

Oligo-(1→2)- α -D-glucopyranosyl-(1→2)- β -D-fructofuranoside bilden kompakte Zuckerhelices**

Daniela Fischer, Eckhard Loos und Armin Geyer*

Professor Horst Kunz zum 65. Geburtstag gewidmet

Im Allgemeinen ist die Konformationsdynamik von Glucoligosacchariden wegen der niedrigen Energiebarriere der Rotation um die Glycosid-Bindung schnell. Die hier beschriebene, zuvor unbekannte Klasse von Glucanen zeigt jedoch eine Energiebarriere, die sogar zur Verbreiterung der Signale im ^1H -NMR-Spektrum führt. Diese Verbreiterung wird auf ein langsames Gleichgewicht zwischen der gefalteten Helix und einer partiell entfalteten Struktur zurückgeführt. α -D-Glucoligosaccharide und Glucane sind ubiquitäre Saccharide, die über (1→3)-, (1→4)- oder (1→6)-Bindungen verknüpft sind. Oligosaccharide fungieren nicht nur als Energiespeicher, einige von ihnen sind auch wichtige Bioprotektoren (Kryoprotektoren) von zellulären Membranen und Proteinen. Die aus *Nostoc* sp. und *N. elliposporum* isolierten Oligosaccharide erweitern diese Kohlenhydratklasse um (1→2)-verknüpfte Oligomere der α -D-Glucose mit dem höchsten bisher bekannten Polymerisationsgrad. Gegenüber den weit verbreiteten Inulinen,^[1] in denen ein Pyranosering den Terminus eines Fructanoligomers bildet, α -D-Glc(1→2)- $[\beta$ -D-Fru(1→2)]_n, haben die hier beschriebenen cyanobakteriellen Oligosaccharide eine inverse Struktur, in der ein Furanosering den Terminus einer linearen Kette von Glucopyranosen darstellt: $[\alpha$ -D-Glc(1→2)]_n- β -D-Fru. Die einzelnen Oligosaccharide konnten bis zum Decasaccharid ($n = 9$) aufgereinigt werden. Sie bilden rechtsgängige Helices mit einer sich wiederholenden Tetrasaccharid-Einheit, einem Durchmesser von 12 Å und einer Ganghöhe von 5 Å. Zwar können alle Glucane in Lösung eine helicale Struktur annehmen, aber nur die benachbarten α (1→2)-Glycosid-Bindungen induzie-

ren eine kompakte Helix, die in Gegenwart einer Fructofuranose-Kappe eine relevante Energiebarriere der Entwindung zeigt. Kojiheptaose mit einer Fructofuranose-Kappe, α -D-Glc(1→2)]₇- β -D-Fru, ist das kleinste Biopolymer, das eine NMR-spektroskopisch beobachtbare Energiebarriere für die Entwindung aufweist (^1H -NMR, 300 K, 600 MHz), was den kooperativ wirkenden, stabilisierenden Effekt der Helixkappe und der Helixganghöhe verdeutlicht. Die Sekundärstruktur dieser nativen Oligosaccharide wird bei der selektiven Hydrolyse der Fructofuranose-Kappe zerstört.

Menge und Zusammensetzung der cyanobakteriellen intrazellulären Saccharide variieren in Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen. Die Gesamtzahl der intrazellulären Kohlenhydrate der untersuchten *Nostoc*-Spezies steigt bei Veränderung des Salzgehaltes (75 mM NaCl, 2 Tage) oder der Temperatur (40 °C, 1 Tag) bis zu einem Zehnfachen des Ausgangswertes an. Speziell bei Temperaturerhöhung werden Saccharose und die Glucoligosaccharide niedrigerer Ordnung durch höhere Oligomere bis hin zu Decasacchariden ersetzt. Die Funktion dieser neuen Klasse von nichtreduzierenden Zuckern als Bioprotektoren^[2,3] ist in Lit. [4] beschrieben.

