

- 114, 9701; c) S. Paliwal, S. Geib, C. S. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4497.
- [8] G. Jones, B. J. Chapman, *Synthesis* **1995**, 475, zit. Lit.
- [9] D. Adam, P. Schuhmacher, J. Simmerer, L. Häussling, K. Siemensmeyer, K. Etzbach, H. Ringsdorf, D. Haarer, *Nature* **1994**, *371*, 141.
- [10] M. Luhmer, K. Batrik, A. Dejaegere, P. Bovy, J. Reisse, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1994**, *131*, 603.
- [11] J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303.
- [12] V. Ramamurthy, D. F. Eaton, *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1128.
- [13] T. Dahl, *Acta Chem. Scand.* **1994**, *48*, 95.
- [14] A. P. West, Jr., S. Mecozzi, D. A. Dougherty, *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 347.
- [15] C. R. Patrick, G. S. Prosser, *Nature* **1960**, *187*, 1021.
- [16] a) G. W. Coates, A. R. Dunn, L. M. Henling, D. A. Dougherty, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 290; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 248; b) G. W. Coates, A. R. Dunn, L. M. Henling, J. W. Ziller, E. B. Lobkovsky, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3641.
- [17] F. Cozzi, F. Ponzini, R. Annunziata, M. Cinquini, J. S. Siegel, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1092; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1019.
- [18] J. H. Williams, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 593.
- [19] T. Dahl, *Acta Chem. Scand.* **1988**, *42*, 1, zit. Lit.
- [20] a) J. Hernández-Trujillo, M. Costas, A. Vela, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1993**, *89*, 2441; b) J. H. Williams, J. K. Cockcroft, A. N. Fitch, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1666; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1655; c) J. Vrbancich, L. D. Ritchie, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1980**, *76*, 648; d) J. M. Steed, T. A. Dixon, W. Klemperer, *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 4940; e) R. E. Gillard, J. F. Stoddart, A. J. P. White, B. J. Williams, D. J. Williams, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4504.
- [21] a) V. B. Smith, A. G. Massey, *Tetrahedron* **1969**, *25*, 5495; b) M. B. Hursthouse, V. B. Smith, *J. Fluorine Chem.* **1977**, *10*, 145.
- [22] Eine allgemeine Übersicht über die Stabilisierung von Flüssigkristallen durch Donor-Acceptor-Wechselwirkungen: a) K. Praefcke, J. D. Holbrey, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1996**, *24*, 19; b) D. Demus, J. Goodby, G. W. Gray, H.-W. Spiess, V. Vill, *Handbook of Liquid Crystals Vol. 2 B*, WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, zit. Lit.
- [23] Beispiele zur Phasentabilisierung in kalamitischen Flüssigkristallen: a) G. Pelzl, D. Demus, H. Sackmann, *Z. Phys. Chem.* **1968**, *238*, 22; b) N. Homura, Y. Matsunaga, M. Suzuki, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1985**, *131*, 273; c) W. H. De Jeu, L. Longa, *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 6410.
- [24] Beispiele zur Stabilisierung von Mesophasen mit Trinitrofluorenenen: a) H. Ringsdorf, R. Wüstefeld, E. Zerta, M. Ebert, J. H. Wendorff, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 934; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 914; b) K. Praefcke, D. Singer, B. Kohne, M. Ebert, A. Liebmam, J. H. Wendorff, *Liq. Cryst.* **1991**, *10*, 147; c) R. Lunkwitz, B. Neumann, C. Tschierske, *Liq. Cryst.* **1998**, *25*, 403.
