	73.4	6d	-	-
4b	3.45	70.1			

Tab. 5. ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für HHZ34 (grün), α -defruct (rot) und β -defruct (schwarz) in D_2O bei 300 K (600 MHz).

4.3.2 bei 310 K

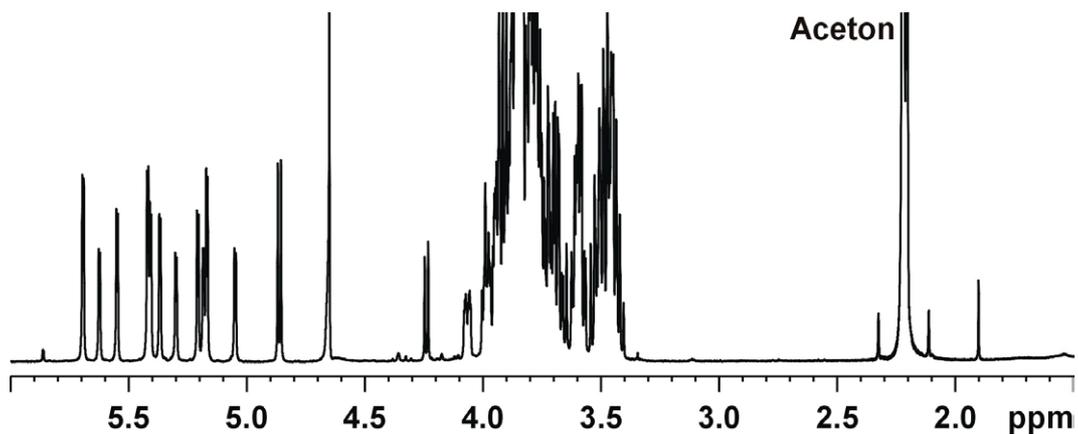


Abb. 32. Gesamtes Protonenspektrum (mit Vorsättigung) für α -defruct, β -defruct und HHZ34 in D_2O bei 310 K (600 MHz).

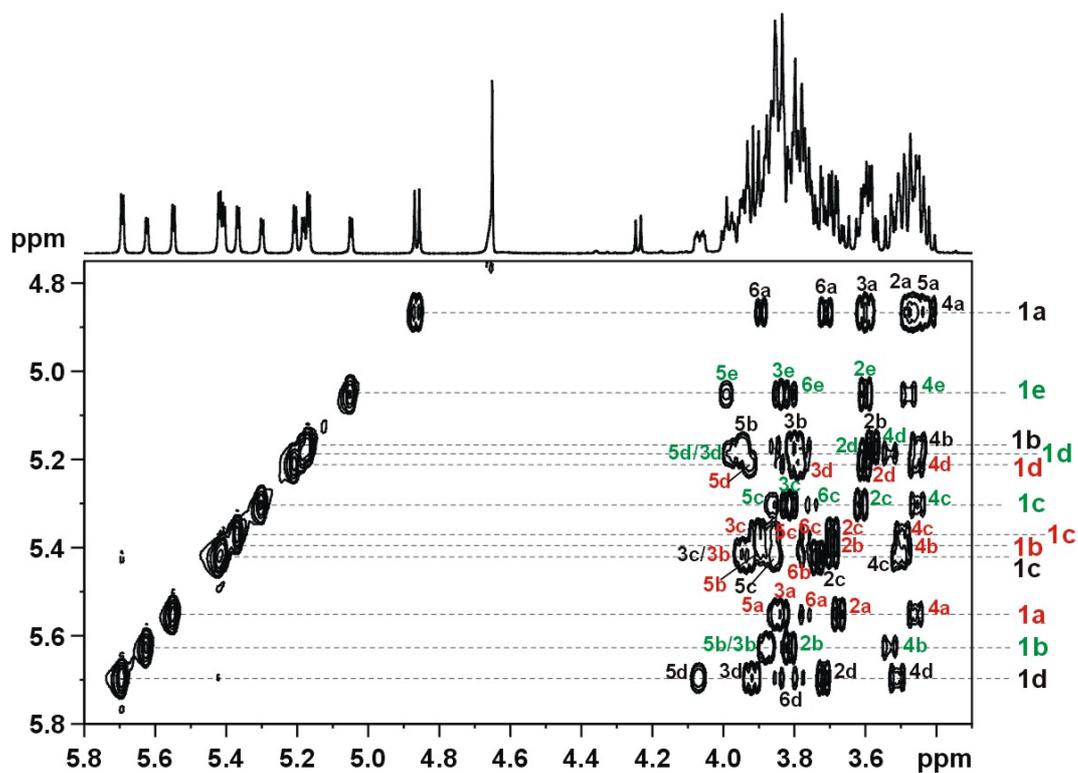


Abb. 33. 2D TOCSY – Anomerenbereich für α -defruct (rot), β -defruct (schwarz) und HHZ34 (grün) in D_2O bei 310 K (600 MHz).

5. Das Oktasaccharid in D₂O

1.9 mg ($n = 1.46 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 2.1$ mM) **Okta** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D₂O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

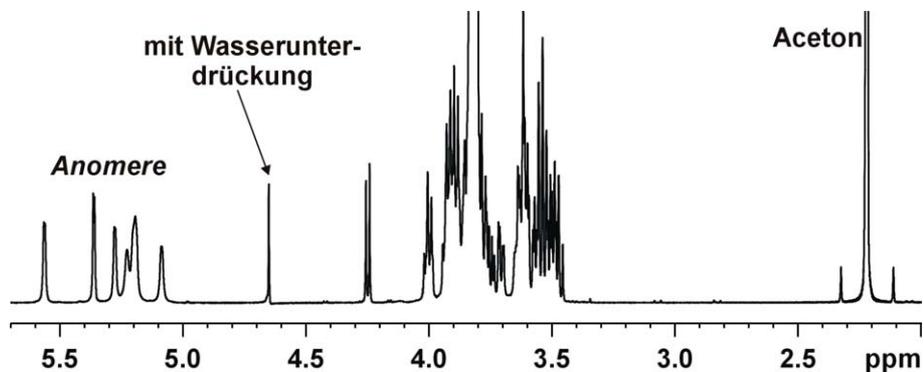


Abb. 34. Gesamtes ¹H Spektrum von **Okta** in D₂O (600 MHz, 310 K), gemessen mit Wasserunterdrückung.

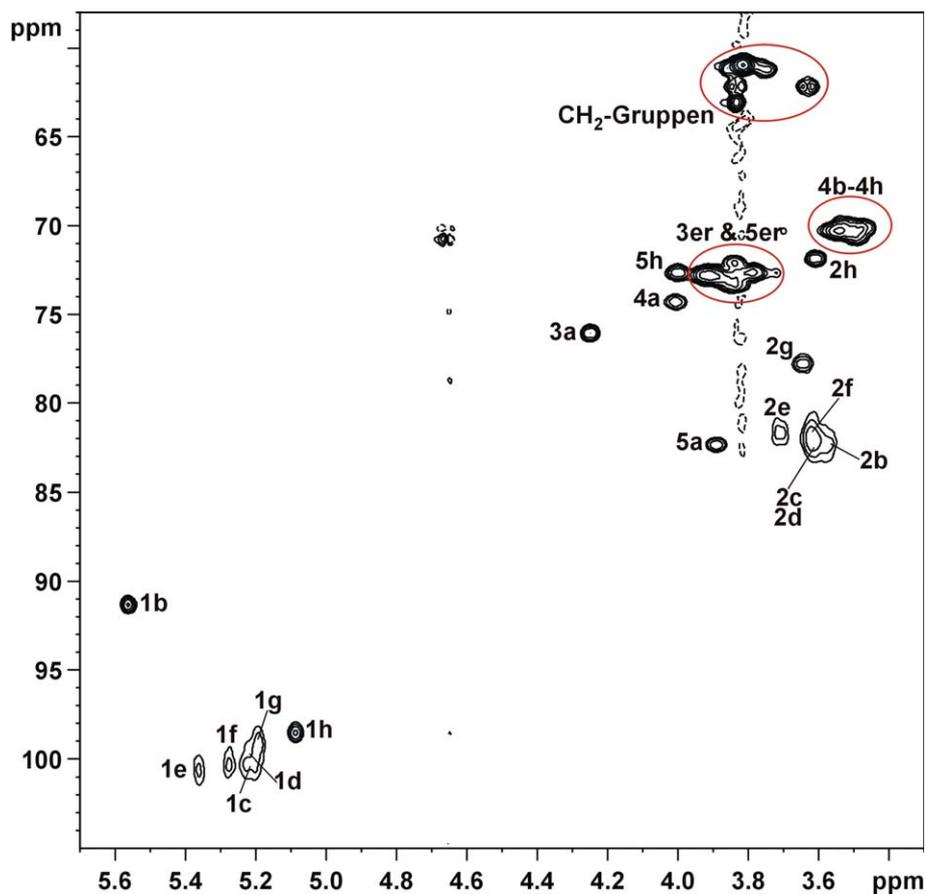


Abb. 35. HMBC von **Okta** in D₂O (600 MHz, 310 K). Die ¹³C und ¹H Verschiebungen der Positionen 3, 4 und 5 der Glucoseeinheiten sind stark überlagert und deswegen, ebenso wie die CH₂-Gruppen, nicht zugeordnet.

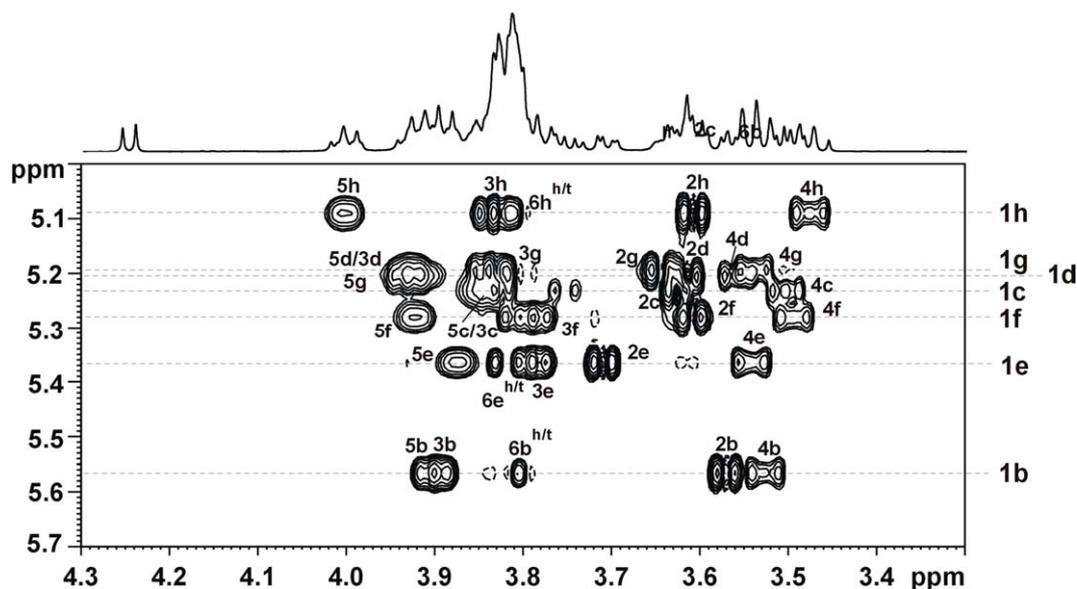


Abb. 36. TOCSY Spektrum von **Okta** in D_2O (600 MHz, 310 K) – Anomerenbereich der Glucoseeinheiten.

6. Deka in D_2O

5.5 mg ($n = 3.35 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 4.8$ mM) **Deka** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D_2O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

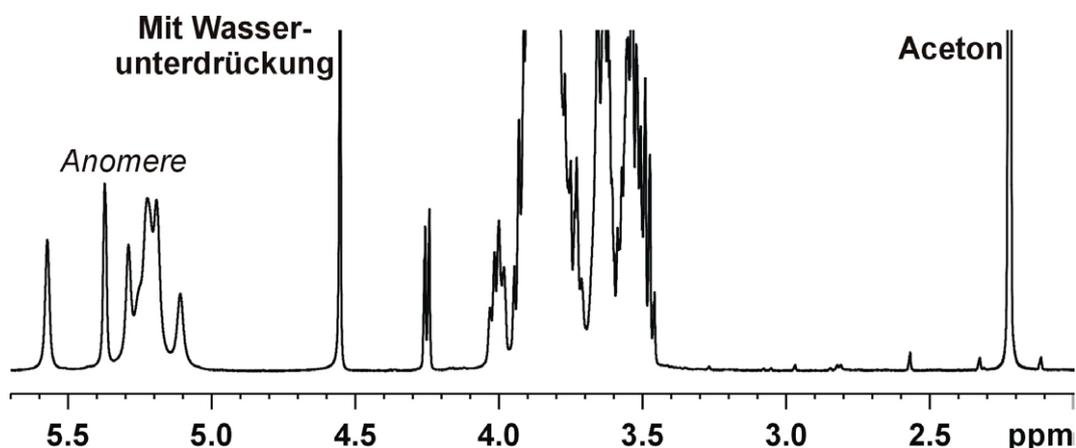


Abb. 37. 1H Gesamtspektrum (mit Vorsättigung) von **Deka** in D_2O (600 MHz, 320 K).

6.1 defruct-Deka in D_2O

6.03 mg ($n = 3.35 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 4.8$ mM) **defruct-Deka** (lyophilisiert) wurden in 0.7 mL D_2O gelöst und etwas Acetondampf zugesetzt.

Es handelt sich um eine Mischung aus α -defruct-Deka, β -defruct-Deka und nicht defructosyliertes **Deka**.

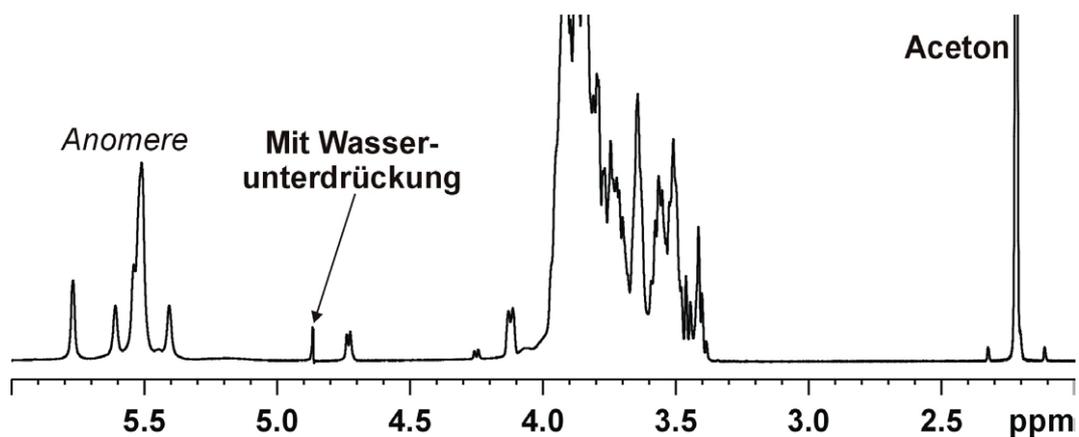


Abb. 38. ^1H Gesamtspektrum von **defruct-Deka** (α und β) mit Wasserunterdrückung bei 290 K (600 MHz, D_2O).

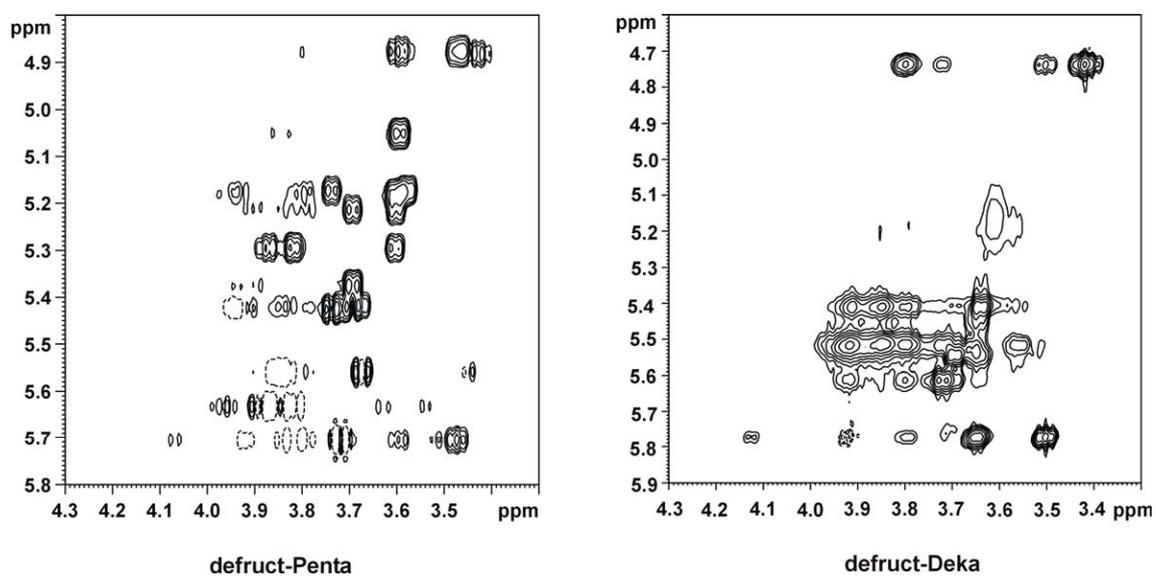


Abb. 39. Ausschnitte aus den ROESY Spektren von **defruct-Penta** (links, 300 K) und **defruct-Deka** (rechts, 290 K) (600 MHz, D_2O). Sie zeigen ein prinzipiell ähnliches ROE Muster, wenngleich für das **defruct-Deka** die Überlagerungen sehr viel stärker sind.

KAPITEL IV: Struktur und Dynamik zyklischer Jasplakinolid Analoga

1. Makrozyklus Sy2741 – Zusätzliche NMR-Daten und –Spektren

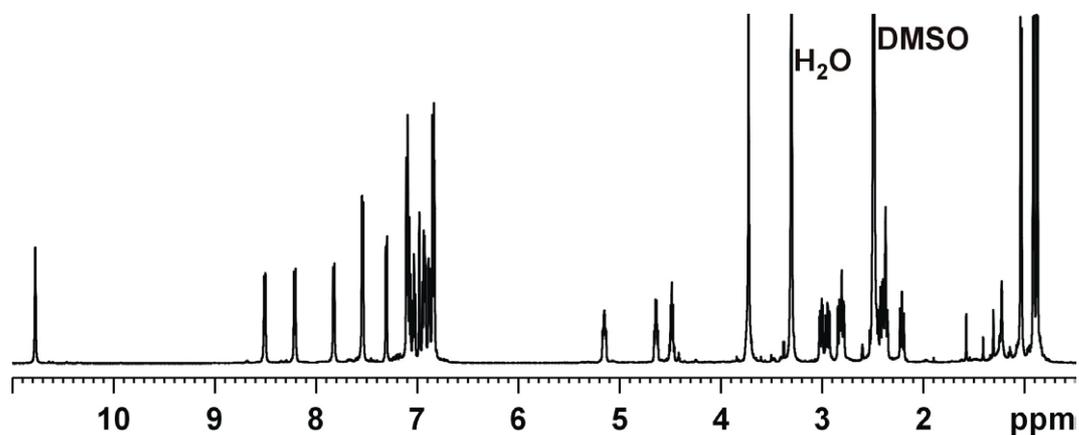


Abb. 1. ^1H Spektrum für **Sy2741** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}).

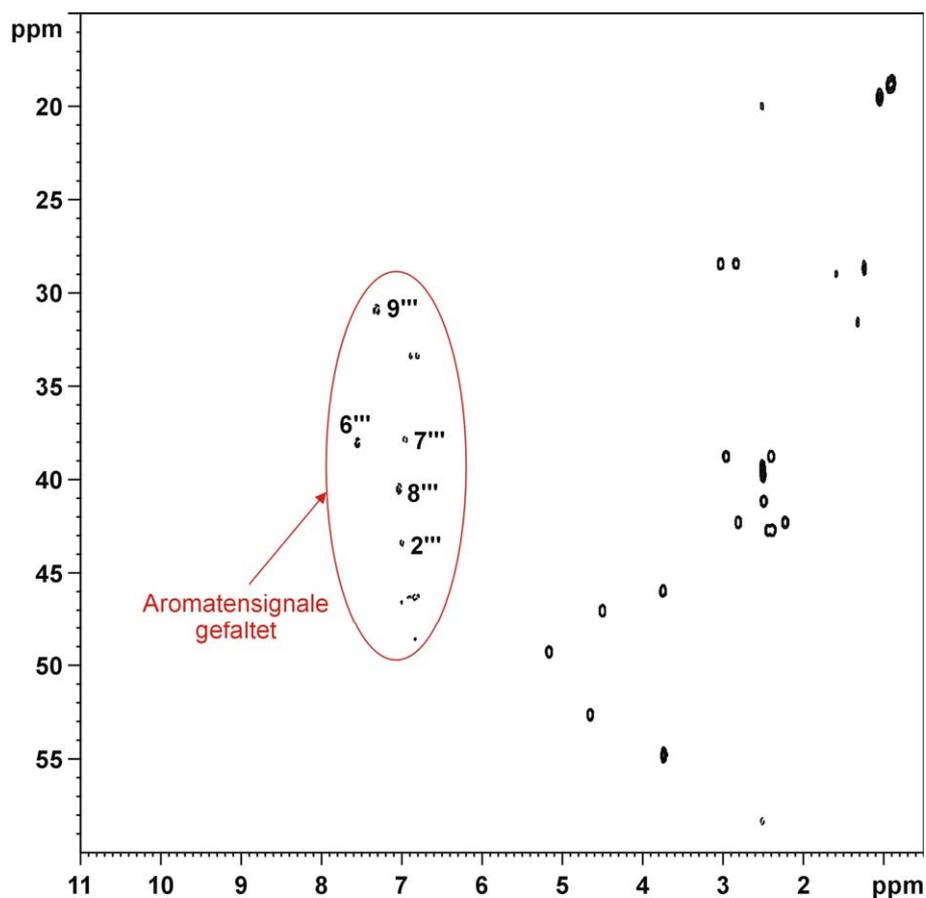


Abb. 2. HMQC Spektrum für **Sy2741** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}). Die Aromatensignale sind gefaltet und daher negativ.

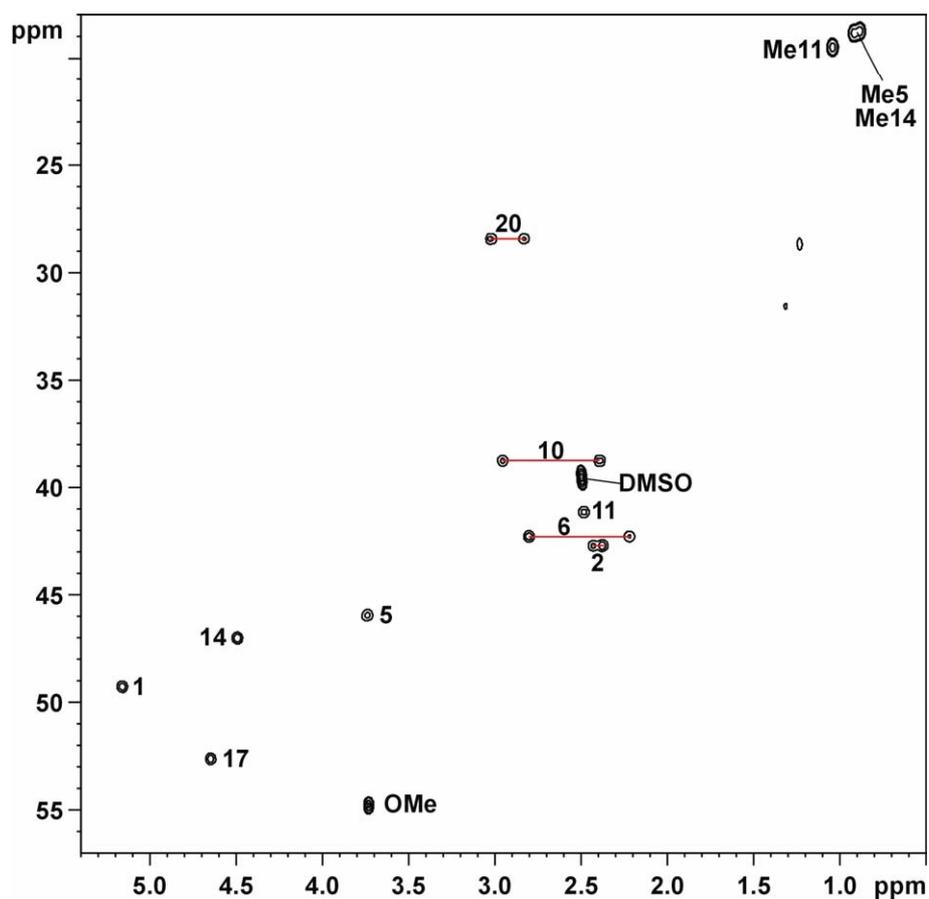


Abb. 3. Alkylbereich des HMQC Spektrums für **Sy2741** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}).

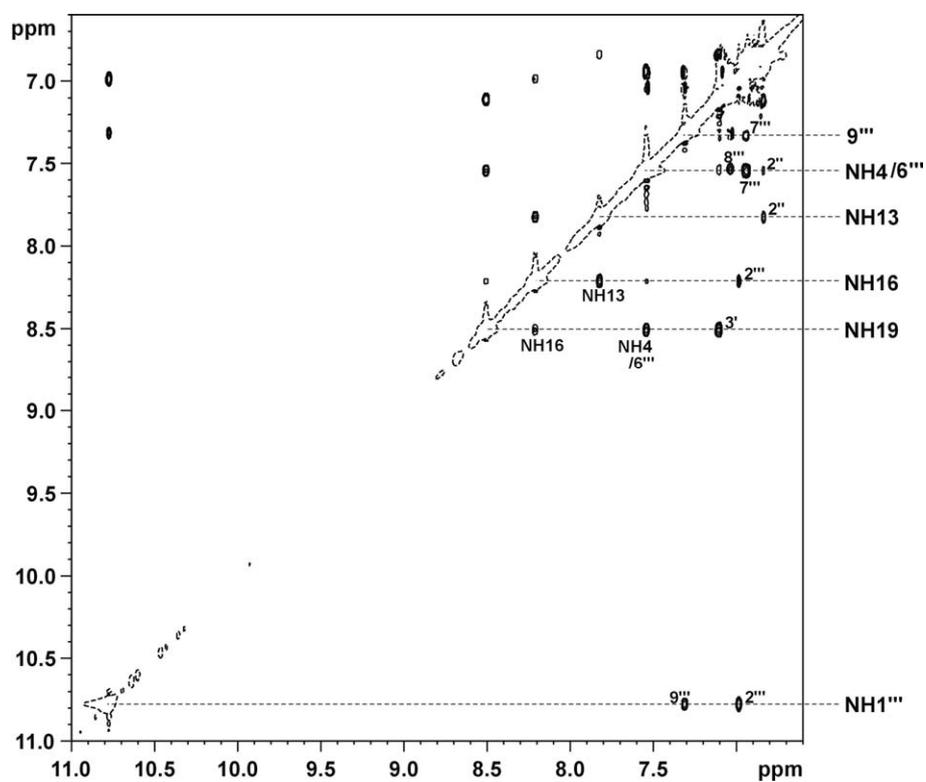


Abb. 4. NH- und Aromatenbereich des ROESY Spektrums für **Sy2741** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}).