Oligo-(1→2)- α -D-glucopyranosyl-(1→2)- β -D-fructofuranoside konnten bis hin zu den Decasacchariden isoliert und charakterisiert werden, womit ihre Länge die der bisher bekannten, aus In-vitro-Synthesen^[5] oder natürlichen Vorkommen^[6] gewonnenen Koji-Oligomere übersteigt. Sie bilden eine Serie von α (1→2)-Glucanen mit einer Fructofuranose-Kappe am reduzierenden Ende.

Transglycosidische, heteronucleare $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungen dienen zur Identifizierung von α (1→2)-Verknüpfungen und zeigen, dass sich die Fructofuranose am reduzierenden Ende der α (1→2)-Glucankette befindet. Gut aufgetrennte Signale für die anomeren Protonen im ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 1) mit 3J -Kopplungskonstanten um 3.5 Hz lassen sich sogar noch für das Hexasaccharid $[\alpha$ -D-Glc(1→2)]₅- β -D-Fru beobachten.^[4] Die homo- und heteronucleare Zuordnung der NMR-Signale gelang mit einer Vollständigkeit, die für andere Glucane wegen der für Homooligomere typischen, minimalen Dispersion der ^1H -Verschiebungen bisher nicht erreicht werden können. Die anomeren Protonen der α (1→2)-verknüpften Hexasaccharide (Abbildung 1) sind um mindestens 0.1 ppm (^1H -NMR, 600 MHz) getrennt, während sich die anomeren Protonen der drei Glycosid-Verknüpfungen des α -(1→4)-Glucans Maltotetraose im ^1H -NMR-Spektrum überlagern. Die unerwartete, große Dispersion der chemischen Verschiebung rührt von der eingeschränkten konformativen Flexibilität der Reihe der Glycosid-Verknüpfungen her. Eine Helixwindung wird von vier Glucoseringen gebildet, und hydrophobe Wechselwirkungen benachbarter Helixschleifen stabilisieren die Sekundärstruktur. Die charakteristischen NOEs werden in Abbildung 2 diskutiert, und ein Modell ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Glycosid-Torsionswinkel jeder Glc α (1→2)-Glc-Disaccharideinheit der rechtsgängigen Helix nehmen Werte von ungefähr $\phi = -30^\circ$ ($\phi = \text{H1-C1-O2-C2}$) und $\psi = +30^\circ$ ($\psi = \text{C1-O2-C2-H2}$) an. Dies liegt im Minimum des Ramachandran-Diagramms eines isolierten Kojibiose-Disaccharides, dessen ϕ -Werte zwischen 0° und -60° und ψ -Werte zwischen

[*] Prof. Dr. A. Geyer
Fachbereich Chemie
Philipps-Universität Marburg
35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-28-22021
E-mail: geyer@staff.uni-marburg.de

Dr. D. Fischer
Fachbereich Chemie und Pharmazie
Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)

Dr. E. Loos
Fachbereich Biologie
Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Wir danken Edelgard Herold für die Hilfe bei der Isolierung der Oligosaccharide.

