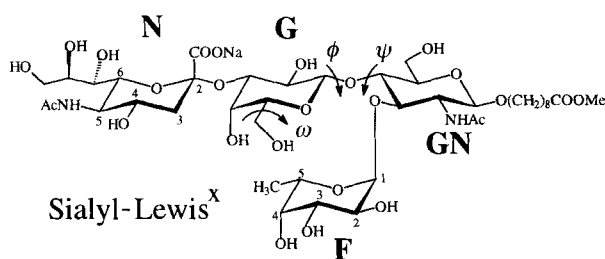


# Bestimmung der bioaktiven Konformation des Kohlenhydratliganden im E-Selectin-Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Komplex\*\*

Karoline Scheffler, Beat Ernst, Andreas Katopodis, John L. Magnani, Wey Tong Wang, Rüdiger Weisemann und Thomas Peters\*

Die durch Cytokine stimulierte Expression von E-Selectin-Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen ist einer der ersten Schritte im Verlauf entzündlicher Prozesse<sup>[1, 2]</sup>. E-Selectin ist ein membranständiges Glycoprotein, das zur Familie der Selectine (E-Selectin, L-Selectin, P-Selectin) zählt und spezifisch das Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Antigen auf neutrophilen Granulozyten bindet. Um den Erkennungs- und Bindungsprozeß auf molekularer Ebene verstehen zu können, muß die dreidimensionale (3D)-Struktur des Komplexes aus E-Selectin und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> analysiert werden. Einen erheblichen Fortschritt markiert in diesem Zusammenhang die Aufklärung der Struktur von E-Selectin im Kristall<sup>[3]</sup>. Für die Konformation des Liganden Sialyl-Lewis<sup>x</sup> im Komplex mit E-Selectin fehlen bisher noch eindeutige experimentelle Daten. Zwei jüngst publizierte Arbeiten<sup>[4, 5]</sup> beschreiben zwar Transfer-NOE-Experimente<sup>[6]</sup> zur Konformationsanalyse von komplexiertem Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, jedoch werden in den beiden Publikationen unterschiedliche Konformationen des gebundenen Liganden angegeben, und die Orientierung des Fucoserests im gebundenen Zustand wird gar nicht erörtert.

Wir stellen nun Transfer-NOE-Experimente am E-Selectin-Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Komplex vor. Das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis<sup>x</sup> wurde synthetisch gewonnen<sup>[7]</sup>, bei dem verwendeten E-Selectin



handelt es sich um eine rekombinante Chimäre aus E-Selectin und humanem IgG, wobei die Lektin-, die EGF- und sechs CR-Domänen des E-Selectins die Antigenbindungsstellen in IgG ersetzen<sup>[8]</sup>. Für die Bestimmung der Transfer-NOEs wurden NOESY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten aufgenommen<sup>[9]</sup>. Um störende Protonenresonanzsignale des E-Selectins zu unterdrücken und damit eine quantitative Auswertung der Spektren zu ermöglichen, wurde ein Spinlockfilter<sup>[10]</sup> verwendet. Zum Vergleich wurden NOESY-Experimente an rei-

nem E-Selectin und freiem Sialyl-Lewis<sup>x</sup> durchgeführt<sup>[11]</sup>. Für die Zuordnung der Protonenresonanzsignale wurden bekannte Daten verwendet<sup>[12]</sup>.

Der Vergleich der NOESY-Spektren von E-Selectin und freiem Sialyl-Lewis<sup>x</sup> zeigt, daß keine störenden Überlagerungen von Protonenresonanzsignalen des Glycanteils von E-Selectin mit solchen des Tetrasaccharids auftreten. Für freies Sialyl-Lewis<sup>x</sup> werden kleine, negative NOEs beobachtet, wie dies auch in vergangenen Veröffentlichungen<sup>[12]</sup> berichtet wurde (Abb. 1 a).

