

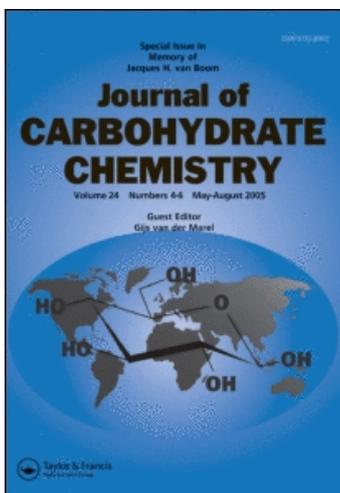
This article was downloaded by:

On: 23 January 2011

Access details: *Access Details: Free Access*

Publisher *Taylor & Francis*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Journal of Carbohydrate Chemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713617200>

¹H-NMR-Untersuchungen an Sialinsäuren, V¹ N-Acetyl- α -D-Neuraminsäure: Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten; Konfiguration und Konformation in Lösung

R. Rensch^a; W. Baumann^a; H. Friebolin^a

^a Organisch-Chemisches Institut der Universität, Heidelberg 1

To cite this Article Rensch, R. , Baumann, W. and Friebolin, H.(1983) '¹H-NMR-Untersuchungen an Sialinsäuren, V¹ N-Acetyl- α -D-Neuraminsäure: Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten; Konfiguration und Konformation in Lösung', *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2: 4, 415 – 425

To link to this Article: DOI: 10.1080/07328308308057888

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/07328308308057888>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

$^1\text{H-NMR-UNTERSUCHUNGEN AN SIALINSÄUREN, V}^1$

N-ACETYL- α -D-NEURAMINSÄURE:

CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN UND KOPPLUNGSKONSTANTEN; KONFIGURATION
UND KONFORMATION IN LÖSUNG

R. Rensch, W. Baumann und H. Friebolin*

Organisch-Chemisches Institut der Universität,
Im Neuenheimer Feld 270, D-6900 Heidelberg 1

Received June 24, 1983

ABSTRACT

The enzymatic cleavage of N-acetyl-2-azido-2-deoxy- α -D-neuraminic acid in the probe of the NMR spectrometer allows the accumulation of ^1H NMR spectra of the released α anomer of the N-acetyl-D-neuraminic acid before it mutarotates to the β anomer. The analysis and computer simulation of the spectra yield the ^1H NMR data set of chemical shifts and coupling constants of N-acetyl- α -D-neuraminic acid. Using this data set, configuration and conformation in solution are discussed by comparing it with the ^1H NMR data set of the β anomer, the structure of which is known from an X-ray study.

EINFÜHRUNG

N- oder O-substituierte Neuraminsäuren - sogenannte Sialinsäuren - sind in Mikroorganismen und im Tierreich weit verbreitet. Sie sind meist an andere Zucker gebunden und besitzen wichtige biologische Funktionen. Am häufigsten trifft man in der Natur die N-Acetyl-D-neuraminsäure (NeuAc) an, deren Pyranose-Ring nach

stets von Signalen des im Spaltansatz noch vorhandenen Substrats und der durch Mutarotation schon entstandenen βNeuAc überlagert. Ein Gesamtspektrum der αNeuAc war uns daher nicht bekannt.

Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen war, durch Optimieren der enzymatischen Spaltreaktion an geeigneten Substraten und Enzymen möglichst hoch an αNeuAc angereicherte Proben zu erhalten, deren $^1\text{H-NMR-Spektren}$ aufzunehmen und durch Simulation exakt zu analysieren. Die aus der Spektrensimulation gewonnenen chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten sollen als Grundlage für die Diskussion von Konformation und Konfiguration der αNeuAc verwendet werden.

ERGEBNISSE

Für unsere Untersuchungen zur Kinetik der Mutarotation hatte sich als Substrat vor allem ein synthetisches Derivat der αNeuAc , die N-Acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-neuraminsäure (αAzid), als geeignet erwiesen,⁹ weil es problemlos durch Sialidasen gespalten wird und keine störenden Signale durch weitere Abbauprodukte auftreten. Wir erhielten von einem Spaltansatz (s. Experimenteller Teil) mit αAzid und der Sialidase aus *Clostridium perfringens* im Zeitraum von 8 -16 min nach Inkubation das in FIG. 2 wiedergegebene 300-MHz-Spektrum. Aus den Integralen läßt sich entnehmen, daß mehr als 80 % αNeuAc neben wenig αAzid und 10 bis 15 % βNeuAc vorliegen. Dieses Spektrum verwendeten wir zur Spektrenanalyse. In FIG. 3 ist zum Vergleich das Spektrum der βNeuAc wiedergegeben; es enthält zusätzliche Signale der im Mutarotationsgleichgewicht vorhandenen αNeuAc .

