Darstellung und Reinigung von Chondroitinsulfat-Tetrasacchariden NMR-Studien zur Bindung von Chondroitinsulfat und Heparin an Proteine

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg vorgelegt von

Andreas Witte

aus Münster

Hamburg 1999

- 1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer
- 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Paulsen

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1999

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1.1.1995 bis zum 31.3.1999 am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Meyer danke ich für die Überlassung des Themas und seine wertvolle und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für meine Familie

Abkürzungen

4S, 6S, 0S	4-Sulfat, 6-Sulfat, unsulfatiertes
Ac	Acetyl
COSY	Correlated Spectroscopy
E. COSY	Exclusive COSY
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
GlcA	Glucuronsäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MD	Molecular Dynamics
MMC	Metropolis Monte Carlo
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
RP	Reversed phase
TFA	Trifluoressigsäure
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TPPI	Time proportional phase increments
TRNOE	Transferred Nuclear Overhauser Effect

Aminosäure	Abkürzung	Code	Aminosäure	Abkürzung	Code
Alanin	Ala	А	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	Κ
Asparagin	Asn	Ν	Methionin	Met	М
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	С	Prolin	Pro	Р
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	Т
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	Н	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	Ι	Valin	Val	V

Inhalt

1	E	EINLEITUNG			
	1.1	Vorkommen und biologische Funktion von Glycosaminoglycanen			
	1.2	Inter	rleukin-8	3	
	1.3	Che	mische Synthese von Glycosaminoglycanen	5	
	1.4	Isoli	erung und Analytik von Glycosaminoglycanen	7	
	1.5	Chro	omatographische Methoden	8	
	1.	.5.1	Ausschluß-Chromatographie	8	
	1.	.5.2	Reversed-Phase Chromatographie	9	
	1.	.5.3	Ionenaustausch-Chromatographie	9	
	1.	.5.4	High-Performance Anion-Exchange Chromatographie	10	
	1.	.5.5	Detektion	11	
	1.	.5.6	Sonstige chromatographische Methoden	11	
	1.6	Mas	senspektrometrie ionischer Verbindungen	12	
	1.7	NM	R-Spektroskopie zur Untersuchung von Biomolekülen	13	
	1.	.7.1	Skalare Kopplung	13	
	1.	.7.2	Nuclear Overhauser Enhancement	13	
	1.	.7.3	Transferred NOE	16	
	1.	.7.4	Saturation transfer difference NMR-Spektroskopie	17	
	1.	.7.5	NMR-spektroskopische Untersuchungen von Glycosaminoglycanen	18	
	1.8	The	oretische Konformationsanalyse	19	
2	Р	ROBL	EMSTELLUNG	21	
3	Р	RÄPA	RATION VON CHONDROITINSULFAT-OLIGOSACCHARIDEN	23	
	3.1	Stru	ktur der untersuchten Chondroitinsulfat-Oligosaccharide	23	
	3.2	Spal	ltung des Chondroitinsulfats	24	
	3.	.2.1	Spaltung mit Hyaluronidase	24	
	3.	.2.2	Spaltung mit Chondroitinase	26	
	3.	.2.3	Reduktion der Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide	27	
	3.3	Reir	nigung der Proben	28	
	3.	.3.1	Ausschlußchromatographie	28	
	3.	.3.2	Ionenaustausch-Chromatographie	31	
	3.	.3.3	Ionenpaarchromatographie	36	
	3.	.3.4	High-Performance Anion-Exchange Chromatography (HPAEC)	37	
	3.	.3.5	Entsalzung	37	

	3.4	4 Mas	ssenspektrometrie	39
	3.5	5 NM	R-spektropische Untersuchungen von Chondroitinsulfat	44
		3.5.1	Zuordnung der Spektren	44
		3.5.2	Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid	44
		3.5.3	Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide	46
		3.5.4	Acetate als structural reporter groups	54
4		Konfo	DRMATIONSANALYSE VON CHONDROITINSULFAT	55
5		NMR-	BINDUNGSSTUDIEN	65
	5.1	Cho	ondroitinsulfat-Oligosaccharide und Hyaluronidase	65
		5.1.1	Einleitung	65
		5.1.2	Voruntersuchungen	65
		5.1.3	Saturation transfer difference Experimente	66
		5.1.4	Transferred NOE Experimente	72
	5.2	2 Kat	ionische Peptide und Heparin	73
		5.2.1	Theoretische Vorversuche	73
		5.2.2	NMR-Experimente	76
	5.3	3 Hep	parinoligosaccharide und Interleukin-8	77
		5.3.1	Beschreibung der Heparinoligosaccharid-Proben	77
		5.3.2	Vorversuche	78
		5.3.3	Peakverbreiterung und Peakshifts	83
		5.3.4	Ergebnisse transferred NOE-Experimente	84
		5.3.5	Ergebnisse der saturation transfer difference NMR-Experimente	87
	5.4	1 Dis	kussion der Ergebnisse der saturation transfer difference NMR-Spektrokopie	92
6		Zusan	IMENFASSUNG	95
7		Summ	ARY	97
8		Exper	IMENTELLER TEIL	99
	8.1	l Allg	gemeines	99
	8.2	2 Ber	eitung der Chondroitinsulfat-Proben	103
	8.3	3 Cha	rakterisierung der Chondroitinsulfat-Proben	106
	8.4	4 Pep	tidsynthesen	112
	8.5	5 Spe	ktroskopische Daten der Peptide	113
	8.6	5 We	chselwirkungen von Heparin mit Interleukin-8	116
9		Hand	HABUNG DER CHEMIKALIEN	119
1()	ANHA	ANG	121

10.1	Vorgehen zur Erzeugung randomisierter Startkonformationen	
10.2	Erzeugung von pdb-files aus GEGOP .mcang-files	
10.3	Pulsprogramme	
11 Lit	ERATUR	

1 Einleitung

1.1 Vorkommen und biologische Funktion von Glycosaminoglycanen

Glycosaminoglycane (GAG) sind unverzweigte Oligo- und Polysaccharide, die ionische Gruppen wie Carboxylat- und Sulfatgruppen tragen. In der Regel bestehen sie aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die überwiegend alternierend aus Aminozuckern und Uronsäuren aufgebaut sind.

In Proteoglycanen sind Glycosaminoglycane kovalent über Serin an ein Polypeptidrückgrat geknüpft, wobei dieses zentrale Protein (Core-Protein) wiederum an ein Filament aus Hyaluronat gebunden ist. Im Körper treten die Proteoglycane vor allem in der extrazellulären Matrix (EZM) auf und sind aufgrund des ausgeprägten polyanionischen Charakters in der Lage, im hydratisierten Zustand ein Vielfaches ihres eigenen Volumens an Wasser aufzunehmen; sie sind daher in wäßriger Lösung schleimig, hochviskos und elastisch.¹ In Abb. 1-1 ist der Aufbau eines Protoeglycans dargestellt. Das *core*-Protein besitzt eine Molekülmasse von ungefähr 300 000 Dalton, die zwischen 80 und 100 Seitenketten bestehen aus jeweils 30 - 40 Disaccharideinheiten.



Abb. 1-1: a.) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Proteoglycans aus fetalem Epiphyseknorpelgewebe des Rinds. b.) Schematische Zeichnung der Struktur eines Proteoglycans (aus²).

Das Chondroitinsulfat (Abb. 1-1), das vor allem in Knorpelgewebe zu finden ist, besitzt ein N-Acetyl-D-Galactosamin, dessen 4 und/oder 6 Position sulfatiert ist, sowie eine

 β -D-Glucuronsäure. Das Glycosaminoglycan Heparin besteht überwiegend aus alternierend α -(1-4)-glycosidisch verknüpften D-Iduronat-2-sulfat- und N-Sulfo-D-glucosamin-6-sulfateinheiten.²





$X_1 = OSO_3$,	$X_2 = OH$	Chondroitin-4-sulfat
X ₁ = OH,	$X_2 = OSO_3^{-1}$	Chondroitin-6-sulfat
$X_1 = OSO_3^{-},$	$X_2 = OSO_3^{-1}$	Chondroitin-4,6-disulfat.

Hyaluronsäure besteht aus alternierenden Glucuronsäure- und N-Acetylgalactosamineinheiten - β -D-GlcA-(1-3)- β -D-GlcNAc-. Im Haut- aber auch im Herz- und Lungengewebe findet man Dermatansulfat. Dieses ist eng mit dem Chondroitin-4-sulfat verwandt, enthält aber neben dem N-Acetylchondrosin-4-sulfat - β -D-GlcA-(1-3)- β -D-(4-O-SO₃)-GalNAc- auch das Iduronsäure-haltige N-Acetyldermatosin-4-sulfat - α -L-IduA-(1-3)- β -D-(4-O-SO₃)-GalNAc-. Vor allem in der Lunge findet sich daneben das nicht Uronsäure-haltige Keratansulfat - β -D-Gal-(1-4)- β -D-(6-O-SO₃)-GlcNAc-.

Die Funktionen der GAG im Organismus sind vielfältig. Heparin ist wesentlich an der Steuerung der Blutgerinnung beteiligt. Nachdem "noch bis in die 80er Jahre hinein"³ angenommen wurde, daß die biologische Aktivität von Heparin vor allem auf seinen

polyanionischen Charakter zurückzuführen sei, weiß man inzwischen, daß z.B. ein definiertes, nicht reguläres Pentasaccharid spezifisch an Antithrombin III bindet.⁴

Eine besondere Bedeutung kommt den Proteoglycanen im Nervensystem zu, wo sie als Wachstumsfaktoren, Protease-Inhibitoren und bei der Vermittlung von Kontakten zwischen den Zellen und Kontakten zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix wirken.⁵ Seit Antikörper gegen Chondroitinsulfat zugänglich sind,⁶ ist es auch möglich, lokale Veränderungen in histologischen Schnitten nachzuweisen. So sind Chondroitinsulfate an entscheidender Stelle in einige neurodegenerative Erkrankungen involviert. Schon länger ist bekannt, daß nach einer Verwundung des zentralen Nervensystems (ZNS) das Nachwachsen von Neuronen durch Chondroitin-6-sulfat-Proteoglycane gehemmt wird.⁷ Inzwischen wurden Chondroitinsulfat-Proteoglycane auch in senilen Plaques der Alzheimerschen Krankheit gefunden und könnten für den Rückgang der Neuronen in diesem Bereich verantwortlich sein.^{8,9} Die Akkumulierung von Proteoglycanen in neuronalen Einschlüssen bei der Parkinsonschen Krankheit ist möglicherweise für die Hemmung des proteolytischen Abbaus von Proteinen verantwortlich.¹⁰ Gleichzeitig wurde eine Veränderung der Zusammensetzung des Heparansulfates im cerebralen Kortex von Alzheimer Patienten gefunden.¹¹

Eine wichtige Rolle beim Andocken von Molekülen an die Zelloberfläche spielt Heparansulfat, das strukturell eng mit Heparin verwandt ist. Die Entfernung des Heparansulfats an der Oberfläche der Wirtszellen reduziert die Empfindlichkeit gegenüber Infektion mit Herpes Simplex Virus Typ 1 Vironen deutlich. Bei intakten Zellen scheint der anfängliche Kontakt zwischen Virus und Zelle durch die Bindung des viralen Glycoprotein C an eine Einheit von 10-12 Monosaccharideinheiten induziert zu werden.¹² Ähnliche Bindungen sind auch von *Platlet-derived Growth Factor A* (PDGF-A)¹³ und basischem Fibroplastenwachstumsfaktor (BFGF) bekannt, von diesem Komplex konnte bereits die Röntgenstruktur ermittelt werden.¹⁴ Genauere Untersuchungen der Biosynthese von Heparansulfat lassen vermuten, daß die Variation des Sulfatmusters gezielt durch Veränderungen im enzymatischen System von der Zelle durchgeführt werden.¹⁵

1.2 Interleukin-8

Interleukin-8 gehört zur Gruppe der Chemokine. Diese Proteine spielen eine bedeutende Rolle bei der Chemotaxie und Aktivierung von Leukozyten im Blut. Sie werden von einer Vielzahl von Zellen produziert und spielen eine wesentliche Rolle bei Entzündungsprozessen, so auch bei Asthma, Arteriosclerose und Arthritis. Rezeptoren sind vor allem IL-8RA (Typ I Rezeptor)¹⁶ und IL-8RB (Typ II Rezeptor)¹⁷, wobei letzterer weniger spezifisch ist. IL-8 bindet beide Rezeptoren unter Anstieg des Ca^{2+} - Levels im Cytosol.

Interleukin-8 selbst gehört zur CXC-Klasse (α -Klasse) der Chemokine, bei der im Gegensatz zur CC-Klasse die beiden ersten Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind. Das Protein ist 7.9 kD schwer und besteht aus 72 Aminosäuren, darunter fünf Arginin-, neun Lysin- und zwei Histidinreste. Interleukin-8 ist sehr gut untersucht, die Röntgen-¹⁸ und die NMR-Struktur des Dimeren¹⁹ und Monomeren²⁰ sind veröffentlicht (Abb. 1-3).



Abb. 1-3: Struktur von Interleukin-8. Die Bindungsstelle für Heparin/Heparansulfat liegt unten links im Bereich der Helix (aus¹⁸).

Auch die Bindungsstellen sind aus Mutageneseexperimenten bekannt, so sind Glu4, Leu5, Arg6, Ile10 in die Rezeptorbindung involviert,²¹ und aus der Röntgenstruktur ist bekannt, daß die Aminosäuren 23-29 im Dimer an der Grenzfläche zwischen den Monomeren liegen. Interleukin-8 bindet ebenfalls an Heparin/Heparansulfat, dabei konnte Kuschert zeigen, daß die Bindung an Heparin über die C-terminale Helix und die benachbarte Loop erfolgt.²²

Die Bindung an Heparin/Heparansulfat wurde von Spillmann et al.²³ mit einem Nitrocellulosefilterassay näher untersucht. Dabei zeigte sich, daß die eigentliche Bindungseinheit ungefähr ein Hexamer ist, wie es aus der Größe der Bindungsregion²² zu

erwarten war. Allerdings bindet ein Hexamer unter physiologischen Konditionen zu schwach. Zur Bindung unter diesen Bedingungen ist mindestens ein 18-mer, besser ein 22- bis 24-mer erforderlich. Erklären läßt sich dieses Verhalten durch eine hufeisenförmige Bindung, bei der zwei hochsulfatierte Hexamereinheiten getrennt durch eine 12-14 Zuckereinheiten lange Kette an die Heparinbindungsregionen beider IL-8 Monomere binden (Abb. 1-4).



Abb. 1-4: Modell für die Bindung von Heparin/Heparansulfat an das Interleukin-8 Dimer. Die beiden Interleukin-8 Monomere binden jeweils ein Element aus ca. 6 Zuckereinheiten, die durch eine ca. 14 Monomere lange Kette verknüpft sind. (aus²³)

1.3 Chemische Synthese von Glycosaminoglycanen

Der Fortschritt in der Synthese von komplexen Oligosacchriden hat es ermöglicht, eine Vielzahl von Proteoglycanoligosacchariden und ihrer Derivate synthetisch herzustellen.²⁴ Dabei wird die Darstellung der Glycosaminoglycane dadurch erschwert, daß Uronsäuren schlechte Glycosidakzeptoren sind. Es ist daher sinnvoll, die C-6-Oxidation erst im Anschluß an den (teilweisen) Aufbau des Zuckergerüsts durchzuführen. Es gelang sogar, bei der Synthese von Galacturonsäure-Dodecasaccharid mit guter Ausbeute alle Zucker gleichzeitig zu oxidieren.²⁵ Die Einführung der Sulfatgruppen kann anschließend z.B. durch Trimethylamin / Schwefeltrioxid-Komplex (Me₃N·SO₃) erfolgen.²⁶

Einige Glycopeptide aus der Bindungsregion von Proteoglycanen wurden bereits von Rio et al.^{27, 28} sowie von Goto und Ogawa²⁹ synthetisiert. Neben der Synthese der aktiven Pentasaccharideinheit des Heparins^{3, 30} wurden inzwischen eine Reihe von *repeating-units* der Glycosaminoglycane dargestellt, so die Disaccharide des Dermatansulfats,³¹ des Heparins,³² des Chondroitinsulfats³³ sowie Chondroitinsulfat-Analoga.^{34, 35}

Für Chondroitinsulfat wurden die Synthese des Trisaccharids³⁶ und 1995 von Ogawa³⁷ die des Tetrasaccharids veröffentlicht. Dabei werden aus den geschützten Monosaccharidbausteinen zunächst die Disaccharide synthetisiert. Die Oxidation zu Glucuronsäure erfolgt aufgrund der schlechten Glycosid-Akzeptoreigenschaften der Säure erst auf dieser Stufe. Anschließend werden die Disaccharide verknüpft, sulfatiert und entschützt.



Abb. 1-5: Schematische Darstellung der Synthese von Chondroitinsulfattetrasacchariden.³⁷ Zunächst werden die Disaccharideinheiten aufgebaut, deren Glucosen anschließend zu den Uronsäuren oxidiert werden. Am Ende der Synthese werden beide Bausteine miteinander verknüpft, sulfatiert und entschützt.

1.4 Isolierung und Analytik von Glycosaminoglycanen

Die natürlich vorkommenden Glycosaminoglycane weisen eine große Heterogenität bezüglich ihrer Kettenlänge, Zuckerzusammensetzung und ihres Sulfatierungsmusters auf. Daher gibt die Analyse der Polymere nur Aussagen über die Kettenlänge und - beispielsweise bei der Verwendung geeigneter Antikörper^{6, 38} - das Auftreten spezifischer Strukturen. Eine genauere Analyse ist erst nach vorheriger Spaltung möglich. Diese kann entweder chemisch oder enzymatisch erfolgen.³⁹

Die Enzyme zum Abbau der Glycosaminoglycane lassen sich in zwei Gruppen einteilen, in Hydrolasen und Lyasen. Die Lyasen spalten die glycosidische Bindung zu C-4 der Uronsäure unter β -Eliminierung⁴⁰ und führen somit zu Δ 4,5 ungesättigten Uronsäuren. Diese kann aus den höheren Oligomeren unter Einsatz von Quecksilberacetat abgespalten werden.⁴¹ Unter analytischen Gesichtspunkten ist die Ausbildung der zum Carboxylat α-ständigen Doppelbindung von Vorteil, da sich die entstehenden Oligomere leicht bei 232 nm detektieren für Polysaccharide lassen. Als Modellverbindungen die in Bindungsoder Konformationsstudien sind sie dagegen weniger geeignet.

Chondroitinsulfat wird durch die Lyasen Chondroitinase AC und ABC gespalten.^{42, 43} Dabei ist Chondroitinase ABC auch in der Lage, Dermatansulfat abzubauen.⁴⁴ Heparin kann durch Heparinase oder Heparanase abgebaut werden. Heparinase greift spezifisch 2-O sulfatierte Uronsäuren an, Heparanase spaltet bevorzugt N-Acetylglucosamine oder N-sulfatierte Glucosamine.

Hydrolasen, wie testiculäre Hyaluronidase, spalten dagegen unter Erhalt der terminalen Uronsäure.⁴⁵ Allerdings ist Hyaluronidase eine Transglycosidase, so daß sich während der Spaltung auch wieder neu gemischte Oligomere bilden.⁴⁶ Die Transglysosylierungsreaktion läßt sich unterbinden, wenn in Gegenwart eines Überschusses Glucuronidase inkubiert wird. Dabei entfernt die Glucuronidase den Glucuronylrest aus den durch die Hyaluronidase gebildeten Oligosacchariden. Diese stehen damit anschließend nicht mehr als Glycosidakzeptor zur Verfügung.⁴⁷

1.5 Chromatographische Methoden zur Analytik und Reinigung von Glycosaminoglycan-Oligomeren

1.5.1 Ausschluß-Chromatographie

Die Ausschluß-Chromatographie⁴⁸ (*gel filtration chromatography GFC* oder *size exclusion chromatography SEC*) trennt Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe. Zur Trennung werden poröse Trägermaterialien wie z.B. quervernetzte Dextrane eingesetzt, deren Poren groß genug sind, um kleineren Molekülen die Penetration des internen Volumens zu erlauben. Für Moleküle, die größer sind als die vorhandenen Poren, ist nur ein geringeres Volumen zugänglich. Dementsprechend passieren größere Moleküle die Säule mit geringerem Elutionsvolumen und somit schneller, als dies für kleine Moleküle der Fall ist.



Abb. 1-6: Trennung durch Ausschluß-Chromatographie. Gezeigt sind für drei unterschiedliche Molekülgrößen das jeweilig zugängliche Volumen und die Elutionsposition im Chromatogramm (aus⁴⁹).

Im Gegensatz zu anderen chromatographischen Techniken ist hierbei eine Retardierung durch Adsorption der Probe an der stationären Phase unerwünscht. Zur Verhinderung unpolarer Wechselwirkungen kann dem Lösungsmittel beispielsweise Alkohol zugesetzt werden, durch Zugabe von Salzen können die polaren und ionischen Interaktionen minimiert werden. Von besonderem Vorteil ist dabei der Verwendung flüchtiger Puffer wie Ammoniumhydrogencarbonat oder Pyridiniumacetat.⁵⁰

Ein zusätzliches Problem bei der Trennung geladener Polymere ist die Ausbildung gelartiger Strukturen, die die Trennung erschweren, zumal durch die Aggregation von Molekülen eine virtuell höhere Masse beobachtet wird. Diese Gelbildung kann durch die Verwendung höherer Temperaturen sowie die geeignete Wahl der Gegenionen verringert werden.⁴⁸ Dabei empfehlen sich Lithium- und Natriumsalze, dagegen bilden sich mit Kaliumionen leichter gelartige Strukturen.⁵¹ Als Alternative bieten sich auch Diol-Säulen auf Kieselgelbasis an, die durch die Alkoholfunktionen eine hohe Hydrophilie besitzen und somit eine gute Zugänglichkeit der Poren auch für ionische Oligomere bieten.⁵²

1.5.2 Reversed-Phase Chromatographie

Die *Reversed-Phase* (RP) Chromatographie ist die am meisten verbreitete HPLC-Technik. Als stationäre Phase wird eine extrem unpolare Oberfläche, wie beispielsweise an Kieselgel gebundene C-18 Ketten verwendet. Wird eine polare mobile Phase, z.B. eine wäßrige Lösung verwendet, so läßt sich die Trennung durch das Verteilungsgleichgewicht zwischen unpolarer und polarer Phase beschreiben. Zur Trennung von kationischen oder ionisierbaren Peptiden wird üblicherweise Trifluoressigsäure (TFA) zugesetzt, um eine gleichmäßige Protonierung zu erreichen. Gleichzeitig besitzt das TFA-Anion die Fähigkeit, durch Komplexbildung die entstandene positive Ladung wieder zu kompensieren.⁴⁹

Auch die Trennung stark anionischer Moleküle wie Chondroitinsulfat ist durch RP-Chromatographie möglich. Dazu werden zusätzlich Ionenpaarreagenzien wie Tetraalkylammoniumsalze dem Eluenten zugegeben. Die entstehenden Komplexe sind so stabil, daß eine *reversed-phase* Trennung des Gesamtsystems möglich ist. So ist die Trennung von Hyaluronsäure,⁵³ Dermatansulfat und Chondroitinsulfat⁵⁴ möglich. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber Ionenaustausch-chromatographischen Verfahren ist die Vermeidung von Salzen, die eine bessere Anbindung an massenspektroskopische Verfahren gestattet.⁵⁵ Nachteilig ist jedoch, daß die Abtrennung der Tetraalkylammoniumionen sehr schwierig ist,⁵⁶ was insbesondere anschließende NMR-spektroskopische Untersuchungen erschwert.

1.5.3 Ionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustausch-Chromatographie trennt ionische Substanzen aufgrund ihrer elektrostatischen Wechselwirkung mit einer geladenen stationären Phase. Diese besteht aus geladenen Gruppen (z.B. $-SO_3^-$ oder NR_4^+), die über einen Spacer an eine Polymer- oder Kieselgelmatrix gebunden sind.

Bei der Elution kommt es zur Konkurrenz zwischen den Probenionen und den Ionen des Eluenten um die verfügbaren Bindungsstellen, die Probenionen werden in der Reihenfolge ihrer Ladung eluiert. Bei Ionen gleicher Ladung können zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen die Elutionsreihenfolge beeinflussen, da unpolare Gruppen des Moleküls mit dem Spacer in hydrophobe Wechselwirkung treten können.⁵⁷

Die Anionenaustausch-Chromatographie gehört zu den am häufigsten eingesetzten Methoden zur Analytik der Glycosaminoglycane und wird bei den im Literaturverzeichnis zitierten Arbeiten gemeinsam mit der Ausschluß-Chromatographie überwiegend als Reinigungsmethode verwendet. Die eingesetzte Methodik ist vielfältig, so wurden Di-⁵⁸, Tetra-⁵⁹, Hexa-, Octa-⁶⁰und Mischungen von Oligosacchariden⁶¹ untersucht, als Eluenten wurden vorrangig Natrium-/Kaliumphosphat- verwendet, aber auch andere wie Natriumchlorid-⁶² und Lithiumperchlorat-Lösungen.⁶¹ Bei Verwendung Basen-inerter Polymersäulen können auch Eluenten mit höheren pH-Werte verwendet werden. So konnte für eine schwache Ionenaustauschersäule bei Verwendung von Ammoniumformiatlösung als Eluent mit pH-Werten zwischen 2.5 und 10.5 deutlich die abnehmende Elutionszeit der geladenen Zucker nachgewiesen werden.⁶³ Einen guten Überblick über die verwendeten Konditionen gibt zum Beispiel Imanari⁶⁴.

1.5.4 High-Performance Anion-Exchange Chromatographie

Die *High-Performance Anion-Exchange* Chromatographie (HPAEC) stellt eine neuere Entwicklung auf dem Gebiet der Kohlenhydratanalyse dar.⁶⁵ Im stark basischen Milieu liegen die Zucker in der anionischen Form vor (pK-Werte zwischen 12 und 14)⁶⁶ und können durch Anionenaustauschchromatographie getrennt werden. Als Eluent wird Natriumhydroxid verwendet, das gleichzeitig zur Einstellung des pH-Wertes dient. Für ungeladene Zucker läßt sich so eine sehr gute Trennung erreichen, wobei interessanterweise die Größe der Oligosaccharide nur unwesentlich die Retentionszeit beeinflußt.⁶⁵ Besondere Bedeutung gewinnt die HPAEC dadurch, daß in Kombination mit der *Pulsed Amperometric Detection* (PAD) der Nachweis auch sehr geringer Mengen der anderweitig nur schwer zu detektierenden Kohlenhydrate möglich ist.

Die *High-Performance Anion-Exchange Chromatography* kann beispielsweise zur Trennung der Oligomeren aus der *linkage region* der Glycosaminoglycane eingesetzt werden.⁶⁷ Bei der Analyse der Monosaccharide aus Glycosaminoglycanen konnten alle untersuchten Aminozucker und Uronsäuren sehr gut getrennt werden.⁶⁸ Dagegen ist der Einsatz zur Trennung von Chondroitinsulfat- und Heparinoligomeren stark eingeschränkt. Zum einen kommt es bei den stark alkalischen pH-Werten zur *peeling-reaction* und damit zur Zerstörung

eines Teils der Oligomeren. Gleichzeitig eluieren Glycosaminoglycane aufgrund der schon bei neutralem pH vorhandenen negativen Ladung nur sehr schwer und erfordern den Einsatz von hohen Salzgehalten. Eine Analyse der Disaccharide von Chondroitinsulfat und Heparin ist allerdings bei Verwendung eines Gradienten bis zu einmolarer Natriumacetatlösung noch gut möglich.⁶⁹

1.5.5 Detektion

Zur Detektion der gereinigten Glycosaminoglycane stehen unterschiedliche Verfahren zur Auswahl. Die photometrische Detektion durch Messung der UV-Absorption wird im wesentlichen auf Glycosaminoglycane angewendet, die N-Acetate enthalten (Detektion bei ~ 215 nm) sowie auf 4,5-ungesätttigte Zucker, wie sie nach der Zersetzung durch Eliminasen auftreten ($\lambda_{max} \approx 235$ nm).⁷⁰

Brechungsindexdetektoren können Zucker-Konzentrationen bis zu 50 ng/L nachweisen⁵⁷ und bieten sich damit für die Detektion von Oligosacchariden an. Der Einsatz ist auf isokratische Elutionen beschränkt, da sich der Brechungsindex des Eluenten so stark mit dem Mischungsverhältnis ändert, daß eine Detektion der vergleichsweisen kleinen Probensignale nicht mehr möglich ist. Damit sind Brechungsindexdetektoren insbesondere für die Ionenaustauschchromatographie nur sehr eingeschränkt einsetzbar. Die Reduktion der Zucker durch ³H-Natriumborhydrid ermöglicht den Einsatz eines Szintillationdetektors. Diese Technik wird insbesondere bei Heparin eingesetzt, das nur wenige N-Acetatgruppen aufweist und daher nur schlecht mit UV-Licht zu detektieren ist.⁷¹

Unter Substanzverbrauch sind auch hochempfindliche Nachweise durch *post column* Zugabe von Fluoreszenzreagenzien möglich.⁷² Der naßchemische Nachweis der Zucker in den einzelnen Fraktionen (z.B. durch die Orcinol-⁷³ oder die Carbazolmethode⁷⁴) ist zwar universell einsetzbar, allerdings mit großem Aufwand verbunden. Bei präparativem Arbeiten stört zusätzlich der notwendige Substanzverbrauch.

1.5.6 Sonstige chromatographische Methoden

Bei der Elektrophorese werden Moleküle unter dem Einfluß eines äußeren elektrischen Feldes durch ein Trägermaterial aus Polyacrylamid bewegt. Während bei der Untersuchung von Proteinen meist die Ladung "extern" erhöht werden muß, ist die Elektrophorese von Glycosaminoglycanoligomeren aufgrund der vorhandenen Ladungen gut möglich.⁷⁵ Ein

Einsatzbeispiel ist die Analytik von Dermatansulfat.⁶² Durch Kapillar-Elektrophorese ist dabei die Detektion bis zu wenigen Attomol möglich⁷⁶

Umgekehrt können durch Substrat-Gel-Elektrophorese mit Hyaluronan oder Chondroitinsulfat Enzyme wie Hyaluronidase getrennt werden. Die Immobilisierung des Chondroitinsulfats erfolgt dabei durch Einführung einer Allylgruppe nach Reduktion mit Natriumborhydrid. Der Allylzucker wurde anschließend mit dem Acrylamid copolymerisiert.⁷⁷

Eine weitere Untersuchungsmethode stellt die Gaschromatographie dar. Bevor allerdings sulfatierte Oligosaccharide untersucht werden können, müssen sie durch Desulfatierung und Methylierung, Acetylierung und/oder Silylierung verdampfbar gemacht werden.⁷⁸ Anschließend können durch Massenspektrometrie Rückschlüsse auf die ursprüngliche Konstitution gezogen werden.⁷⁹

Ein Vergleich der Analyse der Monosaccharide aus Glycosaminoglycanen, Aminozucker und Uronsäuren ergab dabei Vorteile für *Pulsed Amperometric Detection* bei unreinen Proben, da insbesondere die Toleranz gegenüber Salz, Lipiden und Aminosäuren groß ist. Dagegen liefert die GC eher "*fingerprint*"-artige Chromatogramme und empfiehlt sich damit besonders zur Analyse völlig unbekannter Verbindungen.⁶⁸

1.6 Massenspektrometrie ionischer Verbindungen

Die Massenspektrometrie ionischer Verbindungen stellt ein besonderes Problem dar, da die geladenen Teilchen besonders schlecht in die Gasphase übertreten. Eine Möglichkeit, das Problem zu umgehen, ist die vorhergehende Derivatisierung durch Permethylierung und Peracetylierung, wie sie z.B. auf Heparinoligosaccharide angewandt wurde, um anschließend FAB-MS Spektren messen zu können.⁸⁰ Kleinere Glycosaminoglycan-Fragmente (Mono- und Disaccharide) können auch direkt im MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight*) vermessen werden.⁸¹ Daneben wurden Versuche unternommen, die anionischen Zucker im Komplex mit kationischen Peptiden zu ionisieren.⁸²

Als besonders geeignet hat sich die Elektrospray-Massenspektrometrie erwiesen. So gelang es, die Oligomeren aus dem Verdau von Chondroitin-6-sulfat mit testiculärer Hyaluronidase vom Di- bis zum Tetradecasaccharid zu bestimmen.⁵⁰ Hochgeladene Chondroitinsulfat-Disaccharide können noch bei einer Ladungsdichte von 3 Sulfaten und der Carboxylatgruppe charakterisiert werden.⁵⁵ Im Elektrospray-Interface Massenspektrometers des wird eine Lösung der Untersuchungssubstanz elektrostatisch geladen und fein vernebelt. Die entstandenen Flüssigkeitströpfchen werden im Stickstoffgegenstrom getrocknet. Mit Abnahme der Flüssigkeitsmoleküle erhöht sich die Ladungsdichte, so daß es zur Zerteilung in kleinere Flüssigkeitstropfen kommt. Bei weiterem Anstieg der Ladungsdichte kommt es schließlich Emission der Probenionen, die dann durch das elektrische Feld in das zur Massenspektrometer gezogen werden.⁸³ Bei Verwendung von reversed-phase-Ionenpaar-Chromatographie ist sogar eine direkte LC-MS Kopplung möglich. Die zweimalige Durchführung des Experiments, einmal mit Tetrapropylammoniumionhydroxid und einmal mit deuteriertem Ionenpaarreagenz vereinfacht dabei die Interpretation der erhaltenen Spektren.55

1.7 NMR-Spektroskopie zur Untersuchung von Biomolekülen

1.7.1 Skalare Kopplung

Die skalare Kopplung⁸⁴ (J-Kopplung) wird durch die Bindungselektronen zwischen Atomen vermittelt und tritt daher nur zwischen Atomen auf, die durch wenige Bindungen getrennt sind. Die qualitative Auswertung der Kopplung gibt Informationen über die Konnektivitäten, aus der quantitativen können die Torsionswinkel einer Bindung hergeleitet werden. Für ³*J*-Kopplungen läßt sich die Größe des Torsionswinkels mit Hilfe der Karplusgleichung⁸⁵ berechnen:

- ${}^{3}J = A\cos^{2}\theta + B\cos\theta + C$ Gl. 1
- ³J: skalare Kopplungskonstante
- θ : Torsionswinkel
- A,B,C: Karplus-Konstanten

1.7.2 Nuclear Overhauser Enhancement

Die dipolare Kopplung ist einer der T₁-Relaxationsmechanismen, bei der magnetische Information durch den Raum ausgetauscht wird. Wird in einem NMR-Experiment die Resonanz *S* selektiv gesättigt und anschließend das Signal der Resonanz *I* gemessen, ist dieses beim Vorliegen von dipolarer Kopplung gegenüber dem nicht gesättigten Vergleichsspektrum verändert. Dieses wird als *Nuclear Overhauser Enhancement* (NOE) bezeichnet.⁸⁶ Der NOE $\eta_i(s)$ ist definiert als Intensitätsänderung der beobachteten Resonanz *I*:

$$\eta_i(s) = \frac{I - I_0}{I_0}$$
Gl. 2

 I_0 : Signalintensität des Kerns *i* ohne Sättigung von *s*.