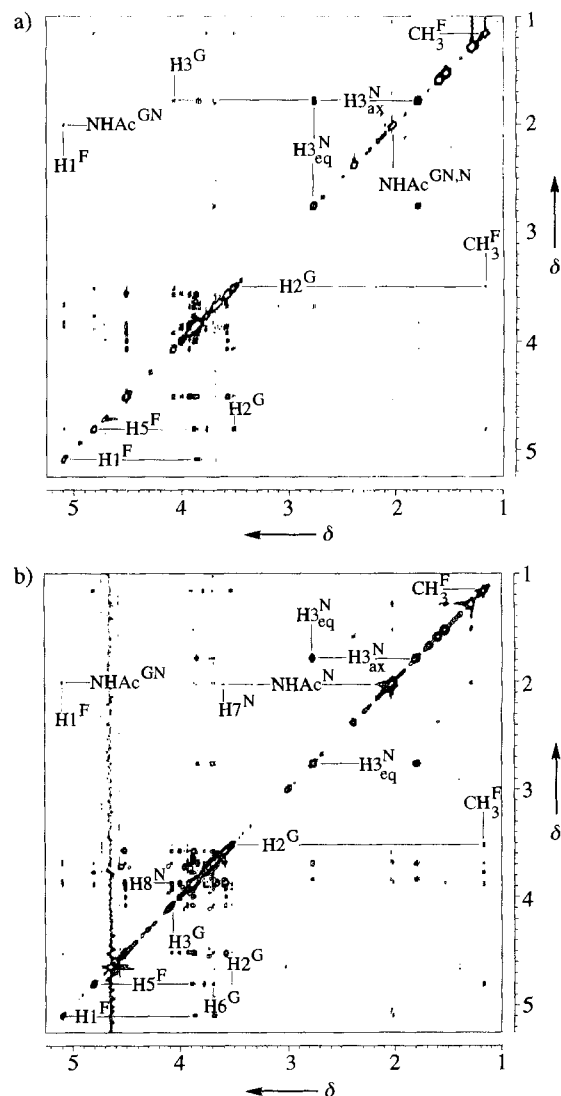


Abb. 1. 2D-NOESY-Spektren [9, 11] von freiem (a) und mit E-Selectin komplexiertem Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (b). Spektrum a wurde mit einer Mischzeit von 900 ms ohne Spinlockfilter, Spektrum b mit einer Mischzeit von 150 ms mit Spinlockfilter aufgenommen.

Es treten interglycosidische NOEs auf, die den bekannten NOEs entsprechen. Allerdings wird kein interglycosidischer NOE zwischen den Protonen H8<sup>N</sup> und H3<sup>G</sup> beobachtet, wie er mit einem ROESY-Experiment gefunden wurde<sup>[13]</sup>. Der entsprechende Effekt konnte auch bei Sialyl- $\alpha$ (2  $\rightarrow$  3)-N-acetylactosamin registriert werden<sup>[12a]</sup>. Der Grund für diese unterschiedlichen Befunde ist, daß die Korrelationszeit  $\tau_c$  des Tetrasaccharids zu einem Wert  $\omega\tau_c$  ( $\omega$  = Spektrometerfrequenz, 600 MHz) von ungefähr 1 führt. In diesem Bereich hängt die Intensität der NOEs äußerst empfindlich schon von sehr kleinen Änderungen in der

[\*] Prof. Dr. T. Peters, Dipl.-Chem. K. Scheffler  
Institut für Chemie der Medizinischen Universität  
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck  
Telefax: Int. + 49/451-500-4241  
E-mail: tp@chemie.mu-luebeck.de

Dr. B. Ernst, Dr. A. Katopodis  
Zentrale Forschungslaboratorien, Rosental, CIBA-GEIGY AG  
CH-4002 Basel (Schweiz)

Dr. J. L. Magnani, W. T. Wang  
Glyco Tech Corp., 14915 Brochart Rd., Rockville, Maryland 20850 (USA)

Dr. R. Weisemann  
Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Silberstreifen, Rheinstetten

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 169) gefördert. T. P. dankt der NATO für eine Forschungsbeihilfe (CRG.890356).

lokalen Beweglichkeit einzelner Molekülteile ab. Dies zeigt sich deutlich am Beispiel der C9-Kette am reduzierenden Ende von Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, in der keine oder sogar schwache positive NOEs beobachtet werden. Auch die Glycerolseitenkette des *N*-Acetylneuraminsäurerestes kann eine von der globalen Korrelationszeit  $\tau_c$  abweichende lokale Korrelationszeit  $\tau$  aufweisen, so daß NOEs in dieser Seitenkette wie etwa der NOE H8<sup>N</sup>/H3<sup>G</sup> nicht mehr detektierbar sind. Unter Beachtung der von anderen Arbeitsgruppen<sup>[12a, 13]</sup> vorgenommenen Experimente ergibt sich somit insgesamt, daß für das Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Tetrasaccharid in Lösung ein Gleichgewicht mehrerer Konformationen vorliegt<sup>[13]</sup>, das im wesentlichen durch die Orientierung des *N*-Acetylneuraminsäurerests charakterisiert wird. Die <sup>1</sup>H-NMR-Daten für das Tetrasaccharid sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Für den Komplex traten schon bei einer Mischzeit von 25 ms Transfer-NOEs auf. Da durch die Aufnahme von NOESY-Spektren mit verschiedenen Mischzeiten<sup>[9]</sup> vollständige Transfer-NOE-Kurven erhalten wurden, können für die im folgenden diskutierten NOEs Spindiffusionseffekte als Ursache ausgeschlossen werden. Intensitäten der Transfer-NOEs und Lage der Maxima der Transfer-NOE-Kurven belegen eindeutig, daß es sich bei den beobachteten Effekten tatsächlich um Transfer-NOEs handelt. Transfer-NOEs zwischen Protonen des E-Selectins und Sialyl-Lewis<sup>x</sup> können bei dem gewählten Protein-Ligand-Verhältnis<sup>[9]</sup> nicht beobachtet werden. Die folgende Diskussion betrifft nur das NOESY-Spektrum, das mit einer Mischzeit von 150 ms aufgenommen wurde (Abb. 1b). Eine genaue Analyse der Transfer-NOE-Daten und weiterer NMR-Experimente insbesondere unter Berücksichtigung des Austauschgleichgewichts und Einbeziehung der Aminosäureprotonen<sup>[14]</sup> in der Bindungstasche von E-Selectin wird an anderer Stelle veröffentlicht werden. Zum Vergleich ist in Abbildung 1a ein entsprechender Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum für freies Sialyl-Lewis<sup>x</sup> gezeigt. Für die wichtigsten zu diskutierenden Effekte sind außerdem in Abbildung 2 Schnitte durch die entsprechenden NOESY-Spektren zusammengestellt.