Schon eine oberflächliche Betrachtung der FIG. 2 und 3 zeigt, daß die Analyse des Spektrums der βNeuAc relativ einfach durchzuführen ist, denn die jeweils einem Proton zuzuordnenden Multipletts des 9-Spin-Systems sind recht deutlich voneinander abgesetzt. Daher konnte das Spektrum der βNeuAc schon früher⁶ nach 1. Ordnung ausgewertet werden, so daß sehr gute Näherungs-

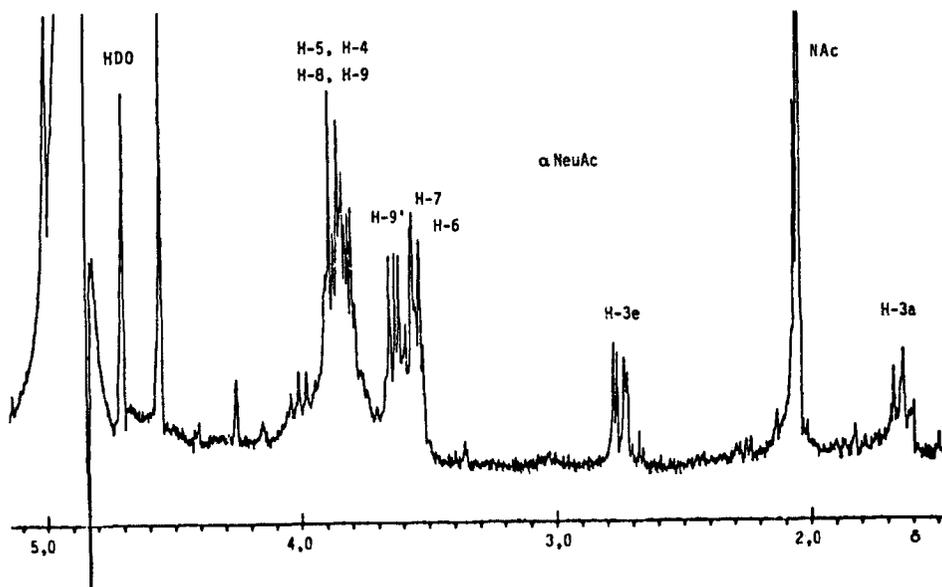


FIG. 2. ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) der α NeuAc in D_2O -Acetat-Puffer; pD = 5,4; 22°C ; 16 K Datenpunkte, 200 Scans; aufgenommen im Inkubationszeitraum von 8 bis 16 min des Spaltansatzes aus α Azid und der Sialidase aus *Clostridium perfringens*.

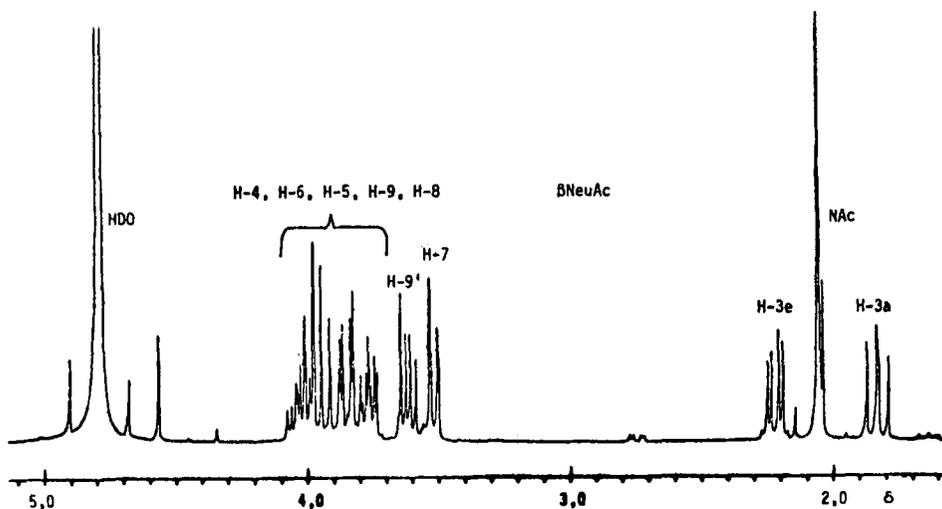


FIG. 3. ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) der β NeuAc in D_2O -Acetat-Puffer; pD = 5,4; 22°C ; 16 K Datenpunkte, 300 Scans.

werte für die chemischen Verschiebungen aller 9 Protonen und der Kopplungskonstanten vorhanden waren. Wesentlich komplizierter ist die Analyse dagegen beim α -Anomer. Hier überlagern sich die Multipletts der stark koppelnden Protonen des Ringes und der Seitenkette. Nur die Signale von H-3a und H-3e sind deutlich getrennt; das Multiplett für H-3a zeigt jedoch starke Abweichungen vom erwarteten Dublett von Dubletts.