- [25] a) Kristallstrukturdaten für die Triphenylen-Perfluortriphenylen-Cokristalle (Einkristall aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\text{C}_{18}\text{H}_6\text{F}_6$ ,  $M_r = 336.23$ , Kristallabmessungen  $0.4 \times 0.2 \times 0.05$  mm, monoklin, Raumgruppe  $C2/c$ ,  $a = 7.3899(7)$ ,  $b = 20.9871(19)$ ,  $c = 16.9977(15)$  Å,  $\beta = 95.255(1)^\circ$ ,  $V = 2625.1(4)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 8$ ,  $\rho_{\text{ber}} = 1.701$  g cm<sup>-3</sup>,  $2\theta_{\text{max}} = 43.92^\circ$ , SMART-Diffraktometer ( $\text{MoK}\alpha$ -Strahlung,  $\lambda = 0.71073$  Å, Graphitmonochromator),  $\omega$ -Scans,  $T = 295(2)$  K, 4971 gemessene Reflexe, davon wurden 1603 in der Verfeinerung verwendet, Lorentz- und Polarisationskorrektur,  $\mu = 1.58$  cm<sup>-1</sup>, Strukturlösung und -verfeinerung: Direkte Methoden (SHELXS-97), Volle-Matrix-kleinste-Fehlerquadrate-Verfeinerung gegen  $F^2$  (SHELXL-97). 241 Parameter. Wasserstoffatome wurden isotrop verfeinert.  $R = 0.044$  mit  $F_o^2 > 2\sigma(F_o^2)$ ,  $R = 0.0685$  mit  $F_o^2 > 0$ ,  $wR = 0.1101$ , max./min. Restelektronendichte  $0.164/-0.229$  e Å<sup>-3</sup>. b) Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Struktur wurden als „supplementary publication no. CCDC-120572“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44)1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk). c) In diesem Falle ist der Neigungswinkel definiert als die End-zu-End-Krümmung zwischen dem zentralen und einem äußeren Ring, welche von der  $C_2$ -Achse des Moleküls halbiert werden. Wir haben festgestellt, daß verschiedene Softwareprogramme geringfügig unterschiedliche Werte für diese Diederwinkel ergaben.
- [26] Einführung von Chiralität in hexagonale diskotische Flüssigkristalle: a) K. Praefcke, A. Eckert, D. Blunk, *Liq. Cryst.* **1997**, *22*, 757; b) N. Boden, R. J. Bushby, A. N. Cammidge, G. Headdock, *J. Mater. Chem.* **1997**, *7*, 601; c) K. Praefcke, A. Eckert, D. Blunk, *Liq. Cryst.* **1997**, *22*, 113. Zur Einführung permanenter Chiralität in Perfluortriphenylen müßte man dieses chemisch so modifizieren, daß die schnelle Inversion zwischen den Stereoisomeren verhindert wird.
- [27] Synthese von **1**: a) P. G. Schouten, J. F. Van der Pol, J. W. Zwikker, W. Drenth, S. J. Picken, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1991**, *195*, 291; b) N. Boden, R. C. Borner, R. J. Bushby, A. N. Cammidge, M. V. Jesudason, *Liq. Cryst.* **1993**, *15*, 851.
- [28] Synthese von **2**: a) M. B. Hursthouse, V. B. Smith, *J. Fluorine Chem.* **1977**, *10*, 145; b) C. S. Frampton, D. D. MacNicol, S. J. Rowan, *J. Mol. Struct.* **1997**, *405*, 169.
- [29] Übersicht über bei Ring-Öffnungs-Metathese-Polymerisationen verwendeten Katalysatoren und Monomeren: K. J. Ivin, *Olefin Metathesis*, Academic Press, London, **1996**.
- [30] Eine detaillierte experimentelle Beschreibung der Synthese von **3** wird an andere Stelle publiziert werden.
- [31] Bedauerlicherweise war wegen der unzureichenden Größe der Einkristalle der 1:1-Komplexe keine Röntgenstrukturanalyse möglich.
- [32] Die kalorimetrischen Untersuchungen wurden mit einem Perkin-Elmer-DSC-7-Gerät mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 10 Grad min<sup>-1</sup> vorgenommen. Die gelpermeationschromatographischen Analysen wurden mit einem HPLC-System bestehend aus einer Altex-Pumpe, Modell 110A, einem Rheodyne-Modell-7125-Injektor mit einer 100-µL-Schleife, einem Knauer-Differentialrefraktometer und zwei American-Polymer-Standards-10-Mikron-Mischbett-Säulen durchgeführt. Die Molekulargewichte und Polydispersitätsindizes wurden gegen monodisperse Polystyrolstandards vermessen. Die mikroskopischen Bilder der Texturen wurden mit einem Zeiss-Universal-Polarisationsmikroskop mit aufgesetzter Minolatte-Kamera aufgenommen. Die pulverröntgenographischen Untersuchungen wurden mit einem Gerät der Firma SCINTAC Inc. (USA), Modell XDS-2000, mit einer Hochtemperatureinheit aufgenommen.
- [33] Triphenylen **1** weist hexagonales diskotisches flüssigkristallines Mesophasenverhalten auf. Polarisationsmikroskopische Aufnahmen zeigen fächerförmige Texturen beim Abkühlen aus der isotropen Schmelze, die für eine hexagonale diskotische Anordnung der Mesogene charakteristisch sind.
- [34] Wäre eine Phasentrennung beim Mischen aufgetreten, würde man die für die Reinsubstanzen charakteristischen Signale detektieren.
- [35] Ein geringer Überschuß einer Substanz kann mittels DSC nachgewiesen werden. Man würde die für die Reinsubstanz charakteristischen Signale detektieren.

