

Schema 5. a) [15]Krone-5, THF, 20°C, 16 h; b) NaOMe, MeOH, THF; c) DTT, THF, MeOH, Et₃N; d) TFA, CH₂Cl₂, 20°C.

daß eine teilweise Spaltung der O-glycosidischen Bindung für die geringere Ausbeute von ca. 70% bei den Verbindungen **20–28** verantwortlich war.

Wir haben hiermit eine hocheffiziente Methode zur Synthese von Schwefel-verknüpften Oligosacchariden an fester Phase beschrieben. Alle Glycoside konnten stereoselektiv und in hohen Ausbeuten erhalten werden. Nebenprodukte, die von Eliminierungsreaktionen der Triflate herrühren, konnten durch Waschen des Harzes nach erfolgter Glycosylierung vollständig entfernt werden. Weiterhin erwies sich die Verwendung unsymmetrischer Disulfide als Schutzgruppe der anomeren Thiolfunktion als kompatibel mit allgemein üblichen Reaktionsbedingungen in der Kohlenhydratchemie.

Eingegangen am 6. November 1998 [Z12628]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1782–1784

Stichwörter: Festphasensynthesen • Oligosaccharide • Thioglycoside • Thiolate • Thiooligosaccharide

- [1] a) Z. J. Witzak, R. Chhabra, H. Chen, X.-Q. Xie, *Carbohydr. Res.* **1997**, *301*, 167–175; b) F. Shafizadeh, R. H. Furneaux, T. T. Stevenson, *Carbohydr. Res.* **1979**, *71*, 169–191.
- [2] L. A. Reed, L. Goodman, *Carbohydr. Res.* **1979**, *94*, 91–99.
- [3] L. X. Wand, N. Sakari, H. Kuzuhara, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 1677–1682.
- [4] T. Eisele, A. Toepfer, G. Kretzschmar, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1389–1392.
- [5] Z. J. Witzak, J. M. Sun, R. Mielgij, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2169–2174.
- [6] V. Moreau, J. C. Norrild, H. Driguez, *Carbohydr. Res.* **1997**, *300*, 271–277.

- [7] T. Mukaiyama, K. Takahashi, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 5907–5908.
- [8] a) D. Horton, *Methods Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 433–437; b) D. Zanini, W. K. C. Park, R. Roy, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7383–7386; c) W. K. C. Park, S. J. Meunier, D. Zanini, R. Roy, *Carbohydr. Lett.* **1995**, *1*, 179–184; R. Roy, D. Zanini, S. J. Meunier, A. Romanowska, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1869–1872.
- [9] D. Horton, *Methods Carbohydr. Chem.* **1972**, *6*, 282–285.
- [10] Das Harz wurde von der Firma Novabiochem bezogen. Zur Immobilisierung wurde 48 h in Pyridin in Gegenwart von DMAP bei 60°C erhitzt.
- [11] Ausbeute an isoliertem Produkt. Die Isopropyliden-Schutzgruppen der Verbindungen **20**, **23**, **25**, **27** sowie die O-glycosidischen Bindungen der ungeschützten Verbindungen **22**, **24**, **26**, **28** wurden teilweise unter den sauren Abspaltungsbedingungen gespalten. Die Abspaltung der Benzoyl-geschützten Thiosaccharide von der Festphase hingegen ergab die entsprechenden Disaccharide in quantitativen Ausbeuten, da die elektronenziehenden Estergruppen glycosidische Bindungen stabilisieren. Der Einsatz säurelabilerer Linkersysteme wird zur Zeit untersucht.

Charakterisierung von Ligandenbindung durch Sättigungstransfer-Differenz-NMR-Spektroskopie**

Moriz Mayer und Bernd Meyer*

Die hier vorgestellte Differenzbildung zwischen Sättigungstransfer- und normalem NMR-Spektrum (STD-Methode) ermöglicht das schnelle Testen von Substanzbibliotheken auf Bindungsaktivität gegenüber makromolekularen Rezeptoren. Mit dieser Methode erhält man 1D- und 2D-Spektren, die nur Signale bindender Moleküle enthalten. Die hohe Empfindlichkeit des Verfahrens macht die Aufnahme von STD-Spektren ab 1 nmol Protein möglich. Zudem lässt sich das Bindungsepitop des Liganden leicht bestimmen, da mit dem Protein in direktem Kontakt stehende Ligandenreste intensivere STD-Signale liefern. Beispielsweise konnten wir zeigen, daß die beiden Fucosereste des Lewis^b-Hexasaccharids für die Bindung an das *Aleuria-aurantia*-Agglutinin (AAA) verantwortlich sind.