Die interglycosidischen Transfer-NOEs zwischen Protonen der *N*-Acetylneuraminsäure und der Galactose unterscheiden sich erheblich von den entsprechenden NOEs im freien Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (Abb. 1 und 2). Am auffälligsten ist das Fehlen eines Transfer-

Tabelle 1. <sup>1</sup>H-NMR-chemische Verschiebungen ( $\delta$ -Werte) für das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis<sup>x</sup> in D<sub>2</sub>O bei 303 K und 600 MHz. Als Referenz diente das HDO-Signal:  $\delta$ (HDO) = 4.722.

	NeuNAc (N)	Gal (G)	GlcNAc (GN)	Fuc (F)	Spacer O(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> COOMe
H1		4.51	4.51	5.09	
H2		3.52	3.89	3.68	4 × CH <sub>2</sub> 1.28
H3	1.79	4.08	3.82	3.91	1 × CH <sub>2</sub> 1.52
		2.76			CH <sub>2</sub> 1.59
H4	3.68	3.92	3.92	3.77	CH <sub>2</sub> 2.38
H5	3.86	3.58	3.58	4.81	CH <sub>2</sub> 3.82–3.92
H6	3.66	3.68	4.0	1.16	OCH <sub>3</sub> 3.68
			3.88		
H7	3.59				
H8	3.89				
H9	3.64				
	3.87				
N-CH <sub>3</sub>	2.01		2.01		

NOEs zwischen H3<sup>N<sub>ax</sub></sup> und H3<sup>G</sup>. Es wird jedoch ein deutlicher Transfer-NOE zwischen H8<sup>N</sup> und H3<sup>G</sup> beobachtet (Abb. 2b und 2c). Ein schwacher Transfer-NOE wird zwischen der Methylgruppe der *N*-Acetylfunction an C5<sup>N</sup> und H7<sup>N</sup> innerhalb des *N*-Acetylneuraminsäurerests beobachtet. Dies stützt die