Um dieses Spektrum exakt zu analysieren, versuchten wir eine Spektrensimulation. Dazu bedurfte es möglichst guter Ausgangsdaten für die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten. Da diese nicht wie bei der β NeuAc durch eine Analyse 1. Ordnung zu gewinnen waren, gingen wir von Datensätzen aus, die wir durch Spektrensimulation von synthetischen Derivaten der α NeuAc erhalten hatten,^{4,10} um dann durch "trial and error" zu dem Datensatz zu gelangen, der die beste Übereinstimmung von berechnetem und experimentellem Spektrum liefert (s. experimenteller Teil).

Die Tabellen 1 und 2 enthalten die für α NeuAc und β NeuAc gefundenen "besten" Datensätze. Die damit berechneten und in den FIG. 4 und 5 wiedergegebenen Spektrenausschnitte zeigen eine sehr gute Anpassung an die experimentellen Spektren; da sich die Änderung in den chemischen Verschiebungen um 0,005 ppm (1,5 Hz) und in den Kopplungskonstanten um 0,2 Hz als sichtbare Verschlechterung der Anpassung der ausgeschriebenen Spektren äußert, sind die Werte im Rahmen dieser Fehlerbreite als sicher zu betrachten.

Durch die Spektrensimulation und Modellrechnungen können wir erklären, warum das Signal von H-3a der β NeuAc als Dublett von Dubletts erscheint, das von H-3a der α NeuAc dagegen als Multiplett, obschon sich die Kopplungskonstanten der beiden Anomeren nicht wesentlich unterscheiden. Unsere Modellrechnungen zeigen, daß die Multiplizität des Signals von H-3a nicht nur durch die Wechselwirkung mit den Protonen H-3e und H-4 bestimmt wird, sondern auch durch die mit dem Proton H-5. Die Wechselwirkung mit H-5 macht sich im Spektrum jedoch nur dann bemerkbar, wenn die

TABELLE 1

Berechnete ^1H -chemische Verschiebungen von αNeuAc und βNeuAc in D_2O -Acetat-Puffer; $\text{pD} = 5,4$; Temperatur 22°C

Chemische Verschiebung (δ)	H-3a	H-3e	H-4	H-5	H-6	H-7	H-8	H-9	H-9'
αNeuAc	1,633	2,750	3,800	3,828	3,536	3,549	3,878	3,868	3,625
βNeuAc	1,833	2,223	4,063	3,925	3,995	3,519	3,773	3,853	3,620

TABELLE 2

Berechnete ^1H -Kopplungskonstanten von αNeuAc und βNeuAc

Kopplungskonstante J (Hz)	3a/3e	3a/4	3e/4	4/5	5/6	6/7	7/8	8/9	8/9'	9/9'
αNeuAc	-12,6	11,3	4,5	10,1	10,6	1,3	9,5	3,0	6,8	-11,8
βNeuAc	-13,2	11,6	4,9	9,7	10,4	1,5	9,2	2,6	6,5	-11,9