## Enzymatische Regeneration von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat mit Aryl-Sulfotransferase zur präparativen enzymatischen Synthese von sulfatierten Kohlenhydraten

Michael D. Burkart, Masayuki Izumi und Chi-Huey Wong\*

Sulfotransferasen umfassen eine Familie von Enzymen, die den Transfer einer Sulfogruppe ( $-\text{SO}_3^-$ ) vom Cofaktor 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) **1** auf ein Acceptor-

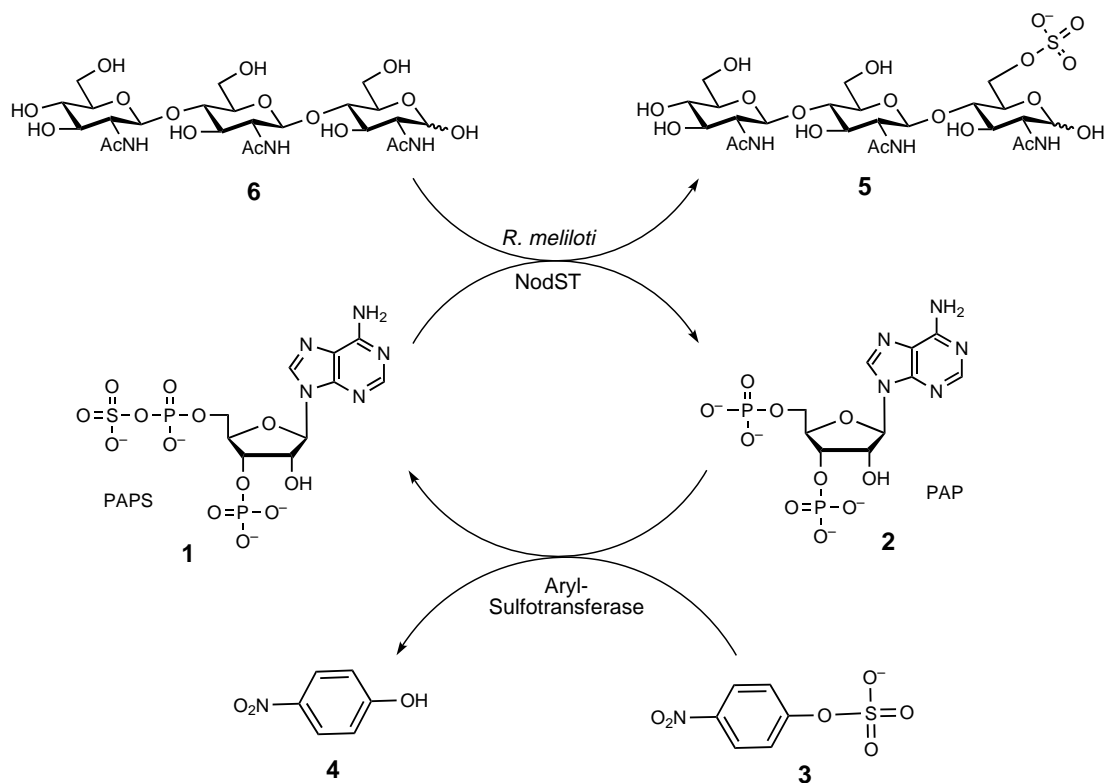
[\*] Prof. C.-H. Wong, M. D. Burkart, M. Izumi  
Department of Chemistry  
and  
The Skaggs Institute for Chemical Biology  
The Scripps Research Institute  
10550 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037 (USA)  
Fax: (+1) 858-784-2409  
E-mail: wong@scripps.edu

molekül katalysieren. Sulfotransferasen vermitteln die Sulfatierung verschiedener Klassen von Substraten, wie Kohlenhydraten, Proteinen und Steroiden, bei einer großen Zahl biologischer Prozesse einschließlich der Signaltransduktion und der Modulation der Rezeptorbindung.<sup>[1, 2]</sup> Innerhalb der letzten drei Jahre wurden viele neue Sulfotransferasen identifiziert und kloniert.<sup>[3]</sup> Eine einfache Methode zur Herstellung großer Mengen sulfatierter Verbindungen und effiziente Assays für Sulfotransferasen sind essentiell für die biologische Evaluierung dieser Enzyme und ihrer sulfatierten Produkte.