Identifizierung von Bindungsaktivität und Charakterisierung des Bindungsepitops von Liganden sind für die biochemische und pharmazeutische Industrie von entscheidender Bedeutung. Anders als bei Screening-Methoden wie ELISA, RIA, Biacore oder Immunoblotting besteht bei auf der NMR-Spektroskopie basierenden Techniken die Möglichkeit, bindende Substanzen direkt in einem Gemisch potentieller Liganden zu identifizieren. Kleine Moleküle,

[*] Prof. Dr. B. Meyer, Dipl.-Chem. M. Mayer
Institut für Organische Chemie der Universität
Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg
Fax: (+49) 40-42838-2878
E-mail: Bernd.Meyer@sg1.chemie.uni-hamburg.de
Moriz.Mayer@sg1.chemie.uni-hamburg.de

[**] Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, der Bruker Analytik GmbH und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 470 und Graduiertenkolleg 464) für Projektförderung.

die reversibel mit der Bindungsdomäne eines Proteins in Wechselwirkung stehen, zeigen charakteristische Relaxations- und Mobilitätsunterschiede zu den Molekülen, die keine Affinität zum Protein aufweisen. Transfer-NOE-Spektren,^[1] diffusions- und relaxationseditierte NMR-Spektren^[2] sowie die ¹⁵N-NMR-chemische Verschiebung^[3] wurden zur Identifizierung von Substanzen mit Bindungsaktivität eingesetzt. Hauptfaktoren, die den Einsatz von NMR-Methoden zum Hochdurchsatz-Screening reduzieren, sind lange Akquisitionszeiten sowie die Abhängigkeit vom Ligandenüberschuss. Zusätzliche Nachteile der Untersuchung der ¹⁵N-NMR-chemischen Verschiebung sind der große Substanzbedarf an wertvollen, ¹⁵N-markierten Biomolekülen und die Einschränkung der Proteingröße auf <30 kDa.^[3] Spindiffusionsexperimente wurden bis heute in einer Vielzahl von Bereichen eingesetzt, z. B. bei der Untersuchung von Proteinbeweglichkeiten^[4] und dem Einfluß der Unterdrückung des H₂O-Signals auf NMR-Spektren^[5] sowie bei der Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen.^[6]

Makromoleküle wie die Proteine bestehen aus einem großen System stark über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen gekoppelter Kerne.^[7] Die longitudinale Relaxationsrate R_1 der Proteinprotonen wird von der Kreuzrelaxationsrate σ_{intra} dominiert. Selektive Sättigung einzelner Proteinresonanzen führt zu einer sehr schnellen Verteilung der Magnetisierung über das gesamte Protein (Spindiffusion). Der ebenfalls ablaufende intermolekulare Magnetisierungstransfer vom Protein auf den Liganden, σ_{inter} , führt zu einer kontinuierlichen Sättigung des Liganden (Abbildung 1). Die einzige

Einschränkung besteht darin, daß Ligandenmoleküle in der Mischung nicht durch den Sättigungspuls beeinflußt werden dürfen. Die NOE-Pumping-Methode^[2b] beruht ebenfalls auf einem Polarisierungstransfer vom Protein auf den bindenden Liganden. Jedoch benötigt die STD-Methode im Gegensatz zur NOE-Pumping-Methode keinen Diffusionsfilter, und die NOE-Mischzeit wird durch die Sättigungszeit ersetzt. Diese Faktoren machen die STD-Methode empfindlicher und variabler in den Einsatzmöglichkeiten. Die Aufnahme von STD-Spektren sollte eine Identifizierung von Bindungen zwischen Liganden und Proteinen mit Dissoziationskonstanten K_D zwischen 10^{-3} und 10^{-8} ermöglichen.^[8]

Die Effizienz der STD-Technik wird hier an der Untersuchung der Bindung von *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) an Weizenkeim-Agglutinin (WGA) gezeigt. Die Affinität dieses Lektins zu GlcNAc wurde schon durch andere Studien belegt.^[9] Wir erstellten eine Substanzmischung aus sechs nichtbindenden Sacchariden zusätzlich zum bindenden Monosaccharid GlcNAc. Abbildung 2 A zeigt das 1D-¹H-NMR-