I : Signalintensität des Kerns *i* bei Sättigung von *s*.

Ist das Signal *I* größer als das der ungestörten Resonanz I_0 , spricht man von einem positivem NOE, ist *I* kleiner, spricht man von einem negativem NOE. Die Veränderung der Signalintensitäten verdeutlicht das Termschema Abb. 1-7. Bei Störung des thermodynamischen Gleichgewichts durch Sättigung der Resonanz *S* verändern sich auch die anderen Übergangswahrscheinlichkeiten *W*.



Abb. 1-7: Termschema eines Zweispinsystems IS. Wird das thermodynamische Gleichgewicht durch Einstrahlung auf die Resonanz S gestört, verändern sich die Übergangswahrscheinlichkeiten W_x .

Der NOE entsteht durch Null- und Doppelquantenübergänge, die aber nicht direkt beobachtbar sind. Da sich als Folge aber auch die Übergangswahrscheinlichkeiten W_I der Einquantenübergänge ändern, verschieben sich die Intensitäten von Linien, die gut durch Differenzspektroskopie meßbar sind. Bei kleinen, leicht beweglichen Molekülen erfolgt die dipolare Relaxation überwiegend durch den Zweiquantenübergang W_2 , was zu positiven NOEs führt. Bei großen, langsam beweglichen Molekülen überwiegt der Nullquantenübergang W_0 , und man beobachtet negative NOEs.

Die Übergangswahrscheinlichkeiten der einzelnen Quantenübergänge lauten:

$$W_0^{IS} \propto \frac{2\tau_c}{r^6 (1 + (\omega_i - \omega_s)^2 \tau_c^2)}$$
 Gl. 3

$$W_1^{IS} \propto \frac{3\tau_c}{r^6(1+\omega_i^2\tau_c^2)}$$
 Gl. 4

$$W_2^{IS} \propto \frac{12\tau_c}{r^6(1+(\omega_i+\omega_s)^2\tau_c^2)}$$
 Gl. 5

 τ_c : Korrelationszeit

 ω_x : Resonanzfrequenz Kern x

r: Abstand zwischen den Kernen i und s

Unter Berücksichtigung des Auf- und Abbaus der Magnetisierung lassen sich die Übergangswahrscheinlichkeiten in der Solomongleichung zusammenfassen:

$$\eta_I(S) = \frac{\gamma_s}{\gamma_i} \frac{W_2 - W_0}{2W_1^I + W_2 + W_0}$$
Gl. 6

Der Term $W_2 - W_0$ ist Ausdruck der Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Er wird als Kreuzrelaxationsrate σ bezeichnet und beschreibt den Aufbau des NOEs zwischen den Spins.

$$\sigma_{IS} = W_2 - W_0$$
 Gl. 7

Damit ergibt sich die Abhängigkeit des NOE von der Spektrometerfrequenz ω , der gyromagnetischen Verhältnisse γ_s und γ_i sowie der Korrelationszeit τ_c . Diese wiederum korreliert mit der Beweglichkeit des Moleküls, die u.a. eine Funktion von Größe, Temperatur und Viskosität ist. Je nach Korrelationszeit τ_c kann der NOE ein positives oder negatives Vorzeichen aufweisen (Abb. 1-8). Im Bereich des Nulldurchgangs wird nur ein kleiner NOE beobachtet. Dieser Nulldurchgang wird bei einer Spektrometerfrequenz von etwa 500 MHz bei Molekülen mit Molmassen zwischen 1000 und 2000 Dalton beobachtet. Für die Konformationsanalyse von besonderer Bedeutung ist die umgekehrte Proportionalität des

NOEs zur 6ten Potenz des Abstands r, die eine Bestimmung von Protonendistanzen ermöglicht.



Abb. 1-8: Darstellung der Abhängigkeit des NOE von $\omega \tau_C$ für ein homonukleares Zweispinsystem IS.

1.7.3 Transferred NOE

Die Grundlage des *transferred Nuclear Overhauser Effect* (trNOE)⁸⁷ ist eine reversible Wechselwirkung eines Liganden mit einem Protein. Betrachtet man nun einen kleinen Liganden, so weist dieser in Lösung zunächst einen positiven NOE auf (vgl. Abschnitt 1.7.2).

Während der Ligand an das Protein gebunden ist, ist er aufgrund der Linienverbreiterung nur schwer zu beobachten. Trotzdem wirkt auch während dieser Zeit die dipolare Relaxation, nur diesmal mit den Korrelationszeiten eines schweren Moleküls. Nach Freisetzung des Liganden kann dieser wieder mit geringer Linienbreite in Lösung beobachtet werden. Der NOE wird dabei durch die mit dem Molenbruch gemittelte Kreuzrelaxationsrate $\langle \sigma \rangle$ im freien und gebundenen Zustand bestimmt. Da der negative NOE aber viel größer ist, wird für bindende Moleküle ein Vorzeichenwechsel des NOEs beobachtet. Das vorrangige Anwendungsgebiet für den trNOE war bislang die Konformationsanalyse von Liganden im gebundenen Zustand und das Modelling der Bindungsstelle.⁸⁸

Meyer, Weimar und Peters konnten vor einiger Zeit zeigen, daß trNOE Experimente auch eingesetzt werden können, um bindende von nicht bindenden Liganden zu unterscheiden.⁸⁹ Verwendet man eine Bibliothek von Liganden mit postivem NOE (Abb. 1-9) und führt ein

NOE-Experiment in Anwesenheit von Protein durch, so werden im Spektrum die bindenden Liganden einen negativen NOE aufweisen.



Abb. 1-9: Ligandenbibliothek und Protein. Nur ein Ligand kann mit der Assoziationsrate k_{on} an das Protein binden. Wird der Ligand mit der Dissoziationsrate k_{off} wieder freigesetzt, so ist er mit dem negativen Vorzeichen des NOE gelabelt und kann in Lösung detektiert werden.

Wichtig ist, daß der Ligand mit dem Protein eine reversible Wechselwirkung eingeht und ein hinreichender Austausch mit dem ungebundenen Zustand stattfindet. Ist die k_{off} -Rate zu groß und bindet der Ligand nur schwach, so beobachtet man die Resonanzen des freien Liganden, ist k_{off} zu klein und wird die Bindungsstelle irreversibel blockiert, erfolgt kein Ausausch mehr mit der Lösung und man beobachtet nur noch die gelösten Liganden; der gebundene Ligand selber kann aufgrund seiner großen Linienbreite im Regelfall nicht vermessen werden.

1.7.4 Saturation transfer difference NMR-Spektroskopie

Eine weitere Möglichkeit, mittels NMR-Spektroskopie bindende Liganden aus einer Mischung zu identifizieren, nutzt die intermolekulare Spindiffusion, also den Austausch bzw. die Weiterleitung magnetischer Information durch den Raum. Proteinresonanzen lassen sich beispielsweise unterdrücken, indem ein diskretes Proteinsignal gesättigt wird. Durch intramolekulare Spindiffusion wird die Magnetisierung auf das Gesamtprotein übertragen. Ein anschließendes NMR-Experiment mit 90° Puls und anschließender Detektion liefert kaum noch Signale des Proteins, weil durch die Vorsättigung die einheitliche Orientierung aller Proteinresonanzen entlang des äußeren Feldes zerstört wurde.

Akasaka konnte für das System ADP - Myosin zeigen, daß nach Anregung des Proteins die Magnetisierung auf die bindenden Liganden übertragen wird.⁹⁰ Nach Vorsättigung des Myosins waren nicht nur die NMR-Signale des Proteins, sondern auch die des bindenden Liganden im Vergleich zu einem Standard NMR-Experiment deutlich vermindert. Eine einfache Auswertung ist allerdings aufgrund der nur schwer vergleichbaren Signaländerung nicht möglich.

Durch die von Mayer et al. entwickelte saturation transfer difference NMR-Spektroskopie⁹¹ wird die Auswertung der Spektren drastisch vereinfacht. Dazu werden abwechselnd Spektren mit und ohne Vorsättigung des Proteins aufgenommen. Durch anschließende Subtraktion der beiden Spektren werden die Signale detektiert, bei denen der Sättigungstransfer eingetreten ist. So können im Idealfall die bindenden Liganden anhand ihrer Spektren identifiziert werden. Dieser Ansatz ermöglicht es, saturation transfer difference Spektren mit fast allen NMR-Pulssequenzen, wie z.B. TOCSY oder HMBC, aufzunehmen. Dazu muß lediglich das Pulsprogramm um einen Teil zur Vorsättigung ergänzt und anschließend die Differenz aus dem mit und ohne Vorsättigung aufgenommenem Spektrum bestimmt werden. Zur Vermeidung von Artefakten hat es sich dabei bewährt, auch das Vergleichsspektrum mit dem gleichen Pulsprogramm aufzunehmen, wobei die Vorsättigung in einem Bereich erfolgt, in dem keine Resonanzen auftreten (z.B. 20 ppm - 40 ppm). Praktisch werden jeweils alternierend Spektren mit einer Vorsättigung im Bereich von Proteinresonanzen (onresonance) und in einem Bereich, in dem keine Resonanzen liegen, (off-resonance) aufgenommen und anschließend die Differenz berechnet. Durch diese Technik können Artefakte, die bei längeren Messungen durch eine geringe Veränderung der Meßbedingungen möglich sind, minimiert werden.⁵⁶

1.7.5 NMR-spektroskopische Untersuchungen von Glycosaminoglycanen

Die NMR-chemischen Verschiebungen für eine Vielzahl von Glycosaminoglycanen sind bereits veröffentlicht, so die Verschiebungen von Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat⁹² sowie Heparin.⁹³ Die Daten der synthetisch hergestellten Oligomere sind ebenfalls bekannt (s. z.B. Zitate in Abschnitt 1.3).

Bei der Strukturaufklärung unbekannter Glycosaminoglycan-Strukturen spielt die NMR-Spektroskopie eine wichtige Rolle. Insbesondere die ¹³C-Spektroskopie kann Hinweise auf die Position der Sulfatgruppen geben.⁹⁴ Zugeordnet wurden beispielsweise die Spektren von Tetrasacchariden aus der Zersetzung von Chondroitinsulfat mit Hyaluronidase⁹⁵ sowie die Spektren von Chondroitinase-resistenten Tri-⁹⁶ und Tetrasacchariden.^{59, 97} Eine Vielzahl von Arbeiten beschäftigt sich mit der Strukturaufklärung von Heparinfragmenten,^{98,99} wobei auch noch die Resonanzen von Octasacchariden zugeordnet werden konnten.⁶⁰

NMR-spektroskopische Untersuchungen der Konformationen wurden beispielsweise für ein Hyaluronat-Octasaccharid,¹⁰⁰ für polymeres Chondroitinsulfat^{92, 101, 102} und für Chondroitinsulfat-analoge Disaccharide¹⁰³ durchgeführt. Bei diesen Messungen zeigte sich, daß der zu erwartende Abstand zwischen den Sulfatgruppen geringer war, als aufgrund der Ladungen zu erwarten. Durch die Messung von ¹³C-Relaxationszeiten war es auch möglich, die molekulare Bewegung von Proteoglycanen im tierischen Gewebe zu messen. Die volle Lösungsstruktur von Heparin konnte von Mulloy et al. durch NMR-Spektroskopie bestimmt werden.¹⁰⁴ Bei der Konformationsanalyse von Heparin steht die Frage nach der Konfomation der Iduronsäure im Vordergrund.¹⁰⁵ Die Lösungskonformation von Heparintetramer mit vier Sulfatgruppen wurde unter Berücksichtigung der vollen Relaxationsmatrix bestimmt. Bei der Meßtemperatur von 5 °C lag die Korrelationszeit für die Rotation bei 0.4 ns.¹⁰⁶

Von besonderem Interesse ist die Konformationsanalyse in Abhängigkeit vom jeweiligen Gegenion; dabei ist aber zu berücksichtigen, daß es zusätzlich zur ionischen Wechselwirkung auch zu einer Chelatisierung von Metallkationen durch die Hydroxidfunktionen der Kohlenhydrate kommen kann.¹⁰⁷ NMR-Messungen mit verschiedenen Ionen wurden von Rabenstein durchgeführt, bei Messungen mit Natrium kann dessen chemische Umgebung durch ²³Na-Spektroskopie aufgeklärt werden.¹⁰⁸

1.8 Theoretische Konformationsanalyse

Die eindeutige Bestimmung der Konformation allein auf experimenteller Basis stößt auf große Schwierigkeiten. Aus den NMR-Experimenten können zwar anhand der Kopplungskonstanten Aussagen über die Bindungswinkel gemacht werden, aber diese lassen vielfach keine eindeutige Winkeldefinition zu. Die NOE-Daten, die eine Funktion des Abstandes sind, sind zum Teil fehlerbehaftet und liegen meist auch nur für einen Teil der Protonen vor. Aussagen über die Position nicht NMR-spektroskopisch faßbarer Atome wie der Sulfatgruppen sind nur indirekt über die benachbarten ¹H- und ¹³C-Atome möglich.

Auch die Röntgenstrukturanalyse stößt an Grenzen: Die Messungen können nur im kristallinen Zustand durchgeführt werden, Aussagen über Protonenorientierungen sind aus den Messungen meist nicht möglich. Beiden Methoden gemeinsam ist, daß beim Auftreten von Mittelungseffekten durch Flexibilität von Seitenketten häufig keine direkte Aussage mehr möglich ist.

Daher stellen theoretische Modelle eine wichtige Hilfe zur Untersuchung der Konformation dar. Eine Beschreibung des Konformationsraumes kann durch Computersimulationen erfolgen. In der *Metropolis-Monte-Carlo*-Simulation (MMC)¹⁰⁹ wird der Konformationsraum energiekontrolliert in zufälligen Schritten durchmustert. Ausgehend von einer Startkonformation wird eine leicht veränderte neue Konformation generiert, deren Energie bestimmt wird.¹¹⁰ Diese wird akzeptiert, wenn ihre Energie niedriger ist als die der vorherigen Konformation. Liegt die Energie der neuen Konformation höher, so wird durch Boltzmann-Stastik die Wahrscheinlichkeit dieses Schrittes bestimmt. Dann kann durch eine Zufallszahl bestimmt werden, ob die neue Konformation akzeptiert wird.

Das Programm GEGOP (*Geometry of Glycoproteins*) wurde von Stuike-Prill und Meyer für die Konformationsanalyse von Glycoproteinen entwickelt.¹¹¹ GEGOP basiert auf dem *rigid body*-Konzept und berücksichtigt nur Rotationsfreiheitsgerade inklusive der glycosidischen Bindung. Es kombiniert im Kohlenhydratanteil eine modifizierte Version des HSEA-Kraftfeldes (*Hard Sphere Exo-Anomeric*)¹¹² mit dem ECEPP/2-Kraftfeld¹¹³ für den Proteinanteil. Der Konformationsraum kann entweder systematisch, mit Minimierungsalgorithmen oder durch *Metropolis-Monte-Carlo-*Simulation (MMC)¹⁰⁹ abgetastet werden.

Im Gegensatz zur MMC-Methode wird in der *Molecular-Dynamics*-Simulation (MD) die Bewegung der Atome beobachtet.^{110, 114} Dazu werden in diskreten Zeitabständen die klassischen Newtonschen Gleichungen für jedes Atom gelöst. Jedes Atom besitzt zu einem Zeitpunkt t genaue Koordinaten im Raum sowie eine Geschwindigkeit. Durch Bestimmung der Wechselwirkungen mit benachbarten Atomen können die Kräfte auf dieses Atom berechnet werden. Diese Daten zusammen ergeben eine neue Geschwindigkeit, aus der dann der Aufenthaltsort zum nächsten Zeitpunkt berechnet werden kann. Ein solches *Molecular-Dynamics*-Programm steht beispielsweise im Programm *Sybyl*¹¹⁵ zur Verfügung, wobei unterschiedliche Kraftfelder benutzt werden können.

2 **Problemstellung**

Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung, Reinigung und NMR-spektroskopische Untersuchung von Glycosaminoglycanen, wobei insbesondere der Einfluß des Sulfatierungsmusters auf die Struktur und die Wechselwirkungen mit Proteinen bestimmt werden soll.

Zur Durchführung der geplanten NMR-Experimente ist es nötig, zunächst das polymere Chondroitinsulfat zu spalten, um so kleinere Oligosaccharide zu erhalten. Zur genauen Untersuchung die einzelnen, unterschiedlich sulfatierten Oligomere müssen chromatographisch isoliert werden. Anschließend sollen die erhaltenen Proben spektroskopisch charakterisiert und exemplarisch die Konformationen an den glycosidischen Bindungen der Tetrasaccharide bestimmt werden, die die Sulfatgruppe entweder an den 4oder an den 6-Positionen tragen.

In zweiten Teil der Arbeit soll geprüft werden, ob sich zwei NMR-Verfahren, *transferred Nuclear Overhauser Effect* und *saturation transfer difference* Spektroskopie, zur Bestimmung und Analyse der Bindung von Glycosaminoglycan-Bibliotheken an Proteine eignen. Als erstes Untersuchungssystem wurde Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide / Hyaluronidase ausgewählt, das bereits im ersten Teil der Arbeit verwendet wurde. Als komplexes aktuelles Beispiel aus der medizinischen Forschung soll die Wechselwirkung von Heparinoligosacchariden mit Interleukin-8, einem Chemokin, untersucht werden.

3 Präparation von Chondroitinsulfat-Oligosacchariden

3.1 Struktur der untersuchten Chondroitinsulfat-Oligosaccharide

In dieser Arbeit wurde eine Reihe von disulfatierten Chondroitinsulfat-Tetrasacchariden sowie das Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid isoliert. Die Struktur des Disaccharids ist in Abb. 3-1 dargestellt. Diese Struktur ist das Grundgerüst eines polymeren Chondroitinsulfats, das alternierend aus Glucuronsäure und sulfatiertem N-Acetylgalactosamin aufgebaut ist.



Abb. 3-1: Struktur von Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid β -D-GlcA-(1-3) -D-(4-O-SO₃)-GalNAc.

In den Chondroitinsulfat-Tetrasacchariden (Abb. 3-2) sind zwei dieser Einheiten miteinander verknüpft. Die Sulfatierungspositionen sind mit X bzw. Y gekennzeichnet, wobei die Indices jeweils dem 4- und 6-Sulfat entsprechen.



Abb. 3-2: Struktur der untersuchten Chondroitinsulfat-Tetramere. Die Positionen X_n und Y_n können sulfatiert sein, wobei die in dieser Arbeit untersuchten Zucker jeweils an einer Position X und an einer Position Y eine Sulfatgruppe tragen. Diese Zucker liegen in der reduzierenden Form, also als α,β -Gemische vor. Zum Beispiel bezieht sich die verkürzte Bezeichnung 4S6S auf ein Tetrasaccharid, dessen N-Acetylgalactosamin III an Position 4 sulfatiert ist (X₄ = OSO₃⁻, X₆ = OH), und dessen N-Acetylgalactosamin I an Position 4 sulfatiert ist Y₄ = OH, Y₆ = OSO₃⁻). Zur Vereinfachung wird im folgenden eine Nomenklatur für die Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide verwendet, die sich ausschließlich auf die Position der Sulfatgruppen bezieht. Die allgemeine Form lautet xSyS, wobei x und y jeweils die Position der Sulfatgruppen angeben. Die Abkürzung 4S4S steht für das an beiden 4-Positionen sulfatierte Tetrasaccharid, beim Zucker 4S6S liegt entsprechend am reduzierenden Ende das 6-Sulfat vor.

Einige der Tetrasaccharide wurden auch reduziert isoliert. Die allgemeine Formel ist in Abb. 3-3 dargestellt. Für die reduzierten Zucker wird die gleiche Kurzschreibweise wie für die reduzierenden verwendet, allerdings wird am Ende ein -ol angehängt. So bezeichnet 6S4S-ol das reduzierte Chondroitinsulfat-Tetrasaccharid, dessen internes N-Acetylgalactosamin III in 6-Position, und dessen terminales Galactosamin I in 4-Position sulfatiert ist.



Abb. 3-3: Struktur der untersuchten reduzierten Chondroitinsulfat-Tetramere. Die Nomenklatur ist analog zu den nicht reduzierten Zuckern, nur wird ein -ol angehängt, z.B. 4S4S-ol für X_1 , $Y_1 = OSO_3^-$ und X_2 , $Y_2 = OH$.

3.2 Spaltung des Chondroitinsulfats

3.2.1 Spaltung mit Hyaluronidase

Die Spaltung des Chondroitinsulfats erfolgte mit testikulärer Hyaluronidase (Hyaluronat-4glucuronathydrolase). Dieses Enzym spaltet die interne 1,4-Bindung zwischen N-Acetyl-β-Dglucosaminen bzw. -galactosaminen und Glucuronaten. Hyaluronidase ist eine Hydrolase, als Produkte entstehen Oligomere mit Aminozuckern am reduzierenden und Glucuronsäuren am nicht reduzierenden Ende.⁴⁵ Die Hyaluronidase zeigt eine ausgeprägte Transglycosidaseaktivität. Diese begrenzt die Einsatzmöglichkeiten dieses Enzyms in der Analytik, da sich im Laufe einer Zersetzung Oligomere mit nicht authentischer Sequenz bilden können.⁴⁶

Das Glycosaminoglycan wird bei pH 5 in Gegenwart von Natriumchlorid und –sulfat bei 37 °C verdaut.⁴⁵ Der Verlauf der Zersetzung kann durch Ausschlußchromatographie

überwacht werden. Bei dieser chromatographischen Technik erfolgt eine Trennung nach Molekülgröße, die Elution erfolgt in umgekehrter Reihenfolge der Molekülgröße. In Abb. 3-4 sind Ausschlußchromatogramme einer typischen Zersetzung mit Hyaluronidase abgebildet. Mit zunehmender Inkubationszeit wird das Chondroitinsulfat-Polymer weiter abgebaut und die niedrigeren Oligomere werden gefunden.



Abb. 3-4: Ausschlußchromatogramme der Spaltung von polymeren Chondroitin-4-sulfat mit Hyaluronidase (zunehmende Elutionszeit entspricht abnehmender Molekülgröße). Zum Beginn der Spaltung und nach einer Inkubationszeit von 4 und 30 Stunden wurden jeweils Proben entnommen. Nach Abschluß der Spaltung wurde das Protein im kochenden Wasserbad denaturiert und abgetrennt. Die Probe t = 0 enthält nur das Polymer, die Breite des Peaks ist ein deutliches Indiz für die heterogene Kettenlänge des Polymeren. Nach 4 Stunden Verdau hat die Konzentration der Polymere deutlich abgenommen und es sind bereits geringe Mengen Tetrasaccharid entstanden (Pfeil). Deren Menge nimmt im Verlauf der Spaltung weiter zu, in geringer Konzentration wird auch Disaccharid gebildet (ca. 130 min). Die Detektion erfolgte mit einem Brechungsindexdetektor, der Peak bei ca. 165 min wird durch die Puffersalze hervorgerufen. Die Trennung der Proben erfolgte auf einer Biorad P2 Gel Säule, Eluent ist 0.1 M Natriumchloridlösung.

Knudson et al. haben den Einfluß von Salzkonzentration und pH-Wert auf den Verlauf der Zersetzung untersucht.⁴⁷ Dabei fanden sie, daß unter den Bedingungen pH 5, 0.2 M Salzkonzentration bei 37 °C die Hydrolyserate von Chondroitin-4-sulfat 1.5-mal höher war als die von Chondroitin-6-sulfat. Wurde der gleiche Versuch bei pH 6 und 45 °C ohne zusätzliche Salzzugabe durchgeführt, stieg das Verhältnis auf das achtfache an. Gleichzeitig stieg die durchschnittliche Kettenlänge der gebildeten Oligomere.

In eigenen Experimenten konnte die unterschiedliche Spaltung qualitativ bestätigt werden: Die Menge an 6-sulfatiertem Zucker ist anteilig deutlich vermindert. Für die Präparation von 4-Sulfaten bieten diese Assaybedingungen den Vorteil, daß sich die Reinigung durch den geringeren Gehalt an 6-sulfatierten Oligomeren vereinfacht.

Gleichzeitig ist aber die Gesamtausbeute an Tetrasaccharid bei pH 6 geringer als unter den pH 5 Bedingungen und somit auch die Ausbeute der 4-Sulfate. Da die Stabilität der Hyaluronidase unter diesen Bedingungen nicht ausreicht, um eine weitergehende Zersetzung zu erreichen, wurde nach ungefähr der halben Inkubationszeit eine zweite Portion Enzym zugegeben und so die Ausbeute an Tetrasacchariden erhöht.

Nach Abschluß der Zersetzung, die chromatographisch bestätigt wurde, wird das Enzym durch einminütiges Kochen denaturiert und kann danach durch Zentrifugation gut abgetrennt werden, wie das Chromatogramm in Abb. 3-5 zeigt.



Abb. 3-5: Ausschlußchromatogramm eines Verdaus von polymerem Chondroitin-4-sulfat mit Fractogel HW40S vor (dicke Linie) und nach (dünne Linie) Denaturierung und Abtrennung der Hyaluronidase. Eluent ist 0.1 M Natriumsulfat, die Flußrate beträgt 0.5 mL/min.

3.2.2 Spaltung mit Chondroitinase

Die Chondroitinase ist im Gegensatz zur Hyaluronidase eine Lyase und spaltet die glycosidische Bindung unter Eliminierung. Die bei der Spaltung entstehende Doppelbindung, die benachbart zur Carboxylatgruppe angeordnet ist, absorbiert bei ca. 232 nm. Daher kann der Verdau photometrisch überwacht werden. In Abb. 3-6 ist die Zeitabhängigkeit der UV-Absorption dargestellt.



Abb. 3-6: Verlauf der Spaltung von Chondroitinsulfat mit der Lyase Chondroitinase. Die Spaltung führt zur Ausbildung einer Doppelbindung in Nachbarschaft zur Carboxylat-Die Absorption gruppe. dieses Systems kann bei 232 nm detektiert werden und gibt den Fortschritt der Spaltung an.

Chondroitinase baut im Gegensatz zur Hyaluronidase Chondroitinsulfat vorrangig bis zum Disaccharid ab. Die so erzeugten niederen Oligomere waren sehr hilfreich bei der Methodenentwicklung für die Ausschlußchromatographie. Unklarheiten über die Zuordnung von Dimeren, Tetrameren und Acetaten in den Chromatogrammen konnten durch den Vergleich mit dem stark Disaccharid-haltigen Produkt des Verdaus mit Chondroitinase aufgeklärt werden.

3.2.3 Reduktion der Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide

Die Oligosaccharide, die durch Spaltung mit Hyaluronidase gebildet werden, sind reduzierende Zucker und liegen als α/β -Mischungen vor. Durch die Reduktion des Zuckers sollte sich daher die Trennung und NMR-Analyse der Zucker erleichtern.

Die Reduktion der Chondroitinsulfat-Tetrameren erfolgt durch Reaktion mit Natriumborhydrid in alkalischer Lösung; anschließend wird durch Ansäuern überschüssiges Hydrid zerstört. Für diese Reaktion existieren eine Vielzahl von Arbeitsvorschriften, verwendet wurde eine Kombination nach Shibata et al.⁶⁷ und Karamanos et al.⁷⁰ Da mit großen Hydridüberschüssen gearbeitet wird, ist die Reaktion sehr robust und zuverlässig, eine explizite Reaktionsüberwachung erwies sich als nicht erforderlich.

Durch die Pufferzugabe für die pH-Änderungen zwischen alkalischen und sauren Bedingungen sowie die hohe Hydridkonzentration ist der Salzgehalt am Ende der Reaktion sehr hoch, daher muß normalerweise für eine NMR-spektroskopische Charakterisierung eine aufwendige Entsalzung durchgeführt werden. Die Durchführung der Reduktion des Rohverdaus nach Abtrennung der denaturierten Hyaluronidase erwies sich als optimal, da durch die anschließende Ausschlußchromatographie die separate Entsalzung überflüssig wurde. Als Folge der hohen Salzkonzentration in der Probe kommt es dabei zwar zu Peakverschiebungen gegenüber salzfreien Proben, diese sind jedoch innerhalb einer Reihe reproduzierbar und stören daher nicht.

3.3 Reinigung der Proben

3.3.1 Ausschlußchromatographie

Der erste Reinigungsschritt auf dem Weg zu reinen Tetrasacchariden ist die Isolation der Tetramere. Diese erfolgt durch Ausschlußchromatographie. Zur Methodenentwicklung wurden aus verschieden Säulenmaterialien jeweils HPLC-Säulen gepackt. Mit kleiner Beladung (ca. 0.1 - 1 mg, 0.3 mL) und niedriger Flußrate wurden die Elutionsvolumen für unterschiedliche Eluenten ermittelt. In Tab. 3-1 sind die Säulen tabellarisch zusammengefaßt.

Name	Material	Größe	Volumen	Trennbereich
		[mm x mm]	[mL]	(nominell)
HW40S (Merck)	Methacrylat Copolymer mit Ethlyglycol	250 x 25	122.7	100-10000
HW50S (Merck)	Methacrylat Copolymer mit Ethlyglycol	300 x 21	103.9	500-80000
P2 (Biorad)	Polyacrylamid	130 x 20	40.8	100-1800
G10 (Pharmacia)	Dextran vernetzt mit Epichlorhydrin	130 x 20	40.8	< 700
G2000SW (TSK)	Silica	300 x 7.5	13.3	1000-30.000

Tab. 3-1: Daten der für die Ausschlußchromatographie getesteten Säulen.

Bei diesen Vorversuchen gaben die Säulen mit Fractogel HW40S und P-2 Gel die besten Trennungen. Der optimale Trennbereich der Fractogel HW50S und G2000SW Säulen lag über den Tetrameren. Zu Vergleichszwecken wurden die beiden Fraktogelsäulen in Serie geschaltet, wodurch sich der Trennbereich deutlich vergrößern läßt. Der Auflösungsgewinn betraf aber vor allem die höheren Oligomere, das Tetrasaccharid wurde kaum besser separiert.
Mit der Pharmacia G10 Säule konnten nur die Oligomere und Salz gut separiert werden, die Auflösung zwischen Tetra- und Hexasaccharid war relativ schlecht. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die G10 Säule anschließend für die Entsalzungen verwendet.