PAPS, der universelle Sulfatdonor und die Sulfatquelle für alle Sulfotransferasen, ist eine sehr teure und instabile Verbindung, was bei der Herstellung großer Mengen enzymatisch sulfatierter Produkte ein Hindernis darstellt.<sup>[4]</sup> Auch die Produktinhibition durch Adenosin-3',5'-diphosphat (PAP) 2 ist ein limitierender Faktor bei Anwendungen im größeren Maßstab.<sup>[5, 6]</sup> Wir haben über die erste enzymatische Regeneration von PAPS mit einem Multienzymsystem, das mit *Rhizobium*-Nod-Faktor-Sulfotransferase (NodST) gekoppelt ist, für die enzymatische Synthese von *N,N'*-Diacetylchitobiose-6-sulfat berichtet.<sup>[6]</sup> Während in diesem Regenerationssystem die verwendeten klonierten Enzyme als einfache und effiziente Katalysatoren dienen, um PAPS in großem Maßstab zu synthetisieren, haben wir nun ein einfacheres Regenerationssystem mit nur einem Enzym entwickelt, in dem eine rekombinante Aryl-Sulfotransferase IV (AST IV) aus Rattenleber eingesetzt wird (Schema 1). Dieses Enzym transferiert in Verbindung mit einer weiteren, beliebigen Sulfotransferase die Sulfogruppe von *p*-Nitrophenylsulfat 3 auf PAP.<sup>[7]</sup> Dieses System verhindert die Produktinhibition durch PAP während der Regeneration von PAPS in situ, und

die Umsetzung kann durch die Messung der Absorption von freigesetztem *p*-Nitrophenol 4 bei 400 nm quantitativ verfolgt werden. Hinzu kommt, daß dieses Regenerationssystem so modifiziert werden kann, daß es als kontinuierlicher spektrophotometrischer Assay für die Aktivität von Sulfotransferasen dient. Der gebräuchlichste Assay für die Aktivität von Sulfotransferasen beinhaltet die Verfolgung des Transfers radioaktiv markierten Sulfats von [<sup>35</sup>S]PAPS auf das Produkt mit Dünnschicht- oder Papierchromatographie unter Verwendung von Endpunkt-Methoden.<sup>[8]</sup> Diese Assays sind teuer und häufig ungenau.<sup>[9]</sup> Wir demonstrieren hier die Verwendung des Mono-Enzym-PAPS-Regenerationssystems bei der Synthese von *N,N',N''*-Triacetylchitotriose-6-sulfat 5 und für einen kontinuierlichen, kolorimetrischen gekoppelten Enzymassay von NodST, der zur Bestimmung der Substratspezifität dieses Enzyms verwendet wird.

Das Enzym AST IV existiert in zwei Formen mit unterschiedlichem Oxidationszustand,<sup>[10, 11]</sup> die sehr leicht voneinander getrennt werden können. Die isolierte physiologisch relevante Form kann verwendet werden, um picomolare Mengen von PAPS und PAP nachzuweisen.<sup>[12]</sup> Da die bakterielle Expression der Ratten-AST IV bereits erfolgreich durchgeführt wurde,<sup>[13, 14]</sup> haben wir AST IV aus einer Rattenleber-cDNA-Bibliothek kloniert und das Enzym in *Escherichia coli* überexprimiert. Um die reine  $\beta$ -Form des Enzyms, in der PAP nicht im aktiven Zentrum gebunden ist, zu erhalten, wurde mit dem Gemisch beider Enzymformen eine einfache Reinigung durch Nickel-Agarose-Chromatographie durchgeführt. Das Nickel-Harz mit dem daran gebundenen Enzym wurde vor der Elution des Enzyms mit Alkalischer Phosphatase und  $\beta$ -Mercaptoethanol (BME) inkubiert. Das



Schema 1. Regeneration von PAPS mit rekombinanter Aryl-Sulfotransferase IV und *p*-Nitrophenylsulfat.

gereinigte Enzym stand dann sofort für die PAPS-Regeneration zur Verfügung. Um zu unterscheiden, ob AST IV wirklich in der Lage ist, PAPS aus PAP und *p*-Nitrophenylsulfat zu bilden, und nicht etwa eine einfache Hydrolyse des *p*-Nitrophenylsulfats stattfindet, wurde eine Kapillarzonen-Elektrophorese (capillary zone electrophoresis, CZE) durchgeführt, mit der die Bildung von PAPS aus PAP bestätigt wurde.