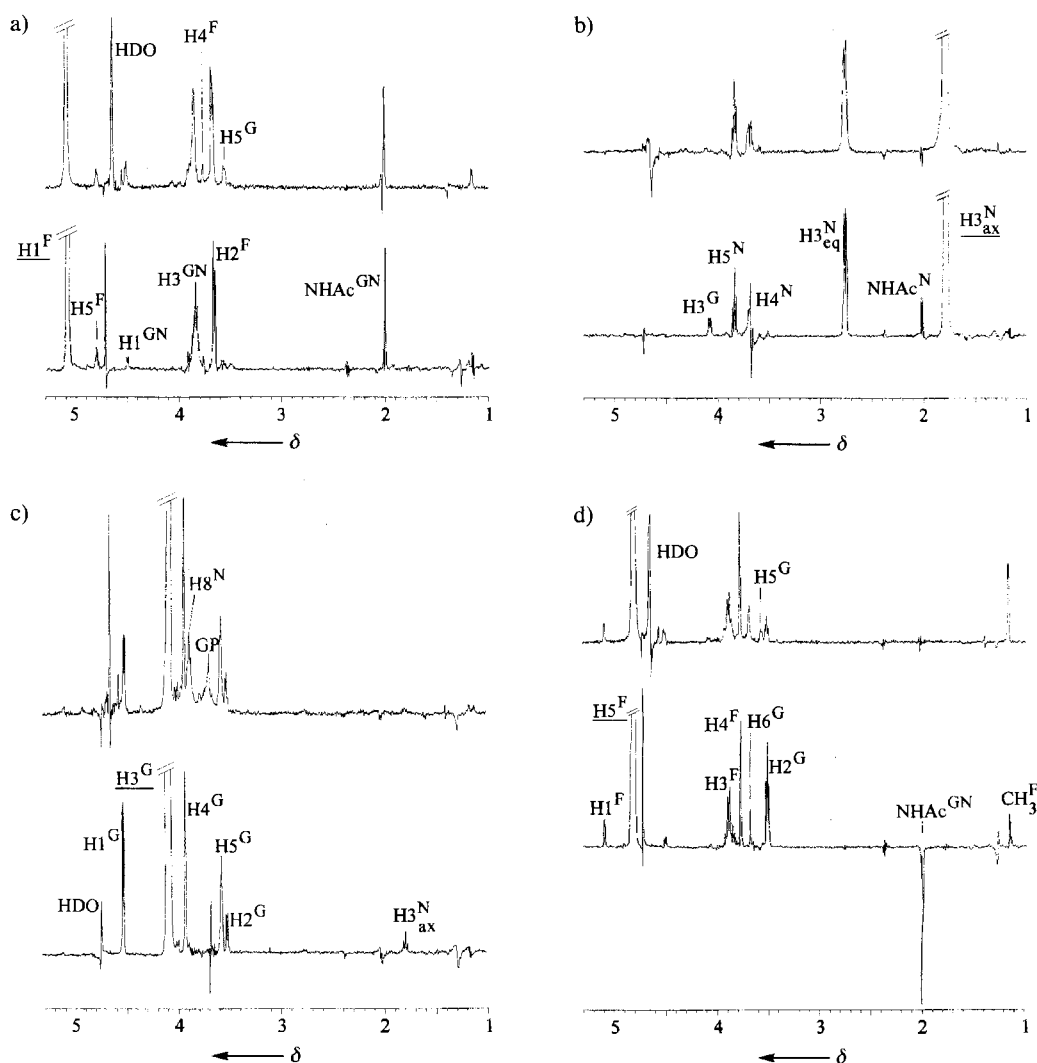


Abb. 2. Durch Addition von F1-Spuren erhaltene 1D-Darstellungen der NOESY-Spektren aus Abbildung 1. Die unteren Spuren sind aus dem NOESY-Spektrum für freies Sialyl-Lewis<sup>x</sup> entnommen (vgl. Abb. 1a), die oberen Spuren entsprechen komplexiertem Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (vgl. Abb. 1b). a)  $\delta$  = H1<sup>F</sup>; b)  $\delta$  = H3<sup>N<sub>ax</sub></sup>; c)  $\delta$  = H3<sup>G</sup>; d)  $\delta$  = H5<sup>F</sup>. Das mit GP gekennzeichnete Signal stammt aus E-Selectin. Dies kann durch einen Vergleich mit NOESY-Spektren für freies E-Selectin (nicht abgebildet) gezeigt werden.

*gauche,gauche*(g,g)-Vorzugsorientierung an der C6<sup>N</sup>-C7<sup>N</sup>-Bindung. Für die Orientierung der C7<sup>N</sup>-C8<sup>N</sup>-Bindung haben Analysen vicinaler homo- und heteronuclearer Kopplungskonstanten sowie die Bestimmung von <sup>13</sup>C-Spin-Gitter-Relaxationszeiten gezeigt, daß die Glycerolseitenkette in wäßriger Lösung an der C7<sup>N</sup>-C8<sup>N</sup>-Bindung ausschließlich eine *trans*-Orientierung der beiden an diese C-Atome gebundenen Hydroxygruppen aufweist<sup>[12a, 15]</sup> und nur für die Hydroxymethylgruppe an C9 ein Konformerengleichgewicht beobachtet werden kann. Insgesamt wird daher für die Glycerolseitenkette der *N*-Acetylneuraminsäure eine Orientierung wie in [12a] angenommen.

Zwischen Galactose und *N*-Acetylglucosamin werden Transfer-NOEs beobachtet, die den NOEs im freien Tetrasaccharid entsprechen (Abb. 1). Die interglycosidischen Transfer-NOEs (Tabelle 2) ausgehend von Fucose unterscheiden sich wiederum

Tabelle 2. Experimentell bestimmte interglycosidische Transfer-NOEs aus dem NOESY-Spektrum (Abb. 1b), die als Abstandsbeschränkungen eingesetzt wurden (zum Vergleich sind in Klammern auch die NOEs für das NOESY-Spektrum (Abb. 1a) des freien Tetrasaccharids angegeben). Zur Bestimmung der Abstandsbeschränkungen  $r_a$  (untere Grenze) und  $r_b$  (obere Grenze) wurde zunächst auf einen bekannten intraglycosidischen Abstand, H1<sup>F</sup>-H2<sup>F</sup> = 2.3 Å, entsprechend der „Isolated Spin Pair Approximation“ (ISPA) geeicht [16]. Für die Bestimmung der NOEs wurde ein relativ großer Fehler von  $\pm 40\%$  angenommen. Mit den aus den NOEs mit ISPA errechneten Abständen und dem geschätzten Fehler ergeben sich dann die Werte für die Abstandsbeschränkungen  $r_a$  und  $r_b$ .