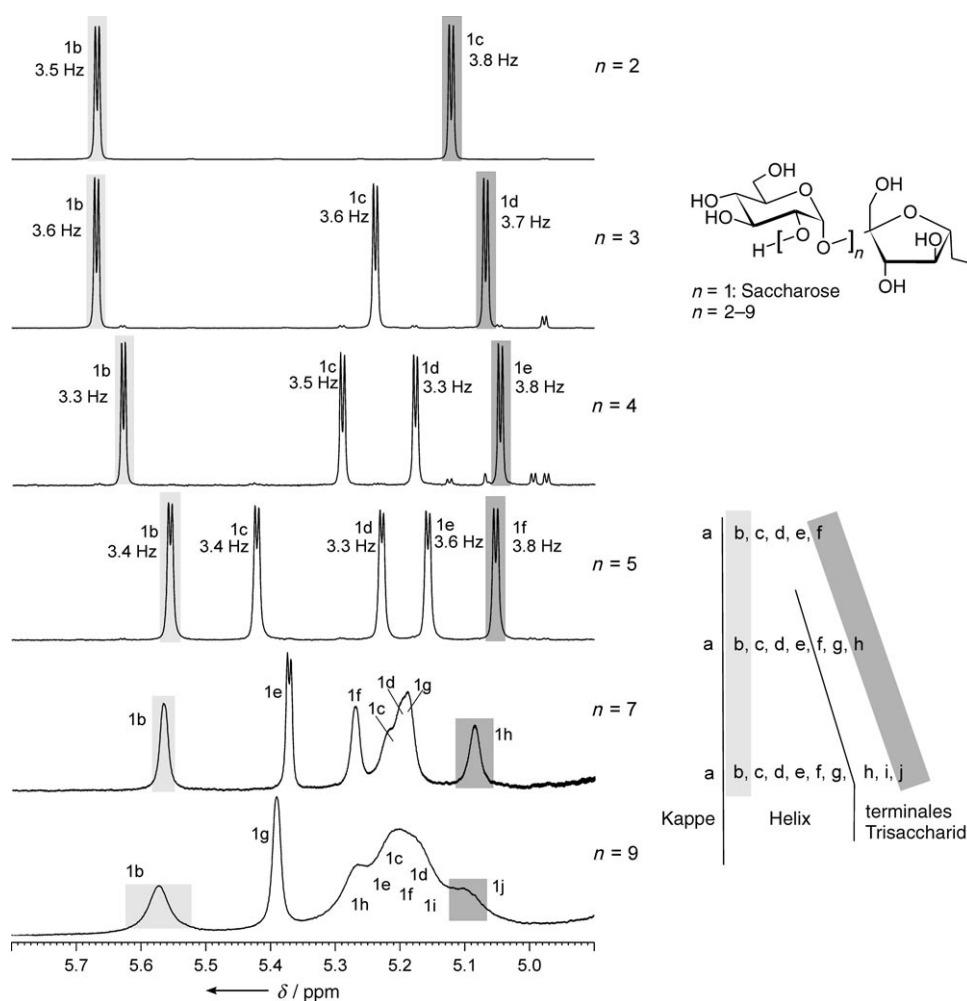


Abbildung 1. Ausschnitt aus dem Bereich der anomeren Protonen in den ^1H -NMR-Spektren (D_2O , 300 K, 600 MHz) der aus *N. ellipsoforum* isolierten α -D-Glucoligosaccharide $[\alpha\text{-D-Glc}(1\rightarrow2)]_n$ - β -D-Fru. Die Zuordnung der Signale wurde mithilfe homo- (DQF-COSY) und heteronuclearer (HMQC, HMBC) Korrelationen sowie dipolarer Wechselwirkungen (ROESY) des Octa- und Decasaccharides im schnellen Austausch (320 K) vorgenommen. In allen untersuchten Verbindungen zeigt das anomere Proton der Pyranose (b, hellgrau) ein Signal, das am weitesten tieffeldverschoben ist, wohingegen das Signal des anomeren Protons der Glucopyranose am entgegengesetzten Ende des Oligomers am weitesten hochfeldverschoben ist (dunkelgrau).