Bei der mit einer Ausbeute von 58 % verlaufenden Synthese von *N,N',N''*-Triacetylchitotriose-6-sulfat (207 mg) wurde käufliches NodST und die  $\beta$ -Form von AST IV mit 0.05 Äquivalenten PAP und 2.0 Äquivalenten *p*-Nitrophenylsulfat verwendet. Die Struktur der Verbindung wurde durch Untersuchungen mit Elektrospray-Ionisations(ESI)-MS, HPLC und NMR-Spektroskopie bestätigt. Die gleiche Arbeitsvorschrift wurde bei der Synthese von *N,N',N'',N'''*-Tetraacetylchitotetraose-6-sulfat (150 mg) verwendet (Ausbeute 95 %).

Der kontinuierliche Assay für die kinetische Analyse von Sulfotransferasen gleicht der Methode für den größeren Maßstab mit der Ausnahme, daß PAPS anstelle von PAP der Reaktion hinzugefügt wird, weil das Ziel des Assays die kontinuierliche Messung der PAP-Produktion beinhaltet. Der Assay verwendet die oben beschriebene  $\beta$ -Form von AST IV. Um die Anwendung dieses Assays bei der Bestimmung kinetischer Parameter des Enzyms zu demonstrieren, wurde *N,N',N''*-Triacetylchitotriose in Konzentrationen von 10, 25, 50, 100, 250 und 500  $\mu\text{M}$  als Substrat verwendet. Die Daten wurden mit dem Programm LineWeaver,<sup>[15]</sup> das nichtlineare Verfahren und die Methode der kleinsten Fehlerquadrate verwendet, an die Michaelis-Menten-Gleichung angepaßt ( $K_M = 103 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 27.5 \text{ min}^{-1}$ ; Abbildung 1). Es wurden ebenfalls Experimente zur Spezifität des Acceptorzuckers durchgeführt, um die Substratspezifität von NodST mit diesem Assay zu untersuchen. Tabelle 1 enthält die Daten für verschiedene *N*-Acetylchitosen, *N*-Acetylactosamin (LacNAc) und ein *N*-Acetylactosamin-Dimer (Gal( $\beta$ 1-4)-GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc).<sup>[16]</sup> Es ist nicht überraschend, daß *N,N',N'',N'''*-Tetraacetylchitotetraose das beste Substrat war ( $k_{\text{cat}} = 19.7 \text{ min}^{-1}$ ,  $K_M = 20.4 \mu\text{M}$ ), weil es dem natürlichen Substrat am ähnlichsten ist.<sup>[17]</sup> Von besonderem Interesse ist die um den Faktor 60 erhöhte Acceptorspezifität beim Übergang von LacNAc zum LacNAc-Dimer.

Diese neue enzymatische Regeneration von PAPS bietet Vorteile bei der praktischen Anwendung im Vergleich zu bereits bestehenden Methoden für die Synthese von Kohlenhydratsulfaten und die kinetische Analyse von Sulfotransfe-

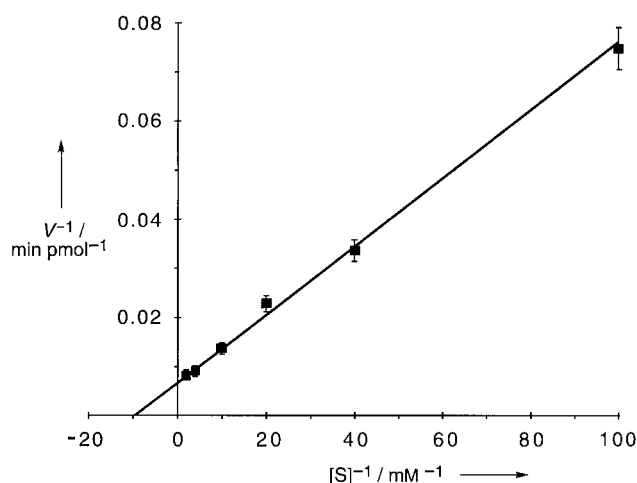


Abbildung 1. Lineweaver-Burke-Auftragung der kinetischen Daten für die Umsetzung von *N,N',N''*-Triacetylchitotriose mit NodST.  $K_M = 20.4 \pm 3.6 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 19.7 \pm 0.8 \text{ min}^{-1}$ .

rasen. Dieses Regenerationssystem sollte auch für andere Sulfotransferasen von genereller Anwendbarkeit sein.

### Experimentelles

Die Kapillarzonen-Elektrophorese wurde mit einem BioRad-3000-Gerät mit einer beschichteten Kapillare (50 cm, 50  $\mu\text{m}$  Innendurchmesser) und mit einer Lösung von 0.23 M Borat in Laufpuffer (pH 7.8) durchgeführt. Die Probe wurde mit einem Druck von 138  $\text{kPa s}^{-1}$  injiziert, die Elektrophorese wurde mit 20.0 kV (– nach +) bei 20 °C durchgeführt, Detektion bei 260 nm. PAPS wird nach 5.53 min, PAP nach 5.98 min detektiert.