	NOE [%] Komplex (frei)	$r_a$ [Å]	$r_b$ [Å]
H1 <sup>F</sup> -H3 <sup>GN</sup>	-37 (-8)	2.3	2.6
H1 <sup>F</sup> -NAc <sup>GN</sup>	-9 (-1)	2.8	3.3
H5 <sup>F</sup> -H2 <sup>G</sup>	-8 (-15)	2.9	3.4
H5 <sup>F</sup> -H6 <sup>G</sup>	-12 (-1)	2.7	3.1
CH <sub>3</sub> <sup>F</sup> -H2 <sup>G</sup>	-20 (-4)	2.5	2.9
H1 <sup>G</sup> -H4 <sup>GN</sup>	-45 (-20)	2.2	2.5
H3 <sup>G</sup> -H8 <sup>N</sup>	-37 (0)	2.3	2.6
H3 <sub>ax</sub> <sup>N</sup> -H3 <sup>G</sup>	0 (-4)	4.0	
H3 <sub>eq</sub> <sup>N</sup> -H3 <sup>G</sup>	0 (0)	4.0	

merklich von den korrespondierenden NOEs im freien Tetrasaccharid. Zwischen H5<sup>F</sup> und H2<sup>G</sup> wird nur noch ein außerordentlich schwacher Transfer-NOE beobachtet (Abb. 2d). Ebenso findet sich ein geringfügig schwächerer Transfer-NOE zwischen der Methylgruppe der *N*-Acetylfunction an C2<sup>GN</sup> und H1<sup>F</sup> (Abb. 2a). Ein sehr schwacher Transfer-NOE zwischen H1<sup>F</sup> und H5<sup>G</sup> oder H5<sup>GN</sup>, der in Abbildung 2a gekennzeichnet ist, muß wahrscheinlich auf Spindiffusion (dies geht aus einer Betrachtung der entsprechenden NOE-Aufbaukurven hervor) zurückgeführt werden. Der Transfer-NOE zwischen CH<sub>3</sub>-6<sup>F</sup> und H2<sup>G</sup> hingegen ähnelt in seiner Intensität dem entsprechenden NOE im freien Tetrasaccharid (Abb. 1). Es wird noch ein Transfer-NOE zwischen H5<sup>F</sup> und H6<sup>G</sup> detektiert, der für freies Sialyl-Lewis<sup>x</sup> an der Nachweisgrenze liegt (Abb. 2d).

Für die weitere Auswertung werden die Transfer-NOEs zuerst integriert<sup>[16]</sup>, wobei die Intensität des intraglycosidischen Transfer-NOEs zwischen H3<sub>ax</sub><sup>N</sup> und H3<sub>eq</sub><sup>N</sup> als Eichwert dient. Die relativen NOEs lassen sich unter Anwendung der ISPA-Näherung<sup>[17]</sup> in Abstandsbeschränkungen (Tabelle 2) umwandeln und so für die Ableitung der Konformation von gebundenem Sialyl-Lewis<sup>x</sup> einsetzen. Dazu wurde zunächst eine 10<sup>6</sup> Schritte umfassende Metropolis-Monte-Carlo(MMC)-Simulation<sup>[18]</sup> mit einem Temperaturparameter von 2000 K durchgeführt, die den für Sialyl-Lewis<sup>x</sup> zur Verfügung stehenden Konformationsraum vollständig erfaßt<sup>[19]</sup>. Aus den erhaltenen 457 309 Konformationen wurden 29 Strukturen selektiert, die alle Abstandsbeschrän-

kungen erfüllen. Die so gefundenen Konformationen populieren nur einen sehr eingeschränkten Bereich des Konformationsraums und geben somit die Konformation von gebundenem Sialyl-Lewis<sup>x</sup> an (Abb. 3).

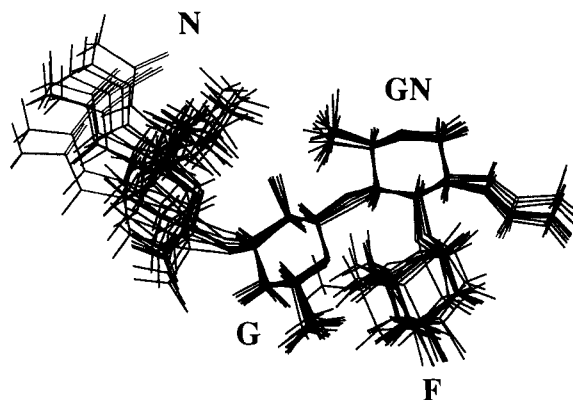


Abb. 3. Darstellung der Konformation von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> im gebundenen Zustand. Gezeigt sind zehn der erhaltenen 29 Konformationen. Für die Diederwinkel an den glycosidischen Bindungen ergeben sich folgende Mittelwerte (vgl. Tabelle 2):  $\phi_{N-G} = -76^\circ \pm 10^\circ$ ,  $\psi_{N-G} = 6^\circ \pm 10^\circ$ ;  $\phi_{G-GN} = 39^\circ \pm 10^\circ$ ,  $\psi_{G-GN} = 12^\circ \pm 6^\circ$ ,  $\phi_{F-GN} = 38^\circ \pm 7^\circ$ ,  $\psi_{F-GN} = 26^\circ \pm 6^\circ$ .

