

**Chemoenzymatische Darstellung komplexer
Glycoconjugate mit Trans-Sialidase
aus *Trypanosoma cruzi***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Björn Neubacher
aus Hamburg

Hamburg 2005

1. Gutachter Prof. Dr. J. Thiem
2. Gutachter Prof. Dr. W. Francke

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis Mai 2005 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. J. Thiem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg durchgeführt. Zwischenzeitlich fanden Forschungsaufenthalte von Februar 2004 bis März 2004 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Paul Kosma in der Abteilung für Organische Chemie der Universität für Bodenkultur in Wien und im Mai 2005 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Peters im Institut für Chemie der Medizinischen Universität zu Lübeck statt.

Herrn Prof. Dr. Joachim Thiem möchte ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die großzügige Unterstützung sowie für die interessante Themenstellung und den gewährten wissenschaftlichen Freiraum bei der Durchführung dieser Arbeit danken.

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcCl	Acetylchlorid
AcOH	Essigsäure
All	Allyl
ATP	Adenosintriphosphat
ax	axial
BSA	Rinderserumalbumin
BuOH	1-Butanol
CMP-Neu5Ac	Cytidinmonophosphat- <i>N</i> -acetylneuraminsäure
CTP	Cytidintriphosphat
DBU	1,4-Diaza-bicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschicht Chromatographie
DCM	Dichlormethan
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
EE	Ethylacetat / Essigsäureethylester
eq	äquarorial
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LacNAc	<i>N</i> -Acetylactosamin
MALDI-Tof	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
Man	Mannose
ManNAc	<i>N</i> -Acetylmannosamin
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MU-OH	4-Methyl-umbelliferon
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure

Neu5Gc	<i>N</i> -Glycoylneuraminsäure
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
<i>p</i> NP	<i>para</i> -Nitrophenyl
<i>p</i> NP-OH	<i>para</i> -Nitrophenol
PNS	Periphere Nervensystem
PTSA	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
py	Pyridin
quant.	quantitativ
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
TBA-HSO ₄	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
THF	Tetrahydrofuran
Tol	Toluol
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat- <i>N</i> -acetylglucosamin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG	1
1.1 BIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON SIALINSÄUREN	2
1.2 TRANS-SIALIDASE UND <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	5
1.3 DAS ZENTRALE NERVENSYSTEM UND MAG	9
2. ZIELSETZUNG	13
3. SYNTHESE VON SIALYLIERTEN OLIGOSACCHARIDEN	16
3.1 CHEMISCHE METHODEN ZUR GLYCOSYLIERUNG VON NEU5AC	16
3.2 ENZYMATISCHE SYNTHESSEN VON SIALYL-OLIGOSACCHARIDEN	19
3.2.1 <i>Synthese mittels Sialyltransferasen</i>	19
3.2.2 <i>Sialidasen in der Synthese von Sialyl-Oligosacchariden</i>	21
3.3 DARSTELLUNG SIALYLIERTER OLIGOSACCHARIDE MIT TRANS-SIALIDASE AUS <i>TRYPANOSOMA-CRUZI</i>	22
3.3.1 <i>Synthese der Neu5Ac-Donorsubstrate</i>	23
3.3.2 <i>Transglycosylierungen durch Trans-Sialidase</i>	25
3.3.3 <i>Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie</i>	27
3.3.4 <i>Synthese von Neu5Acα2-3-Galβ1-3-GalOR Derivativen</i>	28
3.3.5 <i>Darstellung von Sia-3'-Lac Verbindungen</i>	30
4. SYNTHESE NEUARTIGER DONORSUBSTATE	33
4.1 SYNTHESE KETTENVERKÜRZTER DONORSUBSTRATE	33
4.2 CHEMOENZYMATISCHE UMSETZUNG VON <i>pNP-OCT5AC</i>	37
4.3 ENZYMATISCHE TRANSGLYCOSYLIERUNGEN MIT TRANS-SIALIDASE	37
4.4 CHEMOENZYMATISCHE UMSETZUNG VON <i>pNP-HEPT5AC</i>	40
4.5 ENZYMATISCHE TRANSGLYCOSYLIERUNGEN MIT TRANS-SIALIDASE	41
5. SYNTHESE UND UNTERSUCHUNGEN DER CARBONYL-PRECURSOR	44
6. <i>pNP-NEU5,9AC₂</i> ALS DONORSUBSTRAT FÜR TRANS-SIALIDASE	49
6.1 ENZYMATISCHE TRANSGLYCOSYLIERUNG MIT TRANS-SIALIDASE	51
7. SYNTHESE UND MODIFIZIERUNG VON KDN ALS POTENTIELLER DONOR	54
7.1 SYNTHESE VON KDN UND DARSTELLUNG DES <i>pNP-GLYCOSIDES</i>	55
7.2 UNTERSUCHUNG ZUR ENZYMATISCHEN ERKENNUNG VON <i>pNP-KDN</i>	58
8. SYNTHESE UND UNTERSUCHUNGEN PHENOLISCHER NEU5AC-GLYCOSIDE	60
8.1 DARSTELLUNG PHENOLISCHER NEU5AC GLYCOSIDE	61
8.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR ENZYMATISCHEN ERKENNUNG	63
9. ENZYMATISCHE EINTOPF-TRANSGLYCOSYLIERUNGEN	66
9.1 SYNTHESE VON NEU5AC α 2-3-GAL β 1-4GLCNAC- α OALLYL	68
9.2 SYNTHESE VON OCT5AC- α 2-3-GAL- β 1-4GLCNAC- α OALLYL	70

9.3 SYNTHESE VON HEPT5AC- α 2-3-GAL- β 1-4GLcNAC- α OALLYL	71
10. NMR-STUDIEN ZUR BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT EINZELNER GLYCOSIDE....	73
10.1 SÄTTIGUNGSTRANSFERDIFFERENZ- (STD) NMR	73
10.2 NEUARTIGE OLIGOSACCHARIDE ALS POTENTIELLE MAG-LIGANDEN	76
10.3 NMR-UNTERSUCHUNGEN DER REAKTION VON TRANS-SIALIDASE.....	79
10.3.1 <i>Reaktionsverfolgung durch ^1H-NMR-Spektroskopie</i>	80
10.3.2 <i>STD-Experimente an Trans-Sialidase aus <i>T. cruzi</i></i>	86
11. ZUSAMMENFASSUNG	92
12. SUMMARY	95
13. EXPERIMENTELLER TEIL	98
13.1 ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN	98
13.2 ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN.....	100
13.3 SPEZIELLE SYNTHESVORSCHRIFTEN UND NMR EXPERIMENTE	103
14. SICHERHEITSHINWEISE	137
15. LITERATUR.....	139

1. Einleitung

Neben den Proteinen, Lipiden und Nucleinsäuren stellen Kohlenhydrate mit Abstand den bedeutendsten Anteil der vier großen Naturstoffklassen dar. Nur durch Photosynthese werden jedes Jahr $2 \cdot 10^{11}$ t D-Glucose gebildet, wobei der Großteil in der Form von Mono-, Oligo- oder Polysaccharide auf der Stufe von Kohlenhydraten verbleibt und nur ein geringer Anteil von 5 % in die weitere Synthese primärer oder sekundärer Metabolite eingeht.¹ Dabei ist schon lange bekannt, dass Kohlenhydrate als Energiespeicher, die schnell den Brennstoff Glucose freisetzen können, in Form von Stärke bei Pflanzen und Glycogen bei Tieren vorkommen. Des Weiteren spielen Polysaccharide wie z. B. Chitin oder Cellulose eine sehr wichtige Rolle beim Aufbau von Strukturelementen. Sie sind im Exoskelett aller Anthropoden aber auch in den Zellwänden von Bakterien und Pflanzen zu finden. Zum Beispiel ist Cellulose, der Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwände, die am häufigsten auftretenden organische Verbindung in der Biosphäre.²

Mit zunehmenden Möglichkeiten der instrumentellen Analytik Mitte des letzten Jahrhunderts, wurden den Nucleinsäuren und Proteinen als Bausteine des Lebens eine herausragende Bedeutung zugeschrieben. Die Kohlenhydrate wurden dagegen molekularbiologisch weniger beachtet und waren nur im Bereich der Nahrungsmittel- und Papierindustrie von Interesse.³ Erst mit der Entwicklung leistungsfähiger chromatographischer und spektroskopischer Methoden einerseits und der Einführung moderner Verfahren zur Oligosaccharidsynthese andererseits wurden die Entdeckung und Untersuchung der Funktion komplexer Kohlenhydratstrukturen in Organismen, die häufig heterogen auftreten und nur in verhältnismäßig geringen Mengen vorkommen, ermöglicht. Es wurde erkannt, dass die meisten Lipide und Proteine kovalent gebundene Anteile an Kohlenhydraten mit sehr divergierenden und hoch komplexen Strukturen besitzen, wohingegen Kohlenhydrate und deren Derivate mit Energiespeicher- und Stützfunktion recht einfach aufgebaut sind.⁴

In den linear aufgebauten Peptiden und Nucleinsäuren kann die Information nur in der Anzahl und Sequenz der monomeren Bausteine enthalten sein. In Kohlenhydraten ermöglicht die Position und Konfiguration der glycosidischen Bindung und das Auftreten von Verzweigungen darüber hinaus eine extrem hohe Strukturdiversität, die ihre Konsequenz in einer hohen biologischen Informationsdichte hat. Es gibt zum Beispiel 10^{12} mögliche Strukturisomere Formen für ein reduzierendes Hexasaccharid.⁵ Zusätzliche Substitutionen der Hydroxylgruppen einzelner Kohlenhydratbausteine durch Acetyl-, Sulfat-, oder Phosphat-

gruppen erhöhen die Strukturvielfalt noch weiter. Glycoproteine und Glycolipide sind wesentliche Bestandteile der Zellmembran, wobei der Kohlenhydratanteil immer zur extrazellulären Seite ausgerichtet ist und so die Glycocalyx bildet. Die Oberfläche von eukaryotischen Zellen verfügt über eine Vielzahl von mehr oder weniger verzweigter Oligosaccharide, abhängig vom jeweiligen Zelltyp und dem Entwicklungsstadium der jeweiligen Zelle, die wichtige Funktionen bei der Zell-Zell-Erkennung und –Wechselwirkungen erfüllen.⁶ Darüber hinaus dienen Kohlenhydratliganden als Bindungsstellen für eine Vielzahl von Rezeptoren der Viren, Bakterien, Toxine, Antikörper, Enzyme, sowie Lectine und Selectine.⁷⁻¹⁰ Eine wichtige Rolle in dieser „dritten Sprache des Lebens“ spielen die Sialinsäuren, die als hoch komplexe terminale Kohlenhydrate einer Vielzahl von biologischen und vor allem cytokinen Prozessen beteiligt sind.¹¹

1.1 Biologische Bedeutung von Sialinsäuren

Sialinsäuren sind negativ geladenen Monosaccharide mit einem Grundgerüst, das aus neun Kohlenstoffatomen besteht. Sie kommen in allen höheren Lebewesen ab den Deuterostomaten und in einigen Microorganismen vor.^{12,13} Sie zeichnen sich durch eine enorme Strukturvielfalt aus und gehören zu den komplexen Kohlenhydraten, die als Hauptbestandteil der Glycoproteine und –lipide die Glycocalyx aufbauen.¹⁴ Daher spielen sie eine wichtige regulatorische und schützende Rolle in der Zellbiologie. So gibt es in Säugetieren kaum biologische Vorgänge, in deren Verlauf Sialinsäuren nicht beteiligt sind, was im Falle von Störungen in deren Biosynthese oder ihrem natürlichen Abbau zu dramatischen biologischen Konsequenzen führen kann. Zu der Familie der Sialinsäuren gehören ca. 50 Monosaccharide, die sich durch verschiedene Substitutionsmuster an der Amino- bzw. den Hydroxylgruppen unterscheiden. Sie sind alle Derivate der Neuraminsäure, 5-Amino-3,5-didesoxy-D-*glycero*-D-*galacto*-non-2-ulopyranoson-säure, deren Aminofunktion entweder acetyliert oder glycolyliert ist, während die nicht glycosidischen Hydroxylgruppen unterschiedliche Acetylierungsmuster aufweisen. Vereinzelt sind auch Phosphoryl-, Sulfonyl- und Lactosylsubstituenten nachgewiesen worden.¹⁵⁻¹⁷ Die am häufigsten vorkommenden Derivate der Neuraminsäure sind die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, **1**), die N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc, **2**), sowie die an Position 9 O-acetylierte Form der Neu5Ac (Neu5,9Ac₂, **3**). Dabei ist einzig nur Neu5Ac **1** in jeder Spezies vertreten, während die anderen Derivate nicht allgegenwärtig sind.

Neu5Ac ist im Menschen die häufigste Sialinsäure und nimmt die terminal Position in Glycoproteinen und Gangliosiden ein, wobei sie als Monomer, Oligomer oder auch als Polymer vorkommt.¹⁶ Durch ihre Position in der äußeren Zellmembran spielt sie eine außergewöhnlich wichtige Rolle in der Molekularbiologie der Zelle. Auf der einen Seite maskieren Sialinsäuren die Zellepitope und verhindern so eine Zell-Zell-Erkennung, auf der anderen Seite repräsentieren sie die biologischen Ziele einer Vielzahl von Rezeptorproteinen. Neu5Ac kann, wie alle Sialinsäuren, als acids Monosaccharid sehr leicht mit Komponenten anderer Zelloberflächen und extrazellulären Substanzen interagieren. Aufgrund der strukturellen Komplexität und der unterschiedlichen Substitutionsmuster fehlt bisher ein generellumfassendes Verständnis der biologischen Aufgaben der Sialinsäuren und Detailfunktionen können nur speziell für einzelne Derivate formuliert werden. Neu5Gc kann zum Beispiel im gesunden humanen Gewebe nur in kleinen Spuren nachgewiesen werden, während sie im Tierreich weit verbreitet und bis zu den höheren Affen die dominante Sialinsäure ist. Aufgrund einer Genmutation hat der Mensch die Fähigkeit verloren Neu5Gc biosynthetisch zu exprimieren.¹⁸ Weshalb Neu5Gc in kleinen Mengen im menschlichen Gewebe und in Tumorzellen auftritt ist bisher nicht bekannt. Es wird aber diskutiert, dass es unter anderem mit der Ernährung zusammenhängt, da Neu5Gc im gastrointestinalen Trakt von Enten nachgewiesen wurde.^{19,20}

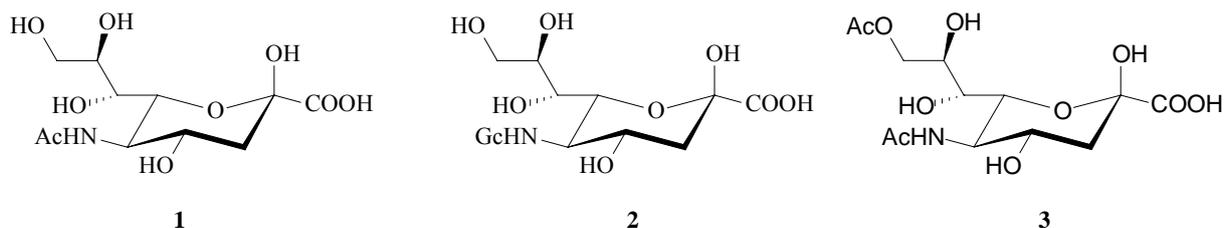


Abb. 1: Die häufigsten Sialinsäuren Neu5Ac (1), Neu5Gc (2) und Neu5,9Ac₂ (3)

In der humanen Zellbiologie nimmt also Neu5Ac unterschiedliche Aufgaben wahr. Durch die negative Ladung ist Neu5Ac entweder am Transport und der Bindung positiv geladener Moleküle, einschließlich Pharmazeutika, beteiligt oder es kommt zur Abstoßung gleich strukturierter Zellen, wie zum Beispiel zwischen den Erythrocyten.^{13,21} Gerade die physikalisch-chemischen Eigenschaften werden durch relativ hydrophobe Substituenten wie

z. B. eine *O*-Acetyl-Gruppe beeinflusst. Auf der anderen Seite sorgt eine zusätzliche Sulfatierung der Neu5Ac, wie sie in *Echinodermen* zu beobachten ist, für einen stärker ausgeprägt sauren Charakter der Neu5Ac. Der maskierende Effekt (anti-recognition effect) der Neu5Ac beruht auf dem Zusammenspiel der negativen Ladung der Carboxyl-Funktion einerseits und großen aber hydrophilen Molekülen andererseits.²² Dabei werden Gal- oder GalNAc-Reste der Glycocalyx, die von Natur aus durch Galactose-spezifische Lectine erkannt werden, maskiert, so dass sie durch die entsprechenden Rezeptoren nicht erkannt werden können. Diese Funktion der Neu5Ac wird deutlich wenn die Interaktionen zwischen Makrophagen der Leber und Milz mit human Erythrocyten betrachtet werden, deren Zelloberfläche durch Alterung oder durch Einfluß diverser Sialidasen zu 10-20 % (1-2·10⁷ Moleküle pro Zelle) desialyliert ist. In vitro konnte gezeigt werden, dass diese Zellen an Galactose spezifische Rezeptoren der Phagocyten gebunden, aufgenommen und abgebaut wurden. Eine Sialylierung der Zelloberfläche führt also zum Schutz der Zelle vor humoraler oder zellulärer Erkennung.^{23,24} Dies gilt auch für pathogene Zellen wie z. B. Bakterien oder Krebszellen, die zu einem großen Teil sialyliert sind, was dazu führt, dass sie vom Immunsystem nicht erkannt und vernichtet werden können. So verhindert *O*-acetylierte Neu5Ac auf der Oberfläche von Krebszellen die natürlich Apoptose, so dass es zum Wuchern der Zellen kommt.²⁵

Neben dem maskierenden Effekt ist die Neuraminsäure auch direkt an eine Vielzahl von Erkennungsprozessen beteiligt. Dabei erkennen pathogene Organismen wie Bakterien, Viren oder auch Protozoen die Neuraminsäure, binden an die Zelloberfläche und lösen im weiteren Verlauf eine Vielzahl von Krankheiten aus.²⁶ Zum Beispiel bindet der Influenza A Virus über ein virales Lectin (Hämagglutinin) an humane Erythrocyten und an Mucine des respiratorischen Trakts. Die Adhäsion des Hämagglutinin wird begleitet von der Freisetzung einer Neuraminidase (Sialidase), die eine Verbreitung des Virus erleichtert und eine entscheidende Rolle im Infektionsmechanismus spielt. Es gelang, durch die genaue Kenntnis der Kristallstruktur einen starken Inhibitor für dieses Enzym zu entwickeln, welcher heutzutage als erstes potentes Arzneimittel gegen diesen Virus auf dem Markt ist.²⁷

1.2 Trans-Sialidase und *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi ist ein pathogener Organismus der zu der Familie der Protozoen gehört. Es gibt zwei für den Menschen infektiöse Spezies. Zum einen *Trypanosoma brucei*, als Auslöser der Schlafkrankheit in Afrika, und zum anderen *Trypanosoma cruzi*, welches in großen Teilen Südamerikas für die Chagas Krankheit verantwortlich ist. Bei dieser Krankheit handelt es sich um eine letal verlaufende Infektion, deren Hauptursache die unzureichenden sanitären Verhältnisse in den betroffenen Gebieten sind. Die Chagas Krankheit wird durch die Raubwanze *Rhodnius prolixus* übertragen. Sie lebt in dunklen und feuchten Nischen in Häusern und ernährt sich vom Blut der Bewohner. Die Wanze an sich stellt keine Bedrohung für den Menschen dar, beherbergt aber in ihrem Verdauungstrakt das pathogene *Trypanosoma cruzi*. Durch die natürliche Ausscheidung des Insektes gelangt der Erreger über eine Schmierinfektion in den Wirt. Laut WHO sind ca. 100 Mio. Menschen in Gefahr angesteckt zu werden. Es kommt jährlich zu 16-18 Mio. Neuerkrankungen, wobei pro Jahr ca. 50.000 Tote zu beklagen sind. Die Krankheit durchläuft ein frühes Stadium mit Fieber, geschwollenen Lymphknoten, Müdigkeit, Vergrößerung der Milz und ein spätes Stadium, in dem sich der Herzmuskel vergrößert und das Myokardgewebe weicher wird. Diese Schwächung des Herzens führt dann zum Tode durch Herzversagen.²⁸



Abb. 2: Geographische Verbreitung der Chagas Krankheit (laut WHO)

Das Überleben von *T. cruzi* im Wirtsorganismus hängt sehr stark vom Grad der Sialylierung des Zellepitopes ab.²⁹ Dabei verfügt es nicht über die Möglichkeit Neu5Ac auf biosynthetischem Weg zu erhalten, um so sein Epitop zu schützen. Es besitzt allerdings ein Oberflächenenzym, welches dafür sorgt, dass Neu5Ac von der Wirtszelle auf das Oberflächen-Mucin des Pathogens übertragen wird. Hierbei handelt es sich um Trans-Sialidase, ein Oberflächenenzym, welches mit einem GPI-Anker fixiert ist und zur Superfamilie der Sialidasen gehört, mit denen bis zu 70 % strukturelle Übereinstimmung nachgewiesen wurden.³⁰ Dabei durchläuft dieses Enzym im Lebenszyklus des Trypanosoms eine interessante Entwicklung. Die nichtin-vasive epimastigote Form von *T. cruzi*, welche sich im mittleren Darm des Vektor-Insektes befindet, verfügt über keine Trans-Sialidase und somit auch nicht über Neu5Ac auf der Zelloberfläche. Erst im unterem Teil des intestinalen Systems wandelt sich die epimastigote Form in die metacyclische trypomastigote Form um, wodurch die Expression von Trans-Sialidase gestartet wird. Sobald dann das Trypanosom die Blutbahn des Wirtsorganismus erreicht, beginnt die Übertragung von Neu5Ac.³¹

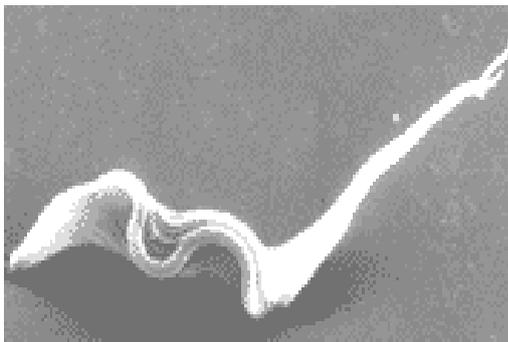


Abb. 3: Trypanosoma cruzi (links) und die Raubwanze Rhodnius prolixus (rechts)

Trotz umfangreicher Versuche ist es bis heute noch nicht gelungen die Wildtyp Trans-Sialidase zu kristallisieren. Es gelang allerdings die Kristallisation einer voll aktiven Trans-Sialidase Mutante durch systematischen Oberflächen Mutagenese der Sialidase aus *Trypanosoma rangeli*, denn die Gesamtstrukturen beider Enzyme weisen eine große Homologie von ca. 75 % auf. Wie die Sialidase verfügt auch die Trans-Sialidase über zwei Domänen, die N-terminale katalytische Domäne mit einem sechsblättrigen β -Propeller, der für mikrobiische Sialidase charakteristisch ist und die lectin-ähnliche C-terminalen Domäne.³² Ein detaillierter Vergleich der aktiven Zentren der trypanosomalen Enzyme zeigt, dass die reine Sialidase bestimmte strukturelle Merkmale besitzt, die die unterschiedliche

Transferaktivitäten erklären könnte. Aufgrund des Substitutionsmusters und der konformativen Anordnung der Aminosäure an der Peripherie des aktiven Zentrums, verfügt die Trans-Sialidase über eine engere und hydrophobere Bindungstasche als die Sialidase. Wegen der recht unpolaren Aminosäuren (u.a. Trp und Tyr) könnte der Eintritt des Wassers in die Bindungstasche erschwert und somit die bevorzugte Transglycosylierung erklärt werden.³³ Eine hydrolytische Aktivität von Trans-Sialidase ist nur zu beobachten, wenn kein geeignetes Akzeptorsubstrat vorhanden ist.³⁴

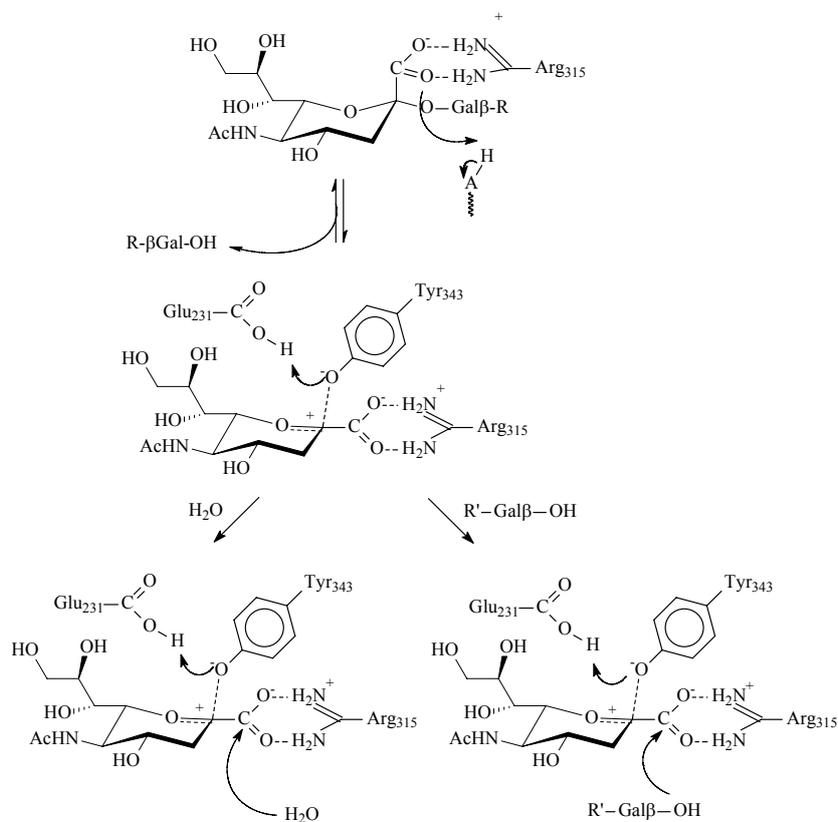


Abb. 4: Mechanistische Betrachtung der Transglycosylierung und der Hydrolyse am Beispiel von Sialidase aus *T. rangeli* unter Retention der Konfiguration

Geeignete Akzeptorsubstrate sind ausschließlich β -Galactoside, die über eine freie Hydroxyl-Funktion am C-3 verfügen, denn die Trans-Sialidase erkennt, wie auch einige Sialidasen, ausschließlich die $\alpha(2-3)$ Bindung natürlicher sialylierter Oligosaccharide, die so gespalten oder verknüpft werden.³⁵ Kommt es zur Bindung von Neu5Ac in der katalytischen Domäne, so führt dieses zu einer konformativen Änderung in der Proteinstruktur. Ein Akzeptor wie z. B. Lactose bindet offenbar anschließend in einer genau definierten Position an das Protein,

weil sonst die außerordentlich hohe Regiospezifität nicht erklärt werden könnte. Es ist davon auszugehen, dass die oben genannte Änderung in der Konformation des Enzyms eine schwächere Bindung des Akzeptors an das Protein ermöglicht wie sich aus Ergebnissen sowohl von BIAcore-Sensogrammen, als auch sensitiveren NMR-Untersuchungen ableiten ließ.^{33,36}

Trotz einiger Unterschiede in den einzelnen Aminosäuren der reaktiven Domäne des Enzyms, kann der Mechanismus des Transfers der Neu5Ac auf ein Akzeptorsubstrat analog zu einer Sialidase aus *T. rangeli* beschrieben werden. Die Reaktion verläuft unter Retention der Konfiguration, wobei ein kovalentes Sialyl-Enzym-Intermediat ausgebildet wird. Wie in Abb. 4 zu sehen ist, agiert ein Tyrosinrest als katalytisches Nucleophil.^{30,37}

Auch nach einer Vielzahl von Versuchen ist es bislang noch nicht gelungen, einen geeigneten Inhibitor für Trans-Sialidase zu finden. Während Sialidasen durch das Glycal der Neu5Ac (Neu2en5Ac) inhibiert werden, in dem das Oxocarbeniumion als Übergangszustand der Reaktion mimikriert wird, ist dieser Effekt bei der Trans-Sialidase nicht zubeobachten.^{16,38,39} Im Gegensatz zu Sialidasen dringt das Donorsubstrat bei der Trans-Sialidase eher in einer schrägen bzw. gekippten Position in die Bindungstasche ein. Es wird diskutiert, ob dieses zum Verlust der inhibitorischen Eigenschaften des Neu2en5Ac führt.⁴⁰ Die beschriebene konformative Änderung der Bindungstasche und die damit einhergehende Bindung des Enzyms an ein Akzeptorsubstrat legt die Vermutung nahe, dass auch Akzeptorstrukturen ein inhibitorisches Potential besitzen. Es sind einige Galactoside getestet worden, von denen allerdings nur Lactitol einen recht ausgeprägten inhibitorischen Effekt aufwies. Ein *in vitro* Inhibitionstest zeigte, dass sich in Anwesenheit von Lactitol die Anzahl der infizierten Zellen um ca. 25 % im Vergleich zu einem Kontrollmedium verringerten.⁴⁰ Es ist aber davon auszugehen, dass die Menge übertragener Neu5Ac-Moleküle immer noch ausreicht, um eine Infektion im Menschen auszulösen. Darüberhinaus ist zu berücksichtigen, dass diese *in vitro* Tests nicht mit den natürlichen Bedingungen vergleichbar sind. Im Menschen reichen schon wenige Parasiten, die durch die Ausscheidungen des Vektorinsekts auf die Haut gebracht werden, um eine Infektion auszulösen.

Zur Zeit ist der beste Schutz vor der Chagas Krankheit die Verhinderung der Infektion. Ein Ansatz ist dabei die Verbesserung der hygienischen Verhältnisse. So gibt es gemeinsame Anstrengungen zwischen der ESA und den „Ärzten ohne Grenzen“, die weitere Verbreitung

der Raubwanzen zu verhindern und ihren Bestand in betroffenen Gebieten zu dezimieren.²⁸ Außerdem gilt es, das für Transfusionen bereitstehende Blut, auf den Erreger zu testen und kontaminierte Proben aus dem Verkehr zu ziehen. Ist es bereits zu einer Infektion gekommen, gibt es mehrere Möglichkeiten zur chemotherapeutischen Medikation der Patienten. Allerdings handelt es sich bei diesen Pharmazeutika um recht aggressive Medikamente, deren Anwendung mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen einher geht und deren Wirksamkeit in chronischen Phase der Erkrankung noch diskutiert werden.⁴¹⁻⁴³ Es sind also weitere Anstrengungen nötig, um Pharmazeutika zur Therapie der Krankheit zu entwickeln. Ein Ansatz wäre durch einen geeigneten Inhibitor die Trans-Sialidase zu blockieren. Ähnlich wie bei der Therapie von Influenza würde ein entscheidender Mechanismus im Infektionsverlauf blockiert werden und somit eine wirksame Behandlung möglich.

1.3 Das Zentrale Nervensystem und MAG

Durch das Nervensystem werden Reize wahrgenommen, weitergeleitet und verarbeitet, die es dem Organismus ermöglichen, auf seine Umwelt zu reagieren und sich zu orientieren. Dabei bilden Gehirn und das Rückenmark das zentrale Nervensystem (ZNS), von dem ausgehend zahlreiche Nerven als peripheres Nervensystem (PNS) den Körper durchziehen. Die Nervenbahnen des PNS werden in sensorische und motorische Bahnen unterteilt. Steuern die beteiligten Nerven die Skelettmuskulatur, wird dieses als willkürlich somatisches Nervensystem bezeichnet, während die Kontrolle der inneren Organe vom unwillkürlichen vegetativen Nervensystem übernommen wird.⁴⁴ Wie alle Körperzellen bestehen die Nervenzellen (Neuronen) aus einem Zellkörper mit einem Zellkern. Allerdings können sie sich nicht mehr teilen, nachdem das Gehirn seine Wachstumsphase abgeschlossen hat. Des Weiteren verfügen sie über besondere Zellfortsätze und eine Zellmembran, die elektrische Signale erzeugt und mit Hilfe von Botenstoffen und Rezeptoren Signale empfangen kann. Unterschieden werden dabei Fortsätze, die Informationen von anderen Nervenzellen empfangen (Dendriten) von solchen, die Informationen weiterleiten (Neuriten oder Axons). Während ein Neuron über zahlreiche kurze und verästelte Dendriten verfügen kann, existiert nur jeweils ein Neurit, der allerdings an seinem Ende vielfach verzweigt sein kann und Synapsen mit anderen Neuronen oder Muskelzellen bildet.⁴⁵

Die Erregungsübertragung erfolgt diskontinuierlich mit Hilfe von Neurotransmittern, die durch den Erregungsimpuls aus den Enden des präsynaptischen Neurits freigesetzt, dann über

Vesikel transportiert werden und die Permeabilität der postsynaptischen Membran für Natrium-Ionen für kurze Zeit um den Faktor 500 erhöhen. Die Nervenzellen stehen miteinander lediglich über Synapsen in Kontakt, im übrigen werden sie voneinander wie auch von Blutgefäßen und Liquor räumlich und elektronisch isoliert. Im ZNS erfolgt dies durch Oligodendrocyten, während im PNS jeder Neurit schlauchartig von den Schwannschen Zellen umhüllt wird.⁴⁶

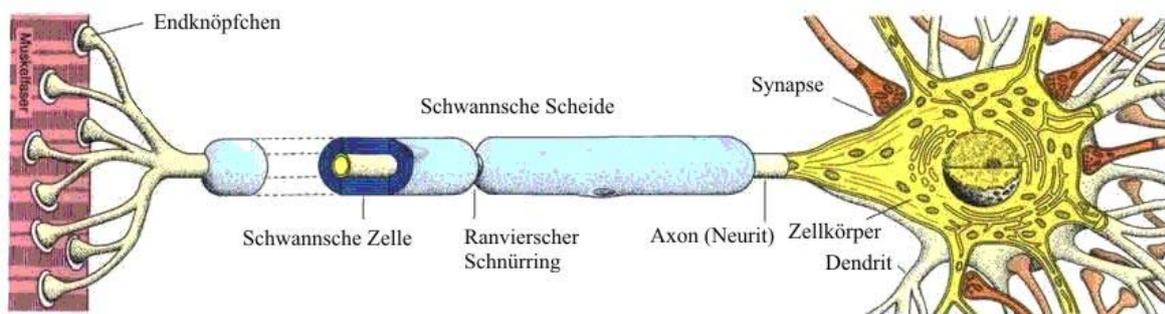


Abb. 5: Schematischer Aufbau einer Nervenzelle

Bei einigen Nervenfasern wickeln sich die Oligodendrocyten oder die Schwannschen Zellen zwiebelartig mehrfach um die Neuriten und bilden so eine schützende Myelinschicht. Markhaltige Nervenfasern haben eine dicke Myelinschicht, die eine schnelle Reizleitung ermöglicht, während marklose Nervenfasern über eine sehr dünne und somit langsame Leitungsgeschwindigkeit verfügen. Die sogenannte Schwannsche Scheide wird von Ranvierschen Schnürringen unterbrochen. Nur an diesen Stellen ist der Kontakt mit dem interzellulären Raum und die Stoffdiffusion durch Natrium-Kanäle möglich. Die Signale breiten sich saltatorisch von Schürring zu Schnürring aus und erreichen so durch den kleinen Querschnitt eine sehr hohe Geschwindigkeit.⁴⁷ Kommt es zum Verlust der Myelinschicht induziert dies eine hohe Geschwindigkeitsabnahme in der Reizleitung und damit einen dramatischen Einbruch der Funktion des Nervensystems, was bei den demyelinierenden Neuropathien wie der Multiplen Sklerose und dem Guillain-Barre-Syndrom der Fall ist.⁴⁸

Die Struktur und Anordnung der Myelinschicht ist determiniert durch Ganglioside (meist durch Galactosylcerebrosid), die zwar in allen Geweben der Säugetiere nachgewiesen werden können, aber im Nervengewebe mit 25 % der Glycoconjugate am stärksten konzentriert ist.⁴⁹ Ganglioside beeinflussen die Nervenzellen durch zwei Arten der Erkennung bzw. der

Regulation. Zum einen findet eine *cis*-Regulierung von Proteinen auf der selben Membran statt, zum anderen auch die *trans*-Erkennung von komplementären Lectinen auf benachbarten Zellen, wie dem Myelin-assoziierten Glycoprotein (MAG). Zu der Gruppe der sogenannten Siglecs (Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lectine) gehören unter anderem neben Sialoadhäsin (Makrophagen), CD22 (B-Zellen) und CD33 (Monocyten) ebenfalls das Myelin-assoziierte Glycoprotein. Dabei handelt es sich bei allen Siglecs um typische Typ I Transmembran-Proteine, deren N-Terminus extrazellulär aus einigen Immunglobulin-ähnlichen Domänen besteht, während der C-Terminus als zytoplasmatischer Schwanz wahrscheinlich an der Signaltransduktion beteiligt ist.⁵⁰ Alle Siglecs weisen eine Sequenzhomologie von ca. 30 % in der extrazellulären Region auf, wobei sich alle extrazellulären Domänen durch β -Faltblattstrukturen auszeichnen, die durch Cysteinmoleküle in Form von Disulfidbrücken stabilisiert sind. Gleichzeitig bewirken diese Disulfidbrücken eine Vergrößerung des Abstandes zwischen zwei Faldblättern, wobei diese wichtig für die Bindung der Neuraminsäure zu sein scheint.⁵¹ Seit der Entdeckung von MAG wurde diesem eine Schlüsselfunktion in der Bildung der Myelinschicht zugeordnet. Allerdings weisen MAG-Knockout-Mäuse mit einer Nullmutation für MAG zunächst die Bildung einer normalen Myelinschicht auf. Ein anderes Molekül (NCAM) übernimmt anscheinend die Funktion des MAG.⁵² *In vitro* bindet MAG vorzugsweise an Ganglioside, deren terminales Motiv aus einem Neu5Ac α 2-3Gal β -R-Oligosaccharid besteht, wie es unter anderem im GM3, GM1, GM1b aber auch SiaLe^X zu finden ist.⁵³ Allen gemein ist die terminale Position der Neuraminsäure, die im Erkennungsprozeß eine sehr wichtige Rolle zu spielen scheint. Es wird diskutiert, dass Veränderungen am Neu5Ac Gerüst einen ausgeprägten Einfluß auf die Bindungsstärke zwischen dem Rezeptor und dem Liganden zur Folge haben.^{54,55}

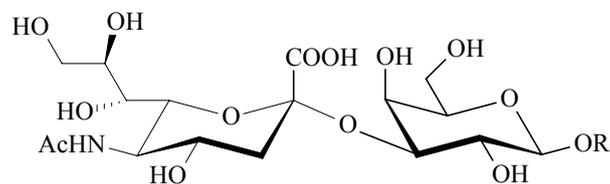


Abb.6: Das terminale Ligandenmotiv für MAG; dabei ist die Neu5Ac α 2-3Gal β -R Substruktur außerordentlich wichtig für den Erkennungsprozeß;

Auf das Wachstum von Neuriten hat MAG einen bifunktionalen Einfluß, indem es ihr Wachstum im neonatalen Stadium fördert, bei adulten Neuronen allerdings als signifikanter

Inhibitor wirkt.⁵⁶ Daraus resultierend können bei Erwachsene im Fall einer Verletzung des ZNS keine Reparaturen stattfinden, allerdings kommt es auch nicht zu ungewollten Verzweigungen der Nervenzellen. Kommt es zu einer Verletzung einer Nervenzelle im PNS, so kann es zur Waller'schen Degeneration kommen, bei der das Myelin kontrolliert abgebaut wird und die Schwannschen Zellen sich in einen nicht-myelinhaltigen Phänotyp umwandeln. Dadurch wird ein Wachstum der Nervenzelle ermöglicht und Verletzungen an dieser Stelle können verheilen.⁵⁷ Der Funktionswechsel von MAG während der Entwicklung der Nervenzelle geht einher mit einer Veränderung in der Zusammensetzung der Ganglioside. Während der Entwicklung einer Zelle ändert sich die Struktur der Ganglioside. Durch Antikörper-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass höhere Ganglioside die endogenen Liganden von MAG darstellen und somit für dessen Wirkung verantwortlich sind.^{58,59} Außerdem kommt es noch zu zusätzlichen Interaktionen. Zum einen wechselwirkt MAG mit dem p75 Neurotrophin Rezeptor ($p75^{NTR}$), wobei es zu einer *cis*-Interaktion des Gangliosid G_{T1b} und $p75^{NTR}$ kommt, wodurch MAG indirekt auch an dem Neurotrophin Rezeptor bindet. Zum anderen bindet MAG Gangliosid-unabhängig an den NOGO-Rezeptor (NgR).⁶⁰⁻⁶²

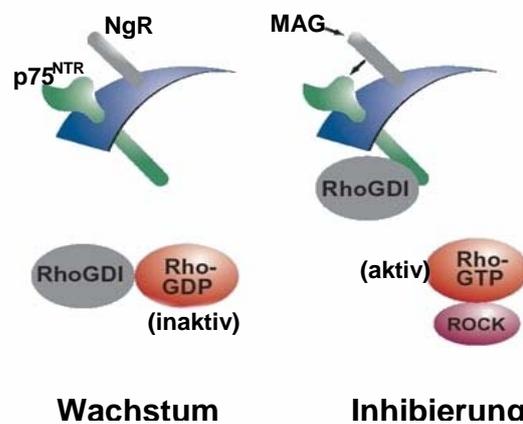


Abb. 7: Mechanismus der Inhibition und des Nervenwachstums

Somit ergibt sich für die Inhibition des Neuronenwachstums ein komplexes Zusammenspiel von vier unterschiedlichen Bindungspartnern. Durch die Bindung von MAG an $p75^{NTR}$ und G_{T1b} entsteht durch diese Vernetzung in der Membran eine funktionale Vernetzung aus G_{T1b} , $p75^{NTR}$ und NgR. Durch extrazelluläre *cis*- Wechselwirkung kann $p75^{NTR}$ von NgR aktiviert

werden und bindet in dieser Form an Rho-GDI (Rho-Guanin-Dissoziation-Inhibitor). Das so freie Rho, ein kleines GDP/GTP-bindendes Protein, wird aktiviert, bindet als Rho-GTP an das Signalprotein Rho-Kinase (Rock) und inhibiert so das Wachstum bzw. die Regeneration der Nervenzellen. Ist MAG nicht anwesend bindet Rho-GDI an Rho und verhindert so die Bildung von aktiviertem Rho-GTP, womit das Wachstum der Nervenzelle nicht beeinträchtigt ist.⁶³

Trotz einer Vielzahl von Untersuchungen und aufgrund der aufgezeigten Komplexität der biologischen Erkennungsprozesse, ist der Mechanismus nur ein Vorschlag und besonders die Funktion des MAG wird durchaus kontrovers diskutiert.

2. Zielsetzung

Mit der zunehmenden Erkenntnis, dass sialylierte Oligosaccharide viele Prozesse des Lebens maßgeblich beeinflussen und zum großen Teil sogar steuern, nahm die Suche nach effizienten Synthesestrategien für solche Glycoconjugate zu. Von besonderem Interesse ist die chemoenzymatische Synthese komplexer Oligosaccharide, bei der in den ersten Syntheseschritten ein Neuraminsäurederivat chemisch aktiviert wird, so dass es durch eine enzymatische Transglycosylierungsreaktion auf ein Akzeptorsaccharid übertragen werden kann. Die etablierten Enzyme für diese Reaktionen sind Sialyltransferasen und Sialidasen. In Abhängigkeit von der Quelle des jeweiligen Enzyms lassen sich auf diese Weise α 2-3- oder α 2-6- verknüpfte sialylierte Oligosaccharide synthetisieren. Sowohl die Verwendung einer Sialidase als auch einer Sialyltransferase gehen einher mit einer Vielzahl an Nachteilen, wie mäßige Gesamtausbeuten, die Bildung von Regioisomeren oder sehr komplexe Reaktionsführungen. Daher ist die Suche nach effizienten Glycosylierungsmöglichkeiten als Alternativen zu den bekannten Methoden ein hoch aktuelles Thema im Rahmen der Kohlenhydratchemie. Eine Möglichkeit hierfür bietet die Trans-Sialidase, die trotz großer struktureller Ähnlichkeit zu den Sialidasen einen ausgeprägten Transferase Charakter besitzt.

Trans-Sialidase wird auf der Oberfläche des *Trypanosoma cruzi* exprimiert und überträgt Neu5Ac von einer Wirtszelle auf Glycane des Pathogen und maskiert so dessen Zellepitop. Es findet dabei ein Transfer der Neu5Ac auf galactosidische Reste statt, wobei ausschließlich eine α 2-3-Bindung geknüpft wird. In der chemischen Synthese zeigt sich, dass die Trans-

Sialidase die jeweiligen Vorteile der Sialidasen und der Sialyltransferasen kombiniert. Sie gehört zu der Superfamilie der Sialidasen und akzeptiert somit die gleichen Donorsubstrate. Trans-Sialidase erkennt darstellbare phenolisch Sialoside wie das *p*NP-Neu5Ac als Donorsubstrate. Gleichzeitig findet in der Anwesenheit eines geeigneten Akzeptors ein reiner Glycosyltransfer statt, während eine Hydrolyse des Donorsubstrats nicht zu beobachten ist. In dieser Arbeit sollte die Trans-Sialidase als effizienter Biokatalysator für die Synthese einer Vielzahl von verschiedenen Oligosacchariden etabliert werden. Der Transfer soll mit möglichst hohen Ausbeuten auf verschiedenen Akzeptorsubstrate erfolgen, um zu klären, in wie weit eine Variation dort möglich ist und was für Glycoconjugate darstellbar sind. Besonders die Sialylierung von Disacchariden ist von Interesse, da es sich hierbei um biologisch äußerst aktive Verbindungen handelt.

Neben den Untersuchungen der Akzeptorsubstrate, können auch Modifikationen am Donorsubstrat zu Erkenntnissen hinsichtlich der Enzymspezifität führen. Neben Variationen an den phenolischen Abgangsgruppen, sollte auch das Kohlenhydratgrundgerüst modifiziert werden.

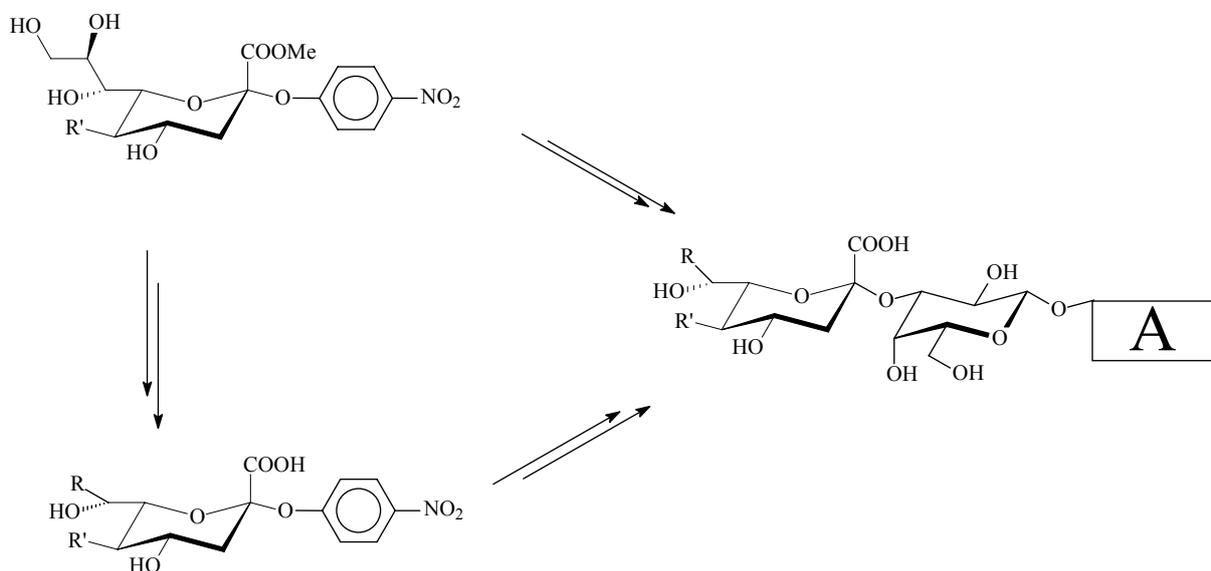


Abb. 8: Schematisch Darstellung der Synthesestrategie

Die enzymatische Umsetzung zu verschiedenen Oligosacchariden ist nicht nur interessant, um die Toleranz des entsprechenden Enzyms zu untersuchen, sondern könnten auch Aussagen über mechanistische Aspekte ermöglichen. Durch gezielte Manipulationen am Donorsubstrat

kann der Einfluß dieser Veränderung auf die Übertragungsrate bestimmt werden. So können auch kinetische Untersuchungen von schnell ablaufenden Reaktionen mittels der modernen Spektroskopie wie der NMR-Spektroskopie untersucht werden.

Des Weiteren helfen modifizierte sialylierte Oligosaccharide, wie sie schematisch in Abb. 8 dargestellt sind, auch das Verständnis von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen in biologischen Systemen zu vertiefen. So sollen die Adhäsion der neuartigen, nicht natürlich vorkommenden Strukturen im Vergleich zu den natürlichen sialylierten Oligosacchariden an Sialinsäure-bindende Lektine untersucht werden. Dies soll mit Hilfe einer speziellen Meßmethode der NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, in dem STD-Untersuchungen durchgeführt werden. Durch diese Messungen können die jeweilige K_D -Werte und Epitope ermittelt werden. Auch enzymatische Reaktionen lassen sich so untersuchen.

3. Synthese von sialylierten Oligosacchariden

Mit zunehmender Kenntnis der herausragenden biologischen Aufgaben der Neuraminsäuren rückte nicht nur deren Synthese, sondern auch die Synthese von Neu5Ac-Glycosiden bis hin zu komplexen Oligosacchariden in den Focus der Kohlenhydratchemie. Zwar ist es möglich die verschiedensten Sialyl-Glycoconjugate aus unterschiedlichsten natürlichen Quellen zu isolieren, allerdings sind die entsprechenden Methoden zur Reinigung ziemlich aufwendig. Hinzu kommt, dass die Menge an isoliertem Material recht klein und es häufig schwierig ist, eine exakte Charakterisierung dieser Verbindungen vorzunehmen. Eine sinnvolle Alternative stellt die *in vitro* Synthese von sialylierten Oligosacchariden dar. Dabei bieten sich neben der rein chemischen Synthese auch die Verwendung von Enzymen an, die entsprechende Donorsubstrate auf Akzeptorstrukturen übertragen.⁶⁴

3.1 Chemische Methoden zur Glycosylierung von Neu5Ac

Während der letzten Jahrzehnte hat es eine enorme Zunahme an unterschiedlichsten Glycosylierungsreaktionen gegeben. Die meisten dieser Methoden sind auch auf die Glycosylierung von Neu5Ac anwendbar. Dabei erfolgt in einem ersten Schritt die Blockierung der Hydroxylfunktionen, die nicht an den weiteren Reaktionen teilnehmen sollen. Die Wahl der Schutzgruppen ist davon abhängig, ob das geschützte Molekül als Glycosyldonor oder Akzeptor eingesetzt werden soll und ist Teil einer sinnvollen Synthesepaltung. Bei der Glycosylierung von Neu5Ac werden häufig Esterfunktionen zur Blockierung der Hydroxylgruppen eingesetzt (s. Abb. 9) Die Aktivierung am anomeren C-Atom kann durch unterschiedlichste Substituenten erfolgen. Eine Möglichkeit bieten Halogenid-Substituenten wie Cl und Br, die sich durch Promotoren wie Ag_2CO_3 oder durch $\text{Hg}(\text{CN})_2/\text{HgBr}_2$ zu entsprechenden Oligosacchariden umsetzen lassen.^{65,66} Ein großer Nachteil dieser Methoden liegt in der mangelnden Stereoselektivität. Aufgrund der unsubstituierten Methylengruppe an Position 3 der Neu5Ac kann die Stereoselektivität der Glycosylierung nicht durch den Nachbargruppen-Effekt beeinflusst werden. Da der anomere Effekt keine ausreichende stereoselektive Kontrolle ermöglicht, sind die Glycoside immer Anomerengemische mit unterschiedlicher Zusammensetzung.