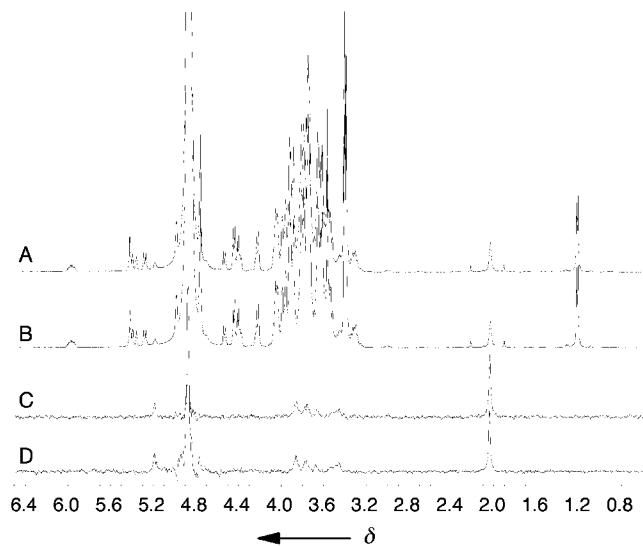


Abbildung 2. Charakterisierung von Liganden mit Bindungsaffinität mit der 1D-STD-Methode. 1D-¹H-NMR-Spektrum einer Mischung aus sieben Sacchariden (1 mm an α -D-GlcNAc, α -D-Man-OMe, α -D-Gal-OMe, α -L-Fuc-OMe, β -D-Gal-(1→4)- β -D-Glc-OMe, β -D-Gal-(1→4)- β -D-Glc-O-Allyl und D-Raffinose) in Gegenwart von WGA bei Off-resonance-Einstrahlung ($\delta = 30$, A) und bei On-resonance-Einstrahlung ($\delta = 10$, B). C) Das zugehörige STD-Spektrum (Spektrum (A) minus Spektrum (B)). D) Das STD-Referenzspektrum von WGA nur in Gegenwart von GlcNAc. Die Spektren (C) und (D) wurden mit je 128 Scans für die On- und Off-resonance-Spektren aufgenommen und die Differenzen intern über den Phasencyclus gebildet. In den Spektren (C) und (D) treten ausnahmslos Signale von GlcNAc auf. Die WGA-Konzentration in der Lösung war 45 μ M (Bindungsplätze), der Ligandenüberschuß ca. 20:1. Die Pulskaskade zur Sättigung des Proteins bestand aus 40 selektiven Gauß-Pulsen (Dauer 50 ms, Abstand 1 ms). Störende Proteinresonanzen wurden durch einen T_2 -Relaxationsfilter (70-ms-Spinlock-Puls) unterdrückt, was zusätzlich zu einem Intensitätsverlust in den Spektren (C) und (D) führte.

Spektrum^[10] der Bibliothek bei selektiver Sättigung im Off-resonance-Bereich bei $\delta = 30$, Abbildung 2B das der gleichen Probe bei On-resonance-Sättigung des Proteins bei $\delta = 10$. Wegen starker Signalüberlappung, besonders im Bereich der Ringprotonen, kann die bindende Komponente nicht anhand der Intensitätsunterschiede in den Spektren (A) und (B)

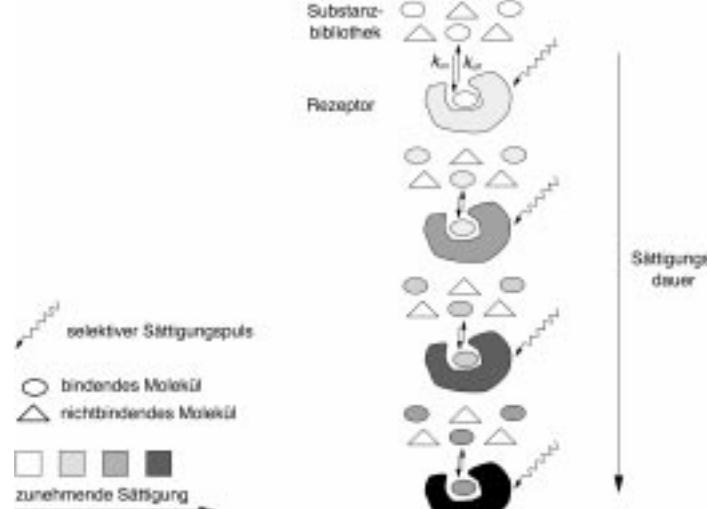


Abbildung 1. Illustration des Sättigungstransfer-Effekts. Der selektive Puls sättigt nur wenige, breite Proteinresonanzen. Die so erreichte Sättigung wird – wie durch die zunehmende Schattierung angedeutet – durch Spindiffusion über das gesamte Protein verteilt. Die scharfen Resonanzen kleiner Moleküle werden nicht direkt beeinflußt. Nur die mit dem Protein in direktem Kontakt stehenden Moleküle (ellipsenförmig dargestellt) werden durch intermolekularen Polarisierungstransfer gesättigt. Über chemischen Austausch gelangen diese Moleküle in Lösung, wo sie detektiert werden. Die dreieckig dargestellten Moleküle binden nicht an das Protein und übernehmen somit keine Sättigung. Der Sättigungsgrad bindender Moleküle ist, wie durch die Schattierung angedeutet, niedriger als der des Rezeptors, da die Liganden im Normalfall nur kurze Zeit gebunden vorliegen.