Cooke et al. leiten aus ihren Experimenten eine Konformation ab, bei der die *N*-Acetylneuraminsäure eine Orientierung ähnlich der hier beschriebenen einnimmt. Allerdings wird dort ein Transfer-NOE zwischen H8<sup>N</sup> und H3<sup>G</sup>, der für die Ableitung der gebundenen Konformation eine essentielle Abstandsbeschränkung ist, weder beobachtet noch diskutiert. Daher müssen die Autoren auf bereits publizierte Kraftfeldrechnungen<sup>[11b]</sup> und Moleküldynamik(MD)-Simulationen<sup>[13]</sup> zurückgreifen, um eine mögliche Konformation für den gebundenen Liganden angeben zu können. Die von Ichikawa et al.<sup>[11b]</sup> angegebene Konformation C wird unter Anwendung des Ausschlußprinzips – nur der fehlende NOE H3<sup>G</sup>/H3<sub>ax</sub><sup>N</sup> wird für eine negative Abstandsbeschränkung herangezogen – favorisiert. Transfer-NOEs zwischen der Fucose- und der *N*-Acetylglucosamineinheit werden nicht diskutiert, und folglich wird dem Fucoserest in Sialyl-Lewis<sup>x</sup> eine Orientierung wie in wäßriger Lösung zugeschrieben. In der kürzlich erschienenen Arbeit von Hensley et al.<sup>[5]</sup> wird ein „Transfer-NOE“ zwischen H3<sub>ax</sub><sup>N</sup> und H3<sup>G</sup> gefunden, der belegen soll, daß die Konformation im gebundenen Zustand mit der Lösungskonformation von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> identisch ist. Es bleibt jedoch unklar, welche Lösungskonformation gemeint ist. Vermutlich handelt es sich um die von Ichikawa et al.<sup>[11b]</sup> angegebene Konformation A oder B. Dies ist weder mit den Ergebnissen von Cooke et al.<sup>[4]</sup> in Einklang zu bringen, noch läßt es sich mit unseren Befunden korrelieren. Möglicherweise ist der von diesen Autoren<sup>[5]</sup> beobachtete „Transfer-NOE“ auf den verwendeten hohen Ligandenüberschuß und damit auf ungebundenes Sialyl-Lewis<sup>x</sup> zurückzuführen.

Unsere Experimente ermöglichen auf der Grundlage von MMC-Simulationen bei 2000 K die Bestimmung der Konformation von gebundenem Sialyl-Lewis<sup>x</sup>. Der hohe Temperaturparameter wurde gewählt, um den sterisch zugänglichen Konformationsraum möglichst vollständig zu erfassen. Es ist hervorzuheben, daß sowohl die Orientierung des *N*-Acetylneuraminsäure- als auch des Fucoserests im gebundenen Liganden zu Transfer-NOEs führen, die sich erheblich von den NOEs für freies Sialyl-Lewis<sup>x</sup> unterscheiden (Abb. 1 und 2). Als wesentliche Schlußfolgerung ergibt sich damit:

E-Selectin komplexiert ausschließlich eine Konformation aus dem in wäßriger Lösung präsentierten Konformerengemisch, bei der die Neuraminsäure eine Orientierung aufweist, die etwa der Konformation A von Rutherford et al.<sup>[13]</sup> bzw. der Konformation C von Ichikawa et al.<sup>[11b]</sup> entspricht und wobei die Fucose ihre Orientierung gegenüber der in wäßriger Lösung bevorzugten geringfügig ändert (vgl. Abb. 3). Hieraus lassen sich bei genauerer quantitativer Auswertung der Transfer-NOE-Daten möglicherweise Schlußfolgerungen über die Flexibilität der  $\alpha(1 \rightarrow 3)$ -glycosidischen Bindung zwischen dem Fucose- und dem N-Acetylglucosaminrest ableiten. Diese Ergebnisse dienen derzeit als Grundlage für die Modellierung potenter Inhibitoren für die E-Selectinrezeptoren.

Eingegangen am 25. Februar 1995 [Z 7735]