Eine Möglichkeit die thermodynamische Kontrolle des anomeren Effektes auszunutzen und eine Art Nachbargruppen-Effekt zu induzieren, bietet die Blockierung der Carboxylfunktion als 2-Thioethylester, während das C-2 durch eine Thiomethyl-Gruppe gleichzeitig aktiviert

wird. Das intermediär entstehende Oxocarbenium-Ion wird durch die Bildung eines Sulfonium-Intermediates stabilisiert, wobei sich das β -Anomer ausbildet. Der nucleophile Angriff des Glycosylakzeptors kann dann nur aus axialer Richtung erfolgen. (s. Abb. 9)

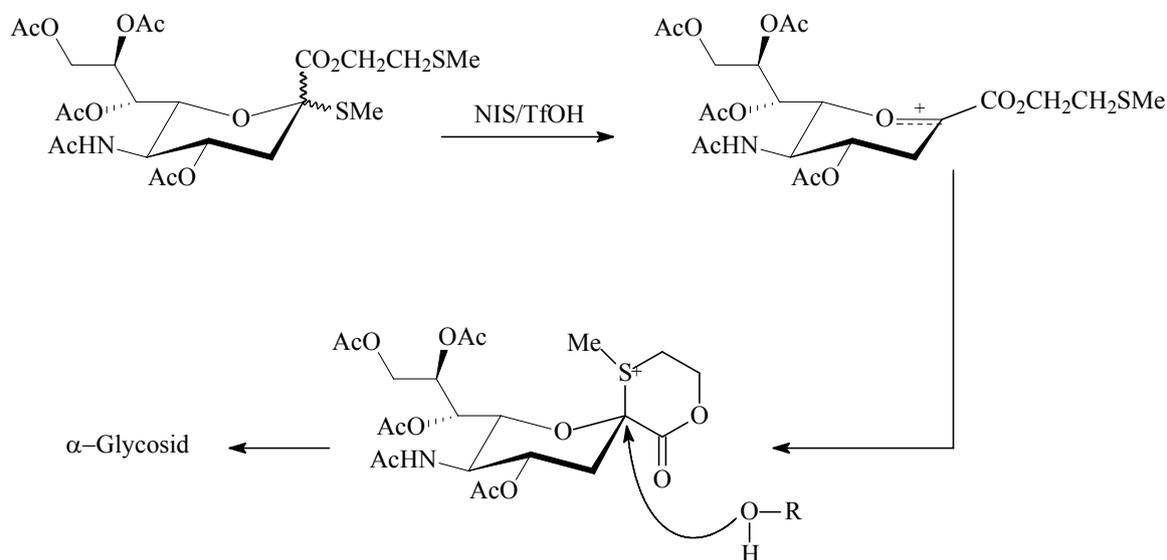


Abb. 9: Postulierter Mechanismus der Glycosylierung von Neu5Ac mittels 2-Thioethylesters⁶⁷

Trotz einer guten Stereoselektivität hat diese Reaktion moderate Ausbeuten von maximal 50 %. Dies hängt wahrscheinlich mit dem erhöhten sterischen Anspruch des cyclischen Sulfonium-Ions zusammen. Die Glycosylierung erfolgt zwar nicht 100 % anomerenrein, ist aber dennoch für die Synthese eines Sialyl-Taxol-Glycoconjugates benutzt worden.⁶⁷ Auch andere C-1-Auxiliare zur stereogenen Kontrolle bei Glycosylierungen ermöglichen nicht die Synthese reiner α -Anomere, sondern liefern immer ein Gemisch aus den beiden Anomeren. So ergibt die Blockierung der Säurefunktion als N,N-Dimethylglycolamidester in Glycosylierungen nur Gemische, die in einem Verhältnis 5:1 (α : β) vorliegen.⁶⁸ Ein weiteres Problem bei den direkten Glycosylierungen stellen Konkurrenzreaktionen dar. Es muß bei allen Reaktionen unter wasserfreien Bedingungen gearbeitet werden, da es sonst zur Hydrolyse am anomeren Zentrum kommt. Bei nicht ausreichender Nucleophilie des Akzeptors oder aufgrund anderer Einflüsse während der Glycosylierung, kann es zu einer H-Heteroatom-Eliminierung zwischen dem C-2 und C-3 kommen. Das entstehende Glycol ist folglich als häufiges Nebenprodukt bei diesen Reaktionen zu beobachten.

Im weiteren sind Versuche unternommen worden, ausgehend vom Glycol der Neu5Ac, eine dirigierende Nachbargruppe an Position 3 einzufügen, die nach einer erfolgten Glycosylierung wieder entfernt werden kann. Ein Substituent wird dort in äquatorialer Position eingeführt, der dann durch einen Nachbargruppen-Effekt das intermediäre Oxocarbeniumion stabilisiert und so den nucleophilen Angriff des Akzeptors aus äquatorialer Richtung erfolgen läßt. Dies kann durch ein selektiv geöffnetes Epoxid oder mittels einem Thiophenyl-Substituenten erfolgen.^{69,70}

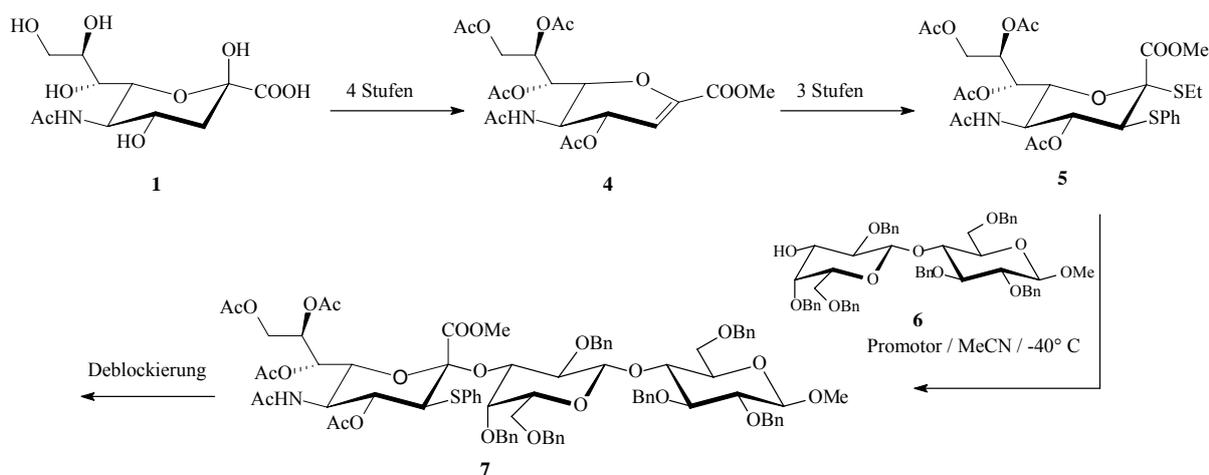


Abb. 10: Beispiel einer Glycosylierung, mittels temporär eingeführter Nachbargruppe

An Hand der in Abb. 10 dargestellten Glycosylierung ist zu erkennen, wie aufwendig die gesamte Synthese ist. Ausgehend von der freien Neu5Ac sind sieben Syntheseschritte, bis zum aktivierten Donormolekül nötig. Auch wenn die Donorsynthese in sehr guten Ausbeuten von ca. 85 % gelingt, so zeigt sich jedoch auch hier, dass die Glycosylierung mit 30 – 40 % in guten Ausbeute aber mit nur mäßiger Stereoselektivität gelingt ($\alpha/\beta = 9/1$).⁷¹

Die Synthese eines geeigneten Glycosylakzeptors bedarf neben der gewünschten Derivatisierung einer genau bedachten Wahl der Schutzgruppen. Zum einen muß die reagierende OH-Funktion deblockiert sein und zum anderen müssen die Schutzgruppen so gewählt werden, dass die Elektronendichte und somit die Nucleophilie möglichst hoch ist. Diese Voraussetzung erfüllen benzyliche Schutzgruppen, die allerdings nur durch eine Hydrierung wieder entfernt werden können. Diese Reaktion kann sehr aufwendig sein und verläuft bei komplexen Oligosacchariden oftmals nicht quantitativ. Es ist also auch bei der

Akzeptormodifizierung mit einem großen Aufwand und mit einer Vielzahl von Problemstellungen zu rechnen.

3.2 Enzymatische Synthesen von Sialyl-Oligosacchariden

Aufgrund der erheblichen Probleme bei der rein chemischen Synthese von sialylierten Oligosacchariden sind in den letzten Jahren in zunehmendem Maße Enzyme zur Synthese hoch komplexer Oligosaccharid-Strukturen verwendet worden. Enzyme katalysieren substratspezifisch chemische Reaktionen in biologischen Organismen und können auch *in vitro* zur regio- und stereospezifischen Synthese von Sialyl-Oligosacchariden benutzt werden. Dabei führen sowohl Sialyl-Transferasen als auch Sialidasen zu entsprechenden $\alpha(2-3)$ und $\alpha(2-6)$ verknüpften Neu5Ac-Glycosiden.

3.2.1 Synthese mittels Sialyltransferasen

Im allgemeinen sind Glycosyltransferasen essentiell für den biosynthetischen Aufbau von Oligosacchariden verantwortlich. Sie lassen sich in Leloir und Non-Leloir Transferasen einteilen, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden. Die Transferasen des Leloir-Weges sind *in vivo* für die Synthese der meisten Glycoconjugate verantwortlich und verwenden hierbei Monosaccharide, die als Glycosylester von Nucleosidmono- oder Nucleosidiphosphaten aktiviert sind.⁷² Enzyme des Non-Leloir-Weges erkennen entsprechende Zucker-Phosphate als Substrate. Von ihnen sind weitaus weniger bekannt und sie finden vergleichsweise selten Anwendung in der organischen Synthese. Sie sind aber durchaus für die organische Synthese geeignet.⁷³⁻⁷⁵

Sialyltransferasen folgen dem Leloir-Weg und übertragen je nach Quelle des Enzyms Neu5Ac von einem aktiviertem Donor (CMP-Neu5Ac) auf Hydroxylfunktion an C-3 oder C-6 eines terminalen Galactosides. CMP-Neu5Ac ist das einzige natürlich vorkommende β -Anomer der Neu5Ac (s. Abb. 11). Die Glycosylierung erfolgt unter Inversion der Konfiguration, so dass entweder eine $\alpha 2-3$ - oder eine $\alpha 2-6$ -Bindung geknüpft wird.⁷⁶⁻⁷⁸ $\alpha 2-6$ -Sialyltransferasen können aus Schweineleber, aus Rindercolostrum oder dem *Photobacterium damsela* isoliert werden, $\alpha 2-3$ -Sialyltransferasen werden hingegen aus Schweineleber bzw. den Achseldrüsen gewonnen.^{79,80}

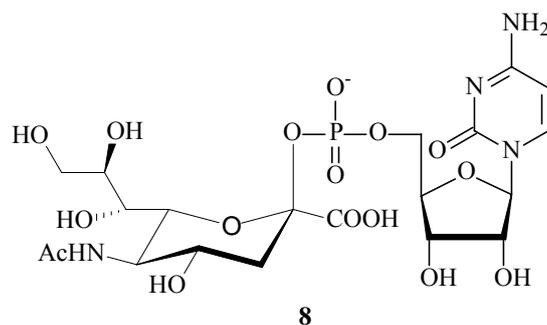


Abb. 11: CMP-Neu5Ac (**8**), Neu5Ac-cytidinmonophosphat

Schon vor einigen Jahren gelang es, die isolierten Enzyme zu klonen und zu exprimieren, so dass sie in ausreichender Menge verfügbar sind.⁸¹ Sialyltransferasen akzeptieren einige Variationen an subterminalen Kohlenhydrateinheiten des Akzeptorsubstrates, so dass eine große Anzahl an sialylierten Oligosacchariden auf diese Weise regio- und stereoselektiv in sehr guten Ausbeuten (> 75 %) dargestellt werden können.

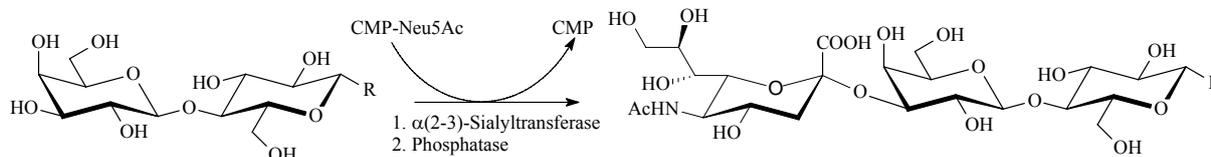


Abb. 12: Glycosylierung eines Lactosides durch eine α 2-3-Sialyltransferase, R ist variabel und nicht zwingend ein O-Glycosid

Die Anwendung von Sialyltransferasen stellt sich teilweise als sehr aufwendig dar. Zum einen ist die Verfügbarkeit von CMP-Neu5Ac sehr beschränkt, da die Synthese sehr aufwendig ist und in schlechten Ausbeuten verläuft.⁸² Auf der anderen Seite inhibiert freies CMP die Sialyltransferasen. Sie sind Feedback-Inhibitoren, die *in vivo* die Synthese der sialylierten Oligosaccharide steuern. Um die maximale Ausbeute bei der *in vitro* Synthese zu gewährleisten, muß CMP durch eine Phosphatase dephosphoryliert werden. Durch die Abspaltung der Phosphatgruppe verliert CMP den inhibitorischen Charakter und die Ausbeute der Synthese kann die literaturbekannten Ergebnisse erreichen.⁶⁴

3.2.2 Sialidasen in der Synthese von Sialyl-Oligosacchariden

Sialidasen sind Glycohydrolasen, die die Abspaltung von terminal und α -glycosidisch gebundener Neu5Ac katalysieren. Sie können auch in der Rückreaktion zur Transglycosylierung von Neuraminsäure eingesetzt werden. Dabei zeigten erste Versuche, dass dieses mit einem immobilisierten Enzym gelingt, wenn *p*NP-Neu5Ac als Donorsubstrat eingesetzt wird. Die Übertragung von Neu5Ac auf verschiedene Galactoside gelang mit Hilfe von Sialidase aus *Vibrio cholerae* in bis zu 20 % Ausbeute (s. Abb. 13).⁸³

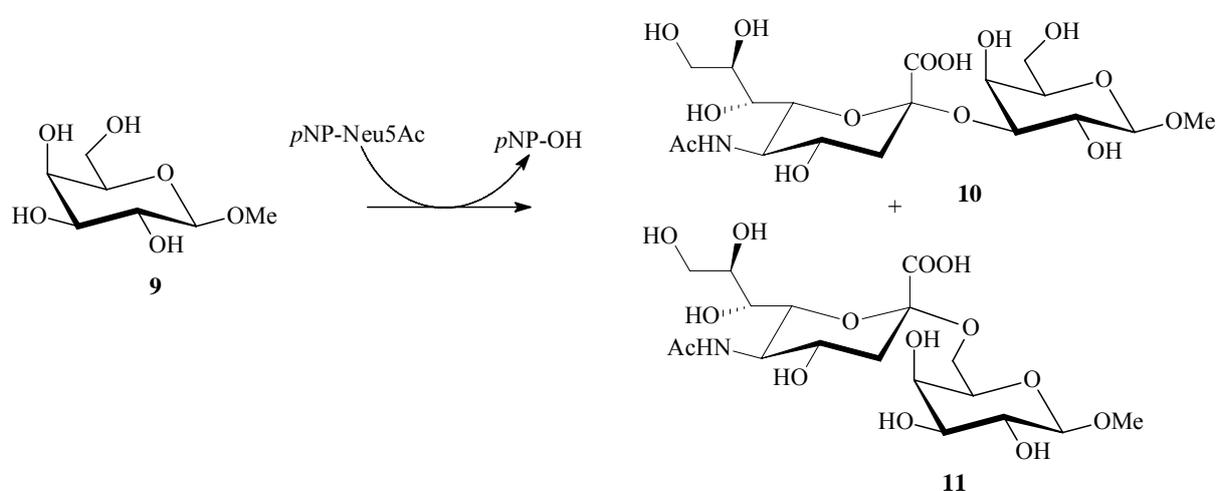


Abb. 13: Transglycosylierung von Neu5Ac unter der Katalyse von Sialidase aus *Vibrio cholerae* bei pH 5.5 in 20 % Ausbeute

Je nach biologischer Herkunft des verwendeten Enzyms, zeigt sich eine unterschiedliche Regioselektivität. Sialidasen von *Colistridium perfringens*, *Athrobacter ureafaciens* und *Vibrio cholerae* führen zu α 2-6-verknüpften Oligosacchariden, während die Transglycosylierung mit Sialidase aus dem Newcastle Disease Virus und von *Salmonella typhimurium* α 2-3-verknüpfte Oligosaccharide ergibt.^{84,85} Sialidasen ermöglichen nicht nur den Zugang zu relativ einfachen sialylierten Oligosacchariden, sondern zeigten sich auch in der Synthese von hochkomplexen Glycoconjugaten wie Sialyl-Lewis^x und Sialyl-Lewis^a als geeignete Biokatalysatoren.⁸⁶ Ausgehend von MU-Neu5Ac (s. Abb. 14) konnte an Sialidase aus *Salmonella typhimurium* exemplarisch gezeigt werden, dass die Reaktion unter vollständiger Retention der Konfiguration verläuft.⁸⁷ In Abhängigkeit von der benutzten Enzymquelle gelang die Synthese von diversen sialylierten Oligosacchariden in unterschiedlichsten Regioselektivitäten bis hin zum T- und Sialyl-Tn-Antigen bzw.

sialylierten Buildingblocks, die für weitere Umsetzungen verwendet werden können in guten Ausbeuten von ca. 20 %.⁸⁸

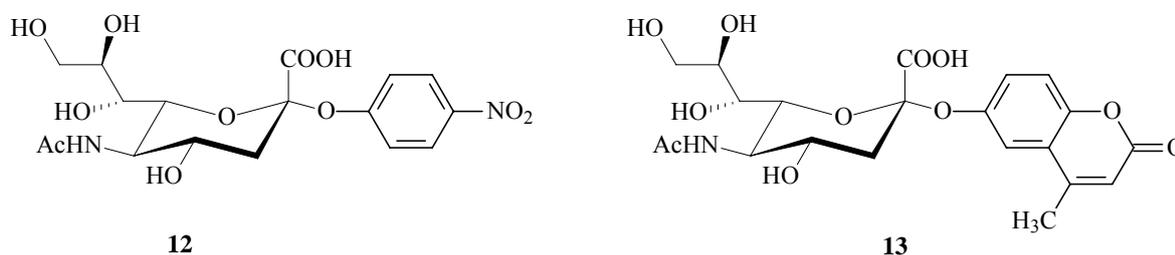


Abb. 14: Donorsubstrate für die Transglycosylierung mit Sialidasen: *p*NP-Neu5Ac (**12**) und MU-Neu5Ac (**13**)

Die Akzeptanz der Sialidasen gegenüber einer großen Anzahl Donorsubstraten ist der große Vorteil dieser Enzyme im Vergleich zu den Sialyl-Transferasen. Sowohl *p*NP-Neu5Ac (**12**) als auch MU-Neu5Ac (**13**) sind relativ einfach chemisch zugänglich und lassen sich in guten Ausbeuten isolieren. Eine Steigerung der Ausbeute ist nicht ohne weiteres möglich, da die Produktglycoside ebenfalls Substrate für die Hydrolasen sind. Um die Hydrolyse zur freien Neu5Ac zu minimieren, muß für jedes Enzym ein Produktbildungsmaximum bestimmt werden. Ein weiterer Nachteil der Anwendung von Sialidasen besteht darin, dass der Akzeptor in 5-10-fachem Überschuß eingesetzt werden muß, da sich sonst nur die Hydrolyse der Donorsubstrate vollzieht. Dies spielt gerade bei schwer zugänglichen oder relativ unpolaren Akzeptorstrukturen eine wichtige Rolle. Durch den sehr großen Überschuß an Akzeptor und durch die Hydrolyse des Donors wird die chromatographische Reinigung des Produktes erschwert, so dass diese zu Lasten der Ausbeute mehrfach wiederholt werden muß.

3.3 Darstellung sialylierter Oligosaccharide mit Trans-Sialidase aus *Trypanosoma-cruzi*

Da die Trans-Sialidase zu der Superfamilie der Sialidasen gehört und denen strukturell sehr ähnlich ist, erkennt sie neben dem natürlichen Donor (Sialyl-3'-lactose) auch *p*NP-Neu5Ac bzw. MU-Neu5Ac als Donorsubstrate.³⁵ Die Nachteile der Verwendung von Sialyllactose sind zum einen die sehr schlechte Verfügbarkeit dieser Substanz und zum anderen die Tatsache, dass die freie Lactose ebenfalls ausgeprägte Akzeptoreigenschaften besitzt.

3.3.1 Synthese der Neu5Ac-Donorsubstrate

Bevor Neu5Ac zu einem entsprechenden Donorsubstrat für die enzymatische Transglycosylierung modifiziert werden kann, müssen Schutzgruppen eingeführt und das anomere Zentrum durch ein Halogenid aktiviert werden. Die Darstellung der Phenylglycoside erfolgt anschließend unter Phasentransferkatalyse (s. Abb. 15) und darauffolgende Deblockierung.

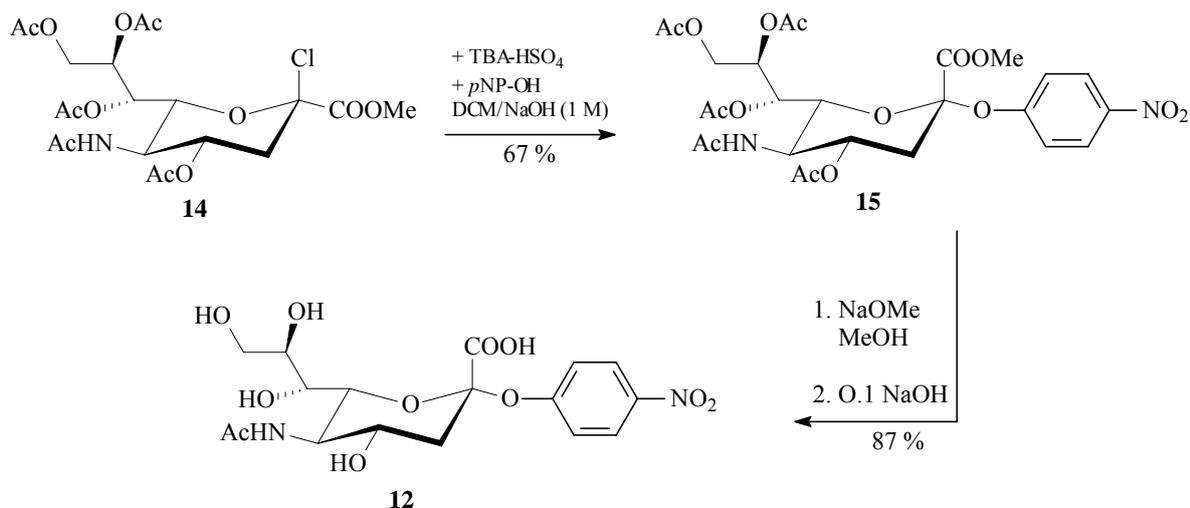


Abb. 15: Darstellung von *p*NP-Neu5Ac mittels Phasentransferkatalyse

Dabei wird durch einen Phasentransferkatalysator (TBA-HSO₄) der Kontakt zwischen der basischen Phase, in der das Phenolat anion gelöst ist, und der organischen Phase mit der lipophilen Verbindung **14** ermöglicht. Diese Reaktion liefert mit sehr guten Ausbeuten das α -Glycosid **15** unter Inversion der Konfiguration am anomeren C-Atom, was auf einen S_N2-artigen Mechanismus der Glycosylierung schließen lässt.⁸⁹ Ähnliche Resultate lassen sich erreichen, wenn man die entsprechenden Phenolate unter Silbersalz-Aktivierung in Acetonitril umsetzt.^{90,91} Das erhaltene Glycosid **15** wird nach Zemplén deacetyliert und der Methylester der Säurefunktion durch wäßrige NaOH Lösung hydrolysiert.⁹²

Methylumbelliferon läßt sich ausgehend vom aktivierten Sialylchlorid **14** ebenfalls unter den Bedingungen der Phasentransferkatalyse zu dem entsprechenden phenolischen Glycosid **13** umsetzen.

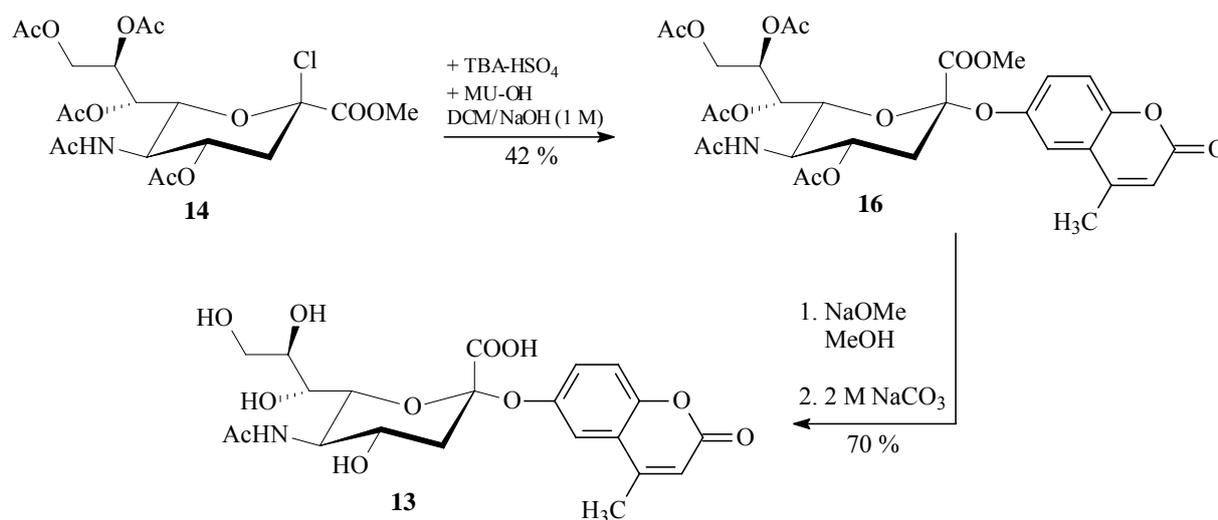


Abb. 16: Darstellung von MU-Neu5Ac mittels Phasentransferkatalyse

Wie in (Abb. 16) zu sehen ist, verringert sich die Ausbeute der Reaktion zum Glycosid **16** signifikant im Vergleich zur Darstellung von **15**. Dies kann mit der geringeren Nucleophilie des entsprechenden Phenolations begründet werden. Durch die geringere Reaktivität ist eine Zunahme an Nebenreaktionen, wie die zur Hydrolyse des aktivierten Moleküls **14** oder die Eliminierung zum Glycol der Neu5Ac zu erwarten. Während ersteres Nebenprodukt ohne Probleme zu entfernen ist, zeigt das Glycol doch ähnliche chromatographische Eigenschaften und ist daher schwieriger abzutrennen. Nach dem Glycosylierungsschritt kann die Deacetylierung der Verbindung **16** nach Zemplén durchgeführt werden. Die abschließende Verseifung des Methylesters muß unter recht milden Bedingungen erfolgen, um eine Zersetzung des Moleküls zu vermeiden. Unter Anwendung von NaOH wird auch das labile Glycosid gespalten und die freie Neu5Ac erhalten. Bei der Synthese des MU-Glycosides stellt die Verwendung von Silbersalzen als Aktivator eine durchaus sinnvolle Alternative dar.^{90,91} Allerdings kann es hier sehr schnell zur Bildung eines Anomerengemisches kommen. Aufgrund der beschriebenen Probleme in der Synthese und weil die Anwendung von MU-Neu5Ac in der enzymkatalysierten Trans-glycosylierung keine signifikanten Vorteile brachte, wurde im Rahmen dieser Arbeit weitgehend auf MU-Neu5Ac verzichtet und stattdessen *p*NP-Neu5Ac verwendet.

3.3.2 Transglycosylierungen durch Trans-Sialidase

Um das Enzym effizient einsetzen zu können, muß es in größeren Mengen und hoher Qualität verfügbar sein. Daher wird die Trans-Sialidase aus *T. cruzi* auf verschiedenen Wegen gewonnen. Das Enzym kann aus dem Erreger direkt isoliert werden.⁹³ Dies ist für präparative Synthesen wenig sinnvoll, was zur Entwicklung mikrobiologischer Methoden führte. Neben der rekombinanten Expression aus relativ leicht verfügbarer Hefe gelang es auch Trans-Sialidase aus Insektenzellen zu exprimieren, die mit dem Baculovirus infiziert wurden.^{94,95} Die in dieser Arbeit verwendete Trans-Sialidase ist rekombinant in *E. coli* exprimiert worden, wobei der Klon und die Vorschrift zur Expression von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Frasch erhalten wurde und die Expression durch Dr. Patrick Ziegelmüller im Institut für Biochemie durchgeführt wurde.^{96,97}

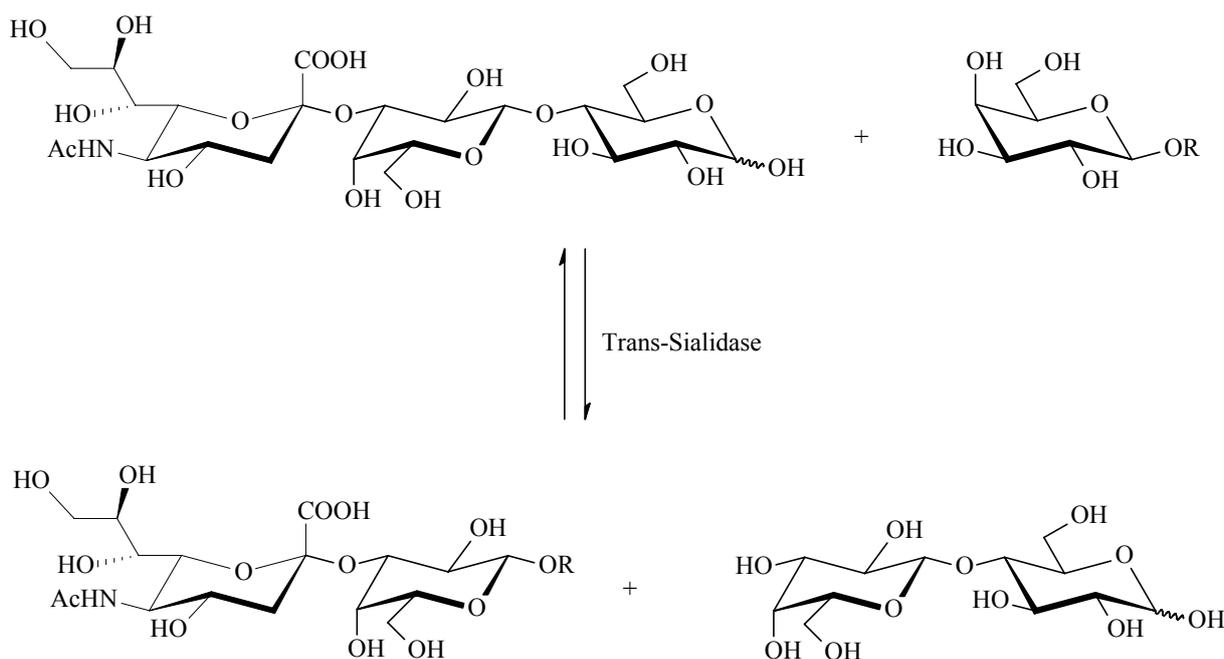


Abb. 17: Das Reaktionsgleichgewicht bei der Synthese von Sialyl-Oligosacchariden unter Verwendung von Sialyl-3'-Lactose als Donorsubstrat

Erste biochemische Versuche zeigten, dass Trans-Sialidase aus *T. cruzi* ein geeignetes Enzym zur Synthese von α 2-3-Sialyl-Oligosacchariden darstellt.^{35,98,99} Schon frühzeitig gelang es Paulson *et al.*⁹⁴ eine Transglycosylierungsmethode zu etablieren, bei der mit Hilfe einer Sialyltransferase, ausgehend von CMP-Neu5Ac, Sialyl-3'-lactose synthetisiert wird. Durch

Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* wird anschließend Neu5Ac auf ein Propylgalactosid durch Transglycosylierung übertragen (s. Abb. 17). Das korrespondierende sialylierte Disaccharid konnte in guten Ausbeuten isoliert werden.¹⁰⁰ Um das Gleichgewicht zwischen dem Donorsubstrat (Sial-3'-Lac) und dem Produkt (s. Abb. 17) möglichst weit auf die Produktseite zu verschieben, sind ebenfalls Versuche unternommen worden, in denen mit Hilfe einer β -Galactosidase die freiwerdende Lactose hydrolysiert wird. Allerdings ist dieses Multienzymsystem nicht auf jedes Akzeptor-Disaccharid übertragbar, da Galactosidasen auch entsprechende Akzeptorsaccharide hydrolytisch spalten. Bei der Synthese von Neu5Ac α 2-3-Gal β 1-3-GlcNAc erhöht sich die Ausbeute unter Anwendung von β -Galactosidase aus *E. coli*, während sie bei dem Versuch der Sialylierung des Gal β 1-6-GlcNAc Akzeptorderivates gegen Null geht und kaum noch Produktbildung nachzuweisen ist.¹⁰¹

Die phenolischen Glycosidsubstrate **12** und **13** sind aus kinetischen Sicht im Vergleich zur Sialyllactose keine guten Donorsubstrate. Allerdings unterliegen die Transglycosylierungen ausgehend von **12** und **13** keinem vergleichbaren Gleichgewicht, da die Phenolationen keinerlei Akzeptoraktivität besitzen. Daher sind sie sehr gut für die Synthese geeignet und ermöglichen einen bequemen Zugang zu den unterschiedlichsten Oligosacchariden.

Die Aktivität von Trans-Sialidase läßt sich am effektivsten durch radioaktiv gelabelte Lactose bestimmen. Aus Gründen der Durchführbarkeit wurde auf die Szintillationsmessung der Sialylierung von ¹⁴C-markierter Lactose verzichtet und stattdessen immer die gleiche Menge (100 μ g) an Trans-Sialidase verwendet, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Im Allgemeinen wird die Aktivität von Hydrolasen UV-spektroskopisch bestimmt, wobei die zeitabhängigen Konzentration der freien phenolischen Abgangsgruppe gemessen wird. Im Gegensatz zur Trans-Sialidase findet bei Sialidasen die Hydrolyse mit maximaler Aktivität statt. In ersten enzymatischen Versuchen gelang die Darstellung sialylierter Oligosaccharide in respektablen Ausbeuten. Dabei erfolgte die Inkubation bei relativ geringer Donorkonzentration (ca. 20 μ mol) und einem leichten Überschuß von ca. 1.1 Äquivalenten des Akzeptors bei einem pH-Wert von 6.9 (Cacodylat/HCl-Puffer) und einer Temperatur von 37° C.¹⁰² Es konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität sowohl erheblichen von der Natur der Akzeptorsubstrate, als auch vom pH-Wert und der Inkubationstemperatur abhängt.^{102,103} Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, dass leichte Modifikationen der Inkubationsbedingungen zu einer höheren Aktivität und größerem Umsatz führen können.

3.3.3 Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie

Seit der Einführung der hochauflösender NMR-Spektroskopie hat sich dieses Verfahren als die Standardmethode zur Aufklärung der Primärstruktur von komplexen Glycokonjugaten bewährt. Insbesondere die Möglichkeit, ^1H - als auch ^{13}C -NMR-Spektren von unblockierten Verbindungen in wäßrigen Lösungen zu messen, erlaubt ein hohes Maß an Flexibilität bei der Analyse enzymatisch synthetisierter Strukturen. Am einfachsten und schnellsten ist dabei die Analyse von sogenannten „Structural Reporter Groups“, d. h. Signalen, die für Oligosaccharide besonders charakteristisch sind. Hierzu gehören die anomeren Protonen der Akzeptorstrukturen genauso wie die Protonen am C-3 der Neu5Ac, die besondere chemische Verschiebungen zeigen. Die anomeren Protonen bilden im Bereich von 4.5-5.5 ppm je nach Glycosylierungsmuster ein Dublett, dessen Kopplungskonstante Aussagen über die Struktur der Monosaccharideinheiten zuläßt. Da das anomere Zentrum der Neuraminsäure ein quartäres C-Atom darstellt, können so keine direkten Aussagen aus dem Protonenspektrum gemacht werden. Allerdings übt die Carboxylfunktion am C-1 einen Anisotropie-Effekt aus, so dass die beiden Protonen am C-3 je nach Stellung der Carboxylfunktion eine unterschiedliche chemische Verschiebung zeigen. So kommt das Signal des H-3_{eq} bei ca. 2.7 ppm im α -Anomer, während es im β -Anomer schon bei ca. 2.3-2.4 ppm erscheint. Die Signalstruktur der Methylensignale am C-3 ermöglicht eine einfache Zuordnung. Das axiale Proton zeigt ein visuelles Triplett, in dem sowohl die geminale Kopplung zum H-3_{eq} , als auch zum trans-ständigen H-4 recht groß ist (ca. 11 Hz). Das äquatoriale Proton hingegen bildet ein dd-System aufgrund der großen geminalen Kopplung und der kleineren Kopplung zum H-4 (um die 4 Hz). Die Zuordnung der Protonen in einem Spinsystem erfolgt durch TOCSY-Messungen, womit sich die Protonen innerhalb einer Monosaccharideinheit ermitteln lassen. Durch die Aufnahme von $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektren werden die Zuordnungen der Protonen durch Korrelation direkt koppelnder Kerne ermöglicht.

Von besonderem Interesse bei der Analyse von Oligosacchariden sind ^{13}C -Spektren, da gerade aus ihnen Aussagen über strukturelle Veränderungen getroffen werden können. Ähnlich wie bei den ^1H -Spektren ist die Auswertung der eindimensionalen ^{13}C -Spektren von komplexen Strukturen nicht möglich. Allerdings sind auch hier Reportergruppen zu finden, die Aussagen über die glycosidischen Bindungen erlauben. Im Allgemeinen wird hier bei einer Glycosylierung eine Tieffeldverschiebung des substituierten C-Atoms von 3-10 ppm beobachtet. Während bei der enzymatischen Synthese von Gal β 1-3Gal-Derivaten eine Tieffeldverschiebung von 10 ppm des C-3 zu beobachten ist, kommt es bei einer Sialylierung

nur zu einer Veränderung der Verschiebung um 3 ppm zu tieferem Feld. Bei der Synthese von sialylierten Oligosacchariden wird diese Veränderung im ^{13}C -Spektrum als Nachweis für die Sialylierung herangezogen, da es nicht möglich ist, mit Hilfe von HMBC-Spektren die direkte C-H Korrelation an dieser Position zu messen. Die Relaxationszeit von quartären C-Atomen ist zu langsam, um ein Signal im Spektrum bei einer Routinemessung zu detektieren. Daher ist das glycosidische C-Atom auch nur selten im ^{13}C -Spektrum zu sehen. Die genaue Zuordnung der Signale im ^{13}C -Spektrum erfolgt unter zu Hilfenahme von $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -COSY- bzw. HMQC-Spektren, in denen die Korrelation direkt koppelnder Kerne zu erkennen sind.

3.3.4 Synthese von Neu5Ac α 2-3-Gal β 1-3-GalOR Derivativen

Die Synthese von sialylierten Gal β 1-3-GalOR Motiven ist nicht nur mit Sialyltransferasen und Sialidasen möglich, sondern gelingt ebenfalls mit Hilfe von Trans-Sialidase. Die Akzeptorsubstrate lassen sich biokatalytisch mit Hilfe der β -Galactosidase aus Rinderhoden, ausgehend von *p*NP- β Gal und den Akzeptorsacchariden darstellen. Dabei gelang es das Threonin-Derivat **17** in 28 % und das korrespondierende Serin-Glycosid **18** in 25 % Ausbeute zu isolieren.¹⁰⁴ Von besonderem Interesse sind hierbei die Synthese von Neu5Ac α 2-3-Gal β 1-3-GalNAc α Thr **21** bzw. der entsprechenden Serin-Verbindung **22**, da diese tumor-assoziierte Antigen-Epitope darstellen und auch darüber hinaus als Liganden verschiedener Siglecs (u.a. MAG) dienen.

Die Ausbeuten sind mit denen der Synthese mit Hilfe von Sialidase vergleichbar, was durchaus mit den verwendeten Inkubationsbedingungen zusammenhängen kann, da Trans-Sialidase bei 37° C und bei pH = 6.9 keine optimal Aktivität zeigt. Interessanterweise gelang es auch weniger polare Akzeptorsubstrate wie **19** und **20** umzusetzen, so dass auch die Synthese von sialylierten Buildingblocks wie dem 2-Azidoglycosid **24** möglich wird. Die höhere Ausbeute beim Einsatz von **20** unter diesen Umständen hängt vermutlich mit der β -Konfiguration der des Allylglycosids zusammen. Es zeigte sich im Verlauf dieser Arbeiten, dass die Konfiguration am subterminalen anomeren Zentrum durchaus Einfluß auf die Reaktivität und somit auf die Ausbeute der Reaktion hat. Dabei zeigen β -glycosidische Akzeptorsubstrate bessere Umsätze als die korrespondierenden α -Glycoside.

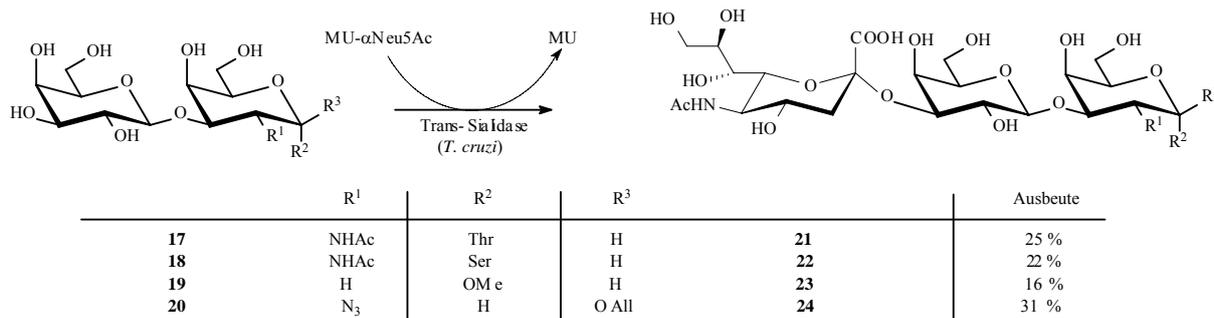


Abb. 18: Synthese von sialylierten Galβ1-3-GalOR-Motiven durch Trans-Sialidase aus *T. cruzi*¹⁰³

Die Darstellung des Akzeptorsubstrates **25** erfolgte durch die Umsetzung von α-Allyl-GalNAc mit einem entsprechenden Donorsubstrat chemoenzymatisch unter der Verwendung verschiedener Enzyme. Die besten Umsetzungen gelangen ausgehend von *pNP*-Gal mit Galactosidase aus *Bovine testes* in 67 % und ausgehend von Gal-1-P mit Phosphorylase aus *Bifidobacterium bifidum* in 43 % Ausbeute.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

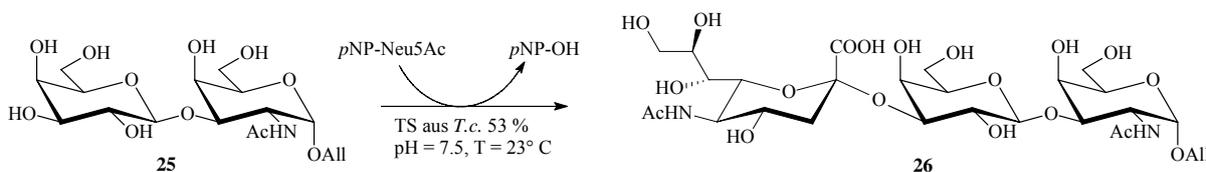


Abb. 19: Sialylierung von Galβ1-3-GalNAcα-OAllyl⁹⁹ durch Trans-Sialidase;

Unter den modifizierten Bedingungen, mit Tris-HCl, pH = 7.5 und 23° C gelingt die Darstellung **26** in sehr guten Ausbeuten (53 %). Die Reinigung des Produktes erfolgt einfach säulenchromatographisch über eine RP-18 Säule. Wahrscheinlich ist die Allylfunktion durch ihre Tendenz zur Aggregation dafür verantwortlich, dass sich das Produkt vom Akzeptor auf diese Weise schnell und effizient trennen läßt. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen von Versuchen mit Sialyltransferasen im Glycosylierungsschritt und übertrifft die Ergebnisse der Transglycosylierungen mit Sialidasen bzw. einer rein chemischen Synthese. Durch die Kombination der kurzen und effizienten Synthese des Donorsubstrats und der sehr guten Ausbeute im Transglycosylierungsschritt, übertrifft dieser Syntheseweg alle bisher bekannten Möglichkeiten der Darstellungen dieser vorgestellten Derivate in der Gesamteffizienz.

3.3.5 Darstellung von Sia-3'-Lac Verbindungen

Da Lactoside die natürlichen Akzeptorstrukturen darstellen, gelingt die Sialylierung von verschiedenen Derivaten der Lactose mit Hilfe von Trans-Sialidase. Dabei zeigten sich ähnliche Tendenzen bezüglich der Inkubationsbedingungen und der strukturellen Verhältnisse der Akzeptorsubstrate. So gelang die Synthese von Sialyl-3'-lactose **28** bei pH = 7.5 und 23° C in einer hervorragenden Ausbeute von 73 %. Dies ist eine deutliche Verbesserung, die durch die Modifikationen der Inkubationsbedingung erreicht wurde, denn die Umsetzung bei 37° C und pH = 6.9 lieferte das Produkt lediglich in 49 % Ausbeute.^{102,103}

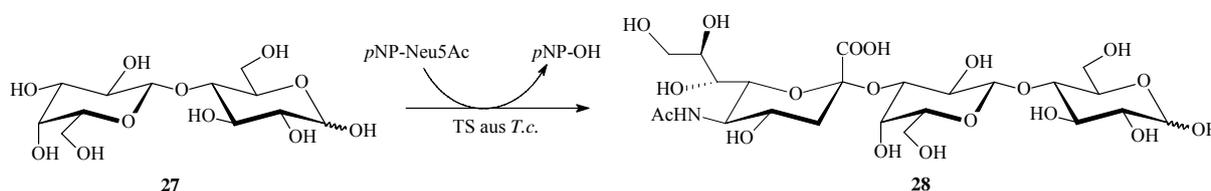


Abb. 20: Sialylierung von Lactose in 73 % Ausbeute bei 23° C und pH = 7.5 und in 49 % Ausbeute bei 37° C und einem pH-Wert von 6.9

Bei der Darstellung wird deutlich, wie wichtig die optimalen Reaktionsbedingungen für sehr gute Ausbeuten sind. Dabei ist generell zu beachten, dass Sia-3'-Lac ein ausgezeichnetes Donorsubstrat ist, so dass auch eine hydrolytische Spaltung des Trisaccharids **28** möglich gewesen wäre. Trotz der recht langen Inkubationszeit von 13 Stunden war aber keine Bildung der freien Neu5Ac zu detektieren. Die Struktur des reduzierenden Glucoserestes scheint keinerlei Einfluß auf die Reaktivität zu haben, da die Ausbeute nicht mit dem natürlichen Gleichgewicht der verschiedenen Isomere der freien Lactose im wäßrigen Lösungen korreliert.

In genauso überzeugenden Ausbeuten gelangen die Sialylierungen des β -Allyl-lactosids **29** (Abb. 21) und des β -Methyl-lactosids **31** (Abb. 22). Die Akzeptorstrukturen unterscheiden sich nur geringfügig in ihrem Aufbau und ihrer Polarität, so dass auch ähnliche Ausbeuten zu erwarten waren. Trotz der einfachen Struktur von **29** und **31** ist die Darstellung der jeweiligen Verbindungen nicht nur aus chemischer Sicht interessant. Während der Methylsubstituent das reduzierende Ende der Lactose strukturell fixiert, ohne dabei großen Einfluß auf die Polarität des Moleküls auszuüben, erlaubt es die Allylfunktion, das resultierende Trisaccharid **30** für weitere Applikationen zu verwenden.

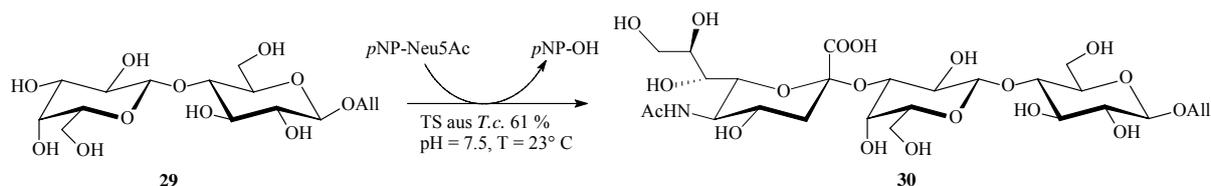


Abb. 21: Sialylierung von Allyl- β -lactosid in 61% Ausbeute mit Hilfe von Trans-Sialidase

Ähnlich wie bei der Darstellung von **26** gelingt auch bei der Synthese von **30** die Isolierung des Produktes durch Umkehrphasen-Chromatographie (Reverse-Phase-Chromatography, RP-18). Dadurch ist eine schnelle und effiziente Reinigung des Produktes möglich.

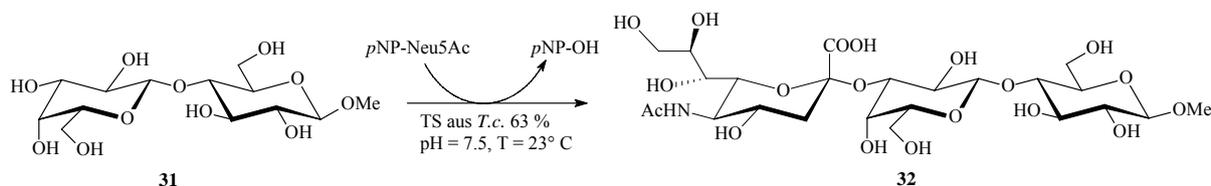


Abb. 22: Chemoenzymatische Darstellung von Sia-3'-Lac- β -OMe

Die Sialylierung zum Trisaccharid **32** gelingt in sehr guter Ausbeute von 63 % bezogen auf *pNP-Neu5Ac*. Die säulenchromatographische Reinigung des Produktes erfolgt gelpermeationschromatographischen Biogel P-2.