Eine besonders gute Trennung zeigt Abb. 3-7, die mit der frisch gepackten Fractogel HW40S Säule bei sehr langsamer Flußrate und hoher Salzkonzentration durchgeführt wurde. (Hyaluronidase spaltet normalerweise nur bis zum Tetrameren, daher die geringe Intensität des Dimerenpeaks.)



Abb. 3-7: Ausschlußchromatogramm eines Hyaluronidase-Verdaus von polymerem Chondroitin-4sulfat an Fractogel HW40S. Aufgetragen ist die UV-Absorption bei 215 nm gegen das Elutionsvolumen seit Injektion. Der Pfeil zeigt das Tetrasaccharid. Das Hexasaccharid ist bereits mit höherem Oligomerem verunreinigt. Die Flußrate beträgt 0.25 mL, Eluent ist 1 molare Natriumchlorid-Lösung.

Zur Bestimmung der optimalen Betriebsparameter wurden weitere Experimente durchgeführt. Die Variation des Salzgehaltes zeigte für die getesteten Eluenten Natriumchlorid und -sulfat sowie Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung ein praktisches Optimum bei ca. 0.1 molarer Konzentration. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 0.5 – 1 mol/L ergab zwar eine geringfügig bessere Auflösung, jedoch ist ein derartig hoher Salzgehalt für das präparative Arbeiten ungeeignet. Eine Trennung mit reinem Wasser als Eluenten ist auf der HW40S Säule kaum möglich, alle Oligomeren eluieren innerhalb einer breiten Bande. Die Erklärung für dieses Verhalten liegt vermutlich in der unterschiedlichen Ionenstärke der Eluenten begründet. Ist die Ionenstärke zu gering, bauen sich um die geladenen Chondroitinsulfat-Oligomere relativ große Wassercluster auf, die die Diffusionfähigkeit in die Poren stark herabsetzen. Die vielfach empfohlene Zugabe von Alkohol zur Schwächung eventueller hydrophober Wechselwirkungen scheint für die Trennung von Chondroitinsulfat auf Fractogel und P2 Gel unnötig zu sein, zumindest wurde visuell keine Auflösungsverbesserung festgestellt. Allerdings reduzierte die Zugabe von Isopropanol die Elutionsvolumina der Oligosaccharide deutlich (Abb. 3-8). Als Erklärung dafür ist denkbar, daß die relativ hydrophoben Poren durch die Anwesenheit des vergleichsweise unpolaren Alkohols für die ionischen Zucker zunehmend unzugänglich werden.



Abb. 3-8: Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom Isopropanolgehalt des Eluenten. Der Eluent ist in allen Fällen 0.1 M Natriumchlorid-Lösung mit dem angegebenen Isopropanolgehalt, das Säulenmaterial ist Fractogel HW 40 S.

In Abb. 3-9 ist die Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom pH-Wert der Lösung dargestellt. Eine Trennung bei pH 3 ist für den praktischen Einsatz sicherlich nicht brauchbar, da es bei diesem pH-Wert bei längerer Elutionszeit zur Zersetzung des Chondroitinsulfats kommt.



Abb. 3-9:Abhängigkeit des Elutionsvolumens vom pH des Eluenten. Der Eluent ist in allen Fällen0.1 M Natriumphosphat-Lösung mit dem angegebenen pH-Wert.

Zusammenfassend gilt, daß wäßrige 0.1 molare Natriumsulfat, -chlorid und -phosphat sowie Ammoniumhydrogencarbonat-Lösungen grundsätzlich als Eluenten geeignet sind, die Unterschiede in der Trennleistung sind eher marginal. Daher wurden zur präparativen Reinigung der Tetrasaccharide eine präparative Biorad-P2 Schwerkraftsäule mit einem Volumen von 460 mL sowie die HW-40 S Säule (120 mL) eingesetzt. Aufgrund ihrer einfachen Vakuumflüchtigkeit wurde 0.1 molare Ammoniumhydrogencarbonatlösung als Eluent verwendet. Die Beladbarkeit der HW-40 Säule ist wegen des geringeren Volumens deutlich geringer als das der Schwerkraftsäule. Daher wurde eine Mehrfachinjektion durch die automatische Probenaufgabe der HPLC benutzt, wobei eine gute Reproduzierbarkeit erreicht wurde. In Abb. 3-10 sind die UV-Chromatogramme von 4 hintereinander folgenden HPLC-Läufen übereinander dargestellt.



Abb. 3-10: Präparative Ausschlußchromatographie durch Mehrfachinjektion. Dargestellt ist die UV-Spur bei 215 nm für 4 sequentielle Läufe.

3.3.2 Ionenaustausch-Chromatographie

Die weitere Reinigung der Tetramere nach Ladung und Ladungsmuster kann durch Ionenaustausch-Chromatographie erfolgen. Die Anionenaustauscher tragen kationische Gruppen, an die zunächst die anionischen Gruppen der zu trennenden Substanzen binden. Dabei wird zwischen starken Anionenaustauschern, die quartäre Ammoniumgruppen tragen, und schwachen Anionenaustauschern mit tertiären Aminogruppen unterschieden. Letztere zeigen aufgrund des unterschiedlichen Protonierungsgrades eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit. Wird der Salzgehalt durch Gradientenelution erhöht, so werden die Probenionen in der Reihenfolge ihrer Ladung verdrängt und eluieren. Weitere Unterschiede im Elutionsverhalten verschiedener, aber gleichgeladener Substanzen folgen aus der unterschiedlichen Zugänglichkeit der ionischen Gruppen und aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial.^{57, 65} In Tab. 3-2 sind die Daten der verwendeten Anionenaustauschsäulen zusammengefaßt.

Name	Größe	Volumen
	[mm x mm]	[mL]
Beckman QHyperD	100 x 4.6	1.7
PerSeptive Poros PI	100 x 4.6	1.7
PerSeptive Poros HQ	100 x 4.6	1.7
Macherey & Nagel Nucleosil SB 5	250 x 4	3.1
Macherey & Nagel Nucleosil SB 5	250 x 10	19.6
Merck Carbopack- NH_2	250 x 4.6	4.2

Tab. 3-2: Daten der für die Ionenaustauchchromatographie getesteten Säulen.

Mit keiner der untersuchten Säulen gelang die vollständige Basislinientrennung der untersuchten Tetramere. Im Hinblick auf die unterschiedliche Retention auf den einzelnen Säulen ist daher eine quantitative Aussage über die Qualität der einzelnen Säulen nicht möglich.

Bei einem Vergleich der starken Anionenaustauscher nimmt die Retentionsstärke von Poros HQ über QHyperD zur Nucleosil SB Säule hin zu, wie Tab. 3-3 zeigt. Eine ähnliche Reihenfolge zeigt sich auch bei der Trennleistung, wobei unklar blieb, zu welchem Anteil dieser Unterschied aus dem größeren Volumen der Nucleosil SB Säule folgt.

Durch Chromatographie des Disaccharidpeaks eines Hyaluronidase-Verdaus von Chondroitinsulfat A (vgl. Abb. 3-4) auf der Nucleosil SB Säule konnte ein Peak bei 0.19 M (QHyperD 0.14 M) Natriumsulfatlösung isoliert werden (Gradient 0.1 M bis 0.5 M, 50 mL). Dieser Peak wurde als Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid identifiziert (NMR s.u.). Auch hier zeigt sich wieder die stärkere Retentionsfähigkeit der Nucleosil Säule. Tab. 3-3:Elutionvondi-4-sulfatiertemChondroitinsulfat-TetrasaccharidbeiEinsatzunterschiedlicher Säulen. Der Eluent ist 0.5 M Natriumsulfatlösung mit einem Gradienten
von 0 - 100 % in 50 mL. Die jeweilige Flußrate ist in der Tabelle angegeben.

Säule	Flußrate	Konzentration	Leitfähigkeit
	[mL/min]	[M]	[<i>mS</i>]
Poros HQ	4	0.19	19.7
QHyperD	2	0.27	25.6
Nucleosil SB	0.8	0.40	32.6

In weiteren Experimenten wurden unterschiedliche Eluenten getestet. Dabei zeigte sich Natriumchlorid-Lösung als Eluent am besten geeignet, da einerseits die Elutionskraft höher ist als die einer gleichmolaren Natriumphosphat oder -sulfatlösung, andererseits das Molgewicht geringer ist. Damit wird die im nächsten Schritt zu entfernende Salzfracht verringert und die Entsalzung vereinfacht. Zur Stabilisierung des pH-Wertes war 0.1 M Natriumphosphatpuffer anwesend. Die Phosphatkonzentration bleibt während des Gradienten konstant.

Interessanterweise konnte nicht nur für die schwachen, sondern auch für die starken Ionenaustauscher eine – wenn auch geringe – Abhängigkeit vom pH-Wert beobachtet werden (Abb. 3-11). Offensichtlich ist bei pH 4 der Zucker schon so weit deprotoniert, daß eine weitere Erhöhung des pH-Wertes keinen weiteren Einfluß auf seine ionische Bindungsfähigkeit hat.



Abb. 3-11: Abhängigkeit der Elution des reduzierten disulfatierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids
4S4S-ol von dem pH-Wert bei Verwendung einer analytischen QHyperD Säule.
Aufgetragen ist die Natriumchloridkonzentration in mol/L bei einem Gradienten von
0.1 M Natriumchlorid / 0.1 M Natriumphosphat nach 0.5 M Natriumchlorid / 0.1 M
Natriumphosphat in 10 min bei einer Flußrate von 2 mL/min.

Bei Verwendung eines Gradienten, der mit 0 Prozent des jeweiligen Eluentensalzes startet, zeigt der Leitfähigkeitdetektor einen ungleichmäßig geformten Kurvenverlauf. Dieses liegt vermutlich darin begründet, daß zunächst freie und durch leicht verdrängbare Ionen wie Hydroxid belegten Bindungsstellen des Rezeptors besetzt werden und dadurch die Konzentration des Eluentensalzes vermindert wird. Dieser Effekt kann durch Vormischung des Eluenten fast vollständig unterdrückt werden.



Abb. 3-12: HPLC-Chromatogramme der reduzierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide aus der Spaltung von polymerem Chondroitinsulfat A und Chondroitinsulfat C. Bei ca. 10 min eluieren die disulfatierten Tetramere. Die Peaks bei 8 min rühren mutmaßlich von monosulfatierten, die bei 12.5 min von trisulfatierten Tetrasacchariden. Zur Trennung wurde eine QHyperD Säule verwendet, der Gradient beginnt bei 0.1 M Natriumchlorid / 0.1 M Natriumphosphat und steigt innerhalb von 10 min auf 0.5 M Natriumchlorid / 0.1 M Natriumphosphat bei einer Flußrate von 2 mL/min.

Die Unterschiede zwischen dem überwiegend 4-sulfatierten Chondroitinsulfat A und dem zu 90 % in Position 6 sulfatierten Chondroitinsulfat C sind deutlich zu erkennen. Die Spaltung des Chondroitinsulfat C gibt ebenfalls einen sehr hohen Anteil 4-sulfatierter Verbindung, da die Hyaluronidase diese Position vorrangig spaltet. Die Elutionsreihenfolge der identifizierten Tetrasaccharide ist in Tab. 3-4 zusammengefaßt.

Eine weitere Reinigung der erhaltenen Fraktionen ist nach Entsalzung durch Verwendung von schwachen Ionenaustauschern (Aminosäule) bei pH 7 möglich. Durch den relativ hohen pH-Wert ist die Retentionskraft der Aminogruppen soweit vermindert, daß schon geringe Salzkonzentrationen zur Trennung ausreichen.

Tab. 3-4:	Elutionsreihenfolge	der	disulfatierten	Tetrasaccaride	bei	Elution	mit	dem	oben
	beschriebenen Natriu	ımph	ophat/Natriumc	chloridsystem bei	pH 7	7.			

reduzierende Tetrasaccharide	reduzierte Tetrasaccharide
4S6S	4S4S-ol
*	6S4S-ol
4S4S	4S6S-ol
6S4S	6S6S-ol

Sugahara et al. fanden das reduzierende Tetrasaccharid 6S6S gemeinsam mit 4S6S.⁹⁵ In den . eigenen Arbeiten gelang keine hinreichende Trennung in diesem Bereich.

Durch Mehrfachinjektion gelang es, auch auf analytischen Säulen hinreichend große Substanzmengen für NMR-spektroskopische Untersuchungen zu erhalten. Grundvoraussetzung für eine gute Reproduzierbarkeit der einzelnen Läufe (Abb. 3-13) ist dabei die gute Equilibrierung der Säule, wobei am besten einmal das vollständige Gradientenprofil ohne Substanz durchgefahren wird.



Abb. 3-13: Multiple Injektion von Chondroitinsulfat A Tetrasaccharid auf eine analytische Nucleosil SB 5 Säule. Aufgetragen ist die UV-Absorption bei 215 nm gegen die Zeit in Minuten. Die Elution erfolgt in diesem Fall mit einem Gradienten von 25 mM bis 235 mM Natriumsulfat-Lösung mit einer Flußrate von 1 mL/min und einer Dauer von 60 min.

Eine relativ bequeme Option ist der Einsatz von Ammoniumhydrogencarbonat-Lösungen zur Elution. Auf einer QHyperD Säule eluiert das disulfatierte 4S4S-ol bei ca. 0.62 molarer Lösung (Gradient 0.1 bis 1 M über 20 mL, Säulenvolumen 1.2 mL). Aufgrund der Vakuumflüchtigkeit Ammoniumhydrogencarbonats eine des kann u.U. auf

chromatographische Entsalzung verzichtet werden. Im Vergleich zu den mit Natriumsalzen chromatographierten Proben ist der Natriumgehalt deutlich vermindert, wie das geringere Auftreten von Natriumaddukten bei Elektrospray-massenspektrometrischen Untersuchungen zeigt.

Am Anfang dieser Arbeit wurde die Elution mit Ammoniumhydrogencarbonat-Lösungen mit Erfolg zur Vorreinigung der Tetrasaccharide auf einer analytischen POROS HQ Säule eingesetzt. Dieses wurde durch die Anschaffung einer präparativen Anionentauschersäule auf Kieselgelbasis dann obsolet. Säulen auf Kieselgelbasis werden durch die alkalische Lösung angegriffen, was den Einsatz dieses Eluenten einschränkt.

3.3.3 Ionenpaarchromatographie

In der Literatur wird die Ionenpaarchromatographie als sehr empfindliches Verfahren zur Analyse von Glycosaminoglycanen beschrieben.^{53, 54} Es bietet sich insbesondere wegen der Möglichkeit zur HPLC-MS Kopplung an.⁵⁵ Daher wurden eine Reihe von Versuchen mit dieser Methode durchgeführt. Abb. 3-14 zeigt als Beispiel die Trennung von Chondroitinsulfat A Tetrameren auf einer Poros R2-Säule. Als Ionenpaarreagenz wurde 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Lösung eingesetzt. Bei 7.5 min eluieren die disulfatierten Tetrasaccharide. Bei diesen Vorversuchen wurde allerdings keine nutzbare Trennung der Zucker erreicht. Gleichzeitig zeigten NMR-Messungen des aufgefangenen Peaks die bereits früher beobachteten Probleme durch die Anwesenheit der Salze des Tetraalkylamins,⁵⁶ das sich im Vakuum nicht zufriedenstellend entfernen ließ. Daher wurde auf die Weiterverwendung dieser Methode verzichtet.



Abb. 3-14: Ionenpaarchromatographie von Chondroitinsulfat-Tetrasacchariden. Eluenten sind 5 % Acetonitril/Wasser und 95 % Acetonitril/Wasser plus 5 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, die Flußrate beträgt 2 mL/min. Der mittlere Peak entspricht disulfatierten Tetrameren, die kleineren Peaks entstammen Verunreinigungen, da kein gradient grade Ionenpaarreagenz eingesetzt wurde.

3.3.4 *High-Performance Anion-Exchange Chromatography* (HPAEC)

Als weitere Methode wurde der Einsatz von *High-Performance Anion-Exchange Chromatography* (HPAEC) in Kombination mit der *Pulsed Amperometric Detection* (PAD) zur Trennung und Analytik der Chondroitinsulfat-Tetramere getestet, der bereits für die Analytik von Disacchariden publiziert wurde.^{67, 69} Aufgrund des hohen pH-Wertes können nur die reduzierten Zucker vermessen werden, da es sonst zu einer *stripping* Reaktion unter Desulfatierung kommt. Bei isokratischer Arbeitsweise mit einer 1 molar (!) Natriumacetat-Lösung (mit 100 mmolar Natriumhydroxid) können zwei Peaks nach ca. 30 bzw. 40 min mit dem di-4- bzw. dem di-6-sulfatiertem Chondroitinsulfattetrasaccharid assoziiert werden. Der hohe Salzgehalt der Probe machte eine anschließende Vermessung unmöglich (es stand keine *online* Entsalzung zur Verfügung, daher mußten die Fraktionen in Puffer zur Neutralisation gesammelt werden). Weitere Peaks erschienen nach kurzer Elutionszeit, bei Gradientenbetrieb auch schon bei 0.8 - 0.9 molarer Acetatkonzentration, sie konnten allerdings keinen bestimmten Tetrasacchariden zugeordnet werden.

3.3.5 Entsalzung

Während die Entfernung des Ammoniumhydrogencarbonats und anderer flüchtiger Salze im Vakuum relativ leicht möglich ist, gestaltet sich die Entfernung nicht flüchtiger Salze als aufwendiger. Der theoretisch denkbare Einsatz von Ionenaustauschern schied aufgrund des ionischen Charakters der Zielmoleküle aus, ebenso die auf Polaritätsunterschieden beruhende Entsalzung über *reversed-phase* Säulen.

Zunächst wurde eine Reihe von Ultrafiltrationen durchgeführt. Die disulfatierten Tetrasaccharide haben ein Molekulargewicht von ca.1 kD, daher wurden zwei Membranen mit einer Ausschlußgrenze (*molecular weight cut-off, MWCO*) von MW = 1000 und 3000 getestet. Da auch höhere Oligosaccharide nur gering gehindert die Membrane mit einer Ausschlußgrenze von MW = 3000 passieren konnten, schied diese für weitere Versuche aus.

Für die Membrane mit einem MWCO von 1000 liegt der spezifizierte Druckbereich bei maximal 4.7 bar, ein geringerer Druck erhöht aber die Spezifizität.¹¹⁶ Daher wurden zusätzlich Versuche mit 2.5 bar durchgeführt. In Tab. 3-1 sind die Parameter der Ultrafiltrationen zusammengestellt, die erhaltenen Chromatogramme zeigt Abb. 3-15.

Tab. 3-5:Übersicht über die Ultrafiltrationen des gespaltenen Chondroitin-4-sulfats auf einer
Membrane MWCO = 1000.

Druck	2.5	4.7
[bar]		
erzielte Flußrate	1.8 mL/min	2.8 mL/min
[mL/min]		



Abb. 3-15: Veränderung der Zusammensetzung einer Oligomerenmischung durch Ultrafiltration über eine Membran mit einem *molecular weight cut-off* (MWCO) von 1000 Dalton bei 2.5 und 4.7 bar. Dargestellt sind die Gelpermations-Chromatogramme eines Verdaus von Chondroitinsulfat A.

Wie die Abbildung zeigt, können die Tetrasaccharide zu einem nennenswerten Anteil die Ultrafiltrationsmembran passieren. Dieses kann vermutlich durch die Stäbchenstruktur der linearen Oligomere erklärt werden.

Zur Entsalzung hat sich eine Säule aus G10-Material, die direkt an der HPLC-Anlage betrieben wurde, am besten bewährt. Bei einer Flußrate von 2 mL/min dauert ein Entsalzungslauf weniger als 30 min. In Abb. 3-16 sind die UV- und die Leitfähigkeitsspur für eine exemplarische Entsalzung wiedergegeben.



Abb. 3-16: Entsalzung des Rohverdaus von Chondroitin-4-sulfat über Pharmacia G10. Die Flußrate beträgt 2 mL/min. Die UV-Spur bei 215 nm (fette Linie) zeigt zwei Peaks, zunächst die Chondroitinsulfat-Oligosaccharide, dann folgen die Salze (Natriumacetat und -chlorid), die die Leitfähigkeit erhöhen (dünne Linie)

3.4 Massenspektrometrie

Die Aufklärung der NMR-Spektren von Oligosacchariden ist relativ aufwendig, daher stellt die Massenspektrometrie eine leistungsfähige Methode dar, die isolierten Verbindungen zunächst zu charakterisieren. Zur Durchführung der Elektrospray-Massenspektrometrie werden die Proben im konstanten Lösungsmittelfluß in das Elektrospray-Interface injiziert, dort vernebelt und nach Verdampfen des Lösungsmittels im Stickstoffgegenstrom in das Massenspektrometer gezogen.

Zur Injektion einer Probe über einen längeren Zeitraum z.B. zur Kalibrierung des Massenspektrometers wird diese mit einer Spritzenpumpe gefördert. Zur Untersuchung kleinerer Mengen ist dieses Verfahren allerdings ungeeignet, da sich die Totvolumina nur schwer verkleinern lassen.

Eine bessere Methode stellt die Probenaufgabe durch ein HPLC-Injektionsventil in einem konstanten Lösungsmittelstrom dar. Dazu wird mit einer Flußrate von $50 - 100 \,\mu$ L/min kontinuierlich Lösungsmittel zum Elektrospray-Interface gepumpt. Das Injektionsventil ist in den Fluß geschaltet und ermöglicht so die verlustfreie Probenaufgabe.

Um nicht unnötig wertvolle Substanz zu verbrauchen, wurden zunächst Vorversuche mit der Tetrasaccharidfraktion der Ausschlußchromatographie durchgeführt. Dabei wurden die Einstellungen des Massenspektrometers und die Probenaufgabe untersucht. Zur Kalibrierung des Massenspektrometers wurde die Standardprobe der Fa. Hewlett-Packard verwendet. Die Ergebnisse dieser Voruntersuchungen waren erwartungsgemäß: Zum einen lassen sich die Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide nur im *negative-ion mode* hinreichend ionisieren, Messungen im *positive-ion mode* gaben keine auswertbaren Spektren. Zum zweiten stört Salz – wie bekannt¹¹⁷ – die Signalintensität drastisch. Schon die ungenügende Entfernung des zur Ausschlußchromatographie eingesetzten Ammoniumhydrogencarbonats hatte eine drastische Abnahme des Signal/Rauschverhältnisses zur Folge.

Außerdem zeigte sich, daß überwiegend doppelt geladene Tetrasaccharide detektiert wurden. Dieses entspricht den Ergebnissen von Takagaki et al.,⁵⁰ die bei der Vermessung von Chondroitinsulfat-Oligomeren vom Di- bis zum Tetradecasaccharid jeweils die größte Signalintensität bei $m/z \approx 400-500$ gefunden haben. Die molekulare Masse M ergibt sich für ein *n*-fach deprotoniertes Ion aus dem Masse / Ladungsverhältnis m/z:

$$m/z = \frac{M-n}{n} \tag{3-1}$$

Das Spektrum von Chondroitinsulfat-Disaccharid (Abb. 3-17) zeigt einen Hauptpeak bei m/z = 498.2, der dem deprotonierten Mononatriumsalz (M – 2H + Na)[–] entspricht. Mit einem fünftel der Signalintensität ist auch (M – H)[–] zu beobachten. Der Peak m/z = 300.1 entspricht deprotonierten, sulfatiertem N-Acetylgalactosamin (M = 301.3), m/z = 282.1 kann aus der Abspaltung von Wasser resultieren (s.u.).

Sehr schwach ist auch ein Peak (m/z = 396.1) des desulfatierten Disaccharids (β -D-GlcA-(1-3)-D-GalNAc, M = 397.2) zu erkennen. Ob dieses bereits vorher in der Lösung vorhanden war oder durch Abspaltung von SO₃H⁺ entstand, ist unklar.



Abb. 3-17: Negative-ion mode Elektrospray-Massenspektrum von Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid (M = 477.3) Die Probenaufgabe erfolgte durch ein HPLC-Injektionsventil in einen konstanten Lösungsmittelstrom. Die obere Grafik zeigt den Gesamt-Ionenstrom, also die Gesamtanzahl der ionisierbaren Moleküle in der Lösung. Nachdem die Probe das Totvolumen zwischen Injektionsventil und Massenspektrometer durchflossen hat, steigt der Ionenstrom nach ca. 0.3 min an und fällt nach Passage der Probe eine halbe Minute später wieder ab. Die untere Grafik zeigt das gemittelte Massenspektrum von 0.3 bis 0.9 min. Der Hauptpeak m/z 498.2 entspricht dem Mononatriumsalz des sulfatierten Disaccharids (M – 2H + Na)⁻ (s. Text). Das Lösungsmittel für den konstanten Fluß ist Wasser/Isopropanol 3:1 bei einer Flußrate von 50 μL/min; es wurden 20 μL einer Lösung von 60 μg/mL Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid in Wasser/Isopropanol injiziert.

Im Gegensatz zu den Tetrasacchariden konnte Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid auch im *positive-ion mode* vermessen werden. Bei relativ hohem Hintergrundrauschen konnten die in Tab. 3-6 zusammengefaßten Peaks identifiziert werden. Dabei ist bemerkenswert, daß offensichtlich auch Dimere beobachtet werden.

Tab. 3-6:ZugeordnetePeaksimpositive-ionmodeElektrospray-MassenspektrumvomChondroitin-4-sulfat-Disaccharid. (Im Gegensatz zu den anderen Messungen wurde dieseMessung mit einem Bruker Iontrap-Massenspektrometer durchgeführt.)

m/z beobachtet	Zuordnung	m/z theoretisch
523	$(M - H + 2Na)^+$	522.3
525	$(M - 2H + 3Na)^+$	524.3
1021	$(2M - 2H + 3Na)^+$	1021.6
1043	$(2M - 3H + 4Na)^+$	1043.6
1065	$(2M - 4H + 5Na)^+$	1065.6

Die von der Kettenlänge abhängige unterschiedliche Ionisierbarkeit im *positive-ion mode* negativ geladener Polysaccharide wurde von Tinke et al. beobachtet. Sie fanden, daß bei Glucuronsäure und ungesättigter Digalacturonsäure die Signalintensitäten im *positive-ion mode* deutlich besser sind als im *negative-ion mode*. Bei Trigalacturonsäure sind die Intensitäten beider Ionisierungsarten in etwa vergleichbar.¹¹⁸

Die Vermessung der Tetrasaccharide wurde durch die deutliche Reduktion der Empfindlichkeit des Massenspektrometers in Gegenwart von geringen Salzmengen erschwert. Während die Aufnahme von NMR-Spektren einmal entsalzter Proben problemlos möglich war, konnten für die Massenspektrometrie nur die Peakfronten der zweiten Entsalzung über Gelsäulen verwendet werden.

Im Spektrum des disulfatierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids 4S4S (Abb. 3-18) ist der Molekülpeak kaum noch zu erkennen. Dafür werden die doppelt geladenen Molekülionen beobachtet, der Peak bei m/z = 489.2 entspricht $(M - 4H + 2Na)^{2-}$. Das zweifach geladenen Mononatriumsalz m/z = 478.2 und die freie Säure m/z = 467.2 sowie ein Wasseraddukt (M - 4H + 2Na + H₂O)²⁻ bei m/z = 498.2 treten ebenfalls auf. Wie beim Disaccharid wird bei

m/z = 300.2 O-Sulfo-N-acetylgalactosamin beobachtet. Der Peak m/z = 282.1 kann als derselbe Zucker nach Wasserverlust erklärt werden (s.u.).



Abb. 3-18: Negative-ion mode Elektrospray-Massenspektrum des disulfatierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids 4S4S (M = 936.6) Der Molekülpeak M⁻ ist in diesem Spektrum nicht zu beobachten. Der Hauptpeak m/z = 489.2 entspricht dem zweifach negativ geladenen Dinatriumsalz (M – 4H + 2Na)²⁻. Das Spektrum wurde ebenfalls nach Probenaufgabe durch ein HPLC-Injektionsventil aufgenommen, die Bedingungen entsprechen den bei Abb. 3-17 beschriebenen.

Im Spektrum des reduzierten disulfatierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids 4S4S-ol ist der Molekülpeak sehr klein und im Rauschen nicht zu identifizieren. Genau wie beim nicht reduzierenden Zucker werden die doppelt geladenen Molekülionen beobachtet, die jeweils um m/z 1 schwerer sind. Der Hauptpeak bei m/z = 490.2 entspricht (M – 4H + 2Na)^{2–}. Das Mononatriumsalz m/z = 479.2, die freie Säure m/z = 468.2 und das Wasseraddukt (M – 4H + 2Na + H₂O)^{2–} bei m/z = 499.2 treten ebenfalls auf. Das O-Sulfo-N-acetylgalactosamin ist reduziert und daher um 2 Masseneinheiten schwerer, m/z = 302.2. Bei m/z = 284.1 wird dieser Zucker nach Wasserverlust beobachtet. Trotzdem tritt weiterhin ein Peak bei m/z = 282.1 auf. Offensichtlich handelt es sich daher bei den Peaks bei m/z = 282.1 in den Spektren der oben diskutierten Zucker um ein nicht vom reduzierenden Ende stammendes Fragment.

3.5 NMR-spektropische Untersuchungen von Chondroitinsulfat

3.5.1 Zuordnung der Spektren

Die isolierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide wurden NMR-spektroskopisch charakterisiert. Durch Integration der Signale der anomeren Protonen und der Acetatgruppen konnte die Reinheit der einzelnen Fraktionen verifiziert werden.

Die ¹H-NMR-Spektren sind aufgrund der relativ geringen spektralen Dispersion der Ringprotonen relativ komplex. Die Interpretation der reduzierenden Zucker wird zusätzlich durch das Vorliegen von Anomerenmischungen erschwert. Dabei kommt es zu besonderen Signalhäufungen in den Bereichen 3.6 - 3.9 und 4.0 - 4.1 ppm. Dagegen ist der H-1 Bereich überwiegend gut separiert und ermöglicht eine relativ weitgehende Zuordnung durch die TOCSY-Spektren. Alle Messungen wurden bei 280 K durchgeführt, da bei dieser Temperatur das Wassersignal bei 5.0 ppm liegt und damit genau in der Mitte zwischen dem H-1 α -GlcNAc-1 (ca. 5.2 ppm) und den H-4 der sulfatierten β -GlcNAc (ca. 4.8 ppm). Bei Raumtemperatur weist das Wassersignal eine Verschiebung von ca. 4.7 ppm auf, und überlagert damit einen Teil der H-1 Protonen der β -Zucker.

3.5.2 Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid



Abb. 3-19: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid in D₂O bei 280 K. Das Spektrum ist auf Aceton 2.225 ppm kalibriert.

Die Abb. 3-19 zeigt einen Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid. Bei 5.2 ppm ist das anomere Proton des α -, bei 4.7 ppm das des β -Galactosamins zu erkennen. Die H-4 Signale sind durch die Sulfatgruppe entschirmt und geben Resonanzen bei 4.9 ppm (α) und 4.8 ppm (β). Die Signale bei ca. 4.5 ppm können anhand der TOCSY-Spuren als H-1 Signale der Glucuronsäure zugeordnet werden, durch diese Spuren ist auch die Zuordnung der meisten anderen Uronsäureprotonen möglich. Im Gegensatz zu den anomeren Protonen der Uronsäuren ist die Verschiebung der übrigen Ringprotonen fast unabhängig von der Konfiguration am reduzierenden Ende.

In Tab. 3-7 sind die ¹H-chemischen Verschiebungen von Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid zusammengefaßt. Die Resonanzen von H-5 und H-6 des β -Galactosamins sind stark überlagert und können daher nicht mehr 1. Ordnung interpretiert werden.

Tab. 3-7:¹H-chemische Verschiebungen des Chondroitin-4-sulfat-Disaccharids bei 280 K. Als
interner Standard wurde Aceton (2.225 ppm) zugesetzt.

	α-GlcNAc	β -GlcNAc	(α) GlcUA	(β) GlcUA
H-1	5.204	4.708	4.516	4.472
H-2	4.347	4.048	3.356	3.355
H-3	4.221	4.053	3.461	3.461
H-4	4.855	4.789	3.529	3.529
H-5	4.283	3.84*	3.665	3.665
H-6	3.724	3.8*	-	-
H-6'	3.808	3.8*	-	-
NH	$8.089^{\#}$	8.217#	-	-
CH ₃	2.033	2.033	-	-

^{*} nicht eindeutig zuzuordnen.