identifiziert werden. Erst das Differenzspektrum in Abbildung 2C ermöglicht die Signalzuordnung im Bereich der Ringprotonen und damit die Identifizierung von GlcNAc als bindende Komponente. Zum Vergleich wurde das STD-Spektrum von GlcNAc und WGA in Lösung aufgenommen (Abbildung 2D). Die Spektren (C) und (D) sind identisch, was beweist, daß die Signale aller nichtbindenden Saccharide im STD-Spektrum (C) vollständig abgezogen wurden.

Die Abhängigkeit des Sättigungsgrades vom eingesetzten Ligandenüberschuß wurde durch Titration einer WGA-Probe mit GlcNAc bestimmt (Abbildung 3 A). Das aus Differenzspektren ermittelte Signal-Rausch-Verhältnis der Signale des

der Liganden ist folglich von der Größe des Proteins, dem Offset, der Dauer der On-resonance-Einstrahlung, der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{off} und dem Ligandenüberschuß abhängig.

Das Screening der Bibliothek aus 22 nmol (400 µg) WGA und den potentiellen Liganden in 20fachem Überschuß war mit der 1D-STD-Methode innerhalb von zwei Minuten möglich. Um die Empfindlichkeit der Methode zu testen, wurde versucht, die Bindung von GlcNAc an nur 1 nmol WGA (18 µg) in einer Mischung aus je 200 nmol GlcNAc (44 µg) und α -L-Fuc-OMe (36 µg) nachzuweisen. Dies gelang innerhalb von etwa einer Stunde mit einem 500-MHz-Spektrometer. Die Verwendung von Spektrometern mit höherer Meßfrequenz wird die STD-Methode noch effizienter machen, da sowohl Spindiffusion als auch Empfindlichkeit mit der Feldstärke ansteigen.

Um komplexere Komponenten einer Bibliothek zu identifizieren, sind zusätzliche Experimente, z.B. 2D-NMR-Experimente, nötig. Der Sättigungstransfer-Effekt läßt sich auf nahezu jedes NMR-Experiment anwenden. Somit lassen sich 2D-NMR-Spektren erhalten, die strukturrelevante Informationen nur über den bindenden Liganden liefern. Wir demonstrieren hier die Vorteile der STD-Methode an einem TOCSY-Spektrum (Abbildung 4). Es handelt sich um dieselbe

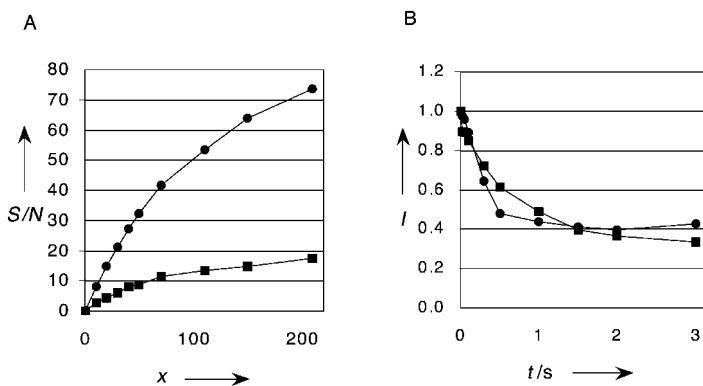


Abbildung 3. A) Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) aus STD-Spektren als Funktion des molaren Überschusses x an GlcNAc für ausgewählte Signale (● N -Acetylgruppe, ■ α -H1). Die Probe enthielt 22 nmol WGA. Die Spektren wurden bei 290 K (On-resonance-Einstrahlung bei $\delta = 7$, Off-resonance-Einstrahlung bei $\delta = 20$) gemessen. Die maximale Signalintensität wurde selbst bei einem Ligandenüberschuß von 200:1 nicht erreicht. B) Die Signalintensität I als Funktion der Sättigungsdauer t für ausgewählte α -L-Fuc-OMe-Signale (● O -Methylgruppe, ■ H6-Fuc-Methylgruppe). Die Probe enthielt 28 nmol AAA und den Liganden in 30fachem Überschuß. Die Spektren wurden bei 310 K mit On-resonance-Einstrahlung bei $\delta = 7$ aufgenommen. Die Sättigung steigt bis ca. 2 s an und flacht bei ca. 60% Sättigung ab.

anomeren α -H1-Protons und der N -Acetylgruppe steigt sogar jenseits eines Überschusses von 210:1 noch an. Die STD-Intensität wird in Abhängigkeit vom Ligandenüberschuß größer, solange Ligandenmoleküle an das Protein binden, die nicht oder nur wenig gesättigt sind. Hohe Wechselzahlen führen daher bei höheren Ligand-Protein-Verhältnissen zu einem größeren Effekt. Geringe Dissoziationsgeschwindigkeiten haben entsprechend kleinere STD-Signale zur Folge, was die Empfindlichkeit reduziert.