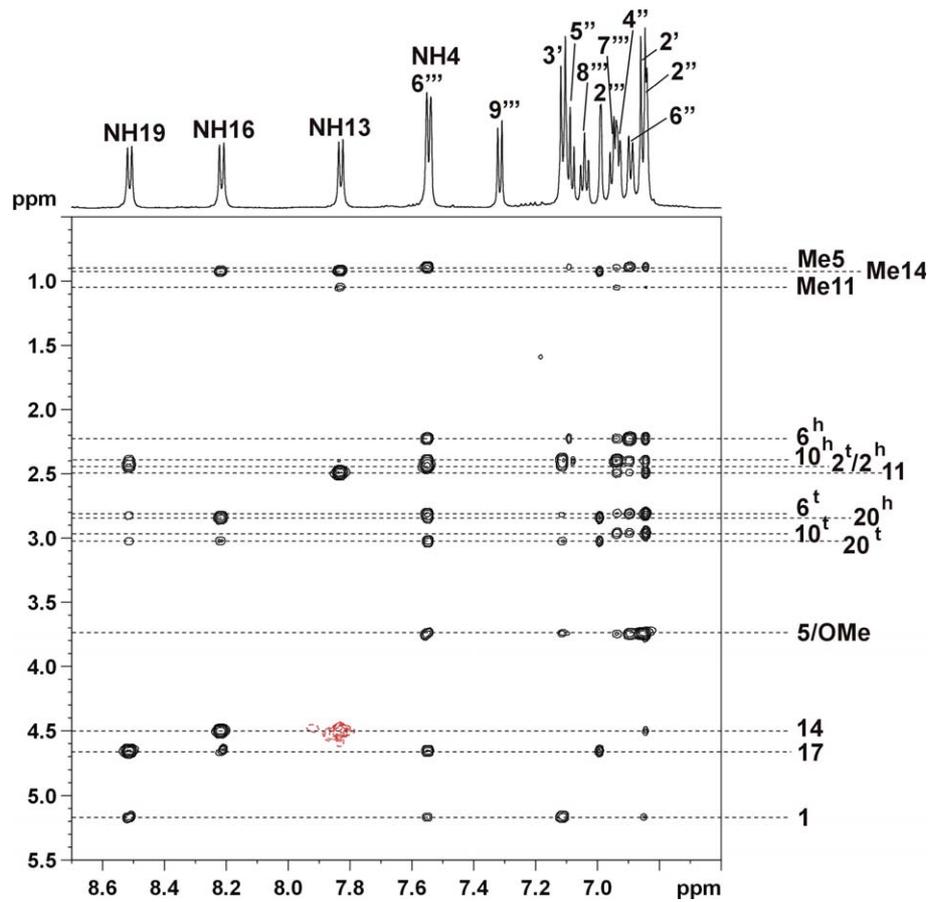


Abb. 5. ROESY Ausschnitt für **Sy2741** – Kreuzsignale zwischen NH-/Aromaten und Alkylbereich (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}).

1.1 Temperaturreihe der NH Protonen

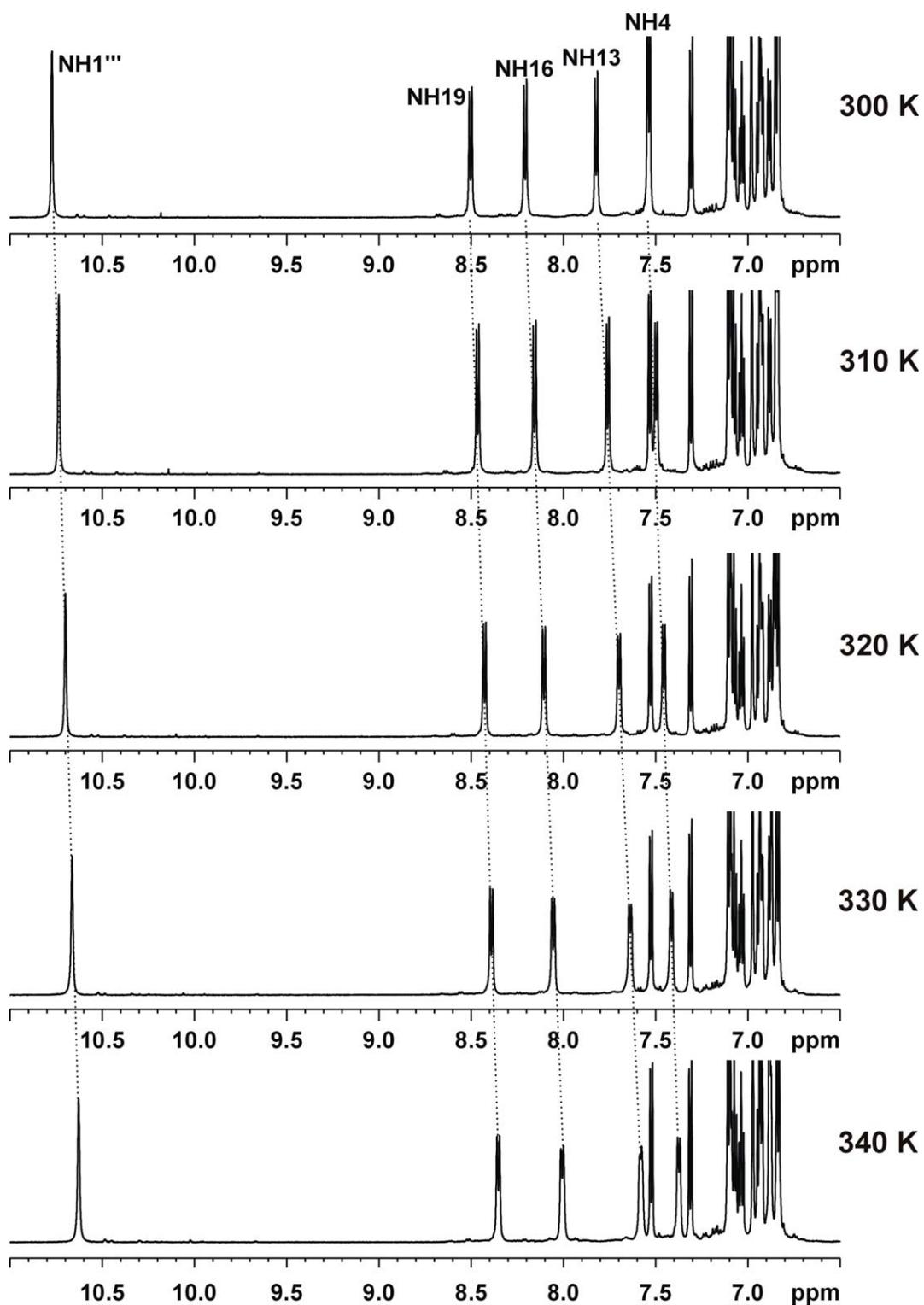


Abb. 6. ^1H NH-/Aromatenbereich für **Sy2741** in Abhängigkeit von der Temperatur (600 MHz, DMSO_{d6}).

1.2 Übersicht über alle für Sy2741 ermittelten ROEs

ROE	Abstand _{calc} [Å]	ROE	Abstand _{calc} [Å]
NH16 – NH19	3.2	2 ^{'''} – 20 ^h	2.8
NH19 – NH4 / 6 ^{'''}	2.7	2 ^{'''} – Me14	3.0
NH19 – 3 [']	2.5	2 ['] 2 ^{''} – 1	3.4
NH16 – NH13	2.8	2 ['] 2 ^{''} – 14	3.3
NH16 – 2 ^{'''}	3.1	7 ^{'''} /4 ^{''} – 5/OMe	3.1
NH13 – 2 ^{''}	3.1	6 ^{''} – 5/OMe	2.7
NH4 / 6 ^{'''} – 8 ^{'''}	2.8	2 ['] 2 ^{''} – 5/OMe	2.0
NH4 / 6 ^{'''} – 7 ^{'''}	2.3	7 ^{'''} /4 ^{''} – 10 ^t	2.9
NH4 / 6 ^{'''} – 2 ^{''}	3.25	6 ^{''} – 10 ^t	3.1
9 ^{'''} – 7 ^{'''}	2.85	2 ['] 2 ^{''} – 10 ^t	2.5
NH1 ^{'''} – 9 ^{'''}	2.8	7 ^{'''} /4 ^{''} – 6 ^t	3.2
NH1 ^{'''} – 2 ^{'''}	2.4	6 ^{''} – 6 ^t	2.85
NH19 – 1	2.7	2 ['] 2 ^{''} – 6 ^t	2.4
NH19 – 17	2.1	7 ^{'''} /4 ^{''} – 11	3.0
NH19 – 20 ^t	3.3	6 ^{''} – 11	3.4
NH19 – 6 ^t	3.3	2 ['] 2 ^{''} – 11	2.8
NH19 – 2 ^{h/t}	2.4	7 ^{'''} /4 ^{''} – 10 ^h	2.4
NH16 – 17	2.8	6 ^{''} – 10 ^h	2.9
NH16 – 14	2.1	2 ['] 2 ^{''} – 10 ^h	2.9
NH16 – 20 ^t	3.2	7 ^{'''} /4 ^{''} – 6 ^h	3.1
NH16 – 20 ^h	2.4	6 ^{''} – 6 ^h	2.4
NH16 – Me14	2.7	2 ['] 2 ^{''} – 6 ^h	2.7
NH13 – 11	2.1	7 ^{'''} /4 ^{''} – Me11	3.55
NH13 – Me11	3.1	7 ^{'''} /4 ^{''} – Me5	3.45
NH13 – Me14	2.4	6 ^{''} – Me5	2.8
NH4 / 6 ^{'''} – 1	3.1	2 ['] 2 ^{''} – Me5	3.15
NH4 / 6 ^{'''} – 17	2.7	1 – 2 ^{h/t}	2.2
NH4 / 6 ^{'''} – 5/OMe	2.65	17 – 20 ^t	2.4
NH4 / 6 ^{'''} – 20 ^t	2.8	17 – 20 ^h	2.5
NH4 / 6 ^{'''} – 6 ^t	2.5	14 – Me14	2.2
NH4 / 6 ^{'''} – 2 ^{h/t}	2.1	5/OMe – Me5	2.25
NH4 / 6 ^{'''} – 6 ^h	2.6	5/OMe – 6 ^t	2.5
NH4 / 6 ^{'''} – Me5	2.55	20 ^t – 20 ^h	1.8
3 ['] – 1	2.7	10 ^t – 10 ^h	1.7
3 ['] – 5/OMe	3.2	6 ^t – 6 ^h	≅ 1.8
3 ['] – 20 ^t	3.3	10 ^t – Me11	2.7
3 ['] – 6 ^t	3.5	10 ^h – Me11	2.5
3 ['] – 2 ^{h/t}	2.5	6 ^{''} – Me5	2.7
5 ^{''} – 6 ^h	3.45	14 – 11	3.4
5 ^{''} – Me5	3.7	2 ^{'''} – 17	2.8
2 ^{'''} – 20 ^t	3.1		

Tab. 1. Übersicht über alle für Sy2741 ermittelten ROEs (300 K, DMSO_{d6}).

2. Der Makrozyklus Sy5141

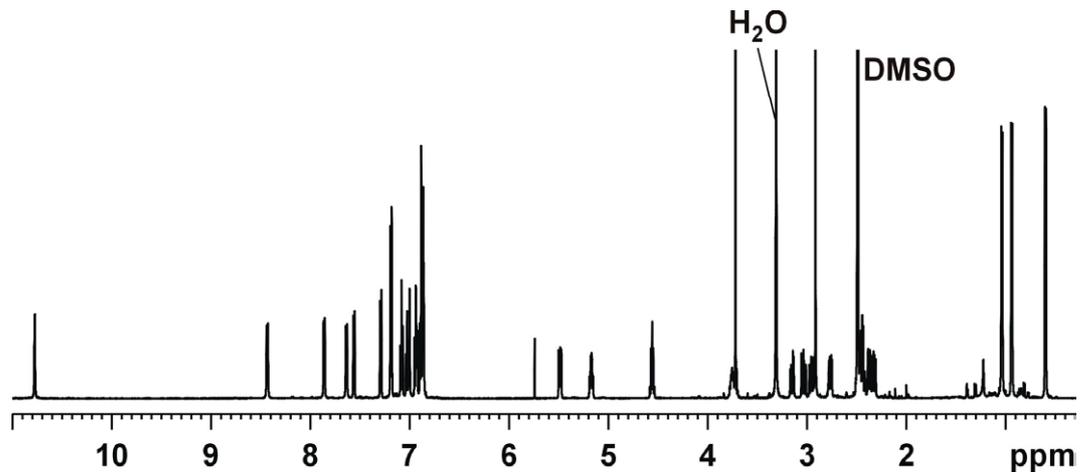


Abb. 7. ^1H Spektrum von **Sy5141** in DMSO_{d_6} (300 K, 600 MHz).

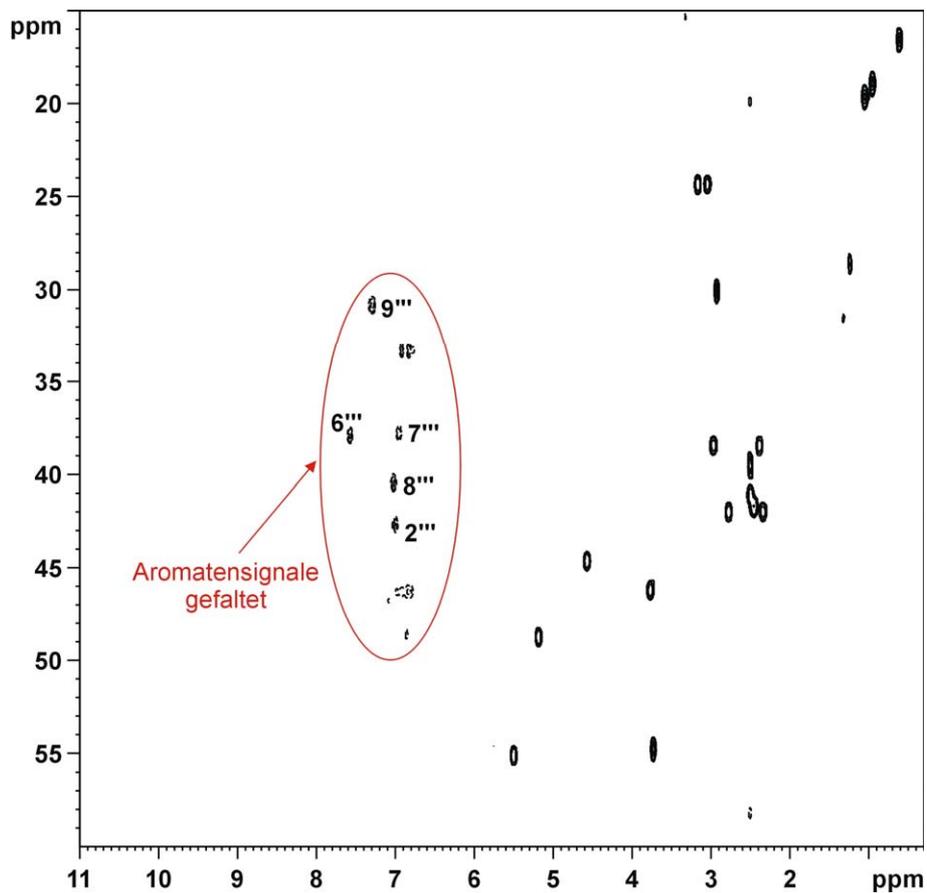


Abb. 8. HMBC Spektrum für **Sy5141** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d_6}). Aufgrund der Faltung der Aromatensignale besitzen diese negatives Vorzeichen.

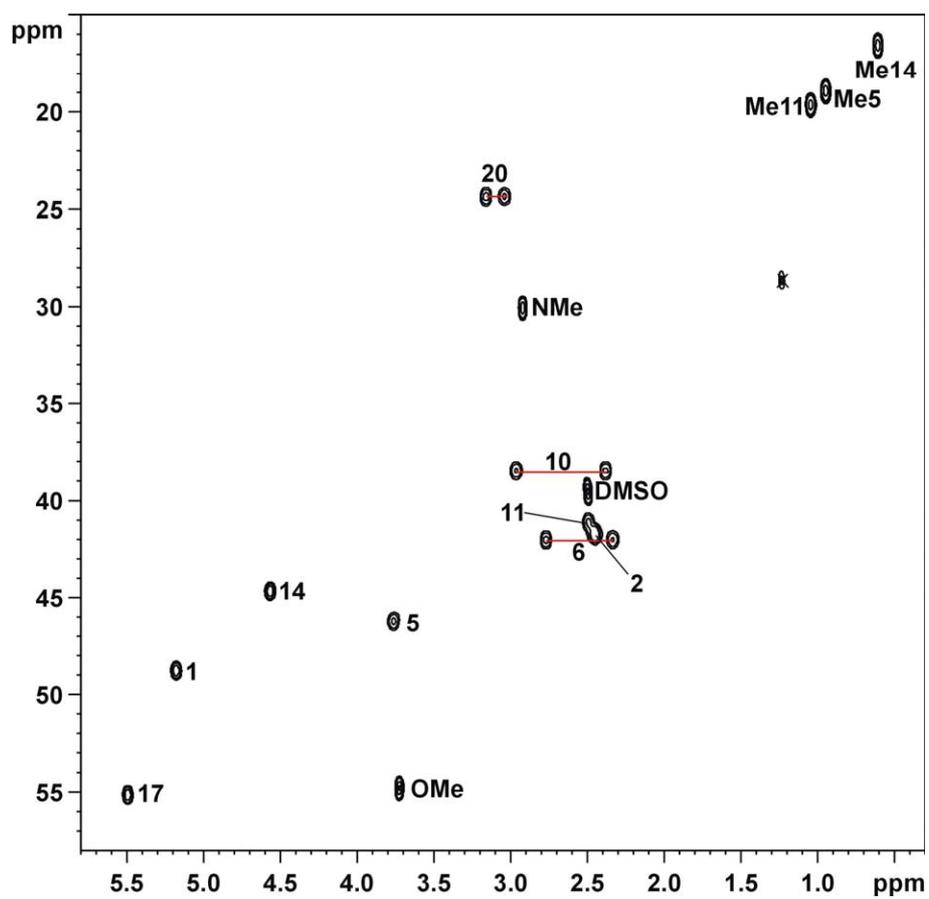


Abb. 9. Alkylbereich des HMQC Spektrums für **Sy5141** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}).

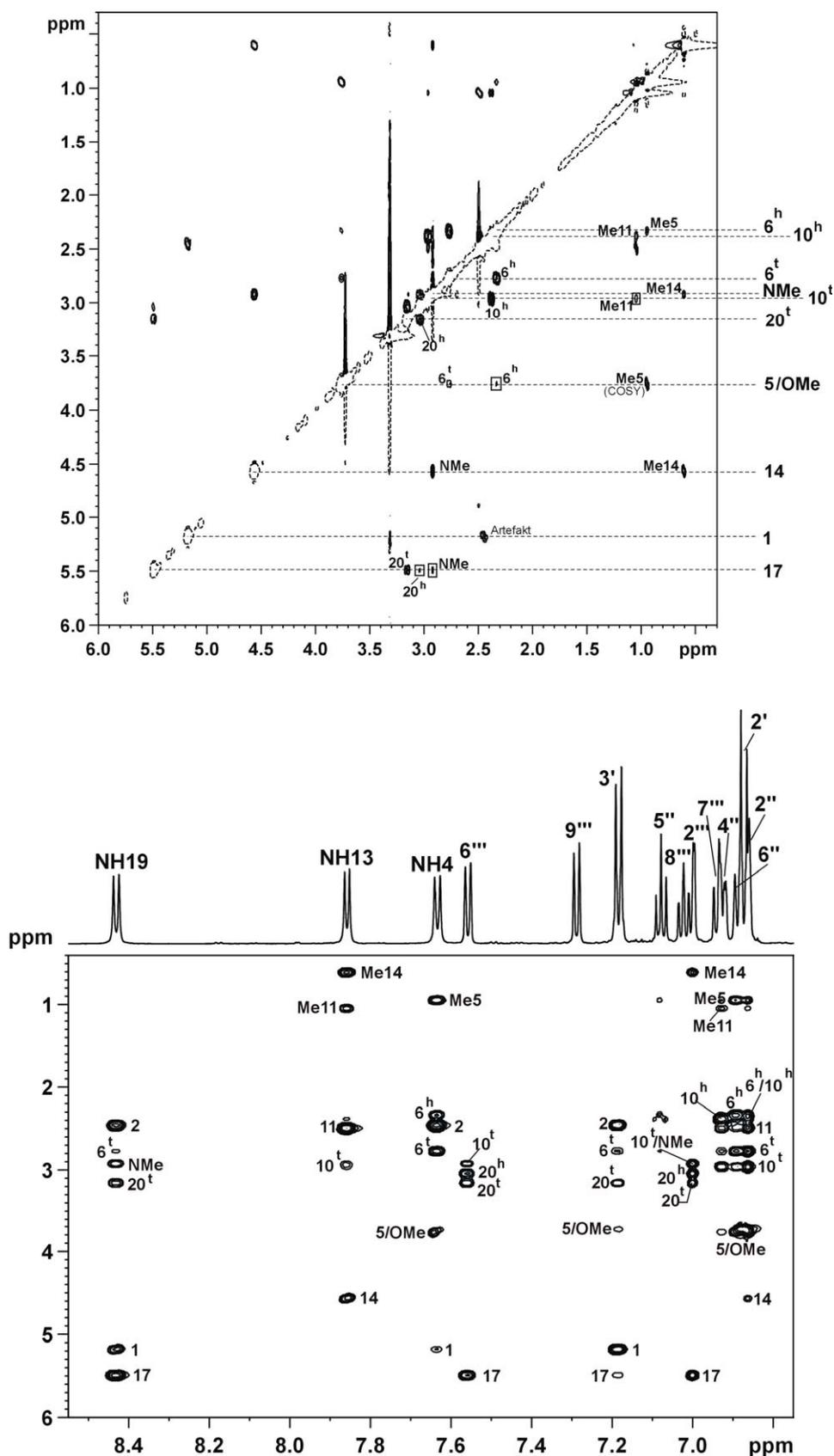


Abb. 10. und **Abb. 11.** ROESY Ausschnitte für **Sy5141** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}) aus dem Alkylbereich (oben) bzw. dem NH-/Aromatenbereich.

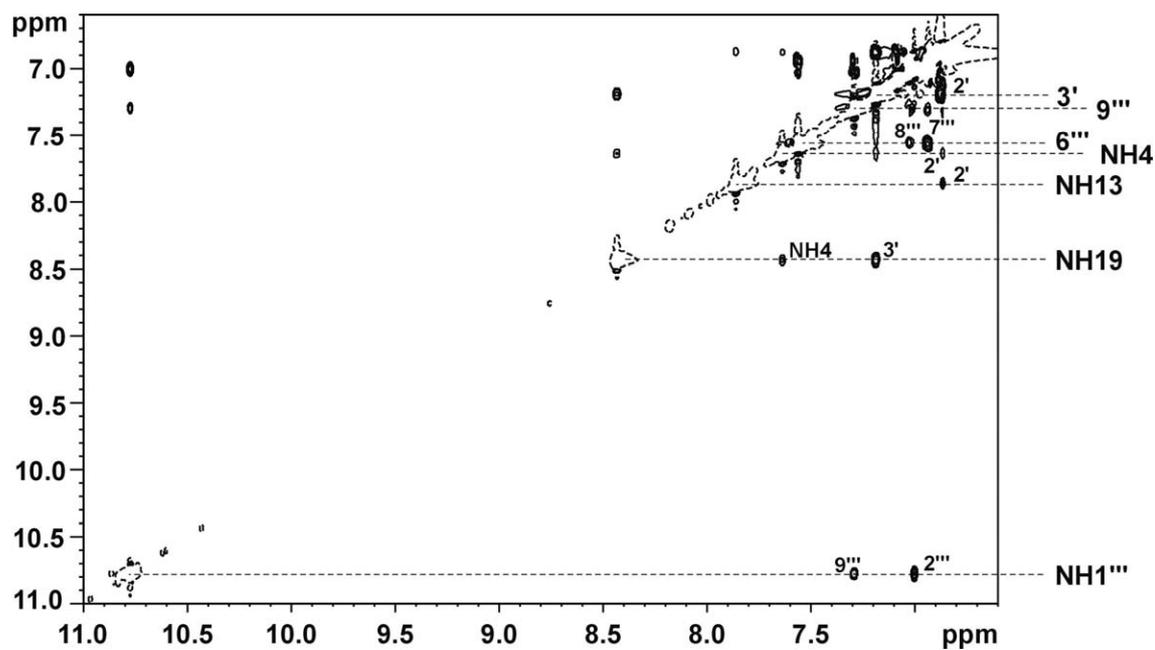


Abb. 12. NH-/Aromatenbereich des ROESY Spektrums von **Sy5141** (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}).