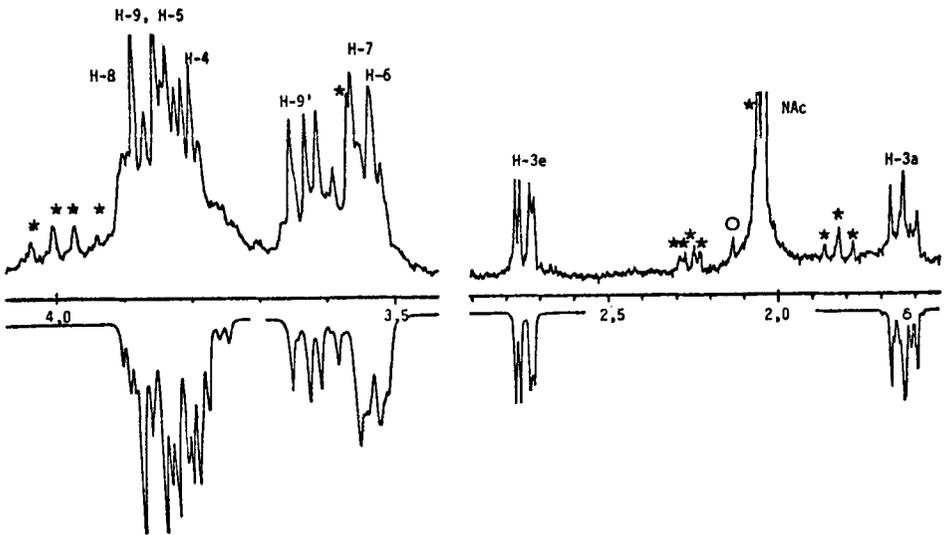


FIG. 4. Ausschnitte aus dem experimentellen (oben) und dem berechneten Spektrum (unten) der αNeuAc ; mit Stern (*) markiert: Signale der βNeuAc ; mit Kreis (o) markiert: Verunreinigungen oder Seitenbanden; experimentelle Daten siehe Legende von FIG. 2 und experimenteller Teil.

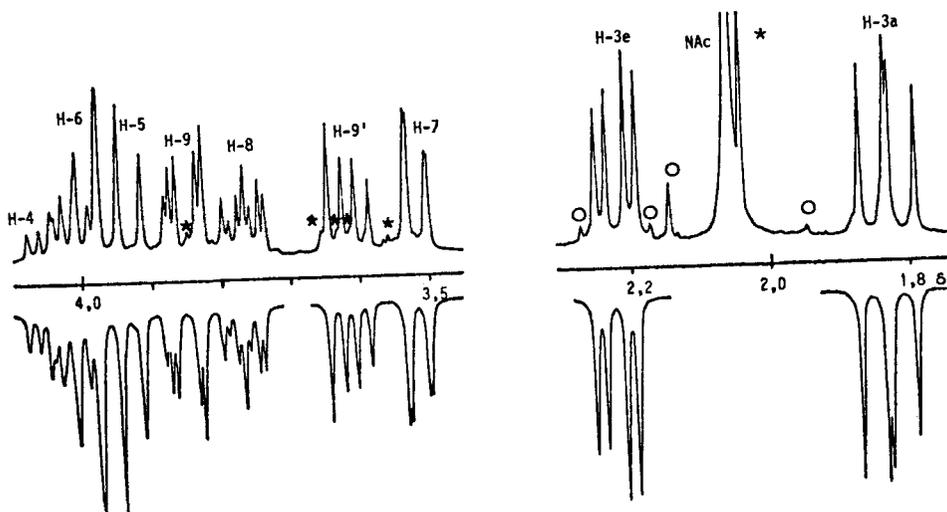


FIG. 5. Ausschnitte aus dem experimentellen (oben) und dem berechneten Spektrum (unten) der β NeuAc; mit Stern (*) markiert: Signale der α NeuAc; mit Kreis (o) markiert: Verunreinigungen oder Seitenbanden; experimentelle Daten siehe Legende von FIG. 3 und experimenteller Teil.

Differenz der chemischen Verschiebungen $\Delta\nu = \nu(\text{H-5}) - \nu(\text{H-4})$ zwischen H-4 und H-5 kleiner ist als 15 Hz. Bei der β NeuAc wird die Wechselwirkung mit H-5 nicht beobachtet, da $\Delta\nu = 33,3$ Hz beträgt (Dublett von Dubletts in FIG. 5). Bei der α NeuAc mit $\Delta\nu = 7,2$ Hz führt die Wechselwirkung mit H-5 zur komplizierteren Aufspaltung (Multiplett in FIG. 4). Dies erklärt, warum wir bei früheren Untersuchungen zur enzymatischen Abspaltung von α NeuAc in den Spektren für H-3a oft ein nur durch das Integral lokalisierbares Multiplett erhielten, da sich die Intensität des Signals auf die vielen Linien des Multipletts verteilt.

Wir betrachten die Multiplett-Aufspaltung für das Signal von H-3a als Test für die richtige Zuordnung von H-4 und H-5 im Bereich von $\delta = 3,7$ bis 4; eine Vertauschung von H-4 und H-5 oder nur eine geringfügige Verschiebungsänderung verändern die Multiplett-Struktur von H-3a so sehr, daß es für die α NeuAc offenbar keinen

anderen "richtigen" Datensatz außer dem in den Tabellen 1 und 2 gibt.