0° und $+60^\circ$ liegen.^[7] Die ϕ/ψ -Diagramme sind für längere $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucane eingeschränkter als für isolierte Kojibiose-Disaccharide, da die Grenzlinie zwischen *P*- und *M*-Helizität das Energieminimum der ϕ/ψ -Diagramme entlang einer Linie trennt, an der die Summe von ϕ und ψ -60° beträgt. Zusammen mit dem von jeder Pyranose beigetragenen $+60^\circ$ -Winkel ($\text{O}2\text{-C}2\text{-C}1\text{-O}1$) wird insgesamt eine Helizität von 0° (Ringstruktur) erhalten. In anderen Worten: Die Kombination der Glycosid-Torsionen, die von einer einzelnen $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glycosid-Bindung eingenommen wird, ist für $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucane nicht möglich; diese weichen der Ringstruktur in Richtung der benachbarten, engen helicalen Konformationen aus. Beide Helixrichtungen sind durch kleine Änderungen der Glycosid-Torsionen zugänglich, und die Präferenz für die Helixrichtung wird durch sekundäre Effekte beeinflusst. Dies können kleine strukturelle Veränderungen der $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucantermini sein, die ausreichen, um entweder eine *P*- oder eine *M*-Helix oder ein Gleichgewicht zwischen den beiden zu induzieren.

den Einfluss der Fructofuranose-Kappe auf die gesamte $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucankette. Das kooperative Zusammenbrechen der helicalen Sekundärstruktur durch Hydrolyse der Fructofuranose ist auch in den NMR-Spektren der längsten hier untersuchten Oligomere sichtbar, obwohl nur die kürzeren vollständig zugeordnet werden konnten.

Die für die größeren Octa- und Decasaccharide beobachtete Linienverbreiterung (Abbildung 1) konnte im schnellen Austausch bei 320 K nahezu aufgelöst werden, im langsamen Austausch waren die zwei Signalsätze der austauschenden Isomere allerdings nicht sichtbar. Bei 300 K sind die viertletzten anomeren Protonen (Pyranose e des Octasaccharides und Pyranose g des Decasaccharides) und das anomere Proton der terminalen Pyranose die einzigen aufgelösten anomeren Protonen. Das anomere Proton der viertletzten Pyranose zeigt eine chemische Verschiebung von 5.4 ppm, getrennt von allen anderen Signalen. Die separierte chemische Umgebung einer einzelnen Pyranose in der $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucankette wird durch unterschiedliche Sekundärstruk-

Fructofuranose ist eine Modifikation des reduzierenden Endes des Koji-Oligosaccharides. Durch Koordination an die terminale Trisaccharid-Einheit fungiert sie als eine Helixkappe (Abbildung 3, HyperChem,^[8] $n=7$). Selektive saure Hydrolyse des Ketosid-Bindung des Pentasaccharides ($n=4$) führt zu einem Zusammenbruch der Sekundärstruktur, was sich an der signifikanten Veränderung der chemischen Verschiebungen und NOEs zeigt. Die Kojitetraose $[\alpha\text{-D-Glc}(1\rightarrow2)]_4\text{OH}$ zeigt zwei getrennte Signalsätze im ^1H -NMR-Spektrum, einen für das α - und einen für das β -Anomer der reduzierenden Glucose. Beide unterscheiden sich signifikant von dem $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucan, das die Fructose-Kappe enthält; sogar das anomere Proton der terminalen Glucose des gegenüberliegenden Endes des Homooligomers weist im Vergleich zum entsprechenden Proton von $[\alpha\text{-D-Glc}(1\rightarrow2)]_4\text{-}\beta\text{-D-Fru}$ eine Tieffeldverschiebung von 0.17 ppm (α -Anomer) und 0.66 ppm (β -Anomer) auf. Diese deutliche Veränderung der chemischen Verschiebung zeigt