[#] Messung in H₂O/D2O 9:1



3.5.3 Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide

Abb. 3-20: Spektrum des reduzierenden Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids 6S4S bei 280 K. Als interner Standard wurde Aceton (2.225 ppm) zugesetzt.

Die Spektren der reduzierenden Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide (4S4S, 4S6S, 6S4S) zeigen eine starke Überlagerung der Signale des reduzierenden β - und des internen β -Galactosamins. In Abb. 3-20 ist exemplarisch das Spektrum des reduzierenden Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids 6S4S wiedergegeben. Während die Zuordnung der Protonensignale (Tab. 3-8) für H-1 bis H-4 durch die TOCSY-Spuren immer noch relativ gut möglich ist, gelingt die eindeutige Unterscheidung der Protonen an C-5 und C-6 nicht. Durch NOE-Experimente läßt sich allerdings zeigen, daß die Verschiebungen dieser Protonen im 4-Sulfat bei ca. 3.7 -3.8 ppm liegt; im 6-Sulfat verändert sich die Lage von H-5 kaum, dagegen erfahren die Protonen H-6 und H-6' eine deutliche Tieffeldverschiebung um 0.4 - 0.5 ppm zu ungefähr 4.2 ppm.

Das TOCSY-Spektrum des reduzierenden Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids 6S4S (Abb. 3-21) zeigt bei 5.2 ppm (H-1) die typische Spur eines 4-sulfatierten α -N-Acetylgalactosamins. Die Resonanzen bei 4.3 ppm und 4.2 ppm werden H-2 und H-3 zugeordnet, bei 4.8 ppm erscheint durch die vicinale Sulfatfunktion Tieffeld-verschoben das Signal des H-4 Protons der Galactose. Entsprechend der äquatorialen Stellung des Protons ist die Kopplungskonstante klein; der Kreuzpeak zu H-5 kann bei 4.3 ppm nur noch sehr schwach im Rauschen detektiert werden, von dort ausgehend sind auch H-6 und H-6' zugänglich.



Abb. 3-21: Spektrum des reduzierenden Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids 6S4S bei 280 K. Als interner Standard wurde Aceton (2.225 ppm) zugesetzt.

Bei 4.7 ppm erscheint die Resonanz des reduzierenden β -Zuckers, direkt daneben liegt das Signal des korrespondierenden H-4 Protons (4.7 ppm). Die übrigen Ringprotonen liegen bei 4.03 (H-2) und 4.01 ppm (H-3). Insbesondere aufgrund der Überlagerung mit den Protonen des internen Galacatosamins ist eine Zuordnung von H-5 und H-6 nicht möglich.

Die Resonanz bei 4.6 ppm wird durch das anomere Proton des internen 6-sulfatierten Galacatosamins hervorgerufen. Die TOCSY-Spur zeigt die für Galactose typischen vier Signale. Bei ca. 4.5 ppm erscheinen die Resonanzen der anomeren Uronsäureprotonen in der Reihenfolge UA-2(α), UA-4 und UA-2(β). Von hier aus ist auch eine Zuordnung der meisten

Ringprotonen der Uronsäuren möglich. Interessanterweise zeigt sich bei den Tetrasacchariden die Unterscheidung zwischen beiden Anomeren auch deutlich bei H-2 der Glucuronsäure, was beim Disaccharid nicht der Fall gewesen ist.

In Tab. 3-8 sind die ¹H und ¹³C chemischen Verschiebungen der reduzierenden Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide zusammengefaßt. Diese Ergebnisse stimmen auf ca. 0.05 ppm mit den bekannten Daten von Sugahara et al. überein.⁹⁵

6S4S	4S6S	4 <i>S</i> 4 <i>S</i>	6S4S	4S6S	4 <i>S</i> 4 <i>S</i>	
¹ H	¹ H	¹ H	¹ H	$^{1}\mathrm{H}$	¹ H	
β	β	β	α	α	α	GalNAc-1
4.709	4.678	4.716	5.203	5.205	5.203	H-1
4.028	4.011	4.039	4.331	4.283	4.331	H-2
4.008	3.822	4.01	4.18	4.029	4.174	H-3
4.743	4.175	4.746	4.812	4.244	4.812	H-4
n.d	n.d	n.d	4.269	n.d.	4.272	H-5
n.d	n.d	n.d	n.d	n.d.	3.793	H-6
n.d	n.d	n.d	n.d	n.d.	3.711	H-6'
2.021*	2.016	2.023	2.023*	2.016	2.023	NAc
β	β	β	α	α	α	GlcUA-2
4.479	4.499	4.472	4.524	4.555	4.514	H-1
3.394	3.365	3.383	3.401	3.362	3.378	H-2
n.d.	3.585	3.583	3.595	3.59	3.583	H-3
n.d.	3.741	3.778	3.748	3.742	3.778	H-4
n.d.	n.d.	3.662	n.d.	n.d.	3.662	H-5

Tab. 3-8:¹H-chemische Verschiebungen der reduzierenden Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide bei
280 K. Als interner Standard wurde Aceton (2.225 ppm) zugesetzt.

	4 <i>S</i> 4 <i>S</i>	4 <i>S</i> 6 <i>S</i>	6S4S
-	¹ H	¹ H	¹ H
GalNAc-3			
H-1	4.554	4.534	4.454
H-2	4.063	4.045	4.031
Н-3	4.028	4.031	3.834
H-4	4.801	4.794	4.244
H-5	3.824	n.d.	n.d.
H-6	n.d.	n.d.	n.d.
H-6'	n.d.	n.d.	n.d.
NAc	2.043	2.043	2.021*
GlcUA-4			
H-1	4.465	4.459	4.5
H-2	3.331	3.329	3.312
H-3	3.464	3.465	3.303
H-4	3.514	3.504	3.306
H-5	3.66	3.657	3.665

Zuordnungen austauschbar.

Ein Vergleich der Spektren der 4- und der 6-sulfatierten Galactose zeigt die Entschirmung, die durch die 4-Sulfatierung an H-4 hervorgerufen wird. Die Differenz der Verschiebungen für die geminalen Protonen liegt bei 0.4 -0.55 ppm. Die Tieffeldverschiebung läßt sich auch an den weiteren Ringprotonen beobachten, das Signal des vicinalen H-3 wird um 0.15 ppm und das Signal des γ -ständigen H-2 ca. 0.05 ppm verschoben. Da für die H-6-Protonen keine exakten Verschiebungen ermittelt werden konnten, kann die Tieffeldverschiebung durch die 6-Sulfatierung nur abgeschätzt werden. Die Resonanzen der nicht sulfatierten H-6 Protonen liegen bei ca. 3.7 ppm, die der sulfatierten bei ca. 4.1 - 4.2 ppm. Damit beträgt die Tieffeldverschiebung durch die Sulfatierung ebenfalls ca. 0.5 ppm. Dieses entspricht der Größenordnung, die auch von Zsiska für 4- und 6-sulfatierte Galactose gefunden wurde.¹¹⁹



Abb. 3-22: Spektrum des reduzierenden Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids 4S6S-ol bei 280 K. Als interner Standard wurde Aceton (2.225 ppm) zugesetzt.

Die Abb. 3-22 zeigt das Spektrum des reduzierenden Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids 4S6S-ol, die zugeordneten ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen sind in Tab. 3-10 zusammengefaßt. Die Reduktion der Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide vereinfacht die Spektren deutlich, da keine unterschiedlichen Anomerensignale mehr vorliegen. Durch die Reduktion verändern sich vorrangig die chemischen Verschiebungen bis zur benachbarten Glucuronsäure. Das Proton H-1 des internen Galactosamins zeigt eine geringe Tieffeldverschiebung als Folge der Reduktion. Dagegen bleiben die Verschiebungen der terminalen Glucuronsäure unbeeinflußt. Damit ergibt sich die Möglichkeit, H-2 dieses Zuckers als *structural reporter group* für die Sulfatierung an GalNAc-3 zu nutzen. Dieses ist besonderes hilfreich, wenn wasserhaltige Proben bei 300 K vermessen werden sollen und es zu Überlagerungen mit dem HDO-Signal kommt.



Abb. 3-23: ¹H-¹H-TOCSY-Spektrum des reduzierten Tetrasaccharids 4S6S-ol.

Auffällig ist die Umkehr der chemischen Verschiebungen der Galactosamin-Protonen H-3 und H-4 als Folge der Reduktion, wie sie in Tab. 3-9 am Beispiel des 6,6"-disulfatierten Chondroitinsulfat dargestellt ist. Diese Zuordnung konnte aus dem COSY sowie durch einen NOE-Kontakt von H-3 zu H-1 der Glucuronsäure bestätigt werden. Eine ähnliche Zuordnung wurde beispielsweise von Lawson et al.¹²⁰ für die Sequenz ~Gal-(1-3)-GalNAc-ol gefunden.

Tab. 3-9:¹H-chemische Verschiebung der Galactosamin-Protonen H-3 und H-4 in der Verbindung
GlcUA-(1-3)-GalNAc(6-SO3)-(1-4)-GlcUA-(1-3)-GalNAc(6-SO3)-ol.

	-(1-3)-GalNAc-(1-4)-	-(1-3)-GalNAc-ol
H-3	3.843	4.082
H-4	4.246	3.550

Bei den in Tab. 3-10 zusammengefaßten Verschiebungen der reduzierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide fällt auf, daß sich im Vergleich zu den reduzierenden Zuckern (Tab. 3-8) die Signale der Disaccharideinheit am nicht reduzierenden Ende kaum verändern. Dagegen zeigt die Glucuronsäure-2, die sich in direkter Nachbarschaft zum reduzierten N-Acetylgalactosamin befindet, eine deutliche Signalveränderung.

Tab. 3-10:¹H- und¹³C-chemischeVerschiebungen der reduziertenChondroitinsulfat-Tetra-
saccharide bei 280 K. Als interner Standard wurde Aceton (2.225 ppm) zugesetzt.

	4S4S-ol	6S6S-ol	4S6S-ol	6S4S-ol	6S6S-ol	4S6S-ol
	$^{1}\mathrm{H}$	$^{1}\mathrm{H}$	$^{1}\mathrm{H}$	$^{1}\mathrm{H}$	¹³ C	¹³ C
GalNAc-ol						
H-1	3.661	3.777	3.705	3.654	61	60.5
H-1'	3.697	n.d.	3.771	3.703	-	-
H-2	4.266	4.401	4.399	4.277	51.9	51.3
H-3	4.256	4.082	4.079	4.262	75.7	75.4
H-4	4.488	3.550	3.543	4.486	68.8	68.3
H-5	4.161	4.321	4.326	4.162	67.7	66.7
H-6	n.d.	4.088	4.091	3.702	69.5	68.9
H-6'	n.d.	4.049	4.052	n.d.	-	-
NAc	2.001	2.044	2.040^{*}	2.001		

	4S4S-ol	6S6S-ol	4S6S-ol	6S4S-ol	6S6S-ol	4S6S-ol
	$^{1}\mathrm{H}$	$^{1}\mathrm{H}$	$^{1}\mathrm{H}$	$^{1}\mathrm{H}$	¹³ C	¹³ C
GlcUA-2						
H-1	4.624	4.561	4.552	4.631	103.0	102.6
H-2	3.464	3.445	3.431	3.486	73?	72.8
H-3	n.d.	3.652	n.d.	3.472	75.0	n.d.
H-4	3.759	3.743	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H-5	n.d.	n.d.	3.63	n.d.	n.d.	73.7
GalNAc-3						
H-1	4.567	4.581	4.594	4.555	102.2	100.9
H-2	4.061	4.03	4.048	4.031	73.1	75.3
H-3	4.039	3.843	4.039	3.843	80.5	n.d.
H-4	4.799	4.246	4.802	4.246	~67	76.6
H-5	3.831	3.991	3.835	3.984	73.1	74.5
H-6	n.d.	4.234	3.808	4.237	~67	n.d.
H-6'	n.d.	4.234	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
NAc	2.044	2.017	2.044^{*}	2.022		
GlcUA-4						
H-1	4.466	4.499	4.469	4.499	104.6	103.6
H-2	3.333	3.317	3.333	3.317	73.1	72.6
H-3	3.466	3.471	3.483	n.d.	76.1	75.1
H-4	3.517*	3.696	3.517*	n.d.	n.d.	72.1
H-5	3.65 [*]	3.696	3.663*	n.d.	n.d.	76.4

* Zuordnungen austauschbar.

3.5.4 Acetate als structural reporter groups

Stellt man die Signale der unterschiedlichen Acetatgruppen der isolierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide zusammen (Tab. 3-11), lassen sich drei "Acetat-Signalcluster" bei ca. 2.00, 2.02 und 2.04 ppm identifizieren. Die Abweichungen, die für unterschiedliche Präparationen des gleichen Zuckers (insbesondere bei unterschiedlichem Salzgehalt) beobachtet wurden, lagen meist unter 0.01 ppm. Für die reduzierenden Zucker besteht auch eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Chai et al.⁹⁷ Darüber hinaus ergibt sich eine überraschend gute Übereinstimmung der Acetatsignale der internen N-Acetylgalactosamineinheiten mit den für polymere Chondroitinsulfate bei 333 K gefundenen Verschiebungen von 2.035 ppm für das 4-Sulfat und 2.021 ppm für das 6-Sulfat.¹²¹

Damit bietet sich die Analyse der ¹H-NMR chemischen Verschiebungen der Acetatgruppen zur schnellen Strukturzuordnung an. Aus den Integralen der Acetatsignale kann die Probenreinheit direkt abgeleitet werden. Bei reinen Präparationen kann darüber hinaus anhand der chemischen Verschiebung der Acetatgruppen auf das Sulfatierungsmuster des Tetrasaccharids geschlossen werden.

 Tab. 3-11:
 Zusammenstellung der ¹H-NMR chemischen Verschiebungen der unterschiedlichen

 Acetatgruppen der isolierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide.

GalNAc-3	GalNAc-3	GalNAc-ol-1	GalNAc-ol-1	GalNAc-1	GalNAc-1
<i>6S</i>	<i>4S</i>	<i>6S</i>	4S	<i>6S</i>	4S
2.017	2.043	2.040	2.001	2.016	2.023
2.022	2.043	2.044	2.001		2.023
2.021	2.044				
	2.044				

4 Konformationsanalyse von Chondroitinsulfat

Um einen Eindruck von der räumlichen Gestalt der Chondroitinsulfat-Oligomere zu erhalten, wurden mit dem Programm GEGOP Metropolis-Monte-Carlo- (MMC) Simulationen durchgeführt. Als Modellverbindungen wurden die Trimere β -D-GlcA"-(1-3)-D-(4-O-SO₃)-GalNAc'- β -D-GlcA und β -D-GlcA"-(1-3)-D-(6-O-SO₃)-GalNAc'- β -D-GlcA ausgewählt. Diese Verbindungen bieten sich als Modellsubstanzen für die Polymere an, da beide glycosidischen Bindungen vorhanden sind und die Sulfatgruppen auf beiden Seiten von Zuckerresten umgeben sind.

Die Temperaturkonstante der Simulationen betrug 1000 bzw. 300 K. Bei sonst unveränderten Bedingungen zeigte die Simulation bei tieferer Temperatur erwartungsgemäß eine geringere Akzeptanzrate, diese fiel beim 6-sulfatierten Trisaccharid von 28.6 % auf 8.6 %, die Akzeptanzrate nach Metropolis-Kriterium fiel von 14.3 % auf 4.3 %. Entsprechend ist auch die Energie der akzeptierten Konformationen geringer und zeigt nur wenig Variation, wie Abb. 4-1 für das 6-sulfatierte Trisaccharid zeigt.



Abb. 4-1: Auswirkung der Temperatur auf die Energie der akzeptierten Konformationen bei der Metropolis-Monte-Carlo-Simulation des Trisaccharids β-D-GlcA-(1-3)-D-(6-O-SO₃)-GalNAc-β-D-GlcA. Dargestellt ist die Energie in kcal/mol in Abhängigkeit von der Zahl der Simulationsschritte. Die schwarzen Punkte geben die Ergebnisse einer Simulation bei 300 K, die grauen bei 1000 K wieder.

Im Gegensatz zum 6-sulfatierten Trisaccharid zeigt die MMC-Simulation des 4-sulfatierten Trisaccharids bei einer Temperatur von 1000 K eine Reihe hochenergetischer Konformationen. In Abb. 4-2 ist das Histogramm der Energieverteilung wiedergegeben. Insgesamt lagen 8.9 % der untersuchten Konformationen im oberen Energiebereich.

Abb. 4-2: Verteilungsfunktion der Energie einer MMC-Simulation des Trisaccharids GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA. Es wurde die zweite Hälfte einer Simulation mit 200000 Schritten und einer Temperatur von 1000 K ausgewertet.



···	∮ (GIcA" - GalNAc')
	ψ (GlcA" - GalNAc')
	∮ (GalNAc' - GlcA)
······································	ψ (GalNAc' - GlcA)
	S (Sulfat) - O4 (GalNAc')
	04 - C4 (GalNAc')
	C6 - C5 (GlcA")
	02 - C2 (GlcA")
	03 - C3 (GlcA")
	04 - C4 (GlcA")
	C6 - C5 (GalNAc')
·····	N1 - C2 (GalNAc')
·\$+\$+\$+\$+\$+\$\$+\$	06 - C6 (GalNAc')
	C6 - C5 (GlcA)
	01 - C1 (GlcA)
	02 - C2 (GlcA)
	03 - C3 (GlcA)
	τ (GIcA" - GaINAc')
	τ (GalNAc' - GIcA)
· ····································	τ (S - O4 - C4 GalNAc')

Abb. 4-3: Verteilungsgrafik der flexiblen Torsionswinkel einer 1000 K GEGOP-Simulation des Chondroitin-4-sulfat-Trisaccharids GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA. Die einzelnen Punkte stellen jeweils einen beobachteten Winkel dar. Die mit + markierten Winkel gehören zu den sehr energiereichen Konformationen. Die Skalierung ist auf den jeweiligen Wertebereich des jeweiligen Winkels bezogen und reicht vom kleinsten gefundenen Wert (links) bis zum größten (rechts). Die ersten Zeilen geben die Phi- und Psi- Winkel von GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc, (4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA und Sulfat-(4-O-SO₃)-GalNAc wieder. Die folgenden beschreiben die Torsionswinkel der NH- und OH-Gruppen am Ring. Die letzten drei Zeilen geben die glycosidischen Winkel, ebenfalls in der Reihenfolge GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc, (4-O-SO₃)-GalNAc, (4-O-SO₃)-GalNAc, GlcA und Sulfat-(4-O-SO₃)-GalNAc, an.

Winkel	Definition
φ	H1-C1-O1-C _x
ψ	$C1-O1-C_x-H_x$
ω	05-C5-C6-O6
τ	C1-O1-C _x

Tab. 4-1: Winkeldefinitionen des Programms GEGOP.

Eine genauere Analyse wird durch eine Verteilungsgrafik der flexiblen Torsionswinkel ermöglicht (Abb. 4-3). Die Definition der Winkel, wie sie im Programm GEGOP verwendet wird, ist in Tab. 4-1 wiedergegeben. Für die Verteilungsgrafik werden die einzelnen Torsionswinkel als Punkte auf einer Linie dargestellt. Die Skalierung der Linie reicht dabei vom kleinsten (links) bis zum größten Wert (rechts). Die energiereichen Konformeren werden anschließend mit + markiert. Wie die Abb. 4-3 zeigt, lassen sich Häufungen der hochenergetischen Konformere bei den Phi- und Psi- Winkeln von GlcA-GalNAc , GalNAc-GlcA und Sulfat-GalNAc nachweisen. Die stärkste Häufung fällt bei der sechsten Zeile auf, die den Torsionswinkel S-O4-C4-H4 wiedergibt.



Abb. 4-4: Darstellung der Energie der akzeptierten Konformationen als Funktion der Zahl der MMC-Schritte (links) und des Torsionswinkel der Sulfatgruppe (S-O4-C4-H4, rechts) bei einer 1000 K GEGOP-Simulation des Chondroitin-4-sulfat-Trisaccharids GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA.

Die Korrelation mit dem Torsionswinkel der Sulfatgruppe läßt sich auch nachweisen, wenn man die Energie der akzeptierten Konformationen als Funktion des Torsionswinkels der Sulfatgruppe aufträgt (Abb. 4-4). Die energiereichen Konformationen treten dabei ausschließlich bei einem Torsionswinkel der Sulfatgruppe von ca. 200 ° auf.

Die Darstellung einer solchen energiereichen Konformation zeigt eine ungünstige Anordnung der Sulfatgruppe oberhalb des Galactoserings (Abb. 4-5). Die abgebildete Konformation mit einem Torsionswinkel S-O4-C4-H4 von 231 ° weist eine Gesamtenergie von 72.5 kcal/mol auf und liegt damit 16 kcal/mol über der energiereichsten der Konformationen, bei denen der Torsionswinkel der Sulfatgruppe ungefähr 0 ° beträgt.



Abb. 4-5: Stereodarstellung der ungünstigen Anordnung der Sulfatgruppe oberhalb des Galactoserings. Der Torsionswinkel S-O4-C4-H4 beträgt 231°. Die abgebildete Konformation weist eine Gesamtenergie von 72.5 kcal/mol auf und liegt damit 16 kcal/mol über der energiereichsten der Konformationen, bei denen der Torsionswinkel der Sulfatgruppe ungefähr 0° beträgt. Bei dieser Konformation ist zusätzlich das N-Acetat um ca. 180° verdreht. Der Energiebeitrag dieser Anordnung ist aber eher gering, wie eine Vergleichsrechnung zeigt.

Die Abbildung erklärt auch die Korrelation mit den glycosidischen Winkeln der Zuckerreste: Eine entsprechende Anordnung der Sulfatgruppe erfordert ein Wegdrehen der benachbarten Zuckerreste. Trägt man zur Analyse die Energie gegen den Torsionswinkel der Sulfatgruppe auf, so erklärt die ungünstige Anordnung der Sulfatgruppe die Hochenergie-Konformere vollständig. Bei Raumtemperatur sollte diese Anordnung keine Rolle spielen. Aufgrund der Korrelation mit den glycosidischen Winkeln ist die Verteilung zwischen diesen vermutlich ebenfalls nicht repräsentativ. Als Konsequenz wurden daher die weiteren Simulationen bei 300 K durchgeführt.

Die Simulation des 4-sulfatierten Tetrasaccharids bei 300 K mit einer Dielektrizitätskonstanten $\varepsilon = 1$ zeigte die in Abb. 4-6 wiedergegebene Verteilung der glycosidischen Winkel. Die Winkel der Bindung GlcA-GalNAc liegen relativ dicht beieinander, dagegen werden zwei Orientierungen der glycosidischen Bindung GalNAc-GlcA beobachtet. Die Sulfatgruppe zeigt bei dieser 300 K Simulation die günstige Anordnung der Torsion S-O4-C4-H4 von ca. 0°. Die S-O Bindung ist frei drehbar, entsprechend findet man für diesen Winkel keinen Vorzugswert.



Abb. 4-6: Phi-Psi Plots der glycosidischen Winkel des Trisaccharids GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA bei einer 300 K GEGOP Simulation mit 2 Millionen Schritten. Die linke Grafik zeigt den φ-Winkel in Abhängigkeit von ψ-Winkel für die Bindung GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc, rechts ist die gleiche Grafik für die Bindung (4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA wiedergegeben. 90 % der Konformere weisen für die (4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA-Bindung Phi- und Psi-Winkel von ungefähr 315 und 35 ° auf. Dieser Konformationscluster ist mit durchschnittlich 26.1 kcal/mol geringfügig energetisch günstiger ist als der Cluster bei 345/75 ° mit 26.3 kcal/mol.

Um den Einfluß der elektrostatischen Wechselwirkungen auf die Konformationen genauer zu studieren, wurden die Simulationen mit einer Reihe unterschiedlicher Werte für die Dielektrizitätskonstante ε durchgeführt. Wie Abb. 4-7 zeigt, hat im Vakuum ($\varepsilon = 1$) die elektrostatische Kraft einen deutlichen Einfluß auf die Konformation. Bei zunehmender Dielektrizitätskonstante und damit abnehmender elektrostatischen Wechselwirkung nähern sich die glycosidischen Winkel der 4- und 6-sulfatierten Trisaccharide einander an. Dieses ist insofern bemerkenswert, da offensichtlich überwiegend elektrostatische und nicht sterische Einflüsse für die Unterschiede in den Konformationen zwischen dem 4- und dem 6-sulfatierten Trisaccharid verantwortlich sind.



Abb. 4-7: Durchschnittliche glycosidische Winkel der akzeptierten Konformere von GEGOP-Simulationen der Chondroitinsulfat-Trisaccharide GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA (oben) und GlcA-(6-O-SO₃)-GalNAc-GlcA (unten) in Abhängigkeit von der angenommenen Dielektizitätskonstanten.

In Abb. 4-8 sind zwei energiearme Konformere der untersuchten Trisaccharide dargestellt. Für diese Simulation wurde eine Dielektizitätskonstante $\varepsilon = 20$ angenommen, die den zwischen den Ladungen vorhandenen Wassermolekülen Rechnung tragen soll.



Abb. 4-8: Niedrigenergiekonformationen der Chondroitinsulfat-Trisaccharide GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA (oben) und GlcA-(6-O-SO₃)-GalNAc-GlcA (unten) aus einer GEGOP-Simulation mit einer Dielektrizitätskonstante $\varepsilon = 20$.

Die NMR-spektroskopische Konformationsanalyse der Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide wird durch die starke Signalüberlagerung erschwert. Zur Vereinfachung wurden daher nur die reduzierten Zucker 4S4S-ol [GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-ol] und 6S6S-ol [GlcA-(6-O-SO₃)-GalNAc-GlcA-(6-O-SO₃)-GalNAc-ol] untersucht. Zur Auswertung wurden die NOEs der glycosidischen Bindungen verwendet. Die eindeutige Zuordnung der H-6 Protonen der Galactosen, die für die Bestimmung der Orientierung der Sulfatgruppen notwendig wäre, war nicht möglich. Bei der Auswertung ist außerdem zu berücksichtigen,

daß die glycosidischen Bindungen eine gewisse Flexibilität besitzen wie Abb. 4-9 zeigt, dadurch wird die Genauigkeit der Abstandsbestimmung auf ca. 0.2 Å eingeschränkt.



Abb. 4-9: Drei übereinandergelegte energetisch günstige GEGOP-Konformere des Trisaccharids GlcA-(6-O-SO₃)-GalNAc-GlcA.

Das Spektrum des reduzierten 4,4"-disulfatierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA-(4-O-SO₃)-GalNAc-ol zeigt Signalüberschneidungen bei der 4-sulfatierten Galactose, hier können H-2 und H-3 nicht unterschieden werden und bei der internen Glucuronsäure, bei der H-4 und H-5 nicht unterschieden werden können.

Die NOESY-Spektren zeigen einen Kontakt von H-1 der terminalen Uronsäure GlcA-4 auf H-3 (bzw. H-2) des benachbarten Galactosamins GalNAc-3. Eine rechnerische Näherung des Abstands zwischen H-1 GlcA-4 und H-3 GalNAc-3 ist möglich, wenn man die Überlagerung von H-3 GalNAc-3 mit H-2 GalNAc-3 vernachlässigt. Dieses ist als Näherung gerechtfertigt, da der Abstand zu H-2 deutlich größer ist. Unter dieser Annahme kann der Abstand von H-3 GalNAc-3 zu H-4 GalNAc-3 als Referenzabstand verwendet werden. Unter Vernachlässigung von Spindiffusion etc. erhält man damit einen Abstand von 2.56 Å, der in akzeptabler Übereinstimmung mit dem Abstand von 2.40 Å steht, der in der energieärmsten Konformation der GEGOP-Simulation mit einer Dielektrizitätskonstante $\varepsilon = 20$ vorliegt (Tab. 4-2).

Die Orientierung um den glycosidischen Winkel entspricht dabei dem Ergebnis der GEGOP-Simulation, wie durch das Fehlen eines NOE-Kontaktes zwischen H-4 GalNAc-3 und H-1 GlcA-4 belegt wird.

Tab. 4-2: Integrierbare NOE-Kontakte des Protons H-1 GalNAc-3 bei der Probe 4S4S-ol.

Rel. NOE	Berechneter	GEGOP
	Abstand	
1.84	2.1	2.2
1	Ref.	2.4
0.83	2.5	2.6
	<i>Rel. NOE</i> 1.84 1 0.83	Rel. NOEBerechneterAbstand1.842.11Ref.0.832.5

Die Analyse des NOESY-Spektrums des reduzierten, di-6,6"-sulfatierten Tetrasaccharids 6S6S-ol zeigt für die Bindung GalNAc-3 GlcA-2 einen deutlichen NOE von H-1 GalNAc-3 auf H-4 und H-5 GlcA-2. Aufgrund der Überlagerung mit H-1 GlcA-2 konnte für die Integration nur der Tieffeld-verschobene Peak des Doubletts verwendet werden. Als Referenzabstand wurde der Abstand zu H-3 GalNAc-3 verwendet, der laut GEGOP-Simulation 2.4 Å beträgt. Die gleiche Simulation gibt einen Abstand des anomeren Protons von GalNAc-3 zu H-5 GlcA-2 von 4.5 Å an, so daß die Berechnung des Abstands nur auf H-4 GlcA-2 bezogen werden kann. Wie Tab. 4-3 zeigt, stimmt der berechnete Abstand zwischen den Protonen H-1 GalNAc-3 und H-4 GlcA-2 mit 2.1 Å gut mit dem Ergebnis der GEGOP-Simulation von 2.2 Å überein. Die Orientierung ist auch hier wieder eindeutig und im Einklang mit der Simulation, da kein NOE-Kontakt zu H-3 GlcA-2 zu beobachten ist.

Tab. 4-3:Integrierbare NOE-Kontakte des Protons H-1 GalNAc-3 bei der Probe 6S6S-ol.

Kontakt zu	Rel. NOE	Berechneter	GEGOP
		Abstand	
H-4 (H-5) GlcA-2	1.84	2.1	2.2
H-3 GalNAc-3	1	Ref.	2.4
H-5 GalNAc-3	0.83	2.5	2.6

Auch bei der Analyse der NOE-Kontakte des Protons H-1 GlcA-4 kann die von GEGOP ermittelte Konformation grundsätzlich bestätigt werden. Nach den NMR-Ergebnissen beträgt der Abstand zwischen dem Proton H-1 GlcA-4 und dem Proton H-3 GalNAc-3 2.5 Å (Tab. 4-4). Diese Distanz stimmt gut mit dem Abstand von 2.6 Å überein, der in der GEGOP-Simulation ermittelt wurde.

Kontakt zu	Rel. NOE	Berechneter	GEGOP
		Abstand	
H-3 GalNAc-3	1.6	2.2	2.4
H-5 (H-4) GlcA-4	1.0	Ref.	2.4
H-3 GlcA-4	0.7	2.5	2.6

Tab. 4-4: Integrierbare NOE-Kontakte des Protons H-1 GlcA-4 bei der Probe 6S6S-ol.

Damit konnten bis auf die Bindung (4-O-SO₃)-GalNAc-GlcA die Anordnungen der glycosidischen Bindung, die in den GEGOP-Simulationen vorhergesagt wurden, experimentell bestätigt werden. Die Verwendung der Dielektrizitätskonstante $\varepsilon = 20$ scheint damit – im Rahmen der Meßgenauigkeit – gerechtfertigt.
5 NMR-Bindungsstudien

5.1 Chondroitinsulfat-Oligosaccharide und Hyaluronidase

5.1.1 Einleitung

Die Ligand-Protein-Wechselwirkungen von geladenen Sacchariden mit Proteinen ist weitgehend unbekannt. Daher wurden die im Arbeitskreis entwickelten NMR-spektroskopischen Techniken zur Studie von Protein-Ligand Wechselwirkungen auf das System Chondroitinsulfat-Oligosaccharide und Hyaluronidase angewandt. Ausgangspunkt war die Überlegung, daß Hyaluronidase neben der Hydrolase- auch eine deutliche Transglykosidase-Aktivität⁴⁶ zeigt und somit auch kürzere Chondroitinsulfat-Oligomere an Hyaluronidase binden sollten. Daten zur Bindungsaktivität oder eine Röntgenstruktur sind nicht zugänglich.

