

¹³C-UNTERSUCHUNGEN VON ANOMEREN KETOSIDEN DER N-ACETYL-D-NEURAMINSÄURE

V. Eschenfelder und R. Brossmer

Institut für Biochemie II (Med.Fak.) der Universität, D-69 Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 328

H. Friebolin

Organ.-Chem. Institut der Universität, D-69 Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 270

(Received in Germany 2 July 1975; received in UK for publication 17 July 1975)

Wir beschäftigen uns schon seit geraumer Zeit mit der Chemie und Biologie von N-Acetyl-D-neuraminsäure (NANA) und N-Acetyl-D-neuraminsäure enthaltenden Oligosacchariden bzw. Glykoproteinen (z.B. (1)). NANA besetzt in zahlreichen Glykoproteinen, Glykolipiden und Oligosacchariden in charakteristischer Weise das nicht reduzierende Ende einer Kohlenhydratkette (2). Die genaue Kenntnis ihrer Konfiguration und Konformation in diesen natürlichen Substanzklassen ist zur Klärung der biologischen Funktion von Bedeutung.

Mit Hilfe der Protonenresonanzspektroskopie konnte für den Sechsring der N-Acetyl-D-neuraminsäure die 1-C-Konformation gesichert werden (3). Die Aufklärung der Konformation an C-2 macht jedoch Schwierigkeiten. Während bei Aldosen aus der Kopplungskonstanten $J_{H(1)-H(2)}$ die Konfiguration am anomeren C-Atom ermittelt werden kann, gelingt dies bei Ketosen - wie im Falle der N-Acetyl-D-neuraminsäure - nicht, da das zur Bestimmung der Kopplungskonstanten $J_{H(2)-H(3)}$ notwendige Proton am anomeren C-2 Atom fehlt.

Wir versuchten daher, das Problem der Konfigurationsbestimmung an C-2 mit der C-13-NMR-Spektroskopie zu lösen. Dazu haben wir die C-13-NMR-Spektren einiger in der 1-C-Konformation vorliegenden synthetischer Derivate der NANA mit α - oder β -Konfiguration (vergl. Abb. 1) mit einem Bruker-Spektrometer HFX 90 bei einer Meßfrequenz von 22.63 MHz in D₂O aufgenommen, um so anhand der chemischen Verschiebungen der einzelnen C-Atome Gesetzmäßigkeiten für die Konfigurationsermittlung natürlicher NANA-enthaltender Kohlenhydrate abzuleiten.

Für diese Untersuchungen ist eine exakte Zuordnung der Signale erforderlich, die jedoch nur für die Kohlenstoffatome 1, 2, 3, 5 und 9 aufgrund ihrer Signallagen leicht gelingt (s. Tab. 1). Die für C-3 und C-9 getroffene Zuordnung ist zusätzlich noch durch das "Off-resonance"-Spektrum gesichert.

Eine Analyse des Spektrenbereichs zwischen δ = 68 und 76, in dem die Signale von C-4, C-6, C-7 und

C-8 liegen, bereitet wegen der nahe beieinanderliegenden Resonanzlinien Schwierigkeiten. Auch das zu Vergleichszwecken aufgenommene Spektrum des 2-Deoxy-2,3-dehydro-D-neuraminsäuremethyl-esters 14 trägt wenig zur eindeutigen Zuordnung bei. Ein Versuch der vollständigen Spektrenanalyse ist in Tabelle 1 wiedergegeben, wobei die durch selektive Spinentkopplung getroffene Zuordnung des Signals von C-4 der Arbeit von Jennings et al. (4) entnommen wurde.

Ein Vergleich der Meßwerte zeigt, daß die Resonanzen des anomeren C-Atoms 2, sowie die von C-3, C-5, C-7 und C-9 nahezu unabhängig von der Konfiguration an C-2 sind. Systematische Unterschiede der δ -Werte zwischen α - und β -anomeren Ketosiden lassen sich nur für die C-Atome 1, 4, 6 und 8 feststellen. Wie ganz allgemein bei den Kohlenhydraten beobachtbar ist, sind jedoch auch hier die durch den Konfigurationswechsel verursachten Effekte klein. Die δ -Werte entsprechender C-Atome im α - und β -Anomeren unterscheiden sich maximal um 2,5 ppm.

Da die Zuordnung der Resonanzen von C-4, 6 und 8 in natürlichen oligomeren und polymeren Kohlenhydraten wegen der größeren Zahl von Signalen in diesem Bereich zunehmend schwieriger wird, eignet sich bevorzugt das im Spektrum immer leicht zu identifizierende Signal von C-1 für die Konfigurationsbestimmung.