2.1 Temperaturreihe der NH Protonen

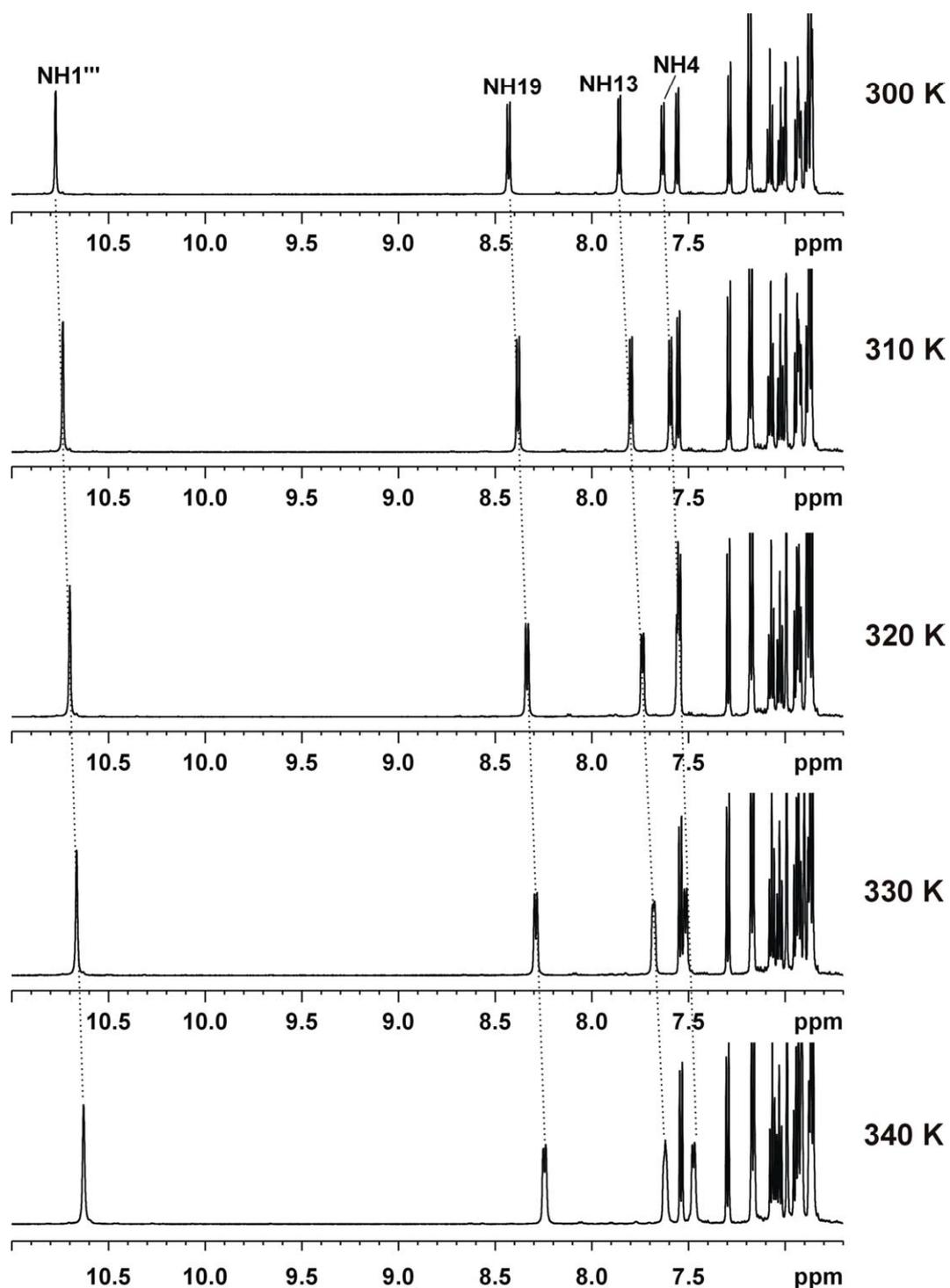


Abb. 13. ^1H NH-/Aromatenbereich für **Sy5141** in Abhängigkeit von der Temperatur (600 MHz, DMSO_{d6}).

3. Vergleich experimenteller Parameter von Sy2741 und Sy5141

3.1 Vergleich der ROE Muster und der berechneten Abstände

ROE	Für Sy-27-4-1 [Å]	Für Sy-51-4-1 [Å]
NH1 ^{'''} – 9 ^{'''}	2.8	2.9
NH1 ^{'''} – 2 ^{'''}	2.4	2.4
NH19 – NH4	2.7	3.0
NH19 – 3'	2.5	2.6
NH19 – 17	2.1	2.2
NH19 – 1	2.7	2.7
NH19 – 14	-	4.0
NH19 – 20t	3.3	3.0
NH19 – NMe	3.2 (NH19 – NH16)	2.9
NH19 – 6t	3.3	3.9
NH19 – 2h/t	2.4	2.4
NH13 – 14	-	2.7
NH13 – 10t	-	3.4
NH13 – 11	2.1	2.1
NH13 – Me11	3.1	3.0
NH13 – Me14	2.4	2.5
NH4 – 1	3.1 (NH4 / 6^{'''} – 1)	3.5
NH4 – 5	2.65 (NH4 / 6 ^{'''} – 5 / OMe)	2.8
NH4 – 6t	2.5 (NH4 / 6 ^{'''} – 6t)	2.7
NH4 – 2h/t	2.1 (NH4 / 6 ^{'''} – 2h/t)	2.15
NH4 – 6h	2.6 (NH4 / 6 ^{'''} – 6h)	2.8
NH4 – Me5	2.55 (NH4 / 6 ^{'''} – Me5)	2.6
6 ^{'''} – 17	2.7 (NH4 / 6 ^{'''} – 17)	2.6
6 ^{'''} – 20t	2.8 (NH4 / 6 ^{'''} – 20t)	3.0
6 ^{'''} – 20h	-	2.9
6 ^{'''} – NMe	-	3.4
6 ^{'''} – Me14	-	4.0
9 ^{'''} – Me14	-	4.2
3' – 17	-	5.3
3' – 1	2.7	2.3
3' – 5/OMe	3.2	3.8
3' – 20t	3.3	3.3
3' – 6t	3.5	3.5
3' – 2h/t	2.5	2.6
5 ^{''} – Me5	3.7	4.2
2 ^{''} – 17	2.8	2.6
2 ^{''} – 20t	3.1	3.1
2 ^{''} – 20h	2.8	2.8
2 ^{''} – NMe	3.1 (2 ^{''} – NH16)	2.8
2 ^{''} – Me14	3.0	3.0
2' / 2 ^{''} – 14	3.3	3.35
4 ^{''} / 7 ^{'''} – Me11	3.55	3.5
6 ^{''} – Me5	2.8	3.0
2' / 2 ^{''} – Me5	3.15	2.9

4'' – 10t	2.9 (4'' / 7''' – 10t)	2.9
4'' – 6t	3.2 (4'' / 7''' – 6t)	3.7
4'' – 11	3.0 (4'' / 7''' – 11)	3.0
4'' – 10h	2.4 (4'' / 7''' – 10h)	2.4
6'' – 10t	3.1	3.2
6'' – 6t	2.85	2.9
6'' – 11	3.4	3.25
6'' – 6h	2.4	2.4
2'' – 10t	2.5 (2' / 2'' – 10t)	2.4
2'' – 6t	2.4 (2' / 2'' – 6t)	2.3
2'' – 11	2.8 (2' / 2'' – 11)	2.6
2'' – 6h / 10h	2.9 (2' / 2'' – 10h)	2.3
	2.7 (2' / 2'' – 6h)	
17 – 20t	2.4	2.3
17 – 20h	2.5	2.75
17 – NMe	2.8 (17 – NH16)	3.1
17 – 6t	-	3.3
1 – NMe	-	3.8
14 – NMe	2.1 (14 – NH16)	2.0
5 – 6t	2.5 (5 / OMe – 6t)	2.6
5 – 6h	-	2.9
20h – 20t	1.8	1.9
10t – 10h	1.7	1.8
6t – 6h	= 1.8	= 1.8
14 – Me14	2.2	2.3
10t – Me11	2.7	2.7
NMe – Me14	2.7 (NH16 – Me14)	2.6
6t – Me5	-	3.2
6h – Me5	2.7	2.65
10h – Me11	2.5	2.5
5 – Me5	2.25 (5 / OMe – Me5)	2.3
2' / 2'' – 5	2.0 (2' / 2'' – 5 / OMe)	2.4
2' / 2'' – OMe	2.0 (2' / 2'' – 5 / OMe)	2.1
6'' – Me11	-	3.4
NH16 – NH13	2.8	- (NMe – NH13)
NH13 – 2''	3.1	Im Rauschen
NH4 / 6''' – 8'''	2.8	-
NH4 / 6''' – 7'''	2.3	2.2
NH4 / 6''' – 2''	3.25	-
9''' – 7'''	2.85	Im Rauschen
NH16 – 20t	3.2	3.1 (NMe – 20t)
NH16 – 20h	2.4	2.4 (NMe – 20h)
5'' – 6h	3.45	?
2' / 2'' – 1	3.4	-
7''' / 4'' – 5 / OMe	3.1	-
6'' – 5 / OMe	2.7	Nicht integrierbar
6'' – 10h	2.9	-
7''' / 4'' – 6h	3.11	-
7''' / 4'' – Me5	3.45	-
1 – 2h/t	2.2	COSY

14 – 11

3.4

-

Tab. 2. Vergleich der für **Sy2741** und **Sy5141** ermittelten HH-Abstände aus der ROESY Integration. Abstände, die mehr als 0.4 Å voneinander abweichen, sind fett gedruckt.

3.2 ¹H- und ¹³C-Verschiebungen für Sy2741 und Sy5141

Sy2741			Sy5141		
Atom	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]	Atom	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]
H1	5.16	49.3	H1	5.18	48.7
H2 ^h	2.37	42.7	H2 ^{h/t}	2.44	41.7
H2 ^t	2.42	42.7			
NH4	7.54	-	NH4	7.63	-
H5	3.74	46.0	H5	3.76	46.2
Me5	0.88	18.7	Me5	0.94	18.9
H6 ^h	2.22	42.3	H6 ^h	2.33	42.0
H6 ^t	2.80	42.3	H6 ^t	2.76	42.0
H2 ^{''}	6.83	n.d.	H2 ^{''}	6.86	
H6 ^{''}	6.88	n.d.	H6 ^{''}	6.89	
H5 ^{''}	7.08	n.d.	H5 ^{''}	7.08	
H4 ^{''}	6.92	n.d.	H4 ^{''}	6.92	
H10 ^h	2.39	38.7	H10 ^h	2.37	38.4
H10 ^t	2.95	38.7	H10 ^t	2.96	38.4
H11	2.48	41.1	H11	2.49	41.1
Me11	1.04	19.4	Me11	1.04	19.6
NH13	7.82	-	NH13	7.86	-
H14	4.49	47.0	H14	4.57	44.6
Me14	0.91	18.8	Me14	0.60	16.5
NH16	8.21	-	NMe	2.92	30.0
H17	4.65	52.6	H17	5.49	55.1
H20 ^h	2.83	28.4	H20 ^h	3.04	24.3
H20 ^t	3.02	28.4	H20 ^t	3.11	24.3
H2 ^{'''}	6.98	123.3	H2 ^{'''}	7.00	
NH1 ^{'''}	10.77	-	NH1 ^{'''}	10.77	-
H9 ^{'''}	7.31	110.9	H9 ^{'''}	7.29	
H8 ^{'''}	7.03	120.5	H8 ^{'''}	7.02	
H7 ^{'''}	6.94	117.8	H7 ^{'''}	6.93	
H6 ^{'''}	7.54	118.0	H6 ^{'''}	7.56	
NH19	8.50	-	NH19	8.43	-
H3 [']	7.10	n.d.	H3 [']	7.18	
H2 [']	6.84	n.d.	H2 [']	6.87	
OMe	3.73	54.8	OMe	3.72	54.8

Tab. 3. ¹H- und ¹³C-Verschiebungen für **Sy2741** und **Sy5141** in DMSO_{d6} bei 300 K (600 MHz).

4. Die Makrozyklen Maclac1 und Maclac2

4.1 ^1H und 2D HMQC Spektren

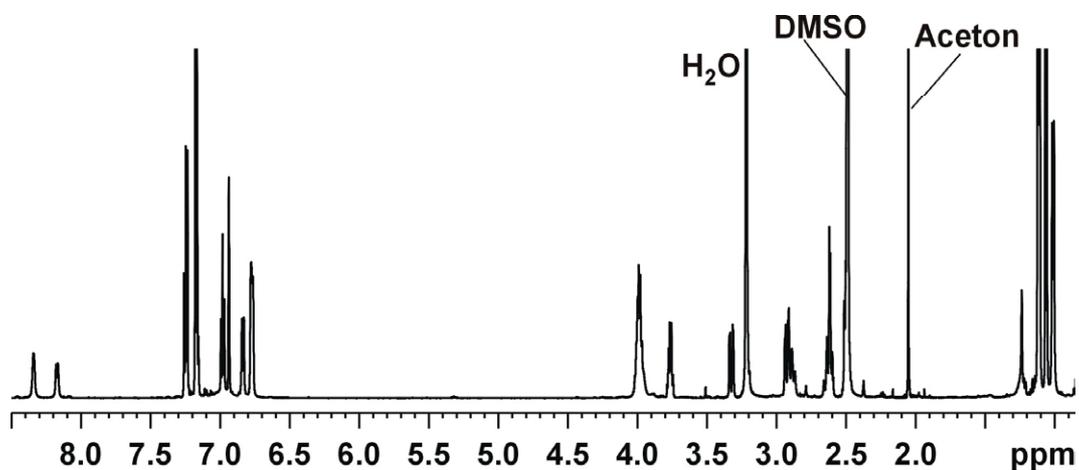


Abb. 14. ^1H Spektrum von Maclac1 bei 320 K (600 MHz, DMSO_{d6}).

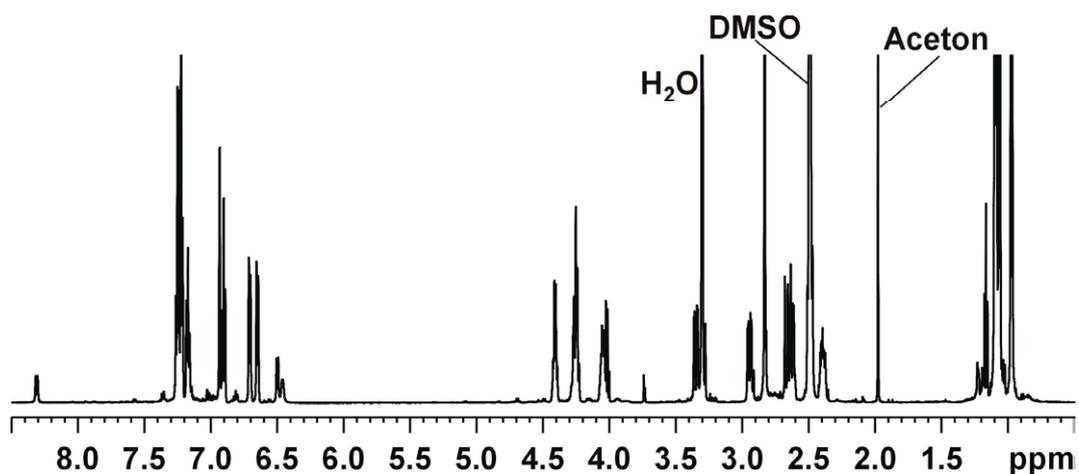


Abb. 15. ^1H Spektrum von Maclac2 bei 300 K (600 MHz, DMSO_{d6}).

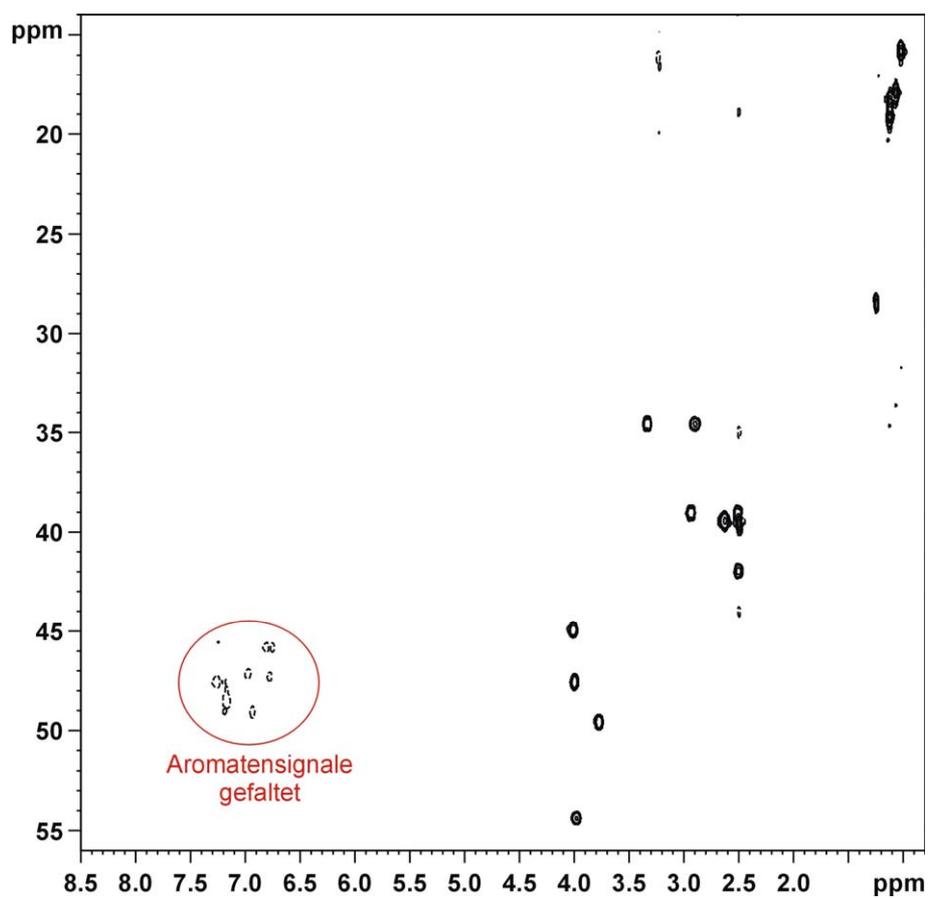


Abb. 16. HMBC Spektrums von **Maclac1** bei 320 K (600 MHz, DMSO_{d6}). Der Aromatenbereich ist wiederum gefaltet.

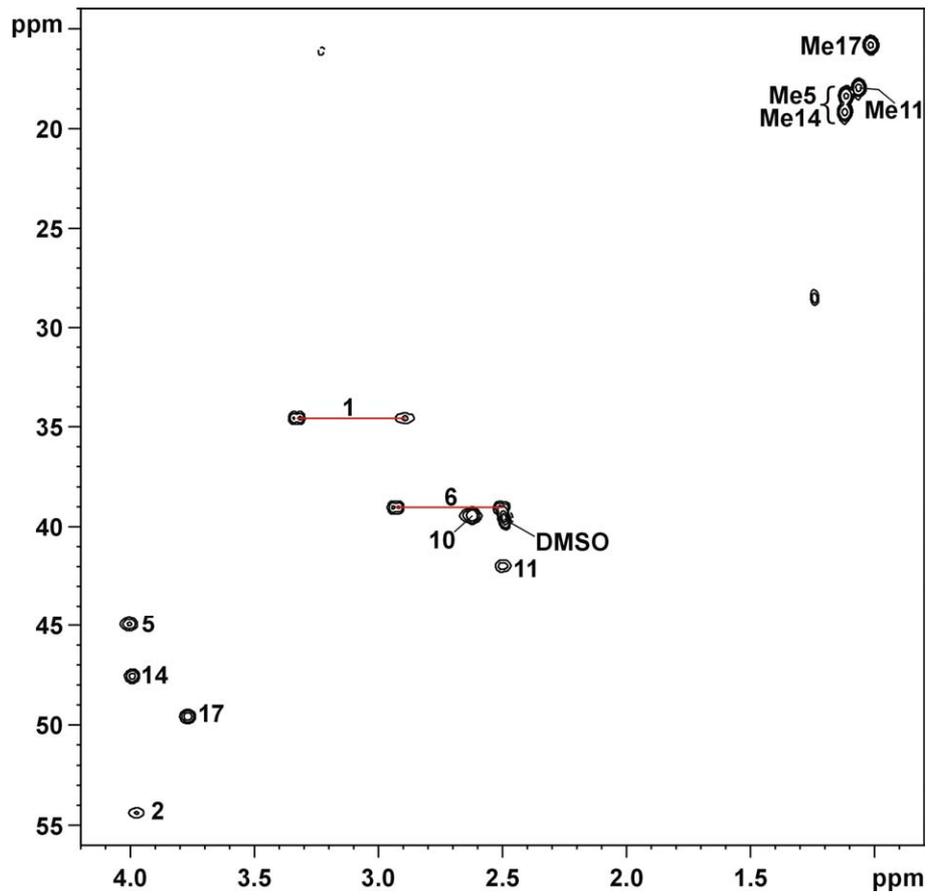


Abb. 17. Alkylbereich des HMQC Spektrums von **Maclac1** bei 320 K (600 MHz, DMSO_{d6}).

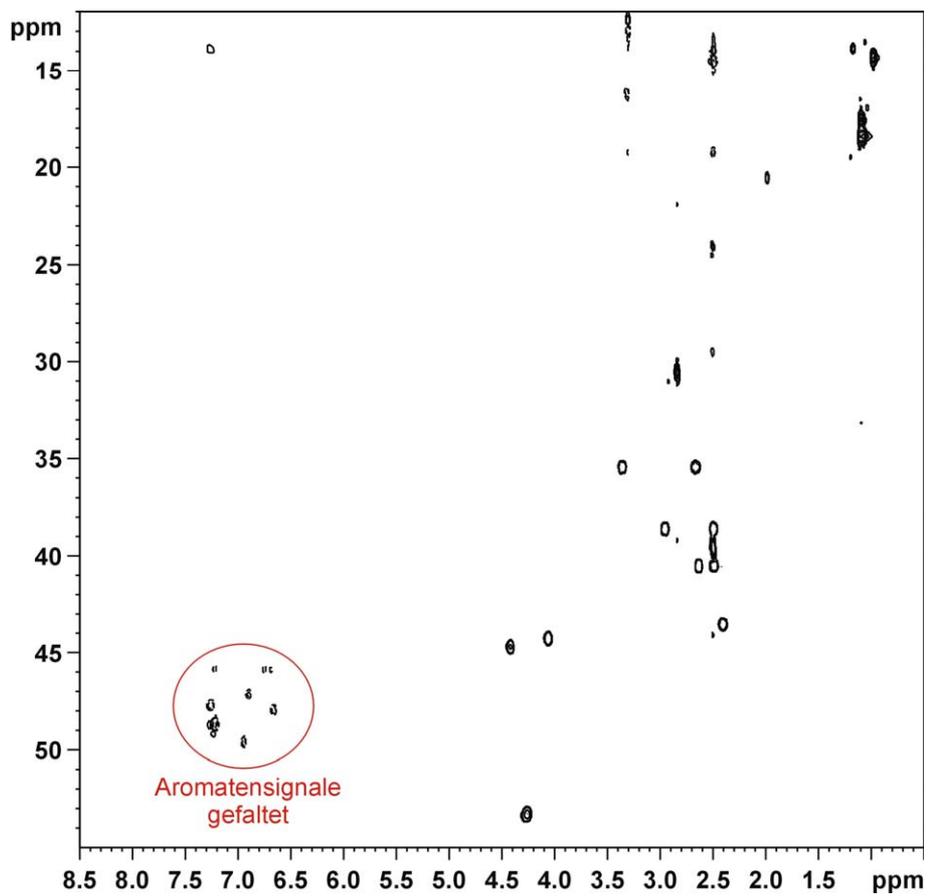


Abb. 18. HMBC Spektrum von **Maclac2** bei 300 K (600 MHz, DMSO_{d6}). Wiederum mit gefaltetem Aromatenbereich.

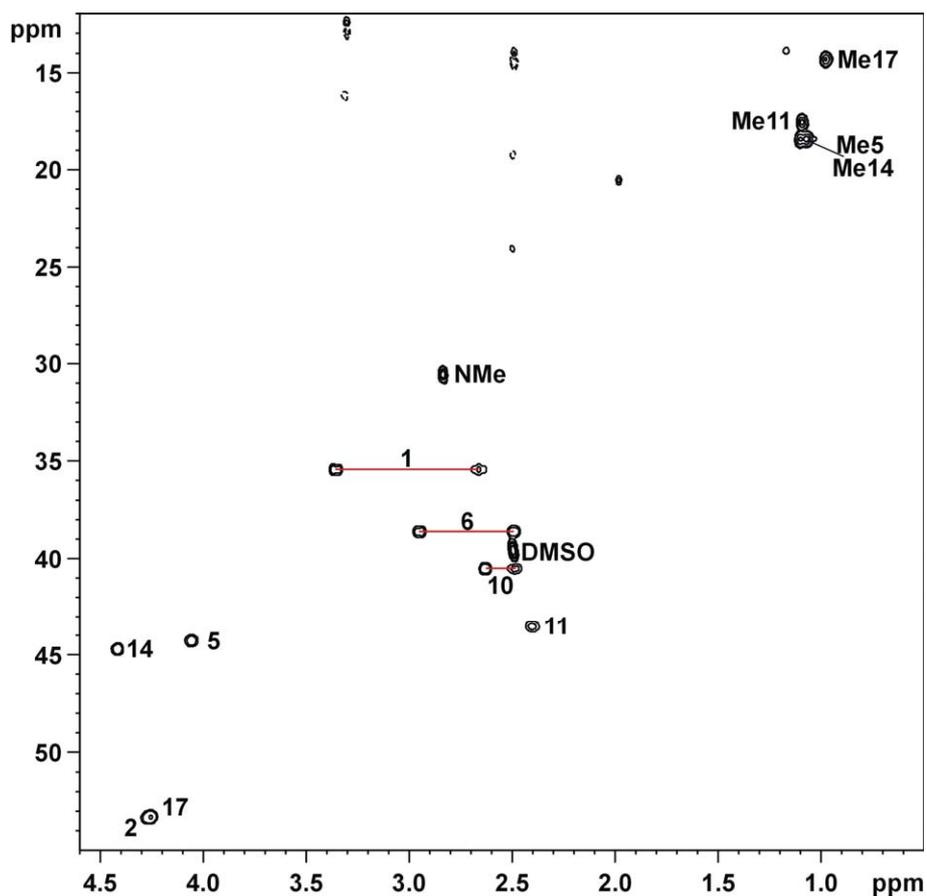


Abb. 19. Alkylbereich aus dem HMBC Spektrum von **Maclac2** bei 300 K (600 MHz, DMSO_{d6}).