**Stichworte:** Glycoproteine · Kohlenhydrate · NMR-Spektroskopie · Selectine · Sialyl-Lewis<sup>x</sup>

- [1] M. P. Bevilacqua, S. Stengelin, M. A. Gimbrone, Jr., B. Seed, *Science* **1989**, *243*, 1160–1165.
- [2] L. A. Lasky, *Science* **1992**, *258*, 964–969.
- [3] B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K.-S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky, D. K. Burns, *Nature* **1994**, *367*, 532–538.
- [4] R. M. Cooke, R. S. Hale, S. G. Lister, G. Shah, M. P. Weir, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10591–10596.
- [5] P. Hensley, P. J. McDevitt, I. Brooks, J. J. Trill, J. A. Feild, D. E. McNulty, J. R. Connor, D. E. Griswold, N. V. Kumar, K. D. Kopple, S. A. Carr, B. J. Dalton, K. Johanson, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 23949–23958.
- [6] a) G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 402–417; b) G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *ibid.* **1983**, *53*, 423–442; c) F. Ni, *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 651–656.
- [7] B. Ernst, N. Cooke, P. M. Åberg, unveröffentlicht. Das synthetische Tetrasaccharid entspricht dem im Text gezeigten Formelbild.
- [8] Die Ectodomänen von humanem E-Selectin wurden mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der Fc-Region von humanem IgG1 kombiniert und in den Expressionsvektor pcDNA1/neo (Invitrogen) subkloniert. Durch Transfektion von CHO-K1-Zellen (ATCC CCL-61) und Selektion mit G418 (Gibco) wurde eine stabile Zelllinie erhalten, welche ca.  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  rekombinantes E-Selectin/hIgG sekretierte. Zur Produktion größerer Mengen wurde diese Zelllinie in einem Hohlfaserbioreaktor ( $1.1 \text{ m}^2$ , 50 mL, Celco) in Opti-MEM Kulturmedium (Gibco) supplementiert und mit 2% fötalem Kälberserum und  $200 \text{ mg mL}^{-1}$  Gentamycin kultiviert. Konditionierte Zellüberstände wurden zuerst durch Affinitätschromatographie an Protein A-Agarose (Sigma) gereinigt. Die durch Elution mit 20 mM Glycin-HCl, pH 3.0, erhaltene Proteinfraktion wurde nach Neutralisierung direkt an einer Anti-human E-Selectin-Affinitätsäule (2 mg monoklonaler Antikörper 7A9 pro mL Affigel) chromatographiert. Spezifisch gebundenes E-Selectin/IgG wurde mit 5 M Harnstoff in gepufferter Salzlösung eluiert und anschließend gegen Dulbeccos PBS-Lösung (PBS = Phosphate Buffered Saline) dialysiert. Das erhaltene Protein zeigte in einer Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen eine einzige Bande bei ca. 140 kD. Für die NMR-Analyse wurden ca. 6 mg E-Selectin/hIgG gegen 50 mM perdeutiertes Imidazol (Sigma), 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4, in  $\text{D}_2\text{O}$  dialysiert und mit Centricon YM-50 (Amicon) auf ein Endvolumen von 0.5 mL konzentriert.
- [9] a) Alle NMR-Experimente wurden im Institut für Biophysikalische Chemie der Universität Frankfurt an einem Bruker-DMX-600-Spektrometer durchgeführt; wir danken Prof. Dr. H. Rüterjans für die Meßmöglichkeit. b) Für die NMR-Experimente am Komplex wurde ein E-Selectin(IgG-Chimäre)/Tetrasaccharid-Verhältnis von 1:15 gewählt. Die Konzentration von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> betrug 0.81 mM, die von E-Selectin(IgG-Chimäre) 54  $\mu\text{M}$ . Als Puffer wurde  $[\text{D}_2]\text{imidazol}$  (30 mM) eingesetzt. Die Lösung enthielt außerdem NaCl (50 mM) und  $\text{CaCl}_2$  (1 mM). Der pH-Wert betrug 7.4. Bei 600 MHz und 310 K wurden Spinlock-gefilterte NOESY-Spektren [10] mit Mischzeiten  $\tau_m$  von 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 und 200 ms aufgenommen. Die Relaxationswartezeit betrug 1.85 s. Die spektrale Weite war in allen Fällen 3000 Hz (5 ppm). Es wurden 512 Inkremente in  $t_1$  aufgenommen. Für jedes Inkrement wurden 32 Transienten mit jeweils 2 K Datenpunkten akquiriert. Nach Auffüllen mit Nullen und Multiplikation mit quadrierten cos-Funktionen in  $t_1$  und  $t_2$  wurde durch 2D-Fourier-Transformation eine  $2 \text{ K} \times 1 \text{ K}$  Datenmatrix erhalten.
- [10] T. Scherf, J. Anglister, *Biophys. J.* **1993**, *64*, 754–761.
- [11] NOESY-Spektren für freies E-Selectin(IgG-Chimäre) und Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Tetrasaccharid wurden wie unter [9] beschrieben mit folgenden Änderungen aufgenommen. Für freies E-Selectin wurden Mischzeiten  $\tau_m$  von 50, 100, 150, 200 und 400 ms (mit Spinlockfilter) verwendet, für freies Sialyl-Lewis<sup>x</sup> solche von 200, 300, 500, 600, 800 und 900 ms (ohne Spinlockfilter). Für freies Sialyl-Lewis<sup>x</sup> wurde eine Meßtemperatur von 303 K gewählt.
- [12] a) J. Breg, L. M. J. Kroon-Batenburg, G. Strecker, J. Montreuil, J. F. G. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *178*, 727–739; b) Y. Ichikawa, Y.-C. Lin, D. P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9283–9298; c) C. Mukhopadhyay, K. E. Miller, C. A. Bush, *Biopolymers* **1994**, *34*, 21–29.
- [13] T. J. Rutherford, D. G. Spackman, P. J. Simpson, S. W. Homans, *Glycobiology* **1994**, *4*, 59–68.
- [14] a) N. Murali, G. K. Jarori, S. B. Landy, B. D. N. Rao, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12941–12948; b) F. Ni, H. A. Scheraga, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 257–264; c) F. Ni, Y. Zhu, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1994**, *102*, 180–184.
- [15] a) L. Poppe, R. Stuik-Prill, B. Meyer, H. van Halbeek, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 109–136; b) G. Zhu, A. Renwick, A. Bax, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1994**, *110*, 257–261; c) L. W. Jaques, S. Glant, W. Weltner, Jr., *Carbohydr. Res.* **1980**, *80*, 207–211; d) M. F. Czarniecki, E. R. Thornton, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8273–8279.
- [16] Die Integration der NOE-Kreuzsignale wurde mit UXNMR-Software (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt. Es wurden die in Abbildung 1 gezeigten Spektren für die Integration ausgewählt. Das NOE-Kreuzsignal zwischen  $\text{H3}_\text{N}^\text{a}$  und  $\text{H3}_\text{N}^\text{b}$  diente dabei als Referenz (100%). Transfer-NOEs sind um ca. eine Größenordnung intensiver als NOEs für freies Sialyl-Lewis<sup>x</sup>.
- [17] A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1985**, *17*, 1–32.
- [18] a) T. Peters, B. Meyer, R. Stuik-Prill, R. Somorjai, J.-R. Brisson, *Carbohydr. Res.* **1993**, *238*, 49–73; b) R. Stuik-Prill, B. Meyer, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 903–919.
- [19] Die MMC-Simulationen für Sialyl-Lewis<sup>x</sup> wurden mit einem Temperaturparameter von 2000 K und  $1 \times 10^6$  Makroschritten durchgeführt. Die maximalen Schrittweiten betragen  $20^\circ$  ( $\phi$ ,  $\psi$ ) und  $25^\circ$  ( $\omega$ ). Die Diederwinkel sind dabei wie folgt definiert:  $\phi = \text{H1-C1-O1-Cx}$  (für NeuNAc: C1-C2-O2-Cx),  $\psi = \text{C1-O1-Cx-Hx}$  (für NeuNAc: C2-O2-Cx-Hx) und  $\omega = \text{O5-C5-C6-O6}$  (für NeuNAc werden entsprechende Notierungen zur Bezeichnung der Orientierung der Seitenkette verwendet. Das Akzeptanzverhältnis betrug 46%. Aufgrund der Wahl des hohen Temperaturparameters werden auf diese Weise alle sterisch möglichen Konformationen erreicht. Die Auswertung der MMC-Daten und die Extraktion der den experimentell ermittelten Abstandsbeschränkungen (siehe Tabelle 2) genügenden Konformationen wurde mit Fortran- und MATLAB-Programmen durchgeführt. Alle Rechnungen wurden auf einer Silicon-Graphics-Indy-II-Workstation durchgeführt.