Abbildung 3B demonstriert die Abhängigkeit der STD-Signalintensität von der Sättigungsdauer. Das Sättigungsprofil zeigt, daß intra- wie intermolekulare Spindiffusion sehr effizient sind. Schon eine Sättigungsdauer von 100 ms führt zu einer Reduzierung des Ligandensignals um 15 %. Die unter diesen Bedingungen maximale Sättigung von ca. 60 % wurde bei einer Sättigungsdauer von 1.5 s erreicht. Hier sei angemerkt, daß eine verlängerte Einstrahltdauer nicht zu einer Verminderung des STD-Signals führt. Der hohe Sättigungsgrad sogar bei einem Ligandenüberschuß von 30:1 macht die STD-Methode sehr empfindlich, so daß die Untersuchung geringer Proteinmengen möglich wird. Der Sättigungsgrad

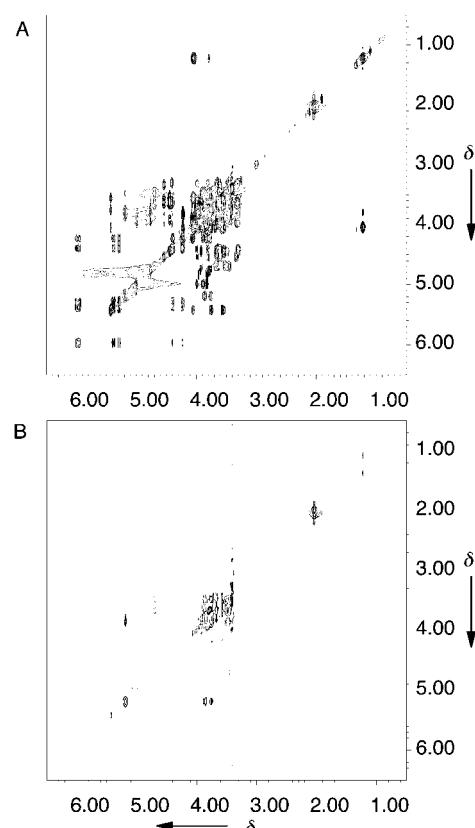
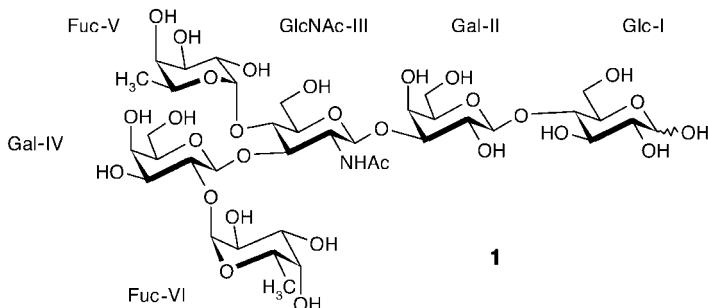


Abbildung 4. Charakterisierung von Liganden mit Bindungsaffinität mit der 2D-STD-Methode. A) TOCSY-Spektrum einer Mischung aus sieben Sacchariden und WGA mit Off-resonance-Einstrahlung bei $\delta = 20$. B) STD-TOCSY-Spektrum, erhalten durch Subtraktion eines mit On-resonance-Einstrahlung bei $\delta = 7$ aufgenommenen Spektrums von Spektrum (A). Die Spektren wurden bei 290 K mit 32 Transienten aufgenommen, wobei die 200 t_1 -Inkrementen abwechselnd gemessen wurden. Im STD-TOCSY-Spektrum sind nur Kreuz- und Diagonalsignale vom GlcNAc enthalten. Vor der Subtraktion wurden die Spektren identisch prozessiert.

Probe, die auch im 1D-Experiment verwendet wurde. Abbildung 4A zeigt das mit Off-resonance-Einstrahlung aufgenommene normale TOCSY-Spektrum der Substanzmischung, Abbildung 4B das STD-TOCSY-Spektrum, das nur Signale der bindenden Komponente GlcNAc enthält. Die Aufnahme von 2D-NMR-Spektren ermöglicht die eindeutige Identifizierung komplexer Ligandenmoleküle direkt in Mischungen.