Das AST-IV-Gen wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) wie beschrieben<sup>[11]</sup> aus einem cDNA-Bibliothek-Templat (zur Verfügung gestellt von W. E. Balch, The Scripps Research Institute) erhalten. Die DNA des Klons, die eine konstruierte *NdeI*-Schnittstelle vor dem codierenden Bereich am 5'-Ende und eine *BamHI*-Schnittstelle nach dem 3'-Stop-Codon enthält, wurde mit *BamHI* und *NdeI* gespalten und mit einem auf entsprechende Weise gespaltenen pET19b-Vektor (Novagen, Madison, WI) ligiert. Das rekombinante Plasmid wurde zur Amplifikation in *E. coli*-SURE-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA) transformiert. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) wurde mit dem amplifizierten Plasmid transformiert, und eine einzelne Kolonie wurde zum Beimpfen von 100 mL Luria-Bertani (LB)-Medium, das 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  Ampicillin enthielt, verwendet. Nach Wachstum über Nacht bei 37 °C wurde die Kultur auf vier Volumen von 1 L LB mit Ampicillin verteilt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm ( $\text{OD}_{600}$ ) von 1.0 geschüttelt. Die Kulturen wurden mit 50  $\mu\text{M}$  Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert, 20 h bei 25 °C geschüttelt und dann zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; pH 7.6) mit

Tabelle 1. Acceptorspezifität von NodST.<sup>[a]</sup>

Acceptorsubstrat	$K_M [\mu\text{M}]^{\text{[b]}}$	$k_{\text{cat}} [\text{min}^{-1}]$
GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc	$243 \pm 40$	$23.6 \pm 1.7$
GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc	$103 \pm 12$	$27.5 \pm 2.9$
GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc	$20.4 \pm 3.6$	$19.7 \pm 0.8$
GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc	$98.1 \pm 12.4$	$25.9 \pm 1.2$
GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-4)GlcNAc	$45.7 \pm 6.0$	$22.7 \pm 1.0$
Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc	$> 5000$	$8.0 \pm 1.3$
Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc( $\beta$ 1-3)Gal( $\beta$ 1-4)GlcNAc	$87.0 \pm 6.3$	$3.4 \pm 0.1$

[a] Die Konzentrationen der Acceptor-Kohlenhydrate wurden im Bereich ihrer jeweiligen  $K_M$ -Werte ausgewählt. Die PAPS-Konzentration wurde konstant bei 20  $\mu\text{M}$  gehalten. Die kinetischen Konstanten wurden aus der nichtlinearen Anpassung der Michaelis-Menten-Gleichung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit dem Programm LineWeaver erhalten. [b] Scheinbare kinetische Werte.

5 mM 2-Mercaptoethanol (BME) suspendiert und durch Druckentspannung mit einer French Press aufgeschlossen. Der so erhaltene Überstand wurde auf eine Nickel-Agarose-Säule aufgetragen und mit einer Lösung aus 100 mM Tris (pH 7.6), 5 mM BME, 300 mM NaCl, 5 % Glycerin und 20 mM Imidazol gewaschen. Dann wurde die Säule mit einer Lösung aus 100 mM Tris (pH 9.0), 50 mM NaCl und 5 mM BME äquilibriert. Alkalische Phosphatase (500 U) wurde hinzugefügt und das Säulenmaterial bei 20 °C 15 h inkubiert. Nachdem das Säulenmaterial wie oben beschrieben gewaschen worden war, wurde die  $\beta$ -Form von AST IV mit einer Lösung aus 100 mM Tris (pH 7.6) und 250 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die Dialyse gegen 100 mM Tris (pH 7.6), Aufkonzentrieren und Verdünnen bis zu einem Glyceringehalt von 50 % lieferte 14 mL einer Stammlösung mit 63 U Enzym ( $4.5 \text{ U mL}^{-1}$ ). Eine Einheit (U) ist definiert als der Umsatz von 1  $\mu\text{mol}$  PAP mit *p*-Nitrophenylsulfat zu PAPS pro Minute bei pH 7.0 und 25 °C.