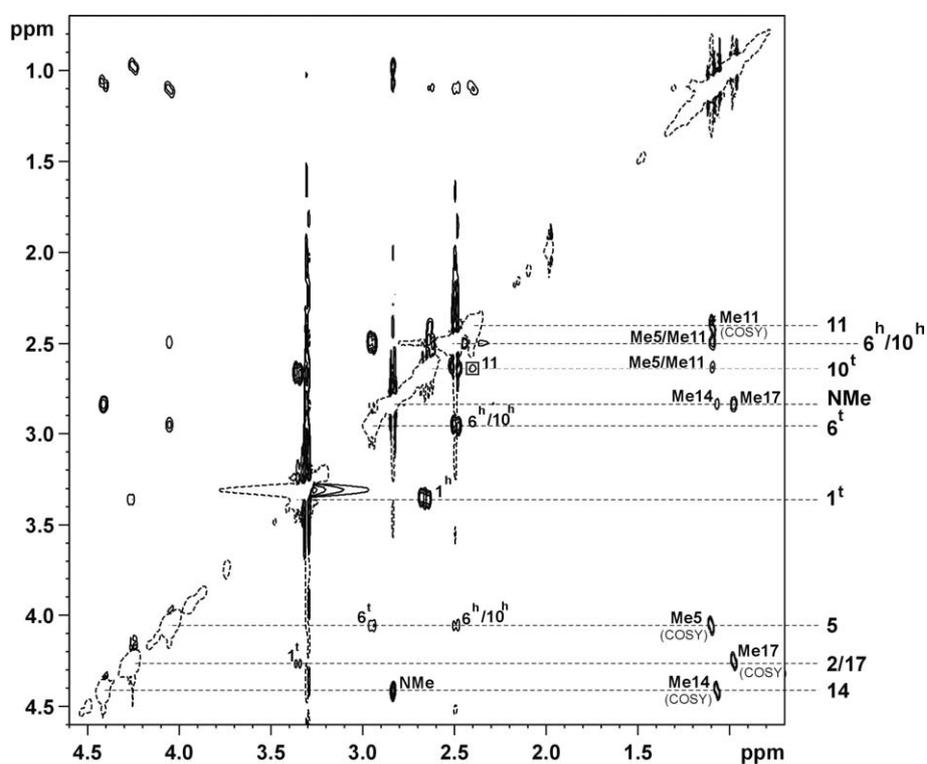


Abb. 20. ROESY Spektrum für **Maclac2** – Alkylbereich (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}).

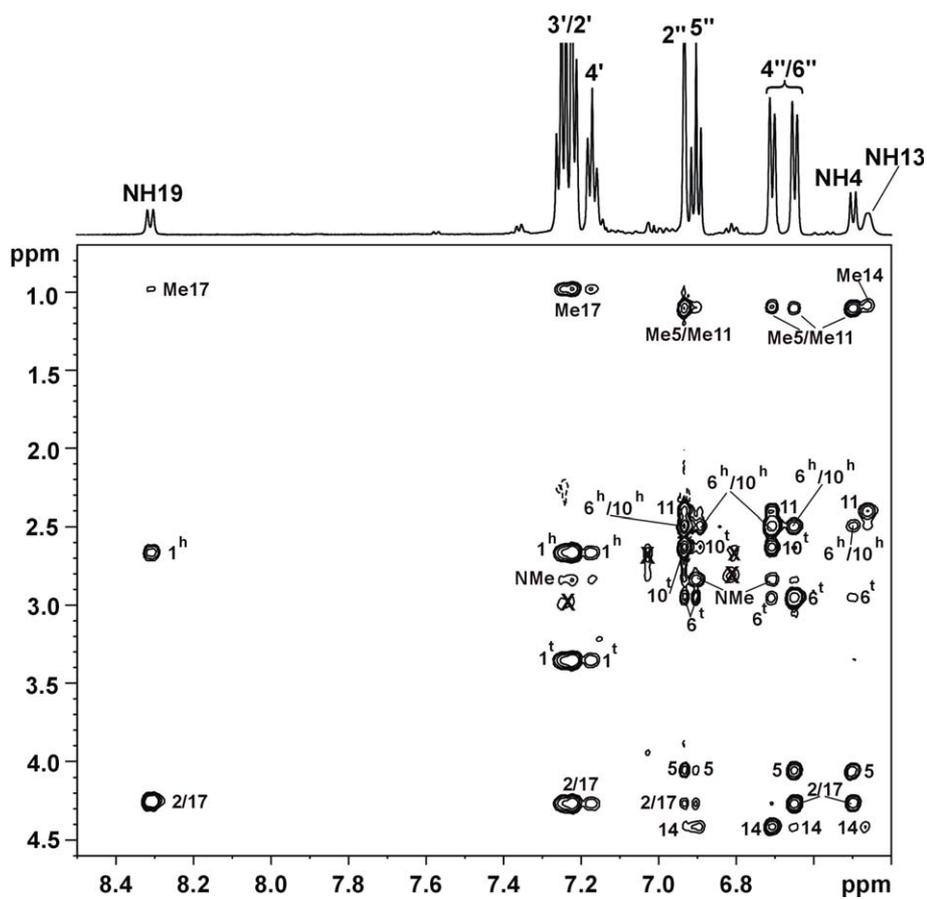


Abb. 21. ROESY Spektrum für **Maclac2** – Aromaten- und NH-Bereich. Die aromatischen und NH-Signale zeigen untereinander nur zwei ROE Signale – nämlich NH19 zu 2'/3' und NH19 zu NH13/NH14.

4.2 Temperaturreihen der NH Protonen von Maclac1 und Maclac2

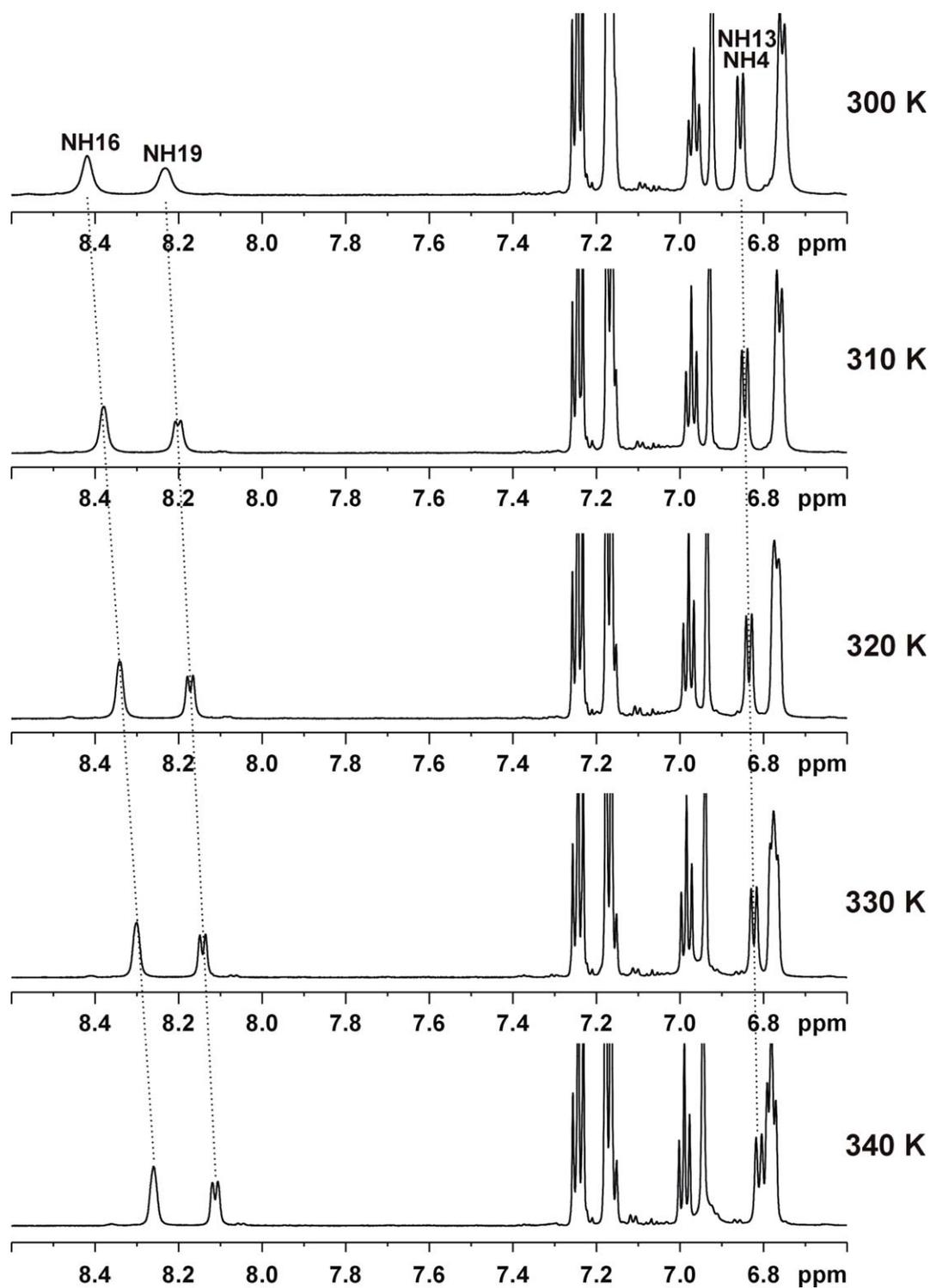


Abb. 22. ^1H Spektren – NH-/Aromatenbereich – für **Maclac1** in Abhängigkeit von der Temperatur (600 MHz, DMSO-d_6).

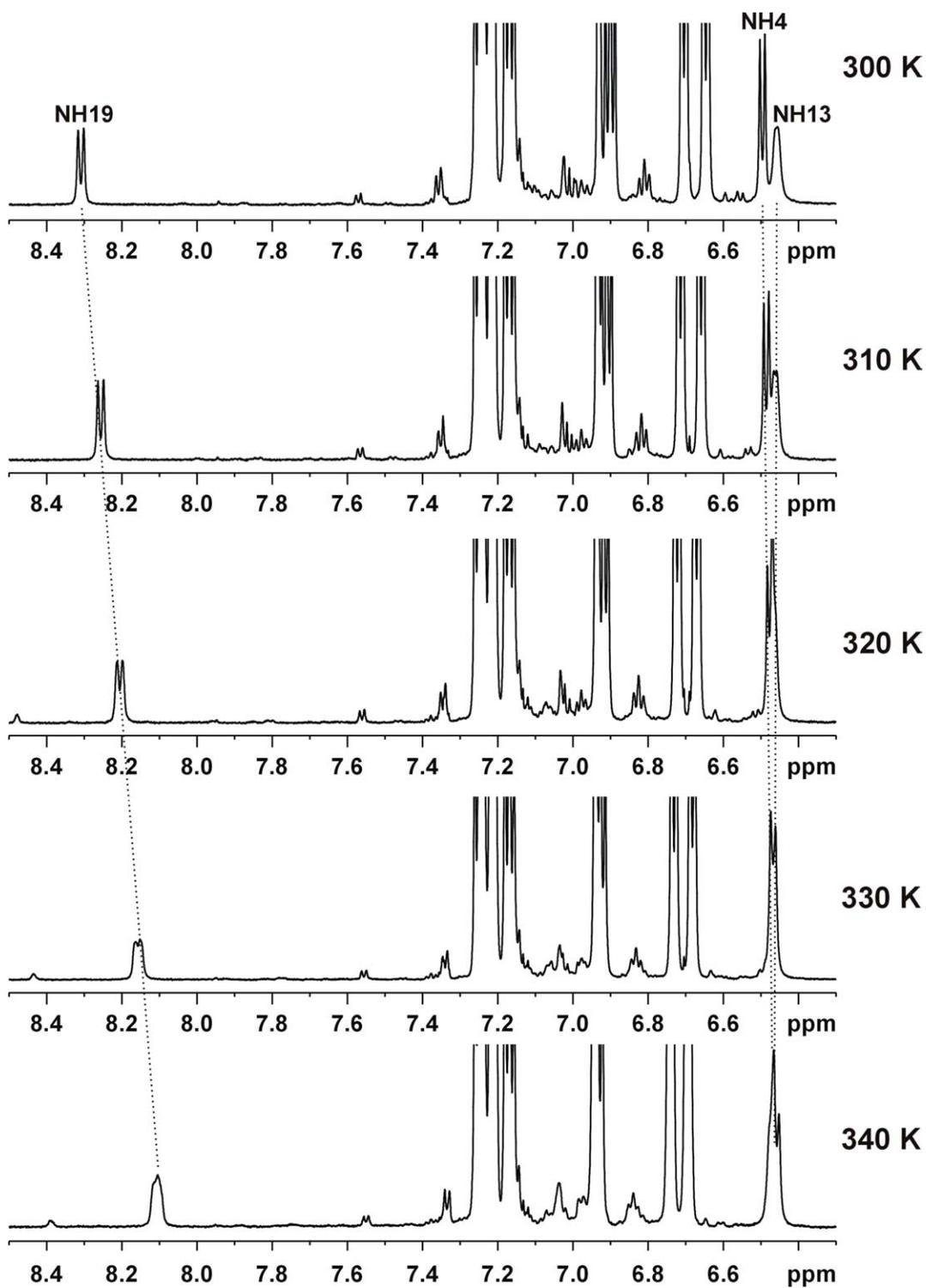


Abb. 23. ^1H Spektren – NH-/Aromatenbereich – für **Maclac2** in Abhängigkeit von der Temperatur (600 MHz, DMSO-d_6).

4.3 Für Maclac2 erhaltene HH-Abstände aus ROESY- bzw. NOESY-Integration

ROE	Abstand [Å]	ROE	Abstand [Å]
<i>NH19 – 2'/3'</i>	2.3	4''/6''(1) – NMe	3.65
<i>NH19 – 2/17</i>	2.0	4''/6''(1) – 10t	3.1
<i>NH19 – 1h</i>	2.5	4''/6''(1) – 6h/10h	2.4
<i>NH19 – Me17</i>	3.3 (2.8)	4''/6''(1) – 11	3.1
2'/3' – 2/17	2.7	4''/6''(1) – Me5/Me11	3.6
2'/3' – 1t	2.6	4''/6''(2) – 14	4.2
2'/3' – NMe	3.6	4''/6''(2) – 2/17	3.0
2'/3' – 1h	2.7	4''/6''(2) – 5	3.1
2'/3' – Me17	3.1	4''/6''(2) – 6t	2.4
4' – 2/17	3.3	4''/6''(2) – 6h/10h	3.2
4' – 1t	3.4	4''/6''(2) – Me5/Me11	3.7
4' – 1h	3.4	<i>NH4 – 2/17</i>	2.5
4' – Me17	3.9	<i>NH4 – 5</i>	2.6
2'' – 14	4.5	<i>NH4 – 6t</i>	3.2
2'' – 2/17	4.1	<i>NH4 – 6h/10h</i>	2.9
2'' – 5	3.5	<i>NH4 – Me5/Me11</i>	2.4 (2.25)
2'' – 6t	3.4	<i>NH13 – 14</i>	3.0
2'' – 10t	2.4	<i>NH13 – 6h/10h</i>	2.8
2'' – 6h/10h	2.2	<i>NH13 – 11</i>	2.3
2'' – 11	2.55	<i>NH13 – Me14</i>	2.6 (2.2)
2'' – Me5/Me11	2.55	2/17 – 1t	2.5
5'' – 14	3.6	<i>14 – NMe</i>	2.85
5'' – 2/17	4.1	5 – 6t	2.3
5'' – 5	4.1	5 – 6h/10h	2.4
5'' – 6t	3.6	1t – 1h	≅1.75
5'' – NMe	3.7	6t – 6h(10h)	1.8
5'' – 10t	3.7	10t – 11	2.6
5'' – 6h/10h	3.1	<i>NMe – Me14</i>	2.7
5'' – Me5/Me11	3.3	<i>NMe – Me17</i>	2.5
4''/6''(1) – 14	3.1	<i>1h/10t – Me5/Me11</i>	2.5
4''/6''(1) – 6t	3.8	<i>6h/10h – Me5/Me11</i>	2.3

Tab. 4. Übersicht über alle für **Maclac2** erhaltenen HH-Abstände (300 K, 600 MHz, DMSO_{d6}). In **rot** jene ROEs, bei denen der NH-Korrekturfaktor enthalten ist. In **grün** jene, die auf 5 – Me5 (≅ 2.16 Å) geeicht wurden. Für 4''/6'': (1) Signal bei 6.70 ppm, (2) Signal bei 6.65 ppm.

4.4 ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für Maclac1 und Maclac2

Maclac1			Maclac2		
Atom	$\delta ^1\text{H}$ [ppm]	$\delta ^{13}\text{C}$ [ppm]	Atom	$\delta ^1\text{H}$ [ppm]	$\delta ^{13}\text{C}$ [ppm]
H1 ^h	2.89	34.6	H1 ^h	2.66	35.4
H1 ^t	3.33	34.6	H1 ^t	3.35	35.4
H2	3.98	54.4	H2	4.29	53.4
NH4	6.83	-	NH4	6.50	-
H5	4.00	45.0	H5	4.05	44.3
Me5	1.11	18.3/19.1	Me5	1.07/1.10	18.4
H6 ^h	2.50	39.1	H6 ^h	2.49	38.6
H6 ^t	2.93	39.1	H6 ^t	2.95	38.6
H2''	6.93	n.d.	H2''	6.93	n.d.
H6''	6.77	n.d.	H6''	6.65/6.70	n.d.
H5''	6.98	n.d.	H5''	6.90	n.d.
H4''	6.77	n.d.	H4''	6.65/6.7	n.d.
H10 ^{h/t}	2.62	39.5	H10 ^h	2.48	40.5
			H10 ^t	2.63	40.5
H11	2.50	42.0	H11	2.40	43.6
Me11	1.06	17.9	Me11	1.09	17.5
NH13	6.83	-	NH13	6.46	-
H14	3.99	47.6	H14	4.41	44.7
Me14	1.12	18.3/19.1	Me14	1.07/1.10	18.4
NH16	8.34	-	NMe	2.84	30.5
H17	3.77	49.6	H17	4.25	53.3
Me17	1.01	15.8	Me17	0.97	14.3
NH19	8.17	-	NH19	8.31	-
H2'	7.17/7.24	n.d.	H2'	7.21/7.24	n.d.
H3'	7.17/7.24	n.d.	H3'	7.21/7.24	n.d.
H4'	7.16	n.d.	H4'	7.17	n.d.

Tab. 5. ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für **Maclac1** (bei 320 K) und **Maclac2** (bei 300 K) in DMSO_{d6} (600 MHz).

KAPITEL VI: 4'-modifizierte DNA Tetramere – Strukturanalyse für Einzel- und Doppelstrang

1. NMR-Spektren und –Daten für die Einzelstränge bei 300 K

1.1 Das unmodifizierte Tetramer 4PH

1.6 mg ($n = 1.09 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.66$ mM) **4PH** (als Triethylammoniumsalz) wurden in 0.7 mL Phosphatpuffer (30 mM, pH 7, D_2O) gelöst.

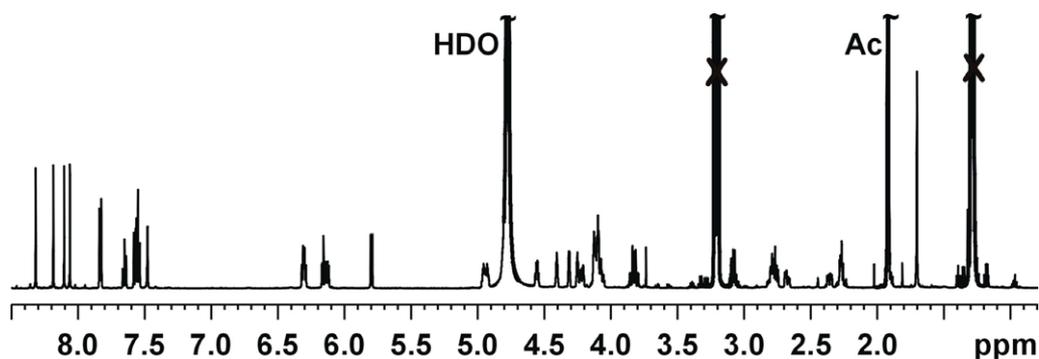


Abb. 1. Übersichtsprotonenspektrum von **4PH** (600 MHz, 300 K). Gekennzeichnet sind Restwasser-signal, Acetat und die Signale des Triethylammoniumions (X).

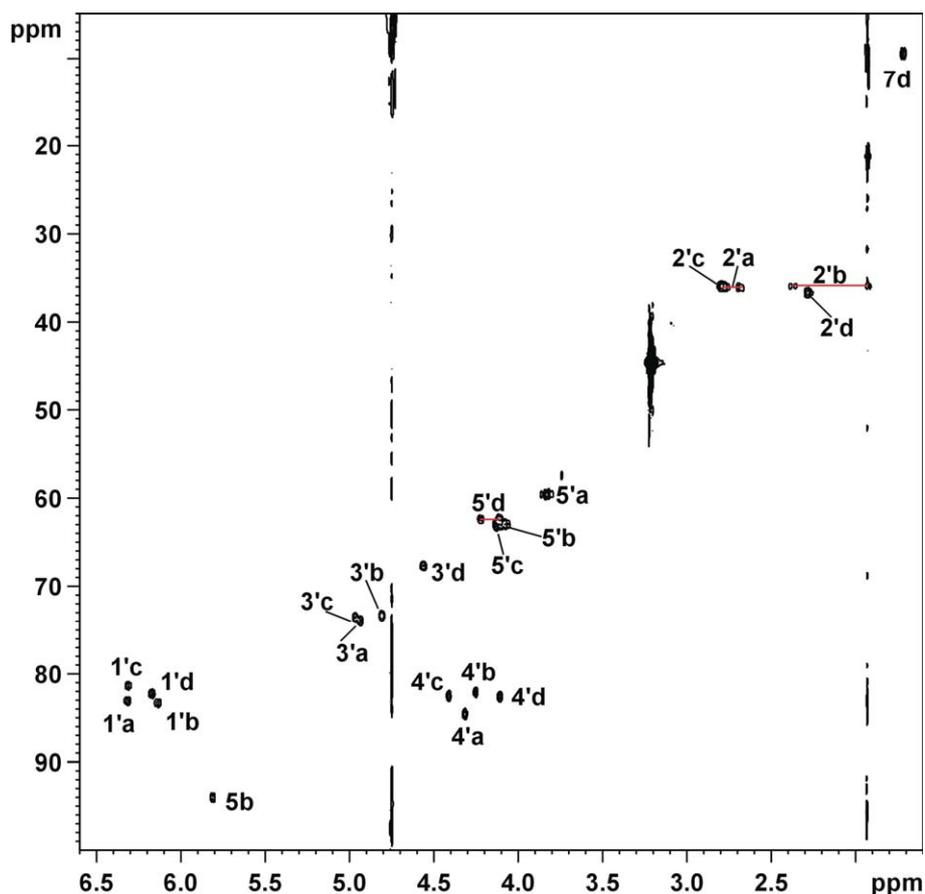


Abb. 2. Ausschnitt aus dem HMQC von **4PH** (600 MHz, 300 K). Der Signalbereich für die Basen-Kohlenstoffe ist nicht dargestellt, da dieser Bereich gefaltet wurde und daher eine nur schwache Signalintensität aufweist.

	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]		$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	
1'a	6.31	82.9		1'c	6.31	81.2
2'a	2.68	35.8		2'c^{h/t}	2.78	35.8
2'a	2.81	35.8		3'c	4.96	73.4
3'a	4.93	73.8		4'c	4.41	82.3
4'a	4.31	84.4		5'c^{h/t}	4.13	62.8
5'a^{h/t}	3.83	59.4		2c	8.06	n.d.
2a	8.10	n.d.		8c	8.32	137.2
8a	8.19	138.3		1'd	6.17	82.1
1'b	6.13	83.1		2'd^{h/t}	2.28	36.5
2'b	1.92	35.8		3'd	4.56	67.5
2'b	2.36	35.8		4'd	4.10	82.4
3'b	4.80	73.2		5'd^h	4.11	62.2
4'b	4.25	81.9		5'd^t	4.22	62.2
5'b^{h/t}	4.08	62.8		6d	7.48	n.d.
5b	5.81	93.9		7d	1.70	9.2
6b	7.57	138.7				

Tabelle 1. ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für **4PH** bei $T = 300\text{ K}$.

^1H - und ^{13}C -Verschiebungen der Deoxyriboseatome und die ^{13}C -Verschiebungen der Basenatome wurden (soweit möglich) aus dem HMQC abgelesen, die ^1H -Verschiebungen der Basen aus dem Protonenspektrum.