5.1.2 Voruntersuchungen

Ein SDS-Page Gel der käuflichen Hyaluronidase (Sigma) zeigt neben der erwarteten Bande bei ca. 60 kD eine weitere Bande bei ca. 70 kD. Aufgrund der Masse könnte es sich um *bovine serum albumine* (BSA) handeln. Das Serumalbumin dient dabei nicht nur zur Erhöhung der Proteinmenge, sondern es steigert die Aktivität der Hyaluronidase, wie beispielsweise an Hamstersperma-Hyaluronidase gezeigt wurde.¹²² Grundlage dafür scheint die Wechselwirkung des positiv geladenen Albumins mit dem negativ geladenen Zucker zu sein. Unter Assay-Bedingungen bei pH 6 nimmt die Aktivierung durch BSA ab, was mit einer geringeren positiven Ladung des Albumin korreliert ist.¹²³ Die folgenden Untersuchungen und Mengenangaben beziehen sich immer auf die Mischung Hyaluronidase/BSA.

Das NMR-Spektrum der Hyaluronidase zeigt die für ein 60 kD schweres Protein typischen großen Linienbreiten, entsprechend sind im NOE-Spektrum bei 300 K ausschließlich negative NOEs zu beobachten, die sich durch Verwendung längerer Mischzeiten (300 ms) weitgehend unterdrücken lassen.

Für die Durchführung von *saturation transfer difference* Experimenten ist eine möglichst gute Anregung des Proteins erforderlich. Daher wurden zunächst STD-Messungen ohne Spinlock mit dem reinen Protein durchgeführt. Eine gute Anregung wird durch Vorsättigung bei 10 ppm und im negativen Bereich bei -0.3 ppm und -4.1 ppm erreicht. Die Einstrahlung im Bereich der Aromaten und NH-Protonen bei 7 ppm gibt erwartungsgemäß eine noch bessere Anregung, ist allerdings aufgrund der NH-Protonen im N-Acetylgalactosamin nicht sinnvoll. Zur Unterdrückung der Proteinsignale im STD-Spektrum wird während des STD-Experiments ein Spinlockpuls angewandt. Um nur geringe Signalintensität zu verlieren, sollte der Spinlock so kurz wie möglich sein. In einer Versuchsreihe mit 2 mg gelöster Hyaluronidase erwies sich ein Spinlockpuls von 30 ms als ausreichend, die Proteinsignale zu unterdrücken.

NMR-spektroskopische Untersuchungen des Protein-freien Chondroitinsulfat-Tetrasaccharids belegen eine deutliche Blindanregung bei Vorsättigung im Bereich von 7 ppm. Diese ist auf die Anregung von nicht durch Deuterium ausgetauschten NH-Protonen zurückzuführen. Die Einstrahlung bei den anderen am Protein ermittelten Frequenzen 10 ppm, -0.3 ppm und -4.1 ppm führt bei 280 K zu kleineren Blindsignalen im Promillebereich. Bei Erhöhung der Temperatur nimmt die Signalstärke der Blindanregung ab und ist bei 300 K vollständig unterdrückt. Vergleichsmessungen mit einer Saccharose-Lösung zeigen für diese keine Blindanregung bei 280 K, womit Störungen durch fehlende Selektivität des Vorsättigungspulses unwahrscheinlich sind. Bei ungenügender Einstellung der Selektivitätsparameter im NMR-Experiment werden Blindsignale auch in Spektren der Saccharose-Lösung beobachtet, wie in Kontrollexperimenten bestätigt wurde. Die Erhöhung der Probenkonzentration von 5 auf 10 mg / 600 µL erhöht bei 280 K die Blindanregung stärker, als dieses aufgrund der Proportionalität zwischen Stoffmenge und Signalintensität zu erwarten ist. Bei 300 K wird auch für die höhere Probenkonzentration keine Blindanregung beobachtet. Diese Beobachtungen lassen sich beispielsweise durch die Bildung intermolekularer Cluster oder Aggregate erklären, durch die einzelne Moleküle soweit immobilisiert werden, daß die Protonen eine deutliche Linienverbreiterung erfahren.

Für die geplante Durchführung von *transferred* NOE Experimenten wurde die Temperaturabhängigkeit des NOE bestimmt. Bei 280 und 290 K zeigen die freien Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide einen deutlich negativen NOE, der Nulldurchgang liegt bei ca. 300 K, wobei sowohl schwach positive als auch einige schwach negative Signale beobachtet werden. Bei 310 K weisen alle Kreuzpeaks positive Vorzeichen auf.

5.1.3 Saturation transfer difference Experimente

In Abb. 5-1a ist das Protonenspektrum einer Probe von Tetrasacchariden aus dem Verdau von Chondroitinsulfat C wiedergegeben. Das Spektrum weist die Probe als eine Mischung aus Chondroitin-4- und -6-sulfaten aus: bei ca. 4.8 ppm erscheinen die Signale der geminalen Protonen der 4-Sulfatgruppen, bei ca. 4.2 ppm die der 6-Sulfate. Die unterschiedlichen Sulfatierungen können auch bei den Acetatprotonen beobachtet werden. Die Signale bei 2.04 ppm sind charakteristisch für das interne 4-sulfatierte Galactosamin. Bei ca. 2.02 ppm überlagern sich die Signale der übrigen Acetatprotonen.

Das *saturation transfer difference* Spektrum der proteinfreien Probe (Abb. 5-1b) zeigt außer dem Wasser- und Acetonpeak nur sehr schwache Signale der Acetatprotonen. Erst bei einer deutlichen Erhöhung der Anzahl der Scans werden schwache Blindsignale der Ringprotonen beobachtet. Aceton wurde als interner Standard zugesetzt. Da die Relaxationszeit des Acetons sehr lang ist, erfolgt keine vollständige Relaxation der CH₃-Protonen zwischen zwei einzelnen Pulssequenzen. Daher werden im Spektrum Signale bei 2.225 ppm als Folge der Restanregung aus dem vorhergehenden Puls beobachtet. Es konnte gezeigt werden, daß sich das Signal durch einen größeren Abstand zwischen zwei Experimenten unterdrücken läßt.⁵⁶

Die Zugabe von 2 mg Hyaluronidase verändert das "Standard-" ¹H-NMR-Spektrum gegenüber dem in Abb. 5-1a wiedergegebenem Spektrum kaum, da die Linienbreiten des Proteins relativ groß sind. Dagegen zeigt das *saturation transfer difference* Spektrum (Abb. 5-1c) eine Anregung der Chondroitinsulfat-Oligosaccharide. Offensichtlich tritt ein Transfer von Magnetisierung von der Hyaluronidase auf die Chondroitinsulfat-Oligosaccharide auf.

Der Vergleich der relativen Signalintensitäten zwischen dem STD-Spektrum und dem normalen Spektrum zeigt eine deutliche Veränderung. Besonders signifikant ist die relative Abnahme der Signale bei 4.2 ppm, die aufgrund von 2D-Experimenten eindeutig den H-6-Protonen der Chondroitin-6-sulfate zugeordnet werden können, sowie die Abnahme der Resonanzen bei 2.015 ppm, die von den Acetatprotonen derselben Zucker stammen.

Aufgrund der bekannten Transglycosidaseaktivität⁴⁶ der Hyaluronidase kann postuliert werden, daß die unterschiedlich sulfatierten Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide kompetitiv um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren. Somit folgt aus dem beobachteten geringeren Magnetisierungstransfer auf die 6-Sulfate auch eine geringere Bindungs- bzw. Affinitätskonstante. Diese Ergebnisse sind kongruent mit dem experimentellen Befund, daß die Hydrolysegeschwindigkeit der 6-Sulfate geringer ist als die des 4-sulfatierten Chondroitins.

Bei Zugabe von Hyaluronidase zu einer größenhomogenen Mischung von Chondroitinsulfat-A-Tetrasacchariden (vorrangig Chondroitin-4-sulfat) treten im *saturation transfer difference* Spektrum ebenfalls deutliche Signale auf. Bei inkrementeller Zugabe der Hyaluronidase nimmt die Signalintensität des Chondroitinsulfat im *saturation transfer difference* Spektrum zu.



Abb. 5-1: a.) Protonenspektrum einer Probe von 4.5 mg größenhomogener Tetrasaccharide aus dem Verdau von Chondroitinsulfat C (vorrangig Chondroitin-6-sulfat) in D₂O bei pH 5. Die Temperatur beträgt 280 K, die Anzahl der Scans 8, die *receiver gain* 64. b.) STD-Spektrum der gleichen Probe. Die Anzahl der Scans beträgt 160, die reciever gain 64, die Spinlockzeit 30 ms. c.) STD-Spektrum der gleichen Probe nach Zugabe von 2 mg Hyaluronidase. Die Aufnahmebedingungen sind unverändert.

Die Veränderung der Signalintensitäten ist in Tab. 5-1 wiedergegeben. Nach den bisherigen Beobachtungen⁵⁶ sollte zunächst eine lineare Zunahme erfolgen, die dann in eine Sättigungskurve übergeht. Eine Sättigung des Signals wurde hier nicht beobachtet, da es bei weiterer Proteinzugabe (4 mg) zu Trübungen kam und diese Proben daher nicht weiter vermessen werden konnten.

Tab. 5-1: Abhängigkeit der Signalintensität von der Proteinkonzentration bei Titration von 2.5 mg Chondroitinsulfat-A-Tetrasacchariden mit Hyaluronidase. Die Signalintensität ist relativ zum Signal bei Zugabe von 2 mg Hyaluronidase angegeben, der Überschuß bezieht sich auf 4 angenommene gleichverteilte Komponenten. Alle Spektren wurden bei 280 K mit 160 scans in D₂O aufgenommen. Die Vorsättigung erfolgte bei 10 ppm, zur Unterdrückung des Proteinsignals wurde ein Spinlock von 50 ms verwendet. Der Fehler für die ermittelten relativen Signalintensitäten beträgt zwischen 0.05 und 0.1 ppm, da die beobachteten absoluten Signalintensitäten gering sind.

Menge Hyaluronidase [mg]	Überschuβ Ligand	Signalintensität
0		≈ 0
0.5	150 : 1	0.33
0.75	100 :1	0.63
2	37 : 1	1.00



Abb. 5-2: Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Signalintensität von der Proteinkonzentration bei Titration von Chondroitinsulfat-A-Tetrasacchariden mit Hyaluronidase (vgl. Tab. 5-1).

Die Abb. 5-3a zeigt das ¹H-NMR-Spektrum einer Mischung aus Chondroitinsulfat-Tetrasacchariden mit Hyaluronidase. Im Gegensatz zu dem in Abb. 5-1a wiedergegebenen Spektrum von Chondroitinsulfat-C-Tetrasacchariden zeigt das Spektrum im wesentlichen nur die Signale von 4-sulfatiertem Chondroitinsulfat. Die Probe enthält zusätzlich Saccharose, die als nicht bindende Komponente als interner Standard dient. Das STD-Spektrum dieser Probe (Abb. 5-3c) zeigt alle Signale des Chondroitinsulfats. Dagegen werden keine Saccharosesignale beobachtet. Das Spektrum von reiner Saccharose ist zum Vergleich in Abb. 5-3b dargestellt. Dieses entspricht der Erwartung, da die Saccharose nicht an Hyaluronidase bindet und daher kein Magnetisierungstransfer erfolgen kann.

Auffällig ist der deutliche Intensitätsgewinn des Peaks bei 5.3 ppm, dessen relative Intensität gegenüber dem α -H1 der übrigen Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide "Standard-" ¹H-NMR-Spektrum im unteren Prozentbereich auf fast 10 % ansteigt. Dieser Peak wird in der Arbeit von Sugahara et al.⁹⁵ dem α -anomeren Proton des dreifach sulfatierten Tetrasaccharids GlcUA-GalNAc(4S)-GlcUA(<u>2S</u>)-GalNAc(6S) zugeordnet. Die beobachtete TOCSY-Spur des Peaks unterstützt ebenfalls diese Zuordnung.

Der Intensitätsgewinn im STD-Spektrum im Vergleich zum normalen Spektrum weist auf einen erhöhten Magnetisierungstransfer vom Enzym auf dieses Tetrasaccharid hin. Der erhöhte Magnetisierungstransfer ist wiederum die Folge einer höheren Affinität des zusätzlich an der Uronsäure 2-sulfatierten Tetrasaccharids zu der Hyaluronidase.

In den Arbeiten von Knudson et al.⁴⁷ wurde eine unterschiedliche Selektivität für die Hydrolyse der 4- und 6-Sulfate in Abhängigkeit vom pH-Wert beobachtet. Diese konnte auch in eigenen Experimenten bestätigt werden. Demnach wird die relative Hydrolysegeschwindigkeit bei Änderung des pH-Wertes von 5 auf 6 zugunsten der Chondroitin-4sulfate verschoben. Gleichzeitig nimmt die absolute Hydrolysegeschwindigkeit deutlich ab. NMR-spektroskopischen Untersuchung wurde eine Lösung Zur von 9.4 mg Chondroitinsulfat-Tetrasacchariden zu gleichen Teilen auf zwei NMR-Röhrchen verteilt und der pH-Wert mit Natriumphosphat-Puffer auf 4.95 bzw. 6.15 eingestellt bei einer Phosphatpufferkonzentration von 10 mmol. Unter gleichen experimentellen Bedingungen (160 scans, receiver gain 64) nimmt die durchschnittliche Signalintensität bei pH 6 im Vergleich zur Probe mit pH 5 um einen Faktor von ca. 2.8 ab. Die gemessenen Signale ließen aufgrund des hohen Rauschlevels keine Auswertung zu, daher wurde das Experiment mit 4k scans wiederholt.



Abb. 5-3: a.) Protonenspektrum einer Mischung aus 10 mg Chondroitinsulfat-A-Tetrasaccharide (vorrangig Chondroitin-4-sulfat) und 1 mg Saccharose mit 3.3 mg Hyaluronidase in 650 μL D2O bei 280 K. Die Vorsättigung erfolgte bei -0.3 ppm, zur Unterdrückung des Proteinsignals wurde ein Spinlock von 50 ms verwendet. Der Peak bei 3.7 ppm ist eine Verunreinigung. b.) Vergleichsspektrum von Saccharose in D₂O bei 280 K. c.) STD-Spektrum der Probe. Im Vergleich zum normalen Spektrum ist das Fehlen der Saccharosepeaks deutlich zu erkennen. Besonders fällt der kleine Peak bei ca. 5.3 ppm auf (s. Text). Die Vorsättigung erfolgte bei -0.3 ppm, zur Unterdrückung des Proteinsignals wurde ein Spinlock von 50 ms verwendet.

Im Vergleich zur pH 5 Probe sind die Signale der Protonen im Bereich von 3 bis 3.5 ppm deutlich abgeschwächt. Die Tieffeld-verschobenen Acetatprotonen beider 4-sulfatierten Galactosamine sind im Vergleich zu den anderen Acetatprotonen leicht verstärkt. Dieses deutet darauf hin, daß die 4-Sulfate einen besseren Magnetisierungstransfer erfahren - und somit besser binden, wie auch die Hydrolyseexperimente gezeigt haben.

Die bisher beschriebenen Versuche wurden alle bei 280 K und geringem Salzgehalt (10 mmol Natriumphosphat) durchgeführt. Bei Temperaturerhöhung nimmt die Signalintensität deutlich ab, schon bei 300 K wird kaum noch eine Anregung des Chondroitinsulfats beobachtet. Eine Erhöhung des Salzgehaltes durch Zugabe von Natriumchlorid auf eine Konzentration von 10 und 50 mmol bewirkt ebenfalls eine deutliche Signalabnahme.

Unter der Annahme von spezifischer Bindung lassen sich diese Effekte gut erklären: Erfolgt eine Bindung von Chondroitinsulfat an das Protein, so bewirkt der Temperaturanstieg eine Erhöhung der Entropie, und das Bindungsgleichgewicht wird auf die Seite der freien Moleküle verschoben. Die höhere Salzkonzentration bewirkt den gleichen Effekt. Da die Bindungsaffinität wahrscheinlich eher schwach ist, bewirkt jede weitere Schwächung der Bindung einen geringeren Magnetisierungstransfer vom Protein auf das Chondroitinsulfat und damit die beobachtete Signalabschwächung.

5.1.4 Transferred NOE Experimente

Die oben beschriebenen Vorversuche zeigen erst bei 310 K ausschließlich positive NOEs, schon die bei 300 K aufgenommenen Spektren weisen einige negative Signale auf. Daher wurden die *transferred* NOE-Spektren der Tetramerenfraktionen aus dem Verdau von Chondroitinsulfat A und C jeweils bei 310 K aufgenommen. Die Spektren beider Proben zeigen eine Reihe negativer NOEs. Die erhaltenen Signalintensitäten sind allerdings bei allen Spektren gering. Angesichts der mutmaßlich geringen Bindungskonstante ist auch nur ein geringer NOE zu erwarten. Nach diesen Ergebnissen erscheint besonders die Ausdehnung der Untersuchungen auf sulfatierte Di- und Trisaccharide als sinnvoll, die – eine entsprechende Bindungskonstante vorausgesetzt – aufgrund ihres Gewichtes ideale Objekte für *transferred* NOE-Messungen sind.

5.2 Kationische Peptide und Heparin

5.2.1 Theoretische Vorversuche

Eine weitere Möglichkeit, die Wechselwirkung von Glycosaminoglycanen mit geladenen Proteinen an Modellen zu untersuchen, ist, kleine geladene Peptide gemeinsam mit polymerem Glycosaminoglycan zu vermessen. Mascotti und Lohman konnten durch Fluoreszensmessungen von kationischen Tripeptiden die in Tab. 5-2 wiedergegebenen Bindungskonstanten im millimolaren Bereich ermitteln.¹²⁴ Dabei zeigte sich, daß der Entropiegewinn durch die Freisetzung der Gegenionen des Heparins entscheidend zur Bindung beiträgt; ΔH°_{obs} war weitgehend unabhängig von der Salzkonzentration.

Tab. 5-2: Bindungskonstanten f
ür die Bindung der Tripeptide KWK und RWR an Heparin.¹²⁴ Die Angaben wurden durch Fluoreszensmessungen erhalten. (20 mM Kaliumacetatpuffer, pH 6).

Peptid	Bindungskonstante
KWK	$3.2 \cdot 10^3 \mathrm{M}^{-1}$
RWR	$4.5 \cdot 10^3 \mathrm{M}^{-1}$

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch *transferred* NOE und *saturation transfer difference* NMR-Spektroskopie eine Bindung nachweisbar ist. Zunächst wurde eine Reihe von Computersimulationen durchgeführt, um einen Eindruck vom Bindungsgeschehen zu erhalten.

Die Energieminimierung des Peptids H₂N-Arg-Ala-Arg-COOH im Vakuum zeigt, daß bei Berücksichtigung der Ladung bei einer auf molekularem Level realistischen Dielektrizitätskonstante¹⁰³ $\varepsilon = 10$ ein intramolekularer Ringschluß zwischen der positiven Ladung am N-terminalen Arginin und der negativen an der Carboxylatgruppe auftrat. Daher wurde für die weiteren Versuche und die NMR-Experimente die negative Ladung als Amid maskiert.

Weitere Simulationen der Sequenz H₂N-Arg-Ala-Arg-CONH₂ zeigten eine relativ hohe Beweglichkeit des Peptidrückgrads, allerdings falteten sich nach einiger Zeit die Seitenketten ein und das Peptid kollabierte in sich zusammen, wie es von größeren Systemen bekannt ist. Daher wurden weitere Simulationen durchgeführt, in denen Wasser explizit berücksichtigt wurde. Diese Simulationen zeigten ebenfalls eine hohe Beweglichkeit, aufgrund der großen Zahl vorhandener Wassermoleküle gelang es aber offensichtlich nicht, den Konformationsraum vollständig abzudecken.

Eine 100 ps *molecular dynamics* Simulation im Vakuum der Sequenz H₂N-Lys-Ala-Lys-CONH₂ zeigte eine relativ breite Verteilung der Abstände zwischen den kationischen Gruppen: Die Abstände zwischen den beiden Amin-Stickstoffatomen in den Seitenkettten betrugen zwischen 8 und 18 Å, dabei waren zwei bevorzugte Cluster von ca. 11 und ca. 16 Å zu identifizieren.

Mit den Peptidkonformeren wurden anschließend Dockingexperimente zwischen Peptiden und Glycosaminoglycanen durchgeführt. Für Heparin und Chondroitinsulfat wurden die Konformationen verwendet, die nach GEGOP-Simulationen mit je 300000 MMC-Schritte erhalten wurden. In Abb. 5-4 sind das Peptid Lys-Ala-Lys-CONH₂ und Heparin gemeinsam in einer schematischen Bindungsanordnung wiedergegeben. Bei dieser gestreckten Peptidkonformation ist eine Penta- bis Hexasaccharideinheit als Bindungspartner erforderlich. Zur Bindung der Peptidkonformationen, bei denen der Abstand der Ladungen ca. 11 Å beträgt, ist eine Tetrasaccharideinheit erforderlich.

Die Dockingexperimente zeigen deutlich, daß Heparin aufgrund seiner höheren Ladungsdichte sehr gut in der Lage ist, die Ammoniumgruppen zu chelatisieren und damit eine gute Bindung zu erreichen. Chondroitinsulfat dagegen weist eine deutlich geringere Ladungsdichte auf, und es ist schwieriger, in allen Konformationen eine Chelatisierung zu erreichen. Daher ist für die Bindung der Peptide an polymeres Chondroitinsulfat eine geringe ionische Bindung zu erwarten. (Bei dieser Überlegung wird allerdings der Einfluß chelatartig gebundener Gegenionen vernachlässigt). Da die Bindungskonstante für das Peptid Arg-Trp-Arg mit Heparin im millimolaren Bereich liegt¹²⁴ und nach diesen Ergebnissen die Wechselwirkung mit Chondroitinsulfat deutlich schlechter sein sollte, wurden alle NMR-Messungen mit Heparin durchgeführt.



Abb. 5-4: Schematische Darstellung der möglichen Wechselwirkung des Peptids Lys-Ala-Lys-CONH₂ mit Heparin. Bei dieser gestreckten Peptidkonformation ist eine Penta- bis Hexasaccharideinheit als Bindungspartner erforderlich.

Die geeignete Parameterisierung der Ladungen bzw. der Dielektrizitätskonstante erwies sich als schwierig, da es bei zu großem Beitrag der elektrostatischen Energie (Epsilon = 1) leicht zu willkürlichen Verzerrungen der Seitenketten der ionischen Peptide kommt. Simulationen mit höherer Dieelektrizitätskonstante ($\varepsilon = 60$) ergaben realistischer erscheinende wurden Peptidkonformationen. Bei MD-Simulationen fast immer die initialen Bindungspartner (Sulfation X – Ammoniumion Y) beibehalten, die erwartete Umorientierung zu günstigeren Bindungspartnern blieb aus.

Selbst unter optimaler Parameterisierung sind energetische Aussagen aus diesen Experimenten sicherlich nur schwer abzuleiten, da nach bekannten Ergebnissen ein Teil der Bindungsenergie aus dem Entropiegewinn als Folge der Ionenfreisetzung aus Heparin bei Interaktion mit kationischen Peptiden folgt.¹²⁴

Die Dockingexperimente deuten gleichzeitig auf ein grundsätzliches Problem für die Durchführung der *saturation transfer difference* NMR-Spektroskopie hin: Wird die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand ausschließlich durch geladene Gruppen vermittelt, so ist der Abstand zwischen den NMR-aktiven (Kohlenstoff-gebundenen) Proteinen zwischen beiden Molekülen erheblich größer, als dieses bei H-Brücken oder hydrophober Wechselwirkung der Fall wäre. Auf diese Problematik wird in der abschließenden Diskussion der STD-Ergebnisse noch näher eingegangen.

5.2.2 NMR-Experimente

Als Ergebnis der vorhergehenden Simulationen kann eine Hexasaccharideinheit als "Rezeptoreinheit" für die Wechselwirkung mit den Tripeptiden betrachtet werden. Auf der Basis des Molekulargewichts des Natriumsalzes der neunfach sulfatierten Hexasaccharideinheit (-UA(2S)-GlcNS(6S)-)₃ (MW = 1996.2) kann somit ein Massenverhältnis für die Titration der Peptide emittelt werden.

Die Durchführung der NMR-Experimente erwies sich leider als nicht erfolgreich. Es wurden Experimente mit einer Reihe von verschiedenen Peptiden (Arg-Pro-Lys-Thr-NH₂, Ala-Arg-Trp-Arg-NH₂, Lys-Trp-Lys-NH₂, Arg-Ala-Arg-NH₂) mit Peptidüberschüssen im Bereich von 1:20 bis 1:40 durchgeführt. In keinem Fall konnte ein negativer (*transferred*) NOE beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung der Heparinkonzentration war nicht möglich, da es teilweise zu Ausflockungen kam.

Die Durchführung von *saturation transfer difference* NMR-Experimenten wurde dadurch erschwert, daß es nicht gelang, hinreichend Magnetisierung auf das Heparin zu übertragen. Direkte Sättigung einer Heparinresonanz durch *on-resonance* Einstrahlung auf das Zentrum eines Peaks war nicht möglich, da die Signale mit den Peptidresonanzen zu stark überlappten. Bei der Untersuchung schwerer Proteine mit großer Linienbreite ist auch eine Sättigung des Proteins durch Einstrahlung neben den Peaks möglich. Allerdings weist das verwendete Heparin nur ein durchschnittliches Molekulargewicht von 16-17 kD auf. Das NMR-Spektrum zeigt entsprechend nur eine geringe Linienbreite und es erfolgt nur wenig Anregung der Heparinresonanzen. Eine Anregung kann bei 280 K durch Einstrahlung bei -0.732 ppm erzielt werden, ein Magnetisierungstransfer auf das Peptid Arg-Ala-Arg-NH₂ konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

5.3 Heparinoligosaccharide und Interleukin-8

5.3.1 Beschreibung der Heparinoligosaccharid-Proben

In Kooperation mit U. Lindahl, Uppsala, wurde eine Reihe von Heparin-Oligomeren auf ihre Eignung zu Bindungsstudien durch NMR-Spektroskopie hin untersucht. Dabei handelte es sich um native und partiell O-desulfatierte Heparinfragmente aus Kuhlunge, die einen hohen Anteil an Iduronsäure und N-sulfatiertem Glucosamin aufweisen. Das polymere Heparin wurde mit salpetriger Säure gespalten und die Zucker anschließend zum Anhydromanitol reduziert. Die Reinigung der Proben erfolgte nach standardisiertem Vorgehen durch Gelfiltration mit anschließender Anionenaustauschchromatographie. Einen Überblick über die untersuchten Proben gibt Tab. 5-3.

Tab. 5-3: Übersicht über die untersuchten Heparinproben. Die Struktur für die vollständig sulfatierten Tetrasaccharide lautet: IdoA(2-SO₃)-GlcNSO₃(6-SO₃)-IdoA(2-SO₃)- aMan_R(6-SO₃); die der vollständig sulfatierten Hexasaccharide IdoA(2-SO₃)- [GlcNSO₃(6-SO₃)-IdoA(2-SO₃)]₂-aMan_R(6-SO₃). Bei den partiell sulfatierten Zuckern sind vorrangig die 6-O-Sulfate entfernt, zu einem geringeren Anteil auch die 2-O-Sulfate.

Bezeichnung	Beschreibung
ΗI	Vollständig sulfatierte Tetrasaccharide (nur 120 µg)
H II	Vollständig sulfatierte Hexasaccharide
H III	Partiell desulfatierte Tetrasaccharide
H IV	Partiell desulfatierte Hexasaccharide
ΗV	Partiell desulfatierte Tetrasaccharide (2 Sulfatgruppen)
H VI	Partiell desulfatierte Tetrasaccharide (3 Sulfatgruppen)
H VIIa	Vollständig sulfatierte Hexasaccharide
H VIIb	Vollständig sulfatierte Hexasaccharide
H VIIc	Vollständig sulfatierte Hexasaccharide

5.3.2 Vorversuche

Untersuchung der freien Heparin-Oligomere

Zunächst wurden die freien Zucker vermessen, um mit Hilfe zweidimensionaler Spektren und durch den Vergleich mit bekannten Literaturdaten^{60, 125, 126} die Zuordnung der Resonanzen zu ermitteln. Auf die vollständige und exakte Interpretation der Spektren wurde verzichtet, da keine der untersuchten Proben rein war, wie beispielsweise das in Abb. 5-5 wiedergegebene ¹H-NMR-Spektrum des partiell desulfatierten Heparin-Tetrasaccharids H III zeigt.



IdoA(2-SO₃)-GIcNSO₃(6-SO₃)-IdoA(2-SO₃)-aMan_R(6-SO₃)

Abb. 5-5: ¹H-NMR-Spektrum und Struktur des partiell desulfatierten Heparin-Tetrasaccharids H III bei 300 K in D₂O. Die markantesten Protonenresonanzen sind in Tab. 5-4 zusammengefaßt.



 $IdoA(2-SO_3)-GIcNSO_3(6-SO_3)-IdoA(2-SO_3)-GIcNSO_3(6-SO_3)-IdoA(2-SO_3)-aMan_R(6-SO_3)-aMan_R$

Abb. 5-6:¹H-NMR-Spektrum und Struktur des vollständig sulfatierten Hexasaccharids (H VIIa) bei
300 K in D2O. Die markantesten Protonenresonanzen sind in Tab. 5-4 zusammengefaßt.

In Abb. 5-6 ist das Spektrum des vollständig sulfatierten Hexasaccharids H VII wiedergegeben. Beide Spektren zeigen im Bereich 5.4 ppm die Resonanzen der anomeren Protonen der Glucosamine, bei 5.1 - 5.2 ppm die entsprechenden Resonanzen der Iduronsäuren. Bemerkenswert ist die starke Tieffeldverschiebung des H-2 Protons im Vergleich zwischen N-sulfatiertem Glucosamin (3.2 ppm) und der 2-sulfatierten Iduronsäure (4.24 ppm). Das Spektrum des vollständig sulfatierten Hexasaccharids H VII zeigt zusätzlich bei ca. 2.0 ppm die Anwesenheit von einer geringen Anzahl von Acetaten. Die Zuordnungen sind in Tab. 5-4 zusammengefaßt.

Tab. 5-4:Zuordnungen der Protonenresonanzen des vollständig sulfatierten Hexasaccharids (HVIIA) aufgrund der TOCSY und NOESY Spektren und bekannter Literaturdaten.60, 125, 126

Frequenz	Proton	Zucker
5.41	H-1	GlcN zum nicht red. Ende
5.37	H-1	GlcN intern
5.17	H-1	IduA am nicht red. Ende
5.13	H-1	IduA intern
5.03	H-1	IduA (2-non-S)
4.7 - 4.8	H-5	IduA (je nach Sulfatierungsgrad)
4.56	H-1	GlcA
4.24	H-2	IduA(2S)
4.0	H-4	GlcN
3.2	H-2	IduA
3.2	H-2	GlcN
3.6 - 3.8	H-3, H-4	GlcN
4.2 - 4.4	Н-6	GlcN

Vorzeichen des NOE im freien Zustand

Das von Meyer et al. entwickelte Verfahren,⁸⁹ mit dem biologische Aktivität durch *transferred* NOE in Substanzmischungen nachgewiesen werden kann, geht davon aus, daß der bindende Ligand durch seinen negativen NOE identifiziert wird. Voraussetzung ist, daß die gesamte Bibliothek im freien Zustand positive NOEs aufweist. Ist dieses nicht der Fall und die ungebundenen Liganden weisen bereits negative NOEs auf, kann das Verfahren nur eingesetzt werden, indem die Aufbaukurven einzelner Peaks im freien und gebundenen Zustand verglichen werden - die Signale bindender Liganden sollten dabei unterschiedliche negative Steigungen aufweisen. Praktisch ist diese Vorgehensweise allerdings stark limitiert,

da isolierte, gut integrierbare Signale vorhanden sein müssen. Dieses war bei den vorliegenden Mischungen nicht der Fall. Darüber hinaus ist auch der Meßzeitaufwand zur Bestimmung sauberer Aufbaukurven gegenüber der Zeit zur Messung eines NOE-Spektrums erheblich höher.

Die Untersuchung der in Tab. 5-3 zusammengefaßten freien Heparinoligosaccharide ergab, daß nur die partiell desulfatierten Tetrasaccharide (H III, V und VI) bei 310 K einen positiven NOE aufwiesen. Daher wurden die weiteren NOE-Untersuchungen auf diese Proben beschränkt. Eine Absenkung der Meßtemperatur auf 300 K war noch akzeptabel, bei 290 K waren bereits einige der NOEs negativ (Tab. 5-5). Im Vergleich zwischen den ladungshomogenen Tetrasaccharidproben H V (2 Sulfatgruppen) und H VI (3 Sulfatgruppen) zeigt das 300 K Spektrum des disulfatierten Tetrasaccharids H V geringfügig weniger negative Signale.

 Tab. 5-5: Vorzeichen des NOE f
ür die Probe des partiell desulfatierten Tetrasaccharids (H III) in Abh
ängigkeit von der Temperatur. Die Spektren der ladungshomogenen Tetrasaccharidproben H V und H VI zeigen
ähnliche NOEs, dabei sind im Spektrum des disulfatierten Tetrasaccharids H V geringf
ügig weniger negative Signale zu beobachten.