5: *N,N',N''*-Triacetylchitotriose (314 mg, 500  $\mu\text{mol}$ ) wurde in 100 mL einer Lösung von Bis[tris(hydroxymethyl)methylaminopropan]-hydrochlorid (Bis-Tris-Propan-HCl) (100 mM, pH 7.0), 5 mM Dithiothreitol, 10 mM *p*-Nitrophenylsulfat, 11 mg PAP (25  $\mu\text{mol}$ ), 8.4 U NodST (Calbiochem, La Jolla, CA) und 18 U  $\beta$ -AST IV bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bildung von *N,N',N''*-Triacetylchitotriose-6-sulfat wurde durch Dünnschichtchromatographie (*n*-Propanol/30 proz.  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ , 7:1:2) und die Freisetzung von *p*-Nitrophenol durch Messung der Absorption bei 400 nm verfolgt. Nach drei Tagen wurde die Lösung an LiChroPrep 18 (Wasser) chromatographiert. Das Filtrat wurde auf eine BioRad-AG1-X8-Säule ( $\text{HCO}_2^-$ -Form) aufgetragen und mit einem linearen Ammoniumbenzolsulfonat-Gradienten (0  $\rightarrow$  0.1 M) eluiert. Die Fraktionen, die *N,N',N''*-Triacetylchitotriose-6-sulfat enthielten, wurden konzentriert und durch Gelfiltration (BioGel P-2, Wasser) gereinigt, wobei 207 mg (290  $\mu\text{mol}$ , 58 %) *N,N',N''*-Triacetylchitotriose-6-sulfat erhalten wurden. Positiv-Ionen-ESI-MS:  $m/z$ : *N,N',N''*-Triacetylchitotriose-6-sulfat 730 [ $\text{M}+\text{Na}^+$ ], Zersetzungsprodukte: *N,N',N''*-Triacetylchitotriose 628 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ], 1-Desoxy-*N,N'*-diacetylchitobiose 407 [ $\text{M}^+$ ], 1-Desoxy-*N*-acetylglucosamin 204 [ $\text{M}^+$ ] (zum Vergleich siehe die originale Nod-Signal-Charakterisierung in Lit. [18]); HPLC (Spherisorb-S5-SAX-Säule (Waters;  $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ), linearer Gradient von 0.2  $\rightarrow$  1.0 M NaCl in 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.5) über 5 min, Flußgeschwindigkeit  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ , Detektion bei 220 nm): Zwei Peaks (4.12, 4.37 min) sind signifikant für das  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Anomer (bezogen auf das reduzierende Ende);  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 4.25 (br., 0.4 H,  $J$  = 10.3 Hz, H6a $\beta$ ), 4.20 (dd, 0.6 H,  $J$  = 1.8, 11.0 Hz, H6a $\alpha$ ), 4.16 (dd, 0.6 H,  $J$  = 3.7, 11.0 Hz, H6b $\alpha$ ), 4.12 (dd, 0.4 H,  $J$  = 3.7, 9.6 Hz, H6b $\beta$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  = 67.04 (C6 $\alpha$ ), 66.97 (C6 $\beta$ ).

NodST-Assay: Eine Lösung mit 100 mM Bis-Tris-Propan-HCl (pH 7.0), 5 mM BME, 20  $\mu\text{M}$  PAPS, 2 mM *p*-Nitrophenylsulfat, 3.0 mU NodST, 6.4 mU  $\beta$ -AST IV und dem Substrat werden in einem Volumen von 500  $\mu\text{L}$  vorgelegt. Da käufliches PAPS signifikante Mengen von PAP enthält, wurde die Assay-Lösung vor dem Hinzufügen des Substrats 30 min bei 20 °C inkubiert. Die Freisetzung von *p*-Nitrophenol wird bei 400 nm über 10 min verfolgt.

Eingegangen am 26. April 1999 [Z13317]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2747–2750

**Stichwörter:** Cofaktoren • Enzymkatalyse • Kohlenhydrate • Sulfotransferasen • Synthesemethoden

22577; k) K. Yoshinari, K. Nagata, Y. Yamazoe, *J. Biochem.* **1998**, 123, 740.