Zur Untersuchung eines größeren Liganden mit der STD-Methode wurde das TOCSY-Spektrum eines Lewis^b-Hexasaccharids (Lacto-*N*-difucosylhexaose I **1**) in Gegenwart des



fucosespezifischen Lektins AAA aufgenommen.^[11] Die Signale der individuellen Zuckerreste von **1** unterscheiden sich in der Intensität (Abbildung 5). Die Fucosereste erhalten wegen ihres direkten Kontakts zum Protein einen höheren Sättigungsgrad (Abbildung 5B). Weitere Zuckereinheiten wie Gal-II, GlcNAc-III und Gal-IV werden nur zu etwa 60% gesättigt, da sie nur mittelbar über die Fucosereste Sättigung erhalten können (Abbildung 5C). Bei Glc-I ist der Sättigungseffekt noch kleiner (nur etwa 30% relativ zu den Fucoseresten; nicht gezeigt). Folglich lassen sich das bindende Epitop und die ihm benachbarten Ligandenreste leicht mit der STD-Methode bestimmen. Dies gilt für alle Liganden, bei denen der Magnetisierungstransfer außerhalb des bindenden Epitops durch einen Engpaß führt, wie bei Peptiden^[12] oder Oligosacchariden. Die hier gezeigten Untersuchungen wurden mit 10 nmol wiederverwendbarem Protein sowie 1 µmol Ligand durchgeführt. Aus diesem Grund scheint die STD-Methode eine Alternative z.B. zur Bestimmung des Bindungsepitops mittels ELISA zu sein, bei der die Bindungsspezifität aus Messungen mit einer Vielzahl kurzer, überlappender Peptide erhalten wird.

Die STD-Methode ist ein neues Mitglied der Bioaffinitäts-NMR-Spektroskopie,^[1a,b] die die direkte Ermittlung und Identifizierung von bindenden Molekülen in Mischungen erlaubt. Es ist ein wesentlicher Vorteil dieser Methode, daß die falsche Zuordnung von Bindungsaaffinität zu einem potentiellen Liganden ausgeschlossen ist, da auch ein zu hoher Ligandenüberschuß keine Artefakte auslöst. Nur Magnetisierung, die über das Protein auf den Liganden übertragen wird, kann detektiert werden. Solange der makromolekulare Rezeptor selektiv gesättigt werden kann, gibt es keine Einschränkungen hinsichtlich der Größe des Ligandemoleküls. Substanzmischungen, die Komponenten in verschiedenen Konzentrationen und Größen enthalten, können somit effizient getestet werden. Zudem besteht kein Limit für

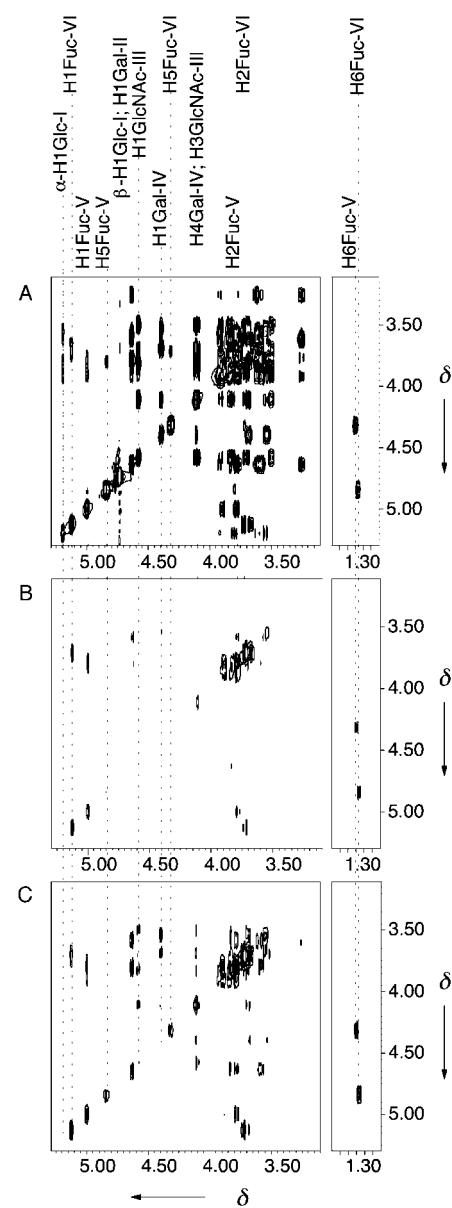


Abbildung 5. Beispiel für die Bestimmung eines Bindungsepitops mit der STD-Methode. A) TOCSY-Spektrum von **1** ohne Protein. B) STD-TOCSY-Spektrum von **1** in Gegenwart des fucosespezifischen Lektins AAA (10 μ M Bindungsplätze). Dieses Spektrum enthält nur die sehr intensiven Signale von Fuc-V und Fuc-VI. C) Spektrum wie in (B), aber mit Konturlinien auch für geringere Intensitäten. Hier sind zusätzlich zu den Fuc-Kreuzsignalen Signale der weniger gesättigten Reste Gal-II, GlcNAc-III und Gal-IV zu sehen. Die On- ($\delta = 10$) und Off-resonance-Spektren ($\delta = 30$) wurden bei 300 K mit je 200 t_1 -Inkrementen und 40 Transienten aufgenommen.