## Neue Netzwerke von Silber(I)-Kationen in ungewöhnlicher Koordination: die waffelartige Struktur von $[\text{Ag}(\text{pyz})_2][\text{Ag}_2(\text{pyz})_5](\text{PF}_6) \cdot 2 \text{ G}$ und das einfache kubische Gerüst von $[\text{Ag}(\text{pyz})_3](\text{SbF}_6)^{**}$

Lucia Carlucci, Gianfranco Ciani\*, Davide M. Proserpio und Angelo Sironi

Entwurf und Synthese kristalliner zwei(2D)- und dreidimensionaler(3D) Koordinationspolymere sind von großem Interesse<sup>[1–3]</sup>, sowohl theoretisch im Hinblick auf die Topologien neuer Netzwerke als auch aufgrund ihrer zu erwartenden physikalisch-chemischen Eigenschaften, z.B. der elektrischen Leitfähigkeit<sup>[4]</sup> und des Magnetismus<sup>[5]</sup>. Anwendungen dieser Systeme in der Wirt-Gast-Chemie<sup>[1, 6]</sup> und in der Katalyse<sup>[7]</sup> wurden beschrieben. Koordinationspolymere bieten im Vergleich mit supramolekularen Verbänden aus wasserstoffverbrückten organischen Molekülen<sup>[8]</sup> mehr Möglichkeiten wegen der Vielzahl an Koordinationsgeometrien und den spezifischen Eigenschaften der Metallzentren. Wir untersuchen die Selbstorganisation von Silber(I)-Kationen mit zweizähligen N-N'-Donor-Liganden und haben 2D- und 3D-Netzwerke hergestellt. Dazu

[\*] Prof. G. Ciani, Dr. L. Carlucci, Dr. D. M. Proserpio, Prof. A. Sironi  
Dipartimento di Chimica Strutturale e Stereochimica Inorganica  
und  
Centro CNR  
Via G. Venezian 21, I-20133 Milano (Italien)  
Telefax: Int. + 2/70635288

[\*\*] pyz = Pyrazin, G =  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CCl}_4$ .