- [4] PAPS ist bei Sigma Co. erhältlich (45.30 US-\$ pro mg). Die Halbwertszeit von PAPS in wäßriger Lösung bei pH 8.0 beträgt ca. 20 h.
- [5] Für die Inhibition von Hydroxysteroid-Sulfotransferase durch PAP wurde eine Hemmkonstante  $K_i = 14 \mu\text{M}$  bestimmt. Siehe auch: C. J. Marcus, R. D. Sekura, W. B. Jakoby, *Anal. Biochem.* **1980**, 107, 296.
- [6] C.-H. Lin, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8031.
- [7] *p*-Nitrophenylsulfat ist bei Sigma Co. erhältlich (18.90 US-\$ pro g).
- [8] S. G. Ramaswamy, W. B. Jakoby, *Methods Enzymol.* **1987**, 143, 201–207.
- [9] [ $^{35}\text{S}$ ]PAPS ist bei NEN Life Science Products (1013 US-\$ pro 100 mCi) erhältlich. Die Halbwertszeit von  $^{35}\text{S}$  beträgt 87.1 d. Endpunktmethoden der  $^{35}\text{S}$ -Detektion auf Dünnschichtplatten beinhalten normalerweise den indirekten, qualitativen Nachweis der Radioaktivität.
- [10] a) A. D. Marshall, J. F. Darbyshire, W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 9153; A. D. Marshall, J. F. Darbyshire, W. B. Jakoby, *Chem. Biol. Interact.* **1998**, 109, 107; b) Y. S. Yang, S. W. Tsai, E. S. Lin, *Chem. Biol. Interact.* **1998**, 109, 129; c) W.-X. A. Guo, Y.-S. Yang, X. Chen, P. McPhie, W. B. Jakoby, *Chem. Biol. Interact.* **1994**, 92, 25–31; d) Y.-S. Yang, J.-J. Pan, J.-K. Hwang, *Protein Eng.* **1997**, 10, 70.
- [11] Y.-S. Yang, A. D. Marshall, P. McPhie, W.-X. A. Guo, X. Xie, X. Chen, W. B. Jakoby, *Protein Expression Purif.* **1996**, 8, 423–429.
- [12] E.-S. Lin, Y.-S. Yang, *Anal. Biochem.* **1998**, 264, 111–117.
- [13] X. Chen, Y. S. Yang, Y. Zheng, B. M. Martin, M. W. Duffel, W. B. Jakoby, *Protein Expression Purif.* **1992**, 3, 421–6.
- [14] S. Ozawa, K. Nagata, D. Gong, Y. Yamazoe, R. Kato, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 4001.
- [15] LineWeaver, ein Programm zur graphischen Auswertung von Enzymkinetik-Daten für Macintosh-Computer, wurde von Dr. Ian Ollmann, California Institute of Technology, zur Verfügung gestellt.
- [16] *N*-Acetyllactosamin-Dimer wurde freundlicherweise von Kathryn M. Koeller (Arbeitsgruppe von Prof. Wong am Scripps Research Institute) zur Verfügung gestellt.
- [17] M. Schultze, C. Staehelin, H. Rohrig, M. John, J. Schmidt, E. Kondorosi, J. Schell, A. Kondorosi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 2706–2709.
- [18] P. Lerouge, P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Promé, J. Dénarié, *Nature* **1990**, 344, 781.

## P,N-Liganden auf Prolinbasis in Palladium-katalysierten asymmetrischen $\pi$ -Allyl-Additionen\*\*

Scott R. Gilbertson\* und Dejian Xie

Die Entwicklung neuer Liganden für die asymmetrische Katalyse hat in den letzten zehn Jahren ein unglaubliches Wachstum erfahren. Eine der umfassend untersuchten Reaktionen ist die Palladium-katalysierte Addition von Nucleo-

- [1] K. G. Bowman, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **1999**, 6, R9–R22.
- [2] C. N. Falany, *FASEB J.* **1997**, 11, 1–2.
- [3] a) J.-I. Aikawa, J. D. Esko, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 2690; b) T. P. Dooley, *Chem. Biol. Interact.* **1998**, 109, 29; c) M. Fukuta, Y. Kobayashi, O. Habuchi, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1399, 57; d) H. Habuchi, M. Kobayashi, K. Kimata, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 9208; e) K. D. Mazany, T. Peng, K. J. Williams, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1407, 92; f) M. A. Nastuk, S. Davis, J. R. Fallon, *J. Neurosci.* **1998**, 18, 7167; g) E. Ong, J.-C. Yeh, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 5190; h) Y.-B. Ouyang, K. L. Moore, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 24770; i) Y. Sacki, Y. Sakakibara, M. C. Liu, *J. Biochem.* **1998**, 124, 55; j) K. Uchimura, H. Muramatsu, T. Muramatsu, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273,

[\*] Prof. S. R. Gilbertson, Dr. D. Xie  
Department of Chemistry, Washington University  
Saint Louis, MO 63130 (USA)  
Fax: (+1) 314-935-4481  
E-mail: srg@wuchem.wustl.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die National Institutes of Health (NIH; Förder-Nr. R01 GM56490-01) und die Washington University unterstützt. Für ihre Hilfe danken wir der NMR- und der MS-Abteilung der Washington University, beide gefördert von den NIH (1S10R02004 bzw. RR00954).