die Größe des Proteins. Die Empfindlichkeit steigt sogar mit der Größe des Proteins, da intra- und intermolekularer Sättigungstransfer effizienter werden. Anders als die Bestimmung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie (SAR by NMR^[3]) ermöglicht diese Methode keine Aussagen über die Bindungsstelle des Proteins. Dagegen sollte sie sich auch für fest bindende Liganden eignen, obwohl der absolute Effekt kleiner als bei Molekülen mit hohen Wechselzahlen sein wird, da weniger Moleküle gesättigt und in Lösung gebracht werden. Was die STD-

Methode besonders attraktiv macht, ist die Tatsache, daß fast alle 1D- und nD-NMR-Experimente für sie modifiziert werden können. Dazu gehören unter anderem TOCSY-, COSY-, NOESY- und invers aufgenommene ¹³C- oder ¹⁵N-NMR-Spektren.

Eingegangen am 8. Januar 1999 [Z12885]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788

Stichwörter: Bioaffinitätsstudien • Kombinatorische Chemie • Molekulare Erkennung • NMR-Spektroskopie

- [1] a) B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 705–709; b) Meyer, T. Weimar, T. Peters, DE-A 19649359 (internationale Patente wurden beantragt); b) D. Henrichsen, B. Ernst, J. L. Magnani, W. T. Wang, B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 106–110; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 98–102.
- [2] a) P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257–12261; b) A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10258–10259; c) M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8930–8931.
- [3] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531–1537.
- [4] K. Akasaka, M. Konrad, R. S. Goody, *FEBS Lett.* **1978**, *96*, 287–290.
- [5] J. D. Stoesz, A. G. Redfield, *FEBS Lett.* **1978**, *91*, 320–324.
- [6] a) K. Akasaka, *J. Magn. Reson.* **1979**, *36*, 135–140; b) L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V. Nikrad, B. H. Shah, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1727–1736.
- [7] A. Kalk, H. J. C. Berendsen, *J. Magn. Reson.* **1976**, *24*, 343–366.
- [8] Noch unveröffentlichte Daten zeigen, daß die STD-Methode selbst dann Ergebnisse liefern kann, wenn die Transfer-NOE-Methode versagt: Die Wechselwirkung eines komplexen diantennären Decasaccharids mit *Ricinus-communis*-Agglutinin-120 wurde mit der STD-Methode untersucht. Die Dissoziationskonstante K_D dieses Liganden beträgt nach Biacore-Messungen 8.16×10^{-9} (Y. Shinohara, H. Sota, F. Kim, M. Shimizu, M. Gotoh, M. Totsu, Y. Hasegawa, *J. Biochem.* **1995**, *117*, 1076–1082).
- [9] a) C. S. Wright, G. E. Kellogg, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1466–1476; b) J. L. Asensio, F. J. Cañada, M. Bruix, C. González, N. Khiar, A. Rodríguez-Romero, J. Jiménez-Barbero, *Glycobiology* **1998**, *8*, 569–577; c) C. S. Wright, *J. Mol. Biol.* **1984**, *178*, 91–104; d) K. A. Kronis, J. P. Carver, *Biochemistry* **1985**, *24*, 826–833; e) K. A. Kronis, J. P. Carver, *Biochemistry* **1985**, *24*, 834–840; f) K. A. Kronis, J. P. Carver, *Biochemistry* **1982**, *21*, 3050–3057.
- [10] Alle NMR-Experimente wurden auf einem Bruker-Avance-DRX-500-MHz-Spektrometer mit einem inversen 5-mm-TXI-Probenkopf aufgenommen. Die Proben lagen in 500 μ L 99.9proz. D₂O vor. Die STD-Methode funktioniert jedoch mit Proben in H₂O gleich gut (siehe Lit. [12]). Die 1D-NMR-Spektren wurden vor der Fourier-Transformation mit einer exponentiellen Linienverbreiterungsfunktion von 3 Hz multipliziert. Die Einstrahlstärke betrug bei allen Experimenten ca. 0.2 W.
- [11] a) P. Casas, C. A. Bush, *Biopolymers* **1990**, *30*, 1123–1138; b) H. Debray, J. Montreuil, *Carbohydr. Res.* **1989**, *185*, 15–26; c) T. Weimar, T. Peters, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 79–82; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 88–91; d) F. Fukumori, N. Takeuchi, T. Hagiwara, H. Ohbayashi, T. Endo, N. Kochibe, Y. Nagata, A. Kobata, *J. Biochem.* **1990**, *107*, 190–196.
- [12] Zur Bestimmung des Bindungseptops von Peptiden und Glycopeptiden, die an den monoklonalen Antikörper SM3 binden, siehe: H. Möller, N. Öztürk, J. Taylor-Papadimitriou, H. Paulsen, B. Meyer, unveröffentlichte Ergebnisse.