Auf Zelloberflächen erfüllt Neu5Ac unter anderem die Funktion, das Zellepitop zu maskieren und die subterminalen Oligosaccharidstrukturen vor Gal-spezifischen Rezeptoren oder Enzymen zu schützen. Dieser Mechanismus kann *in vitro* sehr gut demonstriert werden. Nach Abbrechen der Sialylierung ist in der Lösung neben dem Produkt und feiem *pNP-OH* ebenfalls noch der Akzeptor enthalten. Durch eine *exo*-Galactosidase, die β 1-4 galactosidische Bindungen erkennt, kann nun dieser gespalten werden. Es gelang bei hoher Verdünnung unter Verwendung der Galactosidase aus *Baccillus circulans* das β -Methyl-lactosid vollständig zu hydrolysieren. Das sialylierte Produkt **32** wird dabei nicht angegriffen, und eine größendifferenzierende Trennung des Produktes wird erleichtert.

Auch die Darstellung eines Sialyllactosamids **34** gelingt unter den oben beschriebenen Bedingungen glatt.

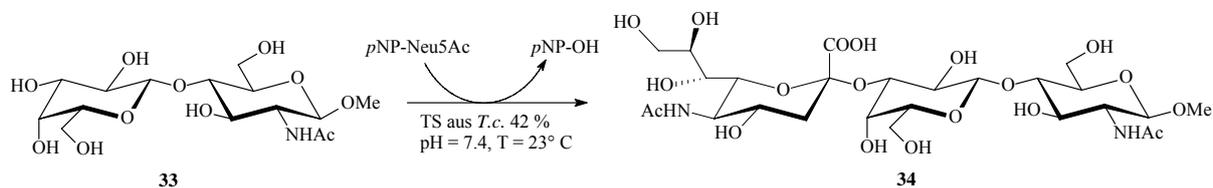


Abb. 23 Sialylierung von β -Methyl-N-acetylglucosaminid mit Hilfe von Trans-Sialidase

Die Ausbeute der Darstellung von **34** fällt mit 42 % niedriger aus als bei den anderen freien Lactosiden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Amidfunktion am C-2 die Reaktivität des Akzeptors **33** beeinflusst, da diese Gruppe einen größeren sterischen Anspruch hat und auch weniger polar ist als die Verbindungen **29** und **31**. Darüber hinaus erwies sich die Aufreinigung des Produktes als kompliziert, da sowohl bei der Biogel- als auch der RP-Chromatographie die Isolierung des reinen Produkts nicht gelang. Daher wurde eine enzymatische Spaltung des nicht umgesetzten Edukts durch Galactosidase aus *Bacillus circulans* in einem entsprechendem Puffersystem vorgenommen und nach der Hydrolyse konnte das Produkt über eine Biogel-Säule in 42 % Ausbeute isoliert werden.

4. Synthese neuartiger Donorsubstrate

Im Rahmen dieser Arbeit sind unterschiedliche Donorsubstrate für die chemoenzymatische Umsetzung mit Trans-Sialidase aus *T. cruzi* synthetisiert worden. In ersten Versuchen wurde die Synthese von Neu5Ac-Glycosiden vollzogen, die variierende phenolische Austrittsgruppen am anomeren Zentrum besaßen. In darauf folgenden Synthesen wurden anschließend Modifikationen am Neu5Ac Grundgerüst durchgeführt, die zur Synthese von Sialyloligosaccharid-Mimetika verwendet wurden.

4.1 Synthese kettenverkürzter Donorsubstrate

Glycosidasen sind Enzyme, die regio- und stereoselektiv Substrate erkennen. Trotzdem ist es möglich nicht nur modifizierte Akzeptorsubstrate umzusetzen, sondern es zeigte sich, dass modifizierte Donorsubstrate zur enzymatischen Transglycosylierung eingesetzt werden können. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass Galactosidasen aus verschiedenen Quellen eine ausgeprägte Toleranz gegenüber Variationen an der Kohlenhydratstruktur des Donors besitzen. Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass an Position 6 modifizierte Donorsubstrate ein ausgeprägtes Transglycosylierungspotential besitzen.^{108,109} Es gelang unter anderem die chemoenzymatische Umsetzung eines am C-6 kettenverlängertem Donorsubstrates **35**.

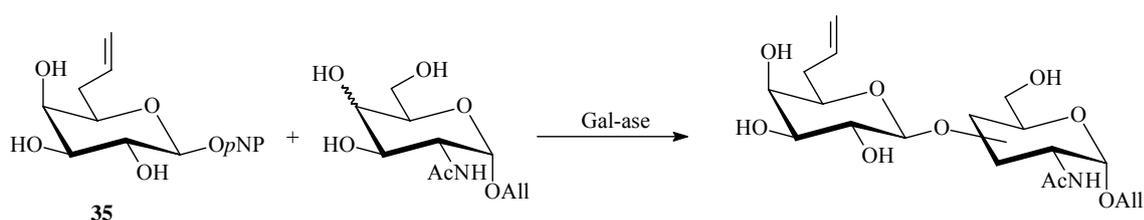


Abb. 24: Chemoenzymatische Umsetzung eines modifiziertem Donorsubstrates mit Hilfe von Galactosidasen verschiedener Herkunft^{99,103}

Sowohl die Übertragung von **35** auf einen GlcNAc-Akzeptor mit Galactosidase aus *Bacillus circulans*, als auch die Transglycosylierung mit Galactosidase aus Rinderhoden zu einem T-Antigenderivat gelang in sehr guten Ausbeuten (Abb. 24).^{105,110} Aber nicht nur exocyclische

Reste konnten modifiziert und transglycosyliert werden. Ebenfalls die direkt am Ring gebundenen Hydroxylfunktionen konnten entfernt oder verändert und anschließend übertragen werden. Die Toleranz der Enzyme geht zum Teil so weit, dass selbst Fucoside- oder Arabinoside bis hin zu Glucosiden als Donorsubstrate von Galactosidasen verschiedener Herkunft erkannt wurden.^{105,111}

Auch im Falle der Trans-Sialidase ist biochemisch nachgewiesen worden, dass Modifikationen an der Glycerinseitenkette erlaubt sind. Dabei ist die Seitenkette mit bi- und tri-antennären Substituenten verlängert worden. Diese wurden dann im biochemischen Maßstab mit Hilfe von Trans-Sialidase glycosyliert, wobei keine exakte Charakterisierung der Produkte erfolgte, sondern der Transfer nur über HPLC belegt wurde.^{112,113} Durch diese Ergebnisse motiviert, sind im Rahmen dieser Arbeit erste Synthesen und Untersuchungen von ketten-verkürzten Neu5Ac-Analoga erfolgt.

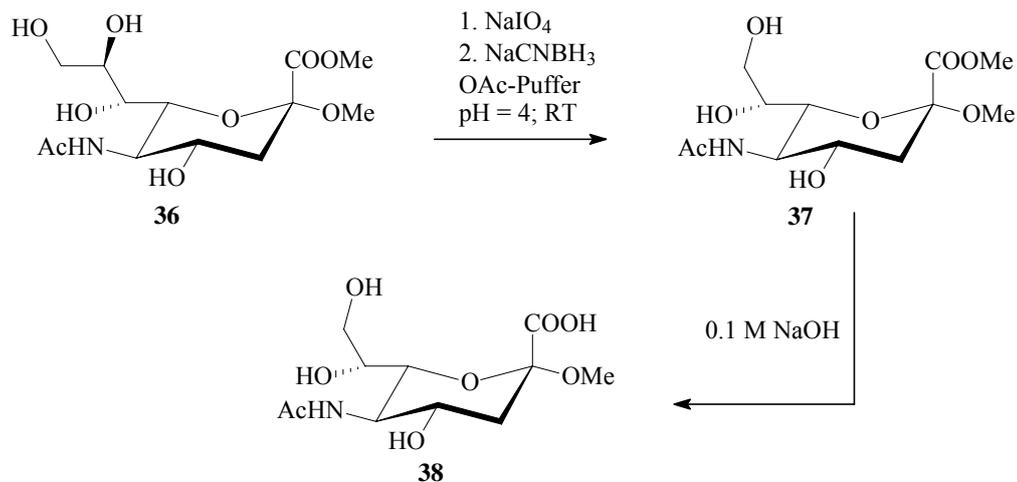


Abb. 25: Erste Versuche zur Synthese kettenverkürzter Sialoside durch Periodat-Spaltung und *in situ* Reduktion mittels Cyanoborhydrid

Das α -Methylsialosid **36** ist ausgehend von **14** durch eine Koenigs-Knorr-Glycosylierung synthetisiert worden. Die Stereoselektivität geht unter diesen Reaktionsbedingungen verloren, so dass sich beide Anomere bildeten. Das α -Anomer stellt das Hauptprodukt dar, da die Reaktion unter kinetischer Kontrolle geführt wurde. Dies konnte anschließend durch eine milde Periodat-Spaltung gefolgt von einer Reduktion mit Cyanoborhydrid in das

kettenverkürzte Glycosid **37** überführt werden. Durch mehrfache säulenchromatographische Reinigung gelang die Isolierung des reinen α -Anomers **37** in 32 % Ausbeute. Die Deblockierung zum Sialosid **38** gelang anschließend in 85 % Ausbeute unter basischer Bedingungen.

Bei der oxidativen Spaltung von vicinalen Hydroxyfunktionen handelt es sich um eine sehr milde Methode, zur Spaltung der Glycerinseitenkette, ohne dass dabei andere Funktionalitäten angegriffen werden. Die Zugabe des Periodats muß zur Synthese des Octonulosonsäure Derivats äquimolar erfolgen, da es sonst zu einem weiteren Abbau des Saccharids zum Heptonulosonsäure-Derivat kommt. Die anschließende Reduktion mit Cyanoborhydrid verläuft chemoselektiv bei pH = 4, da unter diesen Bedingungen nur Aldehyde reduziert werden, während unter neutralen Bedingungen auch die Esterfunktion angegriffen wird.¹¹⁴. Die recht niedrigen Ausbeute bei der Synthese von **37** hängt mit dem Mechanismus der Periodatspaltung zusammen, bei der auch ein Heptonulosonsäure-Derivat entsteht, bzw. nicht umgesetztes Edukt vorhanden ist und so die Reinigung des Produkts erschwert wird. Biochemische Untersuchungen mit **38**, die von Dr. Silke Schrader an der Universität Kiel durchgeführt wurden, ergaben, dass das Methylglycosid **38** ähnlich leichte inhibitorische Eigenschaften auf Trans-Sialidase besitzt wie das α -Methylglycosid der Neu5Ac.

Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, kettenverkürzte Neu5Ac-Donorglycoside für die Synthese neuartiger Oligosaccharidstrukturen einzusetzen. Dabei wurde *p*NP-Neu5Ac **15** ebenfalls, wie in Abb. 25 beschrieben, modifiziert und in ein Octonulosonsäure Donorsubstrat überführt (s. Abb. 26).

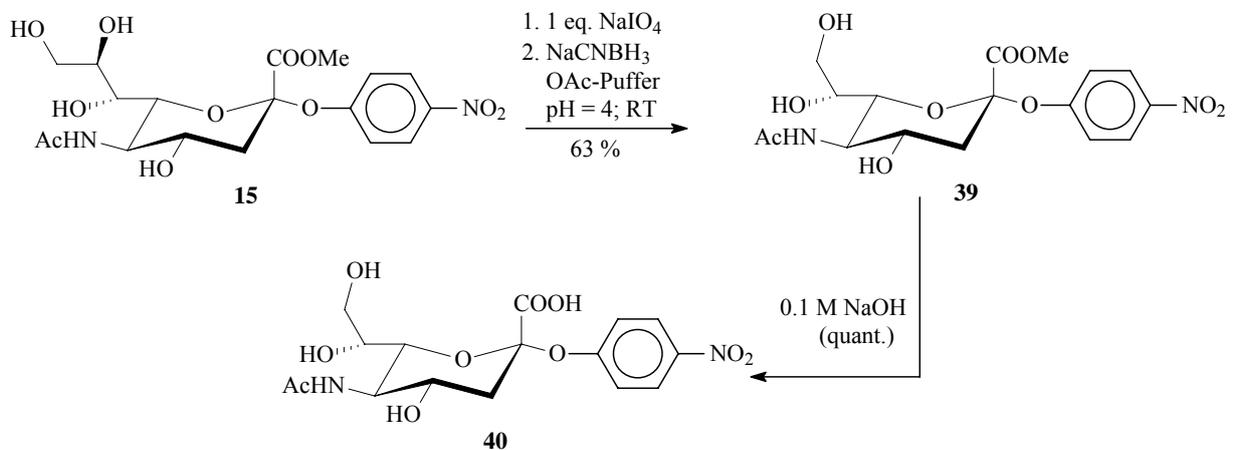


Abb. 26: Darstellung des Octonulosonsäure Donorsubstrates mittels einer Periodatspaltung

Es gelang durch umfangreiche Modifikationen der Reaktionsbedingungen die Ausbeute der Periodatspaltung auf 63 % zu steigern. Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Periodatspaltung sehr hoch ist und durch die Temperatur nur unwesentlich beeinflusst wird, wurde diese Reaktion in großer Verdünnung durchgeführt. So wurde eine Lösung von **15** tropfenweise mit einer äquimolaren Periodatlösung versetzt, um so nur eine einfache oxidative Spaltung zu erreichen. Im weiteren Verlauf können die entstehenden Salze relativ einfach säulenchromatographisch über eine Kieselgelsäule entfernt werden, so dass die Verbindung **40** in sehr guten Ausbeuten gewonnen wird. Allerdings hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Reaktionslösung über einen Mixbed Ionenaustauscher vorzureinigen.

Durch die Zugabe von 2 äquivalenten Periodat ist es in sehr guten Ausbeuten möglich, einen entsprechenden Heptunolosensäure Donor **42** zu synthetisieren. Der bei der einfachen Periodatspaltung gebildete Aldehyd liegt im wässrigen Milieu als Hydrat vor und kann dabei in einer weiteren oxidativen Reaktion unter Bildung von Ameisensäure zum Heptunolosensäure Derivat **41** umgesetzt werden.

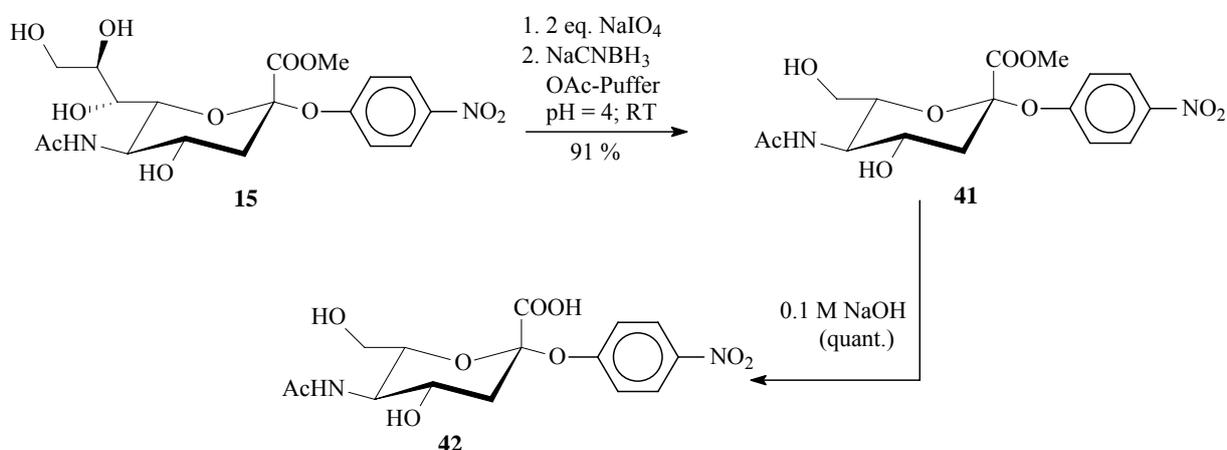


Abb. 27: Synthese des Heptunolosensäure Derivates durch einen kleinen Überschuss an Natriumperiodat

Der *in situ* gebildete Aldehyd kann ohne Probleme bei pH = 4 mit einem Überschuss an Cyanoborhydrid zum korrespondierenden Alkohol **41** reduziert werden. Die Entsalzung des Reaktionsgemisches und die Reinigung des Produktes erfolgte analog zu der säulenchromatographischen Aufreinigung von Verbindung **39**. Die Ausbeute ist sehr hoch, weil bei dieser Reaktion kaum Nebenprodukte auftreten. Die anschließende Esterhydrolyse

führt quantitativ zum gewünschten Produkt **42**. Sowohl Verbindung **40** als auch die Verbindung **42** sind als Donorsubstrate für weitere Transglycosylierungen eingesetzt worden.

4.2 Chemoenzymatische Umsetzung von *p*NP-Oct5Ac

Zwischen der Sialidasen und der Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* besteht eine große Homologie. Daher sind alle potentiellen Donorsubstrate erst mit der Sialidase aus *Salmonella typhimurium* auf ihre Hydrolyseaktivität untersucht worden. Durch diese Reaktion sollte untersucht werden, ob die Sialidase das neuartige und unnatürliche Substrat erkennt und die Hydrolysereaktion katalysiert. Dabei sind 15 μmol des Donorsubstrates **40** bei $\text{pH} = 5.5$ und 37°C für zehn Stunden mit 1 U Sialidase inkubiert worden.

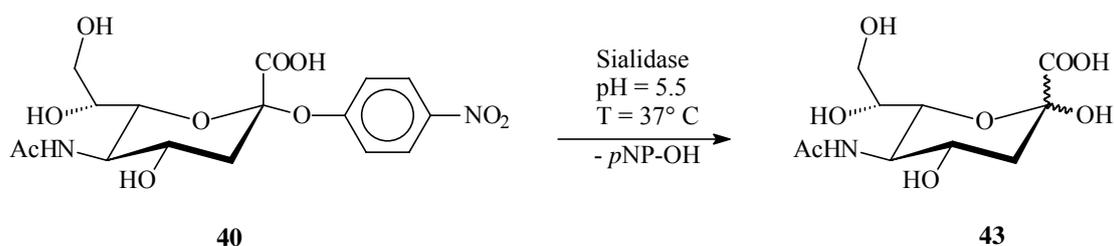


Abb. 28: Hydrolyse des Octonulosensäure Substrats mit Sialidase aus *Salmonella Typhimurium*

Nach Beendigung der Reaktion waren dünschichtchromatographisch die Hydrolyseprodukte **43** und freies *p*NP-OH nachzuweisen. Eine Kontrollösung ohne Enzym zeigte nach derselben Zeit und unter den gleichen Bedingungen keine Hydrolyse. Das Substrat **40** ist somit bei 37°C und $\text{pH} = 5.5$ hydrolysestabil und wird als Donorsubstrat von der Sialidase aus *Salmonella typhimurium* erkannt und umgesetzt.

4.3 Enzymatische Transglycosylierungen mit Trans-Sialidase

Die Verkürzung der Neuraminsäureseitenkette hat also keinen großen Einfluß auf die Erkennung durch eine Sialidase. Aufgrund dieses Ergebnis wurden chemoenzymatische Transglycosylierungen mit Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* unternommen. Die Versuche zur Darstellung der sialylierten Oligosacchariden fanden bei $\text{pH} = 7.5$ (Tris-HCl Puffer) und 23°C statt. Dabei wurden 20 μmol Donorsubstrat mit einem leichten Überschuß

von ca. 0.5 Äquivalenten des Akzeptorsubstrats umgesetzt. Die Reaktion wurde von ca. 100 μg Enzym katalysiert. Die Reaktionsverfolgung durch Dünnschichtchromatographie als auch die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurde wie bei der Synthese der natürlichen sialylierten Oligosaccharide durchgeführt.

In ersten Untersuchungen gelang der Transfer des Donorglycosides **40** auf das β -Allyl-lactosid **29**. Das Octunolosensäure Donorglycosid **40** wurde anschließend auf eine Reihe von lactosidischen Derivaten erfolgreich übertragen.

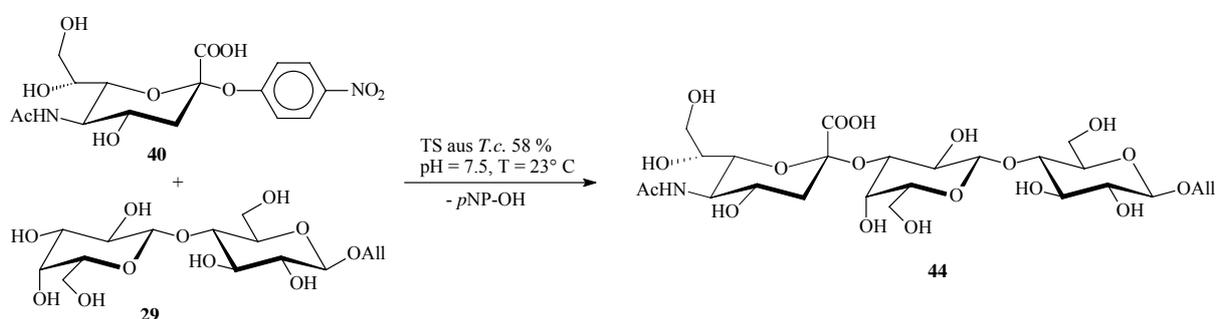


Abb. 29: Chemoenzymatische Glycosylierung von β -Allyl-lactosid (**29**)

Wie in Abb. 29 zu sehen ist, gelang die Synthese des neuartigen Trisaccharides **44** mit Hilfe von der Trans-Sialidase. Überraschender Weise verlief die Reaktion regio- und stereoselektiv zu dem α 2-3-Glycosides **44** in ausgeprägter Analogie zu der Transglycosylierung des entsprechenden Neu5Ac-Donorsubstrates in Abb. 21. Wie auch bei der Synthese der sialylierten Oligosaccharide konnte die Selektivität anhand der chemischen Verschiebung im ^{13}C -NMR Spektrum nachgewiesen werden. Dabei weist das C-3' eine charakteristische Tieffeldverschiebung von 3.5 ppm gegenüber dem freien Lactosid auf. Die Darstellung von **44** erfolgt unter den gewählten Bedingungen ohne nachweisbare Hydrolyse des Donorsubstrates in ausgezeichneten Ausbeuten von 58 %. Im Vergleich zu den Transglycosylierungen von Neu5Ac stellt dies keine signifikante Verringerung der Ausbeute dar, zumal die Synthesen des sialylierten Trisaccharides **30** und der analogen Verbindung **44** mit der gleichen Enzymcharge und der gleichen Methodik vollzogen wurden. Es wird hierbei deutlich, dass die Aktivität des Enzyms nur unwesentlich durch die Kettenverkürzung an der Glycerinseitenkette der Neu5Ac beeinflusst wird.

Ein ähnlich überzeugendes Ergebnis lieferte die Transglycosylierung von **40** mit dem β -Methylactosid **31**. Unter der Biokatalyse der Trans-Sialidase aus *T. cruzi* konnte das Trisaccharid **45** in 57 % Ausbeute isoliert werden (s. Abb 30). Auch bei dieser Reaktion war, wie bei der Darstellung von **44**, ausschließlich der Glycosyltransfer zu detektieren. Der Glycosyltransfer erfolgte hoch stereo- und regioselektiv, auch dies konnte durch die NMR Analyse des ^{13}C -Spektrums nachgewiesen werden. Die Ausbeuten sind hier etwas geringer als bei der Synthese des korrespondierenden, sialylierten Oligosaccharides **32**. Allerdings ist die Differenz von 6 % eher gering, und auch bei dieser Synthese zeigt sich, dass die Glycerinseitenkette für die Enzymreaktivität eine subdominante Rolle spielt. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen den Verbindungen **29** und **31** ist eine ähnliche Enzymaktivität zu erwarten, allerdings zeigte sich, dass die Akzeptorstruktur **31** über bessere Eigenschaften für biologische Untersuchungen zu Adhäsionsprozessen verfügt.

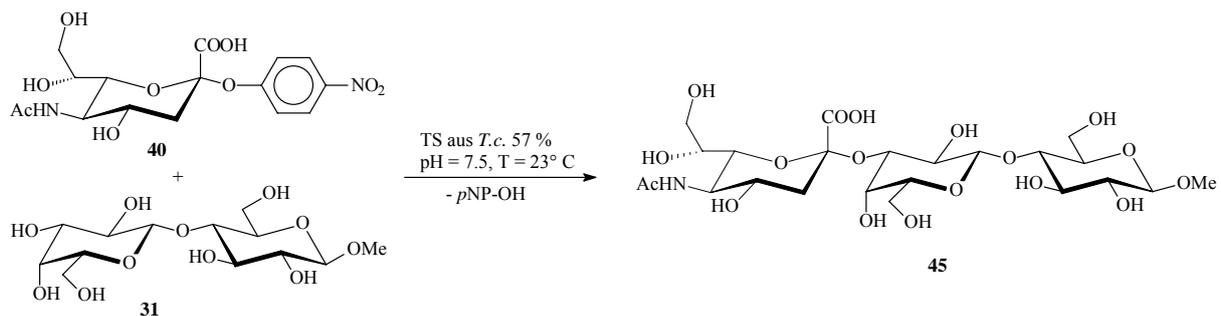


Abb. 30: Darstellung des Glycosids Oct5Aca2-3Gal β 1-3Glu β OMe

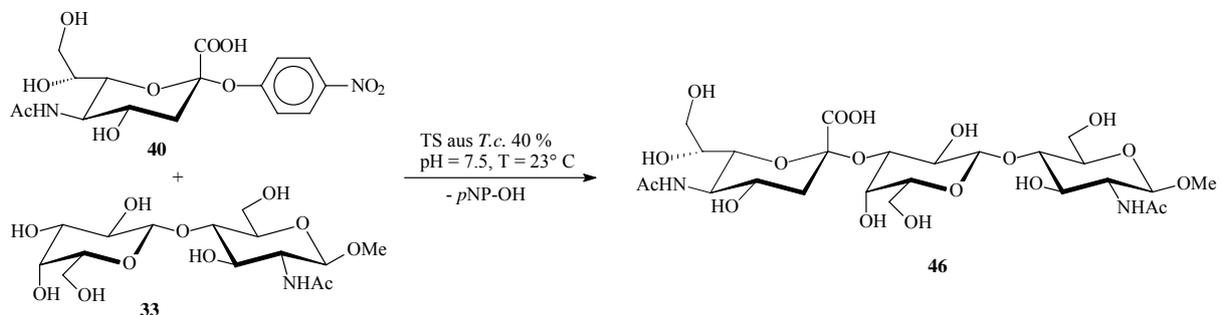


Abb. 31: Umsetzung eines Lactosamidglycosides mit Hilfe von Trans-Sialidase aus *T. cruzi*

Neben den lactosidischen Akzeptorsubstraten **29** und **31** wurde ebenfalls das N-Acetyl-lactosamid **33** enzymatisch mit dem Donorsubstrat **40** umgesetzt (Abb. 31). Wie schon in den vorhergegangenen Synthesen fand die Reaktion unter den gleichen Bedingungen statt, wie in der Synthese der entsprechenden sialylierten Verbindung **34**. Auch diese Synthese des Trisaccharids **46** verlief nachweislich regio- und stereoselektiv unter reinem Glycosyltransfer und in guten Ausbeuten von 40 %. Die Hydrolyse des *p*NP-Glycosides **40** konnte nicht beobachtet werden.

4.4 Chemoenzymatische Umsetzung von *p*NP-Hept5Ac

Das doppelt kettenverkürzte Glycosid **42** ist vor einer Umsetzung mit Trans-Sialidase zunächst mit der Hydrolase aus *Salmonella typhimurium* inkubiert worden. Wie bei der Hydrolyse des Octonulosonsäure Derivates **40** sind 15 μ mol des Donorsubstrates **42** bei pH = 5.5 und 37° C für zehn Stunden mit 1 U Sialidase inkubiert worden.

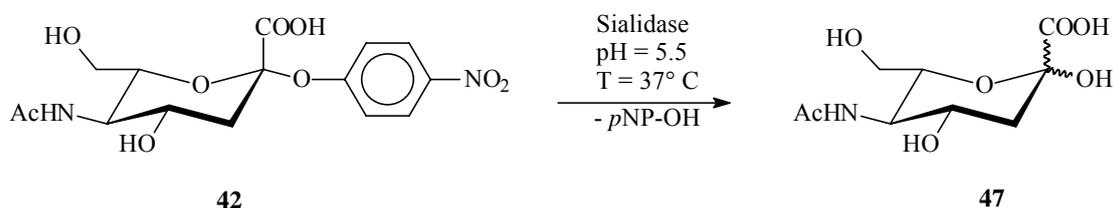


Abb. 32: Hydrolyse von *p*NP-Hept5Ac mit Hilfe von Sialidase aus *Salmonella typhimurium*

In einem Referenzansatz ohne Enzym konnte gezeigt werden, dass auch das Donorsubstrat **42** unter den oben genannten Bedingungen nicht spontan hydrolysiert. Nach zehn Stunden Inkubation mit der Sialidase war dünnschichtchromatographisch kein Donorsubstrat **42** mehr nachweisbar. Es fand auch hier eine Erkennung und somit die Hydrolyse in der Bindungstasche der Sialidase statt, so dass in weiteren Versuchen zu zeigen war, ob auch die Trans-Sialidase aus *T. cruzi* dieses Molekül als Donorsubstrat erkennt und einen Transfer auf unterschiedliche Akzeptorsubstrate katalysiert.

4.5 Enzymatische Transglycosylierungen mit Trans-Sialidase

Aufgrund der Erkennung durch der Sialidase wurde auch das Heptunolosonsäure Derivat **42** mit den Lactosiden **29** und **31** sowie mit dem Acetamidolactosamid **33** unter der Biokatalyse von Trans-Sialidase umgesetzt. Diese Versuche fanden in Analogie zur Darstellung von sialylierten Oligosacchariden bei einem pH = 7.5 (Tris-HCl Puffer) und bei 23° C statt. Dabei wurden 20 µmol Donorsubstrat **42** mit einem leichten Überschuß (ca. 0.5 Äquivalenten) des Akzeptorsubstrates umgesetzt. Die Reaktionsverfolgung durch Dünnschichtchromatographie und die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches erfolgte in Analogie zur Synthese des entsprechenden Neu5Ac-Oligosaccharide **30**.

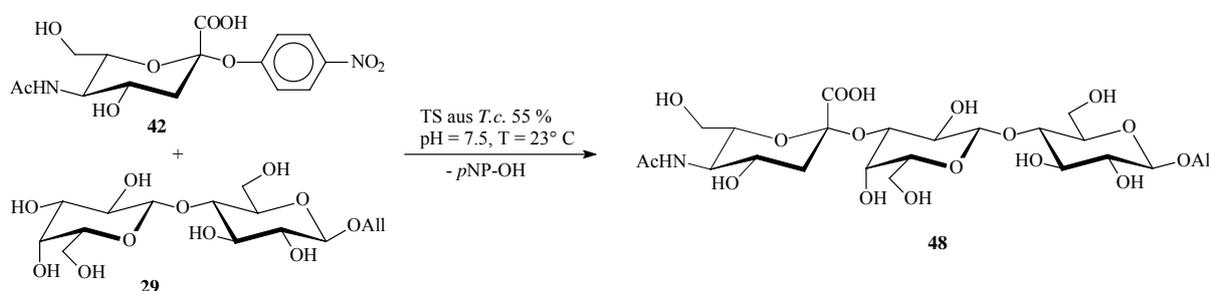


Abb. 33 Transglycosylierung des Donorsubstrates **42** mit Allyl-lactosid

Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* erkennt auch das Donorsubstrat **42**, dass im Vergleich zur Neu5Ac um eine Glycolgruppe verkürzt ist. Die enzymatische Transglycosylierung verlief in ähnlich guten Ausbeuten wie die Glycosylierung des entsprechenden Neu5Ac Donorsubstrates bzw. des Oct5Ac Donorsubstrates in Abb. 21 bzw. 29. Die Darstellung von **48** erfolgte unter den gewählten Bedingungen ohne nachweisbare Hydrolyse des Donorsubstrates in sehr guten Ausbeuten von 55 %. Auch diese war hoch stereo- und regioselektiv, was durch die entsprechende chemische Verschiebung des Signals vom C-3' im ^{13}C -NMR Spektrum (4 ppm zum tieferen Feld) nachgewiesen werden konnte. Auch wenn die Ausbeute der Synthese von **48** mit 55 % nicht signifikant kleiner ist als die Synthese des sialylierten Oligosaccharides **30** mit 61%, so ist doch eine Verringerung in den Ausbeuten schon in diesen ersten Synthesen zu erkennen. Dies verifiziert die Vermutung, dass die Glycerinseitenkette für die Erkennung des Enzyms zwar nicht essentiell ist, die Aktivität aber durchaus beeinflusst. Die Glycerolseitenkette befindet sich im Vergleich zum anomeren Zentrum eher in der Peripherie des Moleküls, wodurch die geringfügige Abnahme der

Aktivität zu erklären wäre. Allerdings ist dabei zu beachten, dass sich die Größe des Donorsubstrates *p*NP-Neu5Ac bis hin zum *p*NP-Hept5Ac deutlich verringert hat. Trotzdem verliert das Enzym nicht seinen regio- und stereodirigierenden Einfluß, was ein Indiz für die eher untergeordnete Wechselwirkung der Glycerinseitenkette mit den Aminosäuren in der Bindungstasche des Enzyms ist. Besonders interessant wird dieser Befund, weil es vermutet wird, dass das Substrat in einem gekippten Zustand kopfwärts, also mit der Glycerinkette voran in die Bindungstasche eindringt, und so eine konformelle Änderung der Bindungstasche induzieren soll, wonach die Bindung des Akzeptors an das Enzym ermöglicht wird.¹¹⁵

Da die Allyl-Lactoside nicht für biologische Untersuchungen geeignet sind, die mittels NMR-Experimenten durchgeführt werden, ist auch das Methyllactosid **31** glycosyliert worden. Die Umsetzung des Donorglycosids **42** mit dem β -Methyllactosid **31** gelang unter den beschriebenen Bedingungen in sehr guten Ausbeuten.

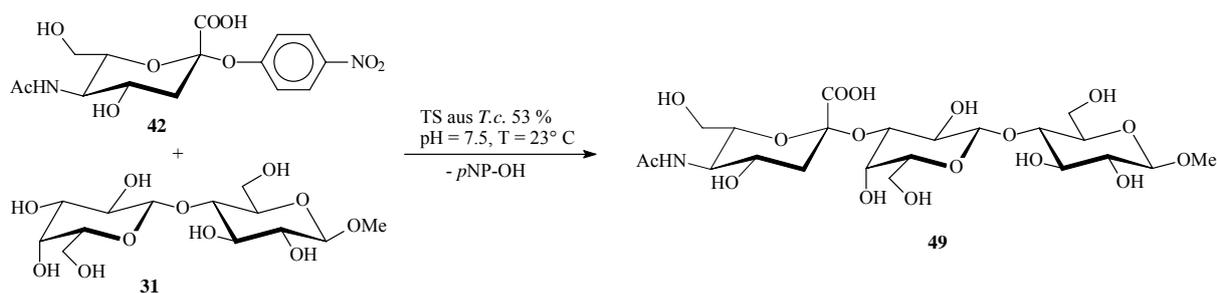


Abb. 34: Umsetzung des kettenverkürzten Donorsubstrats mit β -Methyllactosid

Die Reaktion verläuft ausschließlich unter Donortransfer und es kommt nicht zu einer nachweisbaren Hydrolyse des *p*NP-Hept5Ac Moleküls. Im weiteren erfolgt die Transglycosylierung regio- und stereoselektiv, was durch die Auswertung der NMR Spektren nachzuweisen war. Die chemische Verschiebung der beiden Protonen am C-3'' zeigten, dass das die Hept5Ac α -glycosidisch an das Lactosid gebunden ist, während die Verschiebung ins tiefere Feld des C-3'' im ¹³C-NMR anzeigt, dass es sich um eine 2-3-glycosidische Verknüpfung handelt. Die Ausbeute von 53 % ist für die Synthese eines komplexen Trisaccharides (Abb. 34) bemerkenswert. Genau wie bei der Glycosylierung des Allyllactosides **29** mit den Donorsubstraten **12**, **40** und **42** ist auch bei der Umsetzung des Methyllactosides **31** eine leichte Verringerung der Ausbeute mit abnehmender Kettenlänge

des Glycerinsubstituenten zu beobachten. Dies ist konsistent mit der Vermutung, dass die Aktivität des Enzyms, in bezug auf die Veränderungen am Donor leicht abnimmt.

In einer weiteren enzymatischen Umsetzung reagierte das Acetyllactosamid **33** mit *p*NP-Hept5Ac **42** unter der Katalyse von Trans-Sialidase zu dem entsprechenden Trisaccharid **50**.

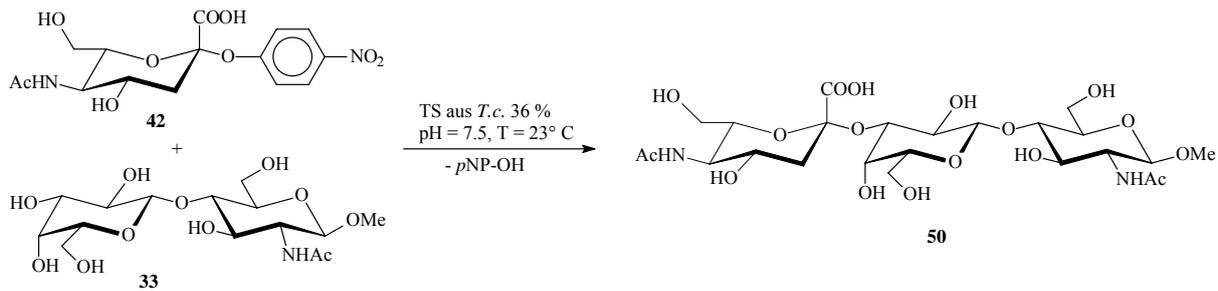


Abb. 35: Darstellung eines neuen kettenverkürzten LacNAc-Glycosids

Es ist auch bei dieser Reaktion ausschließlich der Glycosyltransfer, ohne nachweisbare Hydrolyse des Donorsubstrats, zu beobachten. Die biokatalysierte Übertragung erfolgt regio- und stereoselektiv in einer Ausbeute von 36 %. Die Isolierung des Produkts **50** gelang im Gegensatz zur Reinigung des entsprechenden sialylierten Oligosaccharides problemlos durch eine einfache Gelpermeationschromatographie. In der Reihe der Glycosylierungen des Acetamidolactosids **33** zeigt sich eine Abnahme der Ausbeute mit Verringerung der Seitenkettenlänge. Dieses Ergebnis korreliert mit den Beobachtungen bei den Transglycosylierungen der Lactoside **29** und **31**, bei denen ebenfalls eine Abnahme der Ausbeute bei kürzerer Seitenkette zu beobachten ist. Auch hier hat die Reduktion der Seitenkette nur einen geringeren Einfluß auf die Effizienz der Synthese.

Durch Trans-Sialidase lassen sich folglich an der Glycerinkette verkürzte Derivate der Neuraminsäure auf entsprechende Akzeptorstrukturen in hohen Ausbeuten übertragen. Die daraus resultierenden Oligosaccharide waren bisher nicht beschrieben und es ist auch nicht anzunehmen, dass sie natürlich anabolisiert bzw. katabolisiert werden. Da Neu5Ac terminal an Glycoproteine und -lipide der Glycocalyx gebunden vorliegt, stellen die modifizierten Oligosaccharide potentielle Liganden zur Untersuchung von Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen dar. Damit können nicht nur die Spezifität von physiologische Rezeptoren wie Siglecs untersucht werden. Darüber hinaus sind auch Untersuchungen der Adhäsionseigen-

schaften von pathogenen Rezeptoren wie Hämagglutinin möglich. Das Hämagglutinin ist verantwortlich für die Erkennung der Wirtszellen der Influenza A Viren und stellt den dominanten Virulenzfaktor dar.^{116,117} Die auf diese Weise modifizierten Oligosaccharidstrukturen sind folglich von pharmakologischem Interesse, da sie entweder selbst therapeutische Eigenschaften besitzen, oder als Modelverbindungen zu pharmazeutisch relevanten Erkenntnissen führen können.

5. Synthese und Untersuchungen der Carbonyl-Precursor

Für die Synthese der seitenkettenverkürzten Verbindungen **40** und **42** sind die nach der Periodatspaltung intermediär gebildeten Aldehyde zu den entsprechenden Hydroxylfunktionen reduziert worden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Sialinsäureanaloge mit Hilfe von Trans-Sialidase auf verschiedene Akzeptorstrukturen übertragbar sind. Es ist daher interessant zu untersuchen, ob nach der Periodatspaltung die Isolierung der entsprechenden Carbonyl-Precursoren möglich ist, und ob diese mit Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* interagieren.

Die Verbindungen **52** und **54** liegen in wäßrigen Lösungen als Hydrate mit der Reaktivität von Carbonylverbindungen vor. Während freie aldehydische Protonen eine Verschiebung größer 9 ppm aufweisen, zeigte das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung **54** bei 5.02 ppm ein Dublett, eindeutig einem geminalem Diol am C-7 zugeordnet werden kann. Die ähnliche Reaktivität von geminalen Diolen und Carbonylverbindungen kommt daher, daß sowohl ein Aldehyd als auch das entsprechende Diol über die gleiche Oxidationsstufe verfügen. Wenn Trans-Sialidase mit den Substanzen **52** oder **54** in Wechselwirkung treten sollte, dann besteht die Möglichkeit, dass diese Strukturen als Donoren erkannt und auf einen Akzeptor übertragen werden. Die daraus resultierende Oligosaccharide wären hoch reaktive „Building Blocks“, deren exocyclische Kette auf unterschiedlichste Weise modifiziert werden könnten. Neben den bekannten Carbonylreaktionen wie Wittig- oder Horner-Emmons-Reaktion, wären auch reduktive Prozesse, wie eine reduktive Aminierung denkbar, die nach einer Transglycosylierung erfolgen könnte.

Die Carbonylfunktionen der Substrate **52** und **54** können mit freien Aminen des Enzyms zu Schiff'schen Basen reagieren. Sollte diese chemische Bindung die katalytische Domäne des

Enzyms betreffen und die Aktivität verringern oder ausschalten, hätten diese Verbindungen die Eigenschaften von Suicide-Inhibitoren. Gerade die Synthese eines Inhibitors ist von großem Interesse, da dieser als wirksames Medikament gegen die Chagas Krankheit dienen könnte, da die Trans-Sialidase der Hauptvirulenzfaktor ist.

Es handelt sich bei den Aldehyden **52** und **54** um sehr reaktive Substanzen, deren Synthese sich als problematisch darstellte (s. Abb. 36).

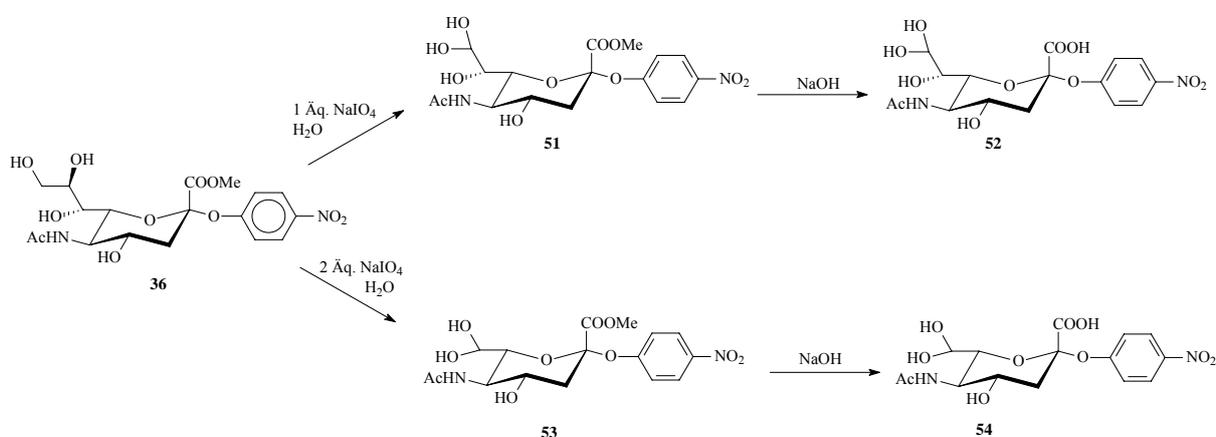


Abb. 36: Geplante Syntheseweg zur Darstellung der Carbonyl-Derivate **52** und **54**

Die einfache Periodatspaltung, die Verbindung **51** liefern sollte, zeigte auch hier die gleichen Probleme wie bei der Darstellung des Octonulosonsäure Derivates **39**. Es sind sowohl das C-7 Derivat **53** als auch unverbrauchtes Edukt **36** dünnschichtchromatographisch nachweisbar. Daher mußte das Produkt **51** säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt werden. Der Aldehyd **51** ist so reaktiv, dass schon der leicht saure Charakter von Kieselgel ausreicht, um es quantitativ mit MeOH in ein Methylhalbacetal **55** zu überführen. Die NMR Analytik zeigte, dass nur das Halbacetal und kein Vollacetal gebildet wurde. Außerdem war so nachzuweisen, dass die Hemiacetalbildung ohne Stereokontrolle ablief und beide Diastereomere in gleichem Verhältnis gebildet wurden. Anschließende Versuche zur säurekatalytischen Spaltung des Methylacetals gelangen nicht, ohne das glycosydische Acetal zu spalten und somit das Molekül zu zerstören (s. Abb. 37).

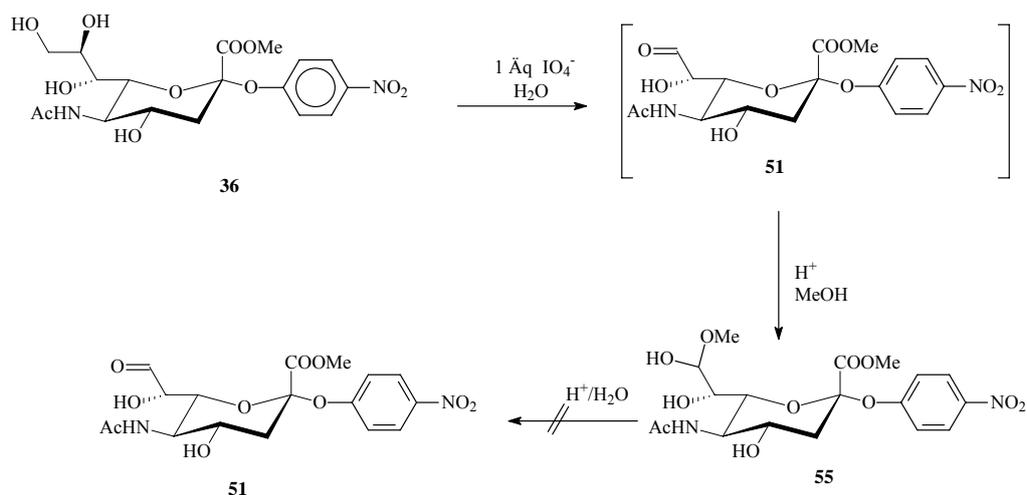


Abb. 37: Hemiacetalbildung bei der säulenchromatographischen Reinigung der Carbonylverbindung **51**

Die Synthese des Aldehyds des Heptonulosensäureesters **53** sollte hingegen unter diesen Bedingungen möglich sein. Durch einen Überschuß an Periodat konnte das entsprechende Derivat **53** gebildet werden, so dass keine aufwendige Reinigung nötig war. Nachdem das Produkt **53** dünnschichttomatographisch detektiert wurde, mußte die Reaktionslösung nur noch entsalzt werden. Dies gelang erfolgreich in rein wäßriger Phase durch Gelpermeationschromatographie.

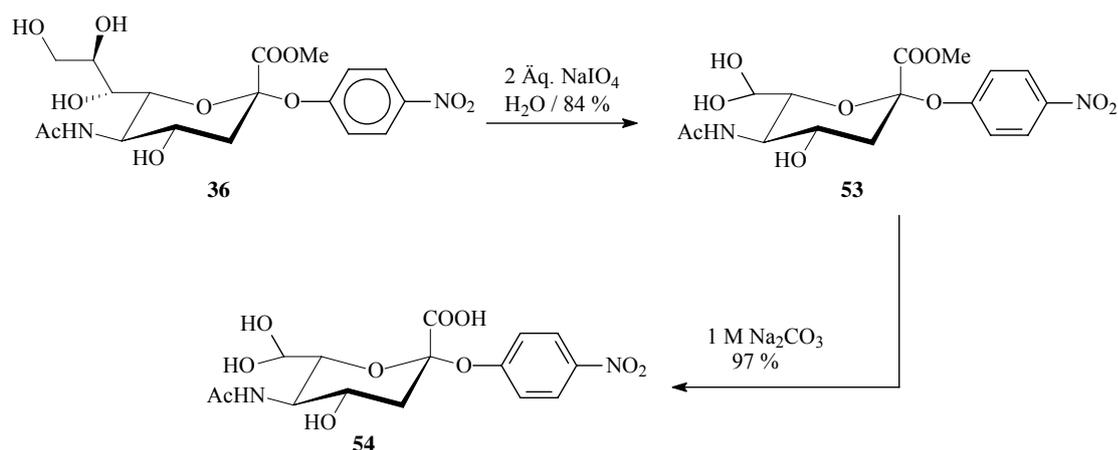


Abb. 38: Synthese eines geminale Diols ausgehend von pNP-Neu5Ac **54**

Das Produkt **53** konnte auf dieses Weise in sehr guter Ausbeute vor 84 % isoliert werden (s. Abb. 38). Die basenkatalysierte Verseifung des Methylresters mit 0.1 molarer NaOH gelang

Die Verbindung **54** ist also kein geeignetes Substrat für eine enzymkatalysierte Transglycosylierung mittels Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi*. Aus diesem Versuch lassen sich aber keinerlei Aussagen über einen inhibitorischen Effekt der Verbindung **54** ableiten. Im allgemeinen interagieren Inhibitoren mit dem Enzym und blockieren oder verändern die Enzymtasche so, dass das eigentliche Substrat nicht mehr in die Bindungstasche eindringen kann und somit auch nicht übertragen wird. Um den inhibitorischen Charakter der Verbindung **54** zu testen, wurde diese mit *p*NP-Neu5Ac co-inkubiert. Im Falle einer Inhibierung des Enzyms würde Neu5Ac nicht auf das Akzeptorsubstrat **31** übertragen und ein entsprechendes Trisaccharid könnte nicht nachgewiesen werden. Dafür wurden 20 μ mol des potentiellen Inhibitors **54** und Donorsubstrat **12** mit 1.5 Äquivalenten des Methylactosides **31** bei 23° C und einem pH-Wert von 7.5 mit Trans-Sialidase für 12 Stunden inkubiert. Die DC-Analyse des Ansatzes zeigte deutlich eine Produktbildung des Trisaccharides **32**, welches, nach dem Abbruch der Reaktion und einer Abtrennung der Puffersalze durch eine Revers-Phase-Chromatographie, massenspektrometrisch (MALDI-Tof) das nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 41).