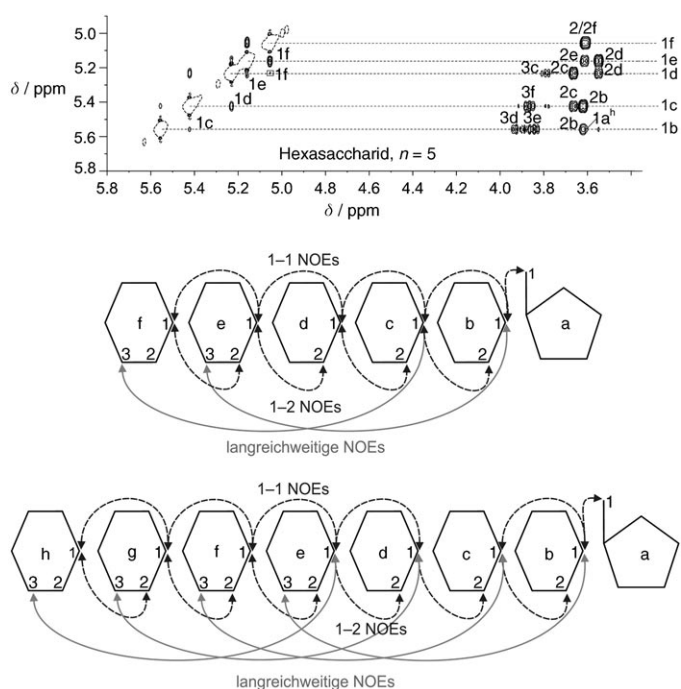


Abbildung 2. Oben: Ausschnitt aus dem Bereich der anomeren Protonen im Rotating-Frame-NOESY-Spektrum (ROESY) des Hexasaccharides $[\alpha\text{-D-Glc}(1\rightarrow2)]_5\text{-}\beta\text{-D-Fru}$ einschließlich der NOE-Zuordnungen. Unten: Schematische Darstellung von zwei mit Kappen versehenen $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucanen mit den für die Definition der helicalen Struktur entscheidenden NOEs. Der durchschnittliche Abstand für die NOEs beträgt $H1_i-H1_{i+1} = 2.9\text{--}3.4\text{ \AA}$, $H2_i-H1_{i+1} = 2.1\text{--}2.2\text{ \AA}$ und für die langreichweitigen NOEs $H1_i-H3_{i+3} = 2.4\text{--}2.5\text{ \AA}$. Das NOE-Muster des Octasaccharides (320 K) ist eine logische Erweiterung des Musters des Hexasaccharides. Langreichweitige NOEs sind nach der sauren Hydrolyse der Fructofuranose-Bindung nicht mehr sichtbar, und die durchschnittlichen Interglycosid-NOEs werden wegen der resultierenden konformativen Flexibilität kleiner ($H1_i-H1_{i+1} = 2.3\text{ \AA}$ für das α -Epimer und $2.4\text{--}2.8\text{ \AA}$ für das β -Epimer).

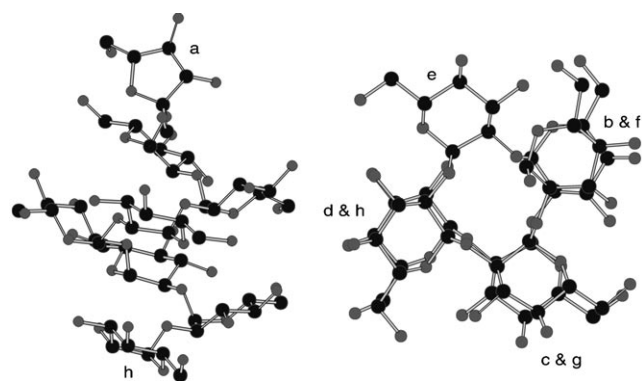


Abbildung 3. Links: Seitenansicht der energieminierten Durchschnittsstruktur des Octasaccharides einschließlich der durch NOEs festgelegten Abstände. Die Ringebene der Fructofuranose steht nahezu senkrecht auf den Pyranoseringen der Helix. Rechts: Die Aufsicht entlang der Helixachse zeigt die Tetrasaccharid-Wiederholungssequenz (Ring a ist in dieser Abbildung nicht dargestellt). Die Moleküle wurden in HyperChem erstellt und in vacuo auf $0.01\text{ kcal mol}^{-1}\text{ \AA}^{-1}$ minimiert. Der MM2+-Parametersatz wurde in Verbindung mit der in HyperChem enthaltenen „Polak-Ribiere conjugate gradient method“ für die Minimierung verwendet.