Experiment	Temperatur	Vorzeichen NOE
NOESY	290 K	+ und -
NOESY	300 K	Nulldurchgang, einige schwach + und -
NOESY	310 K	alle +

Ermittlung der Einstrahlfrequenz für saturation transfer difference Experimente

Das experimentelle Ziel der *saturation transfer difference* Experimente ist, möglichst viel Magnetisierung vom Protein auf die bindenden Liganden zu übertragen, ohne daß es zur direkten Anregung von nicht bindenden kommt. Daher müssen zunächst mit dem freien Protein die Einstrahlbedingungen ermittelt werden, die eine optimale Anregung ergeben, ohne daß es in der Referenzprobe mit freien Liganden zur direkten Anregung kommt.

Interleukin-8 ist mit einem Molekulargewicht von nur 7.9 kD im Vergleich zur Hyaluronidase und anderen mit diesem Verfahren bislang vermessenen Proteinen⁵⁶ ein sehr leichter

Rezeptor. Abb. 5-7 zeigt das ¹H-NMR- Spektrum von Interleukin-8. Das in D_2O aufgenommene NMR-Spektrum zeigt eine gute Auflösung und geringe Linienbreite. Dementsprechend übertrug die bei schwereren Proteinen einsetzbare Vorsättigung bei weit über 10 ppm bzw. im negativen Bereich kaum Magnetisierung; eine gute Anregung des Proteins ließ sich nur durch Einstrahlung *on-resonance* auf Proteinsignale erzielen. In Tab. 5-6 sind die Ergebnisse für die wichtigsten getesteten Einstrahlfrequenzen zusammengefaßt.



Abb. 5-7: 1 H-NMR-Spektrum von Interleukin-8 in D₂O bei 300 K.

Tab. 5-6:Ergebnisse der saturation transfer difference NMR-Experimente mit reinen Proben von
Interleukin-8 und partiell desulfatiertem Heparin-Tetrasaccharid H III.

Frequenz	Ergebnis Interleukin-8	Ergebnis Heparin (H III)	
-4.070	Kaum Anregung	Keine Anregung	
-0.732	Geringe Anregung	Keine Anregung	
0.762	Gute Anregung	Keine Anregung	
3.820	Sehr gute Anregung	Sehr gute Anregung	
7.040	Gute Anregung	Anregung	
10.000	Geringe Anregung	Keine Anregung	
30.000	Off-resonance	Off-resonance	

Um die relativ schlechte Sättigung zu optimieren, wurde die Sättigungsdauer für das reine Protein variiert. Während durch Erhöhung der Zeit von 0.5 s und 1 s auf 2 s eine Steigerung der Signalintensität erzielt wurden, ergab eine Sättigungsdauer von 4 s keine merkliche Verbesserung. Berücksichtigt man zusätzlich die Verlängerung der Meßdauer, so scheinen 2 s optimal. Dieses entspricht den für andere Proteine gefundenen Ergebnissen.⁵⁶

Die *saturation transfer difference* NMR-Spektren der proteinfreien Proben zeigten genau wie die Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide bei 280 K eine geringe Blindanregung. Die Wiederholung der Messungen bei 300 K zeigte dagegen kaum noch Signale, wie Abb. 5-8 zeigt. Um Artefakte durch mangelnde Durchmischung oder ungenügende Temperaturkonstanz auszuschließen, wurden Blindversuche mit vorsätzlich schlecht präparierten Proben durchgeführt. Dazu wurden die *saturation transfer difference* Spektren von nur kurz geschüttelten bzw. nur kurz Temperatur-equilibrierten Proben mit gründlich equilibrierten Proben verglichen. Dabei zeigte sich kein nennenswerter Unterschied zwischen den Proben, so daß dieser Teil der Probenpräparation als Ursache ausgeschlossen werden kann.



Abb. 5-8: Blindanregung des voll sulfatierten Heparin-Hexasaccharids (H VIIc) bei 280 K (oben) vs. 300 K (unten). Die Einstrahlfrequenz beträgt 0.762 bzw. 0.500 ppm.

Signalintensität in Abhängigkeit vom Spinlock

Während des NMR-Experiments wird eine maximale Anregung des Proteins angestrebt, die Aufzeichnung des Spektrums sollte dagegen nach Möglichkeit ohne störende Proteinsignale geschehen. Die Diskriminierung der Signale kann durch das Anlegen eines Spinlockfeldes erreicht werden. Der Massenunterschied zwischen Protein (7.9 kD) und vollständig sulfatiertem Hexasaccharid (1.5 kD) ist allerdings relativ gering, was eine Optimierung der Dauer des Spinlocks erforderlich macht. Die Auswirkung des Spinlocks zeigt Abb. 5-9 anhand eines normalen ¹H-NMR-Spektrums. Während das Spektrum ohne Spinlock (oben) vor allem im Bereich 0.8 ppm deutliche Proteinsignale zeigt, sind diese im Spektrum mit einem Spinlock (unten) von 50 ms fast vollständig verschwunden. Dagegen sind die Signale des Heparins nur geringfügig abgeschwächt. Bei der Durchführung von *saturation transfer difference* Messungen wird das Protein überproportional angeregt. Daher wurde für diese Experimente ein Spinlock von 100 ms eingesetzt.



Abb. 5-9: Auswirkung des Spinlocks auf das ¹H-NMR-Spektrum einer Mischung aus vollständig sulfatiertem Hexasaccharids H II und Interleukin-8.

5.3.3 Peakverbreiterung und Peakshifts

Für die Durchführung der Bindungsstudien wurden jeweils Lösungen der Heparinproben mit Interleukin-8 titriert. Die Zahl der Komponenten in den Heparinproben war unbekannt, daher wurden für die Berechnung der Verhältnisse der partiell desulfatierten Tetrasaccharide (H III) vier gleichverteilte, bei den ladungshomogenen Proben (H V und H VI) wurden jeweils zwei gleichverteilte Komponenten zugrunde gelegt.

Bei der Titration aller Proben waren eine geringe Peakverbreiterung sowie leichte Shifts der Peaks zu beobachten (Abb. 5-10). Dieses ist ein deutliches Indiz für das Auftreten einer Bindung. Allerdings konnten bei den einzelnen Proben keine Unterschiede der Linienverbreiterungen für einzelne Peaks festgestellt werden, aus der sich eine spezifische Bindung einzelner Komponenten nachweisen ließe.



Abb. 5-10: Peakverbreiterung und Peakshift durch Zugabe von Interleukin-8 zur Probe H III (Mischung partiell desulfatierter Heparin-Tetramere) bei 280 K. Die untere Spur zeigt das Spektrum vor, die mittlere und obere Spur nach der Zugabe von Protein im Verhältnis 1:20 und 1:10 (Um eine Abschätzung Überschüsse zu ermöglichen, wurde willkürlich eine Zahl von vier gleichverteilten Komponenten angenommenen, von denen eine bindet).

5.3.4 Ergebnisse transferred NOE-Experimente

Wie die Vorversuche ergeben haben, eigneten sich nur die drei Proben mit partiell sulfatierten Tetrasacchariden für die Durchführung von *transferred* NOE-Experimenten, die allerdings eine Temperatur von 310 K erfordern. Nach Zugabe von Interleukin-8 wurden jeweils *transferred* NOE-Spektren aufgenommen, wobei bei einem Überschuß von 20:1 eine Reihe negativer NOEs beobachtet wurde. Da die Zusammensetzung der Proben unbekannt war, ist der Überschuß auf eine willkürlich angenommene Zahl von vier gleichverteilten Komponenten bezogen, von denen eine bindet. In Tab. 5-7 sind die durchgeführten Experimente zusammengefaßt.

Tab. 5-7: Übersicht über die *transferred* NOE-Experimente mit den partiell desulfatierten Tetrasacchariden H III, H V und H VI. Die Phase der Spektren wurde so eingestellt, daß ein negatives Diagonalsignal erhalten wurde. In der Tabelle steht + für ein positives, - für ein negatives Vorzeichen der NOE-Crosspeaks.

Temperatur	Überschuß Ligand	Vorzeichen NOE
310 K	kein Protein	alle +
310 K	60:1	alle +
	(4 Komponenten)	
310 K	20:1	+ und -
	(4 Komponenten)	
310 K	10:1	+ und -, aber deutlich
	(4 Komponenten)	mehr -
310 K	20:1	+ und -
	(2 Komponenten)	
310 K	20:1	+ und -
	(2 Komponenten)	
	<i>Temperatur</i> 310 K 310 K 310 K 310 K 310 K 310 K	TemperaturÜberschuß Ligand310 Kkein Protein310 K60:1 (4 Komponenten)310 K20:1 (4 Komponenten)310 K10:1 (4 Komponenten)310 K20:1 (2 Komponenten)310 K20:1 (2 Komponenten)

Exemplarisch sind in Abb. 5-11 die H-1 Spuren der NOE-Spektren von Probe H III bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen abgebildet. Nach Zugabe von Interleukin-8 ist eine Abnahme der positiven NOEs zu beobachten, bei weiterer Proteinzugabe treten negative NOEs auf. Bei 5.1 ppm ist der Kontakt von H-1 IduA mit H-3 und H-4 IduA zu erkennen, bei 5.4 ppm die Kontakte von H-1 des GlcN-3 zu H-2 GlcN-3. Bemerkenswert ist, daß es hier laut den Vergleichsspektren nicht zu einem Peakshift als Folge der Titration kommt, sondern sich bei 5.4 ppm die Signale von zwei verschiedenen Protonen überlagern (vgl. Abb. 5-5), die mit zwei verschiedenen H-2 Protonen wechselwirken. Der Vergleich mit Literaturdaten⁶⁰ legt nahe, daß es sich um die anomeren Protonen eines 2N,6O-disulfatierten Glucosamins handelt, das an Iduronsäure gebunden ist. Bei 2O-Sulfatierung dieser Uronsäure sind entsprechend die Protonen H-1 und H-2 des Glucosamins leicht Tieffeld-verschoben. Dieses Verhalten entspricht der Erwartung für *transferred* NOE Experimente und deckt sich grundsätzlich mit den Beobachtungen von Spillmann et al.,²³ nach denen die Heparinregionen besser an Interleukin-8 binden, die reich an 2O-sulfatierter Iduronsäure sind.

Allerdings entspricht die Verteilung zwischen positivem und negativem Vorzeichen dem, das in der Protein-freien Probe bei 290 K beobachtet wurde. Dieses legt die Vermutung nahe, daß die Veränderung des NOE-Vorzeichens lediglich eine Folge der Viskositätsänderung durch die Proteinzugabe und der damit verbundenen Änderung der Beweglichkeit der Heparin-Tetramere ist und nicht durch spezifische Bindung hervorgerufen wird. Leider ergab die Wiederholung des Experimente mit den ladungshomogenen Proben H V und H VI keinen genaueren Aufschluß, da hier der direkte Vergleich der Peaks fehlte.



 Abb. 5-11: Ausschnitt aus den NOE-Spektren der Probe H III ohne (links) und mit Interleukin-8 im Verhältnis 1:20 (mitte) und 1:10 (rechts). Die positiven NOEs sind mit dünnen, die negativen mit dicken Linien wiedergegeben. Die Spektren wurden bei 310 K aufgenommen.

Nach den Ergebnissen von Spillmann et al. können Heparin-Hexamere nur bei 10 mM Phosphatpuffer-Konzentration, nicht aber nach bei zusätzlicher Anwesenheit von 140 mM Natriumchlorid im Cellulose-Filter-Assay isoliert werden. Dementsprechend sollte die Zugabe von Natriumchlorid (100 mM) zur NMR-Probe die Bindungsaffinität deutlich vermindern und damit im *transferred* NOE Experiment zu einer Abschwächung der negativen Signale führen. Experimentell wurde allerdings keine Änderung des Vorzeichens der NOE-Signale festgestellt.

5.3.5 Ergebnisse der saturation transfer difference NMR-Experimente

Mit den zur Verfügung stehenden Proben^{*} (Tab. 5-3) wurden *saturation transfer difference* NMR-Experimente unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Bei den meisten Proben gelang es nicht, ein auswertbares STD-Spektrum zu erhalten. Zum einen ist der Magnetisierungstransfer vermutlich aufgrund der schwachen Bindung sehr gering, so daß es kaum zu einer nachweisbaren Anregung kommt. Ein zusätzliches Problem stellt das geringe Molekulargewicht des Proteins dar, da die Linienbreite gering und somit die Unterscheidbarkeit zu den Ligandensignalen erschwert ist. Zur Unterdrückung dieser Signale ist eine Spinlockzeit von 100 ms notwendig, während der die ohnehin schwachen Ligandensignale weiter Intensität verlieren.

Von allen durchgeführten *saturation transfer difference* NMR-Experimenten zeigte nur das voll sulfatierte Hexasaccharid nachweisbare Bindungsaktivität. Bei einem Überschuß von ca. 15:1 sind im 1D-Differenzexperiment ohne Spinlock fast ausschließlich Proteinsignale zu beobachten. Erst durch eine Spinlockzeit von 100 ms gelang es, diese fast vollständig zu unterdrücken. Die Abb. 5-12 zeigt das erhaltene Spektrum.

Unter den gleichen Aufnahmebedingungen wurde auch ein 2D TOCSY aufgenommen. Die Auswertung der Kreuzsignale ergab einen durchschnittlichen *saturation transfer difference* Effekt von 0.4 % und ist damit eher gering, andere im Arbeitskreis vermessene Proben zeigen einen Effekt im unteren Prozentbereich.⁵⁶

Das erhaltene *saturation transfer difference* TOCSY ist trotz 2-tägiger Meßdauer stark verrauscht, läßt aber nicht nur Signale der Hauptkomponente, sondern auch der geringer vorhandenen Komponenten erkennen. Offensichtlich scheinen mehrere Bestandteile zu binden, wenn auch mit unterschiedlicher Stärke. Da eine direkte Interpretation des Spektrums unter Vernachlässigung der kleineren Peaks die geringer vorhandenen Komponenten ignoriert hätte, wurde ein Integrationsansatz versucht.

^{*} bis auf H 1, da aufgrund der geringen Menge (120 µg) keine erfolgreiche Messung zu erwarten war.



Abb. 5-12: ¹H-NMR (oben) und *saturation transfer difference* Spektrum (unten) von vollständig sulfatiertem Hexasaccharid (H VIIc) in Anwesenheit von Interleukin-8. Gut erkennbar sind die H-1 Resonanzen der Glucosamine (5.4 ppm), Iduronsäure (5.2 ppm) und die Ringprotonen der Zucker. Das Signal zwischen 0.5 und 1 ppm liegt im Bereich der Sättigungsfrequenz von 0.76 ppm, vermutlich relaxieren einige flexible Seitenketten des Proteins ebenfalls langsam.

Dazu wurden im normalen TOCSY gut identifizierbare Peaks integriert. Die gleichen Integrale wurden im *saturation transfer difference* TOCSY bestimmt und für jeden Peak das Verhältnis zwischen beiden Spektren berechnet. Zur Vereinfachung wurden ausgehend von den 50 intensivsten Peaks des *saturation transfer difference* TOCSY die mittleren *saturation transfer difference* Effekte für einzelne Spuren bestimmt. Einige Ergebnisse faßt Tab. 5-8 zusammen.

Tab. 5-8:Anteiliger Sättigungstransfer im 2D saturation transfer difference TOCSY. Von den
ausgewählten Peaks wurden die 50 mit den stärksten saturation transfer difference
Effekten berücksichtigt. So weisen die erfaßten Integrale des STD Spektrums im Bereich
 $3.3 \text{ ppm} \pm 0.05 \text{ ppm}$ im Mittel 0.63 % der Intensität der Signale des normalen Spektrums
auf.

"Spur" [ppm]	Alle	3.3	3.95	5.5	4	4.25	5.15	3.7
Bereich \pm		0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mittelwert [%]	0.40	0.63	0.26	0.52	0.43	0.42	0.40	0.37
Anzahl	50	8	7	7	10	11	9	10

Besonders fallen die Spuren im Bereich 5.5 ppm (H-1 GlcN) sowie 3.3 ppm (H-2 GlcN) auf, die einen besonders hohen Sättigungstransfer zeigen, also zu Molekülen oder Molekülregionen gehören, auf die besonders gut Magnetisierung übertragen wird. Deutlich schwächer als der Durchschnitt binden die Protonen einer Spur im Bereich 3.95 ppm, deren Crosspeaks einer nicht an 2 sulfatierten Uronsäure zugeordnet werden können: 5.12 ppm (H-1), 4.81 ppm (H-5), 4.08 ppm bzw. 3.95 ppm (H-3 bzw. H-4) 3.70 ppm (H-2). Dieses entspricht den Ergebnissen von Spillmann et al.,²³ nach denen Abschnitte mit höherer 2-Sulfatierung der Iduronsäure die aktiven Bindungspartner von Interleukin-8 sind.

Als Ursache für diese *saturation transfer difference* Aktivität kommen neben spezifischer Bindung auch unspezifische Wechselwirkungen und evtl. auch die Ausbildung von gelartigen Strukturen in Frage. Zur genaueren Klärung bietet es sich an, die Probe mit einer "internen Referenzsubstanz", also einem Nichtbinder zu versetzen. Dabei bot sich die Verwendung von Chondroitinsulfat-Hexasaccharid an, das aus den vorhergehenden Untersuchungen zur Verfügung stand. Allerdings ist Chondroitinsulfat mit nur 2 Ladungen pro Disaccharideinheit deutlich geringer geladen als voll sulfatiertes Heparin mit 4 Ladungseinheiten. Die Interleukin-8 enthaltende Probe des vollständig sulfatierten Hexasaccharids (H VIIa) wurde mit Chondroitinsulfat-Hexasaccharid im Verhältnis von ungefähr 1:1 versetzt und erneut ein *saturation transfer difference* TOCSY vermessen. Die Abb. 5-13 zeigt das normale TOCSY und das *saturation transfer difference* TOCSY.

Erwartungsgemäß zeigt das Heparin-Oligomer im *saturation transfer difference* Spektrum die intensivsten Signale, es bindet also bedeutend besser an Interleukin-8. Mit deutlich geringerer Intensität sind auch die Resonanzen des Chondroitinsulfats zu erkennen. Aufgrund der

geringeren Ladung des Chondroitinsulfats bleibt unklar, ob wirklich eine spezifische Wechselwirkung vorliegt oder die Bindung nur als Folge der höheren Ladungsdichte besser ist.





Abb. 5-13: NMR-Spektroskopische Untersuchung einer Mischung aus vollständig sulfatiertem Hexasaccharid (H VIIa) und Chondroitinsulfat-Tetrasaccharid im Verhältnis von ungefähr 1:1 in Gegenwart in Interleukin-8. Das erste Spektrum gibt das erhaltene *saturation transfer difference* NMR-Spektrum. Die zweite Abbildung zeigt zwei übereinandergelegte Spektren, in der das *saturation transfer difference* TOCSY (dickere Linien) mit dem Standard-TOCSY (dünne Linien) überlagert wurde. Besonders deutlich zeigen sich die Unterschiede im Bereich 3.4 –3.6 ppm, in dem die Resonanzen der Ringprotonen der Chondroitinsulfat-Glucuronsäuren liegen. Diese erscheinen im *saturation transfer difference* Spektrum nur noch sehr schwach.

5.4 Diskussion der Ergebnisse der *saturation transfer difference* NMR-Spektrokopie

Durch den Einsatz der *saturation transfer difference* NMR-Spektroskopie konnte eine Reihe von Spektren erhalten werden, deren Ergebnisse kongruent zu anderen experimentellen Beobachtungen sind. So zeigt die 2-sulfatierte Uronsäure des Heparins im STD-Spektrum mit Interleukin-8 ein stärkeres Signal, was den Beobachtungen von Lindahl et al. entspricht, daß die 2-Sulfatierung für die Bindung an das Protein notwendig ist.²³ Bei den Chondroitinsulfaten ist bekannt, daß das 4-sulfatierte Oligosaccharid schneller durch Hyaluronidase gespalten wird als das 6-sulfatierte Analogon;⁴⁷ dementsprechend zeigt das STD-Spektrum Signale des 4-sulfatierten Galactosamins stärker als die entsprechenden des 6-sulfatierten.

Auffällig ist die im Vergleich zu anderen Anwendungen der STD-Spektroskopie deutlich verringerte Signalintensität. Eine der Ursachen sind die recht geringen Bindungskonstanten, die für die Systeme kationische Tripeptide/Heparin und Heparin-Hexasaccharid/Interleukin-8 mit anderen Verfahren experimentell bestimmt wurden. Als weitere Ursache ist die für sulfatierte Oligosaccharide zu erwartende niedrige Diffusionskonstante zu nennen. Da die NMR-basierte Bioaffinitätsspektroskopie einen raschen Austausch der Liganden zwischen gebundenem und freiem Zustand erfordert, so daß im zeitlichen Mittel die in Lösung befindlichen Liganden die Information über den gebundenen Zustand tragen, kann eine niedrige Diffusionskonstante der sulfatierten Oligosaccharide dazu führen, daß dieser Austausch (k_{diff}) nicht schnell genug erfolgt, und daher nur ein kleiner Teil der Liganden die Information des gebundenen Zustands trägt. Dieses führt dann unmittelbar zu einer geringen Signalintensität.



Ein weiterer wichtiger Faktor, der die STD NMR Intensität reduziert, ist der relativ große Abstand zwischen den nicht austauschenden Protonen der Proteine und der Saccharide, wenn die Bindung hauptsächlich durch Sulfate vermittelt wird. Dieses ist in Abb. 5-14 schematisch dargestellt. In diesem Modell wirken die geladenen Gruppen quasi als Abstandshalter zwischen den Kohlenstoff-gebundenen Protonen von Rezeptor und Ligand. Da der Magnetisierungstransfer kubisch vom Abstand abhängt, wird dementsprechend der beobachtete Sättigungstransfer vermindert.



Abb. 5-14: Schematische Darstellung der ionischen Bindung zwischen einer Sulfatgruppe und einer Ammoniumgruppe. Die räumliche Größe der ionischen Gruppen bedingt einen großen Abstand zwischen den nicht gegen Deuterium ausgetauschten Protonen.

Die Grundannahme dieses Modells wird durch den Vergleich von Röntgenstrukturen, in denen Oligosaccharide an die Oberflächen von Proteine gebundenen sind, unterstützt. In Abb. 5-15 sind die Bindungen eines sulfatierten und eines unsulfatierten Saccharids an Proteine wiedergegeben. Die nichtaustauschenden Protonen, die sich im Abstand von weniger als 4 Å um die Kohlenstoff-gebundenen Protonen der Saccharide befinden, sind als Kugeln dargestellt. Dieses sind die Protonen, über die der Sättigungstransfer erfolgt. Die Röntgenstruktur des Komplexes aus Heparin-Hexasaccharid gebunden an basischen Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF)¹²⁷ (Abb. 5-15a) zeigt nur einige wenige hinreichend nahe Protonen. Dagegen sind bei dem Komplex aus Cholera Toxin Pentamer und GM1-Pentasaccharid¹²⁸ deutlich mehr Protonen in geringem Abstand vorhanden (Abb. 5-15b). Bei der Auswertung von STD-Spektren muß entsprechend berücksichtigt werden, daß die Stärke des STD-Effektes nicht nur eine Funktion von Bindungskonstante und Austauschrate ist, sondern auch davon abhängt, wie eng der mögliche Protonenkontakt aufgrund der geometrischen Anordnung der Bindung ist.

Im Vergleich zu anderen Verfahren zur Untersuchung von sulfatierten Oligosacchariden schneidet die STD-Spektroskopie trotz des relativ großen Substanzbedarfs recht gut ab. Insbesondere kann praktisch verlustfrei gemessen werden. Bedenkt man zusätzlich den großen Aufwand, der für andere Verfahren wie z.B. affinitätsbasierte Trennung notwendig ist, so ist die experimentelle Arbeit für die STD-Spektroskopie eher gering, vor allem, wenn wie im Fall der Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide Vergleichsspektren der reinen Substanzen zu Verfügung stehen. Die STD-Spektroskopie sollte dabei von moderneren NMR-Spektrometern mit höherer Frequenz deutlich profitieren. Der Auflösungsgewinn kann sogar zweifach sein, da die verbesserte Empfindlichkeit kürzere Meßzeiten und damit für die Differenzbildung eine bessere Auflösung ermöglicht.



Abb. 5-15: Röntgenstrukturen von Oligosaccharid-bindenden Proteinen mit ihren Liganden. a.) Basischer Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) komplexiert mit Heparin-Hexasaccharid (1BFC).¹²⁷ b.) Cholera Toxin Pentamer komplexiert mit GM1-Pentasaccharid (2CHB).¹²⁸ Zur besseren Unterscheidung sind die Bindungen des Saccharids als Röhren, die des Proteins als Linien wiedergegeben. Die nichtaustauschenden Proteinprotonen, die innerhalb eines Radius von 4 Å um die Kohlenstoff-gebundenen Protonen des Zuckers liegen, sind als Kugeln dargestellt.

6 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit sind die Darstellung, Reinigung und Untersuchung der Struktur sowie die Bindungseigenschaften ausgewählter Glycosaminoglycan-Oligosaccharide. Zunächst wurde Chondroitinsulfat mit Hyaluronidase enzymatisch gespalten. Die erhaltenen Oligomere wurden durch Gelpermeations-Chromatographie größenhomogen fraktioniert. Zur weiteren Trennung der unterschiedlich sulfatierten Tetrasaccharide wurde eine Anionenaustausch-chromatographische Methode entwickelt, mit der drei Positionsisomere der Sulfatgruppe isoliert werden konnten. Diese wurden dann durch Elektrospray-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie charakterisiert:

 $\beta\text{-}D\text{-}GlcA\text{-}(1\text{-}3)\text{-}\beta\text{-}D\text{-}(4\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc\text{-}\beta\text{-}D\text{-}GlcA\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(4\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc$

 $\beta\text{-}D\text{-}GlcA\text{-}(1\text{-}3)\text{-}\beta\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc\text{-}\beta\text{-}D\text{-}GlcA\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(4\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc$

 β -D-GlcA-(1-3)- β -D-(4-O-SO₃)-GalNAc- β -D-GlcA-(1-3)-D-(6-O-SO₃)-GalNAc

Die Reduktion der Oligomerenmischung mit Natriumborhydrid führt zu den entsprechenden Alditolen. Die Trennung dieser Probe war erwartungsgemäß einfacher, da keine Anomerenmischungen vorlagen. Aus dieser Probe konnten alle vier Positionsisomere mit einer Sulfatgruppe pro Galactosamineinheit isoliert werden; sie wurden ebenfalls spektroskopisch charakterisiert:

 β -D-GlcA-(1-3)- β -D-(4-O-SO₃)-GalNAc- β -D-GlcA-(1-3)-D-(4-O-SO₃)-GalNAc-ol

 $\beta\text{-}D\text{-}GlcA\text{-}(1\text{-}3)\text{-}\beta\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc\text{-}\beta\text{-}D\text{-}GlcA\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(4\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc\text{-}ol$

 β -D-GlcA-(1-3)- β -D-(4-O-SO₃)-GalNAc- β -D-GlcA-(1-3)-D-(6-O-SO₃)-GalNAc-ol

 β -D-GlcA-(1-3)- β -D-(6-O-SO₃)-GalNAc- β -D-GlcA-(1-3)-D-(6-O-SO₃)-GalNAc-ol

Mit Hilfe des Programms GEGOP wurden *Metropolis-Monte-Carlo*-Simulationen durchgeführt. Dabei stand vor allem die Frage nach dem Einfluß der Position der Sulfatgruppe und dem der Dielektrizitätskonstante auf die Konformation im Vordergrund. Parallel dazu wurden die NOE-Spektren der 4,4^{III-} sowie der 6,6^{III-}disulfatierten, reduzierten Tetrasaccharide ausgewertet. Aufgrund der Signalüberlagerungen der Tetrasaccharide war die Auswertung nur eingeschränkt möglich. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Ergebnisse einer GEGOP-Simulation im Falle der glycosidischen Bindungen UA-GN(4S), UA-GN(6S) und GN(6S)-UA bei einer Dielektrizitätskonstante $\varepsilon = 20$ in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen stehen.

Anschließend neuartige NMR-Verfahren wurden zwei zum Screening von Substanzbibliotheken auf die Tetrasaccharidmischung angewandt. Diese basieren auf dem transferred Nuclear Overhauser Effect (trNOE) und der saturation transfer difference NMR-Spektroskopie (STD NMR). Beide Verfahren wurden bislang vor allem für kleinere, geringoder ungeladene Moleküle eingesetzt. Für diese Versuche wurden die Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide als Substrat und Hyaluronidase als Rezeptor verwendet. Der Einsatz der transferred Nuclear Overhauser Effect Spektroskopie zum Screening von Mischungen zeigte dabei deutliche Limitierungen, da die Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide aufgrund ihrer großen Masse nur bei erhöhter Temperatur durchgehend positive NOEs aufweisen. Die saturation transfer difference NMR-Spektroskopie gibt deutlich bessere Ergebnisse. Es konnte nachgewiesen werden, daß Chondroitin-4-sulfat-Tetrasaccharide stärker an Hyaluronidase binden, was mit der höheren Hydrolyserate für dieses Isomer übereinstimmt.

Der Versuch, quasi Ligand und Rezeptor zu vertauschen und durch NMR-Spektroskopie eine Bindung von kationischen Tripeptiden an polymeres Heparin nachzuweisen, war nicht erfolgreich. Hauptursache war vermutlich eine zu schwache Bindungskonstante.

In Kooperation mit der Arbeitsguppe von U. Lindahl (Uppsala) wurde abschließend das System aus Heparinoligomeren und Interleukin-8 untersucht, von dem bekannt ist, daß es eine sehr geringe Bindungsaffinität besitzt. Der Einsatz der *transferred Nuclear Overhauser Effect* Spektroskopie war auch hier auf die Heparin-Tetrasaccharide beschränkt, die bei 310 K positive NOEs aufweisen. Nach Zugabe von Interleukin-8 traten einige negative NOEs auf. Die Signale zeigen eine besonders gute Bindung der Heparin-Tetrasaccharide, deren Uronsäure an 2-Position sulfatiert ist. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den experimentellen biologischen Daten, nach denen diese Sulfatierung für die Bindung notwendig ist.

Beim Einsatz der *saturation transfer difference* NMR-Spektroskopie waren bei den Tetrameren nur geringe Effekte zu beobachten, dagegen konnten für die Hexamere deutliche STD NMR Signale erhalten werden. Wiederum zeigten die Tetrasaccharide mit an 2-sulfatierten Uronsäuren intensive Signale, was mit den experimentellen Daten übereinstimmt.

7 Summary

The subject of this work is the preparation, purification and analysis of the structure and binding properties of selected oligosaccharides derived from glycosaminoglycans. First, chondroitinsulfate was digested enzymatically using hyaluronidase. The resulting oligomers were separated into size-homogeneous fractions by gel permeation chromatography. For the separation of the different isomers, an anion exchange method was developed. Using this method, three isomers of the sulfate group were isolated. These were identified by means of electrospray mass spectrometry and NMR spectroscopy:

β-D-GlcA-(1-3)-β-D-(4-O-SO₃)-GalNAc-β-D-GlcA-(1-3)-D-(4-O-SO₃)-GalNAc β-D-GlcA-(1-3)-β-D-(6-O-SO₃)-GalNAc-β-D-GlcA-(1-3)-D-(4-O-SO₃)-GalNAc β-D-GlcA-(1-3)-β-D-(4-O-SO₃)-GalNAc-β-D-GlcA-(1-3)-D-(6-O-SO₃)-GalNAc

Reduction of the oligomeres with sodium borohydride leads to the corresponding alditoles. As expected, the separation of this sample was simpler since no anomeric mixtures were present. All four isomers of Chondroitinsulfate tetrasaccharide with a single sulfate group per galactosamine unit could be isolated and spectroscopically characterized:

$$\begin{split} \beta \text{-D-GlcA-}(1-3) &-\beta \text{-D-}(4-\text{O-SO}_3) \text{-GalNAc-}\beta \text{-D-GlcA-}(1-3) \text{-D-}(4-\text{O-SO}_3) \text{-GalNAc-ol} \\ \beta \text{-D-GlcA-}(1-3) &-\beta \text{-D-}(6-\text{O-SO}_3) \text{-GalNAc-}\beta \text{-D-GlcA-}(1-3) \text{-D-}(4-\text{O-SO}_3) \text{-GalNAc-ol} \\ \beta \text{-D-GlcA-}(1-3) &-\beta \text{-D-}(4-\text{O-SO}_3) \text{-GalNAc-}\beta \text{-D-GlcA-}(1-3) \text{-D-}(6-\text{O-SO}_3) \text{-GalNAc-ol} \\ \beta \text{-D-GlcA-}(1-3) -\beta \text{-D-}(6-\text{O-SO}_3) \text{-GalNAc-}\beta \text{-D-GlcA-}(1-3) \text{-D-}(6-\text{O-SO}_3) \text{-GalNAc-ol} \\ \end{split}$$

Metropolis-Monte-Carlo simulations using the program GEGOP were executed. Primary focus was to study the influence of the position of the sulfate groups and dielectric constant upon the conformation.