Die Unterschiede der C-1 Resonanzlagen in verschiedenen Derivaten der α - und β -Anomeren betragen bis zu 2,1 ppm, wobei das Signal des α -Anomeren stets bei höherer Feldstärke liegt als das des β -Anomeren (vergl. Tab. 1 die Verb. 3 und 4; 5 und 6; 7 und 8; 9 und 10). Die Absolutlage ist selbstverständlich stark abhängig vom Rest R_1 : in der freien Säure ist der δ -Wert um ca. 3 - 4 ppm größer als im Methylester.

Nach den vorliegenden Untersuchungen werden jedoch die Resonanzlagen von C-1 bei gleichem R_1 (H: freie Säure oder CH_3 : Methylester) kaum vom Aglykon (R_2 = Methyl, Äthyl, Cyclohexyl und Benzyl) beeinflusst und erscheinen innerhalb enger Grenzen in den für α - bzw. β -Anomere charakteristischen Bereichen: *

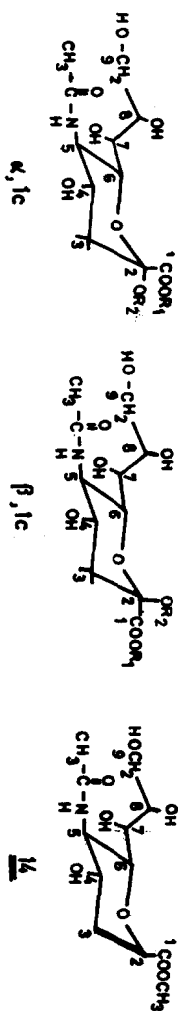
α -Anomere der freien Säure bei = $174,3 \pm 0,5$ (vergl. Verb. 3, 7, 11, 13)

β -Anomere der freien Säure bei = $176,2 \pm 0,2$ (vergl. Verb. 4 und 8)

Methylester des α -Anomeren bei = $170,8 \pm 0,2$ (vergl. Verb. 5, 9 und 12)

Methylester der β -Anomeren bei = $171,3 \pm 0,1$ (vergl. Verb. 6 und 10)

* Die C-1 Resonanzen der in Tabelle 1 angeführten Verbindungen 1 und 2 mit R_2 = H erfahren gegenüber den C-1 Resonanzen der α - und β -Ketoside eine Verschiebung nach tieferer Feldstärke. Diese Abweichung könnte durch eine mögliche Wasserstoffbrückenbindung der OH-Gruppe an C-2 mit der Carbonylgruppe erklärt werden.

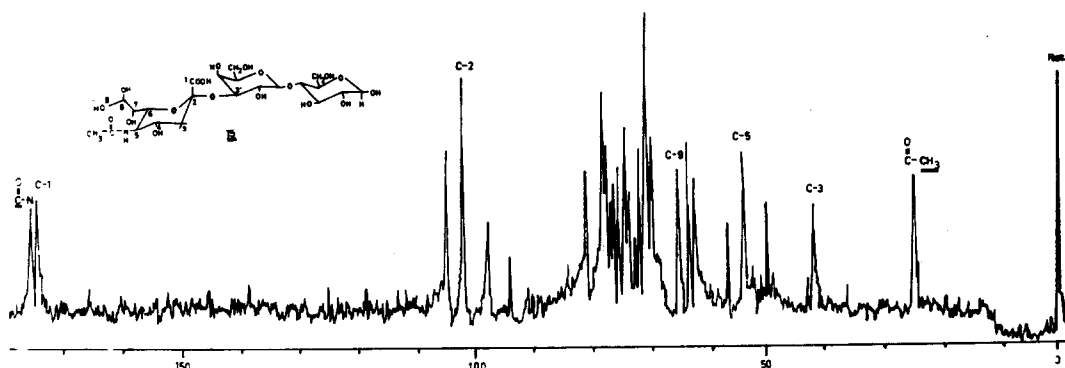
Tabelle 1. ¹³C-Verschiebungen von anomeren Ketosiden der N-Acetyl-D-neuraminsäure und deren Ester bezogen auf TMS = 0

[innerer Standard Natriumsalz der 2,2,3,3-Tetrafluor-3-(trimethylsilyl)-propionsäure]