DISKUSSION

Die Struktur der β NeuAc wurde von Flippin² durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt; durch diese Untersuchung sind Konformation und Konfiguration von Ring und Seitenkette der kristallinen β NeuAc bekannt. Die Struktur ist in FIG. 1 wiedergegeben, und wie die Diskussion der ¹H-Kopplungskonstanten von Weltner et al.^{3,6} ergab, gilt sie auch für die β NeuAc in Lösung.

Bisher konnte nach unserer Kenntnis reine α NeuAc weder in Lösung noch in kristallisierter Form erhalten werden. Daher sind die hier in den Tabellen 1 und 2 angegebenen vollständigen ¹H-NMR-Parameter die einzigen für die Diskussion von Konformation und Konfiguration verfügbaren Daten der α NeuAc.

Der Vergleich der berechneten chemischen Verschiebungen von α NeuAc und β NeuAc zeigt nur für H-3a, H-3e, H-4 und H-6 größere Unterschiede als 0,2 ppm; die sich jeweils entsprechenden Kopplungskonstanten von α - und β -Anomer weichen maximal um 0,6 Hz voneinander ab. Letzteres läßt den Schluß zu, daß Konformation und Konfiguration von Ring und Seitenkette - abgesehen von der Konfiguration an C-2 - bei beiden Anomeren gleich sind. Die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der dem anomeren C-Atom direkt benachbarten Protonen H-3a und H-3e sind durch die unterschiedliche Stellung von COOH- und OH-Gruppe an C-2 zu deuten, wie auch die der zum axialständigen Substituenten an C-2 synaxialen Protonen H-4 und H-6.

Die in der FIG. 1 vorweggenommene Strukturvorstellung für die α NeuAc betrachten wir damit als bestätigt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Substrate und Enzyme. Die N-Acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-neuraminsäure (α Azid) wurde von Brossmer und Rose synthetisiert

und uns zur Verfügung gestellt. Die βNeuAc stammte von der Kantoi-shi Pharmaceutical Co. LTD, Japan; die Sialidase aus *Clostridium perfringens* (EC 3.2.1.18) von der Fa. Boehringer Mannheim; Natriumacetat und D_2O (99,75 % D) von der Fa. Merck, Darmstadt.

Spaltansatz zur Freisetzung der αNeuAc . Der Spaltansatz enthielt 2 mg αAzid , gelöst in 0,5 ml D_2O - Acetat-Puffer vom pD = 5,4 und 2 Einheiten der Sialidase aus *C. perfr.*. Inkubiert wurde bei 22°C im NMR-Spektrometer.

Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren. Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit einem Spektrometer vom Typ WH 300 (Meßfrequenz 300 MHz) der Fa. Bruker, Karlsruhe, in D_2O bei 22°C mit 16 K Datenpunkten und 200 bis 400 Scans aufgenommen. Als interner Standard diente Trimethylsilyl-Na-propionat- d_6 mit $\delta = 0$. Alle austauschbaren Protonen (OH und NH) von Substrat und Puffer waren durch D ersetzt. Die Meßzeit für das während der enzymatischen Abspaltung der αNeuAc aufgenommene Spektrum betrug ca. 8 min (200 Scans, 16 K Datenpunkte); sie fiel in den Inkubationszeitraum von 8 - 16 min. Das aus den Integralen ermittelte Mengenverhältnis von Substrat (αAzid), αNeuAc und βNeuAc entspricht somit einem Mittelwert über den Meßzeitraum. Die αNeuAc lag beim pD = 5,4 als Salz vor; da die ^1H -NMR-Verschiebungen der NeuAc-Protonen pD-abhängig sind, wurde auch die βNeuAc als Salz bei pD = 5,4 gemessen, um die Spektren von αNeuAc und βNeuAc direkt vergleichen zu können.

Berechnung der ^1H -NMR-Spektren. Das NeuAc-Molekül enthält 9 gekoppelte Protonen, so daß die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten eines 9-Spin-Systems zu berechnen sind, was mit den uns zur Verfügung stehenden Prozeßrechnern nicht möglich war. Da die Programme maximal 7 nichtäquivalente Spins berücksichtigten, versuchten wir das 9-Spin-System in Teilsysteme zu zerlegen, was noch den Vorteil hat, daß die Rechenzeit kürzer wird. Allerdings konnte durch die Trennung in Teilspektren nicht von der Möglichkeit der rechnerischen Iteration Gebrauch gemacht werden, da in den Teilspektren Übergänge des 9-Spin-Systems fehlen.