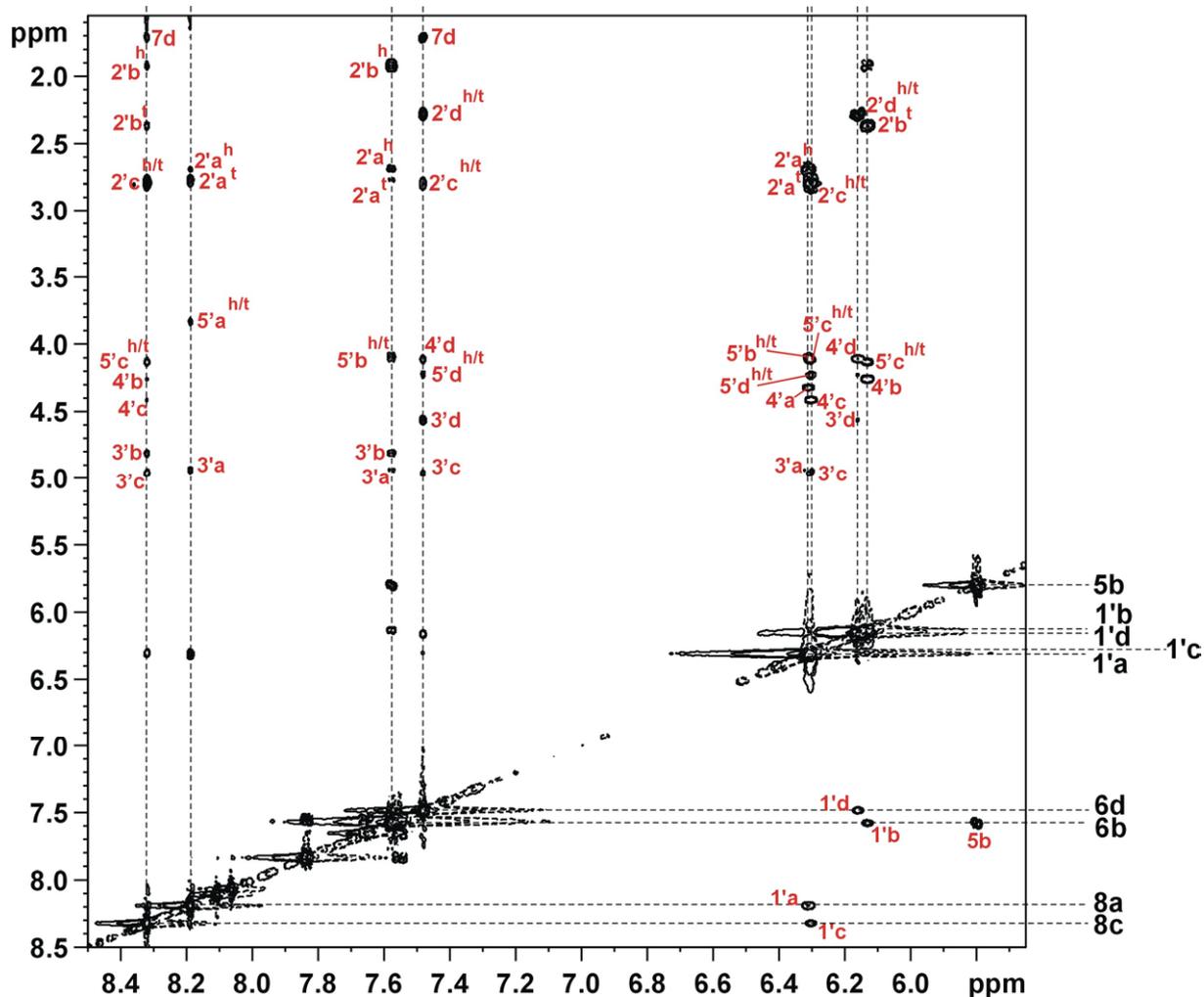


Abb. 3. Ausschnitt aus dem ROESY Spektrum für 4PH (600 MHz, 300 K). Gezeigt sind der Basen- und Anomerenbereich.

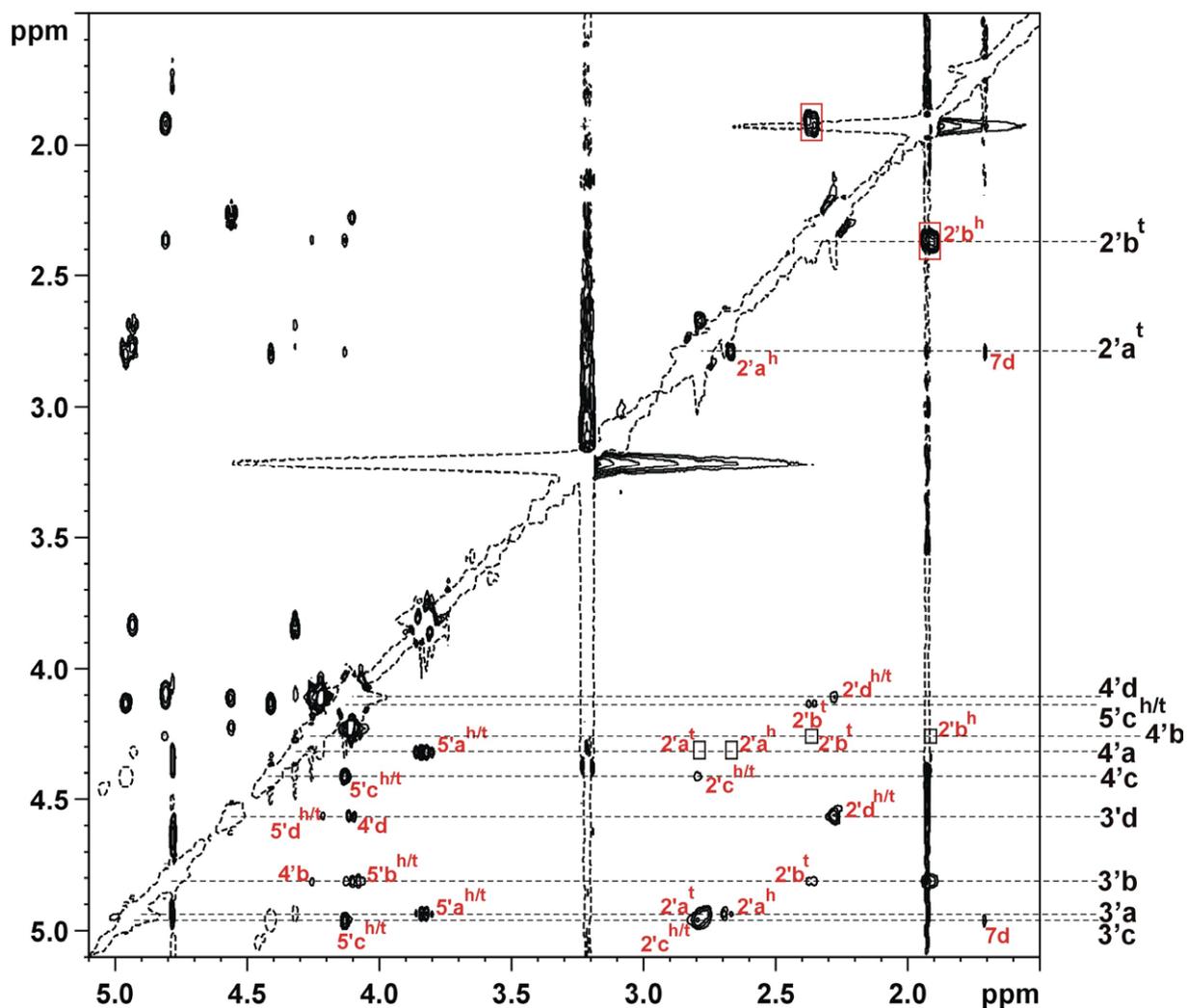


Abb. 4. Alkylbereich des ROESY Spektrums für **4PH** (600 MHz, 300 K). Die zur Eichung verwendeten Kreuzsignale sind rot umrandet. Kleine Kästchen in schwarz markieren ROE Signale, die vorhanden, aber in obiger Abbildung nicht intensiv genug waren, um erkennbar zu sein.

1.2 Das modifizierte Tetramer 4PM

1.84 mg ($n = 1.25 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.79$ mM) **4PM** (als Triethylammoniumsalz) wurden in 0.7 mL Phosphatpuffer (30 mM, pH 7, D₂O) gelöst und TSP als Referenz zugesetzt.

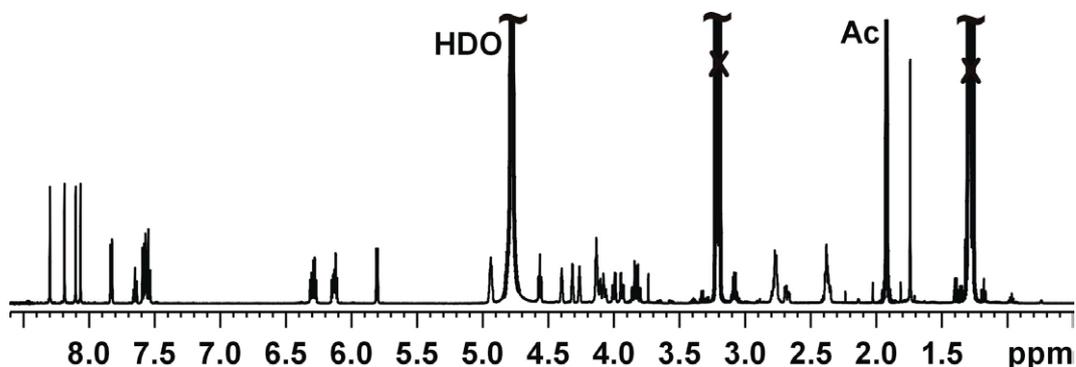


Abb. 5. Übersichtsprotonenspektrum für **4PM** bei 300 K (600 MHz). Gekennzeichnet sind Restwassersignal, Acetat und die Signale des Triethylammoniumions (X).

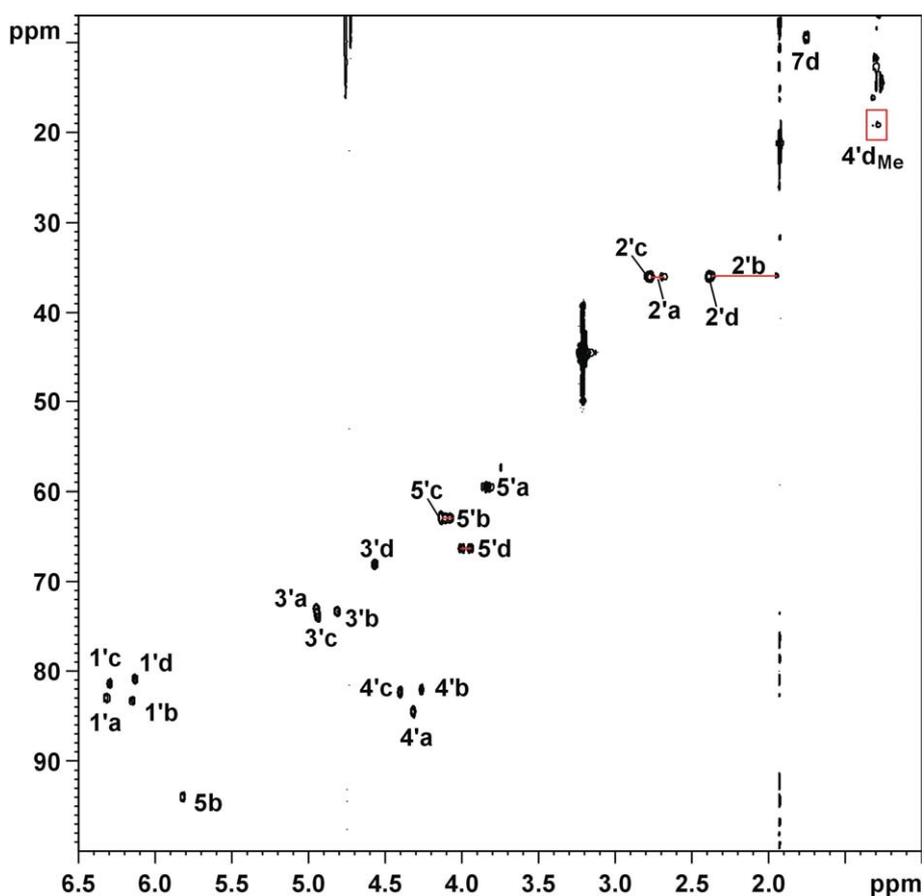


Abb. 6. Ausschnitt aus dem HMQC für **4PM** (600 MHz, 300 K). Auch hier sind die Signale des Basenbereichs gefaltet und infolge ihrer schwachen Intensität nicht dargestellt.

	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]		δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	
1'a	6.31	82.9		1'c	6.29	81.3
2'a	2.68	35.9		2'c^{h/t}	2.77	35.9
2'a	2.80	35.9		3'c	4.93	73.8
3'a	4.94	72.9		4'c	4.40	82.2
4'a	4.31	84.4		5'c^{h/t}	4.13	62.7
5'a^{h/t}	3.81/3.85	59.4		2c	8.06	n.d.
2a	8.10	n.d.		8c	8.30	137.2
8a	8.18	n.d.		1'd	6.13	80.8
1'b	6.14	83.2		2'd^{h/t}	2.38	35.9
2'b	1.93	35.8		3'd	4.56	68.0
2'b	2.35	35.8		4'd_{Me}	1.26	14.3
3'b	4.81	73.2		5'd^h	3.94	66.2
4'b	4.26	82.0		5'd^t	4.00	66.2
5'b^h	4.09	62.9		6d	7.57	n.d.
5'b^t	4.12	62.9		7d	1.75	9.3
5b	5.82	93.9				
6b	7.59	n.d.				

Tabelle 2. ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für **4PM** bei T= 300 K.

^1H - und ^{13}C -Verschiebungen der Desoxyriboseatome und die ^{13}C -Verschiebungen der Basenatome wurden (soweit möglich) aus dem HMQC abgelesen, die ^1H -Verschiebungen der Basen aus dem Protonenspektrum.

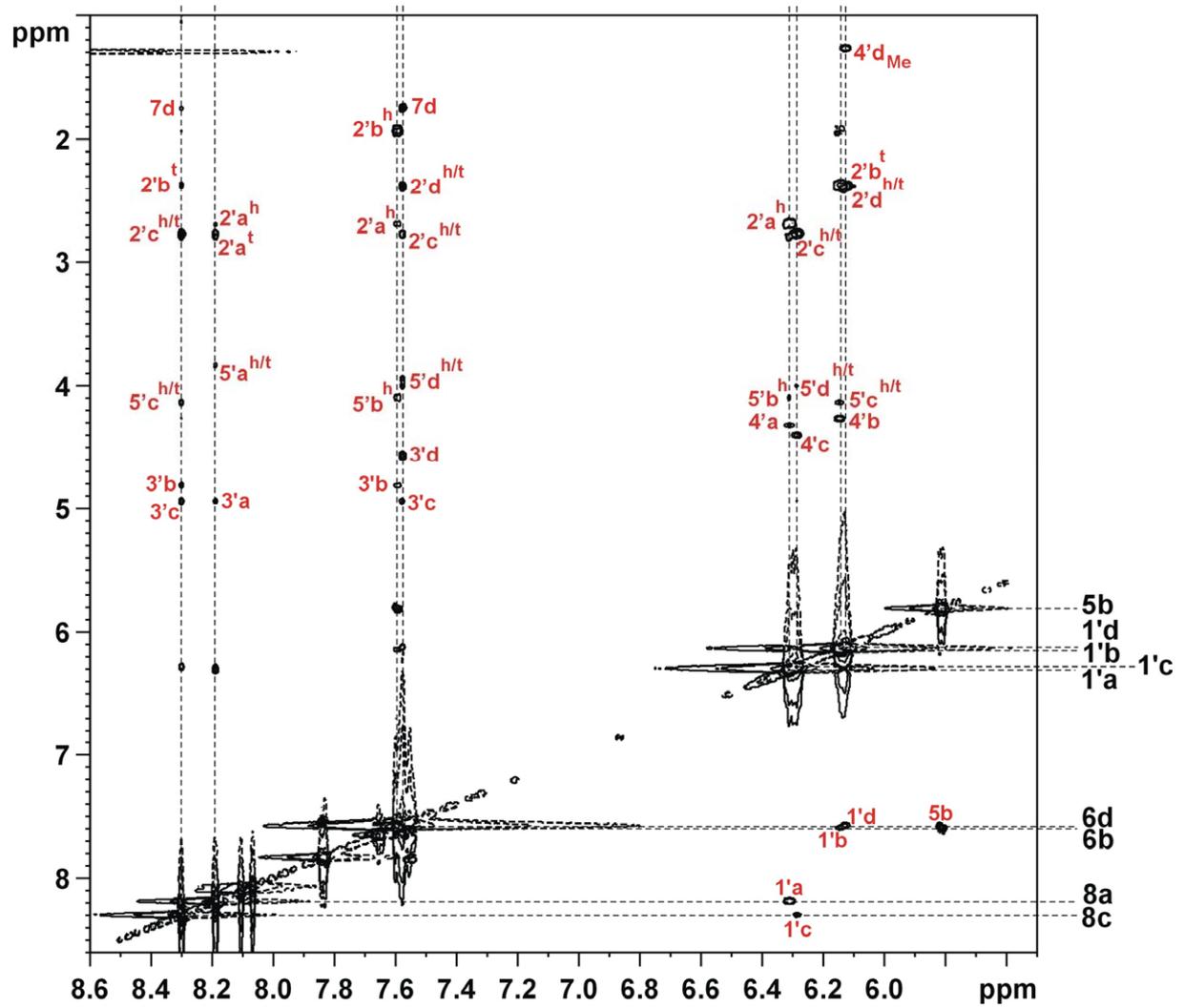


Abb. 7. Basen- und Anomerenbereich des ROESY Spektrums für **4PM** (600 MHz, 300 K).

1.3 Das komplementäre Tetramer 4T

3.42 mg ($n = 2.29 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 3.27$ mM) **4T** (als Triethylammoniumsalz) wurden in 0.7 mL Phosphatpuffer (30 mM, pH 7, D_2O) gelöst.

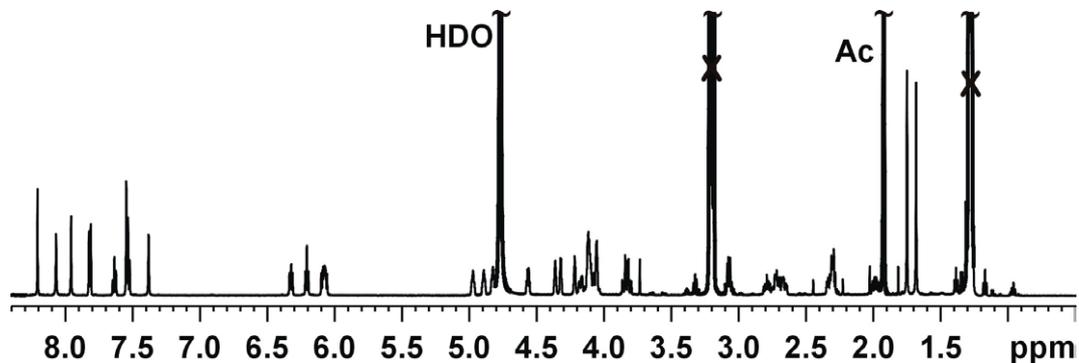


Abb. 9. Übersichtsprotonenspektrum von **4T** (600 MHz, 300 K). Gekennzeichnet sind enthaltenes Restwasser, Acetat und die Signale der Ethylgruppe des Triethylammoniumions (X).

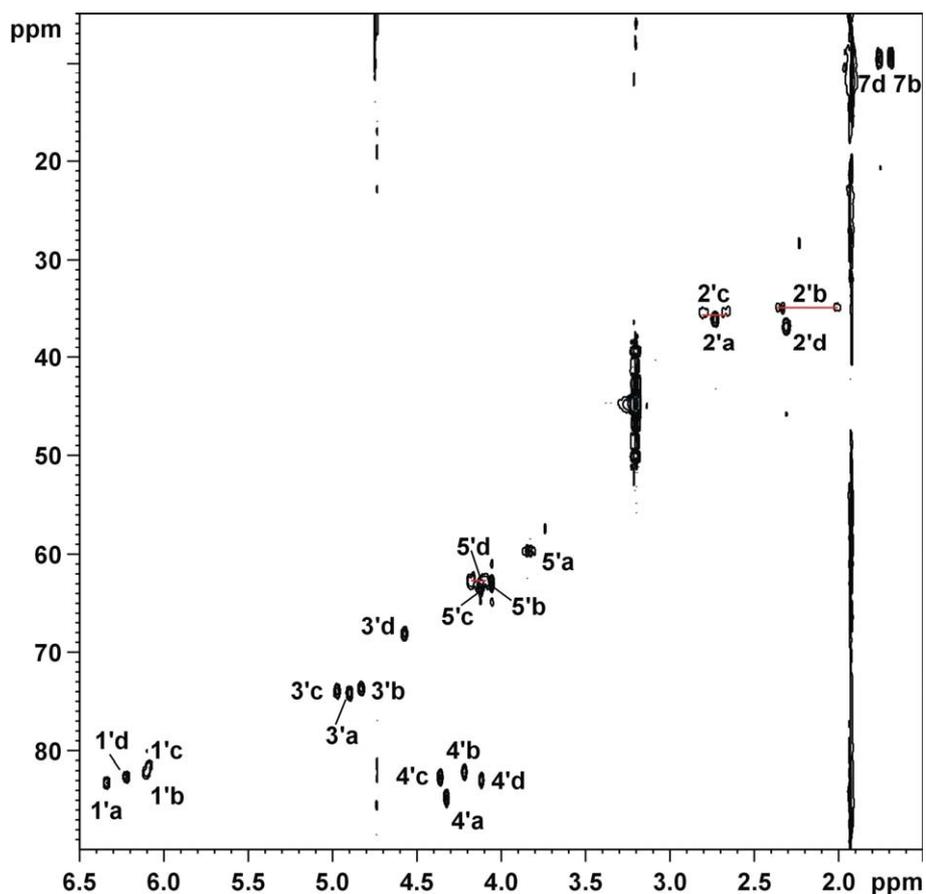


Abb. 10. Ausschnitt aus dem HMQC von **4T**. Auch für **4T** wurde der Basenbereich gefaltet und ist nicht abgebildet.

	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]		$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	
1'a	6.34	83.1		1'c	6.09	81.4
2'a^{h/t}	2.74	35.9		2''c	2.68	35.1
3'a	4.91	74.1		2'c	2.81	35.1
4'a	4.33	84.7		3'c	4.98	73.9
5'a^{h/t}	3.84	59.6		4'c	4.37	82.6
2a	8.08	n.d.		5'c^{h/t}	4.13	63.1
8a	8.22	138.5		8c	7.97	135.3
1'b	6.11	82.1		1'd	6.23	82.5
2'b	2.01	34.7		2'd^{h/t}	2.31	36.7
2''b	2.35	34.7		3'd	4.58	68.0
3'b	4.83	73.6		4'd	4.12	82.8
4'b	4.22	82.0		5'd^h	4.10	62.6
5'b^{h/t}	4.06	62.8		5'd^t	4.19	62.6
6b	7.39	n.d.		6d	7.56	n.d.
7b	1.69	9.3		7d	1.76	9.4

Tabelle 3. ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen für **4T** bei $T= 300$ K.

^1H - und ^{13}C -Verschiebungen der Desoxyriboseatome und die ^{13}C -Verschiebungen der Basenatome wurden (soweit möglich) aus dem HMQC abgelesen, die ^1H -Verschiebungen der Basen aus dem Protonenspektrum.

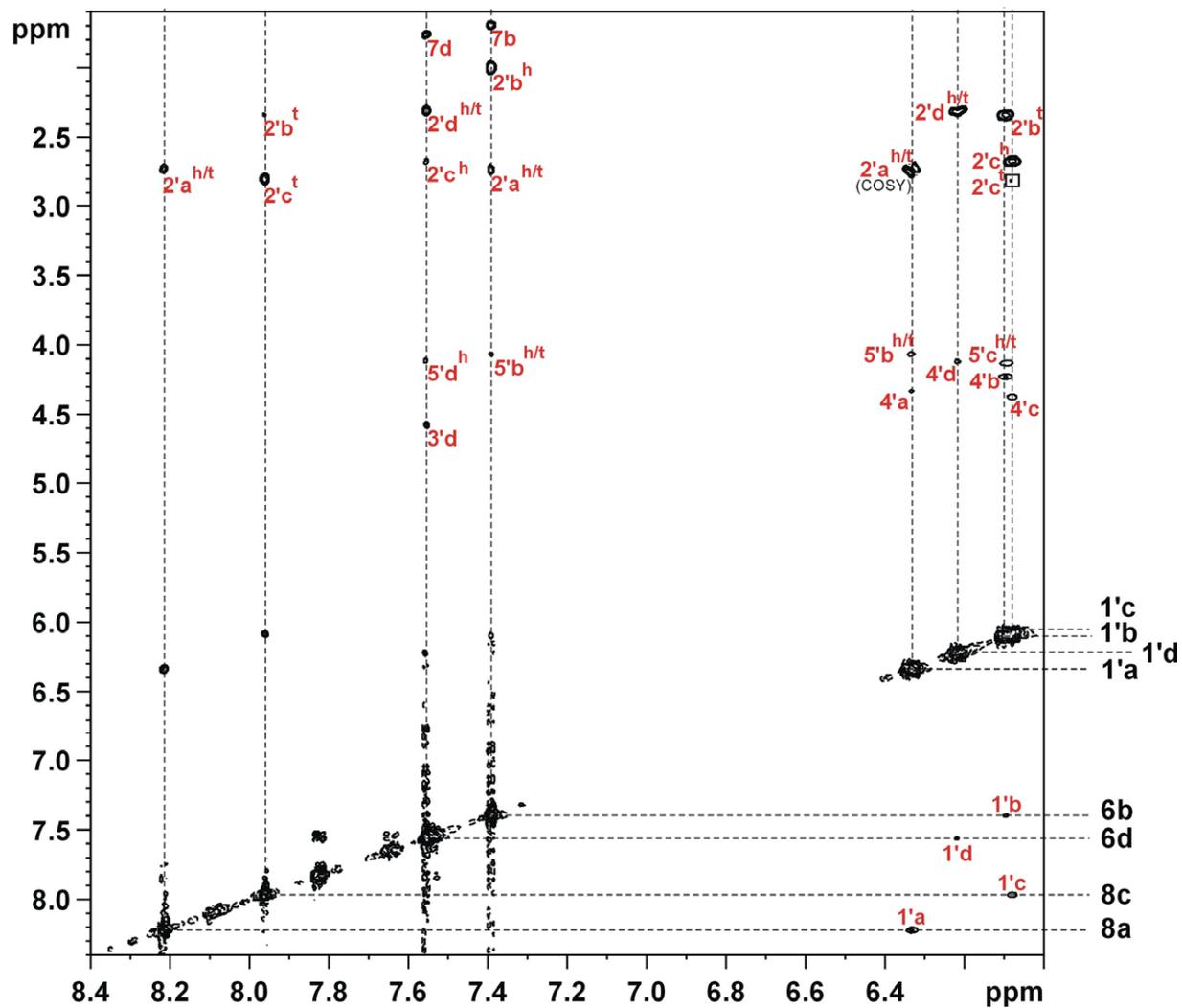


Abb. 11. Basen- und Anomerenbereich des ROESY Spektrums für **4T** (600 MHz, 300 K).