turen des reduzierenden und des nichtreduzierenden Endes bestimmt. Die beiden für die $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucankette möglichen, entgegengesetzten Helixrichtungen sind durch die viertletzte Pyranose überbrückt, die den zwischen einer *P*- und einer *M*-Helix erforderlichen Sattel bildet. Das terminale Trisaccharid (f–h des Octa- und h–j des Decasaccharides) der größeren Oligomere wirkt der rechtsgängigen Helix, die von der Fructofuranose-Kappe induziert wird, entgegen, indem die viertletzte Pyranose in die Sattelposition zwischen den beiden entgegengesetzten Helixrichtungen gedrängt wird. Die Energiebarriere steigt für höhere Polymerisationsgrade nicht weiter an. Dieses Phänomen wird auch für Racemisierungsbarrieren achiraler Homooligomere beobachtet.^[9] Makroskopische Beispiele für Sattelstrukturen finden sich in Ranken der weißen Zaunrube (*Bryonia alba*) oder in Weinranken, die beide Helixrichtungen annehmen müssen, um die Torsion beim Winden zu verringern. Selektive saure Hydrolyse der Ketosid-Bindung des Decasaccharides ($n=9$) führt wie im Fall von $[\alpha\text{-D-Glc}(1\rightarrow2)]_4\text{OH}$ nach Abspaltung der Fructose-Kappe zu einem völlig veränderten $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Allerdings ist, wie man es für ein solches Homooligomer erwartet, eine Zuordnung der Signale wegen der geringen Verschiebungsdispersion nicht mehr möglich.

$\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucane tendieren stark zur Bildung helicaler Sekundärstrukturen; strukturelle Modifikationen am reduzierenden Ende des $\alpha(1\rightarrow2)$ -Glucooligosaccharides haben dabei einen weit reichenden Einfluss auf die Konformation. Die Fructofuranose-Kappe am reduzierenden Ende stabilisiert eine von der Länge des Homooligomers unabhängige rechtsgängige Helix, die jedoch an der viertletzten Pyranose endet. Die einzigartigen Konformationseigenschaften der Oligo-($1\rightarrow2$)- $\alpha\text{-D-Glucopyranosyl}(1\rightarrow2)\text{-}\beta\text{-D-fructofuranoside}$ stellen die allgemeine Sicht der Oligomere als flexible Biomoleküle in Frage. Gegenwärtige Studien beschäftigen sich mit der Frage, wie die molekulare Struktur mit der Rolle von Oligo-Kojibiosen mit Fructose-Kappen als Bioprotektoren korreliert.

Eingegangen am 5. September 2005

Online veröffentlicht am 20. Dezember 2005

Stichwörter: Glucane · Helicale Strukturen · Kohlenhydrate · Konformationsanalyse · NMR-Spektroskopie

- [1] C. V. Stevens, A. Meriggi, K. Booten, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1–16.
- [2] G. Brumfiel, *Nature* **2004**, *428*, 14–15.
- [3] G. Byrant, K. L. Koster, J. Wolfe, *Seed Sci. Res.* **2001**, *11*, 17–25.
- [4] D. Fischer, A. Geyer, E. Loos, *FEBS J.*, im Druck.
- [5] H. Chaen, T. Nishimoto, T. Nakada, F. Tetsuya, S. Fukuda, M. Kurimoto, Y. Tsujisaka, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *92*, 177–182.
- [6] T. Watanabe, Y. Kamo, M. Yoshihiro, K. Matsuda, W. F. Dudman, *Carbohydr. Res.* **1982**, *110*, 170–175.
- [7] Die Werte stammen aus der Datenbank <http://www.glycosciences.de>.
- [8] HyperChem; Hypercube, Inc., Gainesville, FL 32601.
- [9] R. H. Janke, G. Haufe, E.-U. Würthwein, J. H. Borkent, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6031–6035.