Eine aus der Lösung zugängliche neue Kristallstruktur von Cobalt**

Dmitry P. Dinega und Moungi G. Bawendi*

Seit langem sind zwei Kristallstrukturen von Cobalt bekannt – hexagonal dicht gepackt (hcp) und kubisch flächenzentriert (fcc). Beide Phasen können bei Raumtemperatur koexistieren, doch thermodynamisch ist die fcc-Struktur oberhalb von 450 °C und die hcp-Phase bei niedrigeren Temperaturen bevorzugt.^[1] Bei kleinen Partikeln allerdings scheint die fcc-Struktur selbst unterhalb von Raumtemperatur energetisch günstiger zu sein.^[2] Über die Existenz von fcc- und hcp-Cobalt hatte erstmals Hull 1921^[3] berichtet. Er hatte die Pulverbeugungsdiagramme von metallischen Proben analysiert, die auf verschiedenen Wegen hergestellt worden waren. Krainer und Robitsch^[4] beobachteten neue Linien in Beugungsdiagrammen von Proben, die durch Funkenabrieb an der Oberfläche von massivem Cobalt erhalten worden waren. Die zugehörige Struktur konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Kajiwara et al.^[5] beschrieben einige neue Linien in den Beugungsdiagrammen von Cobalt-Nanoclustern, die sie durch Plasmaverdampfung und nachfolgende Kondensation des Metalls hergestellt hatten. Diese Linien ordneten sie aber einer zu den beiden bekannten Strukturen polymorphen Form zu. Über ähnliche Ergebnisse berichteten Leslie-Pelecky et al.^[6] für Cobaltteilchen, die durch Reduktion eines Cobalsalzes in Lösung mit Lithiummetall erhalten worden waren. Eine neuere Veröffentlichung von Respaud et al.^[7] lieferte einige Hinweise auf eine neue Struktur von Cobalt in kleinen Cobaltclustern, die durch Zersetzung von Organometallvorstufen erhalten worden waren; die Struktur wurde jedoch nicht bestimmt. Wir beschreiben nun die Identifizierung einer neuen stabilen Struktur von elementarem Cobalt.

Die fcc- und hcp-Cobaltphasen sind dichtgepackte Strukturen, die sich lediglich in der Stapelabfolge ihrer Atomsschichten längs der 111-Richtung unterscheiden. Wegen der niedrigen Aktivierungsenergie für die Bildung von Stapelfehlern entstehen beide Phasen oft nebeneinander, wenn bei hohen Temperaturen gearbeitet wird, z. B. bei der Kristallisation aus der Schmelze und der Kondensation nach Verdampfung. Dagegen liefern Verfahren in Lösung bei niedriger Temperatur oft ausschließlich eine Cobaltphase.

Wir haben die thermische Zersetzung von Octacarbonyldicobalt in Lösung in Gegenwart von Trioctylphosphinoxid (TOPO) als koordinierendem Liganden genutzt, um Cobalt-Nanocluster zu synthetisieren. Dies ist ein „sauberer“ Syntheseweg, weil elementares Cobalt das einzige nichtflüchtige Produkt der Reaktion ist: $[Co_2(CO)_8] \rightarrow 2Co + 8CO$. Das

[*] Prof. M. G. Bawendi, D. P. Dinega

Department of Chemistry and Center for Materials Science and Engineering
Massachusetts Institute of Technology
Cambridge MA 02139 (USA)
Fax: (+1) 617-253-7030
E-mail: mgb@mit.edu

[**] Diese Arbeit wurde durch das Programm NSF-MRSEC (NSF-DMR-94-00334) unterstützt. Wir möchten Dr. Joseph Adario für seine Hilfe bei den Röntgenbeugungsexperimenten sowie Prof. Christopher Cummins und Dr. Christopher Murray für hilfreiche Diskussionen danken.