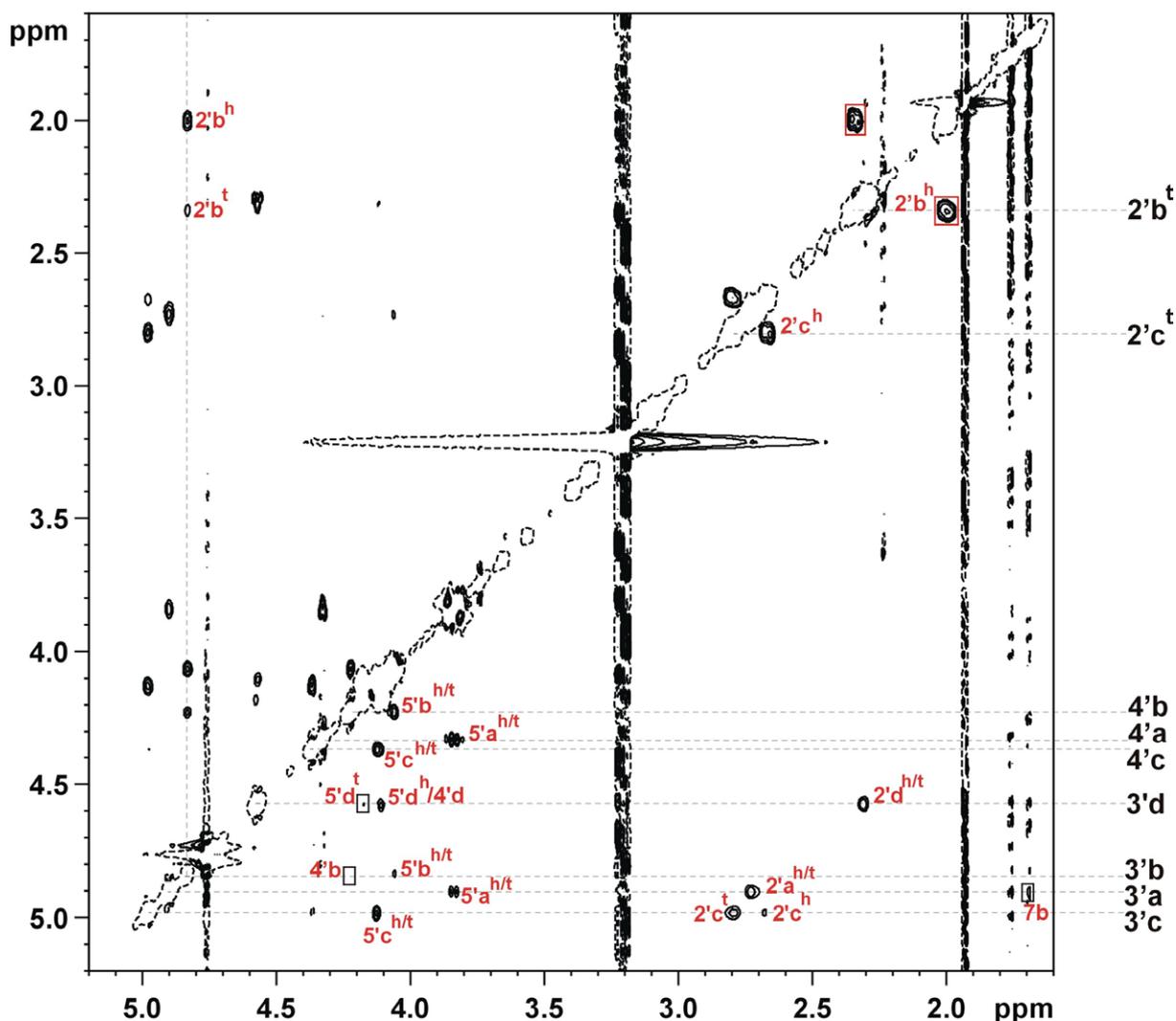


Abb. 12. Alkylbereich aus dem ROESY Spektrum von **4T** (600 MHz, 300 K). Die zur Eichung verwendeten Kreuzsignale sind rot umrandet. Kleine Kästchen in schwarz markieren ROE Signale, die vorhanden, aber in obiger Abbildung nicht intensiv genug waren, um erkennbar zu sein.

2. ^1H Spektren für **4PH** / **4T** und **4PM** / **4T** im Vergleich zu den jeweiligen Einzelsträngen

2.1 Allgemeines

Zu **4PH** ($1.09 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.66$ mM, 700 μL Phosphatpuffer (30 mM, pH7, D_2O)) werden 455 μL **4T** in Phosphatpuffer (30 mM, pH7, D_2O) ($c = 2.52$ mM; $n = 1.15 \cdot 10^{-6}$ mol **4T**) gegeben.

→ Gesamtvolumen $V_{\text{ges}} = 1155$ μL

→ molares Verhältnis **4PH** : **4T** = 0.95

Zu **4PM** ($1.25 \cdot 10^{-6}$ mol, $c = 1.79$ mM, 700 μ L Phosphatpuffer (30 mM, pH7, D₂O)) werden 515 μ L **4T** in Phosphatpuffer (30 mM, pH7, D₂O) ($c = 2.52$ mM, $n = 1.30 \cdot 10^{-6}$ mol **4T**) gegeben.

→ Gesamtvolumen $V_{\text{ges}} = 1215$ μ L

→ molares Verhältnis **4PM** : **4T** = 0.96

2.2 Vergleich von 4PH / 4T mit den Einzelsträngen 4PH und 4T bei 300 K

Nachfolgend sind die ¹H Spektren der jeweiligen Einzelstränge und jene für die in gemeinsamer Lösung vorliegenden Tetramere **4PH** und **4T** gezeigt. Dabei sind die Signale für **4PH** in **blau**, jene für **4T** in **grün** gekennzeichnet.

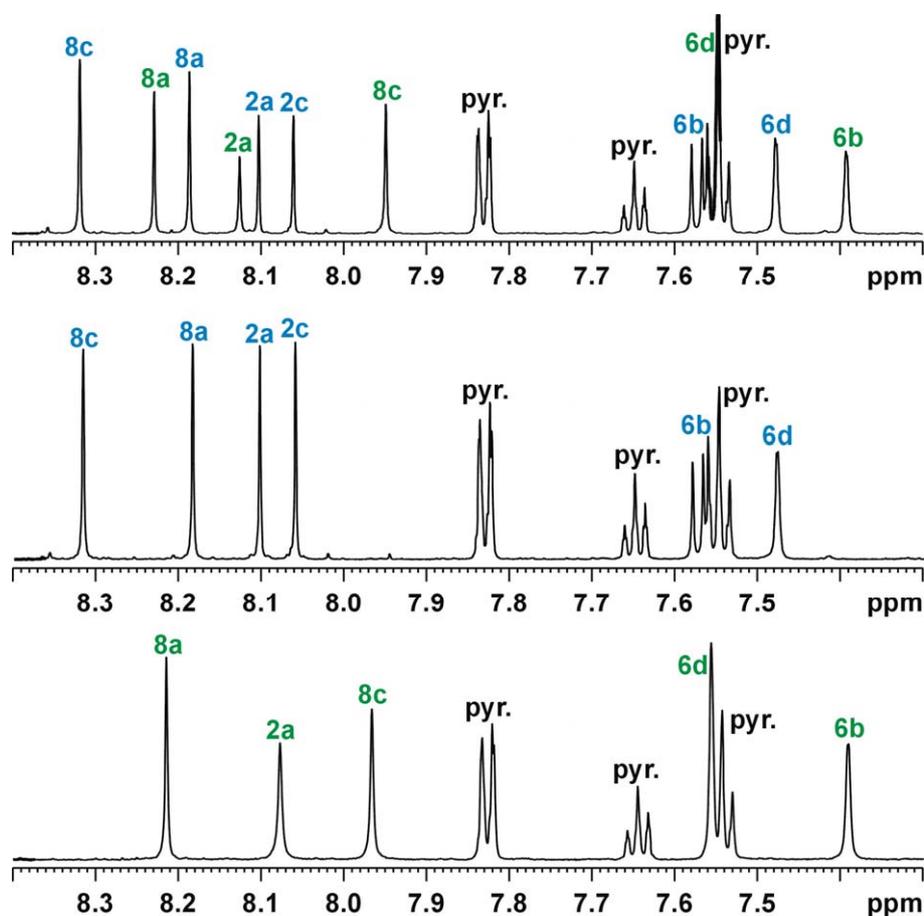


Abb. 13. ¹H des Basenbereichs für **4T** (grün) und **4PH** (blau) als Einzelstränge und gemeinsam in Lösung bei 300 K (600 MHz).

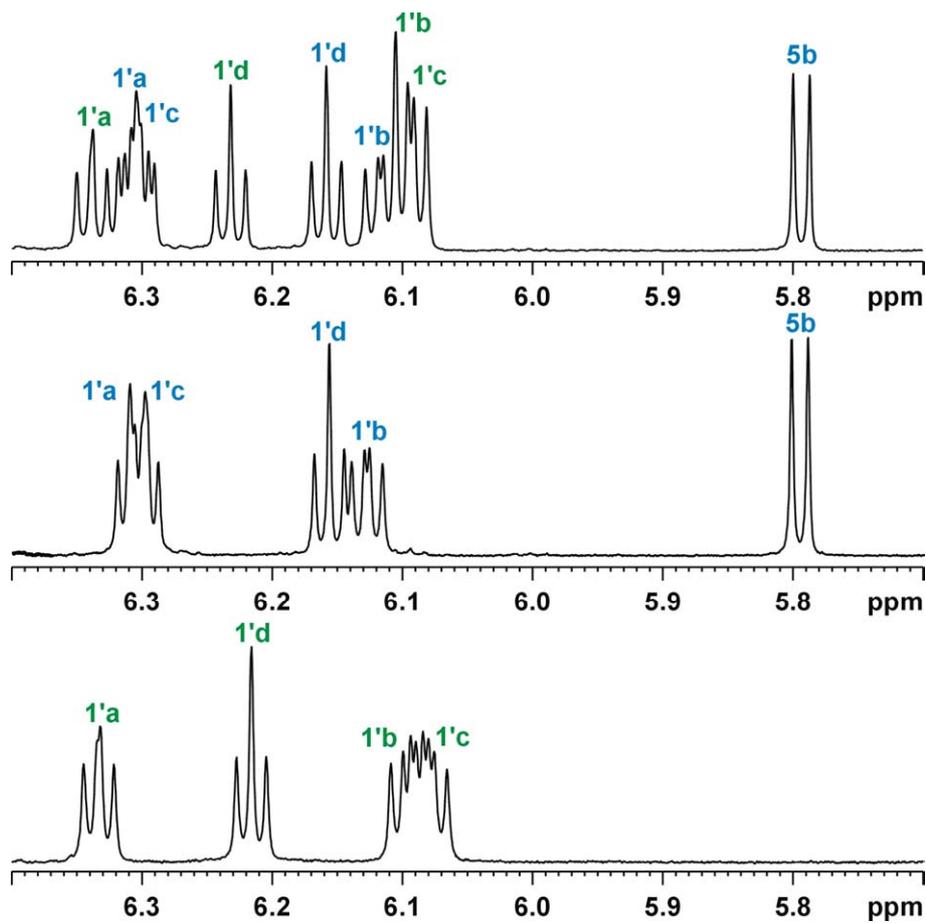


Abb. 14. ^1H des Anomerenbereichs für **4T** (grün) und **4PH** (blau) als Einzelstränge und gemeinsam in Lösung bei 300 K (600 MHz).

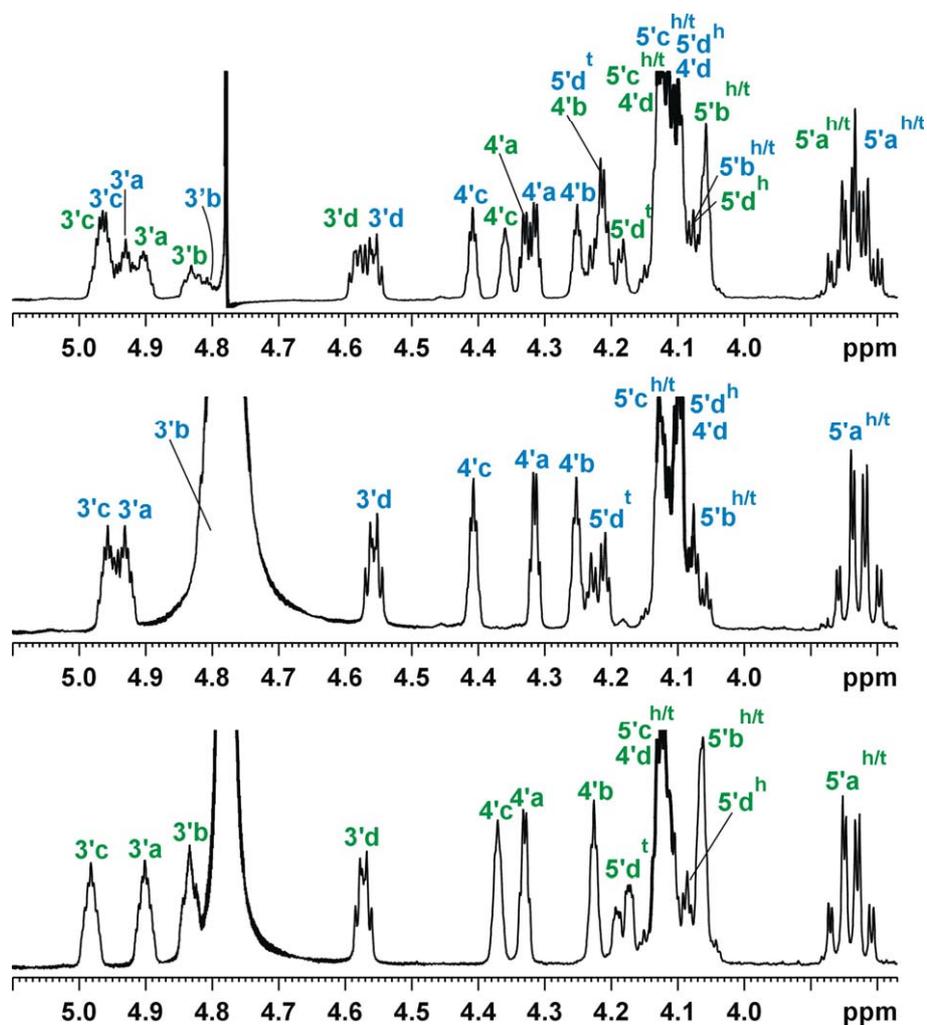


Abb. 15. ^1H Ausschnitt des Alkylbereichs für **4T** (grün) und **4PH** (blau) als Einzelstränge und gemeinsam in Lösung bei 300 K (600 MHz).

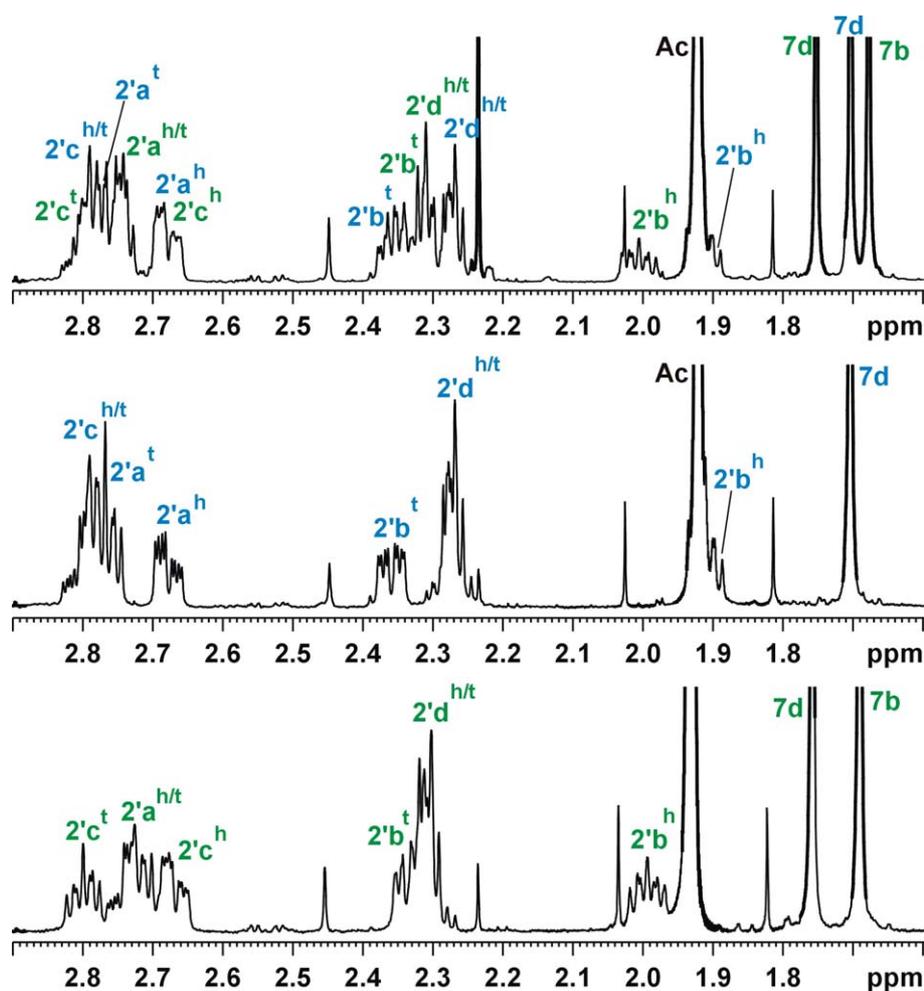


Abb. 16. ^1H des Alkylbereichs der CH_2 - und Methyl-Gruppen für **4T** (grün) und **4PH** (blau) als Einzelstränge und gemeinsam in Lösung bei 300 K (600 MHz).

2.3 Vergleich von **4PM** / **4T** mit den Einzelsträngen **4PM** und **4T** bei 300 K

Nachfolgend sind die ^1H Spektren der jeweiligen Einzelstränge und jene für die in gemeinsamer Lösung vorliegenden Tetramere **4PM** und **4T** gezeigt. Dabei sind die Signale für **4PM** in **rot**, jene für **4T** in **grün** gekennzeichnet.

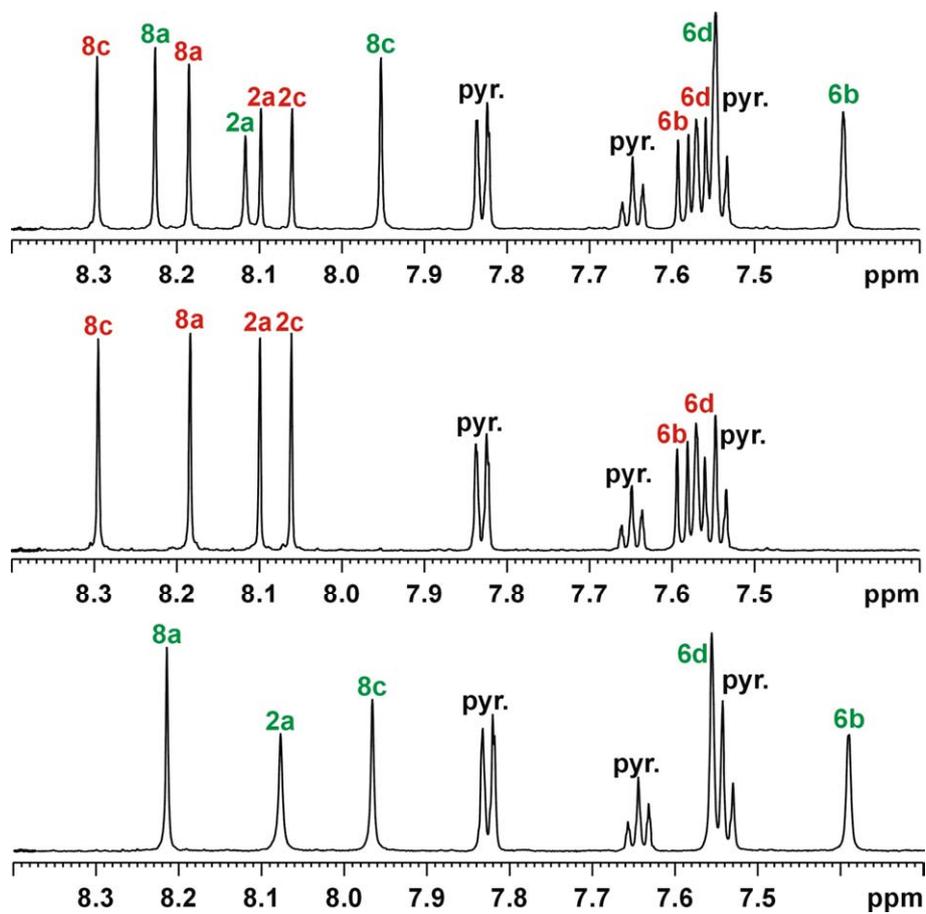


Abb. 17. ^1H des Basenbereichs für 4T (grün) und 4PM (rot) als Einzelstränge und gemeinsam in Lösung bei 300 K (600 MHz).

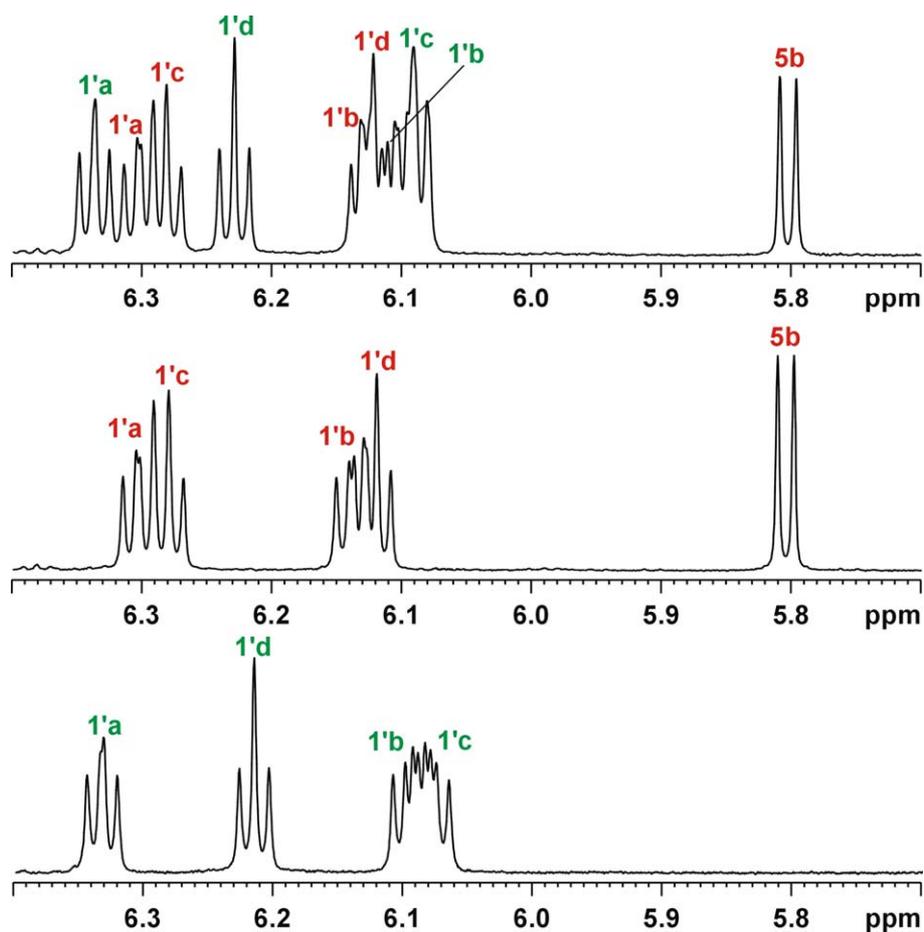


Abb. 18. ^1H Anomerenbereich für **4T** (grün) und **4PM** (rot) als Einzelstränge und gemeinsam in Lösung bei 300 K (600 MHz).

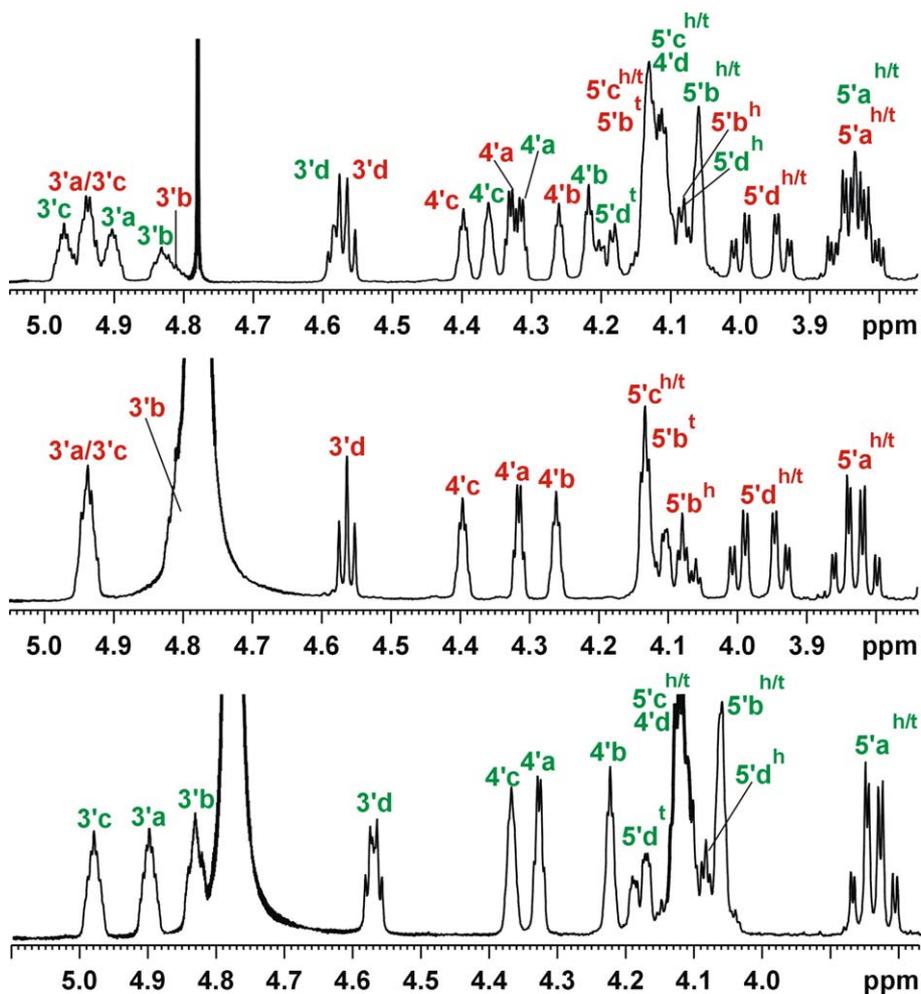


Abb. 19. ^1H Ausschnitt aus dem Alkylbereich für 4T (grün) und 4PM (rot) als Einzelstränge und gemeinsam in Lösung bei 300 K (600 MHz).