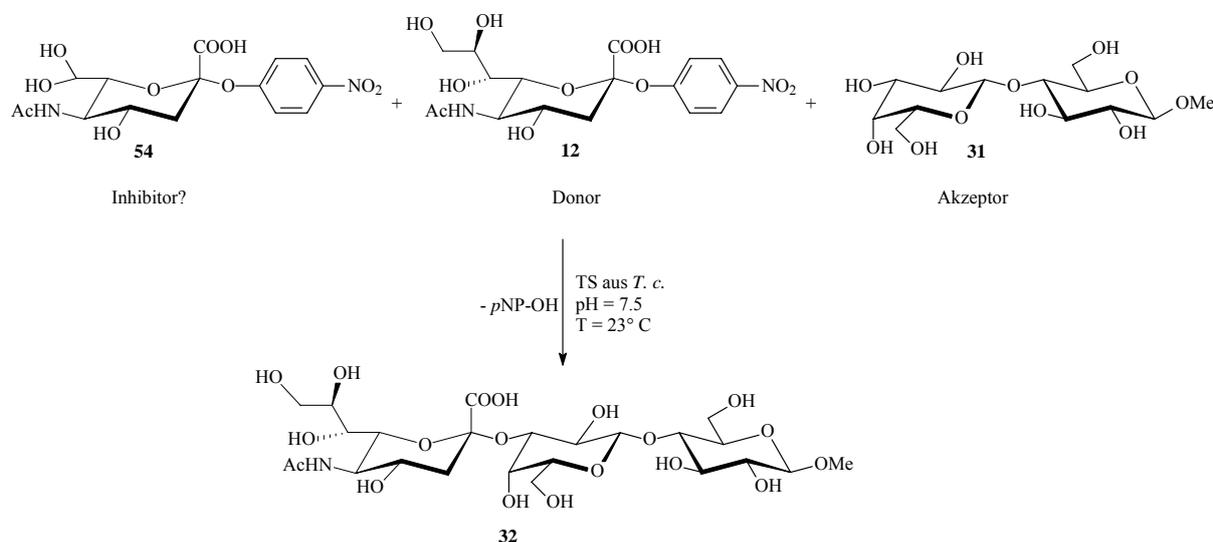


Abb. 41: Untersuchung zu inhibitorischen Eigenschaft der Verbindung **54**

Die Carbonylverbindung **54** zeigt also keinerlei inhibitorische Eigenschaften, da sie die Transglycosylierung der Donorverbindung **12** nicht unterbindet. Es ist zu vermuten, dass das Hydrat **54** aus stereo-elektronischen Gründen nicht in die Bindungstasche der Trans-Sialidase eintreten kann. Wahrscheinlich wird das geminale Diol aufgrund der ausgeprägten

Polarität in diesem Teil des Moleküls von einer Hydrathülle umgeben, die es der Verbindung **54** nicht ermöglicht in die Bindungstasche des Enzyms einzudringen. Die Verbindung **54** ist also weder ein geeignetes Substrat noch ein geeigneter Inhibitor für Trans-Sialidase.

6. *p*NP-Neu5,9Ac₂ als Donorsubstrat für Trans-Sialidase

Eine weitverbreitete Form der Sialinsäure ist das 9-*O*-acetylierte Derivat der Neu5Ac. Ihr Vorkommen reicht von den Echinodermen bis zum Menschen und auch einige Bakterien tragen sie auf ihrer Zelloberfläche.¹² Die biosynthetische Genese dieser Strukturen ist äußerst komplex, denn das dazugehörige Enzym (9-*O*-Acetyltransferase) ist nur schwer isolierbar und Klonierungs-, Expressions- und Mutageneseexperimente sind zur Zeit noch nicht gelungen.^{118,119} Es wird davon ausgegangen, dass innerhalb eines Proteinkomplexes CMP-Neu5Ac von der Acetyltransferase verestert wird. Die modifizierte Form wird dann im Golgi-Apparat von einer Sialyl-Transferase auf die nascierenden Glycoconjugate übertragen, ohne dass die Transferase dabei zwischen der *O*-acetylierten und der freien CMP-Neu5Ac zu unterscheiden vermag.^{120,121}

Untersuchungen des Glycosphingolipids GD₃ (Neu5Ac- α 2-8-Neu5Ac- α 2-3-Gal- β 1-4-Glc- β 1-1-Cer) zeigten, welchen Einfluß eine Acetylierung der Position 9 in der Neu5Ac haben können.¹²² Im allgemeinen kommen Glycosphingolipide auf der Oberfläche verschiedenster Zellen vor, wobei GD₃ in hoher Konzentration in embryonalem Gehirn nachzuweisen ist. Die Expression dieses Gangliosids nimmt während der postnatalen Entwicklung stark ab und befindet sich schließlich nur noch auf einigen T-Lymphocyten und wenigen Gewebezellen.^{123,124} Stark erhöht ist die Expression von GD₃ auf einigen Krebszellen wie von Melanomen, einigen Arten von Leukämie und kleinen carcinomen Zellen. Das 9-*O*-acetylierte GD₃ kommt postnatal nur in neuronalen Zellen vor und wird außerdem, ähnlich wie bei der nicht acetylierten Form, in Carcinomen der menschlichen Basalzellen und verschiedener Melanoma in großer Menge exprimiert. Trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit besitzen GD₃ und 9-*O*-Acetyl-GD₃ konträre Aufgaben. Während die nicht acetylierte Verbindung den „gezielten Zelltod“ (Apoptose) induziert und somit zur Regulierung des Zellwachstums beiträgt, wird angenommen, dass die acetylierte Form die Apoptose verhindert.^{125,126}

GD₃ ist eine biologisch bedeutende Verbindung, bei der offenbar eine kleine Modifikation einen großen Unterschied in ihrer Funktion ausmacht. Daher ist die Synthese entsprechender Oligosaccharide außerordentlich wichtig, um weitere Rückschlüsse auf die biologischen Eigenschaften von derartigen Strukturen zu untersuchen. Dabei würden sich verschiedene *in vitro* Methoden zur Untersuchung von Ligand-Rezeptor Interaktionen wie Biacor oder die NMR-Spektroskopie anbieten.

Eine rein chemische Synthese für Neu5,9Ac₂-Oligosacchariden ist nicht einfach aufgrund der benötigten Schutzgruppen, da die entscheidende Acetylierung an Position 9 als letzter Schritt vollzogen werden muß. Da primäre Hydroxyfunktionen am reaktivsten sind, ist es äußerst schwierig, selektiv die Position 9 der terminalen Neu5Ac innerhalb eines Kohlenhydratclusters mit weiteren primären Hydroxylfunktionen zu verestern. Die Alternative wäre ein chemoenzymatischer Weg, wobei ein entsprechendes CMP-Derivat der Neu5Ac mit Hilfe einer Sialyltransferase übertragen wird. Neben einer sehr aufwendigen Synthese von CMP-Neu5,9Ac₂ muß auch untersucht werden, ob die verwendete Transferase ein entsprechend modifiziertes Donorsubstrat erkennt und überträgt. Ein einfacher Weg zur Darstellung dieser hochkomplexen Oligosaccharide könnte die chemische Acetylierung von *p*NP-Neu5Ac und die anschließende Transglycosylierung mit Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* sein.

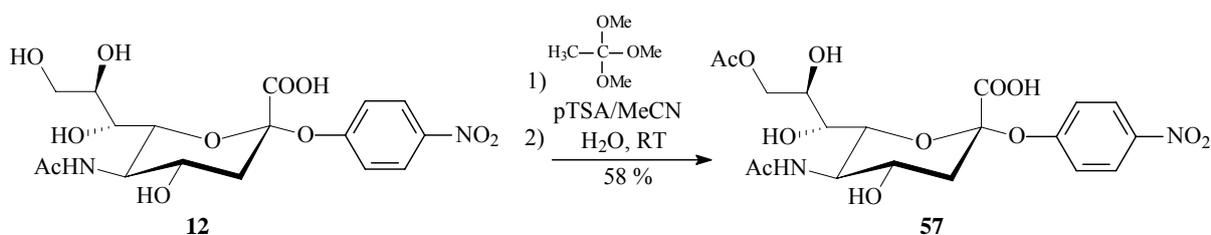


Abb. 42: Darstellung von *p*NP-Neu5,9Ac₂ durch eine säurekatalysierte Veresterung;¹²⁰

Die Synthese des 9-*O*-acetylierten Donorsubstrates erfolgte ausgehend von dem deblockiertem *p*NP-Neu5Ac **12**.¹²⁷ Ein eleganter und schneller Zugang zu dem gewünschten Produkt führt über einen entsprechenden Orthoester, der durch die Reaktion der terminalen OH-Gruppe der Neuraminsäure mit Trimethylorthoacetat selektiv dargestellt werden kann.^{128,129} Die Reaktion wurde unter milder Säurekatalyse (pTSA) in Acetonitril durchgeführt und der gebildete Orthoester *in situ* durch Hydrolyse in die gewünschte Zielverbindung überführt. Das

Produkt **57** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung in 58 % isoliert. Die Regioselektivität der Reaktion konnte durch NMR-Daten belegt werden.¹²⁷

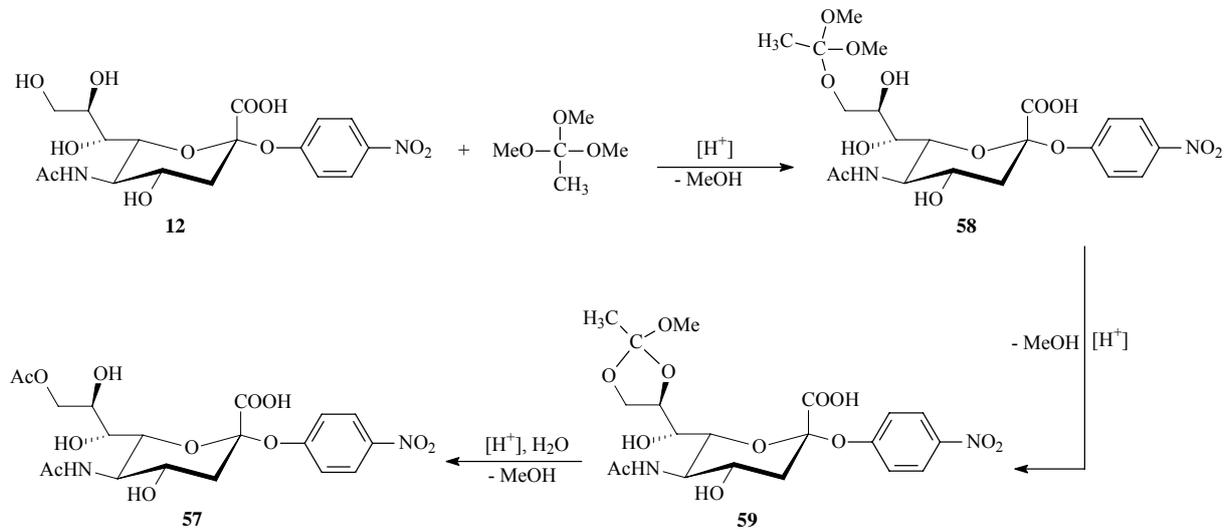


Abb. 43 Mechanistischer Verlauf der Reaktion zur Synthese von *p*NP-Neu5,9Ac₂¹²⁷

Mechanistisch betrachtet handelt es sich bei dieser Reaktion um eine säurekatalysierte Umesterung, bei der durch Protonierung zu erst ein Carbeniumion im Trimethylorthoacetat entsteht, das anschließend durch den Sauerstoff der primären OH-Funktion am Zucker angegriffen wird. Das entstehende Intermediat **58** wird durch eine weitere Abspaltung von MeOH in den Orthoester **59** überführt. Das gewünschte Zielprodukt **57** wird anschließend nach der wässrige Hydrolyse erhalten (s. Abb 43).

6.1 Enzymatische Transglycosylierung mit Trans-Sialidase

Im Rahmen der Diplomarbeit von A. Schroven¹²⁷ konnte gezeigt werden, dass *p*NP-Neu5,9Ac₂ von der Sialidase aus *Salmonella typhimurium* umgesetzt wird.

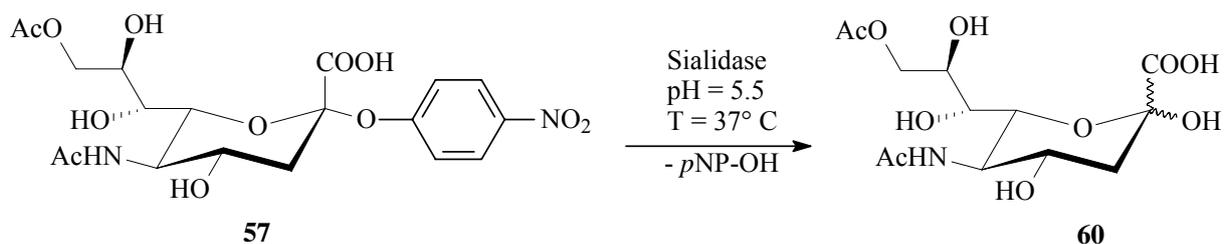


Abb. 44: Hydrolyseversuche mit Sialidase aus *Samonella typhimurium*

Dieses Ergebnis zeigte, dass auch eine Transglycosylierung durch Trans-Sialidase möglich sein könnte und dieses Donorsubstrat so auf ein Akzeptormolekül übertragbar wäre.

Das *O*-acetylierte Derivat der Neuraminsäure (**57**) wurde mit dem Lactosid **31** so wie mit dem Acetamidolactosamid **33** unter Biokatalyse mittels Trans-Sialidase umgesetzt. Auch diese Versuche fanden in Analogie zur Darstellung von sialylierten Oligosacchariden bei einem pH = 7.4 (Tris-HCl Puffer) und bei 23° C statt. Dabei zeigte sich, dass Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* auch das Donorsubstrat **57** erkennt. Auch diese enzymatische Transglycosylierung verlief in ausgeprägter Analogie zu der Glycosylierung des entsprechenden Neu5Ac Donorsubstrates.

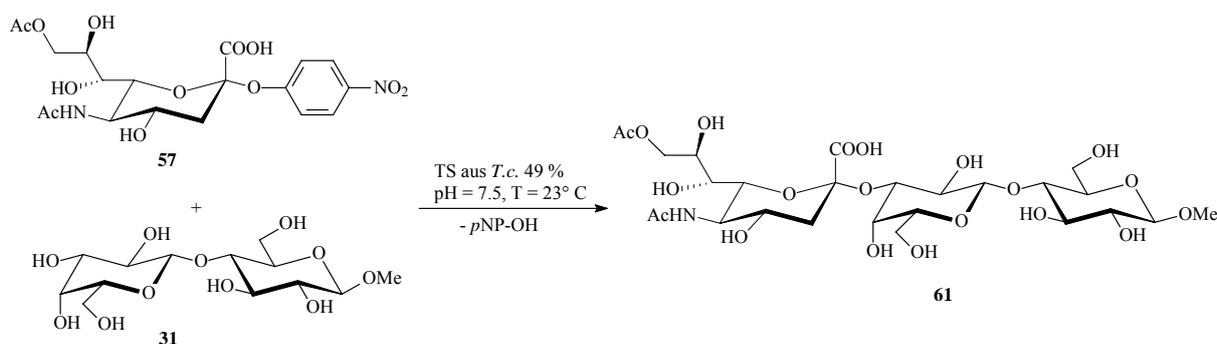


Abb. 45: Darstellung von Neu5,9Ac₂-α2-3-Galβ1-3Glcβ-OMe mit Hilfe von Trans-Sialidase

Das Trisaccharid **61** konnte in sehr guter Ausbeute von 49 % isoliert werden. Die Reinigung gelang durch eine Gelpermeationschromatographie (Biogel P-2). Die Transglycosylierung verlief hoch regio- und stereospezifisch, denn anhand der NMR-Daten konnte das gebildete α2-3 Glycosid eindeutig nachgewiesen werden. Während im ¹H-NMR durch die chemische Verschiebung der Protonen an C-3 der Sialinsäure die α-glycosidische Bindung angezeigt wurde, lieferte ¹³C-NMR Experimente den Beweis, dass C-3' an der Bindung beteiligt ist. Das entsprechende Signal verschob sich um 3.2 ppm zu tieferem Feld. In Analogie zu der Umsetzung der kettenverkürzten Donorsubstrate scheint auch eine Derivatisierung der Seitenkette keinen wesentlichen Einfluß auf die Erkennung durch Trans-Sialidase zu haben.

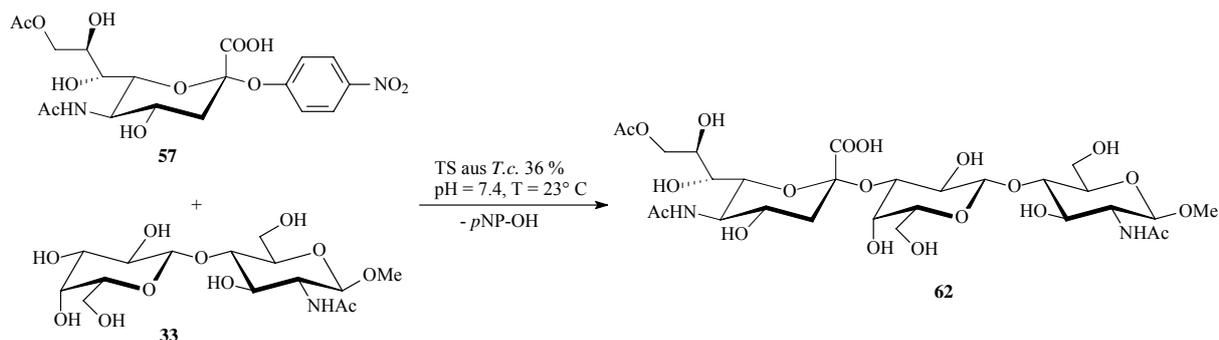


Abb. 46: Darstellung von Neu5,9Ac₂- α 2-3-Gal β 1-3GlcNAc β -OMe mit Hilfe von Trans-Sialidase

In einer weiteren enzymatischen Umsetzungen wurde das Acetyllactosamid **33** mit *p*NP-Neu5,9Ac₂ **57** zu dem entsprechenden Trisaccharid **62** umgesetzt. Die Reaktion fand unter den gleichen Bedingungen statt wie die Synthese des Trisaccharides **61** und es gelang, das erwartete Produkt in guten Ausbeuten von 36 % durch Gelpermeationschromatographie zu isolieren (s. Abb. 46). Der Transfer verlief regio- und stereoselektiv, was auch in diesem Fall spektroskopisch nachgewiesen werden konnte.

Durch eine einfache Synthese des Donorsubstrates in Kombination mit einer bequemen enzymatischen Transglycosylierung zu höheren Oligosacchariden, ist eine Möglichkeit gegeben, Oligosaccharide von besonderem biologischen Interesse zu synthetisieren. Die Ausbeuten in den Transglycosylierungen sind gut bis sehr gut, die entsprechenden Produkte lassen sich im Milligrammaßstab problemlos synthetisieren und sind somit zugänglich, um sie zum Beispiel *in vitro* auf ihre biologischen oder biochemischen Bedeutung hin zu untersuchen.

7. Synthese und Modifizierung von KDN als potentieller Donor

In den letzten Jahren ist Ketodesoxyonulosonsäure (KDN) –die desaminierte Form der Neuraminsäure– als Bestandteil vieler Glycokonjugate nachgewiesen worden. Zuerst wurde KDN als Strukturelement eines Polysialoglycoproteins in den Ovarien von Forellen gefunden.¹³⁰ In den darauf folgenden Jahren zeigte sich, dass KDN im Tierreich weit verbreitet ist und es sogar auf Glycoproteinen und -lipiden von Säugetieren vorkommt. Von besonderem Interesse ist die Tatsache, dass auch KDN vermehrt von Krebszellen wie denen des humanen Lungencarcinoms exprimiert wird.¹³¹ Außerdem ist KDN auch als Bestandteil von bakteriellen Kapsel-Polysacchariden und in bakteriellen LPS nachgewiesen worden.¹³²

KDN-Reste, die die terminale Position in Glycoconjugate besetzen, haben einzigartige Eigenschaften und biologische Funktionen, die sich von denen der Neu5Ac unterscheiden. Es gibt zum Beispiel deutliche Hinweise, dass die glycosidische Bindung von KDN resistent gegen den Angriff von Sialidasen ist und somit ein entsprechendes KDN-Glycoconjugat gegen den Angriff von Bakterien oder Viren geschützt ist.¹³³ Des Weiteren führt die Addition von KDN an das nicht reduzierende Ende von Polysialylderivaten zu einer Inhibition der weiteren Verlängerung der Polysialylkette. Es wird davon ausgegangen, dass KDN als eine Art biologisches Stoppsignal für Polysialyltransferase dient.¹³⁴

Aufgrund dieser speziellen biologischen Funktionen und für das weitere Verständnis der biologischen Bedeutung ist ein einfacher synthetischer Zugang zu KDN-Oligosacchariden von Interesse. Durch chemische Synthesen gelang es zur Zeit KDN in nur kleine glycosidische Strukturen und Oligosaccharide einzuführen.^{135,136} Auch in der Synthese von KDN-Oligosacchariden scheint der chemoenzymatische Weg der effizienteste zu sein. Der Vorteil einer enzymatischen Synthese liegt vor allem darin, dass die Reaktion unter physiologischen Bedingungen abläuft, so dass auch komplexere Verbindungen wie Hormone oder Wachstumsfaktoren unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität umgesetzt werden könnten. KDN-Transferasen sind nur sehr schlecht verfügbar und die einzige bekannte aktive Transferase ist die aus den Ovarien der Regenbogenforelle. Als Alternative bieten sich verschiedene Sialyltransferasen an, die relativ unspezifisch Donorsubstrate umsetzen.¹³⁷ Auf diese Weise gelang auch die Synthese von verschiedenen KDN-Glycoconjugaten, bei der CMP-KDN mit Sialyltransferasen aus verschiedenen Quellen in α 2-3- bzw. α 2-6-Glycoside überführt wurden.^{138,139}

Allerdings zeigen die Glycosylierungen mit Sialyltransferase die schon beschriebenen Nachteile. Die Darstellung von CMP-KDN ist sehr komplex und bedarf entweder eines rein enzymatischen Ansatzes, wobei in einem ersten Schritt aus Mannose und Pyruvat durch eine Aldolase KDN dargestellt wird, dass im weiteren enzymatischen Schritten in das CMP Derivat überführt wird. Als Alternative kann KDN auch chemisch synthetisiert werden, um anschließend in das gewünschte CMP-Derivat überführt zu werden. Diese Synthesestrategie ist zwar möglich und scheint für Synthesen im biochemischen Maßstab durchaus geeignet zu sein, nur sind die Gesamtausbeuten, so weit sie überhaupt publiziert sind, sehr klein. Es wäre daher eine effiziente Alternative entsprechende KDN- α 2-3-Oligosaccharide mit Hilfe von Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* zu synthetisieren. Es ist außerdem interessant Untersuchungen zur Hydrolyse von *p*NP-KDN durch bakterielle Sialidase durchzuführen, da die Ergebnisse zur Zeit noch kontrovers diskutiert werden. Während zum einen die Meinung vertreten wird, KDN schütze als maskierendes Element Oligosaccharide vor Sialidasen, so postulieren Ogura *et al.* eine Hydrolyse von KDN-Arylglycosiden durch bakterielle Sialidasen.¹⁴⁰

7.1 Synthese von KDN und Darstellung des *p*NP-Glycosides

Da sich KDN auf enzymatischen Wege nicht in ausreichenden Mengen synthetisieren läßt, wurde die chemische Methode gewählt. Die erste chemische Synthese von Neu5Ac gelang Cornforth *et al.* durch eine Aldolreaktion von ManNAc mit Oxaloesigsäure in 2 % Ausbeute.¹⁴¹ Diese Reaktion ist auch auf KDN anwendbar und Ogura *et al.* konnten die Synthese in 23 % Ausbeute durchzuführen.¹⁴²

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. P. Kosma an der Universität für Bodenkultur in Wien wurde die Synthese nach der Ogawa-Methode durchgeführt. Es gelang KDN stereoselektiv in 39 % Ausbeute zu isolieren (s. Abb. 47).

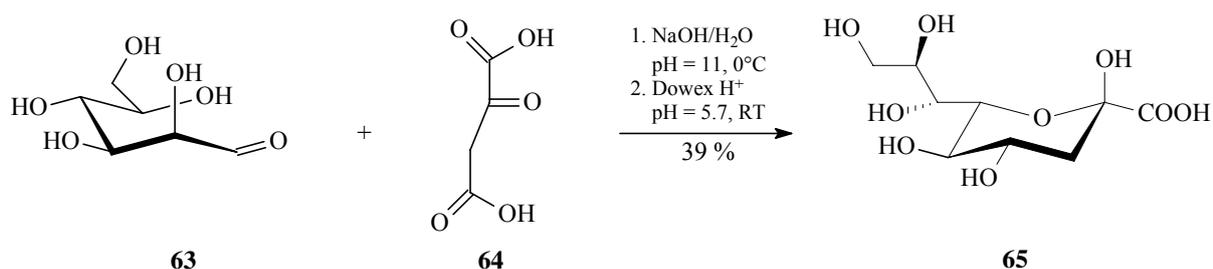


Abb. 47: Darstellung von KDN in Analogie zur Cornforth-Methode¹⁴¹

Unter der Beachtung des Reaktionsmechanismus (s. Abb. 48) wird deutlich, dass die Reaktion trotz des stereochemischen Anspruchs in guter Ausbeute gelang. Zumal bei der Aufreinigung des Produktes durch Ionenaustauschchromatographie immer Produkt verloren geht und es zu einem erheblichen Anteil an Mischfraktionen kommen kann.

In einem ersten Schritt (s. Abb. 48) bildet sich bei $\text{pH} = 11$ das Enolat der Oxallessigsäure (**66**), welches den Carbonylkohlenstoff der Mannose angreift. In Abhängigkeit von der Orientierung des Enolates während des Angriffes bildet sich das gewünschte Intermediat **67** oder das entsprechende Epimere, welches an Position 4 eine axiale Alkoholatfunktion trägt und im Laufe der Reaktion zur Verbindung **68** umgewandelt wird. Das Zwischenprodukt **67** wird im leicht saurem Milieu anschließend decarboxyliert und es entstehen KDN (**65**) und das entsprechende Epimer **68**. Der in Abb. 47 angegebene pH-Wert ($\text{pH} = 5.7$) ist dabei exakt einzuhalten, da ein zu niedriger pH-Wert die Spaltung des Moleküls zur Folge hätte, während ein zu hoher pH-Wert eine vollständige Decarboxylierung gefährdet.

Die Isolierung von KDN gelang nach Abbruch der Synthese durch Ionenaustauschchromatographie (Dowex 1x8), wobei das Produkt mit einem Gradienten ($\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{H}_2\text{O}$) eluiert wurde.

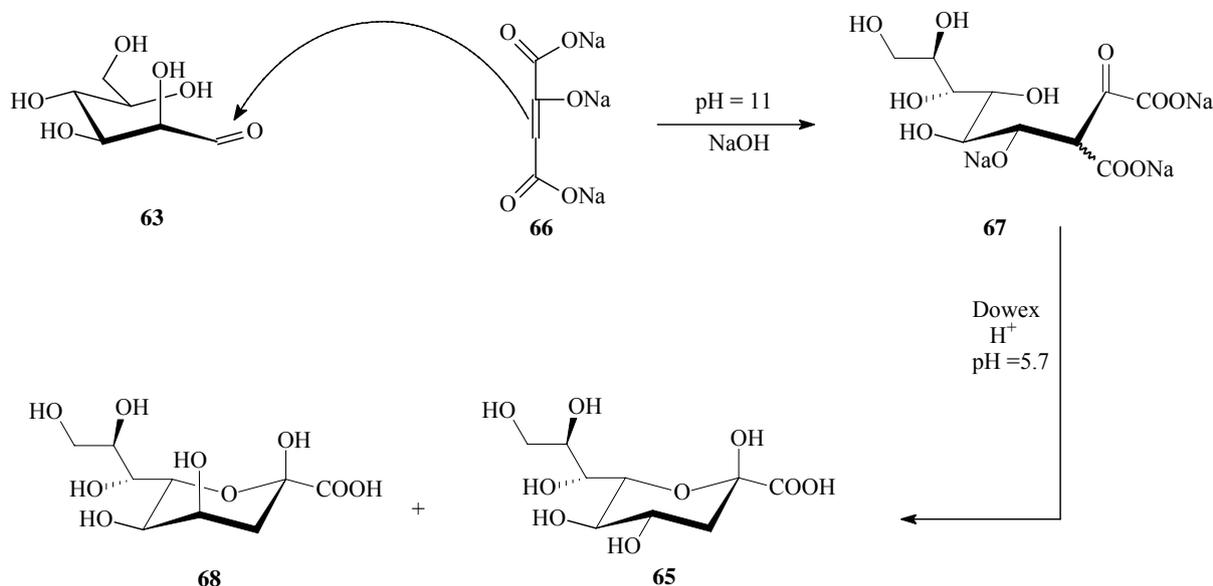


Abb. 48: Mechanismus zur Synthese von KDN

Um aus der dargestellten KDN ein potentielles Donorsubstrat für Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* zu synthetisieren, muß diese in ein *p*NP-Glycosid überführt werden.

Dabei wurde ein ähnlicher Weg gewählt, wie bei der Darstellung des entsprechenden Neu5Ac Derivates **12**. Um eine Aktivierung der Carboxylfunktion des KDN zu verhindern, darf diese in einem ersten Schritt nicht blockiert werden, sondern es müssen erst die OH-Funktionen peracetyliert werden, bevor dann die Carboxylatfunktion in einen Ester überführt werden kann. Da gezeigt wurde, dass einige Derivate von KDN stabiler sind als die entsprechenden Verbindungen von Neu5Ac, ist die COOH-Funktion in den Benzylester überführt worden.¹⁴⁰ Die Chlorierung der geschützten Verbindung gelang hingegen problemlos durch AcCl in Anwesenheit von MeOH. Dieser aktivierte Precursor konnte nach säulenchromatographischer Reinigung in sehr guten 70 % Ausbeute über drei Stufen isoliert werden.

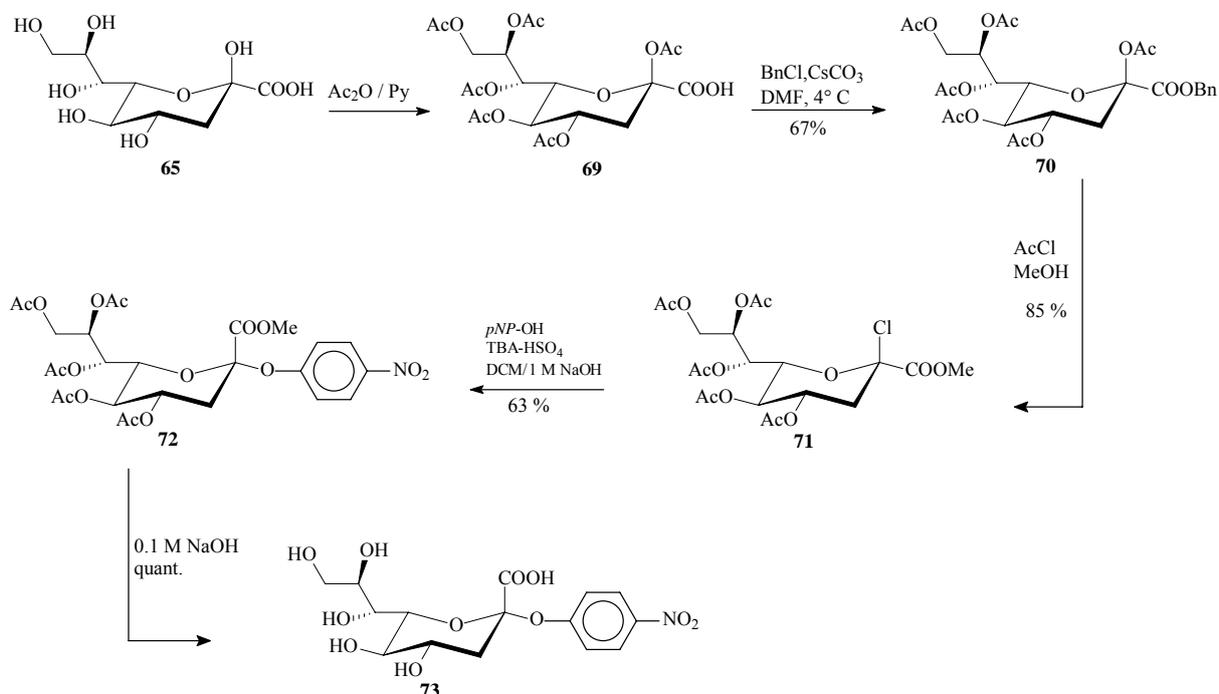


Abb. 49: Syntheseweg für das Donorsubstrat *p*NP-KDN

Mit der Darstellung des Glycosides **72** konnte gezeigt werden, dass es auch durch Phasentransferkatalyse möglich ist, arylische KDN-Glycoside zu synthetisieren (Abb. 49). Wie schon bei der Neuraminsäure verläuft diese Reaktion auch hier stereoselektiv, da nur das α -Glycosid gebildet wird. Dies lässt sich durch die NMR-Analytik belegen, bei der im ^1H -Spektrum das H-3_{eq} , aufgrund der Anisotropie der Carbonylfunktion am C-1 bei 2.85 ppm, erscheint. In einem vergleichbarem β -Glycosid würde dieses Signal zu höherem Feld verschoben sein. Die anschließende Verseifung der Esterfunktionen verlief quantitativ bei

Raumtemperatur mit wäßriger NaOH. Hierbei zeigte sich, dass der Benzylester eine sehr gute Alternative zum Methyl ester darstellt. Im Falle des Methyl esters wäre eine Deblockierung in einem Schritt wohl nicht so leicht möglich gewesen, da dieser weniger hydrolyseempfindlich ist.

7.2 Untersuchung zur enzymatischen Erkennung von *p*NP-KDN

Nach der Synthese des *p*NP-KDN wurden Untersuchungen zur Hydrolyse mit Sialidase aus *Salmonella typhimurium* unternommen.

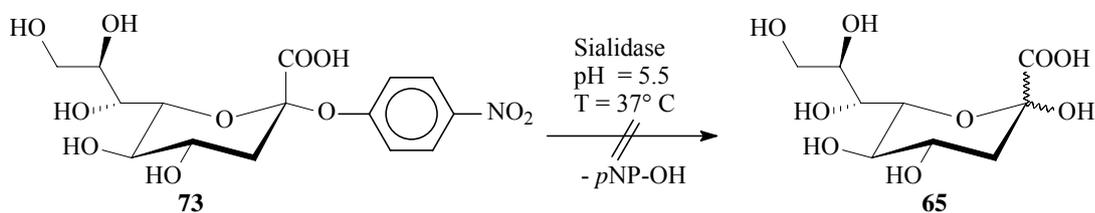


Abb. 50: Hydrolyseversuch von *p*NP-KDN mit Sialidase aus *Salmonella typhimurium*

Da nach 12 stündiger Inkubation noch keine Hydrolyse des Produktes nachweisbar war, wurde die Inkubationszeit auf 24 Stunden verlängert ohne dass sich eine Veränderung zeigte. Das Glycosid **73** wurde durch die Sialidase aus *Salmonella typhimurium* nicht als Donorsubstrat erkannt.

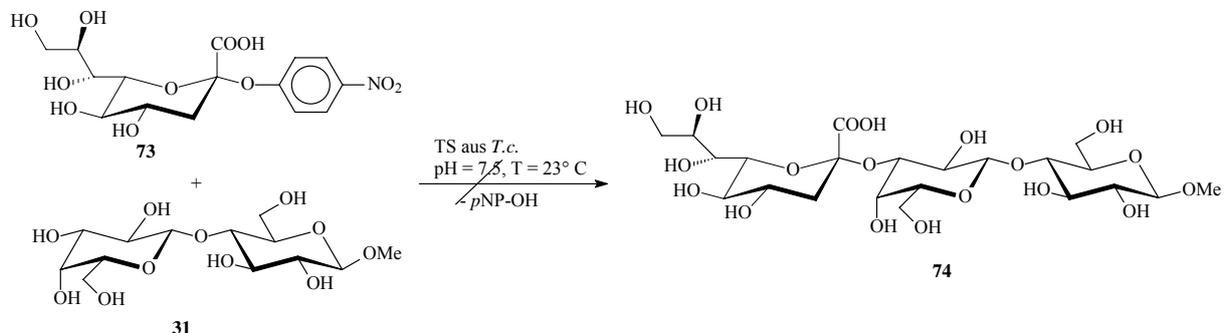


Abb. 51: Versuch der Darstellung eines KDN- Oligosaccharids

Demnach wurde in einem weiteren Versuch *p*NP-KDN mit dem Lactosid **31** unter der Katalyse von Trans-Sialidase umgesetzt. Die Inkubation fand bei einem pH = 7.4 (Tris-HCl Puffer) und bei 23° C statt. Dabei wurden 20 µmol Donorsubstrat **73** mit einem leichten Überschuß von 1.1 Äquivalenten des Akzeptorsubstrates umgesetzt. Nach 16 Stunden war dünnschichtchromatographisch weder eine Produktbildung noch die Bildung von Hydrolyseprodukten zu beobachten. Auch für die Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* ist *p*NP-KDN **73** offenbar kein geeignetes Substrat.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass das Glycosid **73** sowohl für die Sialidase als auch für die Trans-Sialidase kein geeignetes Substrat darstellt. Im Unterschied zu Neu5Ac verfügt KDN über keine N-Acetyl-Funktion. Die Substitution der N-Acetylgruppe an Position 5 durch eine freie Hydroxylgruppe führt zu einer Veränderung der Polarität im Molekül. Es kommt zu Wechselwirkungen in der Bindungstasche des Enzyms zwischen den Aminosäuren im Protein und der N-Acetylgruppe, die das Molekül fixieren.¹⁴³ Diese Wechselwirkungen ermöglichen unter anderen einen nucleophilen Angriff in der Enzymtasche. Was das entscheidende Kriterium für diese Beobachtung ist, ob nun die Größe des Moleküls oder elektronische Effekte verantwortlich sind, muß in weiteren Experimenten untersucht werden. Des weiteren lieferten diese enzymatischen Versuche ebenfalls Hinweise auf die biologische Bedeutung von KDN in Glycoconjugaten. Es ist anzunehmen, dass KDN einen maskierenden Effekt hat und in der Lage ist, Glycoconjugate vor dem Angriff von verschiedenen Sialidase zu schützen. Die hier verwendete Sialidase ist bakterieller Herkunft, daher sind auch hier Untersuchungen mit viralen oder humanen Sialidasen erforderlich, um diese Hypothese zu untermauern.

8. Synthese und Untersuchungen phenolischer Neu5Ac-Glycoside

In dieser Arbeit sind kinetische Erkenntnisse in die Untersuchungen zur Synthese der verschiedenen Oligosaccharide bis jetzt nicht weiter eingeflossen. Dabei zeigen die nicht natürlichen Donorsubstrate wie *p*NP-Neu5Ac und MU-Neu5Ac eine sehr viel schlechtere Kinetik als ein natürliches Substrat wie z. B. Sialyllactose (s. Abb. 52).

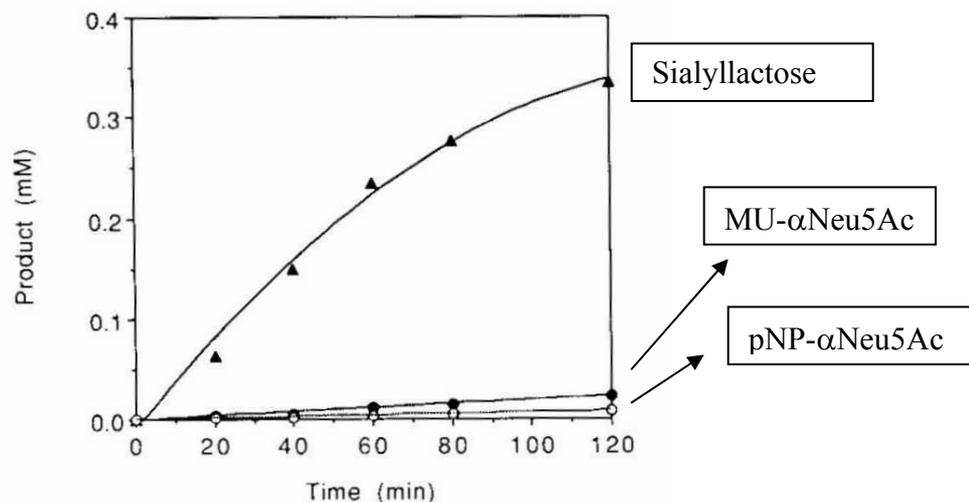


Abb. 52: Transferaktivität von Trans-Sialidase bei verschiedenen Sialyldonoren³⁵

Trotz der deutlich schlechteren Transferaktivität sind die artifiziellen Donoren für die Synthese komplexer Oligosaccharide sehr gut geeignet, weil sie nur über eine aktivierende Abgangsgruppe verfügen. Freie Phenole werden nicht als Akzeptorsubstrate erkannt und daher auch nicht übertragen. Ganz anders stellen sich die Verhältnisse bei der Lactose dar. Sialyllactose ist zwar das beste Donorsubstrat, freie Lactose verfügt aber über ausgeprägte Akzeptoreigenschaften. Ein weiterer großer Vorteil der phenolischen Donorsubstrate ist die Möglichkeit, die Reaktion mittels UV-Vis Spektroskopie zu verfolgen und auf diese Weise kinetische Daten zu erhalten. Bei Lactose bzw. Sialyllactosid erfolgte die Reaktionsanalytik unter Verwendung spezifischer radioaktiver Meßmethoden, wobei eine ¹⁴C-gelabelte Lactose eingesetzt wurde.³⁵ Diese Methode ist mit einem erheblichem Aufwand an Geräten verbunden, die Strahlung detektieren können aber auch gleichzeitig die Strahlung abschirmen. Möglichkeiten zur Messung nach dieser Methode waren im Rahmen dieser Arbeit nicht gegeben.

Der größte Nachteil der nicht-natürlichen Donorsubstrate (MU- und *p*NP-Neu5Ac) besteht in ihrer relativ schlechten Löslichkeit in Wasser, so dass die Konzentration an Donorsubstrat stark limitiert ist. In diesem Teil der Arbeit sollen die Synthese neuartiger phenolischer Glycoside und ihrer Donoraktivitäten mit Sialidase und Trans-Sialidase untersucht werden. Ziel war es, eine bessere Löslichkeit und Aktivität als bei den bekannten Donorsubstrate **12** und **13** zu erreichen.

8.1 Darstellung phenolischer Neu5Ac Glycoside

Ausgehend von dem peracetylierten Sialylchlorid **14** gelang es eine Vielzahl an unterschiedlichen Glycosiden herzustellen. Es wurde deutlich, dass sich alle glycosidischen Bindungen mit phenolischem Komponenten unter phasentransferkatalytischen Bedingungen knüpfen ließen.^{144,145}

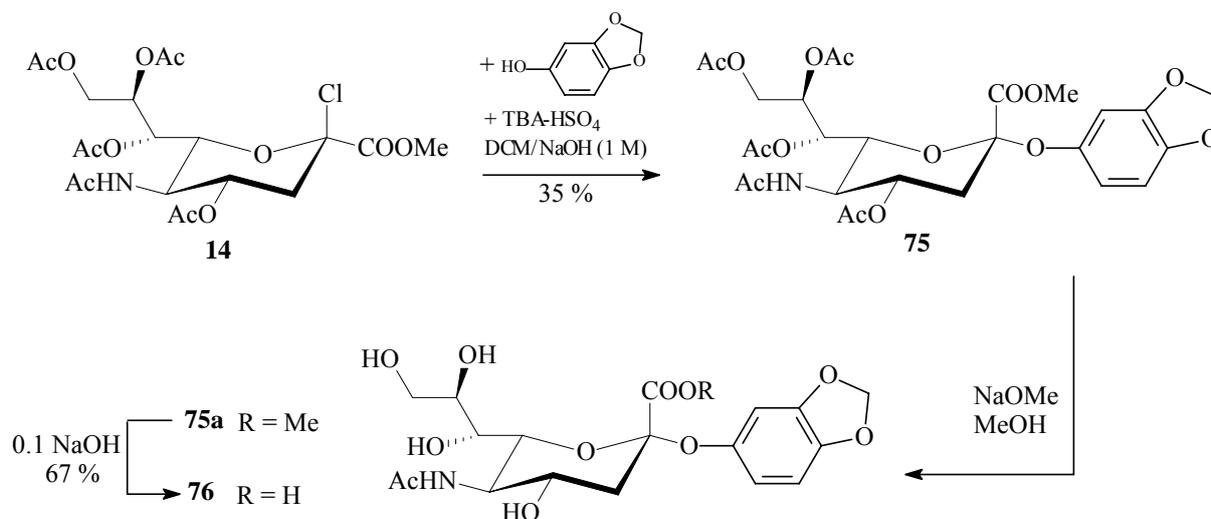


Abb. 53: Einführung von Sesamol als potentiell aktivierende Abgangsgruppe

Die Glycosylierung in Abb. 53 verlief in guter Ausbeute, wobei das blockierte Produkt **75** stereoselektiv als α -Glycosid isoliert werden konnte. Es zeigt sich hier, dass das Phenolat des Sesamols eine schlechtere Nucleophilie aufweist, als zum Beispiel *p*NP-OH. Die anschließende Deblockierung gelang ebenfalls in guten Ausbeuten, da unter Zemplén-Bedingungen auch die glycosidische Bindung angegriffen wurde. Nach säulenchromatographischer Reinigung gelang die milde Verseifung mit Natronlauge annähernd quantitativ

und das deblockierte Produkt **76** konnte auf seine Enzymaktivität getestet werden. In folgenden Versuchen gelang es nicht, das Methylenacetal an dem phenolische Aglycon selektiv zu spalten und somit die Dihydroxyfunktionalität einzuführen. Die säurekatalytische Deacetalisierung führte sowohl bei dem komplett geschützten, als auch bei dem freien Glycosid zur Abspaltung des Sesamolrestes. Damit war eine Modifizierung der Abgangsgruppe, die die Löslichkeit des freien Phenols erhöht hätte, nicht möglich.

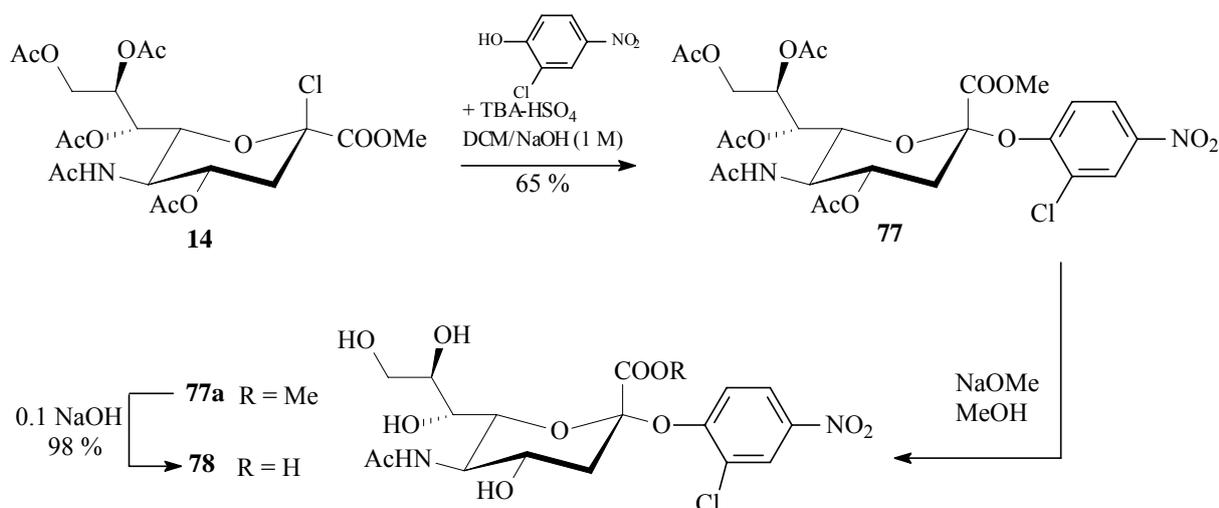


Abb. 54: Synthese des 2-Chlor-nitrophenylglycosids als potentielles Donorsubstrat für enzymatische Synthesen

Anhand der NMR-Spektren konnte nachgewiesen werden, dass die Glycosylierung stereoselektiv zum α -Anomer **77** führte, wobei die sehr guten Ausbeuten auf die bessere Nucleophilie des entsprechenden Phenolats zurückzuführen sind. Durch den elektronegativen Chlorsubstituenten wird die Elektronendichte im aromatischen Ringsystem reduziert, wodurch die Bildung des Phenolats begünstigt wird. Die anschließende milde Deblockierung verlief über zwei Schritte in fast quantitativer Ausbeute. Es konnte anhand der dünnschichtchromatographischen Reaktionsverfolgung gezeigt werden, dass eine Reinigung des Produkts nicht erforderlich war und es in reiner Form anfiel. Das phenolische Glycosid **78** konnte enzymatischen Untersuchungen unterzogen werden.

Durch die Synthese eines 4-Chlor-5-methyl-2-nitrophenolglycosids ist ein relativ unpolares Donorsubstrat dargestellt worden (Abb. 55).

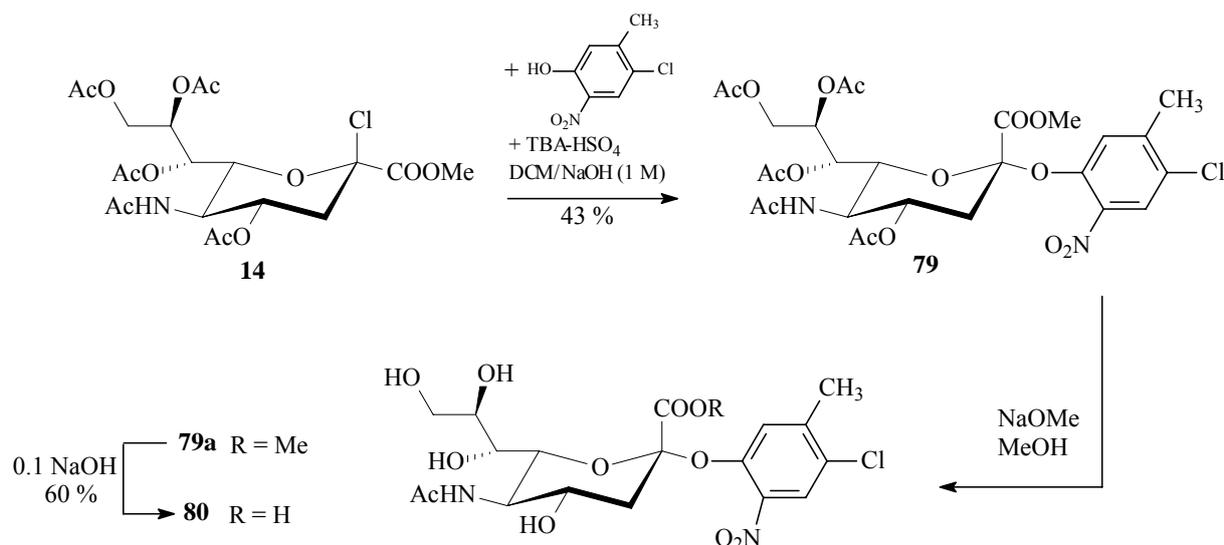


Abb. 55: Synthese des 4-Chlor-6-nitro-*m*-cresol-Neu5Ac-Glycosids

Der nucleophile Angriff des Cresolats ergibt das entsprechende Glycosid **79** in einer guten Ausbeute von 43 %. Trotz des großen sterischen Anspruches sowie der verringerten Polarität des Phenolats verläuft die Reaktion stereoselektiv und führt, durch NMR-Spektroskopie nachweisbar, ausschließlich zum α -Anomer. Die anschließende Deblockierung des Glycosids verläuft ebenfalls in mäßigen Ausbeuten von 60 % und führt somit zu dem potentiellen Donorsubstrat **80**. Als problematisch erwies sich die Deacetylierung nach Zemplén, wobei es zu einer teilweisen Spaltung des Glycosids kam. Die anschließende milde Hydrolyse des Methylesters verlief hingegen in annähernd quantitativen Ausbeuten und ermöglichte eine problemlose Isolierung der Verbindung **80**, die im weiteren auf ihre enzymatische Aktivität getestet wurde.

8.2 Untersuchungen zur enzymatischen Erkennung

Die Verbindungen sind im Vergleich mit *p*NP-Neu5Ac und MU-Neu5Ac auf ihre Enzymaktivität untersucht worden. Dabei wurden zuerst Hydrolyseversuche mit Sialidase aus *Salmonella typhimurium* unternommen, bevor die Verbindungen auf ihre Transfer-eigenschaften mit Trans-Sialidase aus *T. cruzi* getestet wurden.