In parallel, the NOE spectra of the reduced 4,4"'- and 6,6"'-disulfated tetrasaccharides were recorded and analyzed. Due to signal overlaps in the NMR spectra, this analysis could not be performed for all signals. It could be shown however, that the results of the GEGOP simulations with a dielectric constant $\varepsilon = 20$ are in good agreement with the experimental results for the glycosidic linkages UA-GN(4S), UA-GN(6S) and GN(6S)-UA.

Subsequently, two new NMR procedures for the screening of compound libraries were applied to the mixture of chondroitinsulfate tetrasaccharides. The first of these new procedures is based on the transferred nuclear Overhauser effect (trNOE) and the other is based on saturation transfer difference NMR spectroscopy (STD NMR). Currently, these methods were only used for small, mostly uncharged molecules. Chondroitinsulfate tetrasaccharides were used as substrate and hyaluronidase as the receptor. The application of transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy showed limitations since the chondroitinsulfate tetrasaccharides exhibit positive NOEs only at increased temperature due to their large mass and charge. The saturation transfer difference NMR spectroscopy yields clearly better results, showing stronger binding for the 4-sulfated tetrasaccharides. This is in accordance with the higher hydrolysis rates of these compounds.

In an attempt to reverse the role of receptor and ligand the interaction of heparin polymers with small cationic tripeptides was investigated. No proof could be found by NMR for the binding of cationic tripeptides to heparin using either NMR technique. This is attributed to the weak binding constant.

In cooperation with the group of U. Lindahl (Uppsala) the system of heparin oligomers and interleukin-8 was examined. This system is known to have a weak binding constant. The application of transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy was limited to the tetramers exhibiting positive NOEs at 310 K. After addition of interleukin-8 some negative NOEs were observed. The signals indicate good binding for those heparin tetrasaccharides with 2-sulfated uronic acids. This is in accordance with the biological finding that this sulfatation is required for binding.

When using saturation transfer difference NMR spectroscopy for the tetramers only weak signals could be observed. The hexamer, however, showed significant STD NMR signals in the spectrum. Again, the 2-sulfated uronic acid showed particularly intense signals, which is in accordance with experimental data.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeines

Verwendete Chemikalien

Hyaluronidase (Typ V, aus Schafhoden, min. 1100 Units/mg), Chondroitinase ABC (aus Proteus vulgaris, 0.3-3 Units/mg) Chondroitinsulfat A (aus Ochsenlunge, ca. 70 % Chondroitin-4-sulfat) und Chondroitinsulfat C (aus Haiknorpel, ca. 90 % Chondroitin-6-sulfat) wurden von Sigma bezogen.

Als Puffersalze wurden Natriumchlorid, Natriumacetat, konz. Essigsäure, Natriumsulfat, Natriumhydrogen- und Natriumdihydrogenphosphat "BioChemika MicroSelect" der Firma Fluka verwendet, die auch das Acetonitril und Methanol (jeweils gradient grade) lieferte.

Die Bereitung der Puffer erfolgte mit frisch hergestelltem Reinstwasser aus einer Seralanlage, Leitfähigkeit 18.2 μ S.

Die für die Peptidsynthese benötigten Chemikalien stammen von PerSeptive Biosystems.

Die NMR-Proben wurden in D₂O 99.98 % von Aldrich gelöst.

Verwendete Geräte

Die NMR-Daten wurden an einem DRX 500 Spektrometer (11.67 Tesla, entsprechend einer Larmor-Frequenz von 499.87 MHz für Protonen) der Firma Bruker gemessen.

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte mit einem MS 5989B der Firma Hewlett-Packard, das mit einem ESI Interface 59987A ausgestattet war.

Alle Peptidsynthesen wurden auf einem automatischen Peptidsynthesizer (Pioneer Peptide Synthesis System) der Firma Perseptive durchgeführt.

Die Reinigung der Peptide erfolgte mit einer HPLC BioCAD-Sprint der Firma Perseptive.

Zur Präparation der Chondroitinsulfat-Oligomere stand eine BioSys2000 (Beckman) zur Verfügung.

Name	Material	Größe	Volumen	Trennbereich
		[mm x mm]	[mL]	(nominell)
HW40S	Methacrylat Copolymer	250 x 25	122.7	100-10000
(Merck)	mit Ethylglycol			
HW50S	Methacrylat Copolymer	300 x 21	103.9	500-80000
(Merck)	mit Ethylglycol			
P2	Polyacrylamid	130 x 20	40.8	100-1800
(Biorad)				
G10	Dextran vernetzt mit	130 x 20	40.8	< 700
(Pharmacia)	Epichlorhydrin			
G2000SW	Silica	300 x 7.5	13.3	1000-30.000
(TSK)				

Säulen für die Ausschlußchromatographie.

Säulen für die Anionenaustausch-Chromatographie.

Name	Größe	Volumen
	[mm x mm]	[mL]
Beckman	100 x 4.6	1.7
QHyperD		
PerSeptive	100 x 4.6	1.7
Poros PI		
PerSeptive	100 x 4.6	1.7
Poros HQ		
Macherey & Nagel	250 x 4	3.1
Nucleosil SB 5		
Macherey & Nagel	250 x 10	19.6
Nucleosil SB 5		
Merck	250 x 4.6	4.2
Carbopack-NH2		
Hersteller	Größe	Partikelgröße
-----------------	-----------	---------------
Material	[mm x mm]	[µm]
Macherey-Nagel	250 x 4	5
Nucleosil 100-5		
C18		
Macherey-Nagel	250 x 21	5
Nucleosil 100-5		
C18		

Säulen für die reversed phase Chromatographie.

Verwendete Software

Die Prozessierung, Phasenkorrektur, Kalibrierung, Basislinienkorrektur der NMR-Spektren erfolgte mit dem Programm XWINNMR (Version 2.5), die weitere Auswertung mit AURELIA (Version 2.1), beide von Bruker, auf Silicon Graphics Workstations.

Die MMC Simulationen wurden mit dem Programm GEGOP¹¹¹ (Version 2.7) durchgeführt, ein Teil dieser Daten wurde mit *pv-wave* ausgewertet.

Die Dynamics-Simulationen, Clusteranalysen sowie die dreidimensionale grafische Darstellung der Moleküle erfolgte mit dem Programmpaket Sybyl.¹¹⁵

NMR-Spektroskopie

Die Spektren wurden mit einem 5 mm TXI Kopf vermessen, dabei betrug die Spektrenweite 5000 und 6510 Hz, bzw. 25141 Hz bei den 13 C-Spektren. Die 1D-Spektren wurden mit 32 k Datenpunkten, die 2D-Spektren mit 4 k in F2 und mit 128 - 256 Inkrementen in F1 aufgenommen. Die zweidimensionalen Spektren wurden TPPI phasensensitiv aufgenommen. Die verwendeten Pulsprogramme sind unten zusammengefaßt.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Proben in 700 μ l 90/10 H₂O / D₂O bzw. 99.98 % D₂O ggf. unter Zusatz von Phosphatpuffer und ca. 2 % NaN₃ gelöst. Als interner Standard wurde Aceton (2.225 ppm) zugegeben.

Die Unterdrückung des Wassersignals erfolgte bei den in H_2O aufgenommenen Spektren entweder durch Vorsättigung mit 53 dB oder durch eine Watergate-Pulssequenz. Aufgrund des hohen Wassergehaltes der in D₂O gelösten Chondroitinsulfat-Proben wurden diese Spektren ebenfalls mit einer Vorsättigung von 70 dB aufgenommen.

1D- ¹ H	zg
1D- ¹ H mit Vorsättigung	zgpr
Watergate 1D- ¹ H	p3919gp
¹ H- ¹ H TOCSY	mlevprtp
¹ H- ¹ H NOESY	noesyprtp
¹ H- ¹ H E-COSY	ecos3nprtp.vs
¹ H- ¹³ C	inv4gspr
Differenz 1D- ¹ H	zgdiffslsp2.mm
Differenz ¹ H- ¹ H TOCSY	mlevprtpsp2f.os
1D- ¹ H mit Spinlock	zgsl.mm
Selektives 1D- ¹ H	selzg

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Pulsprogramme.

Molecular Modelling

Die Gegop Simulationen wurden bei 300 bzw. 1000 K durchgeführt. Es wurden Simulationen mit 2 000 000 und 3 000 000 Schritten durchgeführt, bei denen die ersten 1 000 000 Schritte als Äquilibrierungsphase verworfen wurden. Alternativ wurden 10 Simulationen à 200 000 Schritte mit randomisierten Startkonformationen verwendet. Die letzten 100 000 Schritte dieser Läufe wurden aneinander gehängt und gemeinsam ausgewertet. Die Simulation wurde als repräsentativ betrachtet, wenn die visuelle Inspektion eine gleichmäßige Verteilung der Winkel über die vereinigten 1000 Schritte zeigte. Dieses Vorgehen erscheint gerechtfertigt, da die Suche nach Niedrigenergiekonformationen im Vordergrund stand und

nicht eine repräsentative Wiedergabe des Konformationsraumes. Letztere hätte bei 300 K eine deutlich höhere Schrittzahl erfordert.

Die Dynamics-Simulationen wurden mit dem Tripos Kraftfeld und Gasteiger-Hückel Ladungen bei 300 K berechnet. Es wurden zwei Läufe für jedes Peptid durchgeführt, wobei als Startkonformationen jeweils α -Helix und β -Faltblattstruktur verwendet wurden. Die Simulation wurde als repräsentativ betrachtet, wenn die visuelle Inspektion ähnliche Verteilung der *backbone*-Winkel in beiden Simulationen zeigte.

8.2 Bereitung der Chondroitinsulfat-Proben

Spaltung von Chondroitinsulfat mit Chondroitinase⁹⁷

200 mg Chondroitinsulfat werden in 10 mL frisch zubereiteter Pufferlösung gelöst, die 5 mM Natriumphosphat pH 7 und 0.2 mM Natriumchlorid enthält. Es werden 0.5 mg Chondroitinase ABC (1.9 Units/mg) zugegeben und 7 h bei 30 °C inkubiert. Der Fortgang des Verdaus wird regelmäßig anhand des Verlaufs der Absorption bei 232 nm überwacht.

Spaltung von Chondroitinsulfat mit Hyaluronidase (Bedingungen für unselektive Spaltung)⁴⁷

Unter starkem Schütteln werden 500 mg Chondroitinsulfat in 9.5 mL frisch zubereiteter Pufferlösung (0.05 M Natriumchlorid, 0.05 M Natriumsulfat in 0.1 M Natriumacetatpuffer, pH5) gelöst. 8 mg in 0.5 mL des Puffers gelöste Hyaluronidase (Sigma Typ V, min. 1100 Units / mg) wird zugegeben und für ca. 20 h bei 37 °C inkubiert. Dabei wird der Fortgang des Verdaus chromatographisch überwacht.

Spaltung von Chondroitinsulfat mit Hyaluronidase

(Bedingungen für selektive Spaltung, vorrangige Spaltung an 4-Sulfatgruppen)⁴⁷

Unter starkem Schütteln werden 500 mg Chondroitinsulfat in 9.5 mL frisch zubereiteter Pufferlösung (0.05 M Natriumacetatpuffer, pH6) gelöst. 8 mg in 0.5 mL des Puffers gelöste Hyaluronidase (Sigma Typ V, min. 1100 Units / mg) wird zugegeben und für ca. 30 h bei 37 °C inkubiert. Nach ungefähr der Hälfte der Verdauzeit werden weitere 8 mg Hyaluronidase zugegeben. Der Fortgang des Verdaus wird chromatographisch überwacht.

Reduktion mit Natriumborhydrid

(nach Shibata et al.⁶⁷ und Karamanos et al.⁷⁰)

Ca. 100 mg Chondroitinsulfat-Oligosaccharide werden in 2 mL Wasser gelöst und durch 1 minütiges Kochen und anschließendes Zentrifugieren von Protein befreit. Anschließend wird die Probe durch vorsichtige Zugabe von verd. Natriumhydroxid-Lösung alkalisch eingestellt. Zu dieser Lösung werden in einem 500 mL Rundkolben vorsichtig 25 mL einer 2 M Natriumborhydrid-Lösung (50 mmol) in 50 mM Natriumhydroxid gegeben. Die Lösung wird 1 h gerührt. Durch Zugabe von 20 %iger Essigsäure wird die Lösung angesäuert, um so überschüssiges Natriumborhydrid zu zerstören. Dabei ist eine mögliche starke Schaumentwicklung zu beachten! Nach Zerstörung des Natriumborhydrids klärt sich die trübe Lösung. Durch Ultrafiltration wird die Salzmenge gesenkt. Anschließend wird die Lösung im Vakuum auf ca. 5 mL eingeengt und durch Gelfiltration gereinigt. Alternativ kann mit Natriumhydrogencarbonat der pH-Wert alkalisch eingestellt werden. So kann das Salz im Vakuum entfernt werden, allerdings nimmt das entstehende Gasvolumen und damit die Schaumbildung stark zu.

Ausschlußchromatographische Reinigung der Chondroitinsulfat-Tetrasaccharide

Zur Isolierung der Tetrasaccharide wird die Produktlösung (entweder die aus der Spaltung oder aus der Reduktion erhaltene Lösung) in ca. 1-2 mL großen Portionen (100-200 mg) auf einer Gelsäule (Biorad P2, 170 x 2.5 cm, Eluent 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat) in die niederen Oligomere fraktioniert. Die Detektion erfolgt wahlweise durch Bestimmung der Absorption bei 215 nm (Verdünnung der Proben ggf. im Verhältnis 1:20) oder durch Refraktionsmessung. Dabei werden die Tetra- sowie evtl. entstandene Disaccharide als Reinfraktionen erhalten. Die erhaltenen Fraktionen werden durch Ultrafiltration entsalzt und durch mehrfache Gefriertrocknung von restlichem Ammoniumhydrogencarbonat befreit.

Ionenaustausch-Chromatographie

Zur Trennung der unterschiedlichen Ladungsisomere werden ca. 20 mg Chondroitinsulfat-Tetrasaccharid an einer Nucleosil SB 5 (250 x 10 mm) Anionenaustauschsäule getrennt. Als Eluent wird ein Puffersystem aus Natriumchlorid/Natriumphosphat pH 6 verwendet. Die Natriumphosphat-Konzentration bleibt konstant bei 100 mM, die Natriumchlorid-Konzentration steigt innerhalb von 30 Minuten von 100 mM am Anfang auf 500 mM Endkonzentration. Die Flußrate beträgt 2 mL/min, die Detektion erfolgt bei 215 nm. Die Entsalzung erfolgt anschließend an G10 Gel.

Alternativ kann mit Ammoniumhydrogencarbonat-Lösungen auf einer Alkali-beständigen Säule eluiert werden. Dazu werden 2 mg Chondroitinsulfat-Tetrasaccharid auf eine QHyperD Säule gegeben und mit einem Gradienten von 0.1 bis 1 M innerhalb von 10 min und einer Flußrate von 2 mL/min eluiert. Aufgrund der Vakuumflüchtigkeit des Ammoniumhydrogencarbonats kann hierbei u.U. auf eine chromatographische Entsalzung verzichtet werden.

Zweidimensionale Chromatographie der Chondroitinsulfat-Proben

Für den Vergleich der unterschiedlichen Spaltungsbedingungen wurde u.a. ein zweidimensionales Verfahren angewandt. Die Auflösung der Anionenaustausch-Chromatographie reichte leider nicht aus, um isolierte Peaks reiner Substanzen zu erhalten. Gleichzeitig war das Detektorrauschen infolge der geringen Substanzmenge sehr hoch, so daß keine quantitative Auswertung möglich war.

Zur Trennung wurde eine Säulenkombination aus semipräparativer HW 40S Gelsäule und analytischer QHyperD Säule eingesetzt. Diese Kombination wurde als vorteilhaft angesehen, da durch den Einsatz der semipräparativen Säule die Verwendung einer relativ hohen Substanzmenge möglich war, ohne daß es zur Überladung der Säule kam. Die QHyperD Säule ist für hohe Durchflußraten konzipiert. Dementsprechend ist der Druckabfall bei der für die präparative Säule eingesetzten Flußrate so gering, daß eine Serienschaltung möglich ist, ohne das Drucklimit des empfindlichen Gelmaterials zu überschreiten.

Die Elution erfolgte mit einer Lösung aus Natriumphosphat (100 mM) und Natriumchlorid (100 mM). Für die Ionenaustausch-Chromatographie wurde die Natriumchlorid-Konzentration in einem linearen Gradienten auf 500 mM erhöht. Die eingesetzte BioSys2000 ermöglicht die Verwendung zweidimensionaler Chromatographie durch zwei elektrische Säulenschaltventile und ein separates Injektionsventil.

Im folgenden ist das dazu eingesetzte Chromatographieprogramm wiedergegeben (Gelsäule Säule \equiv 1; Anionenaustauschsäule \equiv Säule 2):

Beide Säulen mit dem Startpuffer äquilibrieren Säule 1 online, Säule 2 offline Injektion der Probe Eluieren der Gelsäule, bis Tetrasaccharidpeak erscheint^{*} Säulen 1 & 2 online 1 mL Eluieren Säule 1 offline, Säule 2 online Gradient von 100 mM NaCl → 500 mM NaCl starten Salzkonzentration wieder auf Ausgangskonzentration zurück Säule 1 online, Säule 2 offline Disaccharid und Salz von Gelsäule eluieren * entweder über das vorher ermittelte Elutionsvolumen oder durch manuelles Umschalten.

8.3 Charakterisierung der Chondroitinsulfat-Proben Chondroitin-4-sulfat-Disaccharid (4S) β-D-GlcA'-(1-3)-D-(4-O-SO₃)-GalNAc



¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 280 K): $\delta = 2.033$ (CH₃); 3.355 (H-2' β); 3.356 (H-2' α); 3.461 (H-3'); 3.529 (H-4'); 3.665 (H-5'); 3.724 (H-6 α); 3.8* (H-6 β); 3.8* (H-6' β); 3.808 (H-6' α); 3.84* (H-5 β); 4.048 (H-2 β); 4.053 (H-3 β); 4.221 (H-3 α); 4.283 (H-5 α); 4.347 (H-2 α); 4.472 (H-

1'β); 4.516 (H-1'α); 4.708 (H-1β); 4.789 (H-4β); 4.855 (H-4α); 5.204 (H-1α); 8.089* (NHα); 8.217* (NHβ).

^{*} Zuordnungen austauschbar.

MW = 521.4 g/mol (Natriumsalz)

ESI: positiv ion mode: $m/z = 523 [M+H^+]$

negativ ion mode: $m/z = 498 [M-Na^-]$

Chondroitin-4,4-disulfat-Tetrasaccharid (4S4S)

 β -D-GlcA''-(1-3)-D-(4-O-SO₃)-GalNAc''- β -D-GlcA'-(1-3)-D-(4-O-SO₃)-GalNAc



¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 280 K): $\delta = 2.043$ (NAc"); 3.331 (H-2"); 3.378 (H-2'α); 3.383 (H-2'β); 3.464 (H-3""); 3.514 (H-4""); 3.583 (H-3'); 3.66 (H-5""); 3.662 (H-5'); 3.778 (H-4'); 3.824 (H-5"); 4.01 (H-3β); 4.028 (H-3"); 4.039 (H-2β); 4.063 (H-2"); 4.174 (H-3α); 4.331 (H-2α); 4.465 (H-1""); 4.472 (H-1'β); 4.514 (H-1'α); 4.554 (H-1"); 4.716 (H-1β); 4.746 (H-4β); 4.801 (H-4"); 4.812 (H-4α); 5.203 (H-1α).

MW = 1024.8 g/mol (Dinatriumsalz)

ESI (negativ ion mode): $m/z = 490.2 [M-2Na]^{2+}$

¹⁰⁷

^{*} in H₂O bestimmt.

Chondroitin-4,6-disulfat-Tetrasaccharid (4S6S)

 $\beta\text{-}D\text{-}GlcA^{\prime\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(4\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}\beta\text{-}D\text{-}GlcA^{\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime}$



¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 280 K): $\delta = 2.043$ (NAc"); 3.329 (H-2"); 3.362 (H-2'α); 3.365 (H-2'β); 3.465 (H-3""); 3.504 (H-4""); 3.590 (H-3'); 3.657 (H-5""); 3.742 (H-4'); 3.822 (H-3β); 4.011 (H-2β); 4.029 (H-3α); 4.031 (H-3"); 4.045 (H-2"); 4.175 (H-4β); 4.244 (H-4α); 4.283 (H-2α); 4.459 (H-1"); 4.499 (H-1'β); 4.534 (H-1"); 4.555 (H-1'α); 4.678 (H-1β); 4.794 (H-4"); 4S6S; 5.205 (H-1α).

MW = 1024.8 g/mol (Dinatriumsalz)

Chondroitin-6,4-disulfat-Tetrasaccharid (6S4S) β-D-GlcA''-(1-3)-D-(6-O-SO₃)-GalNAc''-β-D-GlcA'-(1-3)-D-(4-O-SO₃)-GalNAc



¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 280 K): $\delta = 2.021^*$ (NAc''); 2.023* (NAc); 3.303 (H-3'''); 3.306 (H-4'''); 3.312 (H-2'''); 3.394 (H-2'\beta); 3.401 (H-2'\alpha); 3.595 (H-3'); 3.665 (H-5'''); 3.748 (H-4');

3.834 (H-3"); 4.008 (H-3β); 4.028 (H-2β); 4.031 (H-2"); 4.180 (H-3α); 4.244 (H-4"); 4.331 (H-2α); 4.454 (H-1"); 4.479 (H-1'β); 4.500 (H-1"'); 4.524 (H-1'α); 4.709 (H-1β); 4.743 (H-4β); 4.812 (H-4α); 5.203 (H-1α).

^{*} Zuordnungen austauschbar.

MW = 1024.8 g/mol (Dinatriumsalz)

Reduziertes Chondroitin-4,4-disulfat-Tetrasaccharid (4S4SR)

 $\beta\text{-}D\text{-}GlcA^{\prime\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(4\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}\beta\text{-}D\text{-}GlcA^{\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(4\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc\text{-}ol$



¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 280 K): $\delta = 2.001$ (NAc); 2.044 (NAc"); 3.333 (H-2""); 3.464 (H-2'); 3.466 (H-3""); 3.517* (H-4""); 3.65* (H-5""); 3.661 (H-1); 3.697 (H-1'); 3.759 (H-4'); 3.831 (H-5"); 4.039 (H-3"); 4.061 (H-2"); 4.161 (H-5); 4.256 (H-3); 4.266 (H-2); 4.466 (H-1""); 4.488 (H-4); 4.567 (H-1"); 4.624 (H-1'); 4.799 (H-4").

^{*}Zuordnungen austauschbar.

MW = 1024.8 g/mol (Dinatriumsalz)

ESI (negativ ion mode): $m/z = 490.2 [M-2Na^{-}]^{2+}$

Reduziertes Chondroitin-6,6-disulfat-Tetrasaccharid (6S6SR)

 $\beta\text{-}D\text{-}GlcA^{\prime\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}\beta\text{-}D\text{-}GlcA^{\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc\text{-}ol$



¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 280 K): $\delta = 2.017$ (NAc"); 2.044 (NAc); 3.317 (H-2"); 3.445 (H-2'); 3.471 (H-3"); 3.55 (H-4); 3.652 (H-3'); 3.696 (H-4""); 3.696 (H-5""); 3.743 (H-4'); 3.777 (H-1); 3.843 (H-3"); 3.991 (H-5"); 4.03 (H-2"); 4.049 (H-6'); 4.082 (H-3); 4.088 (H-6); 4.234 (H-6"); 4.234 (H-6"); 4.234 (H-6"); 4.246 (H-4"); 4.321 (H-5); 4.401 (H-2); 4.499 (H-1""); 4.561 (H-1'); 4.581 (H-1").

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 280 K): $\delta = \sim 67$ (C-4"); ~ 67 (C-6"); 102.2 (C-1"); 103 (C-1'); 104.6 (C-1""); 51.9 (C-2); 61 (C-1); 67.7 (C-5); 68.8 (C-4); 69.5 (C-6); 73.1 (C-2"); 73.1 (C-2"); 73.1 (C-2"); 73.1 (C-3"); 75.7 (C-3); 76.1 (C-3""); 80.5 (C-3").

MW = 1024.8 g/mol (Dinatriumsalz)

ESI (negativ ion mode): $m/z = 490.4 [M-2Na^{-}]^{2+}$

Reduziertes Chondroitin-4,6-disulfat-Tetrasaccharid (4S6SR)

 $\beta\text{-}D\text{-}GlcA^{\prime\prime\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(4\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc^{\prime\prime}\text{-}\beta\text{-}D\text{-}GlcA^{\prime}\text{-}(1\text{-}3)\text{-}D\text{-}(6\text{-}O\text{-}SO_3)\text{-}GalNAc\text{-}ol$



¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 280 K): $\delta = 2.040^{*}$ (NAc"); 2.044* (NAc); 3.333 (H-2""); 3.431 (H-2'); 3.483 (H-3""); 3.517* (H-4""); 3.543 (H-4); 3.63 (H-5'); 3.663* (H-5""); 3.705 (H-1); 3.771 (H-1'); 3.808 (H-6"); 3.835 (H-5"); 4.039 (H-3"); 4.048 (H-2"); 4.052 (H-6'); 4.079 (H-3); 4.091 (H-6); 4.326 (H-5); 4.399 (H-2); 4.469 (H-1""); 4.552 (H-1'); 4.594 (H-1"); 4.802 (H-4").

^{*} Zuordnungen austauschbar.

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O, 280 K): δ = 100.9 (C-1"); 102.6 (C-1'); 103.6 (C-1"); 51.3 (C-2); 60.5 (C-1); 66.7 (C-5); 68.3 (C-4); 68.9 (C-6); 72.1 (C-4"); 72.6 (C-2"); 72.8 (C-2'); 73.7 (C-5'); 74.5 (C-5"); 75.1 (C-3""); 75.3 (C-2"); 75.4 (C-3); 76.4 (C-5""); 76.6 (C-4").

MW = 1024.8 g/mol (Dinatriumsalz)

Reduziertes Chondroitin-6,4-disulfat-Tetrasaccharid (6S4SR)

 $\beta \text{-} D\text{-} GlcA'' \text{-} (1\text{-} 3) \text{-} D\text{-} (6\text{-} O\text{-} SO_3) \text{-} GalNAc'' \text{-} \beta \text{-} D\text{-} GlcA' \text{-} (1\text{-} 3) \text{-} D\text{-} (4\text{-} O\text{-} SO_3) \text{-} GalNAc\text{-} ol$



¹H-NMR (500 MHz, D₂O, 280 K): $\delta = 2.001$ (NAc); 2.022 (NAc"); 3.317 (H-2"); 3.472 (H-3'); 3.486 (H-2'); 3.654 (H-1); 3.702 (H-6); 3.703 (H-1'); 3.843 (H-3"); 3.984 (H-5"); 4.031 (H-2"); 4.162 (H-5); 4.237 (H-6"); 4.246 (H-4"); 4.262 (H-3); 4.277 (H-2); 4.486 (H-4); 4.499 (H-1"); 4.555 (H-1"); 4.631 (H-1').

MW = 1024.8 g/mol (Dinatriumsalz)

8.4 Peptidsynthesen

Die Peptidsynthesen erfolgten jeweils in einem 50 μ mol Ansatz an 278 mg Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz (0.18 mmol/g). Bei dem Harz handelt es sich um ein Copolymer aus Polyethylenglycol und Polystyrol, der Linker ist 5-(4-Aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)valeriansäure). Nach jeder Kupplung werden die Aminofunktionen, die nicht reagiert haben, mit Acetanhydrid in DMF (1:10, 5 min) blockiert, das FMOC wird jeweils mit Piperidin/DMF (1:4) innerhalb von 10 min abgespalten. Die Abspaltung vom Harz erfolgt mit einer Mischung aus TFA/TIPS/H₂O (93:5:2, 90 min stehen lassen).

Die Peptide wurden durch Chromatographie auf einer RP18-Säule gereinigt. Die Identifikation erfolgte durch ESI-Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie, die gemessenen Massen sind ebenfalls aufgeführt.

	ARWR	RPKT	RAR	KWK
Ansatzgröße [mmol]	0.05	0.05	0.05	0.05
Theoretische Ausbeute [mg]	29	25	26	
Überschuß Aminosäure	4	4	4	4
Theoretische Masse	586.695	499.62	516.62	459.6
Beladungsdichte Harz [meq/g]	0.15	0.15	0.15	0.15
Eingesetzte Massen [mg]:				
Fmoc-L-Ala-OH	62		62	
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	2 x 130	130	2 x 130	
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	105			
Fmoc-L-Lys-OH		94		34
Fmoc-L-Pro-OH		67		
Fmoc-L-Thr(tBu)-OH		79		40
Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz	333	333	333	333

Tab. 8-1: Übersicht über die synthetisierten Peptide und die erhaltenen Ausbeuten.

8.5 Spektroskopische Daten der Peptide

Alle NMR-Spektren wurden in H₂O/D₂O 9:1 aufgenommen, um eine Beobachtung der NH-Resonanzen zu ermöglichen. Die Zuordnung der ¹H-NMR-chemischen Verschiebungen der Peptide erfolgte durch Kombination von TOCSY, E.COSY und NOESY. Durch die Auswertung der Nachbarschafts-NOEs konnte für alle Peptide eine eindeutige Sequenzzuordnung erfolgen.

Ala-Arg-Trp-Arg-NH₂

$C_{26}H_{42}N_{12}O_4$ MW = 586.70 g/mol

Das Spektrum wurde bei 280 K aufgenommen und ist auf Aceton (2.225 ppm) kalibriert.

	NH	α	β	β^{ι}	γ	δ	NH
Ala 1	8.018	4.127	1.363				
Arg 2	8.255	4.145	1.62	1.46	1.45	3.09	7.10
Trp 3	8.062	4.637	3.287	10.173	; 7.271;	7.598	
Arg4	7.765	4.139	1.68	1.53	1.329	3.07	6.65
CONH	6.998						
CONH'	7.495						

Arg-Pro-Lys-Thr-NH₂

$$C_{21}H_{41}N_9O_5$$
 MW = 499.62 g/mol

ESI (positiv ion mode): $m/z = 501 [M + H]^+$, $251 [M + 2H]^{2+}$

Das Spektrum wurde bei 300 K aufgenommen und ist auf Aceton (2.225 ppm) kalibriert.

	NH	α	β	eta^{\cdot}	γ	δ	Е	NH
Thr 1	7.543	4.053	3.82	-	1.22	-	-	-
Lys 2	8.729	4.606	1.74	1.65	1.44	1.65	2.95	6.588
Pro 3		4.374	3.81	3.596				
Arg4	8.405	4.171	1.762	1.628	3.165			7.131
CONH	7.543							
CONH'	7.054							

$Arg-Ala-Arg-NH_2$

$$C_{23}H_{37}N_{11}O_3$$
 MW = 516.62 g/mol

Das Spektrum wurde bei 300 K aufgenommen und ist auf Aceton (2.225 ppm) kalibriert.

	NH	α	β	β'	γ	δ	NH
Arg1	8.432	4.182	1.759	1.745	1.613	3.15	6.61
Ala2	8.713	4.311	1.358				
Arg3	7.133	4.18	1.874	1.866	1.76	3.16	
					1.62		
CONH	7.552						
CONH'	7.071						

Lys-Trp-Lys-NH₂

$$C_{23}H_{37}N_7O_3$$
 MW = 459.6 g/mol

ESI (positiv ion mode): $m/z = 461 [M + H]^+$, 231 $[M + 2H]^{2+}$

Das Spektrum wurde bei 280 K aufgenommen und ist auf Aceton (2.225 ppm) kalibriert.