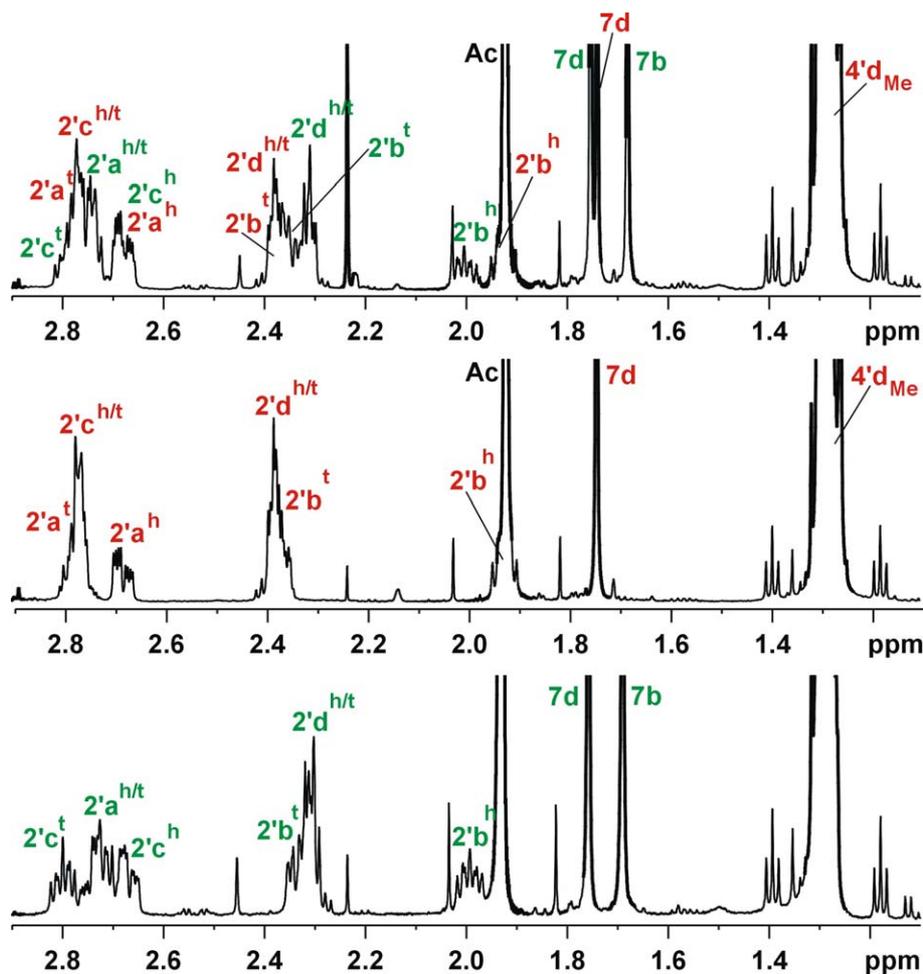


Abb. 20. ^1H Ausschnitt aus dem CH_2 - und Methylgruppenbereich für **4T** (grün) und **4PM** (rot) im Einzelstrang bzw. gemeinsam in Lösung bei 300 K (600 MHz).

3. ^1H Spektren des Anomerenbereichs für **4PH** / **4T** und **4PM** / **4T** von 275 bis 300 K

3.1 ^1H Spektren des Anomerenbereichs für **4PH** / **4T** zwischen 275 und 300 K

Wie bereits im Allgemeinen Teil für die Basen gezeigt, enthält die nachstehende Abbildung den Anomerenbereich der gemeinsam in Lösung vorliegenden Tetramere **4PH** und **4T** in einem Temperaturbereich von 275 bis 300 K, gemessen in 5 K Schritten.

Signale für **4T** sind wiederum in **grün**, jene für **4PH** in **blau** gekennzeichnet.

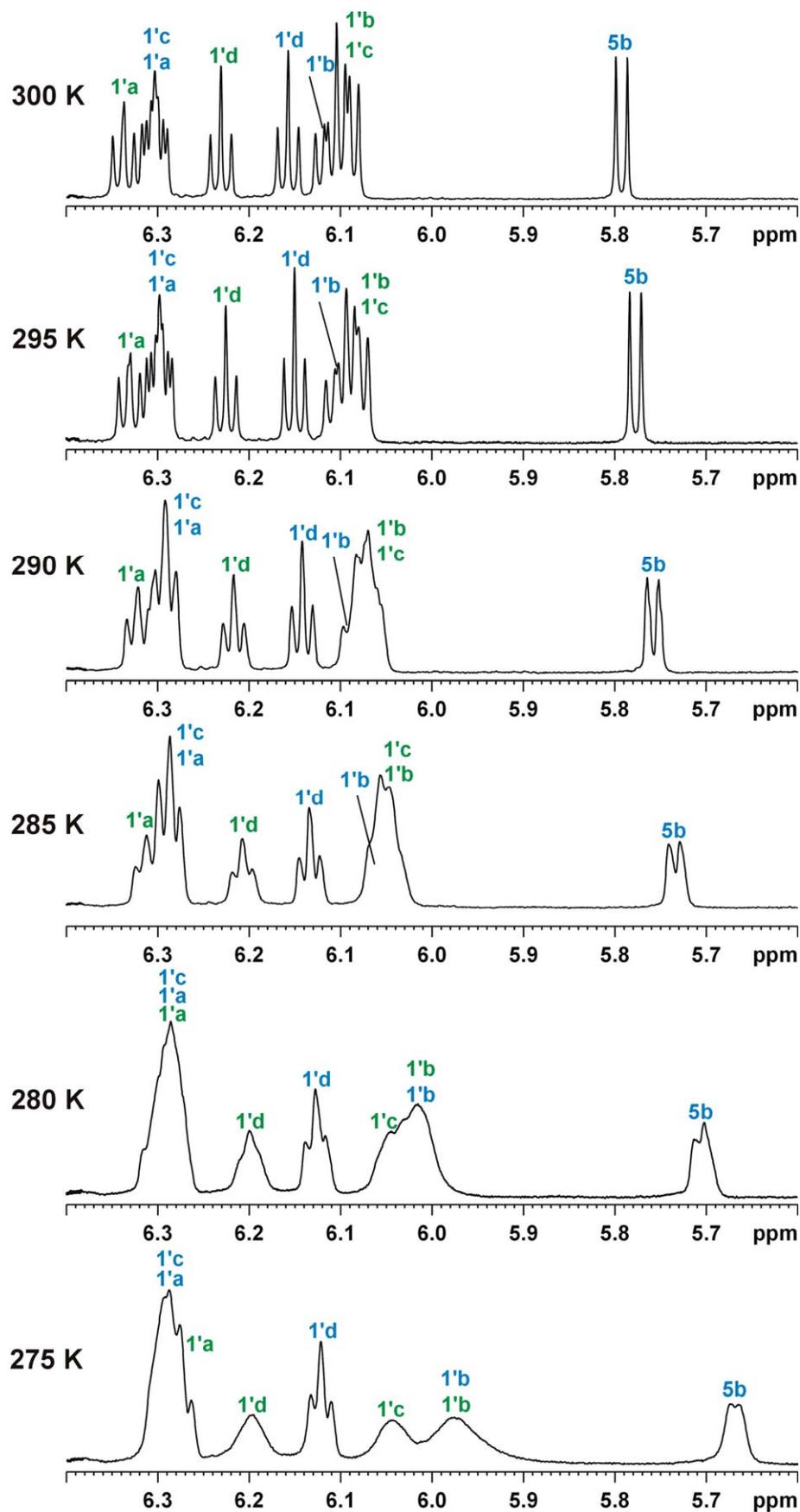
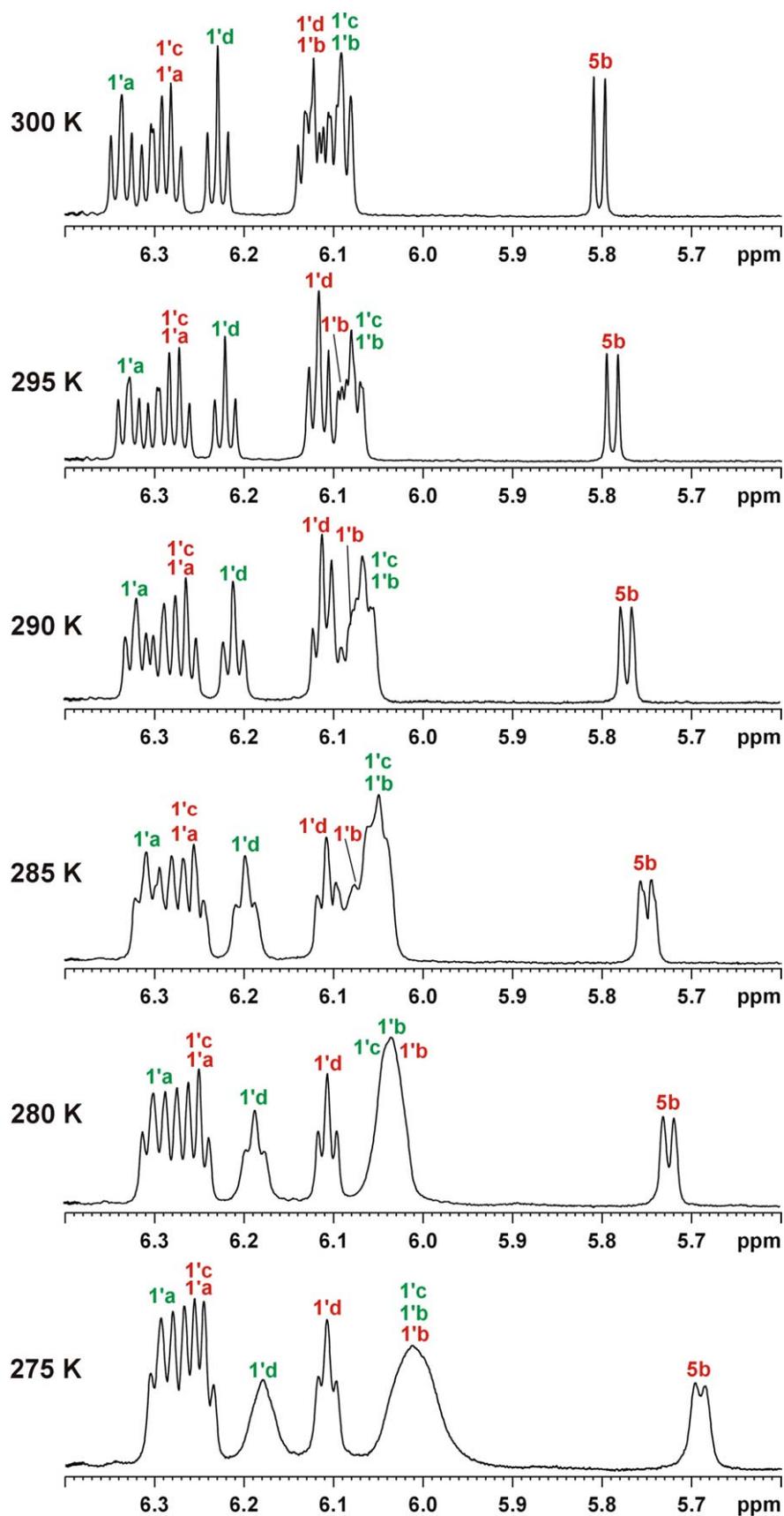


Abb. 21. ^1H Anomerenbereich für 4PH / 4T zwischen 275 und 300 K (600 MHz).

3.2 ^1H Spektren des Anomerenbereichs für 4PM / 4T zwischen 275 und 300 KAbb. 22. ^1H Anomerenbereich für 4PM / 4T zwischen 275 und 300 K (600 MHz).

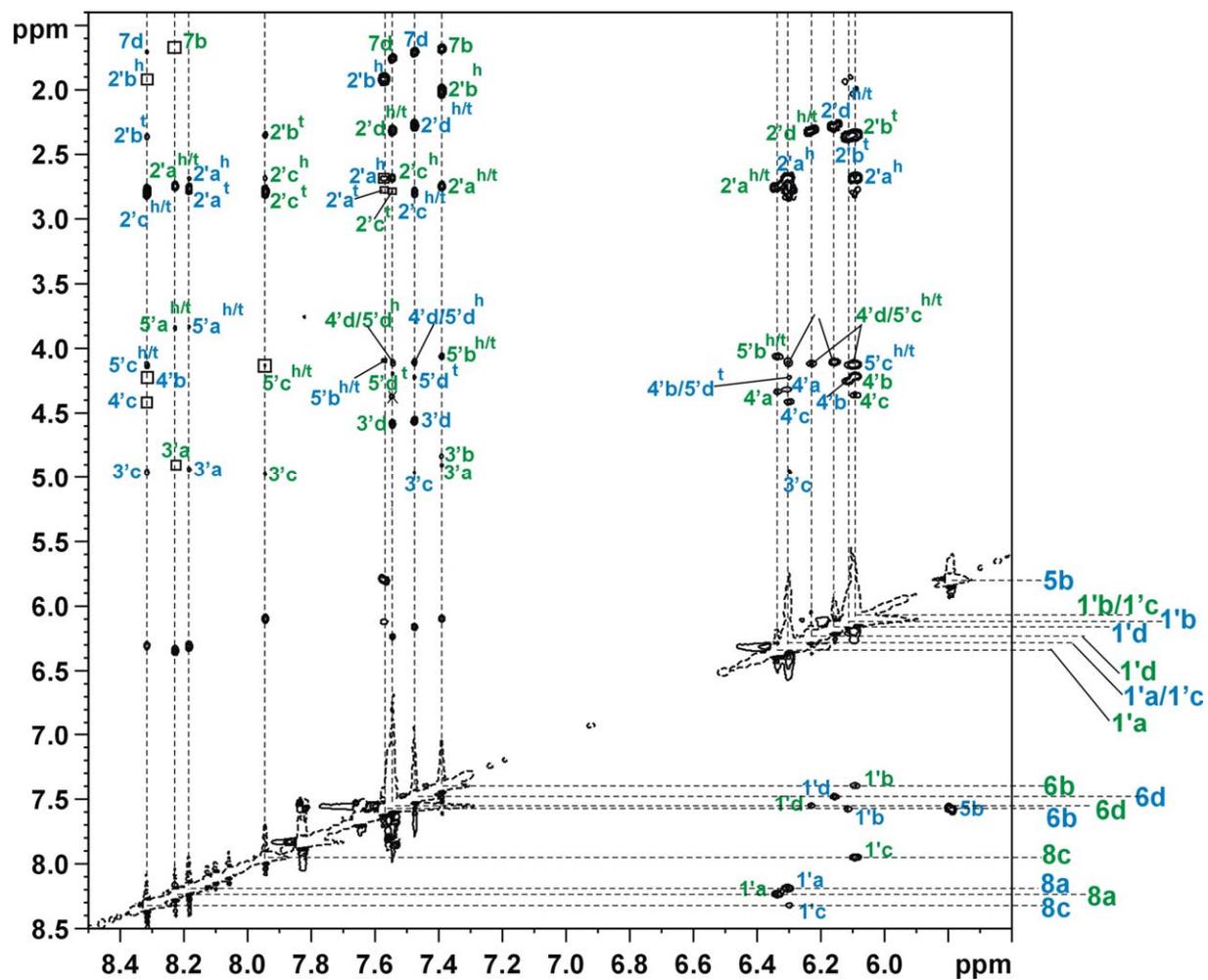


Abb. 24. ROESY Ausschnitt des Basen- und Anomerenbereichs für **4PH / 4T** bei 300 K (600 MHz). Kleine Kästchen in schwarz markieren ROE Signale, die vorhanden, aber in obiger Abbildung nicht intensiv genug waren, um erkennbar zu sein.

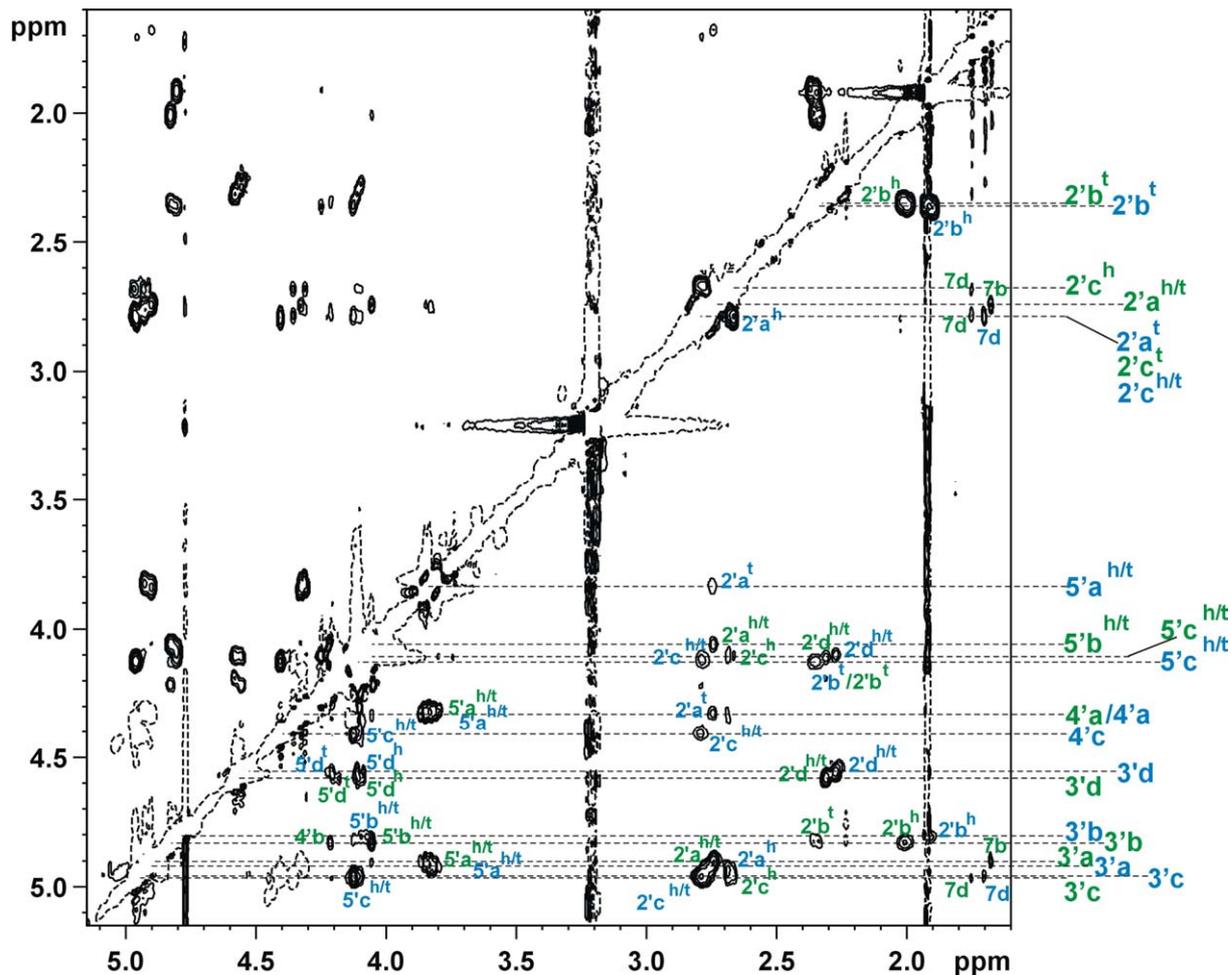


Abb. 25. ROESY Ausschnitt des Alkylbereichs für 4PH / 4T bei 300 K (600 MHz).

4.2 ^1H und ROESY Spektren für 4PH / 4T bei 277 K

Die Zuordnung erfolgte aus dem Verlauf der Temperaturreihe und durch Vergleich der ROESY Spektren bei 300 und 277 K.

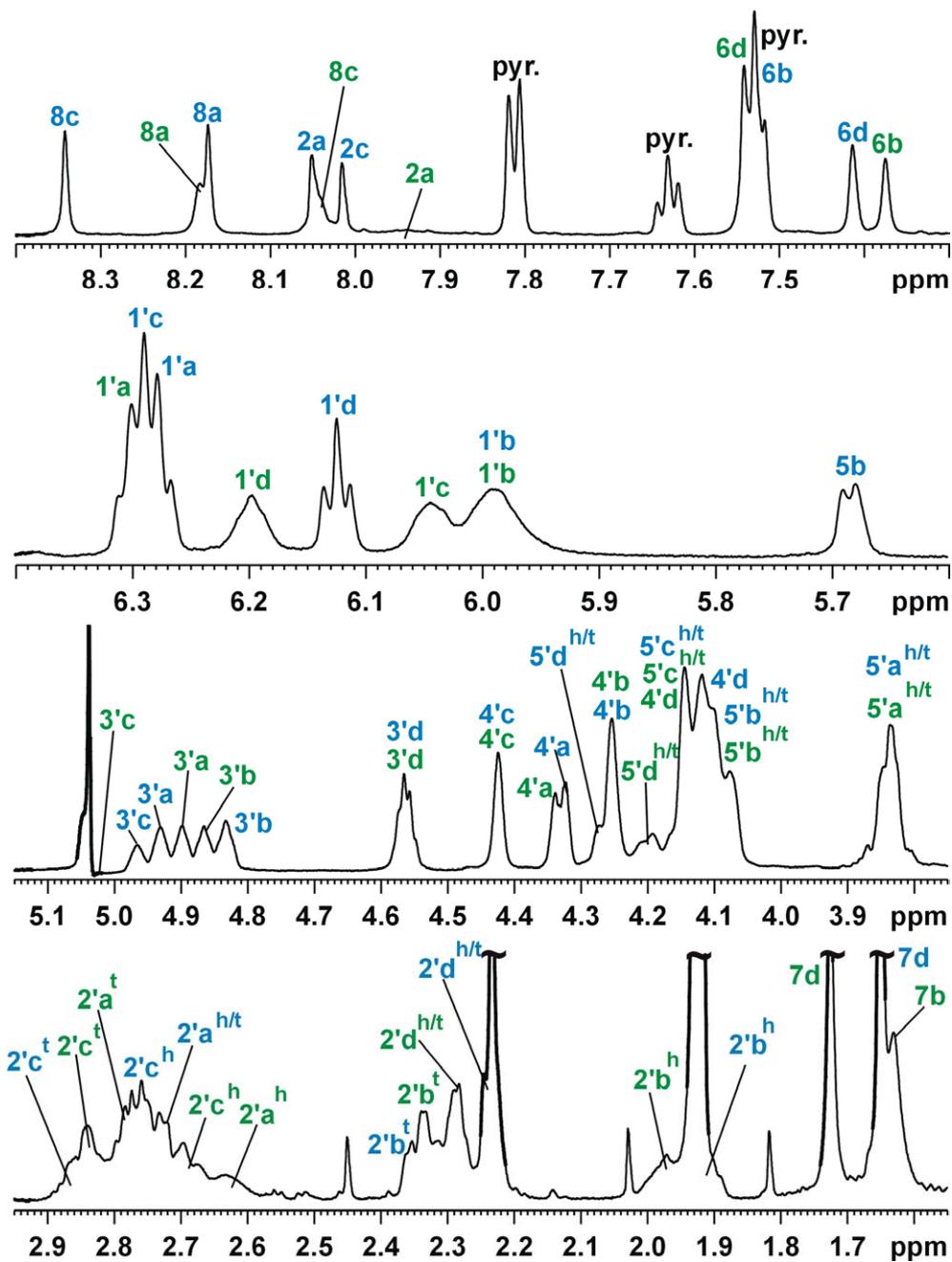


Abb. 26. Alle ^1H Ausschnitte für **4PH** / **4T** bei 277 K (600 MHz). Teilweise liegt eine starke Verbreiterung der Signale vor.

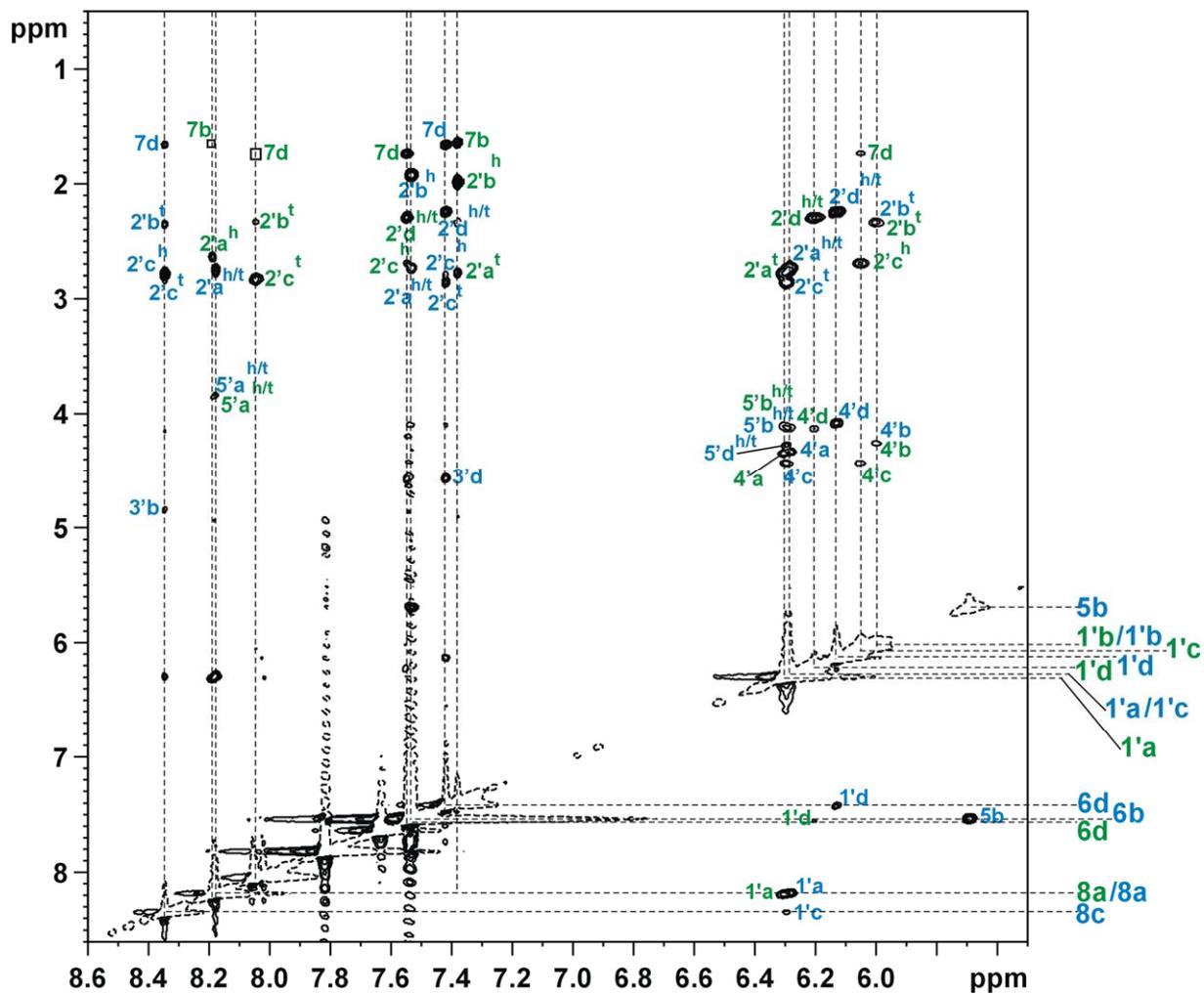


Abb. 27. ROESY Ausschnitt des Basen- und Anomerenbereichs für **4PH** / **4T** bei 277 K (600 MHz).