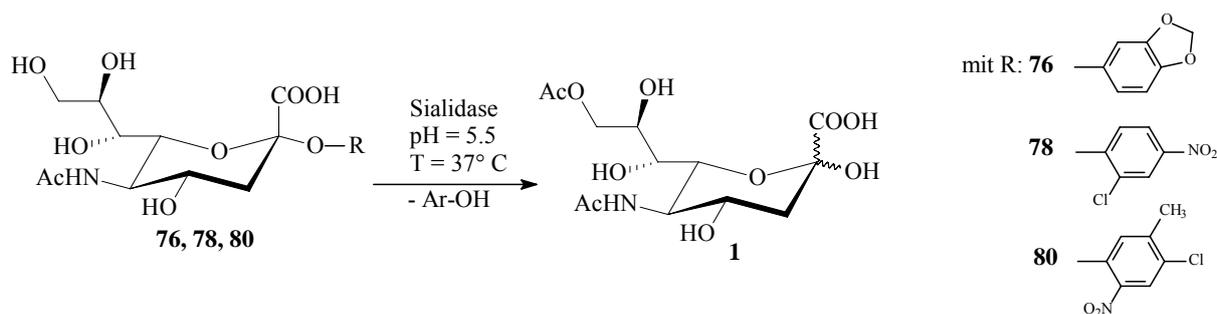


Abb. 56: Hydrolyseversuche der phenolischen Donorsubstrate mit Sialidase

Nach der Synthese der Verbindungen **76**, **78**, und **80** wurden Untersuchungen zur Hydrolyse mit der Sialidase aus *Salmonella typhimurium* vorgenommen. Dafür sind 15 μmol der Donorsubstrate **76**, **78** und **80** bei pH = 5.5 und 37° C mit 1 U Sialidase inkubiert worden. Die Reaktion wurde zuerst UV-Vis spektroskopisch verfolgt. Dabei sollte anhand des Adsorptionsmaximums und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes die Konzentration des freien Phenolats bestimmt werden. Als sich bei allen drei Verbindungen nach vier Stunden keine Veränderung in der Intensität bemerkbar machte, wurde der Ansatz weitere 12 Stunden inkubiert und anschließend dünschichtchromatographisch analysiert. Im Vergleich zu den Blindproben zeigte sich nur bei der Verbindung **80** eine partielle enzymkatalysierte Hydrolyse. Allerdings verfügte die phenolische Abgangsgruppe über eine geringe Löslichkeit, so dass sich ein Niederschlag gebildet hatte. Die Verbindungen **76** und **78** wurden dagegen nicht hydrolysiert. Es wird also deutlich, dass nicht jedes phenolische Glycosid gleichzeitig ein Donorsubstrat für Sialidasen darstellt. Selbst leichte Modifikationen wie die Einführung eines Chlorsubstituenten können dafür verantwortlich sein, dass es zu keiner Erkennung durch die Sialidase kommt. Im Rahmen seiner Dissertation wurde das Sesamol- β -galactosid von L. Kröger hergestellt und mit Galactosidase aus Rinderhoden auf die Hydrolyse und Transfereigenschaften untersucht. Überraschenderweise zeigt dort das Glycosid sowohl eine ausgeprägte Reaktivität in der enzymatischen Hydrolyse und auch bei der entsprechenden Transglycosylierung.¹⁰⁵

Obwohl die Sialidase die Verbindungen **76** und **78** nicht umgesetzt hat und das Phenol **80** sehr schlecht löslich ist, wurden diese Strukturen auf ihre Eignung als Donorsubstrate für Trans-Sialidase aus *T.-cruzi* getestet. Der Versuch der Umsetzung erfolgte mit dem Lactosid **31** bei einem pH = 7.4 (Tris-HCl Puffer) und bei 23° C. Der Verlauf der Reaktion wurde auch hier durch UV-Vis Spektroskopie verfolgt.

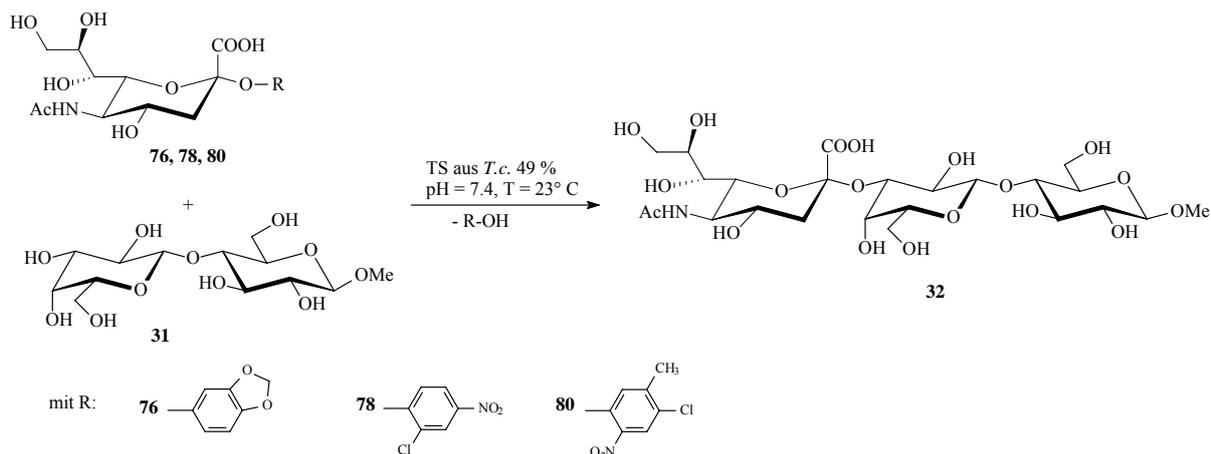


Abb. 57: Versuche zur Transglycosylierung mit Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi*

Nachdem keine Veränderungen in der Intensität der Banden zu sehen war, wurde die Inkubationszeit um 12 Stunden verlängert und anschließend dünnschichtchromatographisch untersucht. Es zeigte sich, dass keine der Verbindungen **76**, **78** und **80** durch Trans-Sialidase umgesetzt wurde. Diese Resultate zeigen eine Ähnlichkeit zu den Ergebnissen der Hydrolyseversuche mit Sialidase. Auch bei der Trans-Sialidase führen schon leichte Veränderungen am aromatischem Ringsystem zu einem Verlust der Reaktivität. Diese ist wahrscheinlich auf sterische und elektronische Veränderungen zurückzuführen. Durch die Substituenten vergrößert sich nicht nur der sterische Anspruch des Moleküls, sondern auch die Elektronendichte im aromatischen Ringsystem und damit auch die Polarität der potentiellen Abgangsgruppe. Diese Ergebnisse belegen, dass es ebenfalls zu Wechselwirkungen zwischen dem Aromaten und hydrophoben Aminosäuren aus dem Enzym kommt, die das Donorsubstrat ebenfalls in der Bindungstasche konformativ fixieren.

9. Enzymatische Eintopf-Transglycosylierungen

Die hohe Substratspezifität erlaubt es Enzymen in biologischen Systemen nebeneinander ihre Funktionen auszuüben. Gerade bei der Biosynthese der Kohlenhydrate und Glycoconjugate im Endoplasmatischem Reticulum, dem Golgi-Apparat und im Trans-Golgi-Netzwerk kommen eine Vielzahl von Enzymen nebeneinander vor, die sukzessiv und spezifisch komplexe Glycokonjugate synthetisieren. Die Reaktionen finden in den einzelnen Zellkompartimenten statt, in denen die Kohlenhydrate linear durch die entsprechenden Enzyme modifiziert werden. Die Kontrolle erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel aus Konzentrationsgradienten einhergehend mit einer reversiblen Inhibition der entsprechenden Enzyme.¹⁶

Mit zunehmender Verfügbarkeit in Kombination mit einem wachsenden mechanistischen Verständnis verschiedener Enzyme gelang es in den letzten Jahrzehnten Multienzymensysteme für die organische Synthese zu etablieren. Besonders die Darstellung komplexer Strukturen ist durch die parallele Verwendung mehrerer Enzyme vereinfacht worden. Als Beispiel sei die Synthese von CMP-Neu5Ac angeführt.

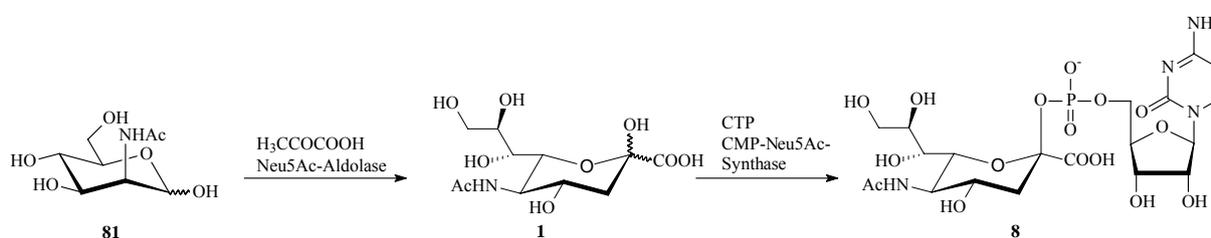


Abb. 58: Enzymatische Synthese CMP-Neu5Ac mit Hilfe einer Aldolase und einer Synthase

Die in Abb. 58 beschriebene Synthese kann nach unterschiedlichen Methoden erfolgen: Nach der Aldolkondensation von *N*-Acetylmannosamin **81** mit Pyruvat durch eine Aldolase kann Neu5Ac isoliert werden. Eine Reinigung des Produkts ist nicht unbedingt erforderlich, so dass nur vorgereinigte Neu5Ac in einem weiteren Schritt in CMP-Neu5Ac überführt werden kann. Bei dieser Synthesemethoden wird das CMP-Neu5Ac isoliert und über eine Ionenaustauschersäule gereinigt.^{146,147} Eine elegantere Methode zur Darstellung von CMP-Neu5Ac ist ein Multienzymansatz in einem Reaktionsgefäß. Dabei findet sowohl die Aldolreaktion als auch die Darstellung von CMP-Neu5Ac nacheinander im gleichen Ansatz statt. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass das gebildete Neu5Ac von der Synthase

sofort in CMP-Neu5Ac überführt wird. Die Ausbeute bei dieser Methode sind überraschend hoch, da Neu5Ac durch das Nucleotid maskiert wird und somit aus dem Gleichgewicht der Aldolreaktion entzogen wird. Denn die Aldolase zeigt ihre ausgeprägte Lyase-Aktivität nur für Neu5Ac und nicht für CMP-Neu5Ac.

In der Oligosaccharidsynthese ist die Anwendung kombinierter Enzyme ebenfalls möglich. Nach der oben beschriebenen Eintopf-Synthese von CMP-Neu5Ac lassen sich verschiedene sialylierte Lactoside herstellen.^{64, 148, 149}

Verschiedene kombinierte Synthesen mit Glucosidasen und Sialyltransferasen wurden in der Vergangenheit durchgeführt.^{148,149} Dabei gelang die Synthese des T-Antigenepitopes in 36 % Ausbeute. In dieser Synthese wurde in einem ersten enzymatischen Schritt der Sialylakzeptor dargestellt. Galactosidase aus Rinderhoden katalysiert dabei die Transglycosylierung von *p*NP-Gal mit *N*-Acetyl-galactosamin zu dem entsprechenden β 1-3-Disaccharid **83** (Abb. 59).

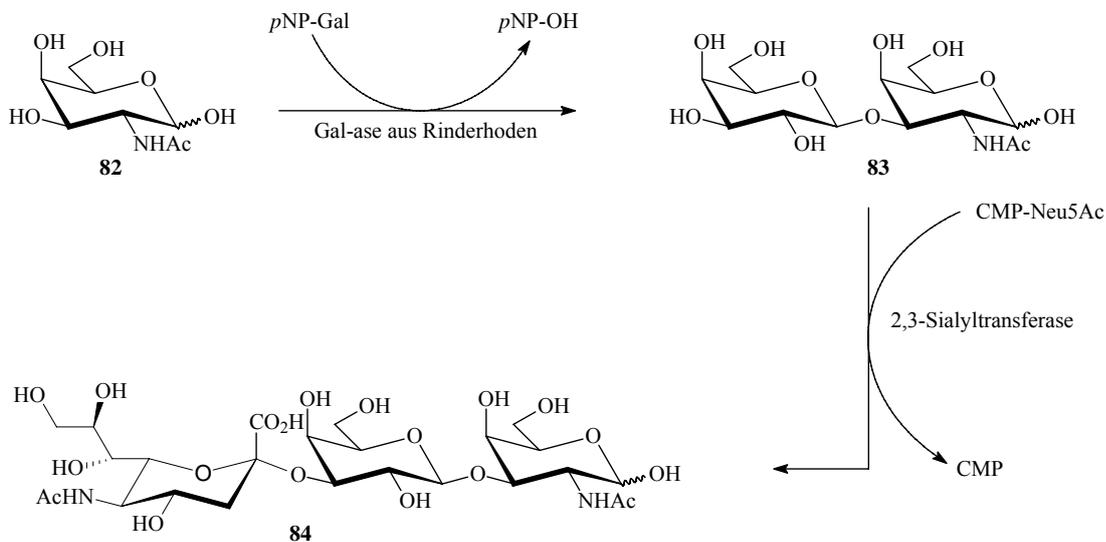


Abb. 59: Schematische Darstellung der Eintopf-Tandem-Glycosylierung in einer Gesamtausbeute von 36 %

Dieses wird dann von einer Sialyltransferase selektiv mit CMP-Neu5Ac zur T-Antigen-Determinante **84** umgesetzt. Eine Tandem-Eintopf Methode ist nur dann möglich, wenn die Aktivität und die Selektivität der Galactosidase groß genug ist, um genügend Disaccharid zu synthetisieren und wenn, wie in diesem Fall, eine ausschließliche Sialylierung des

Disaccharids **83** erfolgt. Das Produkt **84** wurde in einem einzigen Reinigungsschritt von den Enzymen und den Edukten getrennt.¹⁴⁹

Eine ähnliches Konzept ist auch mit Trans-Sialidase aus *T. cruzi* verfolgt worden, da die Trans-Sialidase unter den verwendeten Bedingungen nur Gal- β -R Disaccharide sialyliert, während Monosaccharid Glycoside nicht als geeignete Rezeptoren erkannt wurden. Es sollte daher möglich sein, in einem auf die Trans-Sialidase abgestimmten Puffersystem, in einem ersten Schritt ein Akzeptordisaccharid zu erzeugen, das anschließend zu dem entsprechenden sialylierten Oligosaccharid umgesetzt wird. Da sich im Rahmen dieser Arbeit zeigte, dass lactosidisch verknüpfte Disaccharide die größere Akzeptoraktivität haben, wurde die β 1-4-verknüpfende β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* eingesetzt. Dieses Enzym ist erstmals 1992 untersucht worden und zeigte mit 96 % eine außergewöhnlich hohe Regioselektivität.¹⁵⁰ Außerdem zeigte sich, dass die Galactosidase unter pH-neutralen Bedingungen die größte Transferaktivität hat. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass die optimalen Bedingungen für die Galactosylierung eines N-Acetylglucosamids vorliegen, wenn das Donor/Akzeptor-Verhältnis auf 5:1, der pH-Wert auf 7.0 und die Inkubationstemperatur auf 30° C eingestellt sind. Die Ausbeuten lagen bei diesen Synthese bei ca. 50 % und einer Regioselektivität von mehr als 90 %.^{110,151,152} Es konnte gezeigt werden, dass die Temperatur einen großen Einfluß auf die Reaktion hat. In 42 % Ausbeute wurde LacNAc mit der Galactosidase aus *B. circulans* bei einer Temperatur von 15 °C in reinem Puffer synthetisiert. Allerdings lag bei dieser Reaktion der pH-Wert jenseits des pH-Optimums der Trans-Sialidase.¹⁵³ Die Galactosidase aus *B. circulans* erschien ein geeignetes Enzym für einen Multienzym-Ansatz zu sein, da sie sowohl Variationen des pH-Wertes als auch der Temperatur erlaubt und die Reaktionsbedingungen somit auf die Trans-Sialidase abgestimmt werden konnten.

9.1 Synthese von Neu5Ac α 2-3-Gal β 1-4GlcNAc- α OAllyl

In einem ersten Versuch sollte untersucht werden, ob es möglich ist, in einem Eintopf-Verfahren Neu5Ac- α 2-3-Gal- β 1-4GlcNAc- α OAllyl mit Hilfe der Galactosidase aus *B. circulans* und Trans-Sialidase aus *T. cruzi* herzustellen. Das benötigte α -Allyl-GlcNAc ist im Vorfeld dieser enzymatischen Synthese mittels Fischer-Glycosylierung von GlcNAc und Allylalkohol unter saurer Katalyse in einer Ausbeute von 56 % dargestellt worden.

In einem ersten Schritt würde *p*NP-Gal unter Katalyse von Galactosidase aus *B. circulans* bei pH = 7.5 und T = 23° C mit dem Allyl-glycosid **85** umgesetzt. Dabei wurde ein Donor/Akzeptor-Verhältnis von 1:5 gewählt. Im Rahmen von Optimierungsversuchen und dünnschichtchromatographischen Analysen erwies sich, dass nach 36 Stunden genügend Disaccharid **86** gebildet worden war, um effizient mit Trans-Sialidase *in situ* sialyliert zu werden. Nach 36 Stunden wurden 20 mmol *p*NP- Neu5Ac gefolgt von 200 µg Trans-Sialidase aus *T. cruzi* in das Reaktionsgemisch gegeben. Die anschließende Inkubation erfolgte für weitere 12 Stunden.

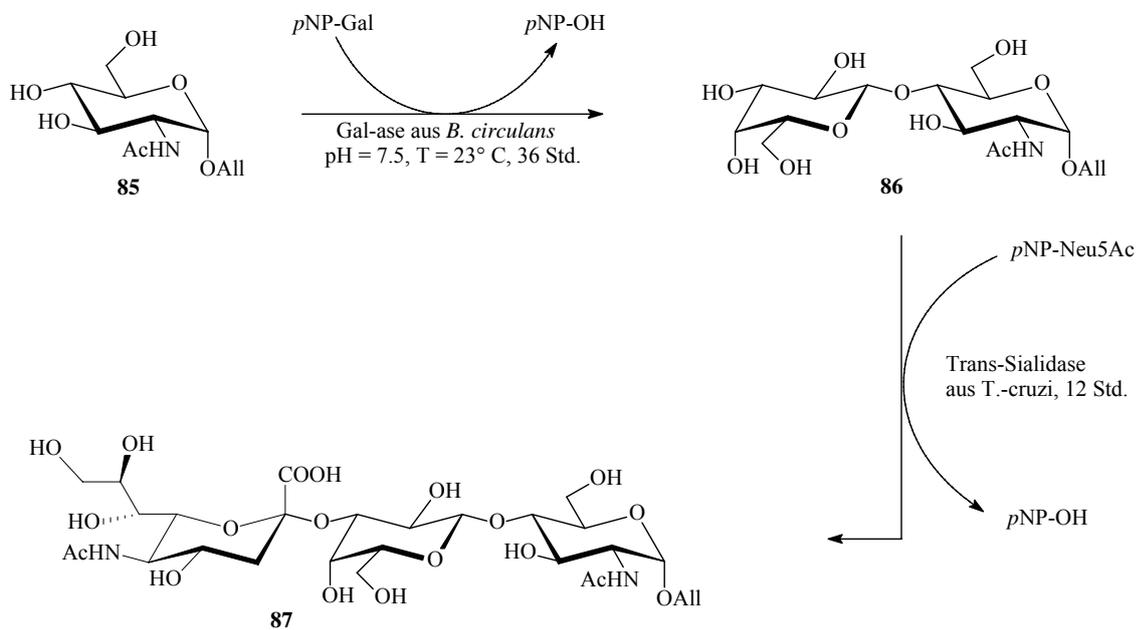


Abb. 60: Enzymatische Eintopfsynthese von Neu5Ac-α2-3-Gal-β1-4GlcNAc-αOAllyl in 17 % Ausbeute

Durch die endständige Allylfunktion gelang eine sehr effiziente Vorreinigung des Produktes durch Reverse-Phase-Chromatographie (RP-18). Das Produkt **87** wurde dabei zusammen mit der ebenfalls entstandenen freien Neuraminsäure eluiert, während sowohl die Monosaccharide **85** und die freie Galactose als auch das Lactosid **86** entfernt werden konnten. Die Isolierung des sialylierten Trisaccharids **87** gelang durch Gelpermetionschromatographie (Biogel P-2), und das Produkt konnte in 17 % Ausbeute bezogen auf *p*NP-Neu5Ac gewonnen werden. Interessanterweise kam es zu keiner nachweislichen Bildung sialylierter Disaccharide. Dieses hängt vermutlich damit zusammen, dass der größte Teil des *p*NP-Gal bei der Zugabe von Neu5Ac und Trans-Sialidase schon umgesetzt war. Allerdings zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass unter den beschriebenen Bedingungen Monosaccharide keine ausgeprägte

Akzeptoraktivität besaßen und sich nicht effizient sialylieren ließen. Da die Trans-Sialidase neben der Reaktion zum Trisaccharid auch die Hydrolyse des Donorsubstrats katalysiert, war zu erwarten, dass die Hydrolyse als Konkurrenzreaktion auftrat, zumal die Konzentration des Akzeptordisaccharides während der gesamten zweiten Synthesephase eher gering war. Die Ausbeute dieser Reaktion von 17 % ist mit einer minimalen Optimierung der Reaktionsbedingungen erreicht worden, indem nur die Reaktionszeit und durch den variablen Zeitpunkt der Zugabe von Trans-Sialidase und Neu5Ac verändert und die Konzentrationen der einzelnen Monosaccharide konstant gehalten worden sind.

9.2 Synthese von Oct5Ac- α 2-3-Gal- β 1-4GlcNAc- α OAllyl

In Analogie zur enzymatischen Eintopftransglycosylierung von *p*NP-Neu5Ac, ist auch das *p*NP-Octunolosensäure-Glycosid zu dem entsprechenden Trisaccharid umgesetzt worden.

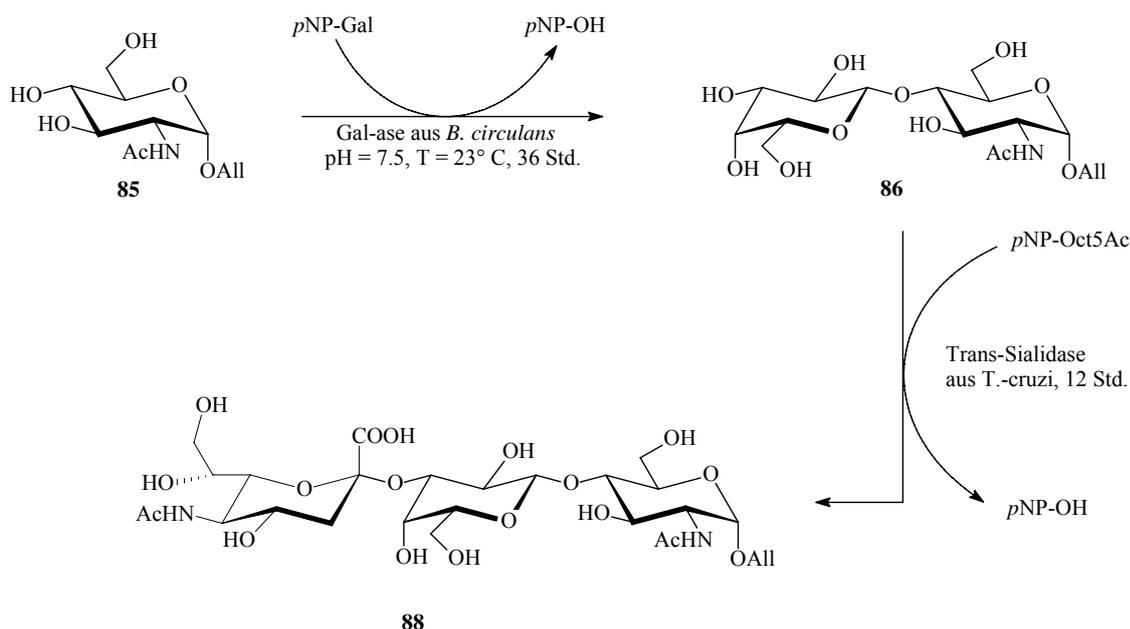


Abb. 61: Enzymatische Eintopfsynthese von Oct5Ac- α 2-3-Gal- β 1-4GlcNAc- α OAllyl in 12 % Ausbeute

Nachdem erst das Lactosid **86** durch die β -Galactosidase aus *B. circulans* bei pH = 7.5 und T = 23° C dargestellt wurde, erfolgte nach 36 stündiger Inkubationszeit die Zugabe von 20 mmol *p*NP-Oct5Ac und 400 μ g Trans-Sialidase aus *T. cruzi*. Die Reaktion wurde nach einer weiteren Inkubation von 12 Stunden und einer dünnschichtchromatographischen Analyse des

Reaktionsgemisches abgebrochen und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt. Da bei dieser Reaktion auch freies Oct5Ac gebildet wurde, mußte dieses durch eine abschließende Gelpermeationschromatographie von dem Trisaccharid **88** abgetrennt werden. Im Vergleich zur Darstellung der Verbindung **87** gelang die Darstellung des Glycosids **88** in etwas geringerer Ausbeute von 12 %. Auch hier zeigt sich, dass eine Kettenverkürzung an der exocyclischen Glycerinkette nur einen geringfügigen Einfluß auf die Aktivität der Trans-Sialidase in einem Multienzymsystem hat. Der Transfer des Oct5Ac-Donorsubstrats erfolgte regio- und stereoselektiv, was durch die entsprechenden NMR-Studien nachgewiesen werden konnte. Im weiteren führte die enzymatische Transglycosylierung ausschließlich zum Trisaccharid **88**. Es konnte keine Bildung eines Oct5Ac α 2-3-Gal-Disaccharids nachgewiesen werden. Es lassen sich folglich auf diese Weise auch Neu5Ac-analoge Oligosaccharide bequem darstellen, ohne dass auf besonders aufwendige Methoden zurückgegriffen werden muß.

9.3 Synthese von Hept5Ac- α 2-3-Gal- β 1-4GlcNAc- α OAllyl

Auch das *p*NP-Heptunolosonsäure-Glycosid ist in einer enzymatischen Eintopftransglycosylierung zu dem entsprechenden Trisaccharid (**89**) umgesetzt worden. Die Gesamtausbeute bei dieser Reaktion lag mit 10 % ebenfalls leicht unter den Ausbeuten der vorigen Eintopfsynthesen. Dabei erfolgte in Analogie zu der Synthese von **87** und **88** auch bei dieser Reaktion nach 36 stündiger Präinkubation der Glycoside (*p*NP-Gal und **85**) mit Galactosidase aus *B. circulans* pH = 7.5 und T = 23° C die Zugabe von 20 mmol *p*NP-Hept5Ac und 400 μ g Trans-Sialidase aus *T. cruzi*. Nach einer weiteren Inkubation von 12 Stunden wurde die Reaktion nach einer dünnschichtchromatographischen Analyse des Reaktionsgemisches abgebrochen und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt. Das Produkt konnte auf genau die gleiche Art wie bei den vorigen Synthesen gereinigt werden und über eine RP-18 gefolgt von einer Biogel P-2 Säule isoliert werden. Der Anteil an hydrolysiertem Edukt liegt bei dieser Reaktion wie auch bei den anderen Eintopftransglycosylierungen im Bereich von ca. 13 % bezogen auf *p*NP-Hept5Ac. Der Transfer des Hept5Ac-Donorsubstrats erfolgte regio- und stereoselektiv, was durch die entsprechenden NMR-Studien nachgewiesen werden konnte. Im weiteren führte die enzymatische Transglycosylierung ausschließlich zum Trisaccharid **89**. Es konnte auch hier keine Bildung eines Hept5Ac α 2-3-Gal-Disaccharids beobachtet werden.

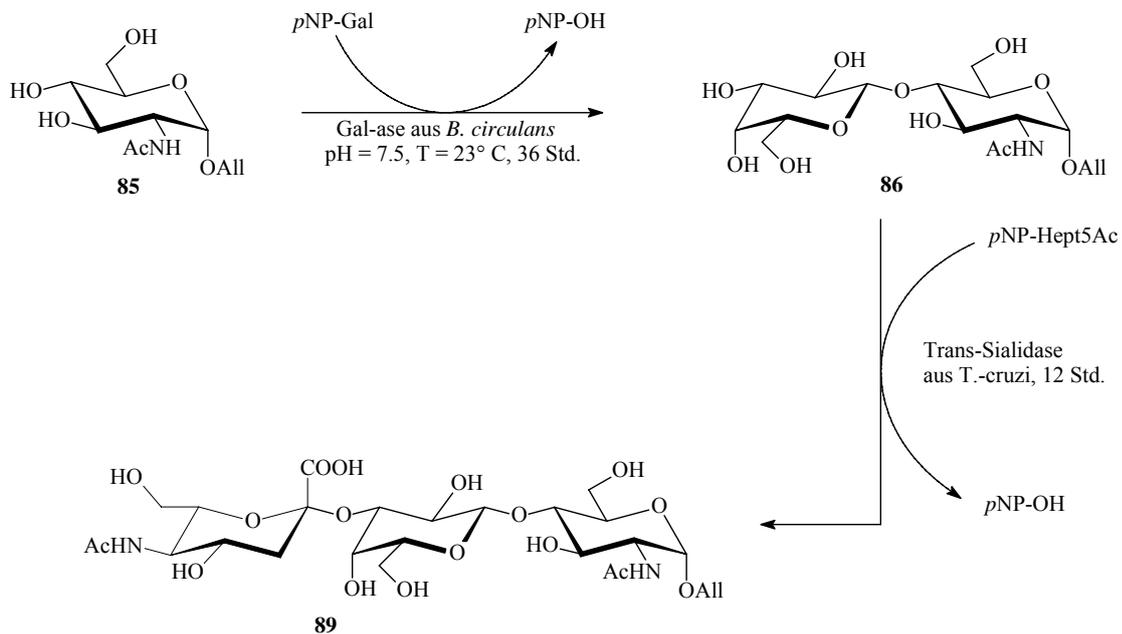


Abb. 62: Enzymatische Eintopfsynthese von Hept5Ac- α 2-3-Gal- β 1-4GlcNAc- α Oallyl in 10 % Ausbeute

Bei allen drei Synthesen waren die Reaktionsbedingungen, wie pH-Wert und Temperatur auf das Optimum für Trans-Sialidase abgestimmt. Dieses scheint in einem sehr engen Rahmen auch erforderlich zu sein, da es nicht gelang eine ähnliche Synthesemethode mit Galactosidase aus Rinderhoden zu verfolgen. Das pH-Optimum für diese Reaktion liegt bei einem pH-Wert von 5.5 und das Enzym läßt sich nur in einem entsprechenden Puffer lagern. Durch Lösen des Lyophyllisats im Inkubationspuffer (Tris-HCl, pH =7.5) fiel der pH-Wert der Lösung auf 6.3. Die Aktivität der Galactosidase reichte zwar aus, um in ausreichender Menge ein entsprechendes Gal β 1-3GalNAc-Glycosid zu synthetisieren. Die anschließende Sialylierung gelang aber nicht, was wohl darauf zurückzuführen ist, das Trans-Sialidase bei diesem pH-Wert keine ausreichende Aktivität besitzt, um das Disaccharid umzusetzen. Die Aktivität der Trans-Sialidase muß sehr hoch sein, damit das gering konzentrierte Akzeptorsubstrat möglichst quantitativ umgesetzt wird. Daher gelang die Tandem-Eintopf-Synthese nur mit der Galactosidase aus *B. circulans* zu sialylierten Lactosiden, während es nicht möglich war, mit der Galactosidase aus Rinderhoden Verbindungen der Struktur Sia α 2-3-Gal β -1-3Gal zu synthetisieren.

10. NMR-Studien zur biologischen Aktivität einzelner Glycoside

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte in Kooperationen mit den Arbeitsgruppen von Prof. B. Meyer und Prof. T. Peters Untersuchungen zur biologischen Aktivität bestimmter sialylierter Oligosaccharide sowie der neuartigen Donorsubstrate mittels NMR-Analytik. Durch STD-NMR wurde von S. Scheid (AK Meyer) die Bindung dreier Oligosaccharide an das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) untersucht. In einem weiteren Projekt wurden in Zusammenarbeit Dr. A. Blume (AK Peters) durch NMR-Techniken kinetische Untersuchungen zum Transfer der neuartigen Donorsubstrate durchgeführt. Außerdem wurde versucht, mit STD-NMR die Enzym-Substrat-Bindung zu charakterisieren und somit weitere Aussagen zum Mechanismus der trypanosomalen Trans-Sialidase treffen zu können.

10.1 Sättigungstransferdifferenz- (STD) NMR

Die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Kohlenhydraten können durch die STD-NMR Analytik wirkungsvoll untersucht werden, wenn es sich um ein großes Protein handelt und der Ligand mit dem Protein in einem schnellen Austausch steht.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Dabei können durch die STD-NMR-Spektroskopie so unterschiedliche Aufgaben wie z. B. das Screening nach potentiellen Liganden, die Ermittlungen von Bindungssepitopen oder von K_D -Werten gelöst werden. Die Grundidee der STD-NMR-Spektroskopie beruht dabei auf dem Sättigungstransfer vom Protein auf den gebundenen Liganden. Moleküle, die nicht als Liganden dienen, werden hierbei nicht angeregt und ergeben kein STD-Signal.

Bei Molekülen mit einer molaren Masse größer als 10 kDa ist ein Effekt zu beobachten, der als Spindiffusion bezeichnet wird und Voraussetzung zur Aufnahme von STD-NMR-Spektren ist. Bei kleinen Molekülen wird dieser Übergang nicht beobachtet, da deren Resonanz spezifisch gesättigt wird. Bei größeren Molekülen kommt es zu einer Verteilung der Sättigung auf das gesamte Molekül und zu einer Übertragung auf einem gebundenen Liganden. Die Sättigungsübertragung ist dabei umgekehrt proportional zum Abstand des Liganden. Je dichter der Ligand am Protein gebunden ist, desto stärker ist die Übertragung der Sättigung. Diesen Effekt kann man NMR-technisch ausnutzen, in dem man ein sogenanntes Differenzspektrum aufnimmt, das aus einem *off-resonance* Spektrum, dem Referenzspektrum, und dem eigentlich relevanten *on-resonance* Spektrum besteht. Beim *off-resonance* wird der Sättigungspuls neben dem 90° Puls außerhalb des spektralen Fensters der Protein- oder Ligandresonanz z.B. bei 45 ppm eingestrahlt. Durch die Aufnahme dieses

Spektrums werden thermische Effekte in der Probe berücksichtigt, die bei Anwendung des Sättigungspulses entstehen. Die Einstrahlung des Sättigungspulses bei dem *on-resonance* Spektrum erfolgt in einem Bereich, in dem sich Proteinresonanzen befinden, aber nicht Ligandenresonanzen. Ermöglicht wird dies durch die Größe der Moleküle, da diese Moleküle breite Signale erzeugen, die zum Teil außerhalb des normalen spektralen Fensters liegen. Durch Anisotropieeffekte in Teilen der Moleküle kann es zu extremen Verschiebungen ins hohe oder tiefe Feld kommen, die dann diese spezielle Anregung ermöglichen. Durch die Sättigungsübertragung auf die gebundenen Liganden verringern sich die Intensitäten der Signale des *on-resonance*- im Vergleich zum *off-resonance* Spektrum. Die Differenz aus den beiden Spektren ergibt dann das STD-Spektrum.

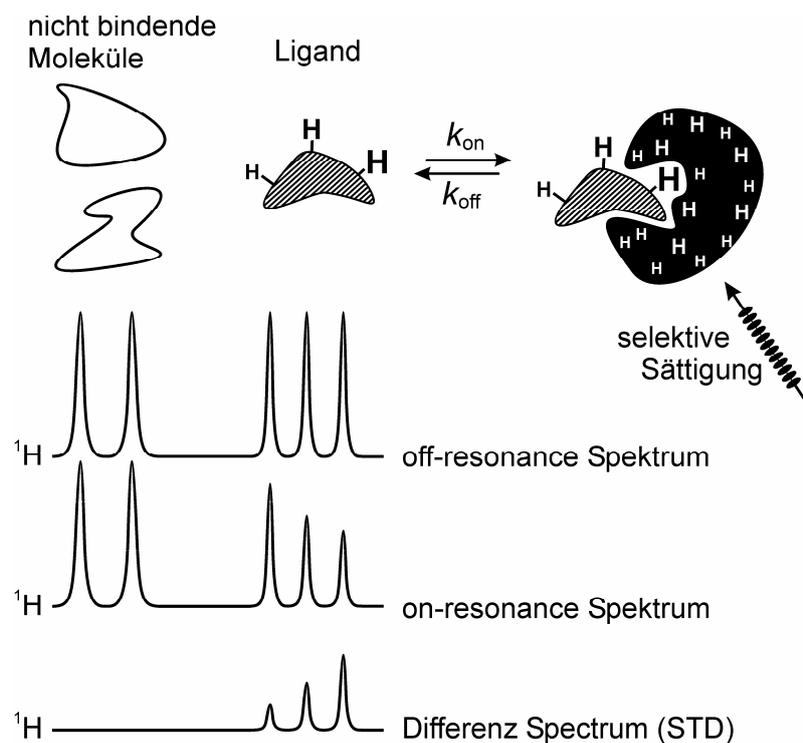


Abb. 63: STD-NMR-Spektroskopie; Differenz aus *off-resonance*- und *on-resonance* Spektrum wird das STD-Spektrum gebildet; nicht bindende Moleküle erfahren durch die Spindiffusion keine Sättigungsübertragung und geben somit kein STD-Signal

Je größer der Sättigungstransfer bei der *on-resonance* Messung ist, desto kleiner wird das Ligandensignal. Dies gilt nicht nur auf molekularer Ebene für ein gesamtes Liganden-

spektrum, sondern auch im Hinblick auf einzelne molekulare Substrukturen. Wenn ein Proton eines Liganden dem Protein näher ist als andere Protonen innerhalb des gleichen Moleküls, so erfährt dieses Proton eine stärkere Sättigung und zeigt somit ein größeres Signal im STD-Spektrum.

Die Intensität des STD-Effekts für ein Proton hängt von vielen Faktoren ab, wobei kinetische und thermodynamische Parameter der Protein-Ligand Wechselwirkungen eine große Rolle spielen. Außerdem sind die Relaxationszeiten der beteiligten Proton maßgeblich verantwortlich für die Größe der Effekte und somit auch für die Auswertbarkeit eines entsprechenden Spektrums. Zum Zeitpunkt der Einstrahlung auf das Protein wird die Sättigung vom Protein auf den gebundenen Liganden übertragen. Nach einer gewissen Verweilzeit in der Bindungstasche des Proteins verlassen die gesättigten Liganden diese wieder und werden von neuen Molekülen ersetzt. Dabei können zur Zeit des Sättigungsprozesses auch Liganden in der Bindungstasche vorliegen, die schon partielle oder vollständige Sättigung erfahren haben. Daher stehen diese nicht mehr wie ungesättigte Liganden für einen effizienten Sättigungstransfer zur Verfügung. Dieses „*Rebinding*“ kann durch eine Vergrößerung des Liganden-Überschusses verhindert werden, da die Wahrscheinlichkeit der Bindung von ungesättigten Liganden vergrößert wird. Dadurch wird die Empfindlichkeit des STD-Experiments erhöht und die Qualität des Spektrums verbessert.

Für die Auswertung der STD-Spektren ist immer auch eine Aufnahme eines Referenzspektrums nötig. Durch die Bildung eines Quotienten aus Intensität des STD-Spektrums $I_0 - I_{\text{sat}}$ und des Referenzspektrums I_0 ergibt sich der sogenannte STD-Wert in Prozent (s. Gl. 1). Auf diese Weise lassen sich Bindungs epitope bestimmen.

$$\text{Gl. 1} \quad \text{STD} = \frac{I_0 - I_{\text{sat}}}{I_0}$$

$$\text{Gl. 2} \quad \text{STD}_{\text{Amplifikationsfaktor}} = \frac{\text{STD}_{\text{Amplifikationsfaktor (max)}} * c}{K_D + c}$$

Es können durch die STD-NMR-Spektroskopie auch Dissoziationskonstanten (K_D -Werte) bestimmt werden, in dem die Spektren jeweils bei unterschiedlichen Ligandkonzentrationen aufgenommen werden. Näherungsweise kann man diese über eine Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandenkonzentration mit einem anschließenden Fit

rechnerisch lösen (Gl. 2). Der STD-Amplifikationsfaktor ist dabei das Produkt aus STD-Wert und dem Überschuß des Liganden.

10.2 Neuartige Oligosaccharide als potentielle MAG-Liganden

Die Bindungsaffinität an MAG ist mit Hilfe von drei verschiedenen Oligosacchariden mittels STD-NMR durch Svenja Scheid (AK Meyer) bestimmt worden.

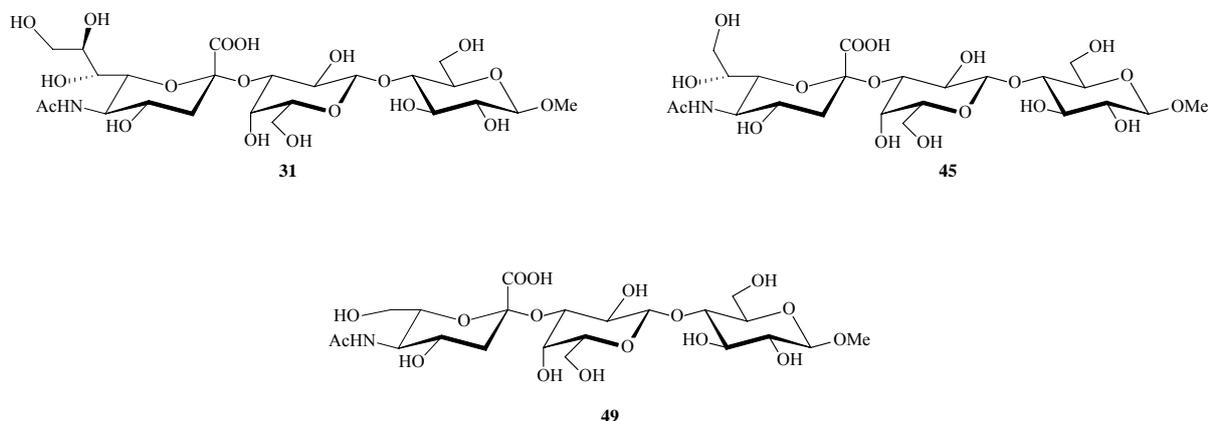


Abb. 64: Die potentiellen MAG-Liganden, die mittels STD-NMR untersucht wurden

Die Bestimmung des K_D -Werts erfolgte durch eine Titration von MAG mit dem jeweiligen Liganden unter NMR-Bedingungen. Durch die Aufnahme und nach der Auswertung der jeweiligen STD-Spektren konnte allerdings nur für Verbindung **31** eine aussagekräftige Titrationskurve erstellt werden (Abb. 65). Die Auswertung der Titrationskurve ergab einen K_D -Wert von 183 μmol . Dieser Wert zeigt, dass Verbindung **31** recht gut an MAG bindet. Interessanterweise haben Vorversuche gezeigt, dass freie Sialyl-3'-lactose eine schlechte Bindung eingeht und zu sehr viel kleineren K_D -Werten ($K_D = 653 \mu\text{M}$) führt.^{157,158} Es ist daher zu vermuten, dass die strukturelle Fixierung am reduzierenden Ende der Verbindung **31** maßgeblichen Einfluß auf die Ligand-Protein-Wechselwirkung hat. Wahrscheinlich ermöglicht das β -Lactosid die bessere Bindung während die α -Anomeren, bzw. die offenkettige Form eine Bindung zum MAG schwächen.

Die Verbindungen **45** und **49** gaben zu schwache STD-Signale, um eine auswertbare Titrationskurve aufzunehmen. Durch den Signalvergleich der *N*-Acetylgruppen der

kettenverkürzten Glycoside mit der Signalstärke der N-Acetylgruppe der Verbindung **31** zeigte sich, dass die Bindungsaffinität der modifizierten Trisaccharide drastisch kleiner ist. So verringert sich die Bindung des Octunolosonsäurederivats **45** um den Faktor 5.6 und des Heptonulosonsäurederivats **49** sogar um den Faktor 7.8 im Vergleich zur Verbindung **31**.

Verbindung	31	45	49
c [mM]	0.90	1.17	1.17
STD value [%]	0.78	0.14	0.10

Tabelle 1: Vergleich der STD-Prozente der untersuchten Oligosaccharide

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen in Übereinstimmung mit den berichteten Resultaten früherer Arbeiten. In diesen Arbeiten wurden Periodatspaltungen an verschiedenen Gangliosiden durchgeführt, die dabei ihre Affinität zu MAG verloren.^{53,54,159,160} In diesen Arbeiten wurden die Ganglioside unspezifisch durch Periodat gespalten, so dass ein Produktgemisch in den Assays getestet wurde. Im Gegensatz dazu konnte durch diese Untersuchungen gezeigt werden, dass schon der Verlust der terminalen OH-Funktion in der exocyclischen Seitenkette eine drastische Abnahme der Bindungsaffinität zu MAG zur Folge hat.

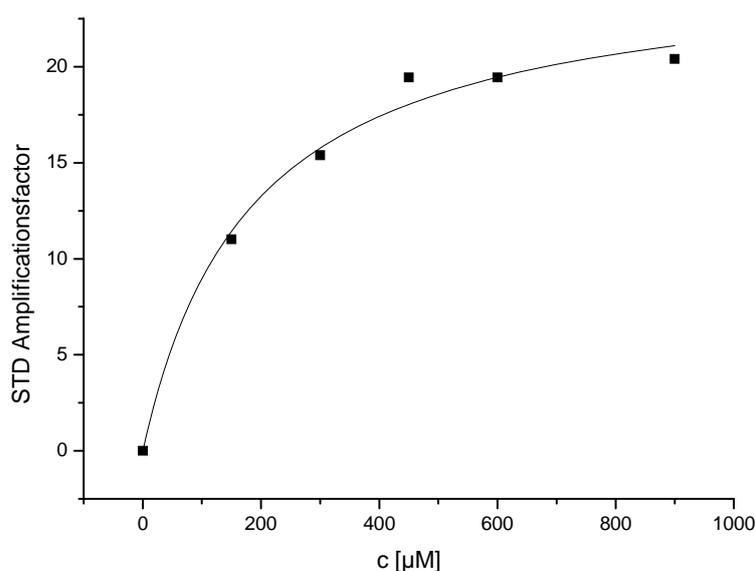


Abb. 65: Titrationskurve der Verbindung **31** zur Bestimmung des K_D -Wertes an MAG

Ein Bindungsepitop konnte ebenfalls nur für Verbindung **31** ermittelt werden. In Abb. 66 sind das erhaltene STD-NMR-Spektrum und das Referenzspektrum zu sehen.

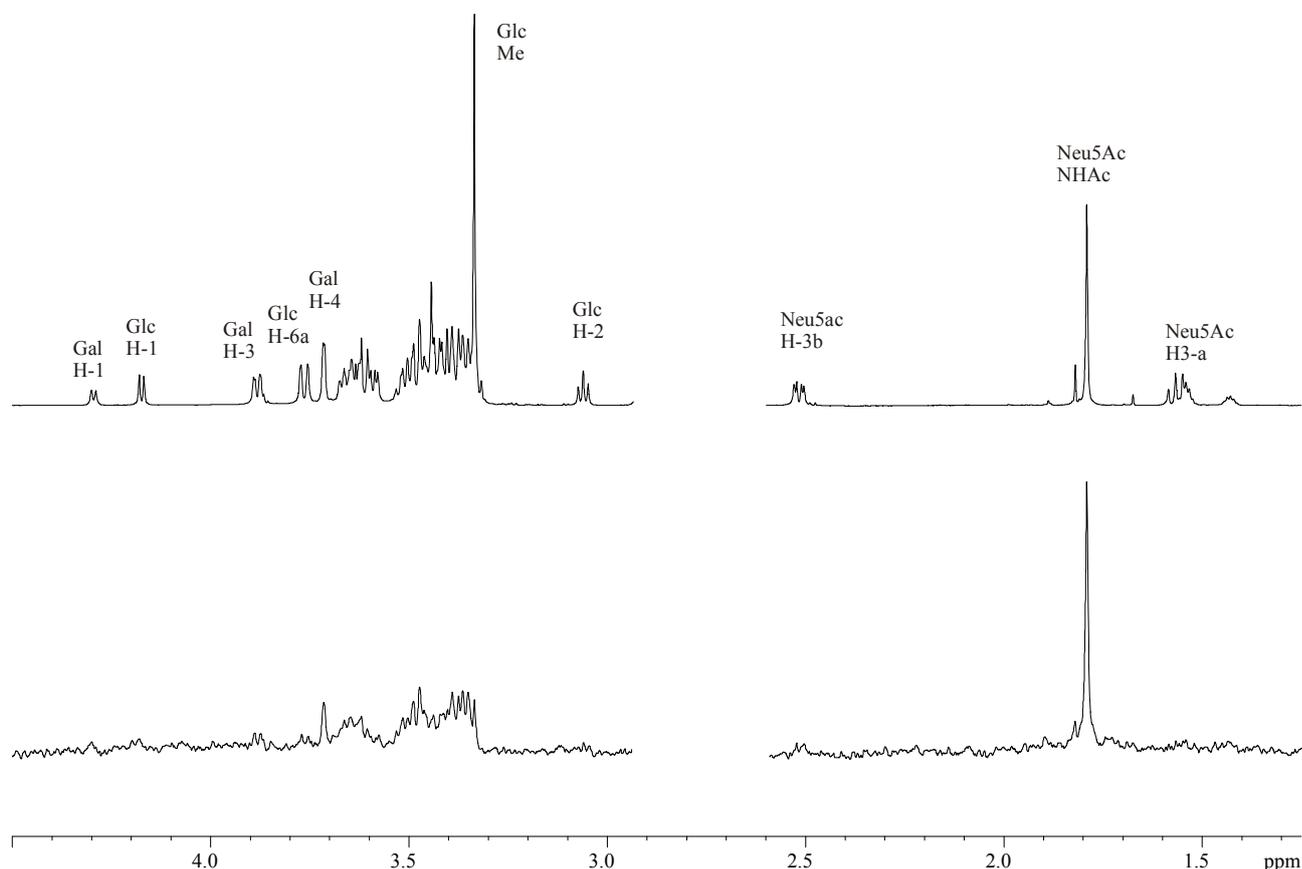


Abb. 66: STD-NMR (unten) im Vergleich zum $^1\text{H-NMR}$ -Referenzspektrum (oben); der Bereich von 2.5 bis 3.0 ppm ist herausgeschnitten, anhand der Zuordnungen lassen sich die STD-Werte der einzelnen Protonen bestimmen

Der stärkste STD-Effekt in Neu5Ac ist für das H-8 ermittelt worden. Die exocyclische Seitenkette zeigt insgesamt einen sehr großen STD-Effekt, was einen engen Kontakt zum Protein nahelegt. Dieser Teil des Moleküls scheint sowohl durch hydrophile und auch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Bindungstasche des MAG an der Bindung beteiligt zu sein. Dieses Bindungsepitop ist in Abb. 67 dargestellt.