	NH	α	β	β'	γ	δ	Е	NH
Lys 1	8.412	4.009	1.88		1.42	1.69	2.98	7.41
Trp 2		4.697	3.29	10.17;	; 7.68;	7.28	; 7.27;	10.174
				7.185				
Lys 3	8.103	4.081	1.88	1.69	1.22	1.58	2.912	7.41
CONH	6.800							
CONH'	6.636							

Name	Beschreibung	Menge	angenommene
		[µg]	Anzahl
			Komponenten
ΗI	Vollständig sulfatierte Tetrasaccharide	120	n.d.
ΗII	Vollständig sulfatierte Hexasaccharide	1000	1
H III	Partiell desulfatierte Tetrasaccharide	800	4
H IV	Partiell desulfatierte Hexasaccharide	1000	n.d.
ΗV	Partiell desulfatierte Tetrasaccharide (2 Sulfatgruppen)	1200	2
H VI	Partiell desulfatierte Tetrasaccharide (3 Sulfatgruppen)	1200	2
H VIIa	Vollständig sulfatierte Hexasaccharide	2300	1
H VIIb	Vollständig sulfatierte Hexasaccharide	1000	1
H VIIc	Vollständig sulfatierte Hexasaccharide	2300	1

8.6 Wechselwirkungen von Heparin mit Interleukin-8

Die Abschätzung des Überschusses sei am Beispiel der Probe H III erläutert: Es wurden 0.8 mg H III eingewogen. Das ungefähre Molekulargewicht von di- und trisulfatierten Hexasacchariden beträgt gut 1000 g/mol. Unter der Annahme, daß ca. ein Viertel der Komponenten bindet, folgt daraus eine ungefähre Ligandenmenge von knapp 0.2 µmol. Falls - entgegen dieser Annahme - die Menge der tatsächlichen Liganden deutlich geringer sein sollte, kann sie vernachlässigt werden, da in diesem Bereich die Empfindlichkeitsgrenze dieses NMR-Experimentes liegt.⁹¹ Bezogen auf diesen Wert wurde Interleukin-8 im Verhältnis 1:60, 1:30 und 1:20 zugegeben und die Probe vermessen.

Um Artefakte durch mangelnde Durchmischung oder ungenügende Temperaturkonstanz als Ursache auszuschließen, wurden Blindversuche mit vorsätzlich schlecht präparierten Proben durchgeführt. Dazu wurde eine Probe des Heparinhexasaccharids (H7-1) gefriergetrocknet und in 300 μ L D₂O sorgfältig gelöst. Diese Lösung wurde zusammen mit weiteren 300 μ L D₂O in ein NMR-Röhrchen gegeben, lediglich einmal umgeschwenkt und ein *saturation transfer difference* NMR-Spektrum aufgenommen. Anschließend wurde das Röhrchen eine Stunde am Schüttler gemischt und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde das gleiche NMR-Experiment wiederholt. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen der Blindanregung der Proben, so daß dieser Teil der Probenpräparation als Ursache ausgeschlossen werden kann. Diese Probe wurde ebenfalls nach 5, 60 und 120 Minuten Temperaturequilibration vermessen. Auch hierbei zeigte sich kein Unterschied in der Blindanregung der Probe.

Um mangelnde Pulsselektivität als Ursache der Blindanregung auszuschließen, wurde von dieser Probe ein *saturation transfer difference* NMR-Spektrum sowie ein selektiv angeregtes Spektrum aufgenommen. Die Einstrahlfrequenz betrug in beiden Fällen 381 Hz, die Zahl der Scans 256. Dabei wurde im STD-Spektrum eine Blindanregung beobachtet, nicht aber im selektiv angeregten.

9 Handhabung der Chemikalien

Acetonitril: F (leichtentzündlich), T (giftig), R 11-23/24/25, S 16-27-45.

Diisopropylethylamin (DIEA): F (leichtentzündlich), Xn(Gesundheitsschädlich), R 11-34-20/21/22, S 16-26-36/37/39-23.

Eisesssig: C (ätzend), R 10-35, S 23-26-45.

Essigsäureanhydrid: C (ätzend), R 10-34, S 26-45.

Ethanol: F (leichtentzündlich), R 11, S 7-16.

Methanol: F (leichtentzündlich), T (giftig), R11-23/25, S7-16-24-25.

Natriumhydrid: F (leichtentzündlich), C (ätzend), R 15-34, S 7/8-26-36/37/39-43.6-45.

Natriumhydroxid: C (ätzend), R 35, S 26-37/39.

O-(Azobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU): Xi (reizend), R 36/37/38, S 26-36.

Phenol: T (giftig), R 24/25-34, S 28.6-45.

Schwefelsäure: C (ätzend), R 35, S 26-30-45.

Tetrabutylammoniumhydrogensulfat: Xi (reizend), R 22-36/37/38, S26-36.

Trifluoressigsäure (TFA): C (ätzend), R 20-35, S 9-26-27-28.1-45.

Triisopropylsilan (TIPS): Xi (reizend), R10-36/37/38, S26-36.

10 ANHANG

10.1 Vorgehen zur Erzeugung randomisierter Startkonformationen

Der einfachste Weg zur Erzeugung vieler randomisierter Startkonformationen besteht darin, automatisch GEGOP-Konfigurationsfiles (.gpin) zu generieren, die zufällig generierte Winkel enthalten. Für die Sequenz β -D-GlcA"-(1-3)-D-(4-O-SO₃)-GalNAc'- β -D-GlcA kann dieses mit dem awk script rndgpin4.awk und der vorbereiteten allg4.gpin Datei erfolgen. Der Aufruf erfolgt mit: awk -f rndgpin4.awk allg4.gpin > cs4_1.gpin

Datei allg4.gpin

Datei zum zufälligen Setzen der Startwinkel GUA-GN4S-GUA ELST-FORC-SHPR-ECUT-MONC-MONI-EOFF 004 000 /ANZAHL MONOMERER H1 1-C1 1-01 1-03 2-C3 2-Н3 2-05 1-@@w1 117.0 * H1 2-C1 2-01 2-04 3-C4 3-H4 3-05 2-@@w1 117.0 * 01 4-S1 4-02 4-04 2-C4 2-H4 2-@@w1 117.0 * @@w2 @@w3 @@w4 015SULFAT / hier folgen die gewünschten gpin Optionen

Datei rndgpin4.awk

setzt 4S gpin file randomisiert um, refresh srand() only once per second! BEGIN{srand()} /^@@w1/{\$0=sprintf(" %7.2f * %7.2f *",rand()*360,rand()*360)} /^@@w2/{\$0=sprintf("015BDGLCA C6 -C5 %7.2f*02 -C2 %7.2f*03 -C3 \ %7.2f*04 -C4 %7.2f* ",rand()*360,rand()*360,rand()*360,rand()*360)} /^@@w3/{\$0=sprintf("015BDGALNAC C6 -C5 %7.2f*N1 -C2 %7.2f*06 -C6 %7.2f*\ ",rand()*360,rand()*360,rand()*360)} /^@@w4/{\$0=sprintf("015BDGLCA C6 -C5 %7.2f*01 -C1 %7.2f*02 -C2 \ %7.2f*03 -C3 %7.2f* ",rand()*360,rand()*360,rand()*360,rand()*360,rand()*360)} {print \$0}

10.2 Erzeugung von pdb-files aus GEGOP .mcang-files

Zunächst müssen aus der Datei name.mcenergy die gewünschten Konformationen (ca. 1000) in eine Datei (hier cs4_1000) extrahiert werden. Durch das folgende Script werden dann die Konformere aus den .mcang-files generiert.

```
awk '{system("replace.sawk \"" $0 "\" replace4.gpin 5 > tmp" NR \
".gpin");system("/usr/user/programs/gp27/gegop tmp" NR) }' cs4_1000
```

Datei replace.gpin

Testlauf mit den Startwinkeln aus Grid-search GEOM 004 000 /ANZAHL MONOMERER 2-C3 1-C1 1-01 1-03 2-Н3 2-05 Н1 1-#3 * #4 * #20 * 2-C1 3-C4 3-н4 3-05 2-2-01 2-04 Н1 #5 * #6 * #21 * 4-S1 2-C4 2-н4 2-4-02 4-04 01 _ #7 * #8 * #22 * C6 -C5 #9 *O2 -C2 #10 *O3 -C3 #11 *O4 -C4 #12 * 015BDGLCA #13 *N1 -C2 #14 *O6 -C6 #15 * 015BDGALNAC C6 -C5 #16 *01 -C1 #17 *02 -C2 #18 *03 -C3 #19 * C6 -C5 015BDGLCA 015SULFAT /parameter as needed

Datei replace.sawk

```
awk -v s="$1" -v l=$3 'BEGIN{n=split(s,a); if (l>0){f="%" l "s"; for (i=n;
i >0 ; i--){a[i]=sprintf(f,a[i])}} {for (i=n; i >0 ; i--) {gsub("#"
i,a[i])}; print $0}' $2
# {for (i=1; i <=n ; i++) \</pre>
```

10.3 Pulsprogramme

```
;ecos3ntppr.vs
;avance-version
;E.COSY program for KcMAX=3
;phase sensitive using TPPI
;Water suppression
#include <Avance.incl>
"d0=3u"
"d11=30m"
"d13=3u"
"d12=20u"
1 ze
2 d11*2
3 d12 p19:f1
  dl cw:fl
  d13 do:f1
  d12 pl1:f1
  pl phl
  d0
  pl ph2
  d13
  pl ph3
  go=2 ph31
  d1 wr #0 if #0 id0 ip1 zd
  d11 ip1
  dll ipl
  lo to 3 times td1
exit
ph1=(12) 3 3 3 3 5 5 5 7 11 1 1 1
ph2=(12) 0 0 0 0 2 2 2 4 8 10 10 10
ph3=2
ph31=1 1 1 1 3 3 3 1 1 3 3 3
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D)
                                                          [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O
                                                          [30 msec]
;d13: short delay
                                                          [3 usec]
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 12 * n
;DS: 16
;tdl: number of experiments
;MC2: TPPI
;pl9: power level for presaturation
;d12: delay for power switching
                                                          [20 usec]
```

```
;zgdiffslsp.mm
;avance-version
;1D difference sequence with f2 presaturation defined by frequency list
;presaturation by shaped pulses
; frequency alternates after every scan
;spin lock for protein suppression
#include <Avance.incl>
1 ze
2 20u pl1:f1
 d7 fq1:f2
3 p11:sp1:f2
  d11
  lo to 3 times 17
  pl phl
  20u pl10:f1
  p10 ph2
  go=2 ph31
  wr #0
exit
ph1=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
ph2=1 3 1 3 2 0 2 0
ph31=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1
;******Power Level********
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl10 : f1 channel - power level for spin lock pulse (10-15 dB)
;sp1 : f2 - channel - power level for shaped pulse
;
between 40 -70\ \mathrm{dB} depending on protein and ligand
;
;*********Pulse***********
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;pl0 : f1 channel - spin lock pulse for protein suppr. (10-30 ms, depending
on the protein)
;p11 : f2 channel - presaturation shaped pulse (gauss ca. 50 msec)
;
;********Delays**********
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d7 : additional delay (if nessesary) for complete T1 relaxation [min
20usec]
;d11 : delay between shaped pulses [1msec]
;
;presaturation = (p11 + d11) * 17 (presaturation should be around 2 sec)
;fql : define frequencies for on and off resonance presaturation
       0 499,87000 on resonance (6000HZ) off resonance (10000HZ)
;
;NS = 16*n
;DS = 16
```

```
;mlevprtpspdf.os 08/98
;avance-version
; homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence
    for mixing
; using two power levels for excitation and spinlock
;writing two files with dslist
;presat with shaped pulse defined by frequency list
; phase sensitive using TPPI
;A. Bax & D.G. Davis, J. Magn. Reson. 65, 355-360 (1985)
#include <Avance.incl>
"p5=p6*.667"
"p7=p6*2"
"d0=3u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=3u"
1 ze
2 d12 fq1:f2
3 d7 pl1:f1
4 p11:sp1:f2
 d14
 lo to 4 times 17
 pl phl
 d0
 d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
5 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
 lo to 5 times 11
  (p17 ph26)
 qo=3 ph31
 d11 wr #1 if #1 zd
 d12 fq1:f2
6 d7 pl1:f1
7 p11:sp1:f2
 d14
 lo to 7 times 17
 pl phl
 d0
 d12 pl10:f1
  (p17 ph26)
8 (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
```

```
(p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph22 p7 ph23 p6 ph22)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p6 ph24 p7 ph25 p6 ph24)
  (p5 ph23)
  lo to 8 times 11
  (p17 ph26)
  go=6 ph31
  d11 wr #2 if #2 id0 ip1 zd
  lo to 2 times td1
exit
ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph22=3 1 3 1 0 2 0 2
ph23=0 2 0 2 1 3 1 3
ph24=1 3 1 3 2 0 2 0
ph25=2 0 2 0 3 1 3 1
ph26=0 2 0 2 1 3 1 3
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1
;******Power Level********
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl10: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;sp1 : f2 - channel shaped pulse power level 30 -70 dB
;**********Pulse***********
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p5 : f1 channel - 60 degree low power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p7 : f1 channel - 180 degree low power pulse
;p17: f1 channel - trim pulse
                                                           [2.5 msec]
;p11: shaped pulse
                                                           [50 msec]
;********Delays**********
;d0 : incremented delay (2D)
                                                           [3 usec ]
;d7 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O
                                                           [30 msec ]
;d12: delay for power switching
                                                           [20 usec ]
;d13: short delay
                                                           [3 usec
                                                                    1
;d14: delay between presat pulses
                                                           [1 msec
                                                                    1
;L1: loop for MLEV cycle: (((p6*64) + p5) * 11) + (p17*2) = mixing time
;17: loop counter, (d14 + p11) * 17 = presaturation time
;in0: 1/(2 * SW) = DW
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: 16
;tdl: number of experiments
;MC2: TPPI
;fq1 : define frequencies for on and off resonance presaturation
       O 499,87000 on resonance (20000HZ) off resonance (-3000HZ)
;
```

;zgsl.mm ;avance-version ;1D sequence ;FOR CALIBRATION OF SPIN LOCK PULSES FOR TRNOE MEASUREMENTS #include <Avance.incl> 1 ze 2 d1 pl1:f1 pl phl 20u pl10:f1 p10 ph2 go=2 ph31 wr #0 exit ph1=0 2 2 0 1 3 3 1 ph2=1 3 1 3 2 0 2 0 ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 ;******Power Level******** ;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default) ;pl10 : spin lock power level (10-15 dB) ; ;*********Pulse*********** ;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse ;p10 : spin lock pulse (10-15 ms, depending on the protein) ; ;********Delays********** ;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1

11 Literatur

- ¹ D. Voet, J.G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim 1992.
- ² L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, 4. Auflage, Heidelberg 1987.
- ³ C.A.A. van Boeckel, M. Petitou, *Angew. Chem.* **105**, 1741-1894 (1993).
- ⁴ Y.I. Wu, W.P. Sheffield, M.A. Blajchman, *Blood Coagulation Fibrinolysis* **5**, 83-9 (1994).
- ⁵ A.D. Landler, *Curr. Opin. Neurobol.* **3**, 716-723 (1993).
- ⁶ N.K. Karamanos, A. Hjerpe, A. Aletras et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 100-109 (1995).
- ⁷ R.J. McKeon, R.C. Schreiber, J.S. Rudge, J. Silver, *J. Neurosci.* **11**, 3398-3411 (1991).
- ⁸ D.A. de Witt, J. Silver, D.R. Canning, G. Perry, *Exp. Neurol.* **121**, 149-152 (1993).
- ⁹ G. Multhaupt, *Biochim.* **76**, 304-311 (1994).
- ¹⁰ D.A. de Witt, P.L. Richey, D. Praprotnik, J. Silver, G. Perry, *Brain Res.* **656**, 205-209 (1994).
- ¹¹ B. Lindahl, L. Eriksson, U. Lindahl, *Biochem. J.* **306**, 177-184 (1995).
- ¹² E. Feyzi, E. Trybala, T. Bergstrom et al., *J. Biol. Chem.* **272**, 24850-24857 (1997).
- ¹³ E. Feyzi, F. Lustig, G. Fager, D. Spillmann et al., *J. Biol. Chem.* **272**, 5518-5524 (1997).
- ¹⁴ X. Zhu, H. Komiya, A. Chirino A et al., *Science* **251**, 90-93 (1991).
- ¹⁵ M. Salmivirta, K. Lidholt, U. Lindahl, *FASEB J.* **10**, 1270-1279 (1996).
- ¹⁶ W.E. Holmes , J. Lee, W.J. Kuang et al., *Science* **253**, 1278-1280 (1991).
- ¹⁷ P.M. Murphy, H.L. Tiffany, *Science* **253**, 1280-1283 (1991).
- ¹⁸ E.T. Baldwin, I.T. Weber, R.St. Charles, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **88**, 502-506 (1991).
- ¹⁹ G.M. Clore, P.C. Driscoll, P.T. Wingfield, A.M. Gronenborn, *Biochemistry* **29**, 7387-7401 (1990).
- ²⁰ K. Rajarathnam, I. Clark-Lewis, B.D. Sykes, *Biochemistry* **34**, 12983-12990 (1995).
- ²¹ C.A. Hebert, R.V. Vitangcol, J.B. Baker, *J. Biol. Chem.* **266**, 18989-18994 (1991).
- ²² G.S. Kuschert, A.J. Hoogewerf, A.E. Proudfoot et al., *Biochemistry* **37**, 11193-11201 (1998).
- ²³ D. Spillmann, D. Witt, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **273**, 15487-15493 (1998).

- ²⁴ T. Ogawa, *Chem. Soc. Rev.*, 397-407 (1994).
- ²⁵ Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **205**, 147-159 (1990).
- ²⁶ Y. Ichikawa, R. Monden, H. Kuzuhara, *Carbohydr. Res.* **172**, 37-64 (1988).
- ²⁷ S. Rio, J.-M. Beau, J.-C. Jacquinet, *Carbohydr. Res.* **219**, 71-90 (1991).
- ²⁸ S. Rio, J.-M. Beau, J.-C. Jacquinet, *Carbohydr. Res.* **255**, 103-124 (1994).
- ²⁹ F. Goto, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **45**, 6841-6844 (1992).
- ³⁰ J. Choay, Ann. N. Y. Acad. Sci. **556**, 61-73 (1989).
- ³¹ J.-C. Jacquinet, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **159**, 229-253 (1987).
- ³² G. Jaurand, C. Tabeur, M. Petitou, *Carbohydr. Res.* **255**, 295-302 (1994).
- ³³ J.-C. Jacquinet, *Carbohydr. Res.* **199**, 153-181 (1990).
- ³⁴ M. Zsiska, B. Meyer, *Carbohydr. Res.* **215**, 261-278 (1991).
- ³⁵ M. Zsiska, B. Meyer, *Carbohydr. Res.* **215**, 279-292 (1991).
- ³⁶ C. Coutant, J.-C. Jacquinet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1 **12**, 1573-1582 (1995).
- ³⁷ J. Tamura, K.W. Neumann, T. Ogawa, Bioorg. & Med. Chem. Lett., **5**, 1351-1354 (1995).
- ³⁸ J. Born, K. Jann, K.J. Assmann et al., *J. Biol. Chem.* **271**, 22802-22809 (1996).
- ³⁹ J.E. Shively, H.E. Conrad, *Biochemistry* **15**, 3932-3942 (1976).
- ⁴⁰ B. Casu, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **43**, 51-134 (1985).
- ⁴¹ U. Ludwigs, A. Elgavish, J.D. Esko, E. Meezan, L. Roden, *Biochem. J.* **245**, 795-804 (1987).
- ⁴² T. Yamagata, H. Saito, O. Habuchi, S. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **243**, 1523-1535 (1968).
- ⁴³ S. Suzuki, H. Saito, T. Yamagata et al., *J. Biol. Chem.* **243**, 1543-1550 (1968).
- ⁴⁴ P.N. Sanderson, T.N. Huckerby, I.A. Nieduszynski, *Biochem. J.* **257**, 347-354 (1989).
- ⁴⁵ K. Meyer, *Enzymes*, 3rd Ed. **5**, 307-320 (1971).
- ⁴⁶ H. Saitoh, K. Takagaki, M. Majima et al., *J. Biol. Chem.* **270**, 3741-3747 (1995).
- ⁴⁷ W. Knudson, M.W. Gundlach, T.M. Schmid, H.E. Conrad, *Biochemistry* **23**, 368-375 (1984).
- ⁴⁸ S.C. Churms, *J. Chromatogr. A* **720**, 151-166 (1996).
- ⁴⁹ The Busy Researcher's Guide To Biomolecule Chromatography; PerSeptive Biosystems; 1996.

- ⁵⁰ K. Takagaki, K. Kojima, M. Majima et al., *Glycoconjugate J.* **9**, 174-179 (1992).
- ⁵² J. Naohara, M. Manabe, J. Chromatogr. **603**, 139-143 (1992).
- ⁵³ L.E. Chun, T.J. Koob, D.R. Eyre, *Anal. Biochem.* **171**, 197-206 (1988).
- ⁵⁴ N.K. Karamanos, P. Vanky, A. Syrokou, A. Hjerpe, *Anal. Biochem.* **225**, 220-230 (1995).
- ⁵⁵ R. Da Col, L. Silvestro, A. Naggi et al., *J. Chromatogr.* **647**, 289-300 (1993).
- ⁵⁶ B. Meyer und Mitarbeiter, unveröffentlichte Ergebnisse.
- ⁵⁷ Handbuch der HPLC, Hrsg. Unger, K.K.; Weber, E.; GIT Verlag Darmstadt 1995.
- ⁵⁸ R.J. Linhardt, K.N. Gu, D. Loganathan et al., *Anal. Biochem.* **181**, 288-296 (1989).
- ⁵⁹ K. Sugahara, K. Shigeno, M. Masuda et al., *Carbohydr. Res.* **255**, 145-163 (1994).
- ⁶⁰ W. Chai, E.F. Hounsell, C.J. Bauer, A.M. Lawson, *Carbohydr. Res.* **269**, 139-156 (1995).
- ⁶¹ G.M. Brown, T.N. Huckerby, I.A. Nieduszynski, *Eur. J. Biochem.* **224**, 281-308 (1994).
- ⁶² N. Volpi, *Carbohydr. Res.* **255**, 133-144 (1994).
- ⁶³ G.R. Guile, S.Y. Wong, R.A. Dwek, *Anal. Biochem.* **222**, 231-235 (1994).
- ⁶⁴ T. Imanari, T. Toida, I. Koshiishi, H. Toyoda, J. Chromatogr. A **720**, 275-293 (1996).
- ⁶⁵ J. Weiß, *Ionenchromatographie*, 2. Aufl., VCH, Weinheim 1991.
- ⁶⁶ J.A. Rendleman: "*Ionization or Carbohydrates in the Presence of Metahl Hydroxydes and Oxides*" in *Carbohydrates in Solution. Adv. Chem. Ser.*, **117**, Am. Chem. Soc, Washington 1971.
- ⁶⁷ S. Shibata, R.J. Midura, V.C. Hascall, *J. Biol. Chem.* **267**, 6548-6555 (1992).
- ⁶⁸ D.M. Whitfield, S. Stojkovski, H. Pang et al., *Anal. Biochem.* **194**, 259-267 (1991).
- ⁶⁹ R.J. Midura, A. Salustri, A. Calabro, et al. *Glycobiology* **4**, 333-342 (1994).
- ⁷⁰ N.K. Karamanos, A. Syrokou, P. Vanky et al., *Anal. Biochem.* **221**, 189-199 (1994).
- ⁷¹ S.R. Delaney, H.E. Conrad, J.H. Glaser, *Anal. Biochem.* **108**, 25-34 (1980).
- ⁷² P.O.G Edlund, S.P. Jacobsson, *Anal. Chem.* **63**, 2888-2891 (1991).
- ⁷³ Brown, A.H.; Arch. Biochem. **17**, 495-499 (1966).
- ⁷⁴ Z. Dische, *J. Biol. Chem.* **167**, 189-198 (1947).
- ⁷⁵ M. Stefansson, M. Novotny, *Anal. Chem.* **66**, 3466-3471 (1994).
- ⁷⁶ N.K. Karamanos, S. Axelsson, P. Vanky et al., *J. Chromatogr. A* **696**, 295-305 (1995).

- ⁷⁷ R.O. Miura, S. Yamagata, Y. Miura et al., *Anal. Biochem.* **225**, 333-340 (1995).
- ⁷⁸ M. Gohdes, Dissertation, Universität Hamburg 1997.
- ⁷⁹ T.T. Stevenson, R.H. Furneaux, *Carbohydr. Res.* **210**, 277-298 (1991).
- ⁸⁰ K.-H. Khoo, H.R. Morris, R.A. McDowell et al., *Carbohydr. Res.* **244**, 205-224 (1993).
- ⁸¹ Y. Dai, R.M. Whittal, C.A. Bridges, Y. Isogai et al., *Carbohydr. Res.* **304**, 1-9 (1997).
- ⁸² P. Juhasz, K. Biemann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4333-4337 (1994).
- ⁸³ A.P. Bruins, *J. Chromatogr. A* **794**, 345-357 (1998).
- ⁸⁴ M. Eberstadt, G. Gemmecker, D.F. Mierke, H. Kessler, *Angew. Chem.* **107**, 1813-1838 (1995).
- ⁸⁵ M. Karplus, J. Am. Chem. Soc. **1963**, 30, 11-15.
- ⁸⁶ Neuhaus, D.; Williamson, M.; The Nuclear Overhauser Effect In Structural and Conformational Analysis; VCH Publishers Inc. 1989.
- ⁸⁷ P. Balaram, A.A. Bothner-By, J. Dadok, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4015-4017 (1972) und
 P. Balaram, A.A. Bothner-By, E. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4017-4018 (1972).
- ⁸⁸ G.M. Glore, A.M. Gronenborn, *J. Mag. Reson.* **1983**, *53*, 423-442.
- ⁸⁹ B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *Eur. J. Biochem.* **246**, 705-709 (1997).
- ⁹⁰ K. Akasaka, J. Magn. Res. **36**; 135-140 (1979).
- ⁹¹ M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **111**, 1902-1906 (1999).
- ⁹² D. Welti, D.A. Rees, E.J. Welsh, *Eur. J. Biochem.* **94**, 505-514 (1979).
- ⁹³ B. Mulloy, M.J. Forster, C. Jones, D.B. Davies, *Biochem. J.* 293, 849-858 (1993) und B. Mulloy, M.J. Forster, C. Jones, A.F. Drake, E.A. Johnson, D.B. Davies, *Carbohydr. Res.* 255, 1-26 (1994).
- ⁹⁴ B. Meyer, L. Thunberg, U. Lindahl et al., *Carbohydr. Res.* **88**, C1-C4 (1981).
- ⁹⁵ K. Sugahara, Y. Tanaka, S. Yamada, *Glycoconjugate J.* **13**, 609-619 (1996).
- ⁹⁶ K. Sugahara, Y. Takemura, M. Sugiura, et al., *Carbohydr. Res.* **255**, 165-182 (1994).
- ⁹⁷ W. Chai, H. Kogelberg, A.M. Lawson, Anal. Biochem. **237**, 88-102 (1996).
- ⁹⁸ E.F. Hounsell, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **27**, 445-474 (1995).
- ⁹⁹ B. Casu, Ann. N. Y. Acad. Sci. **556**, 1-17 (1989).
- ¹⁰⁰ S.M.A. Holmbeck, P.A. Petillo, L.E. Lerner, *Biochem.* **33**, 14246-14255 (1994).
- ¹⁰¹ J.E. Scott, F. Heatley, M.N. Jones et al., *Eur. J. Biochem.* **130**, 491-495 (1983).
- ¹⁰² J.E. Scott, F. Heatley, B. Wood, *Biochemistry* **34**, 15467-15474 (1995).

- ¹⁰³ M. Zsiska, B. Meyer, *Carbohydr. Res.* **243**, 225-258 (1993).
- ¹⁰⁴ B. Mulloy, M.J. Forster, C. Jones, D.B. Davies, *Biochem. J.* **293**, 849-858 (1993).
- ¹⁰⁵ D.R. Ferro, A. Provasoli, M. Ragazzi et al., *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6773-6778 (1986).
- ¹⁰⁶ D. Mikhailov, H.H. Mayo, I.R. Vlahov et al., *Biochem. J.* **318**, 93-102 (1996).
- ¹⁰⁷ S.J. Angyal, *Adv. Carbohydr. Chem.* **47**, 1-43 (1989).
- ¹⁰⁸ D.L. Rabenstein, J.M. Robert, J. Peng, *Carbohydr. Res.* **278**, 239-256 (1995).
- ¹⁰⁹ N. Metropolis, A.W. Rosenbluth, M.N. Rosenbluth, A.H. Teller, E. Teller, *J. Chem. Phys.* **21**, 1087-1092 (1953).
- ¹¹⁰ M.P. Allen, D.J. Tildsley, *Computer Simulation of Liquids*, Oxford Univ. Press 1987.
- ¹¹¹ Struike-Prill und B. Meyer, *Eur. J. Biochem.* **194** (1990) 903.
- ¹¹² R.U. Lemieux, K. Bock, K. Delbaere, S. Koto und V.S. Rao, *Can. J. Chem.* **58** (1980) 631.
- ¹¹³ G. Nemethy, G. Pottle und H.A. Scheraga, *J. Phys. Chem.* **87** (1983) 1883.
- ¹¹⁴ W.F. van Gunsteren, H.J.C. Berendsen, *Angew. Chem.* **102**, 1020-1055 (1990).
- ¹¹⁵ Tripos Inc., St. Louis.
- ¹¹⁶ Manual zu Amicon Ultrafiltrations-Membranen, Millipore Corporation, Bedford.
- ¹¹⁷ Manual zum ESI-Interface 59987A, Hewlett-Packard, Palo Alto.
- ¹¹⁸ A.P. Tinke, J. Chromatogr. **647**, 279-287 (1993).
- ¹¹⁹ M. Zsiska, Dissertation, Universität Oldenburg 1990.
- ¹²⁰ A.M. Lawson, E.F. Hounsell, M.S. Stoll, *Carbohydr. Res.* **221**, 191-208 (1991).
- ¹²¹ T. Toida, H. Toyoda, T. Imanari, *Anal. Sci.* **9**, 53-58 (1993).
- ¹²² B.J. Rogers, B.E. Morton, *J. Reprod. Fertil.* **35**, 477-787 (1973).
- ¹²³ G.A. Doak, W.L. Zahler, *Biochim. Biophys. Acta* **570**, 303-310 (1979).
- ¹²⁴ D.P. Mascotti, T.M. Lohman, *Biochemistry* **34**, 2908-2915 (1995).
- ¹²⁵ A. Larnkjaer, S.H. Hansen, P.B. Oestergaard, *Carbohydr. Res.* **266**, 37-52 (1995).
- ¹²⁶ B. Mulloy, M.J. Forster, C. Jones et al., *Carbohydr. Res.* **255**, 1-26 (1994).
- ¹²⁷ S. Faham, R.E. Hileman, J.R. Fromm et. al., *Science* **217**, 1116-1120 (1996).
- ¹²⁸ E.A. Merritt, S. Sarfaty, M.G. Jobling et al., *Protein Sci.* **6**, 1516-1528 (1997).

mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. U. Lindahl und Frau Dr. D. Spillmann für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Bereitstellung der Heparinoligosaccharide und des Interleukin-8.
- Dem Fond der Chemischen Industrie f
 ür ein Pomotionsstipendium, insbesondere Frau Dr.
 S. Kiefer f
 ür die unb
 ürokratische Betreuung.
- Herrn Dr. V. Sinnwell f
 ür die stets freundliche und geduldige Hilfestellung bei NMR-Problemen und seinem Team f
 ür die Durchf
 ührung des NMR-Services.
- Herrn Dipl. Chem. M. Mayer und Herrn Dipl. Chem. O. Schuster f
 ür die Hilfestellung bei der Aufnahme von Spektren und die Betreuung des NMR-Spektrometers sowie Herrn Dr. J. Pieper f
 ür seine Einf
 ührung in die NMR-Spektroskopie.
- Herrn Dr. J. Klein für die gemeinsame Inbetriebnahme der Dionex-HPLC.
- Herrn U. Jess der Krupp Elastomertechnik GmbH, Hamburg, für die Überlassung einiger in der Anfangszeit sehr hilfreicher HPLC-Säulen und anderer Laboraustattung.
- Herrn Dr. K. Böttcher, Herrn Dr. H. Kränz und Herrn Dipl. Chem. C. Seeberger für die Betreuung der Computer im Arbeitskreis.
- Frau A. Kahrs und Frau Dipl. Biol. B. Leon für die Durchführung der Peptidsynthesen.
- Herrn Dr. Hinze und Herrn Dr. Fietske der Beiersdorf AG, Hamburg für die Durchführung der ersten ESI-Messungen.
- Meiner Familie, insbesondere meiner Frau Birgit und meiner Tochter Anna, ohne deren Geduld und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.