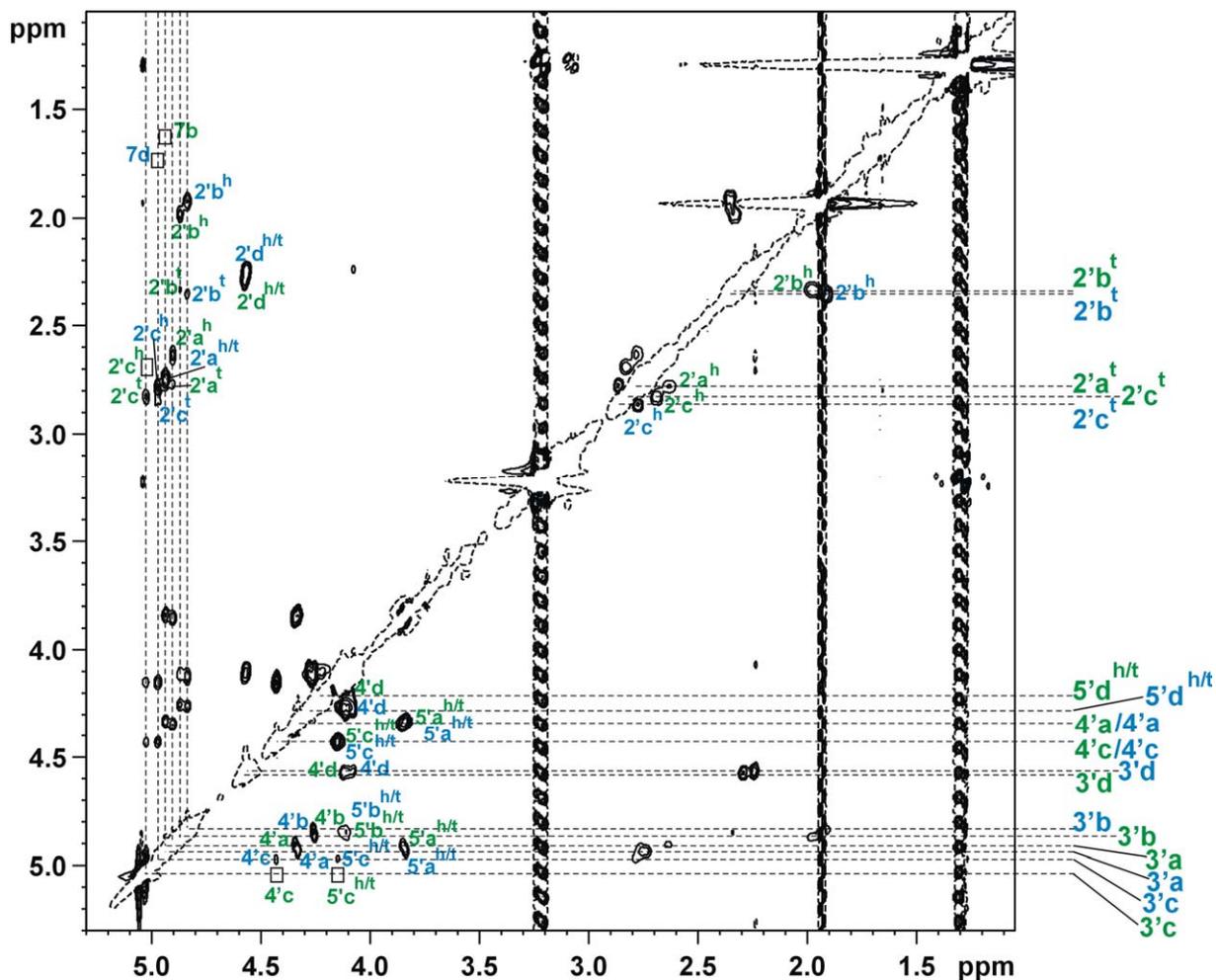


Abb. 28. ROESY Ausschnitt des Alkylbereichs für **4PH / 4T** bei 277 K (600 MHz). Kleine Kästchen in schwarz markieren ROE Signale, die vorhanden, aber in obiger Abbildung nicht intensiv genug waren, um erkennbar zu sein.

Um die Zuordnung der diastereotopen CH_2 -Gruppen an $\text{C}2'$ besser nachvollziehen zu können, ist nachfolgend ein ROESY Ausschnitt mit den Kreuzsignalen der verschiedenen $3'$ Protonen zu ihren jeweiligen $2'$ / $2''$ Protonen gezeigt.

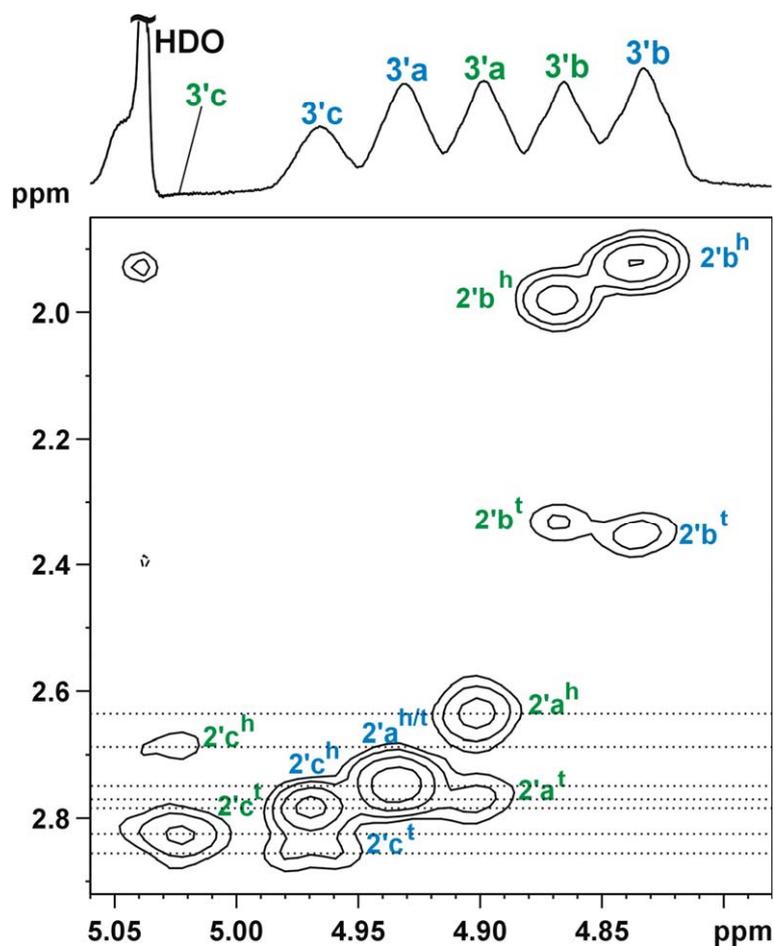


Abb. 29. ROESY Ausschnitt für **4PH** / **4T** bei 277 K (600 MHz).

4.3 ^1H und ROESY Spektren für **4PM** / **4T** bei 277 K

Die Zuordnung für **4PM** / **4T** erfolgte ausschliesslich aus dem Verlauf der Temperaturreihe mit anschliessendem Abgleich mit dem nachstehend abgebildeten ROESY Spektrum.

Wie schon zuvor sind die Signale für **4PM** in **rot**, die für **4T** in **grün** dargestellt.

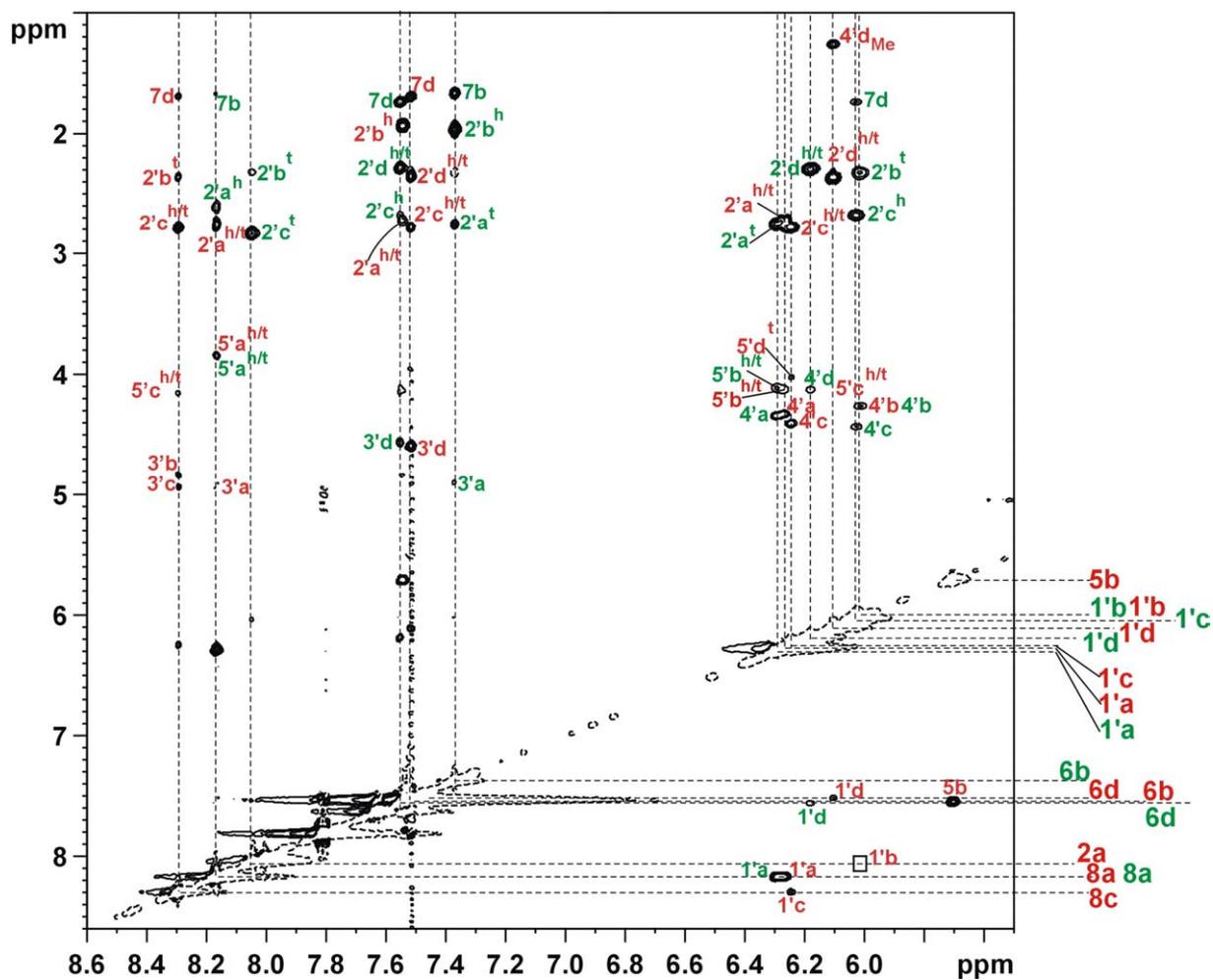


Abb. 31. ROESY Ausschnitt des Basen- und Anomerenbereichs für **4PM / 4T** bei 277 K (600 MHz). Kleine Kästchen in schwarz markieren ROE Signale, die vorhanden, aber in obiger Abbildung nicht intensiv genug waren, um erkennbar zu sein.

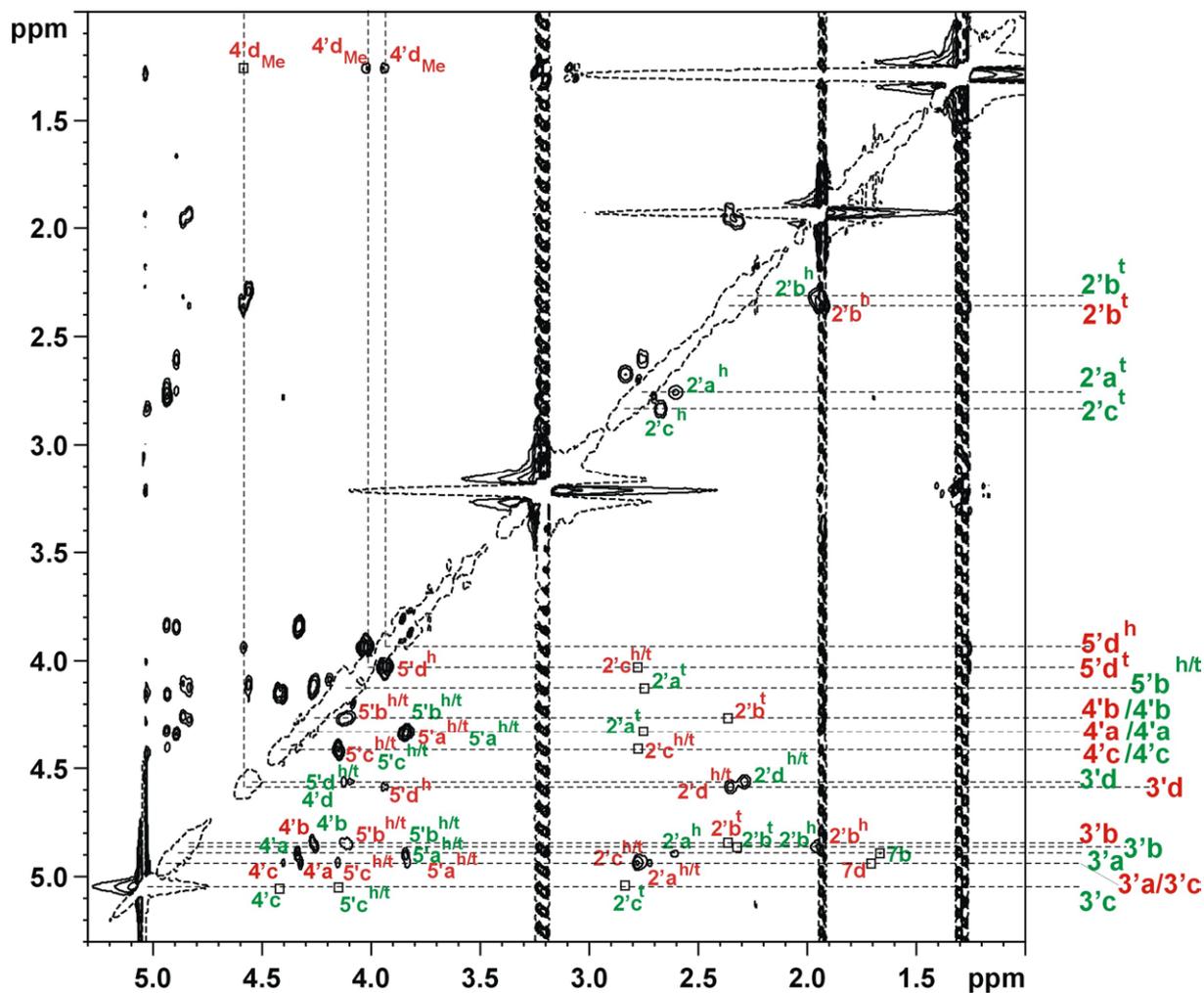


Abb. 32. ROESY Ausschnitt des Alkylbereichs für **4PM / 4T** bei 277 K (600 MHz). Kleine Kästchen in schwarz markieren ROE Signale, die vorhanden, aber in obiger Abbildung nicht intensiv genug waren, um erkennbar zu sein.

Auch für **4PM / 4T** sei hier die Zuordnung der diastereotopen CH₂-Gruppen an C2' nochmals mit einem ROESY Ausschnitt aus dem H3'-Bereich verdeutlicht.

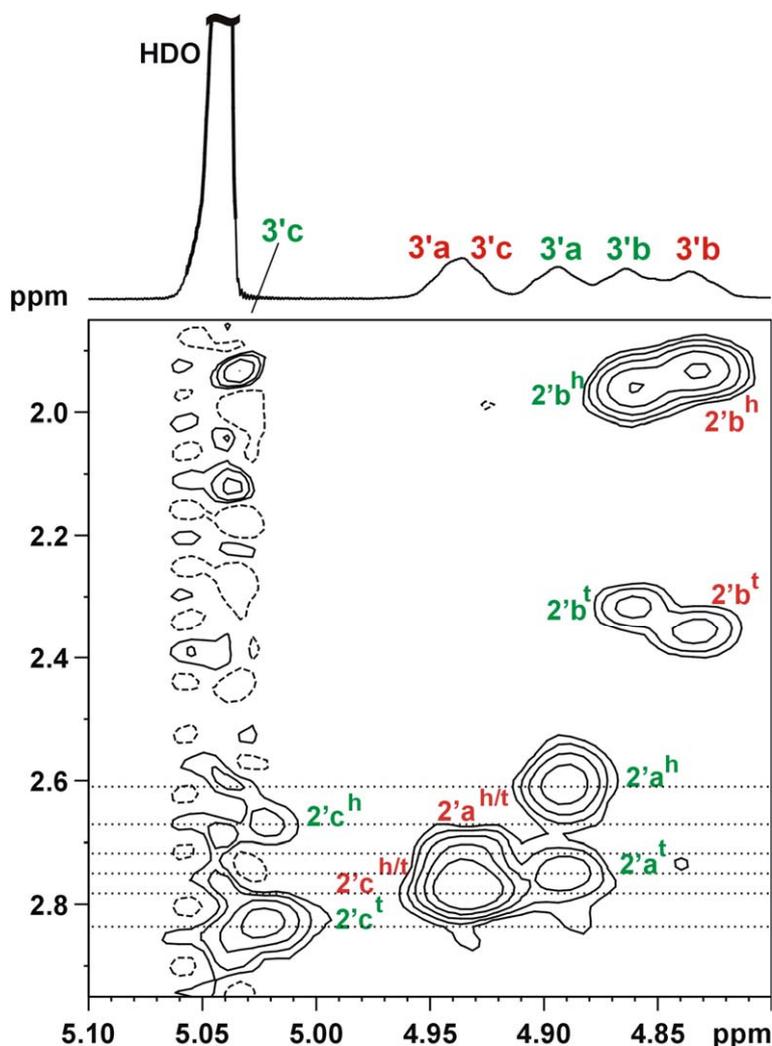


Abb. 33. Ausschnitt aus dem ROESY Spektrum für **4PM** / **4T** bei 277 K (600MHz).

4.4 Vergleich des Anomerenbereichs von **4PH** / **4T** und **4PM** / **4T** bei 277 K

Analog zu dem im Allgemeinen Teil gezeigten Vergleich des Basenbereichs für **4PH** / **4T** und **4PM** / **4T** bei 277 K, ist hier der zugehörige Anomerenausschnitt dargestellt.

Die ROE Signale für **4PM** / **4T** sind in rot, die für **4PH** / **4T** in schwarz dargestellt. Auch in diesem Fall zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung im ROE Muster, der bei ~ 1.2 ppm auftretende ROE für H1'd (**4PM**) stammt von der an C4' eingeführten Methyl-Gruppe und ist deswegen im unmodifizierten Tetramer **4PH** nicht vorhanden. Der entsprechende ROE für H4'd liegt bei ~ 4.1 ppm.

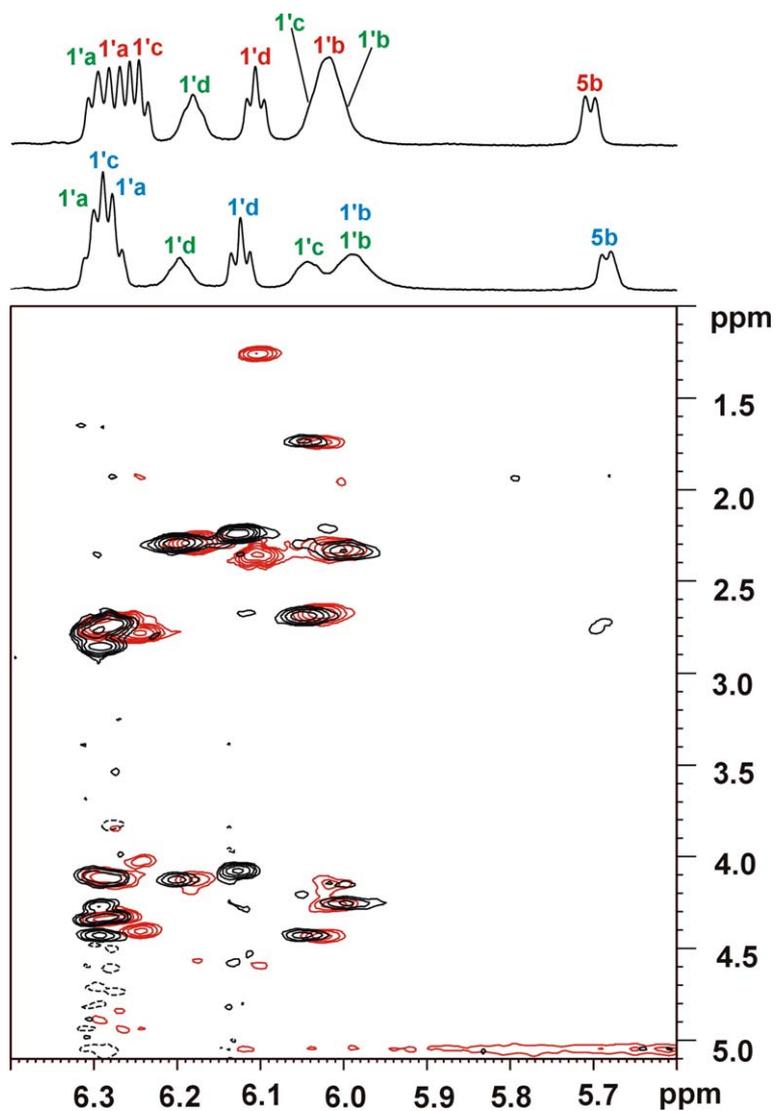


Abb. 34. Vergleich des ROESY Ausschnitts der Anomeren für 4PH / 4T und 4PM / 4T bei 277 K (600 MHz).

4.5 Übersichtstabelle aller ROEs von 4PH bzw. 4PM in gemeinsamer Lösung mit 4T bei 277 K

ROE Abstand	4PH [Å]	4PM [Å]	ROE Abstand	4PH [Å]	4PM [Å]
H2'a ^{h/t} – H8a	2.6	2.8	H3'a – H5'a ^{h/t}	2.6	2.45
H3'a – H8a	3.85	3.6	H2'a ^{h/t} – H6b	2.8	-
H2'a ^{h/t} – H3'a	2.2	2.4	H3'a – H6b	4.1	-
H2'a ^{h/t} – H4'a	3.3	-	H2a – H1'b	-	3.25
H3'a – H4'a	2.6	2.55			
H5b – H6b	≅ 2.40	≅ 2.40	H2''b – H4'b	-	3.3
H2''b – H6b	2.3	2.2	H3'b – H4'b	2.7	2.5
H3'b – H6b	3.5	3.1	H3'b – H5'b ^{h/t}	2.4	2.3
H5'b ^{h/t} – H6b	3.3	-	H2'b – H8c	4.0	4.0
H1'b – H4'b	-	2.7	H2''b – H8c	3.3	3.1
H2'b – H3'b	2.4	2.3	H3'b – H8c	3.5	3.2
H2''b – H3'b	2.9	2.8	H2''b – H5'c ^{h/t}	3.25	-
H1'c – H8c	3.5	3.1	H3'c – H4'c	3.0	2.9
H2'c – H8c	2.5	n.d. (2'c ^{h/t})	H3'c – H5'c ^{h/t}	2.7	2.6
H2''c – H8c	3.7		H1'c – H6d	3.7	-
H3'c – H8c	4.0	3.2	H2'c – H6d	3.5	n.d. (2'c ^{h/t})
H5'c ^{h/t} – H8c	3.8	3.5	H2''c – H6d	2.9	
H1'c – H2''c	2.5	-	H3'c – H6d	3.9	3.0
H1'c – H4'c	3.0	2.7	H3'c – H7d	3.6	3.2
H2'c – H3'c	2.45	-	H8c – H7d	3.3	3.4
H2''c – H3'c	2.7	-	H1'c – H5'd ^{h/t}	3.0	3.2 (5'd ^t)
H2''c – H4'c	3.8	-	H2''c – H5'd ^{h/t}	3.7	-
H1'd – H6d	3.2	3.1	H1'd – H2'd ^{h/t}	2.3	2.1
H2'd ^{h/t} – H6d	2.4	2.35	H2'd ^{h/t} – H3'd	2.3	2.2
H3'd – H6d	2.8	2.35	H2'd ^{h/t} – H4'd	3.1	-
H4'd – H6d	3.6	-	H3'd – H4'd	-	4'd _{Me} 2.9
H5'd ^{h/t} – H6d	4.3	-	H3'd – H5'd ^{h/t}	3.5	5'd ^h 2.6
					5'd ^t 3.1
H6d – H7d	3.0	2.3	H4'd – H5'd ^t	-	4'd _{Me} 2.6
H1'd – H4'd	2.7	4'd _{Me} 2.6			

Tab. 4. Übersicht über alle ROE Abstände für **4PH** und **4PM** bei 277 K und bei Zusatz von **4T**. Geeicht wurde in beiden Fällen auf Cytosin H5 – H6 (≅ 2.40 Å).