Nr.	R ₁	R ₂	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6*	C-7*	C-8*	C-9	$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-N}$	$\text{CH}_3\text{-CO}$	$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C-O-CH}_3$	O-CH ₂ , ₃	CH ₂ -CH ₃
1 B	H	H	177.4	97.3	40.4	68.2	52.2	71.3	69.5	71.3	64.2	175.5	23.1	-	-	-
2 B	CH ₃	H	172.3	96.3	39.7	67.5	53.1	71.3	69.1	71.1	64.1	175.7	23.1	-	54.5	-
3 A	H	CH ₃	174.1	101.6	41.0	69.0	52.9	73.4	69.2	72.6	63.6	175.9	23.0	-	52.5	-
4 B	H	CH ₃	176.1	101.4	40.8	67.1	53.1	71.1	69.5	71.1	64.5	175.6	23.2	-	51.5	-
5 A	CH ₃	CH ₃	170.7	100.1	39.7	69.0	52.8	73.8	69.2	71.5	64.0	175.7	23.1	54.3	52.5	-
6 B	CH ₃	CH ₃	171.2	100.1	40.1	67.2	52.6	71.5	69.0	70.8	64.3	175.6	23.2	54.5	51.0	-
7 A	H	C ₂ H ₅	174.3	101.5	41.4	69.0	52.8	73.4	69.0	72.6	63.5	175.8	22.9	-	61.5	15.6
8 B	H	C ₂ H ₅	176.4	100.9	41.0	68.1	53.1	71.1	69.3	71.1	64.6	175.6	23.2	-	59.9	15.2
9 A	CH ₃	C ₂ H ₅	171.0	100.0	40.2	67.9	52.6	73.8	69.2	71.5	64.0	175.7	23.1	54.3	61.8	15.3
10 B	CH ₃	C ₂ H ₅	171.4	99.5	40.4	67.3	52.7	71.5	68.9	70.7	64.4	175.6	23.1	54.5	60.6	15.0
11 A	H	CH ₂ Ø	174.2	101.8	41.4	67.8	52.9	73.6	69.1	72.6	63.5	175.9	23.0	-	-	-
12 A	CH ₃	CH ₂ Ø	170.7	99.7	40.3	67.4	52.6	73.8	69.1	71.5	63.9	175.4	23.0	54.0	-	-
13 A	H	C ₆ H ₁₁	174.8	101.9	42.2	69.2	52.9	73.7	69.2	73.0	63.5	176.0	23.1	-	-	-
14	CH ₃	-	165.2	144.2	113.5	67.8	50.6	77.1	66.9	70.9	64.0	175.6	23.1	53.9	-	-
15 A	H	Lacto-syl	174.7	100.7	40.6	68.4	52.6	75.7	70.3	72.7	63.6	175.8	23.1	-	-	-

* Die Zuordnung für die C-Atome 6,7,8 ist nicht gesichert

Aufgrund der vorliegenden Befunde sollte auch bei der Strukturuntersuchung von biologisch wirksamen Oligosacchariden mit endständiger N-Acetyl-D-neuraminsäure eine Zuordnung zur α - oder β -Konfiguration möglich sein. Als Beispiel hierfür diene das aus Kuhcolostrum isolierte Tri-



saccharid Neuraminyllactose 15. Wir finden für C-1 einen Wert von 174,7 der eindeutig in dem für die α -Anomeren der freien Säure angegebenen Bereich liegt. Weitere Untersuchungen an natürlichen Produkten sind im Gange. - Die Verbindungen 2, 4 und 6 wurden nach Kuhn et al. synthetisiert(5). Analog erfolgte die Darstellung von 8 und 10. Den Ester 14 erhielten wir nach einer Vorschrift von Meindl und Tuppy(6). Die Ketoside 3, 5, 7, 9, 11, 12 und 13 wurden nach einer modifizierten Koenigs-Knorr Synthese dargestellt(7). Die Substanzen waren kristallisiert bzw. nach Elementaranalyse, Drehwert und Dünnschichtchromatographie rein.

*Ein zusätzlicher Test der hier angegebenen Zuordnungskriterien mit Hilfe der in (4) beschriebenen Verbindungen ist leider nicht möglich, da die dort angegebenen chemischen Verschiebungen sich auf die Na-Salze und auf den externen Standard TMS beziehen.

Literatur:

- (1) R.Kuhn und R.Brossmer, Chem. Ber. 89, 2013 (1956); ebenda 92, 1667 (1959);
R.Brossmer et al., Behring Inst. Mitt. 55, 119 (1974).
- (2) A.Gottschalk, The Enzymes 4, 461 (1966).
- (3) P.Lutz, W.Loehinger und G.Taigel, Chem. Ber. 101, 1089 (1968).
- (4) A.K.Bhattacharjee, H.J.Jennings, C.P.Kenny, A.Martin und J.C.P.Smith, J. Biol. Chem. 250, 1926 (1975).
- (5) R.Kuhn, P.Lutz und D.L.MacDonald, Chem. Ber. 99, 611 (1966).
- (6) P.Meindl und H.Tuppy, Monatsh. Chem. 100, 1295 (1969).
- (7) V.Eschenfelder, R.Brossmer und M.Wachter, in Vorbereitung.