Die *N*-Acetylgruppe der Sialinsäure zeigt ebenfalls einen starken STD-Effekt. Es ist zu vermuten, dass diese Funktionalität hydrophobe Wechselwirkungen in der Bindungstasche

eingeht. Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass die Carboxylgruppe mit dem Arginin 118 des MAG interagiert.⁸⁷ Aufgrund der hohen STD-Effekte aller Protonen der Neu5Ac wird deutlich, dass die Bindung zu MAG selektiv in der Bindungstasche erfolgte und nicht in der Peripherie des Proteins. Da die modifizierten Strukturen eine deutlich schlechtere Bindung zeigten, ist auch ausgeschlossen, dass es zu Interaktionen außerhalb der Bindungstasche kommt.

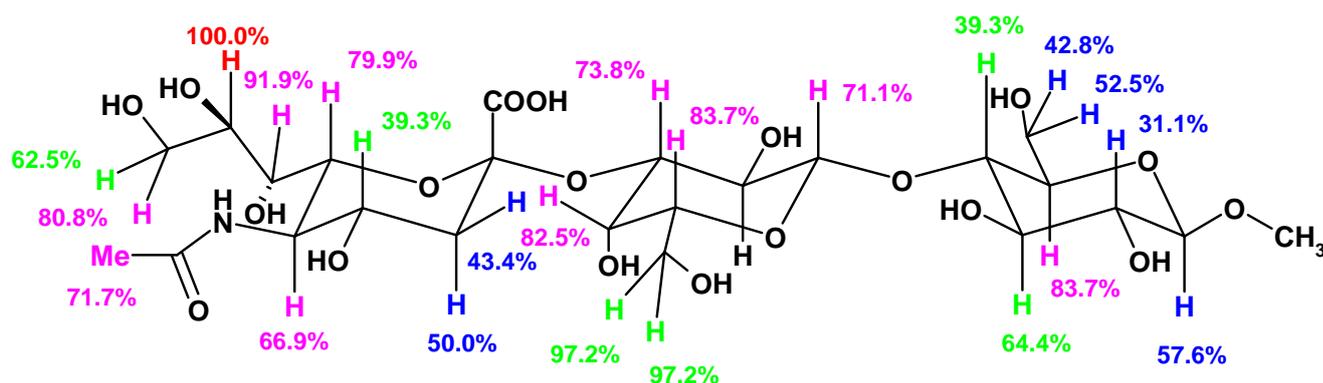


Abb. 67: Bindungsepitop der Verbindung **31**; das stärkste Signal wurde auf 100 % gesetzt (rot); alle anderen Werte beziehen sich auf dieses Signal; magenta: Intensitäten von 99-61 %; blau: 31-60 %, durch Überlappung der Signale können die Werte variieren

Wie in Abb. 67 zu sehen, zeigt die subterminale Galactose ebenfalls große STD-Effekte was darauf schließen lässt, dass auch hier starke Interaktionen mit dem MAG stattfinden. Dem Protein besonders nahe kommen die Protonen der primären Hydroxylfunktion am C-6 der sialylierten Galactose. Die Glucose zeigt dagegen schwache STD-Werte. Hier äußert sich der untergeordnete Anteil der Glucose an der Bindung des gesamten Moleküls.

10.3 NMR-Untersuchungen der Reaktion von Trans-Sialidase

In einer Zusammenarbeit mit Dr. Astrid Blume (AK Peters) wurden verschiedene Donorsubstrate unter NMR-Bedingungen in deuteriertem Lösungsmittel mit Trans-Sialidase umgesetzt. Dabei konnte die Reaktion durch die wiederholte Aufnahme von ¹H-Spektren kinetisch untersucht werden. Durch Aufnahme von STD-NMR-Spektren sollten darüber hinaus Bindungsepitope der Substrate in der Bindungstasche der Trans-Sialidase aus *T. cruzi* bestimmt werden. Die kinetischen Untersuchungen und die STD-Experimente sind mit den

gleichen Substraten durchgeführt worden (s. Abb. 68). Dabei wurden bei folgenden Derivaten der Neuraminsäure sowohl die Transferreaktion auf den Akzeptor Methylactosid, als auch die hydrolytische Spaltung mittels NMR untersucht: *p*NP-Neu5Ac (**12**), *p*NP-Oct5Ac(**40**), *p*NP-Hept5Ac(**42**) und *p*NP-Neu5,9Ac₂ (**57**).

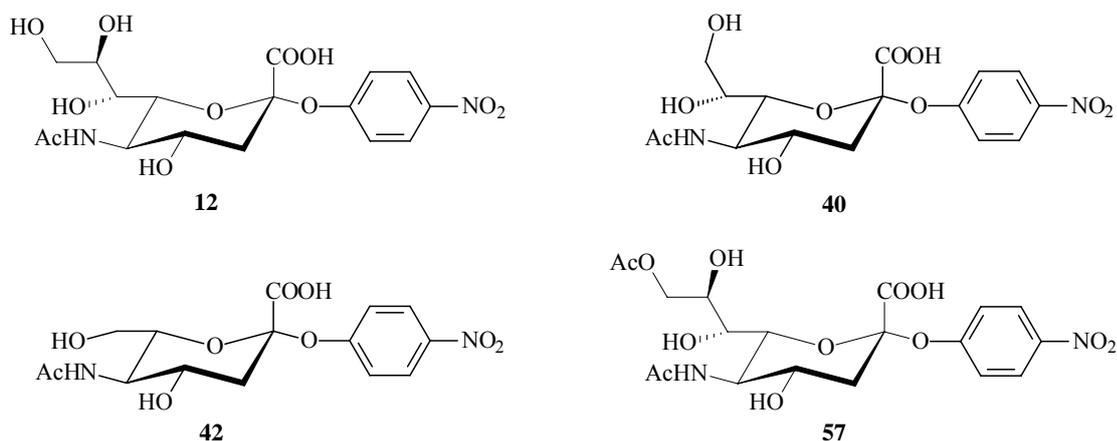


Abb. 68: Durch NMR-Technik untersuchte Donosubstrate

10.3.1 Reaktionsverfolgung durch ¹H-NMR-Spektroskopie

Kinetische Untersuchungen enzymatischer Prozesse können durch die NMR-Spektroskopie durchgeführt werden, wenn ein Enzym unter NMR-Bedingungen aktiv ist. Im Gegensatz zu typischen biochemischen Assays handelt es sich hier um eine nicht-invasive Methode der Reaktionsverfolgung, bei der die Bildung des Produkts und der Abbau des Edukts simultan verfolgt werden können. Die Reaktanden müssen eindeutige Signale im Spektrum geben, die eine zeitabhängige Auswertung der Spektren ermöglichen. Im Falle der Sialinsäuren sind die Methylenprotonen an der Position 3 ausgezeichnete Marker, an denen die Auswertung vorgenommen werden kann. So gelang nicht nur die kinetische Untersuchung der Hydrolyse von MU-Neu5Ac durch Sialidase aus *Salmonella typhimurium*, sondern es konnte durch einfache ¹H-Spektren der Mechanismus durch von Itzstein et al. aufgeklärt werden.¹⁶² Nach Beobachtung der zeitabhängigen Spektren bildete sich bei der Hydrolyse erst α -Neu5Ac, die dann durch Mutarotation in das β -Anomer überging, womit der Retentions-Mechanismus dieser Reaktion bewiesen werden konnte.¹⁶²

In ersten Untersuchungen zur spektroskopischen Reaktionsverfolgung konnte durch von Itzstein et al. gezeigt werden, dass auch durch Trans-Sialidase katalysierte Reaktionen, auf

diese Weise verfolgt werden können.^{162, 36} Durch Aufnahme von zeitlich fortlaufenden Spektren gelang es in diesen Arbeiten die Kinetik der Hydrolyse und des Sialyl-Transfers von MU-Neu5Ac zu untersuchen. Im weiteren wurde auf diese Weise nachgewiesen, dass sowohl die Hydrolyse als auch der Transfer unter Retention der Konfiguration ablaufen.^{162,36}

Die modifizierten Donorsubstrate **40**, **42** und **57** sowie das *p*NP-Glycosid **12** wurden sowohl unter hydrolytischen als auch unter Transferbedingungen untersucht. Dabei erfolgte die Inkubation einer 5 mmolaren Lösung des entsprechenden Donorsubstrats in deuteriertem PBS Puffer (Hydrogenphosphat-Dihydrogenphosphat-Puffer, pH = 7.5) mit 300 µg Trans-Sialidase. Im Falle der Versuche zum Sialyltransfer wurde in das Reaktionsgefäß eine äquimolare Menge an Akzeptor β-Methylactosid gegeben. Die Reaktionsverfolgung gelang durch die Aufnahme von ¹H-Spektren, die in einem Zeitraum von bis zu zwei Stunden permanent bei T = 278 K aufgenommen wurden.

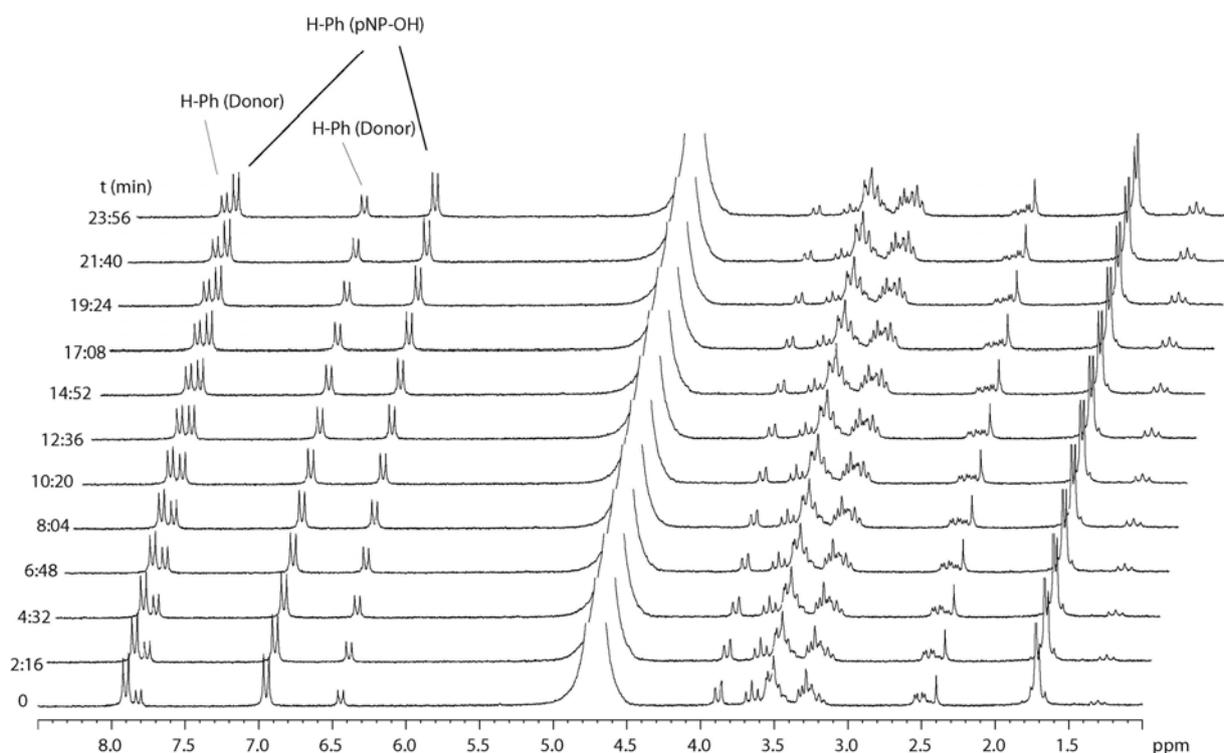


Abb. 69: Darstellung der NMR-Experimente in zeitlicher Abfolge zur Ermittlung der kinetischen Daten der Hydrolyse von *p*NP-Neu5Ac; die Meßpunkte in den folgenden Graphiken stellen die Abnahme der Signale der Protonen der glycosidischen Phenole dar (H-Ph_{Donor})

Es zeigte sich, dass sich Trans-Sialidase ohne Verlust der Aktivität umpuffern ließ und unabhängig vom deuterierten Puffer bei dieser Temperatur die Substrate sowohl hydrolysiert als auch transferiert wurden. Zur Auswertung der Spektren wurden die signifikant veränderten Signale des jeweiligen Donorsubstrats herangezogen. Dabei bieten sich die Signale der Arylprotonen, das H-5 sowie die beiden Protonen an Position 3 an. Im Verlauf der Reaktion werden die Integrale dieser Signale kleiner. Wird aus der Verringerung der einzelnen Integrale pro Spektrum, also pro Zeiteinheit, der Mittelwert gebildet und dieser anschließend gegen die Zeit aufgetragen, so läßt sich ein Geschwindigkeitsprofil der jeweiligen Reaktion erstellen (Abb. 70).

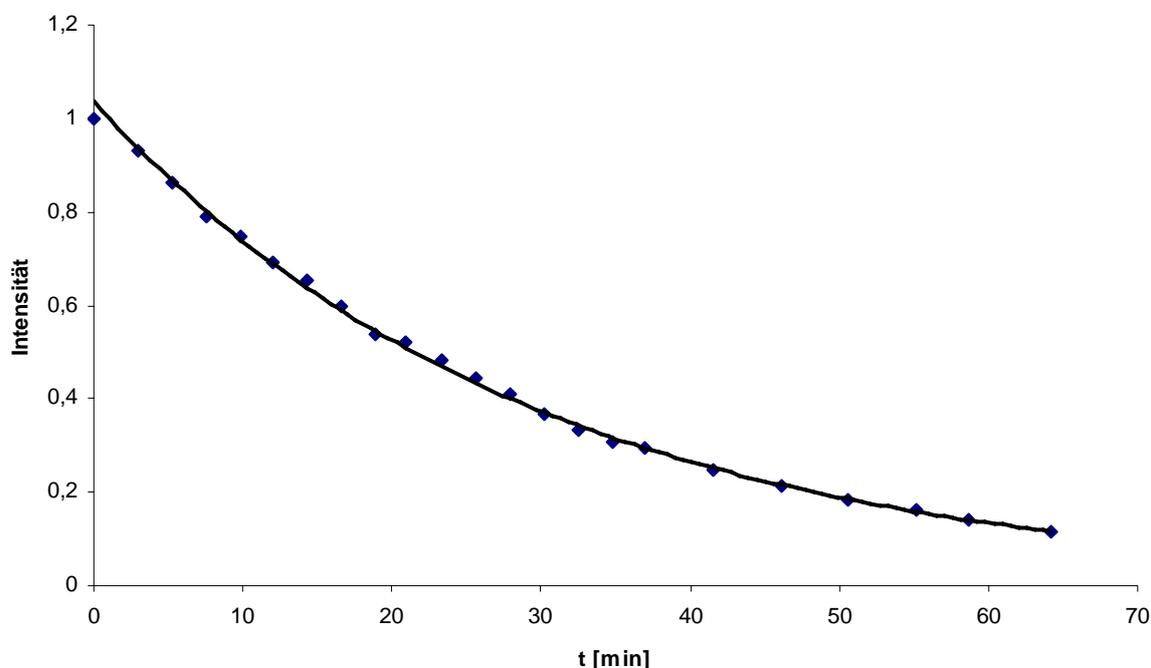


Abb. 70: Hydrolyse von *p*NP-Neu5Ac (**12**)

Die Hydrolyse von *p*NP-Neu5Ac verläuft unter NMR-Bedingungen trotz der geringen Temperatur von 278 K sehr schnell nach einer Reaktion erster Ordnung. Ein 50 %iger Umsatz ist bereits nach 23 min erreicht und nach 63 min ist die Konzentration des Eduktes so gering, dass keine weitere Auswertung möglich war. Die Untersuchung der Transfers auf das äquimolar zugegebene Methyl-lactosid zeigte eine vergleichbare Gesamtzymaktivität. Die Auswertung der Akzeptorsignale in den ^1H -Spektren zeigte allerdings, dass es nicht zu einer reinen Transglycosylierung kam. Nur etwa die Hälfte des Donorsubstrats ist dabei transferiert

worden, während der Rest hydrolysiert wurde. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Konzentration des Akzeptors durchaus einen großen Einfluß auf die Aktivität haben. Unter diesen Bedingungen scheint es wichtig zu sein, dass der Akzeptor in einem Überschuß vorliegt.

Die modifizierten Donorsubstrate werden im Vergleich zu Neu5Ac sehr viel langsamer Übertragen, wie aus den Abbildungen 71-73 zu entnehmen ist.

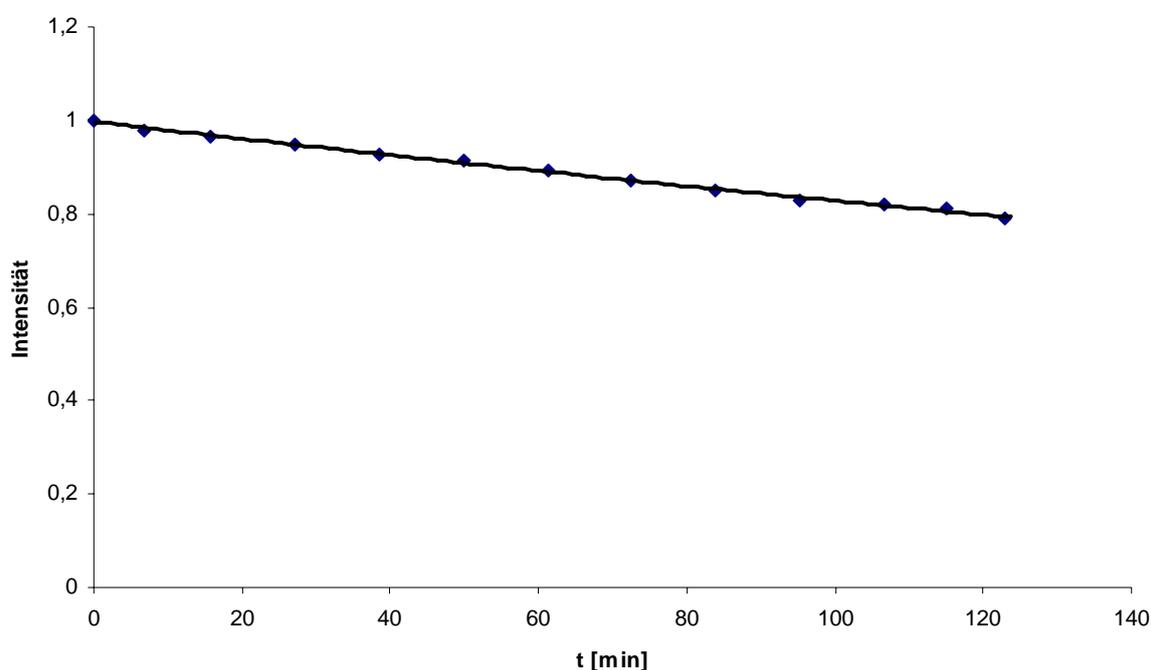


Abb. 71: Hydrolyse von $p\text{NP-Neu5,9Ac}_2$ (**57**)

In Abb. 71 ist zu sehen, dass Trans-Sialidase unter NMR-Bedingungen auch $p\text{NP-Neu5,9Ac}_2$ (**40**) umsetzt. Die Hydrolyse verläuft aber mit sehr viel geringerer Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu $p\text{NP-Neu5Ac}$. Ein 50 %iger Umsatz ist erst nach 5.5 Stunden zu erwarten. Eine Vergrößerung der exocyclischen Seitenkette hat zur Folge, dass die Aktivität des Enzyms deutlich verringert wird und sich der zeitliche Umsatz verkleinert. Die Transferrate in Anwesenheit des Methyl-lactosid-Akzeptors betrug auch hier 50 %. Es wurde also auch unter diesen Bedingungen bei einer ähnlichen Gesamtaktivität des Enzyms nur 50 % des Donors übertragen, während der Rest hydrolysiert wurde.

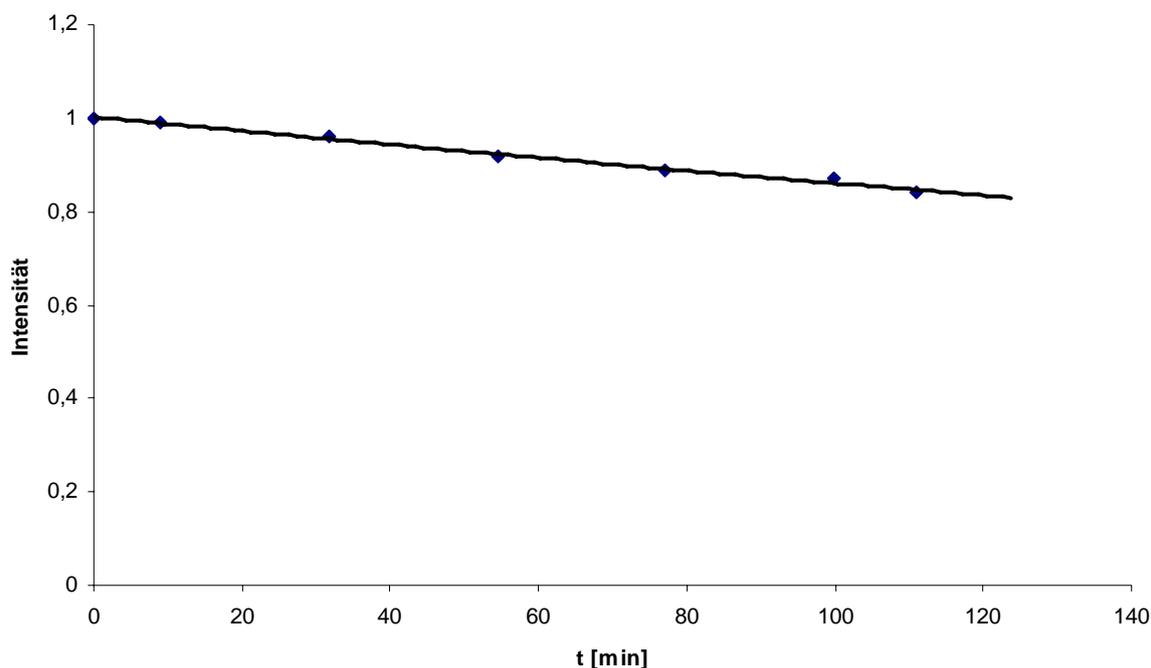


Abb. 72: Hydrolyse von *p*NP-Oct5Ac (**40**)

Trans-Sialidase zeigt auch im Falle von *p*NP-Oct5Ac (**40**) unter NMR-Bedingungen bei 278 K Enzymaktivität. Die Hydrolyse des *p*NP-Oct5Ac Donorsubstrats verläuft aber auch hier sehr viel langsamer als bei *p*NP-Neu5Ac (**12**). Der 50 %ige Umsatz des Donors ist unter diesen Bedingungen erst nach 9 Stunden zu erwarten. Die Transferrate in Anwesenheit des Methylactosid-Akzeptors betrug hier 40 %. Es wurde also auch unter diesen Bedingungen bei einer ähnlichen Gesamtaktivität des Enzyms nur 40 % des Donors übertragen, während der Rest hydrolysiert wurde.

In Abb. 73 ist zu sehen, dass die Trans-Sialidase unter NMR-Bedingungen *p*NP-Hept5Ac (**42**) umsetzt. Das zweifach kettenverkürzte Glycosid **42** zeigt eine leicht höhere Reaktionsgeschwindigkeit als das Octunolosonsäure-Derivat **40** aber eine sehr viel kleinere Umsatzrate als *p*NP-Neu5Ac. Der 50 %ige Umsatz des Donors ist unter diesen Bedingungen erst nach 3.5 Stunden zu erwarten. Der Transfer des Donorsubstrats auf den Methylactosid-Akzeptor erfolgt auch hier in Konkurrenz zur Hydrolyse und nur 40 % des Donors sind auf den Akzeptor übertragen worden, während der Rest hydrolysiert wurde.

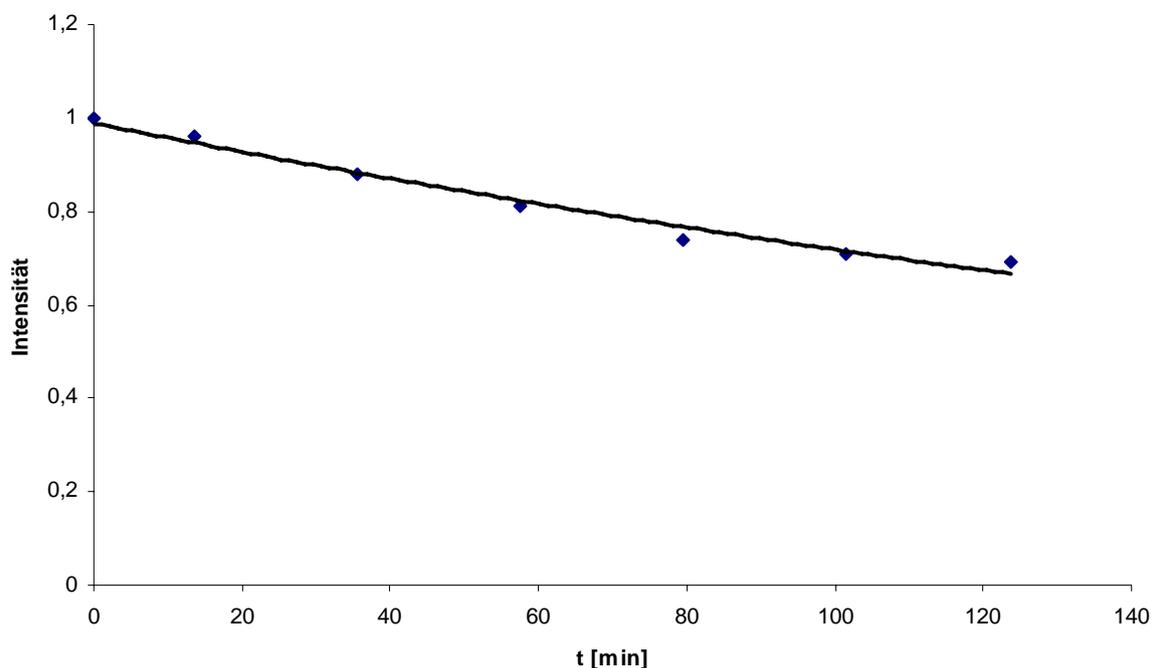


Abb. 73: Transfer (rot) und Hydrolyse (gelb) $p\text{NP-Neu5,9Ac}_2$ (**57**)

Obwohl die exocyclisch modifizierte Donorsubstrate alle deutlich geringere Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen, sind sie geeignete Edukte für die Synthese sialylierter Oligosaccharide, da der Umsatz noch ausreichend schnell erfolgt. Die Verkürzung der Seitenkette zeigt deutliche Einflüsse auf die Kinetik, wobei die Entfernung einer Gruppe die Geschwindigkeit deutlich verlangsamt. Da die Enzym-Reaktionen trotz der Modifikationen immer noch schnell ablaufen, zeigt die eher untergeordnete Bedeutung der Glycerin-Seitenkette während der Reaktion in der Bindungstasche des Enzyms. Die Glycerinseitenkette ist sowohl sterisch als auch elektronisch nicht essentiell für die enzymatische Aktivität von Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi*. Dies wird auch durch die Einführung einer Acetylgruppe in Position 9 bestätigt. Die Vergrößerung der exocyclischen Seitenkette zeigt auch nur eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit. Möglicherweise optimiert die Glycerinseitenkette die räumliche Anordnung des gesamten Moleküls in der Bindungstasche, so dass die Enzymaktivität ein Maximum hat. Durch Modifikationen an der exocyclischen Seitenkette verringert sich die strukturelle Fixierung in der Bindungstasche, womit auch die Aktivität des Enzyms abnimmt. Im weiteren zeigte sich, daß die Konzentration des Akzeptors

in der Reaktionslösung unter diesen Bedingungen nicht ausreichte, um einen ausschließlichen Glycosyltransfer zu leisten.

10.3.2 STD-Experimente an Trans-Sialidase aus *T. cruzi*

Die Methoden zur Untersuchungen von Protein-Ligand-Wechselwirkungen beschränken sich nicht nur auf die Analyse von Siglecs, sondern lassen sich auch auf Enzym-Substrat-Interaktionen anwenden.^{163,164} Es zeigte sich, dass diese Untersuchungen sehr aussagekräftige Ergebnisse liefern, wobei sehr wenig Enzym (μmol -Bereich) benötigt wird.¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ Protonen vom Liganden, die in einem engen Kontakt mit der Bindungstasche stehen, erfahren einen größeren Sättigungstransfer und damit auch einen größeren STD-Effekt. Allerdings werden die Liganden in der Bindungstasche eines Enzyms strukturell modifiziert, so dass jedes Ligandenmolekül nur einmal die entsprechende Sättigung erfährt. Im Laufe der STD-Messung verändert sich das gesamte NMR-Spektrum. Verläuft also eine enzymkatalysierte Reaktion unter den NMR-Bedingungen sehr viel schneller als die Aufnahme des Spektrums, so ergeben sich keine STD-Signale. Die Ligandkonzentration darf nicht größer als 5 mmolar sein, da es sonst zur Bildung von Artefakten im Spektrum kommen kann. Es ist also nicht möglich, im Falle sehr schnell ablaufender Reaktionen, die Ligandkonzentration beliebig zu erhöhen.¹⁶⁴

Die Spektren für die Untersuchung der Trans-Sialidase sind mit 1.5 k Scans aufgenommen. Die entsprechende Messung dauert also ca. 2 Stunden, so dass innerhalb dieser Zeit möglichst viel freier Ligand vorhanden sein sollte. Die Messungen wurden unter Abwesenheit eines Akzeptorsubstrats durchgeführt, so dass die Hydrolyse des entsprechenden Donors untersucht wurde. Die Donorsubstrate waren *p*NP-Neu5Ac (**12**), *p*NP-Oct5Ac (**40**), *p*NP-Hept5Ac (**42**) und *p*NP-Neu5,9Ac₂ (**57**). Die STD-Spektren werden zur Auswertung, wie in den folgenden Abbildungen zu sehen, mit einem Referenzspektrum verglichen. Die STD-Prozente werden wie bei der Untersuchung am MAG in Relation zu dem am stärksten bindenden Proton ermittelt.

Im Falle des *p*NP-Neu5Ac (**12**) wird aus den Spektren in Abb. 74 deutlich, dass die Reaktion unter den NMR Bedingungen so schnell verläuft, dass innerhalb der Meßzeit kein Ligandproton detektiert werden kann. Das Referenzspektrum zeigt hydrolysierte

Neuraminsäure die zu einem geringen Teil mutarotiert ist, und freies *p*-Nitrophenol. Die Protonensignale der Neu5Ac zeigen keinen STD-Effekt, was bedeutet, dass freie Neu5Ac nicht gebunden wird. Dies belegt, dass Neu5Ac kein Ligand bzw. Donorsubstrat für Trans-Sialidase ist. Dieses Ergebnis stimmt mit den früheren Resultaten biochemischer Untersuchungen überein.³¹ Es ist deutlich zu erkennen, dass *p*NP-OH (Signale bei 7.8 bzw. 6.4 ppm) an Trans-Sialidase bindet.

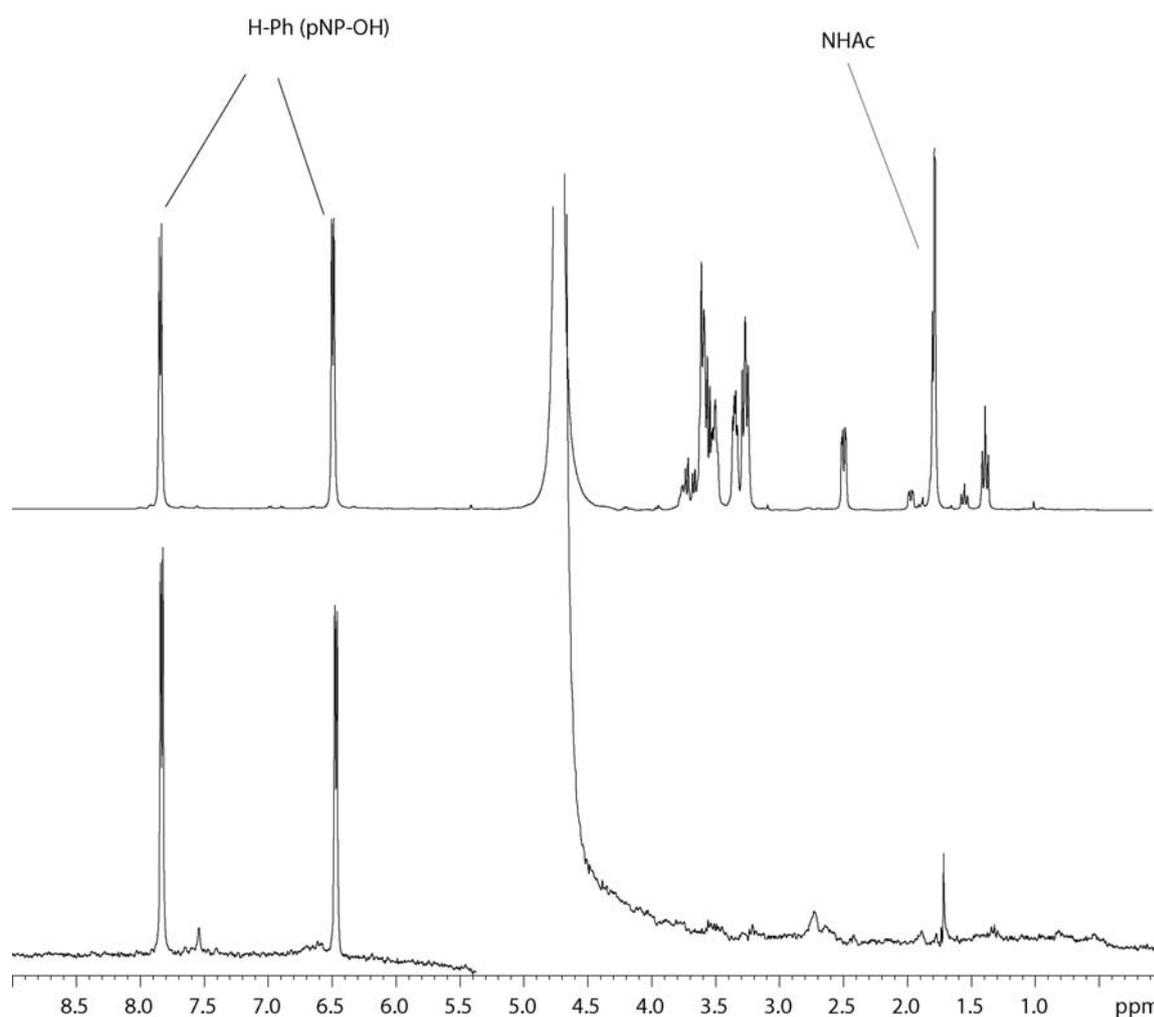


Abb. 74: STD-Messung der Hydrolyse von *p*NP-Neu5Ac; oben: Referenzspektrum; unten: STD-NMR; Lücke im Spektrum ist technisch bedingt, da sich das STD-Spektrum nicht optimal in Phase bringen ließ

Dies ist wahrscheinlich auf unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen zurückzuführen, die nicht im Zusammenhang mit der katalytischen Aktivität des Enzyms stehen. Durch sogenanntes π -Stacking kann sich das freie Phenol überall an das Enzym anlagern und somit den Sättigungstransfer erhalten. Die kleinen Signale bei 2.7 und bei 1.6 sind auf Verunreinigungen zurückzuführen.

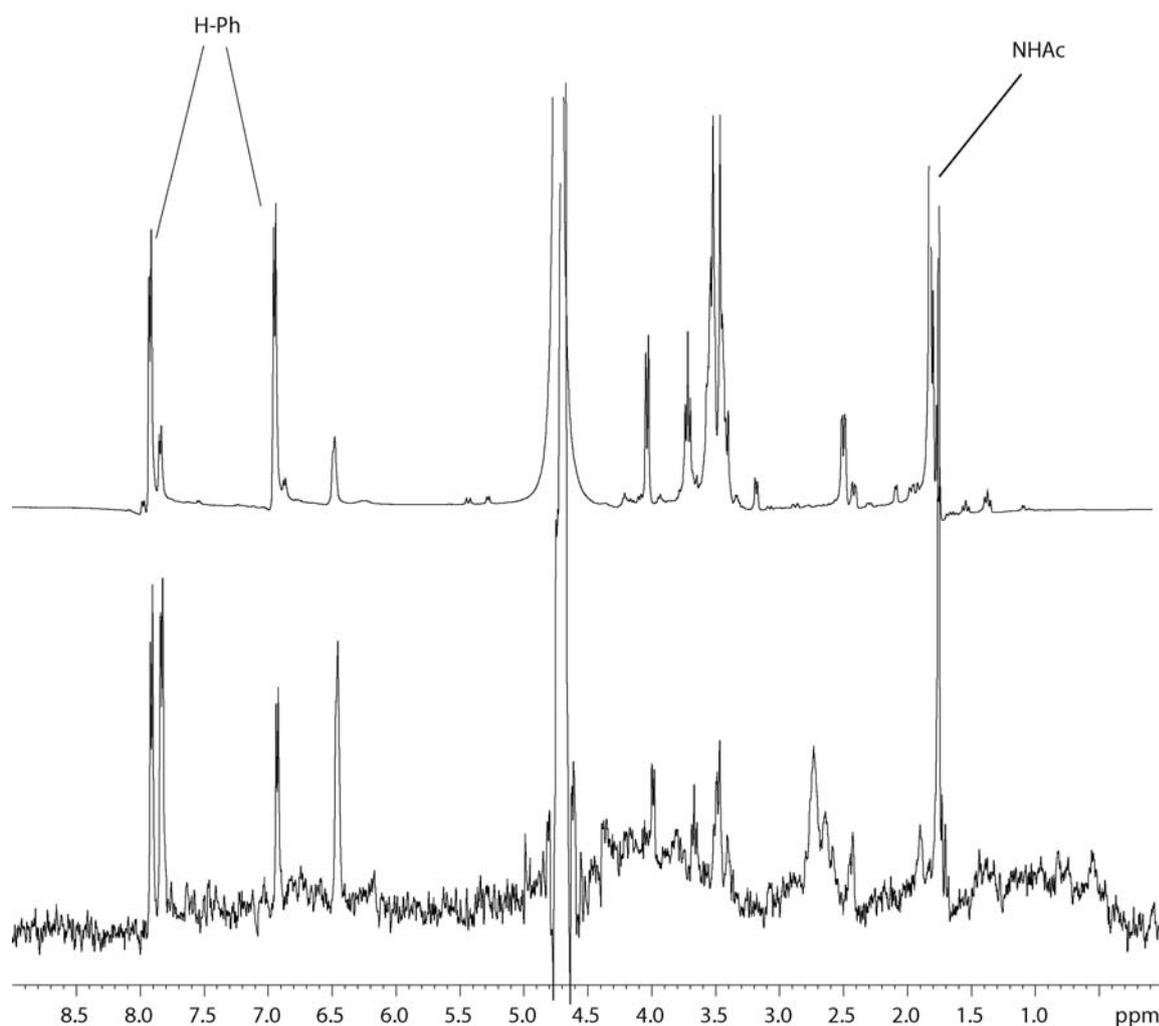


Abb. 75: STD-Messung der Hydrolyse von *p*NP-Oct5Ac; oben: Referenzspektrum; unten: STD-NMR

Die Untersuchung von *p*NP-Oct5Ac (Abb. 75) zeigt, dass die langsamere Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse eine STD-Analyse ermöglicht. Dabei erfahren die Protonen des glycosidisch gebundenen Phenols den höchsten Sättigungstransfer, während der Rest des Moleküls keine eindeutigen Signale zeigt. Das ausgeprägte STD-Signal der NHAc-Gruppe ist bedauerlicherweise auf Direktanregung während der Messung zurückzuführen und liefert daher keine Aussagen, ob und wie stark diese Gruppe Sättigung erfährt. Auch die Signale zwischen 3.5 und 4.0 ppm rühren von direkter Anregung her. Einzig die phenolischen Signale zeigen eindeutigen Sättigungstransfer und scheinen daher eng an das Protein gebunden zu sein. Dabei könnte es sehr gut in hydrophobe Wechselwirkung mit dem Tyrosin oder Tryptophan treten, welche beide direkt an der Bindungstasche des Enzyms zu finden sind.

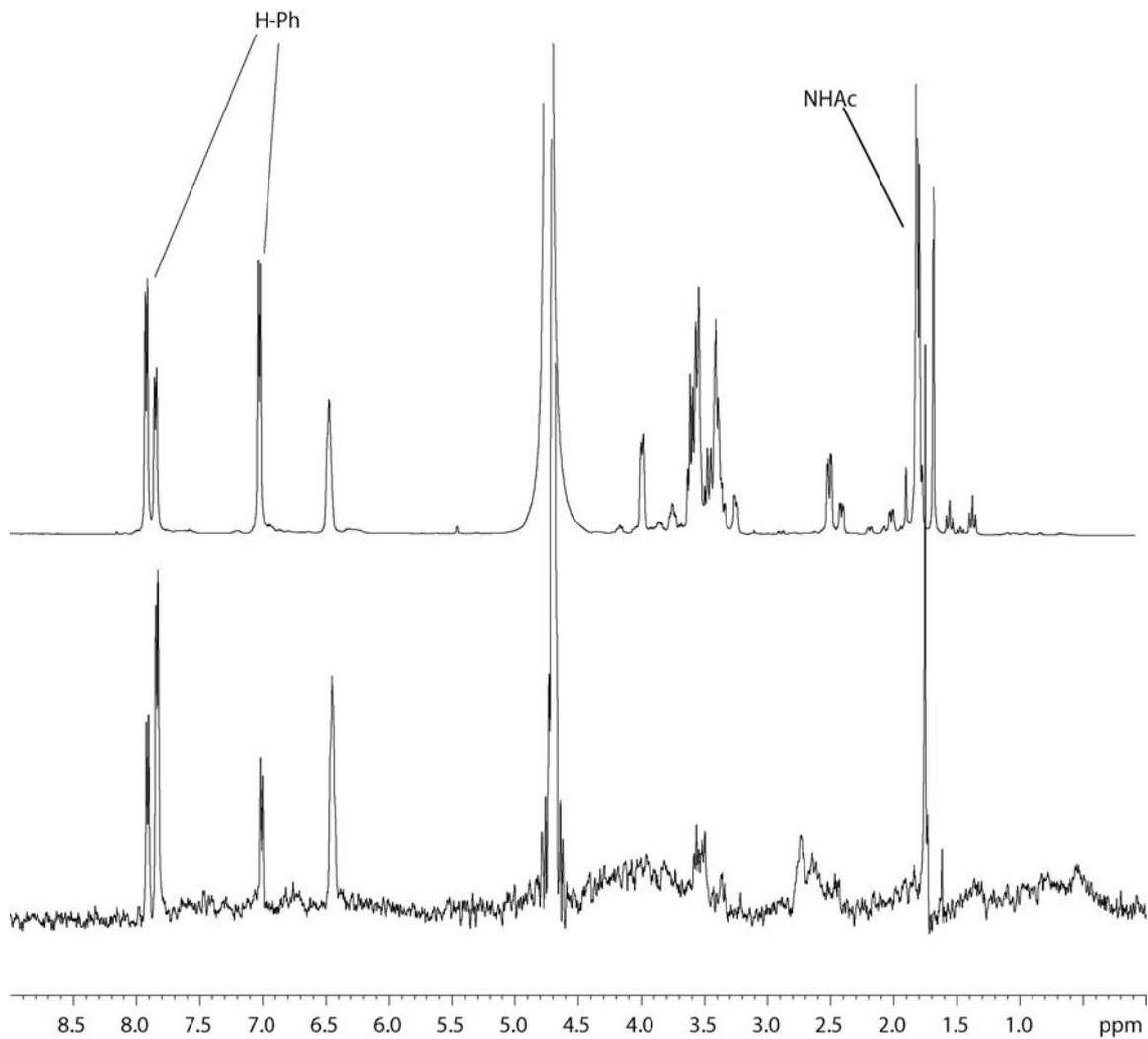


Abb. 76: STD-Messung der Hydrolyse von *p*NP-Hept5Ac; oben: Referenzspektrum; unten: STD-NMR

Ganz ähnlich verhält es sich mit dem STD-Spektrum des *p*NP-Hept5Ac. Während die Kohlenhydratsignale schwach ausgeprägt sind, bzw. von Direktanregung her rühren, zeigen die aromatischen Protonen deutliche STD-Signale. Auch hier zeigt sich, dass einzig das hydrophobe Aglycon Sättigung erfährt und daher mit dem Enzym in engen Kontakt zu stehen scheint.

In Abb. 77 ist die STD-Untersuchung von *p*NP-Neu5,9Ac₂ dargestellt.

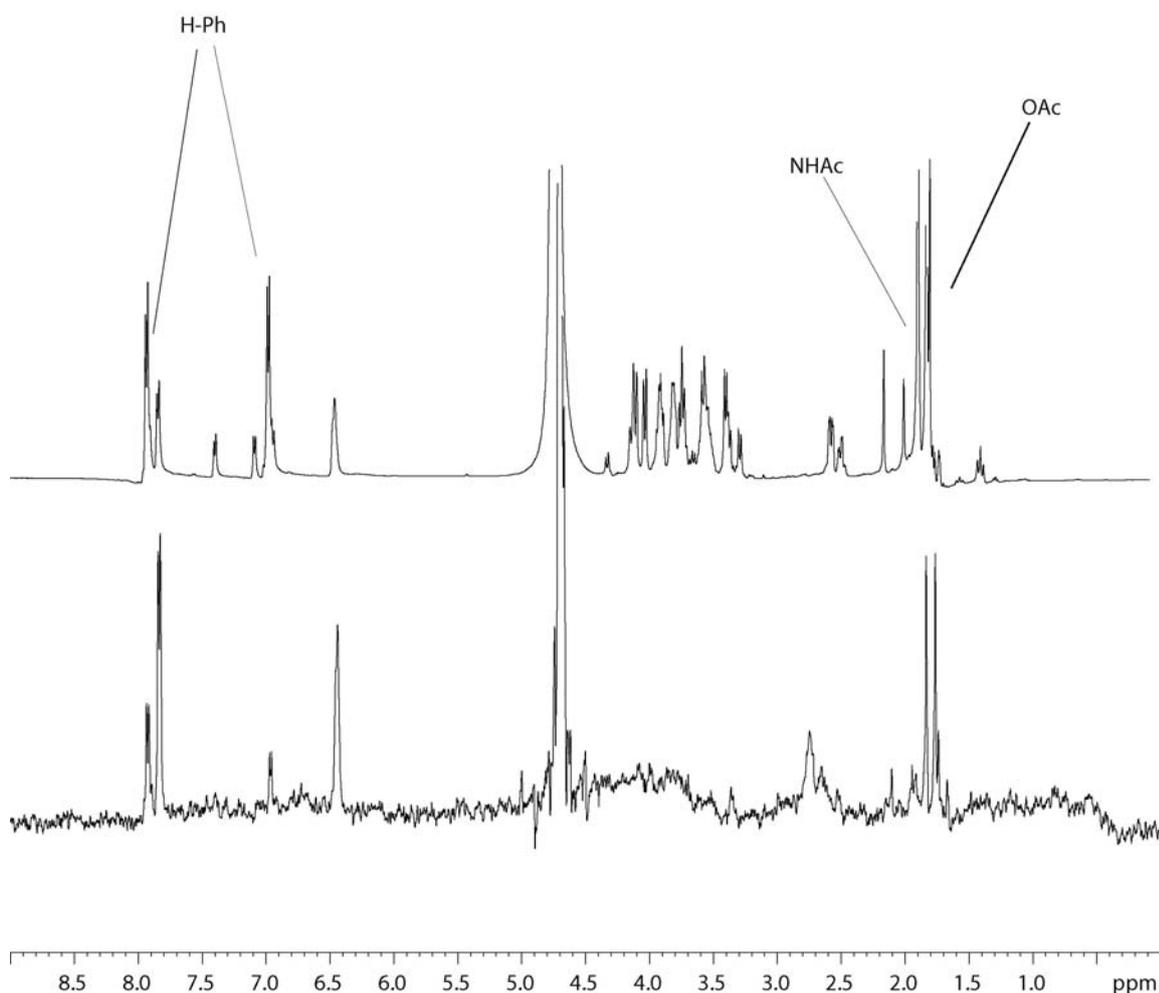


Abb. 77: STD-Messung der Hydrolyse von *p*NP-Neu5,9Ac₂; oben: Referenzspektrum; unten: STD-NMR

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen der anderen Substrate zeigen auch hier sämtliche Kohlenhydratprotonen sehr schwache STD-Signale, so dass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass das Substrat dem Enzym nicht besonders nahe kommt. Auch die aromatischen Protonen verhalten sich genau wie in den oben beschriebenen Spektren. Sie sind der einzige Teil des Moleküls, welches unter diesen Bedingungen nachweislich in engem Kontakt mit dem Enzym steht. Die Signale beider Acetylgruppen bei 1.7 und 1.8 ppm sind auf Direktanregung während der Messung zurückzuführen.

Alle STD-Spektren zeigen einen kaum meßbaren Sättigungstransfer auf die Protonen des Kohlenhydratgerüsts. Durch diese schwachen Wechselwirkungen wird dem Substrat ein

schneller Eintritt und Wiederaustritt aus der Bindungstasche ermöglicht, ohne dass sich während der Reaktion ein allzu stabiles Intermediat bildet. Da nur die unpolare Abgangsgruppe dem Enzym so nahe kommt, dass sie den Sättigungstransfer erfährt, muss das Enzym in Abwesenheit eines Akzeptors in einer geöffneten Konformation vorliegen, in der das Kohlehydratgerüst relativ weit von der Proteinoberfläche entfernt ist. Es ist zu vermuten, dass erst die Bindung eines geeigneten Akzeptors dafür sorgt, daß es zu einer konformellen Veränderung der Enzymtasche kommt. Dadurch könnte das Donorsubstrat dann besser fixiert werden und mit der bekannten Selektivität übertragen werden. Interessanterweise zeigen nur die unpolaren phenolischen Protonen deutliche Signale. Das pNP-Sialosid scheint also den natürlichen Donor Sialyl-3'-lactose in Größe und Polarität zu simulieren. Da diese Gruppe einen ausgeprägten Sättigungstransfer zeigt, könnten Modifikationen an dieser Position zu potentiellen Inhibitoren führen. Dafür müßten die Wechselwirkungen zwischen Aglycon und Enzym so stark sein, dass es in oder an der Bindungstasche verweilt und diese somit blockiert wird.

11. Zusammenfassung

Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* hat die natürliche Aufgabe Neu5Ac von sialylierten Glycoproteinen der Zelloberfläche einer Wirtszelle auf das eigene Zellepitop zu übertragen. Dieses membrangebundene Enzym gehört zur Superfamilie der Sialidasen und stellt den Hauptvirulenzfaktor der Chagas Krankheit dar und ist wegen seiner hohen Substratspezifität für eine *in vitro* Anwendung zur Darstellung $\alpha(2-3)$ -sialylierter Oligosaccharide äußerst interessant. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, ausgehend von *p*NP-Neu5Ac (**12**) eine Reihe von verschiedenen Oligosacchariden zu synthetisieren. Neben lactosidischen Strukturen und LacNAc-Glycosiden, konnten auch Gal β -1-3Gal-Derivate, in zum Teil sehr guten Ausbeuten von größer 70 %, sialyliert werden. Es zeigte sich, daß Trans-Sialidase in der organischen Synthese von $\alpha(2-3)$ -sialylierten Oligosaccharide eine ausgezeichnete Alternative zu den bekannten Sialyl-Transferasen darstellt.