Die Analyse des Spektrums der β NeuAc nach 1. Ordnung,⁶ sowie die von uns an weiteren sechs Derivaten der α NeuAc und der β NeuAc durchgeführten Auswertungen zeigten,¹⁰ daß die Kopplungskonstante zwischen H-6 und H-7 stets kleiner als 1,5 Hz ist. Daher wurde das 9-Spin-System für die Rechnung in ein 5-Spin-System mit den Ringprotonen H-3a, H-3e, H-4, H-5 und H-6 und ein 4-Spin-System mit den Protonen H-7, H-8, H-9 und H-9' der Seitenkette zerlegt. Diese Teilspektren konnten wir mit Hilfe des Programmes SIMEQ am Datensystem des Varian CFT 20 Spektrometers bearbeiten.

Für die β NeuAc wurden die Teilspektren ausgehend von dem von Weltner et al.⁶ publizierten Datensatz berechnet und mit den experimentellen Spektren verglichen. Darauf wurde der Datensatz bis zur bestmöglichen Anpassung verbessert. Um auch die Aufspaltung von H-6 und H-7 zu erhalten, wurden die Teilspektren unter Hinzufügen der jeweiligen Nachbarprotonen H-7 bzw. H-6 zum 6- bzw. 5-Spin-System erweitert und simuliert. Die Teilspektren wurden dann im Rechner addiert und so zusammengesetzt, daß das in FIG. 5 abgebildete simulierte Spektrum alle Kopplungen des 9-Spin-Systems enthält.

Bei der Aufstellung des Ausgangsdensatzes für die α NeuAc griffen wir auf die Erfahrungen bei der Analyse der Spektren der anderen Derivate der α NeuAc zurück und schätzten Werte für die chemischen Verschiebungen und die Kopplungskonstanten ab. Danach war es im Prozeß der Anpassung nötig, besonders die chemischen Verschiebungen in einem weiten Bereich zu variieren. Zur Wiedergabe der Aufspaltung von H-6 und H-7 durch die kleine Kopplung $J(6/7) = 1,3$ Hz wurde mit dem Datensatz der α NeuAc ein 7-Spin-System mit den Protonen H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9 und H-9' simuliert. Für die FIG. 4 (unten) wurden 5- und 4-Spin-System im Rechner addiert und mit dem Ausschnitt von H-6, H-7 und H-9' aus dem 7-Spin-System kombiniert, so daß auch hier alle Kopplungen des 9-Spin-Systems vorhanden sind.

Die sehr gute Anpassung von experimentellen und simulierten

Spektren rechtfertigt nachträglich die Trennung des 9-Spin-Systems bei der rechnerischen Analyse und Anpassung.

DANKSAGUNG

Wir danken Herrn Prof. R. Brossmer und Frau U. Rose, Institut für Biochemie II, Med. Fak. der Universität Heidelberg, für die N-Acetyl-2-azido-2-desoxy- α -D-neuraminsäure (α Azid). Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

LITERATUR

1. IV. Mitteilung: H. Schmidt und H. Friebolin, J. Carbohydr. Chem., preceding paper.
2. J. L. Flippen, Acta Cryst., 29, 1881 (1973).
3. L. W. Jaques, E. B. Brown, J. M. Barrett, W. S. Brey und W. Weltner, J. Biol. Chem., 252, 4533 (1977).
4. U. Dabrowski, H. Friebolin, R. Brossmer und M. Supp, Tetrahedron Lett., 20, 4637 (1979).
5. J. Haverkamp, L. Dorland, J. F. G. Vliegenthart, J. Montreuil und R. Schauer, IUPAC IXth Int. Symp. Carbohydrate Chem., London, Abstr. D 7, 281 (1978).
6. E. B. Brown, W. S. Brey und W. Weltner, Biochim. Biophys. Acta, 399, 124 (1975).
7. R. Brossmer, G. Keilich, D. Ziegler und M. Supp, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 361, 697 (1980).
8. H. Friebolin, M. Supp, R. Brossmer, G. Keilich und D. Ziegler, Angew. Chem., 92, 200 (1980) und Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 92, 208 (1980).
9. H. Friebolin, P. Kunzelmann, M. Supp, R. Brossmer, G. Keilich und D. Ziegler, Tetrahedron Lett., 22, 1383 (1981).
10. R. Rensch und H. Friebolin, XIth Int. Carbohydr. Symp., Vancouver, Abstr. II-21 (1982).