Neben einer großen Vielfalt an Akzeptorsubstraten, sind im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls Modifikationen am Donorsubstrat vollzogen worden. Ausgehend von *p*NP-Neu5Ac (**12**) konnte mit Hilfe einer Periodat-Oxidation, gefolgt von einer Reduktion mit Cyanoborhydrid die seitenketten-verkürzten *p*NP-Oct5Ac und *p*NP-Hept5Ac hergestellt werden. Überraschender Weise gelang es in guten Ausbeuten von ca. 50 % diese nicht natürlichen Donorsubstrate auf Lactoside bzw. LacNAc-Glycoside zu übertragen. Um weitere Erkenntnisse über die Toleranz der Trans-Sialidase zu erhalten, sind weitere Modifikationen am Donorsubstrat durchgeführt worden. Dazu wurde von A. Schroven im Rahmen seiner Diplomarbeit zuerst *p*NP-Neu5,9Ac als Donorsubstrat synthetisiert, bevor es ebenfalls in sehr guten Ausbeuten von ca. 50 % transglycosyliert wurde. Dabei gelang es ebenfalls Lactoside und LacNAc-Derivate zu glycosylieren, was zu biologisch interessanten Trisacchariden führte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß die exocyclische Seitenkette für die enzymatische Erkennung zwar wichtig, nicht aber essentiell für die biokatalytische Aktivität der Trans-Sialidase ist.

Die ausgesprochene Transferase Aktivität und die hohe Substratspezifität der Trans-Sialidase ermöglichten ebenfalls die effiziente Synthese von komplexen Sacchariden wie Neu5Ac- $\alpha(2-3)$ Gal- $\beta(1-4)$ GlcNHAc- α All und den entsprechenden kettenverkürzten Derivaten in einer Tandem-Eintopf-Synthese. Dabei wurde in einem ersten Schritt GlcNHAc- α All unter Verwendung der β -Galactosidase aus *Bacillus circulans* mit *p*NP-Gal in das entsprechende lactosidisch verknüpfte Disaccharid überführt. Nach 36 Stunden wurde dieser Ansatz mit Trans-Sialidase und dem

entsprechenden Donorsubstrat versetzt. Nach einer schnellen chromato-graphischen Reinigung konnten die verschiedenen Trisaccharide in guten Ausbeuten und Quantitäten isoliert werden.

KDN-Oligosaccharide werden ganz besondere Aufgaben in biologischen Systemen zugeordnet und eine effiziente und bequeme Methode der Darstellung dieser Verbindungen steht zur Zeit noch nicht Verfügung, sieht man von der Verwendung einiger Sialyl-Transferasen ab, die ebenfalls CMP-KDN als Donorsubstrat erkennen und transferieren. Im Rahmen dieser Arbeit ist KDN (**65**) durch die Kondensation von Mannose (**63**) mit Oxalessigsäure (**64**) synthetisiert worden. Nach Blockierung der Hydroxylgruppen und Aktivierung des anomeren Zentrums gelang es durch Phasentransferkatalyse das entsprechende *p*NP-KDN Glycosid darzustellen. Nach der erfolgreichen Entschützung dieser Verbindung konnte in enzymatischen Versuchen gezeigt werden, daß *p*NP-KDN kein geeignetes Donorsubstrat für die Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* ist. Diese Erkenntnis unterstützt die Vermutung, daß KDN als Neu5Ac-Ersatz in Glycoconjugaten diese vor den Abbau durch Sialidasen schützt und somit zum Beispiel pathogene oder carcinome Zellen vor dem physiologischen Abbau schützt.

Das sialylierte Lactosid **31** und die seitenkettenverkürzten Saccharide **45** und **49** wurden auf ihre Bindungseigenschaften an das Myelin-Assoziierte-Glycoprotein (MAG) untersucht. Die Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen sind mit Hilfe der Sättigungs-Transfer-Differenz-NMR-Technik (STD-NMR) ermittelt worden. Diese Methode basiert auf die Spin-Diffusion, ein Phänomen das unter NMR-Bedingungen bei Makromolekülen auftritt, die größer als 10 kDa sind. Tritt ein Ligand in einen engen Kontakt mit dem Protein, so erfährt dieser einen stärkeren STD-Effekt als freie Liganden, die keine Signale im STD-Spektrum ergeben. Neben der Bewertung von Bindungseigenschaften, wie der Bestimmung von K_D -Werten, ermöglicht die STD-NMR-Spektroskopie die Ermittlung von Bindungsepitopen. Dadurch können Aussagen getroffen werden, wie sich das Molekül in der Bindungstasche oder -ebene strukturell anordnet. Im Fall des MAG zeigt nur das Sialyl-lactosid **31** ausgeprägte Bindungseigenschaften, während die kettenverkürzten Analoga **45** und **49** eine drastisch verkleinerte Bindungsaffinität aufweisen. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die exocyclische Seitenkette der Neu5Ac essentiell für die Bindung an MAG ist. Bereits die Abspaltung einer C-OH-Gruppe ist dafür verantwortlich, dass keine Erkennung des gesamten Moleküls mehr stattfindet.

Da Trans-Sialidase der Hauptvirulenzfaktor der Chagas-Krankheit ist und dieses Enzym einzigartige Eigenschaften besitzt, sind Untersuchungen zum mechanistischem Verständnis von

besonderem Interesse. Dabei sind hauptsächlich kristallographische Untersuchungen durchgeführt worden und lieferten Erkenntnisse über den Mechanismus allerdings nur unter statischen Bedingungen. Um in Lösung die enzymatischen Reaktionen zu analysieren, sind daher die verschiedenen Donorsubstrate (**12**, **40**, **42** und **52**) mit Trans-Sialidase unter NMR-Bedingungen untersucht worden. Dabei wurden sowohl Versuche zur Kinetik als auch zur Erstellung von Epitopen durch STD-Experimente unternommen. Es zeigte sich, daß die Hydrolyse von *p*NP-Neu5Ac (**12**) sehr viel schneller abläuft als die Hydrolyse der seitenkettenverkürzten Derivate **40** und **42**. Auch die Hydrolyse von *p*NP-Neu5,9Ac₂ (**52**) verlief ähnlich langsam wie die der kettenverkürzten Derivate. Diese Ergebnisse zeigen, daß die exocyclische Seitenkette zwar nicht essentiell aber doch sehr wichtig für die biologische Erkennung durch Trans-Sialidase ist. Im weiteren konnte gezeigt werden, daß in Anwesenheit eines geeigneten Akzeptors (β -Methyl-lactosid) in äquimolarer Konzentration die Transferate nur 50 % betrug. Auch wenn diese Versuche unter NMR-Bedingungen bei geringer Temperatur durchgeführt wurden, läßt sich aus ihnen schließen, daß die Transferaktivität des Enzyms durchaus von der Konzentration des Akzeptors abhängt. Im weiteren zeigte sich in den STD-Experimenten, daß unter Hydrolysebedingungen nur das glycosidisch gebundene *p*NP in direktem Kontakt zum Protein steht, während der Rest des jeweiligen Donorsubstrats keine STD-Signale ergab und somit nicht im engen Kontakt mit dem Enzym steht. Im Falle der Hydrolyse scheint die Bindungstasche des Enzyms eher geöffnet zu sein und es ist davon auszugehen, daß die Adhäsion eines Akzeptors eine konformelle Änderung des Enzyms induzieren könnte, wodurch es in eine eher geschlossene Form übergehen würde.

12. Summary

In Chagas disease trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* causes the transfer of Neu5Ac from a human host cell to the cell epitope of the pathogen. This unusual transfer mechanism enables the pathogen to protect its own cell surface against recognition by the human immune system. Interestingly, this enzyme belongs to the superfamily of the sialidases but shows merely transferase activity in the presence of a suitable acceptor molecule. Thus, trans-sialidase enables the transglycosylation of natural and several non natural donor substrates such as *p*NP-Neu5Ac (**12**) to Gal β -R derivatives leading to a large variety of complex and biologically active oligosaccharides. A number of different sialylated lactosides could be obtained in very good yields. In the case of sialylated lactose more than 70 % yield. Also Gal β 1-3-Gal-Disaccharides have been transferred into the corresponding Neu5Ac derivative leading to tumor associated antigens or corresponding analogues of those compounds (**26**). Further, non naturally occurring oligosaccharides could be obtained, and subsequently used as building blocks for convenient syntheses of more complex glycoconjugates in very good yields.

Beside structural changes of the acceptors, potential donor substrates were synthesized with modifications of the glycerol chains by single or double periodate cleavage of the *p*NP-Neu5Ac glycoside followed by reduction of the corresponding carbonyl compounds with cyanoborohydrate. These novel Neu5Ac mimetics could be obtained in excellent yields. Surprisingly, these octunolosonic and heptulosonic acid derivatives (**40** and **42**) were recognized by trans-sialidase and transglycosylated in comparable yields with lactose derivatives as acceptor substrates. In order to understand which modifications of the donor substrate are tolerated by trans-sialidase further potential donor substrates have been synthesized. First a *p*NP-Neu5,9Ac₂ donor substrate (**57**) was prepared by A. Schroven during his diploma thesis before it was tested to be a good donor substrate leading to very interesting and biologically important oligosaccharides. The yields in these reactions have been still very high with around 50 %. These results indicate that the exocyclic sidechain doesn't play an essential role during the recognition process and enables the syntheses of a variety of different oligosaccharides.

The distinct transferase activity and the high acceptor specificity allows efficient approaches to complex oligosaccharides such as Neu5Ac- α (2-3)Gal- β (1-4)GlcNHAc- α All and its glycerol-shortened derivatives in a tandem one pot synthesis. In a first step GlcNHAc- α All was glycosylated with *p*NP-Gal employing β -galactosidase from *Bacillus circulans*. Subsequently the disaccharide was *in situ* transsialylated with the corresponding *p*NP-donor substrate and trans-

sialidase from *Trypanosoma cruzi*. After a fast purification by Reverse-Phase-Chromatography followed by Size-Exclusion-Chromatography the trisaccharides were obtained in acceptable yields and quantities.

KDN-Oligosaccharides are supposed to play important roles in biological systems but convenient and efficient methods to synthesize such oligosaccharides have not been elaborated so far. Therefore, after the preparation of KDN (**65**) by condensation of Mannose (**63**) with Oxalacetic acid (**64**) it has been converted into the corresponding *p*NP-KDN derivative (**73**). Unfortunately, trans-sialidase did not show any enzymatic activity on *p*NP-KDN (**73**). It turned out that *p*NP-KDN (**73**) is not a suitable donor substrate for trans-sialidase which seems to indicate that the *N*-acetyl group is essential for the recognition process. This emphasizes the assumptions that KDN is responsible for the protection of certain cell-surface-oligosaccharides for being decomposed by sialidases in physiological systems.

The sialylated lactoside **31** and its shorted derivatives **45** and **49** were tested to be ligands for the Myelin-Associated-Glycoprotein (MAG). Therefore, the carbohydrate protein interaction has been measured by Saturation-Transfer-Difference-NMR techniques. This method is based on the spin-diffusion which occurs in macromolecules larger than 10 kDa. If a ligand is in close contact with a protein it shows stronger STD-Effect compared to those which are not in close contact. Besides the evaluation of binding properties, like the determination of K_D -values by titration, the STD-technic enables the determination of the binding-epitope. This allows statements about the structural orientation of the molecule in the binding domain. Only the Neu5Ac-derivative **31** shows distinct binding properties and gave a proper binding epitope. The binding affinity of the shorted derivatives **45** and **49** decreased drastically and neither titration nor epitope mapping could be obtained. In accordance with earlier results these STD-experiments show that Neu5Ac is essential for the binding to MAG. A modification of this key-substrate decreases the binding of the whole molecule drastically.

Because of its massive influence on the progress of the Chagas disease the mechanistic properties of trans-sialidase have been under investigation in order to understand how the enzyme does work as well as to design inhibitors. The main work on these is based on crystallographic approaches in which a potential substrate or inhibitor is supposed to be inside the binding pocket of the enzyme when it is crystallized. The results of the analyses gave a lot of ideas about the mechanism of the enzyme but it's a fixed model without any dynamic changes

throughout the process. Therefore, NMR-studies have been developed in order to follow the dynamic processes. In this work several *p*NP-donor substrates have been tested on their kinetic and STD-properties during the enzymatic process. The enzymatic activity on *p*NP-Neu5Ac (**12**) was that big, that no STD-effect could be observed. The kinetic data showed a rapid hydrolysis compared to the other donor substrates (**40**, **42** and **52**). The hydrolysis of the modified donor substrates with trans-sialidase proceeded far slower compared to *p*NP-Neu5Ac. In all cases the incubation with an equimolar concentration of an acceptor substrate (methyl-lactoside) led only to partial transference reaction. The rate between hydrolysis and transference varies around 50 % for all donor substrates. Further, STD-experiments indicate that the carbohydrate moiety is in more or less loose contact to the protein surface because it does not receive any saturation from the enzyme in the absence of a suitable acceptor. Only the glycosidic *p*NP-group shows distinct signals. This probably indicates that the enzyme is in a more open conformation during the absence of acceptor. Further, the glycosidic *p*NP-group seems to simulate the subterminal Galactose residue of a natural donor substrate such as Sialyl-3'-lactoside. This result can be used for the design of potential inhibitors of trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*.

13. Experimenteller Teil

13.1 Allgemeine Arbeitsmethoden

Dünnschichtchromatographie

Alle Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelfolie (Merck DC-Alufolie 60 F₂₅₄) verfolgt. Die Reverse-Phase-Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgelplatten der Firma Merck (DC-Platten RP-18 F_{254a}). Die Detektion erfolgte durch Besprühen mit 10 %iger ethanolischer Schwefelsäure und anschließender Wärmebehandlung, sowie mittels UV-Absorption. Im weiteren konnten Aldehyde durch Besprühen mit einer 2 %igen Lösung aus 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0.2 M Salzsäure sichtbar gemacht werden.

Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Trennung wurde nach dem Flash-Verfahren mit leichtem Stickstoffüberdruck an Kieselgel (Merck, 230-400 mesh, Korngröße 40-63 µm), bzw. an Kieselgel 60 RP-18 (Merck, 230-400 mesh, Korngröße 40-63 µm) durchgeführt. Die Gelpermeationschromatographie wurde an Biogel P-2 mit bisdestilliertem Wasser durchgeführt.

Zur analytischen HPLC einiger Saccharidgemische an einem LaChrom-HPLC-System (Firma Merck) wurden hauptsächlich LiChrosorb-NH₂ Säulen (250 x 4 mm x 5 µm) verwendet. Die Detektion erfolgte substanzspezifisch mittels UV-(L-7455) Detektor (Firma Merck).

NMR-Spektroskopie

Alle dargestellten Verbindungen wurden mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie an den Bruker Spektrometern AMX-400 (100 MHz bei ¹³C) und DRX-500 (125 MHz bei ¹³C) charakterisiert. Die genaue Zuordnung der Signale erfolgte mit Hilfe von ¹H-¹³C-COSY- bzw. HMQC-, HMBC-, ¹H-¹H-COSY- sowie TOCSY-Experimenten. In seltenen Fällen wurde noch NOESY-Spektren zur Auswertung herangezogen. Die Rezeptor-Ligand- bzw. die Enzym-Ligand-Wechselwirkungen wurden mit Hilfe der STD-Technik an einem 500 MHz NMR der Firma Bruker an der Universität zu Lübeck bestimmt.

Massenspektrometrie

MALDI-ToF Massenspektren wurden an einem Bruker Biflex III aufgenommen. Gemessen wurde im Positiv Reflector Mode. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet.

Schmelzpunktbestimmungen

Die Schmelzpunktbestimmungen erfolgten an einem apotec-Schmelzpunktbestimmer. Der optische Drehwert wurde mit einem Perkin-Elmer-Polarimeters 341 in 100 mm Küvetten bei 20° C ermittelt.

Elementaranalysen

Elementaranalysen wurden in der Abteilung für Zentrale Elementanalytik des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

Photometrie

Photometrische Untersuchungen der enzymkatalysierten Reaktionen erfolgten an einem Lambda 20 Perkin-Elmer UV- Vis Spektrometer.

Zentrifuge

Die Reaktionsansätze wurden bei ca. 20000 Umdrehungen pro Minute mit einer Speedvacc der Firma Savant zentrifugiert.

Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer Lyovac GT 2 der Firma Leybold, einer Christ Alpha 1-4 LD oder einer Christ Alpha 1-2 LD gefriergetrocknet.

pH-Meter

Zur Einstellung der pH-Werte der Pufferlösungen wurden die pH-Meter Metrohm 632 sowie Mettler Toledo MP 220 verwendet.

Enzymansätze

Die enzymatischen Synthesen wurden in dem Thermomixer *comfort* der Firma Eppendorf durchgeführt. Als Reaktionsgefäße dienten Eppendorf Tubes (1.5 ml).

13.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AVV 1: Acetylierungen zur Blockierung der freien OH-Gruppen

Die freien Verbindungen wurden in absolutem Pyridin gelöst und mit einem fünffachen Überschuß an Ac_2O unter Eiskühlung versetzt. Über Nacht wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Reaktion durch Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum beendet, wobei der Rückstand mit Toluol codestilliert wurde. Gegebenenfalls wurde das Rohprodukt über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt.

AVV 2: Deacetylierungen nach Zemplén

Die zu deblockierenden Verbindungen wurden in absoluten Methanol gelöst und mit einer frisch angesetzten methanolischen Natriummethanolat Lösung versetzt, bis sich ein pH-Wert von 8-9 eingestellt hat. Der Reaktionsverlauf wurde kontinuierlich dünnschichtchromatographisch verfolgt, und die Reaktion nach vollständigem Umsatz durch Neutralisation mit Amberlite IR 120 (H^+) beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt. Zur besseren Handhabung wurde das Produkt anschließend in bidestilliertem Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

AVV 3: Verseifung der Ester

Zur Verseifung wurde der jeweilige Ester der Neu5Ac bzw. seiner Analoga in 0.1 M NaOH gelöst. Bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch solange gerührt, bis dünnschichtchromatographisch kein Edukt mehr detektierbar war. Zum Abbruch der Reaktion wurde die Lösung mit Amberlite IR 120 (H^+) neutralisiert, der Ionenaustauscher abfiltriert und das Lösungsmittel an der Gefriertrocknung entfernt.

AVV 4: Transglycosylierungen mit Trans-Sialidase aus *T. cruzi*

Zur Synthese der sialylierten Oligosaccharide wurden ca. 20 μmol des jeweiligen Donorsubstrats mit 1 bis 2 Äquivalenten des Akzeptorsaccharides in 1 ml Tris-HCl-Puffer (100 mmol, 0.02 % BSA) bei einem pH-Wert von 7.5 gelöst. Bei einer Temperatur von 23° C wurden 80 μl der Enzymlösung zum Ansatz gegeben, dies entspricht ca. 80 μg reinem Enzym. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 23° C inkubiert. Die Reaktionen wurden dünnschichtchromatographisch verfolgt, wobei in allen Ansätzen das gleiche Laufmittelge-

misch (Butanol/Essigsäure/Wasser = 5/2/2) zur Kontrolle verwendet wurde. Durch die Zugabe von 1.5 ml Ethanol wurde das Enzym denaturiert und somit die Reaktion abgebrochen. Die leicht getrübe Lösung wurde 30 min. zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Dieser wurde darauf gefriergetrocknet und dann das Rohprodukt säulenchromatographisch an RP-18-Kieselgel oder gelpermeationschromatographisch mit Biogel P-2 gereinigt.

AVV 5: Hydrolyseversuche mit Sialidase aus *Salmonella typhimurium*

Zur Hydrolyse der potentiellen Donorstrukturen wurden 20 μmol des jeweiligen Donorsubstrats in 1 ml Acetat-Puffer (100 mmol, pH = 5.5, 0.02% BSA) gelöst und mit 1 U Sialidase versetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37° C über Nacht. Neben der Reaktionslösung wurde auch ein Referenzansatz mit der gleichen Zusammensetzung in Abwesenheit von Enzym über die gleiche Zeit bei derselben Temperatur inkubiert, mit dem kontrolliert wurde, ob eine spontane Hydrolyse des entsprechenden Substrats eintrat. Nach vergleichender dünnschichtchromatographischer Untersuchung der Ansätze konnte das entsprechende Hydrolyseprodukt nachgewiesen werden und die Reaktion wurde ohne Aufarbeitung des Ansatzes abgebrochen.

AVV 6: Phasentransferglycosylierung

Die peracetylierten Sialylhalogenide wurden zusammen mit dem entsprechenden Phenol und dem Phasentransferkatalysator (TBA- HSO_4) in DCM gelöst. Unter starkem Rühren wurde die 0.8 fache Menge an 1 M NaOH zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für ca. 3 Stunden kräftig gerührt und der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt (Eluens: EE). Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Verdünnung mit DCM. Anschließend wurde mehrfach mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (Laufmittel: EE) gereinigt.

Assay zur Bestimmung der Inhibition von Trans-Sialidase

7.4 mg (20 μ mol) Verbindung **54** wurden nach AVV 4 mit 8 mg (22 μ mol) β -Methylactosid und 80 μ g Trans-Sialidase 12 Stunden inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend dünn-schichtchromatographisch untersucht (Eluens: Bu-OH:HOAc:H₂O 5:2:2). Nachdem keine Produktbildung detektiert werden konnte, wurden dem Reaktionsgemisch weitere 10 mg (23 μ mol) *p*NP-Neu5Ac zugeführt. Nach Fortsetzung der Reaktion für 10 Stunden unter erneuter dünn-schichtchromatographischer Kontrolle konnte die Transglycosylierung des Neu5Ac-Donorglycosids nachgewiesen werden, während die Verbindung **54** unverändert aus der Reaktion hervorging. Die Reaktion wurde ohne weitere Aufarbeitung abgebrochen.

Trans-Sialidase aus *T. cruzi*

Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* wurde rekombinant in *E. coli* im Institut für Biochemie der Universität Hamburg von Dr. P. Ziegelmüller exprimiert. Das Enzym wurde in Konzentrationen von ca. 1 mg pro ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) erhalten.

13.3 Spezielle Synthesevorschriften und NMR Experimente

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-3)-(2-acetamido-2-desoxy α -D-galactopyranosid) (26)

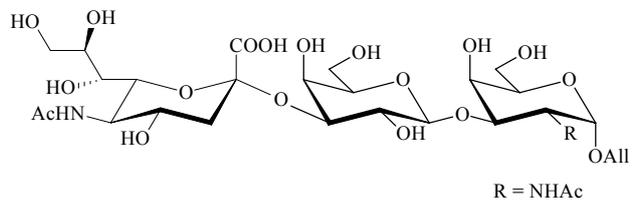
10 mg (23 μ mol) *p*NP-Neu5Ac werden nach AAV 4 mit 11 mg (26 μ mol, 1.1 eq.) Akzeptor **25** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μ l Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung des Produkts erfolgte über eine RP-18 Säule mit H₂O als Eluens. Das Produkt **26** wurde in eine Auswaage von 8.9 mg (12.2 μ mol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 53 %.

C₂₈H₄₆N₂O₁₉ (714.3)

farblos amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +18^\circ$ ($c = 0.2$, H₂O)

R_f = 0.15 (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 737.2$ [M+Na]⁺, 753.3 [M+K]⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 5.98$ (dddd, 1H, All-2), 5.45 (dd, 1H, All-3_{cis}), 5.39 (dd, 1H, All-3_{trans}), 5.10 (d, 1H, H-1), 4.67 (d, 1H, H-1'), 4.59 (dd, 1H, H-2), 4.42 (m, 1H, All-1a), 4.39 (dd, 1H, H-4), 4.25 (m, 1H, All-1b), 4.15 (dd, 1H, H-3), 4.07 (ddd, 1H, H-5), 3.98 (dd, 1H, H-4'), 3.94-3.89 (m, 3H, H-5'', H-6a, H-6b), 3.83-3.67 (m, 9H, H-4'', H-6a', H-6b', H-6'', H-9a'', H-9b'', H-3', H-5', H-8''), 3.59 (1H, dd, H-7''), 3.44 (dd, 1H, H-2'), 2.62 (dd, 1H, H-3_{eq}''), 2.18 (s, 3H, COCH₃), 2.07 (s, 3H, COCH₃), 1.83 (dd, 1H, H-3_{ax}'') ppm.

$J_{All-1a,2} = 5.8$, $J_{All-1b,2} = 6.1$, $^2J_{All-1a/b} = 12.8$, $J_{All-2,3cis} = 15.1$, $J_{All-2,3trans} = 9.7$, $J_{1,2} = 3.7$, $J_{2,3} = 7.8$, $J_{3,4} = 3.0$, $J_{4,5} = 1.8$, $J_{5,6a} = 5.8$, $J_{5,6b} = 5.9$, $J_{5,6a} = 6.1$, $J_{1',2'} = 8.1$, $J_{2',3'} = 8.7$, $J_{3',4'} = 3.3$, $J_{4',5'} = 0.8$, $J_{6'',7''} = 6.1$, $J_{7'',8''} = 5.5$, $^2J_{3ax'',H3eq''} = 13.1$, $J_{3ax'',H4''} = 12.9$, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz.

¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O): 135.05 (All-2), 119.10 (All-2), 106.07 (C-1'), 96.73 (C-1), 76.56 (C-3), 75.27 (C-3'), 75.13, 74.95, 74.61, 74.55, 74.43, 74.29, 73.91, (C-4''), C-5, C-5', C-5'', C-6'', C-7'', C-8''), 73.57 (All-1), 72.85 (C-2), 70.01 (C-4'), 69.89 (C-4), 69.47 (C-2'), 62.03 (C-9), 61, 35 (C-6), 60.72 (C-6'), 39.13 (C-3''), 22.38 (COCH₃), 21.73 (COCH₃) ppm.

Quartäre C-Atome waren unter diesen Bedingungen nicht detektierbar.

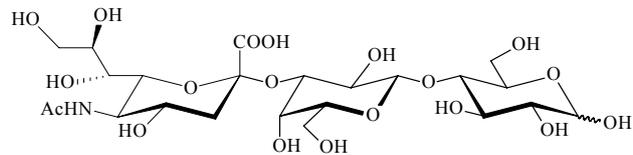
(5-Acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-D-glucopyranose (28**)**

10 mg (23 μ mol) *p*NP-Neu5Ac werden nach AAV 4 mit 9 mg (26 μ mol, 1.1 eq.) Akzeptor **27** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μ l Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung erfolgte gelpermeationschromatographisch über eine Biogelsäule (P-2). Das Produkt **28** wurde in eine Auswaage von 10.6 mg (16.8 μ mol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 73 %.

C₂₃H₃₉NO₁₉ (633.2)

farbloser amorpher Feststoff

R_f = 0.19 (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



Spektroskopische Daten entsprechen der Literatur.¹⁰⁶

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)- β -D-glucopyranosid (30**)**

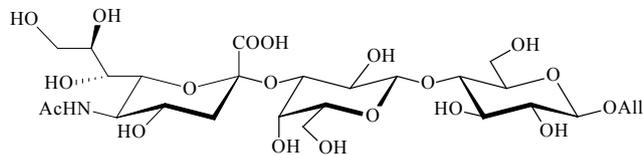
10 mg (23 μ mol) *p*NP-Neu5Ac werden nach AAV 4 mit 9 mg (26 μ mol, 1.1 eq.) Akzeptor **29** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μ l Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung des Produkts erfolgte über eine RP-18 Säule mit H₂O als Eluens. Das Produkt **30** wurde in einer Auswaage von 9.4 mg (14.0 μ mol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 61 %.

C₂₆H₄₃NO₁₉ (673.6)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -2.6^\circ$ (*c* = 0.2, H₂O)

R_f = 0.19 (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): *m/z* = 696. 5 [M+Na]⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): δ = 5.85-5.77 (m, 1H, All-2), 5.25 (dd, 1H, All-3_{cis}), 5.12 (dd, 1H, All-3_{trans}), 4.38 (d, 1H, H-1), 4.36 (d, 1H, H-1'), 4.23 (dd, 1H, All-1a), 4.07 (dd, 1H, All-1b), 3.91 (dd, 1H, H-3'), 3.84-3.80 (m, 2H, H-4', H-6a), 3.70-3.42 (m, 14 H, H-3, H-4, H-4''),

H-5, H-5', H-5'', H-6b, H-6a', H-6b', H-6'', H-7'', H-8'', H-9a'', H-9b''), 3.40 (dd, 1H, H-2'), 3.18 (dd, 1H, H-2), 2.55 (dd, 1H, H-3eq''), 1.90 (s, 3H, COCH₃), 1.60 (dd, 1H, H-3ax'') ppm.

²J_{All-1a/b} = 12.6, J_{All-1a,2} = 5.7, J_{All-1b,2} = 6.47, ²J_{All-3cis,trans} = 2.3, J_{All-3cis,2} = 15.9, J_{All-3trans,2} = 8.4, J_{1,2} = 8.1, J_{2,3} = 8.8, J_{1',2'} = 7.9, J_{2',3'} = 9.7, J_{3',4'} = 3.5, ²J_{3eq'',3ax''} = 12.1, J_{3eq'',4''} = 4.4, J_{3ax'',4''} = 12.0 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): δ = 132.43 (CH_{allyl}), 119.96 (CH_{2-allyl}), 103.49 (C-1'), 102.8 (C-1), 78.67, (C-3'), 77.96, 76.40, 75.90, 75.54, 75.11, 74.92, 73.87, 73.22 (C-4, C-4'', C-5, C-5', C-5'', C-6'', C-7'', C-8''), 76.49 (C-3), 73.19 (C-2), 70.01 (C-2'), 68.24 (C-4'), 61.41, 60.89, 60.20 (C-6, C-6', C-9''), 54.67 (OCH₂), 38.91 (C-3''), 21.99 (COCH₃) ppm.

Quartäre C-Atome waren unter diesen Bedingungen nicht detektierbar.

Methyl-(5-Acetamido-3,5-dideoxy-α-D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β-D-galactopyranosyl)-(1-4)-β-D-glucopyranosid (32)

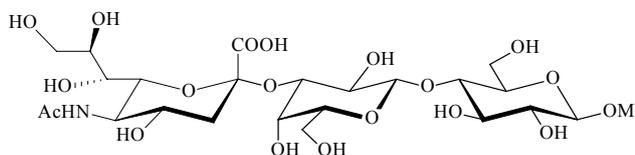
10 mg (23 μmol) *p*NP-Neu5Ac werden nach AAV 4 mit 12 mg (33 μmol, 1.5 eq.) Akzeptor **31** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μl Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung erfolgt gelpermeationschromatographisch über eine Biogelsäule (P-2). Das Produkt **32** wird in eine Auswaage von 9.4 mg (14.5 μmol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 63 %.

C₂₄H₄₁NO₁₉ (647.6)

farblos amorpher Feststoff

[α]_D²⁰ = -7.4° (c = 0.2, H₂O)

R_f = 0.13 (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): *m/z* = 670.1 [M+Na]⁺, 686.8 [M+K]⁺

¹H-NMR(400 MHz, D₂O): δ = 4.83 (d, 1H, H-1), 4.36 (d, 1H, H-1'), 3.91 (dd, 1H, H-3'), 3.86 - 3.81 (m, 2H, H-4', H-6a), 3.70 - 3.44 (m, 14H, H-3, H-4, H-4'', H-5, H-5', H-5'', H-6'', H-6b, H-6a', H-6b', H-7'', H-8'', H-9a'', H-9b''), 3.42 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (dd, 1H, H-2'), 3.19 (dd, 1H, H-2), 2.55 (dd, 1H, H-3eq''), 1.90 (s, 3H, COCH₃), 1.60 (dd, 1H, H-3ax'') ppm.

$J_{1,2} = 8.1$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{2',3'} = 9.7$, $J_{3',4'} = 3.7$, $J_{2,3} = 8.8$, ${}^2J_{3ax'',3eq''} = 12.3$,
 $J_{3ax'',4''} = 12.1$, $J_{3eq'',4''} = 4.4$ Hz.

${}^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 103.49$ (C-1'), 102.80 (C-1), 78.67 (C-3'), 77.96 (C-3), 76.40, 75.90, 75.54, 75.11, 74.92, 73.87, 73.22 (C-4, C-4'', C-5, C-5', C-5'', C-6'', C-7'', C-8''), 76.49 (C-3'), 73.19 (C-2), 70.01 (C-2'), 68.24 (C-4'), 61.41 (C-9'), 60.89 (C-6'), 60.20 (C-6), 54.67 (OCH_3), 38.91 (C-3''), 21.99 (COCH_3) ppm.

Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (34)

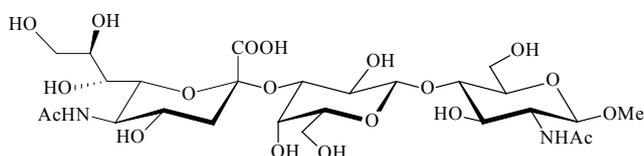
10 mg (23 μmol) *p*NP-Neu5Ac werden nach AAV 4 mit 14 mg (35 μmol , 1.5 eq.) Akzeptor **33** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μl Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Da es nicht gelingt das Produkt säulenchromatographisch vom Akzeptorsaccharid zu trennen, ist das vorgereinigte Gemisch aus Produkt und Akzeptor zusammen mit 8 mg β -Galactosidase aus *B. circulans* (Biolacta N5) in 1 ml Acetatpuffer (100 mmol, pH = 5.4) gelöst. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 40° C und das Ende der hydrolytischen Spaltung wird dünnschichtchromatographisch detektiert. Zur weiteren Aufarbeitung wird die Lösung mit 1 ml EtOH versetzt 10 min auf 75 ° C erhitzt. Nach der Zentrifugation wird die überstehende Lösung vom denaturierten Enzym abgetrennt und gefriergetrocknet. Die Isolierung des Produkts erfolgt durch Gelpermeationschromatographie mit Biogel P-2. Das Produkt **32** wird in eine Auswage von 6.8 mg (9.7 μmol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute 42 %.

$\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{19}$ (688.3)

farblos amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 35^\circ$ ($c = 0.3$, H_2O)

$R_f = 0.13$ (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 711.8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

${}^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 4.54$ (d, 1H, H-1'), 4.44 (d, 1H, H-1), 4.11 (dd, 1H, H-3'), 3.90-3.79 (m, 4H, H-6a, H-6b, H-4, H-5''), 3.75 (dd, 1H, H-2), 3.71-3.58 (m, 9H, H-9a'', H-9b'', H-6a', H-6b', H-5', H-6'', H-8'', H-4'', H-4'), 3.54-3.41 (m, 4H, H-5, H-3, H-2', H-

7''), 3.39 (s, 3H, OCH₃), 2.77 (dd, 1H, H-3''_{eq}), 2.08 (s, 3H, COCH₃), 2.02 (s, 3H, COCH₃), 1, 76 (dd, 1H, H-3_{ax}'') ppm.

$J_{1',2'} = 7.6$, $J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 8.4$, $J_{2',3'} = 8.9$, $J_{3',4'} = 3.4$, ${}^2J_{3''',3ax''} = 12.4$, $J_{3''',4''} = 4.9$, $J_{3ax'',4''} = 12.1$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): $\delta = 103.32$ (C-1'), 102.25 (C-1), 78.31 (C-3'), 76.28 (C-3), 76.01 (C-4), 75.78, 75.31, 74.55, 73.55 (C-5, C-5', C-6'', C-8''), 70.06, 69.59, 68.88, 68.29 (C-2', C-4', C-4'', C-7''), 63.36 (C-9), 61.60 (C-6'), 60.90 (C-6), 55.43 (OCH₃) 54.62 (C-2), 52.42 (C-5''), 40.37 (C-3''), 22.81, 22.60 (je COCH₃) ppm.

Methyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosylonat (37)

50 mg (0.12 mmol) der Verbindung **36** werden in 15 ml Acetatpuffer (100 mmol, pH = 4.0) suspendiert und mit 26 mg (0.12 mmol) NaIO₄ versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur gerührt, wobei kurz nach der Zugabe die Suspension eine Lösung bildet. Nach fast vollständige Umsetzung des Eduktes (dünnschichtchromatographischen Kontrolle) erfolgt in 30 min die weitere Zugabe von 19 mg (0.3 mmol) NaCNBH₃. Die Reaktionslösung wird anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer weiteren DC-Kontrolle und dem Nachweis, dass eine quantitative Reduktion der zunächst gebildeten Aldehydfunktionen stattgefunden hat, wird die Reaktion durch Neutralisation mit festem NaHCO₃ abgebrochen. Zur Entfernung der Salze wird die Lösung über eine Ionenaustauschersäule gegeben (Mixbed, Ionenaustauscher Amberlite, MB-3; 2x10 cm) und anschließend mehrfach über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt. Das Produkt wird in einer Auswaage von 11.8 mg (38.3 μ mol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 32 %.

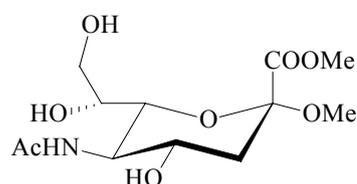
C₁₂H₂₁NO₈ (307.3)

amorpher farbloser Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 45^\circ$ ($c = 0.3$, MeOH)

$R_f = 0.48$ (EE:MeOH = 3:1)

Smp.: 110° C



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 4.02$ (dd, 1H, H-6), 3.93 (dd, 1H, H-5), 3.82 (ddd, 1H, H-4) 3.75-3.61 (m, 1H, H-7), 3.57 (s, 3H, COOCH₃), 3.55 (dd, 1H, H-8a), 3.51 (dd, 1H, H-8b), 3.33 (s, 3H, OCH₃), 2.74 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.21 (s, 3H, NHAc), 2.07 (t, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$^2J_{8a,8b} = 11.4$, $J_{8a,7} = 8.2$, $J_{8b,7} = 4.9$, $J_{6,7} = 2.1$, $J_{5,6} = 9.8$, $J_{4,5} = 8.3$, $J_{3ax,4} = 11.7$, $J_{3eq,4} = 5.1$,
 $^2J_{3ax,3eq} = 11.7$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 73.67$ (C-6), 70.05 (C-7), 66.32 (C-4), 63.07 (C-8), 54.06 (C-5) 53.67 (OCH_3), 52.09 (COOCH_3), 39.87 (C-3), 23.12 (COCH_3) ppm.

Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosylonsäure) (38)

Nach AAV 3 werden 11.8 mg (38.3 μmol) **37** in 5 ml 0.1 M NaOH verseift. Das Produkt **38** wird in einer Auswaage von 9.6 mg (32.6 μmol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 85 %.

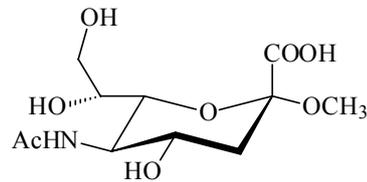
$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_8$ (293.3)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 35^\circ$ ($c = 0.1$, H_2O)

$R_f = 0.40$ ($\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{HOAc} = 5:2:2$)

Smp.: 135°C



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 4.15$ (dd, 1H, H-6), 3.97 (dd, 1H, H-5), 3.92 (ddd, 1H, H-4) 3.71-3.64 (m, 1H, H-7), 3.55 (dd, 1H, H-8a), 3.53 (dd, 1H, H-8b), 3.49 (s, 3H, OCH_3), 2.69 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.16 (s, 3H, COCH_3), 2.11 (t, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$^2J_{8a,8b} = 11.5$, $J_{8a,7} = 8.1$, $J_{8b,7} = 4.5$, $J_{6,7} = 1.9$, $J_{5,6} = 9.7$, $J_{4,5} = 8.4$, $J_{3ax,4} = 11.3$, $J_{3eq,4} = 4.7$,
 $^2J_{3ax,3eq} = 11.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 72.34$ (C-6), 69.03 (C-7), 66.32 (C-4), 63.07 (C-8), 54.06 (C-5) 53.67 (OCH_3), 38.57 (C-3), 22.87 (COCH_3) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

4-Nitrophenyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosylonat) (39)

114 mg (0.26 mmol) Verbindung **15** werden in 15 ml Acetatpuffer (100 mmol, pH = 4.0) suspendiert und mit einer Lösung von 56 mg (0.28 mmol) NaIO_4 in 5 ml Acetatpuffer (100

mmol, pH = 4.0) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur gerührt, wobei kurz nach der Zugabe die Suspension eine Lösung bildet. Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle, die eine fast vollständige Umsetzung des Edukts zeigt, erfolgt 30 min später die weitere Zugabe von 38 mg (0.6 mmol) NaCNBH_3 . Die Reaktionslösung wird anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer weiteren DC-Kontrolle und Nachweis, dass eine quantitative Reduktion der zunächst gebildeten Aldehydfunktionen stattgefunden hat, wird die Reaktion durch die Neutralisation mit festem NaHCO_3 abgebrochen. Zur Entfernung der Salze wird die Lösung über eine Ionenaustauschersäule gegeben (Mixbed, Ionenaustauscher Amberlite, MB-3; 2x10 cm). Nach der Gefriertrocknung des Eluats wird das Rohprodukt mehrfach säulenchromatographisch über Kieselgel im Gradientenverfahren (Eluens: EE/MeOH 8:1 \rightarrow EE/MeOH 4:1) gereinigt. Es werden 67 mg (0.16 mmol) des Produkts **39** isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 63 % bezogen auf **15**.

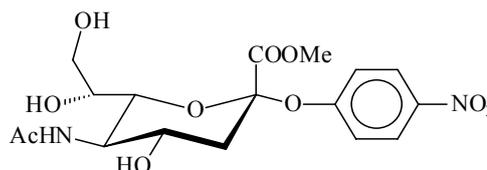
$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}$ (414.4)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 55^\circ$ ($c = 0.8$, MeOH)

$R_f = 0.41$ (EE:MeOH = 4:1)

Smp.: 105-107° C



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.26$ (d, 2H, H_{arom}), 7.30 (d, 2H, $\text{H}_{\text{b,arom}}$), 4.08 (dd, 1H, H-6), 4.02 (dd, 1H, H-5), 3.87 (ddd, 1H, H-4), 3.81 (ddd, 1H, H-7) 3.50 (ddd 1H, H-8a), 3.46 (ddd, 1H, H-8b), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 2.88 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.15 (dd, 1H, H-3_{ax}), 2.09 (s, 3H, COCH_3) ppm.

$J_{\text{H-arom}} = 9.5$, $J_{8a,8b} = 11.4$, $J_{7,8a} = 5.4$, $J_{7,8b} = 8.3$, $J_{6,7} = 5.4$, $J_{5,6} = 10.4$, $J_{4,5} = 9.5$, $^2J_{3ax,3eq} = 12.9$, $J_{3ax,4} = 12.0$, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, D_2O): $\delta = 159.24$ ($\text{C}_{\text{aromNO}_2}$), 143.88 (C_{aromO}), 126.09 (C_{arom}), 120.31 ($\text{C}_{\text{b,arom}}$), 100.96 (C-2), 75.34 (C-6), 69.43 (C-7), 66.86 (C-4), 63.11 (C-8), 53.94 (C-5), 51.99 (COOCH_3), 40.25 (C-3), 22.44 (COCH_3) ppm.

Weitere quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

4-Nitrophenyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosyl)onsäure (**40**)

Nach AAV 3 werden 74.6 mg (0.18 mmol) **39** in 15 ml 0.1 M NaOH verseift. Das Produkt **40** wird quantitativ in einer Auswaage von 72 mg (0.18 mmol) isoliert.

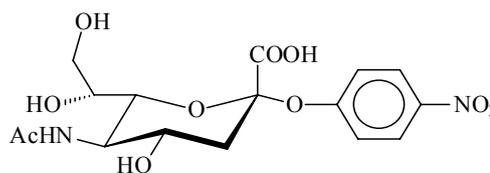
$C_{16}H_{20}N_2O_{10}$ (400.3)

leicht gelber amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 36^\circ$ ($c = 1$, H_2O)

$R_f = 0.41$ (BuOH:H₂O:HOAc = 5:2:2)

Smp.: 130° C



1H -NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.03$ (d, 2H, $H_{a_{arom}}$), 7.35 (d, 2H, $H_{b_{arom}}$), 4.14 (dd, 1H, H-6), 3.88 (dd, 1H, H-5), 3.84-3.74 (m, 2H, H-4, H-8a), 3.73-3.64 (m, 2H, H-7, H-8b), 2.90 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.02 (s, 3H, $COCH_3$), 1.91 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{H-arom} = 9.3$, $J_{6,7} = 5.0$, $J_{5,6} = 10.6$, $J_{4,5} = 7.6$, $^2J_{3ax,3eq} = 11.9$, $J_{3ax,4} = 11.7$, $J_{3eq,4} = 4.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 126.22$ ($C_{a_{arom}}$), 121.31 ($C_{b_{arom}}$), 76.347 (C-6), 71.38 (C-7), 68.77 (C-4), 64.23 (C-8), 54.31 (C-5), 43.66 (C-3), 23.01 ($COCH_3$) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt

4-Nitrophenyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -L-arabino-2-heptulopyrano-sylonat) (41)

102 mg (0.23 mmol) Verbindung **15** werden in 15 ml Acatpuffer (100 mmol, pH = 4.0) suspendiert und mit einer Lösung von 108 mg (0.51 mmol) $NaIO_4$ in 5 ml Acetatpuffer (100 mmol, pH = 4.0) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur gerührt, wobei kurz nach der Zugabe die Suspension eine Lösung bildet. Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle, die eine fast vollständige Umsetzung des Edukts zeigte, erfolgte 30 min später die weitere Zugabe von 60 mg (0.95 mmol) $NaCNBH_3$. Die Reaktionslösung wird anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer weiteren DC-Kontrolle und Nachweis, dass eine quantitative Reduktion der zunächst gebildeten Aldehydfunktionen stattgefunden hat, wird die Reaktion durch Neutralisation mit festem $NaHCO_3$ abgebrochen. Zur Entfernung der Salze wird die Lösung über eine Ionenaustauschersäule gegeben (Mixbed, Ionenaustauscher Amberlite, MB-3; 2x10 cm). Nach der Gefriertrocknung des Eluates wird das Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel im (Eluens: 4:1) gereinigt. Es werden 80.3 mg (0.21 mmol) des Produkts **31** isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 91 % bezogen auf **15**.

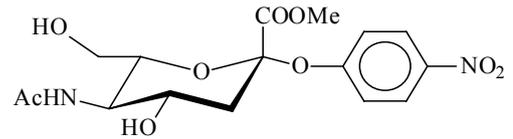
$C_{16}H_{20}N_2O_9$ (384.3)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 44^\circ$ ($c = 1$, MeOH)

$R_f = 0.56$ (EE:MeOH = 4:1)

Smp.: 95-96° C



1H -NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.17$ (d, 2H, $H_{a_{arom}}$), 7.35 (dd, 2H, $H_{b_{arom}}$), 4.02 (ddd, 1H, H-6), 3.83-3.70 (m, 3H, H-4, H-5, H-7a), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.63 (dd, 1H, H-7b), 2.74 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.00 (s, 3H, COCH₃), 1.98 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{H-arom} = 9.4$, $J_{7a,7b} = 12.7$, $J_{6,7b} = 4.8$, $J_{6,7a} = 4.6$, $J_{5,6} = 10.2$, $^2J_{3ax,3eq} = 12.9$, $J_{3ax,4} = 12.7$, $J_{3eq,4} = 4.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) $\delta = 126.62$ ($C_{a_{arom}}$), 121.39 ($C_{b_{arom}}$), 79.05 (C-6), 68.14 (C-4), 63.36 (C-7), 53.95 (C-5), 53.79 (COOCH₃), 42.62 (C-3), 23.14 (COCH₃) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

4-Nitrophenyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -L-arabino-2-heptulopyranosylonsäure) (**42**)

Nach AAV 3 werden 23 mg (60 μ mol) **41** in 5 ml 0.1 M NaOH verseift. Das Produkt **42** wird quantitativ in einer Auswage von 22.2 mg (60 μ mol) isoliert.

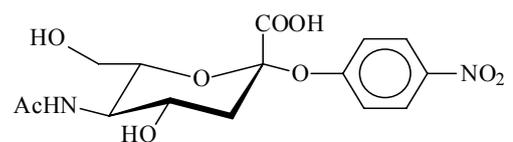
$C_{15}H_{18}N_2O_9$ (370.3)

leicht gelber amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 20^\circ$ ($c = 0.5$, H_2O)

$R_f = 0.46$ (BuOH:H₂O:HOAc = 5:2:2)

Smp.: 101-103° C



1H -NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.03$ (d, 2H, $H_{a_{arom}}$), 7.27 (dd, 2H, $H_{b_{arom}}$), 4.13 (ddd, 1H, H-6), 3.73-3.59 (m, 3H, H-4, H-5, H-7a), 3.48 (dd, 1H, H-7b), 2.68 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.90 (s, 3H, COCH₃), 1.77 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{H-arom} = 9.4$, $J_{7a,7b} = 12.4$, $J_{6,7b} = 8.5$, $J_{6,7a} = 3.4$, $J_{5,6} = 10.0$, $^2J_{3ax,3eq} = 12.5$, $J_{3ax,4} = 11.1$, $J_{3eq,4} = 4.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O) $\delta = 126.22$ (C_{arom}), 120.75 ($\text{C}_{\text{b,arom}}$), 78.28 (C-6), 68.91 (C-4), 63.76 (C-7), 54.13 (C-5), 41.98 (C-3), 23.07 (COCH_3) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)- β -D-glucopyranosid (44)

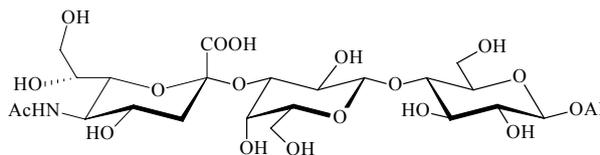
10 mg (25 μmol) *p*NP-Oct5Ac werden nach AAV 4 mit 12 mg (35 μmol , 1.4 eq.) Akzeptor **29** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μl Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung des Produkts erfolgt über eine RP-18 Säule mit H_2O als Eluens. Das Produkt **44** wird in eine Auswaage von 9.3 mg (14.5 μmol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 58 %.

$\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{NO}_{18}$ (643.3)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 12^\circ$ ($c = 0.2$, H_2O)

$R_f = 0.21$ (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 666.4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

^1H – NMR (400 MHz, D_2O) $\delta = 5.85$ - 5.77 (m, 1H, All-2), 5.21 (dd, 1H, All-3_{cis}), 5.12 (dd, 1H, All-3_{trans}), 4.39 (d, 1H, H-1), 4.34 (d, 1H, H-1'), 4.21 (dd, 1H, All-1a), 4.06 (dd, 1H, All-1b), 3.91 (dd, 1H, H-3'), 3.86 - 3.81 (m, 2H, H-4', H-6a), 3.70 - 3.42 (m, 13 H, H-3, H-4, H-4'', H-5, H-5', H-5'', H-6b, H-6a', H-6b', H-6'', H-7'', H-8a'', H-8b''), 3.37 (dd, 1H, H-2'), 3.15 (dd, 1H, H-2,), 2.55 (dd, 1H, H-3eq'), 1.90 (s, 3H, COCH_3), 1.60 (dd, 1H, H-3ax'') ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 11.2$, $J_{\text{All-1a,2}} = 5.9$, $J_{\text{All-1b,2}} = 6.3$, $^2J_{\text{All-3cis,trans}} = 1.7$, $J_{\text{All-3cis,2}} = 15.9$, $J_{\text{All-3trans,2}} = 8.4$, $J_{1,2} = 8.2$, $J_{2,3} = 8.6$, $J_{1',2'} = 7.8$, $J_{2',3'} = 9.7$, $J_{3',4'} = 3.5$, $^2J_{3\text{eq}',3\text{ax}''} = 12.1$, $J_{3\text{eq}',4''} = 4.4$, $J_{3\text{ax}'',4''} = 12.0$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 133.65$ (CH_{allyl}), 119.14 ($\text{CH}_2\text{-allyl}$), 103.00 (C-1'), 101.4 (C-1), 78.61 (C-3'), 75.90 , 75.88 , 75.53 , 75.14 , 74.78 , 74.12 , 73.87 , 73.68 (C-3, C-4, C-4'', C-5, C-5', C-5'', C-6'', C-7''), 73.33 (C-3), 73.19 (C-2), 70.01 (C-2'), 68.24 (C-4'), 61.41 , 60.89 , 60.20 (C-6, C-6', C-8''), 54.67 (OCH_2), 38.91 (C-3''), 21.99 (COCH_3) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-octulopyranosylonsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)- β -D-glucopyranosid (45)

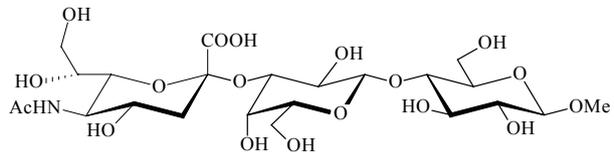
10 mg (25 μ mol) *p*NP-Oct5Ac werden nach AAV 4 mit 12 mg (33 μ mol, 1.3 eq.) Akzeptor **31** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μ l Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung des Produkts erfolgte gelpermeationschromatographisch (Biogel P-2) mit H₂O als Eluens. Das Produkt **45** wurde in eine Auswage von 8.9 mg (14 μ mol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute 57 % bezogen auf **40**.

C₂₃H₃₉NO₁₈ (617.5)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 47^\circ$ (*c* = 0.1, H₂O)

R_f = 0.12 (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 660.8$ $[M+Na]^+$

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 4.54$ (d, 1H, H-1), 4.43 (d, 1H, H-1'), 4.10 (dd, 1H, H-3'), 4.02 (dd, 1H, H-4'), 3.96 (dd, 1H, H-6a), 3.88 – 3.83 (m, 2H, H-5'' H-6b), 3.81 - 3.65 (m, 9H, H-3, H-4, H-4'', H-5', H-6'', H-6a', H-6b', H-8a'', H-8b''), 3.64 - 3.60 (m, 2H, H-5, H-7''), 3.59 (s, 3H, OCH₃), 3.57 (dd, 1H, H-2'), 3.32 (dd, 1H, H-2), 2.72 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 1.80 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 9.1$, $J_{5,6a} = 5.9$, $^2J_{6a,6b} = 12.3$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{2',3'} = 9.8$, $J_{3',4'} = 3.2$, $J_{4',5'} = 3.5$, $J_{3ax'',3eq''} = 12.3$, $J_{3ax'',4''} = 11.9$, $J_{3eq'',4''} = 4.4$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): $\delta = 102.7$ (C-1'), 102.4 (C-1), 78.6 (C-3'), 75.5 (C-4), 75.3, 74.9, 74.6, 74.0 (C-5, C-5', C-7'', C-4'') 73.5 (C-2'), 69.4 (C-2), 68.7 (C-3), 67.9 (C-2'), 67.5 (C-6''), 62.7 (C-8''), 61.0 (C-6'), 59.9 (C-6), 57.3 (OCH₃), 51.8 (C-5'), 39.3 (C-3'), 21.3 (COCH₃) ppm.

Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-(2-acetamido-2-desoxy)- β -D-glucopyranosid (46)

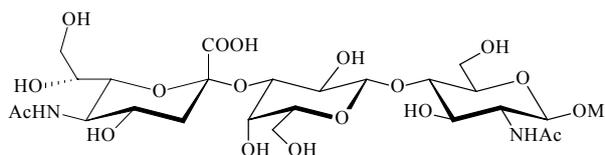
10 mg (25 μ mol) *p*NP-Oct5Ac werden nach AAV 4 mit 14 mg (35 μ mol, 1.5 eq.) Akzeptor **33** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μ l Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung des Produkts erfolgt gelpermeationschromatographisch (Biogel P-2) mit H₂O als Eluens. Das Produkt **46** wird in eine Auswaage von 6.6 mg (10 μ mol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 40 %.

C₂₅H₄₂N₂O₁₈ (658.6)

farblos amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 12^\circ$ ($c = 0.1$, H₂O)

R_f = 0.15 (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 4.54$ (d, 1H, H-1'), 4.53 (d, 1H, H-1), 4.12 (dd, 1H, H-3'), 3.92-3.82 (m, 4H, H-6a, H-6b, H-4, H-5''), 3.71 (dd, 1H, H-2), 3.68-3.57 (m, 8H, H-6a', H-6b', H-8a'', H-8b'', H-5', H-6'', H-4'', H-4'), 3.54-3.41 (m, 5H, H-4, H-5, H-3, H-2', H-7''), 3.36 (s, 3H, OCH₃), 2.79 (dd, 1H, H-3''_{eq}), 2.10 (s, 3H, COCH₃), 2.05 (s, 3H, COCH₃), 1, 83 (dd, 1H, H-3_{ax}'') ppm.

$J_{1,2'} = 7.5$, $J_{1,2} = 8.1$, $J_{2,3} = 8.4$, $J_{2,3'} = 8.8$, $J_{3',4'} = 3.2$, ${}^2J_{3eq'',3ax''} = 12.1$, $J_{3eq'',4''} = 4.6$, $J_{3ax'',4''} = 12.1$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): $\delta = 103.76$ (C-1'), 101.99 (C-1), 79.02 (C-3'), 76.28 (C-3), 76.71 (C-4), 75.19, 74.29, 73.91 (C-5, C-5', C-6''), 71.02, 69.54, 68.81, 68.35 (C-2', C-4', C-4'', C-7''), 64.28 (C-8), 62.01 (C-6'), 60.79 (C-6), 55.43 (OCH₃) 54.78 (C-2), 52.39 (C-5''), 41.05 (C-3''), 22.78, 22.45 (je COCH₃) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -L-arabino-2-heptulopyranosylsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)- β -D-glucopyranosid (48)

10 mg (27 μ mol) *p*NP-Hept5Ac werden nach AAV 4 mit 12 mg (35 μ mol, 1.4 eq.) Akzeptor **29** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μ l Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung des Produkts erfolgt über eine RP-18 Säule mit H₂O als Eluens. Das

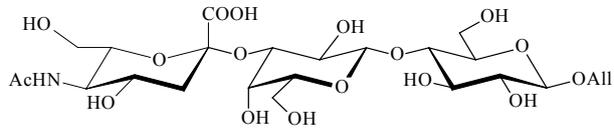
Produkt **44** wird in eine Auswage von 9.1 mg (14.8 μmol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 55 %.

$\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NO}_{17}$ (613.2)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 32^\circ$ ($c = 0.1$, H_2O)

$R_f = 0.17$ (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



^1H – NMR (400 MHz, D_2O) $\delta = 5.83\text{--}5.75$ (m, 1H, All-2), 5.20 (dd, 1H, All-3_{cis}), 5.12 (dd, 1H, All-3_{trans}), 4.41 (d, 1H, H-1), 4.36 (d, 1H, H-1'), 4.19 (dd, 1H, All-1a), 4.06 (dd, 1H, All-1b), 3.89 (dd, 1H, H-3'), 3.88-3.82 (m, 2H, H-4', H-6a), 3.66-3.49 (m, 12 H, H-3, H-4, H-4'', H-5, H-5', H-5'', H-6b, H-6a', H-6b', H-6'', H-7a''H-7b''), 3.37 (dd, 1H, H-2'), 3.15 (dd, 1H, H-2,), 2.54 (dd, 1H, H-3eq''), 1.92 (s, 3H, COCH₃), 1.67 (dd, 1H, H-3ax'') ppm.

$^2J_{\text{All-1a/b}} = 10.8$, $J_{\text{All-1a,2}} = 5.7$, $J_{\text{All-1b,2}} = 6.4$, $^2J_{\text{All-3cis,trans}} = 2.1$, $J_{\text{All-3cis,2}} = 13.7$, $J_{\text{All-3trans,2}} = 8.3$
 $J_{1,2} = 8.1$, $J_{2,3} = 8.2$, $J_{1',2'} = 8.1$, $J_{2',3'} = 8.9$, $J_{3',4'} = 3.3$, $^2J_{3\text{eq}'',3\text{ax}''} = 12.3$, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.5$,
 $J_{3\text{ax}'',4''} = 12.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 132.78$ (CH_{allyl}), 120.04 (CH_{2-allyl}), 102.34 (C-1'), 102.89 (C-1), 77.99 (C-3'), 75.64, 75.54, 75.32, 75.19, 74.82, 74.32, 73.72, (C-3, C-4, C-4'', C-5, C-5', C-5'', C-6''), 73.33 (C-3), 73.19 (C-2), 70.01 (C-2'), 68.24 (C-4'), 62.91, 61.34, 60.99 (C-6, C-6', C-7''), 55.01 (OCH₂), 39.22 (C-3''), 22.15 (COCH₃) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

Methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -L-arabino-2-heptulopyranosyl)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)- β -D-glucopyranosid (49**)**

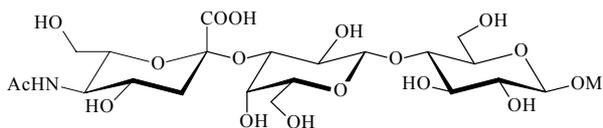
10 mg (27 μmol) pNP-Hept5Ac werden nach AAV 4 mit 12 mg (35 μmol , 1.3 eq.) Akzeptor **29** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μl Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung des Produkts erfolgt über eine Biogel P-2 Säule mit H₂O als Eluens. Das Produkt **44** wird in eine Auswage von 8.4 mg (14.3 μmol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 53 %.

$C_{22}H_{37}NO_{17}$ (587.4)

farblos amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 8^\circ$ ($c = 0.1$, H_2O)

$R_f = 0.15$ (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 660.8$ $[M+Na]^+$

1H -NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 4.55$ (d, 1H, H-1), 4.44 (d, 1H, H-1'), 4.14 (dd, 1H, H-3'), 4.05 (dd, 1H, H-4'), 4.00 (dd, 1H, H-6a), 3.85 (dd, 1H, H-6b) 3.80-3.74 (m, 4H, H-5'' H-6a', H-6b', H-7a''), 3.72 - 3.62 (m, 7H, H-3, H-4, H-4'', H-5', H-5, H-6'', H-7b'') 3.60 (s, 3H, OCH_3), 3.58 (dd, 1H, H-2'), 3.33 (dd, 1H, H-2), 2.74 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.05 (s, 3H, $COCH_3$), 1.79 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{1,2} = 7.9$, $J_{2,3} = 9.1$, $J_{5,6a} = 5.4$, $^2J_{6a,6b} = 12.3$, $J_{5,6b} = 10.3$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{2',3'} = 9.8$, $J_{3',4'} = 3.2$, $J_{4',5'} = 3.8$, $J_{3ax'',3eq''} = 12.3$, $J_{3ax'',4''} = 11.9$, $J_{3eq'',4''} = 4.4$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, D_2O): $\delta = 102.9$ (C-1'), 102.3 (C-1), 78.0 (C-3'), 75.3 (C-4), 75.0, 74.8, 74.6, 74.0 (C-5, C-5', C-4'', C-6''), 72.7 (C-2'), 69.4 (C-2), 67.7 (C-3), 67.9 (C-2'), 67.5 (C-4') 61.0 (C-6'), 60.8 (C- C-7''), 60.1 (C-6), 57.2 (OCH_3), 51.8 (C-5''), 38.9 (C-3''), 20.8 ($COCH_3$) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Bedingungen nicht detektiert.

Methyl-(5-acetamido-3,5-didesoxy- α -L-arabino-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-(2-acetamido-2-desoxy)- β -D-glucopyranosid (50)

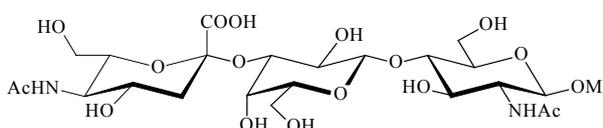
10 mg (27 μ mol) *p*NP-Hept5Ac werden nach AAV 4 mit 14 mg (35 μ mol, 1.3 eq.) Akzeptor **33** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μ l Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung des Produkts erfolgte gelpermeationschromatographisch (Biogel P-2) mit H_2O als Eluens. Das Produkt **50** wurde in eine Auswage von 6.1 mg (9.7 μ mol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 36 %.

$C_{24}H_{40}NO_{17}$ (629)

farblos amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 21^\circ$ ($c = 0.1$, H_2O)

$R_f = 0.16$ (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 4.54$ (d, 1H, H-1'), 4.53 (d, 1H, H-1), 4.12 (dd, 1H, H-3'), 3.96-3.87 (m, 4H, H-6a, H-6b, H-4', H-5''), 3.74 (dd, 1H, H-2), 3.72-3.61 (m, 7H, H-6a', H-6b', H-7a'', H-7b'', H-5', H-6'', H-4''), 3.57-3.48 (m, 4H, H-4, H-5, H-3, H-2'), 3.38 (s, 3H, OCH_3), 2.71 (dd, 1H, H-3''_{eq}), 2.12 (s, 3H, COCH_3), 2.03 (s, 3H, COCH_3), 1, 87 (dd, 1H, H-3_{ax}'') ppm.

$J_{1',2'} = 7.9$, $J_{1,2} = 8.2$, $J_{2,3} = 8.3$, $J_{2',3'} = 8.9$, $J_{3',4'} = 3.7$, $^2J_{3\text{eq}'',3\text{ax}''} = 12.3$, $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.3$, $J_{3\text{ax}'',4''} = 12.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 104.03$ (C-1'), 102.24 (C-1), 79.09 (C-3'), 76.35 (C-4), 76.71 (C-3), 74.90, 73.99, 73.56 (C-5, C-5', C-6''), 70.94, 69.74, 68.25 (C-2', C-4', C-4''), 65.88 (C-7''), 61.69 (C-6'), 60.16 (C-6), 55.60 (OCH_3) 54.96 (C-2), 52.02 (C-5''), 41.08 (C-3''), 22.90, 22.63 (je COCH_3) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

4-Nitrophenyl-(methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy-7-formyl- α -L-arabino-heptulopyranosylonat) (53)

174 mg (0.39 mmol) der Ausgangssubstanz **36** werden in 20 mL bidest. H_2O suspendiert und mit einer NaIO_4 -Lösung versetzt (195 mg (0.92 mmol), in 5 mL bidest. H_2O), wobei die Suspension rasch in eine Lösung übergeht. Zur Vervollständigung der Umsetzung wird noch weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt und das Rohprodukt nach Gefriertrocknung an einer Biogel P2-Säule gereinigt. Das hydratisierte Produkt **53** wird in einer Auswage von 131 mg (0.33 mmol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 84 %.

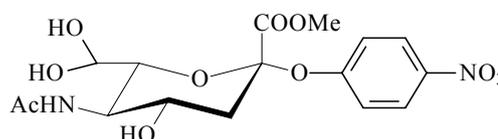
$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}_{10}$ (400.4)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 31^\circ$ (c = 0.6, H_2O)

$R_f = 0.60$ (EE:MeOH = 4:1)

Smp: 89-91° C



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.12$ (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7.24 (d, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 5.04 (d, 1H, H-7), 3.92 (dd, 1H, H-6), 3.81 (dd, 1H, H-5), 3.73 (ddd, H-4), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 2.66 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.04 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.92 (s, 3H, COCH_3) ppm.

$J_{\text{Ha,Hb}} = 9.2$, $J_{6,7} = 2.6$, $J_{5,6} = 9.7$, $J_{4,5} = 8.1$, $J_{3\text{eq},4} = 4.5$, $J_{3\text{ax},4} = 12.1$, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.4$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100MHz, D_2O): 126.31 ($\text{Ca}_{\text{arom.}}$), 120.17 ($\text{Cb}_{\text{arom.}}$), 88.41 (C7), 77.76 (C6), 66.59 (C4), 54.48 (C5), 54.03 (OCH_3), 39.45 (C3), 22.49 (COCH_3) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

4-Nitrophenyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy-7-formyl- α -L-arabino-heptulopyranosylon-säure) (54)

26 mg (65 μmol) des Methylesters **53** werden in 6 ml bidest. H_2O gelöst und mit 50 μl gesättigter Na_2CO_3 Lösung versetzt. Der Verlauf der Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt und die Reaktion nach 1 Stunde durch Neutralisation mit saurem Anionentauscher (Amberlite IR120) abgebrochen. Das Produkt **54** wird in einer Auswage von 25.4 mg (63 μmol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 97 % bezogen auf **53**.

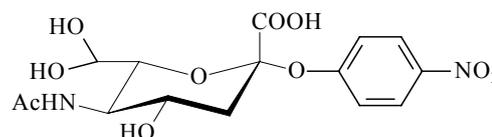
$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{NO}_{10}$ (386.1)

leicht gelber amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 14^\circ$ ($c = 0.6$, H_2O)

$R_f = 0.74$ ($\text{BuOH}:\text{HOAc}:\text{H}_2\text{O} = 5:2:2$)

Smp: 100-103° C



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.21$ (d, 2H, $\text{Ha}_{\text{arom.}}$), 7.32 (d, 2H $\text{Hb}_{\text{arom.}}$), 5.02 (d, 1H, H-7), 3.90 (dd, 1H, H-6), 3.81 (dd, 1H, H-5), 3.72 (dd 1H, H4), 2.62 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.01 (dd, 1H, H-3_{ax}), 1.91 (s, 3H, COCH_3) ppm.

$J_{\text{Harom}} = 9.3$, $J_{6,7} = 2.4$, $J_{5,6} = 9.6$, $J_{4,5} = 8.7$, $J_{3\text{eq},4} = 4.4$, $J_{3\text{ax},4} = 12.9$, $J_{3\text{eq},3\text{ax}} = 13.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100MHz, D_2O): 126.3 ($\text{Ca}_{\text{arom.}}$), 120.0 ($\text{Cb}_{\text{arom.}}$), 88.43 (7), 77.76 (C6), 66.58 (C4), 54.38 (C5), 39.46 (C3), 22.99 (COCH_3) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

**Methyl-(5-acetamido-9-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl-
onsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)- β -D-glucopyranosid (61)**

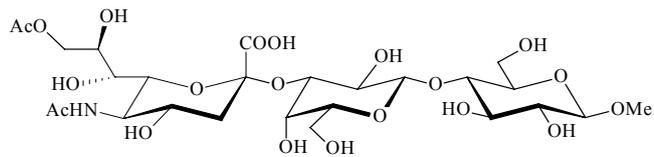
10 mg (20 μ mol) *p*NP-Neu5,9Ac₂ werden nach AAV 4 mit 12 mg (33 μ mol, 1.7 eq.) Akzeptor **31** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μ l Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung erfolgt gelpermeationschromatographisch über eine Biogelsäule (P-2). Das Produkt **32** wird in eine Auswaage von 6.8 mg (10 μ mol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 49 % bezogen auf *p*NP-Neu5,9Ac₂.

C₂₆H₄₃NO₂₀ (689.4)

farblos amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 22^\circ$ ($c = 0.1$, H₂O)

$R_f = 0.15$ (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 712.6$ $[M+Na]^+$

¹H-NMR(400 MHz, D₂O): $\delta = 4.83$ (d, 1H, H-1), 4.36 (d, 1H, H-1'), 4.32 (dd, 1H, H-9a''), 4.19 (dd, 1H, H-6''), 4.12 (dd, 1H, H-9b''), 4.00 (ddd, 1H, H-8''), 3.95 (dd, 1H, H-5''), 3.91 (dd, 1H, H-3'), 3.86 - 3.79 (m, 3H, H-4', H-4'', H-6a), 3.71 - 3.53 (m, 8H, H-3, H-4, H-5, H-5', H-6b, H-6a', H-6b', H-7'), 3.42 (s, 3H, OCH₃), 3.44 (dd, 1H, H-2'), 3.25 (dd, 1H, H-2), 2.56 (dd, 1H, H-3_{eq}''), 2.15 (s, 3H, COCH₃), 2.08 (s, 3H, COCH₃), 1.99 (dd, 1H, H-3_{ax}'')ppm.

$J_{1,2} = 8.1$, $J_{1',2'} = 7.9$, $J_{9a'',9b''} = 12.1$, $J_{8'',9a''} = 3.1$, $J_{8'',9b''} = 6.9$, $J_{6'',7''} = 2.1$, $J_{5'',6''} = 9.9$, $J_{7'',8''} = 9.3$, $J_{4'',5''} = 10.3$, $J_{2',3'} = 9.7$, $J_{3',4'} = 3.7$, $J_{2,3} = 8.8$, $^2J_{3ax'',3eq''} = 12.3$, $J_{3ax'',4''} = 12.1$, $J_{3eq'',4''} = 4.4$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): $\delta = 102.69$ (C-1'), 101.99 (C-1), 76.89 (C-3'), 75.76 (C-3), 74.40, 73.90, 73.54, 75.11, 72.92, 72.87, 72.22 (C-4, C-4'', C-5, C-5', C-5'', C-6'', C-7'', C-8''), 71.49 (C-3'), 70.19 (C-2), 68.01 (C-2'), 67.24 (C-4'), 64.41 (C-9'), 60.89 (C-6'), 60.20 (C-6), 54.67 (OCH₃), 39.99 (C-3''), 22.49, 21.07 (je COCH₃) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

**Methyl-(5-acetamido-9-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl-
onsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-(2-acetamido-2-desoxy)- β -D-glucopyranosid
(62)**

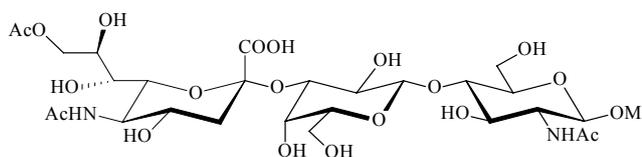
10 mg (20 μ mol) *p*NP-Neu5,9Ac₂ werden nach AAV 4 mit 14 mg (35 μ mol, 1.7 eq.) Akzeptor **33** in 1 ml Puffer (Tris-HCl, pH = 7.5) gelöst und mit 80 μ l Enzym über Nacht bei 23 ° C inkubiert. Die Reinigung erfolgt gelpermeationschromatographisch über eine Biogelsäule (P-2). Das Produkt **32** wird in eine Auswage von 5.4 mg (7 μ mol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 36 % bezogen auf *p*NP-Neu5,9Ac₂.

C₂₈H₄₆N₂O₂₁ (746.4)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = 11^\circ$ ($c = 0.1$, H₂O)

R_f = 0.14 (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 769.2$ [M+Na]⁺

¹H-NMR (400 MHz, D₂O): $\delta = 4.54$ (d, 1H, H-1'), 4.44 (d, 1H, H-1), 4.40 (dd, 1H, H-9a''), 4.24 (dd, 1H, H-6''), 4.18 (dd, 1H, H-9b'') 4.11 (dd, 1H, H-3'), 4.03 (ddd, 1H, H-8'') 3.96-3.72 (m, 5H, H-6a, H-6b, H-4', H-5'', H-4''), 3.75 (dd, 1H, H-2), 3.70-3.62 (m, 4H, H-6a', H-6b', H-5', H-7''), 3.56-3.44 (m, 4H, H-4, H-5, H-3, H-2'), 3.39 (s, 3H, OCH₃), 2.79 (dd, 1H, H-3''_{eq}), 2.14, 2.08, 2.06 (je s, je 3H, COCH₃), 1.96 (dd, 1H, H-3_{ax}'') ppm.

$J_{1,2} = 8.0$, $J_{1',2'} = 7.7$, $J_{9a'',9b''} = 12.3$, $J_{8'',9a''} = 3.2$, $J_{8'',9b''} = 7.1$, $J_{6'',7''} = 2.2$, $J_{5'',6''} = 10.3$, $J_{7'',8''} = 9.2$, $J_{4'',5''} = 10.1$, $J_{2',3'} = 8.9$, $J_{3',4'} = 3.4$, $J_{2,3} = 8.2$, $^2J_{3ax'',3eq''} = 12.1$, $J_{3ax'',4''} = 12.1$, $J_{3eq'',4''} = 4.6$ Hz

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O): $\delta = 104.18$ (C-1'), 102.78 (C-1), 76.31 (C-3'), 76.28 (C-3), 75.79 (C-4), 75.71, 75.42, 74.64 73.63 (C-5, C-5', C-6'', C-8''), 70.02, 69.81, 68.32, 68.26 (C-2', C-4', C-4'', C-7''), 66.06 (C-9), 61.60 (C-6'), 60.90 (C-6), 55.43 (OCH₃) 54.62 (C-2), 52.42 (C-5''), 40.37 (C-3''), 22.81, 22.60, 22.42 (je COCH₃) ppm.

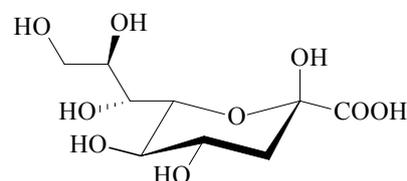
Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

3-Desoxy-D-glycero- β -D-galacto-2-nonulopyranosonsäure, (KDN, 65)

100 mg (1.2 mmol) NaHCO_3 werden in ein Becherglas gegeben und in 60 ml dest. H_2O gelöst. Unter Eiskühlung wird die Lösung mit 10 N NaOH auf $\text{pH} = 11$ eingestellt und mit 6 g (45.4 mmol) Oxalacetat portionsweise bei möglichst konstanten pH (Zugabe von NaOH) versetzt. Anschließend werden bei RT 18 g (100 mmol) D-Mannose (gelöst in 60 ml dest. H_2O) zugeben. Die Reaktion bei $\text{pH} = 11$ wird dünnschichtchromatographisch verfolgt ($\text{MeOH}:\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O} = 10:10:3$). Zur Decarboxylierung wird die leicht gelbe Reaktionslösung auf 45°C erhitzt, mit Dowex 50 WX 8 ein pH von 5.7 eingestellt und beibehalten. Deutliche Gasentwicklung ist zu beobachten. Die Reaktion verläuft über 3 Std. bei konstanter Temperatur und pH -Wert. Nach einer dünnschichtchromatographischen Kontrolle ($\text{MeOH}:\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O} = 10:10:3$) wird die Reaktion durch Abnutschen des Ionenaustauschers abgebrochen. Der Filterkuchen wird mit ca. 0.5 l bidest. H_2O gewaschen. Die Reinigung des Produkts erfolgte säulenchromatographisch über eine Ionenaustauschersäule (Dowex 1x8, Eluens: Gradient $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0.25 \text{ M } \text{NH}_4\text{HCO}_3$). Das Lösungsmittel wurde durch Gefriertrocknung entfernt. Das Produkt **65** wurde in einer Auswage von 4.72 g (17.6 mmol) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 37 % bezogen auf das Oxalacetat.

$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_9$ (268.6)

farbloser amorpher Feststoff



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 4.04$ (m, 1H, H-4), 4.01 (dd, 1H, H-6), 3.88 (m, 2H, H-9a, H-7), 3.75 (ddd, 1H, H-8), 3.63 (dd, 1H, H-9b), 3.56 (dd, 1H, H-5), 2.23 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.89 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{7,8} = 8.6$, $J_{6,7} = 1.9$, $J_{5,6} = 8.8$, $J_{8,9a} = 2.6$, $J_{8,9b} = 5.9$, $^2J_{9a,9b} = 11.3$, $J_{4,5} = 9.2$, $J_{3eq,4} = 4.7$, $J_{3ax,4} = 12.1$, $J_{3ax,3eq} = 12.1$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O): $\delta = 72.28$ (C-8), 71.08 (C-6), 70.67 (C-5), 69.31 (C-7), 68.51 (C-4), 63.86 (C-9), 39.21 (C-3) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

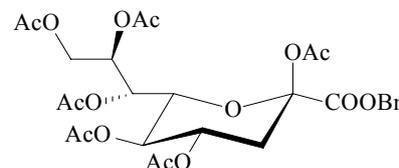
Benzyl-(2,4,5,7,8,9-hexa-O-acetyl-3-desoxy-D-glycero-β-D-galacto-2-nonulopyranosylonat) (70)

1.0 g (3.73 mmol) KDN werden nach AVV 1 unter Zusatz von 50 mg (0.46 mmol) DMAP in einer Lösung aus 15 ml Pyridin und 15 ml Ac₂O im Kühlraum (0° C) umgesetzt. Das Reaktionsgemisch wird 36 Std. gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wird bei 0°C die Reaktionslösung mit 100 ml Chloroform verdünnt und bei gleicher Temperatur dreimal mit 1 M HCl gewaschen. Die organische Phase wird mit ges. NaHCO₃-Lsg. neutralisiert, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der leicht braune Rückstand wird in H₂O/DMF (je 3 ml) gelöst und mit 400 mg (2.1 mmol) CsCO₃ versetzt. Nachdem die Gasentwicklung aufgehört hat, wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wird das Gemisch in 10 ml DMF gelöst und 0.5 ml Benzylbromid hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 Std. gerührt und nach einer DC-Kontrolle wird die Reaktion durch Entfernen des Lösungsmittel abgebrochen. Das Produkt wurde säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (Eluens: EE). Es werden 1.52 g (2.5 mmol) des Produkts **70** isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 67 %.

C₂₈H₃₄O₁₅ (610.4)

farbloser Schaum

R_f = 0.44 (EE)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.61-7.44 (m, 5H, H-Ph), 5.37 (dd, 1H, H-7), 5.28 (ddd, 1H, H-4), 5.24, 5.18 (je d, je 1H, CH₂Ph), 5.16 (ddd, 1H, H-8), 4.95 (dd, 1H, H-5), 4.42 (dd, 1H, H-9a), 4.21 (dd, 1H, H-6), 4.16 (dd, 1H, H-9b), 2.58 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.08 (dd, 1H, H-3_{ax}), 2.10, 2.08, 2.02, 2.01, 2.00, 1.98 (je s, je 3H, COCH₃) ppm.

J_{7,8} = 6.1, J_{6,7} = 2.3, J_{4,5} = 9.8, ²J_{CH₂Ph} = 12.2, J_{8,9a} = 3.1, J_{8,9b} = 6.7, J_{5,6} = 10.3, ²J_{9a,9b} = 12.6, J_{3eq,4} = 4.6, J_{3ax,4} = 12.3, J_{3eq,3ax} = 12.3 Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 138.15, 136.67, 133.98, 131.78, 129.69 (je C-Ph), 74.13 (C-8), 72.99 (CH₂-Ph), 72.86 (C-6), 72.61 (C-5), 69.77 (C-4), 68.27 (C-7), 62.56 (C-9), 36.33 (C-3); 23.53, 21.30, 21.24, 21.13, 20.95, 20.90 (je COCH₃) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

Benzyl-(4,5,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3-desoxy-*D*-glycero- β -*D*-galacto-2-nonulopyranosylchlorid)-onat (71)

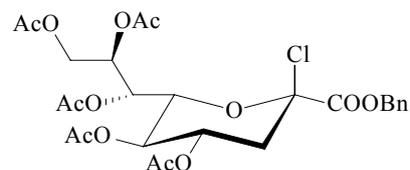
300 mg (0.49 mmol) **70** werden bei 0° C in 10 ml AcCl gelöst und mit 0.5 ml MeOH versetzt. Im verschlossenen Kolben wird die Reaktionslösung 36 Std. bei RT gerührt. Der Abbruch der Reaktion erfolgt durch Entfernen des Lösungsmittel im Vakuum und anschließender schneller säulenchromatographischer Reinigung (Eluens EE). Das Produkt **71** wurde in einer Auswage von 244 mg (0.42 mmol) isoliert. Diese entspricht einer Ausbeute von 85 %.

C₂₆H₃₁ClO₁₃ (589.5)

farbloser Schaum

$[\alpha]_D^{20} = -51^\circ$ ($c = 0.3$, CHCl₃)

R_f = 0.40 (EE)



¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.50-7.30$ (m, 5H, H-Ph), 5.48 (dd, 1H, H-7), 5.43 (ddd, 1H, H-4), 5.35, 5.28 (je d, 1H, CH₂-Ph), 5.20(ddd, 1H, H-8), 4.93 (dd, 1H, H-5), 4.50 (dd, 1H, H-6), 4.36 (dd, 1H, H-9a), 4.12 (dd, 1H, H-9b), 2.81 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.39 (dd, 1H, H-3_{ax}), 2.11, 2.09, 2.08, 2.05, 2.00 (je s, je 3H, COCH₃) ppm.

$J_{6,7} = 2.3$, $J_{7,8} = 8.1$, $J_{4,5} = 9.4$, $^2J_{\text{CH}_2\text{-Ph}} = 12.0$, $J_{8,9a} = 2.5$, $J_{8,9b} = 5.0$, $J_{5,6} = 9.8$, $J_{9a,9b} = 12.1$, $J_{3eq,4} = 5.1$, $J_{3ax,4} = 11.0$, $J_{3eq,3ax} = 14.0$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 140.42$, 139.23, 135.08 132.82, 130.91 (je C-Ph), 74.89 (C-8), 73.56 (CH₂-Ph), 72.84 (C-6), 72.49 (C-5), 69.98 (C-4), 68.67 (C-7), 62.71 (C-9), 36.41 (C-3); 23.54, 21.39, 21.31, 21.45, 20.89 (je COCH₃) ppm.

Quartäre C-Atome wurden unter diesen Meßbedingungen nicht erfaßt.

4-Nitrophenyl-(benzyl-4,5,7,8,9-penta-*O*-acetyl-3-desoxy-*D*-glycero- α -*D*-galacto-2-nonulopyranosylonat) (72)

100 mg (170 μ mol) **71** werden nach AAV 6 mit 50 mg (360 μ mol) *p*NP-OH und 81.5 mg (240 μ mol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in 1.0 ml DCM gelöst. Anschließend wird die Lösung unter starkem Rühren mit 0.8 ml 1 M NaOH-Lsg. versetzt. Nach dünn-schichtchromatographischer Reaktionsverfolgung wird das Produkt säulenchromato-

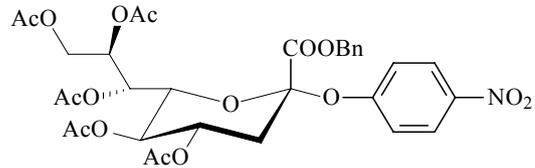
graphisch (Eluens: EE) gereinigt. Es werden 73.7 mg (107 μmol) Produkt (**72**) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 63% bezogen auf **71**.

$\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{NO}_{16}$ (689.4)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22^{\circ}$ ($c = 0.4$, CHCl_3)

$R_f = 0.35$ (EE)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 8.02\text{-}7.01$ (m, 9H, H-Ph), 5.40-5.36 (m, 2H, H-7, H-8), 5.19 (dd, 1H, H-5), 5.16 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.98 (ddd, 1H, H-4), 4.90 (d, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 4.76 (dd, 1H, H-6), 4.23 (dd, 1H, H-9a), 4.15 (dd, 1H, H-9b), 2.82 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.21 (dd, 1H, H-3_{ax}), 2.11, 2.08, 2.07, 2.05, 2.02 (je s, je 3H, COCH_3) ppm.

$J_{5,6} = 9.5$, $^2J_{\text{CH}_2\text{-Ph}} = 12.1$, $J_{4,5} = 9.2$, $J_{6,7} = 1.9$, $J_{8,9a} = 5.5$, $J_{8,9b} = 1.9$, $J_{9a,9b} = 12.6$, $J_{3\text{eq},4} = 4.6$, $J_{3\text{ax},4} = 11.9$, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.0$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 136.99$, 135.01, 133.28 130.21, 128.19, 127.23, 121.78 (je C-Ph), 74.79 (C-8), 71.12 ($\text{CH}_2\text{-Ph}$), 70.59 (C-5), 70.05 (C-6), 68.61 (C-4), 67.69 (C-7), 63.01 (C-9), 38.99 (C-3), 23.15, 21.12, 20.75, 20.64, 20.49 (je COCH_3) ppm.

4-Nitrophenyl-(3-desoxy-D-glycero- α -D-galacto-2-nonulopyranosylonsäure) (**73**)

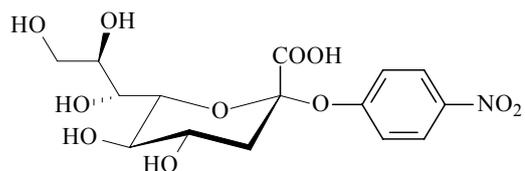
100 mg (145 μmol) **72** werden in 12 ml MeOH gelöst, mit 12 ml 0.1M. NaOH versetzt und bei Raumtemperatur 4 Stunden gerührt. Die Reaktion wird durch Neutralisation mit Ionenaustauscher (Amberlite IR 120, H^+ -Form) abgebrochen. Das Harz wird abfiltriert und die Lösung anschließend gefriergetrocknet. Ohne weitere Reinigung wird die Verbindung **73** in 56.4 mg (145 μmol , quantitative Ausbeute) isoliert.

$\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}_{11}$ (389.7)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8^{\circ}$ ($c = 0.1$, H_2O)

R_f 0.47 (BuOH:HOAc:H₂O 5:2:2)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): $\delta = 8.20$ (d, 2H, $\text{H}_{\text{a}_{\text{arom}}}$), 7.33 (d, 2H, $\text{H}_{\text{b}_{\text{arom}}}$), 4.04 (m, 1H, H-6), 3.91-3.82 (m, 3H, H-9a, H-7, H-4), 3.71(ddd, 1H, H-8), 3.68 (dd, 1H, H-9b), 3.52 (dd, 1H, H-5), 2.23 (dd, 1H, H-3_{eq}), 1.89 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{7,8} = 8.6$, $J_{6,7} = 1.9$, $J_{5,6} = 8.8$, $J_{8,9a} = 2.6$, $J_{8,9b} = 5.9$, $^2J_{9a,9b} = 11.3$, $J_{4,5} = 9.2$, $J_{3\text{eq},4} = 4.7$, $J_{3\text{ax},4} = 12.1$, $J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.1$ Hz.

(100 MHz, D_2O): $\delta/\text{ppm} = 126.22$ ($\text{C}_{\text{a}_{\text{arom}}}$), 122.5 ($\text{C}_{\text{b}_{\text{arom}}}$), 73.89 (C-6), 71.45 (C-8), .69.01, 68.71, 64.95 (C-9, C-7, C-4), 60.38 (C-5), 41.62 (C-3).ppm.

(3,4-Methylenedioxyphenyl)-(methyl-5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate) (75)

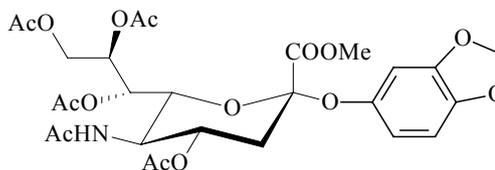
100 mg (196 μmol) **14** werden nach AAV 6 mit 41.5 mg (300 μmol) Sesamol und 81.5 mg (240 μmol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in 1.0 ml DCM gelöst. Anschließend wird die Lösung unter starkem Rühren mit 0.8 ml 1 M NaOH-Lsg. versetzt. Nach dünn-schichtchromatographischer Reaktionsverfolgung wird das Produkt säulenchromatographischen (Eluens: EE) gereinigt. Es wurden 41.8 mg (68 μmol) Produkt (**75**) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 35% bezogen auf **14**.

$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{NO}_{15}$ (611.4)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +39^\circ$ ($c = 1.1$, CHCl_3)

$R_f = 0.30$ (EE)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): $\delta = 6.72$ (d, 1H, H-2_{arom.}); 6.59 (dd, 1H, H-6_{arom.}); 6.51 (d, 1H, H-5_{arom.}); 5.53 (ddd, 1H, H-8); 5.37 (dd, 1H, H-7); 5.10, 5.07 (2 d, je 1H, OCH_2O); 4.75 (ddd, 1H, H-4); 4.44 (m, 1H, H-9); 4.27-4.13 (m, je 1H, H-5, H-6, H-9'); 3.08 (s, 3H, COOCH_3); 2.63 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.05 (dd, 1H, H-3_{ax}); 1.82, 1.76, 1.57, 1.43, 1.41 (5 s, je 3H, COCH_3) ppm.

$J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.7$; $J_{3\text{ax},4} = 12.2$; $J_{3\text{eq},4} = 4.8$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{6,7} = 1.8$; $J_{7,8} = 7.4$; $J_{8,9} = 2.1$; $J_{8,9'} = 4.8$; $J_{2\text{ar},6\text{ar}} = 2.3$; $J_{5\text{ar},6\text{ar}} = 8.4$; $J_{\text{OCH}_2\text{O}} = 1.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, C_6D_6): $\delta = 170.52$, 170.37, 170.33, 170.16, 170.07 (5 COCH_3); 168.79 (COOCH_3); 149.14, 148.83 (C-3_{arom.}, C-4_{arom.}); 145.23 (C-1_{arom.}); 114.02 (C-6_{arom.}); 108.40 (C-

5_{arom.}); 104.14 (C-2_{arom.}); 101.40 (C-2); 74.27, 70.71, 69.43, 68.34 (C-6, C-8, C-4, C-7); 62.75 (C-9); 52.67 (COOCH₃); 49.55 (C-5); 38.75 (C-3); 21.14-20.43 (5 COCH₃) ppm.

(3,4-Methylenedioxyphenyl)-methyl-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosylonate (75a)

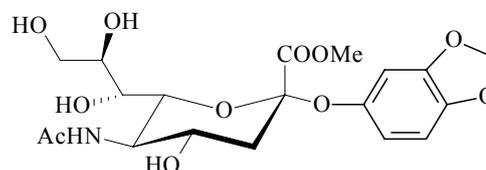
Nach AVV 2 werden 110 mg (215 μ mol) **75** deacetyliert. Nach Abbruch der Reaktion erfolgt eine säulanchromatographische Reinigung des Produkts (Eluens EE:MeOH 4:1). Es werden 50.5 mg (144 μ mol) des Produkts isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 67 %.

C₁₉H₂₅NO₁₁ (413.1)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +61^\circ$ ($c = 1.0$, MeOH)

R_f = 0.37 (EE:MeOH 4:1)



¹H-NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 6.70$ (d, 1H, H-2_{arom.}); 6.66 (d, 1H, H-5_{arom.}); 6.56 (dd, 1H, H-6_{arom.}); 5.88-5.90 (2 d, je 1H, OCH₂O); 3.75-3.84 (m, je 1H, H-8, H-9, H-5); 3.71 (s, 3H, COOCH₃); 3.60-3.68 (m, je 3H, H-4, H-6, H-9'); 3.50 (dd, 1H, H-7); 2.77 (dd, 1H, H-3_{eq}); 1.97 (s, 3H, COCH₃); 1.88 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{3ax,3eq} = 13.0$; $J_{3ax,4} = 12.2$; $J_{3eq,4} = 4.8$; $J_{6,7} = 1.3$; $J_{7,8} = 8.9$; $J_{2ar,6ar} = 2.3$; $J_{5ar,6ar} = 8.4$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 175.62$ (COCH₃); 170.47 (COOCH₃); 149.87, 149.59 (C-3_{arom.}, C-4_{arom.}); 146.59 (C-1_{arom.}); 116.34 (C-6_{arom.}); 108.93 (C-5_{arom.}); 106.23 (C-2_{arom.}); 103.08 (C-2); 75.99, 73.04, 70.47, 68.88 (C-6, C-8, C-7, C-4); 65.13 (C-9); 54.09 (C-5); 53.77 (COOCH₃); 42.03 (C-3); 23.08 (COCH₃) ppm.

(3,4-Methylenedioxyphenyl)-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonsäure (76)

Nach AVV 3 werden 90 mg (203 μ mol) **75a** mit 0.1 M NaOH verseift. Es werden 85 mg (198 μ mol) des Produkts **76** isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 98 %.

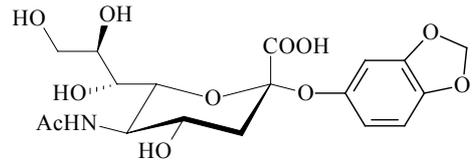
$C_{18}H_{23}NO_{11}$ (429.5)

leicht gelber amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = +59^\circ$ ($c = 1.0$, $CHCl_3$)

Smp: $109^\circ C$

$R_f = 0.47$ (BuOH:HOAc:H₂O 5:2:2)



1H -NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 6.77$ (d, 1H, H-2_{arom.}); 6.67 (dd, 1H, H-6_{arom.}); 6.61 (d, 1H, H-5_{arom.}); 5.83-5.86 (2 d, je 1H, O-CH₂-O); 3.85 (ddd, 1H, H-8); 3.80 (dd, 1H, H-9); 3.58-3.74 (m, je 1H, H-4, H-5, H-6, H-9'); 3.51 (dd, 1H, H-7); 2.91 (dd, 1H, H-3_{eq.}); 1.99 (s, 3H, COCH₃); 1.73 (dd, 1H, H-3_{ax.}) ppm.

$J_{3ax,3eq} = 11.7$; $J_{3ax,4} = 12.7$; $J_{3eq,4} = 4.3$; $J_{6,7} = 1.3$; $J_{7,8} = 8.9$; $J_{8,9} = 2.5$; $J_{8,9'} = 5.3$; $J_{9,9'} = 11.4$; $J_{2ar,6ar} = 2.3$; $J_{5ar,6ar} = 8.4$; $J_{OCH_2O} = 1.2$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 145.67$ (C-1_{arom.}); 116.64 (C-6_{arom.}); 108.57 (C-5_{arom.}); 106.41 (C-2_{arom.}); 104.69 (C-2); 75.41, 73.53, 70.69, 69.91 (C-6, C-8, C-7, C-4); 64.90 (C-9); 54.49 (C-5); 42.99 (C-3); 22.96 (COCH₃) ppm.

(2-Chlor-4-nitrophenyl)-methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonyl)-onat (77)

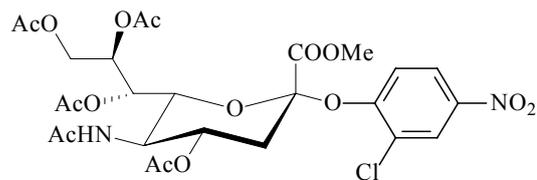
100 mg (196 μ mol) **14** werden nach AAV 6 mit 51.6 mg (297 μ mol) 2-Chlor-4-nitrophenol und 81.5 mg (240 μ mol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in 1.0 ml DCM gelöst. Anschließend wird die Lösung unter starkem Rühren mit 0.8 ml 1 M NaOH-Lsg. versetzt. Nach dünnschichtchromatographischer Reaktionsverfolgung wird das Produkt säulenchromatographisch (Eluens: EE) gereinigt. Es wurden 81.6 mg (126 μ mol) Produkt (**77**) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 64% bezogen auf **14**.

$C_{26}H_{31}ClN_2O_{15}$ (647.7)

farbloser Sirup

$[\alpha]_D^{20} = -29^\circ$ ($c = 0.8$, $CHCl_3$)

$R_f = 0.40$ (EE)



1H -NMR (400 MHz, C_6D_6): $\delta = 8.41$ (dd, 1H, H-5_{arom.}); 8.14 (d, 1H, H-3_{arom.}); 7.75 (d, 1H, H-6_{arom.}); 5.90 (ddd, 1H, H-8); 5.68 (dd, 1H, H-7); 5.12 (ddd, 1H, H-4); 4.80 (dd, 1H, H-6);

4.70-4.56 (m, je 1H, H-5, H-9); 4.41 (dd, 1H, H-9'); 3.28 (s, 3H, COOCH₃); 3.01 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.47 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.25, 2.06, 1.96, 1.81, 1.78 (5 s, je 3H, COCH₃) ppm.

$J_{3ax,3eq} = 12.7$; $J_{3ax,4} = 12.0$; $J_{3eq,4} = 4.6$; $J_{4,5} = 9.9$; $J_{5,6} = 10.7$; $J_{6,7} = 1.9$; $J_{7,8} = 8.9$; $J_{8,9} = 2.8$; $J_{8,9'} = 5.9$; $J_{9,9'} = 12.5$; $J_{3ar,5ar} = 2.7$; $J_{5ar,6ar} = 9.2$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, C₆D₆): $\delta = 170.30-169.76$ (5 COCH₃); 168.65 (COOCH₃); 155.18 (C-4_{arom.}); 146.38 (C-2_{arom.}); 144.04 (C-1_{arom.}); 126.42 (C-3_{arom.}); 124.18 (C-5_{arom.}); 119.54 (C-6_{arom.}); 100.83 (C-2); 74.74, 69.40, 68.62, 67.57 (C-6, C-8, C-4, C-7); 62.89 (C-9); 53.10 (COOCH₃); 49.26 (C-5); 39.26 (C-3); 21.11-20.56 (4 COCH₃) ppm.

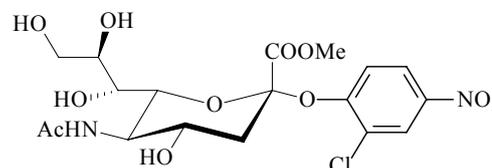
(2-Chlor-4-nitrophenyl)-methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonyl)-onat (77a)

Nach AVV 2 werden 70 mg (110 μ mol) **77** deacetyliert. Nach Abbruch der Reaktion erfolgt eine säulanchromatographische Reinigung des Produkts (Eluens EE:MeOH 4:1). Es werden 52 mg (112 μ mol) des Produkts isoliert. Die entspricht einer Ausbeute von 98 %.

C₁₈H₂₃ClN₂O₁₁ (479.8)

farbloser amorpher Feststoff

R_f = 0.21 (EE)



Das Produkt wurde ohne weitere Charakterisierung für die weitere Synthese eingesetzt.

(2-Chlor-4-nitrophenyl)-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonylonsäure (78)

Nach AVV 3 werden 27 mg (58 μ mol) **77a** mit 1 ml 0.1 M NaOH verseift. Es werden quantitativ 27 mg (58 μ mol) des Produkts **78** isoliert.

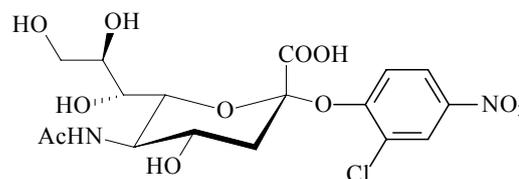
C₁₇H₂₁ClN₂O₁₁ (464.3)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -48^\circ$ ($c = 0.5$, H₂O)

Smp: 115° C

R_f = 0.54 (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.90$ (d, 1H, H-3_{arom.}); 7.68 (dd, 1H, H-5_{arom.}); 6.33 (d, 1H, H-6_{arom.}); 3.85-3.25 (m, je 1H, H-8, H-4, H-5, H-6, H-9, H-9', H-7); 1.95 (dd, 1H, H-3_{eq}); 1.81 (s, 3H, COCH₃); 1.64 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.7$; $J_{3\text{ax},4} = 11.4$; $J_{3\text{eq},4} = 5.1$; $J_{3\text{ar},5\text{ar}} = 3.1$; $J_{5\text{ar},6\text{ar}} = 9.3$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOD): $\delta = 125.75$ (C-3_{arom.}); 125.12 (C-5_{arom.}); 119.14 (C-6_{arom.}); 104.31 (C-2); 72.65, 71.21, 68.63, 68.48 (C-6, C-8, C-7, C-4); 64.89 (C-9); 53.23 (C-5); 41.15 (C-3); 21.73 (COCH₃) ppm.

(4-Chlor-5-methyl-2-nitrophenyl)-methyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonyl)-onat (79)

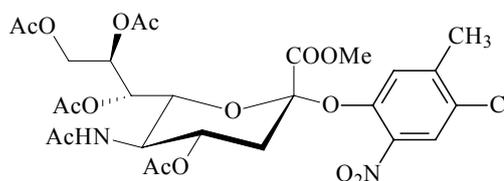
100 mg (196 μmol) **14** werden nach AAV 6 mit 280 mg (1.50 mmol) 4-Chlor-5-methyl-2-nitrophenol und 413 mg (1.22 mmol) Tetrabutylammoniumhydrogensulfat in 1.0 ml DCM gelöst. Anschließend wird die Lösung unter starkem Rühren mit 0.8 ml 1 M NaOH-Lsg. versetzt. Nach dünnenschichtchromatographischer Reaktionsverfolgung wird das Produkt säulenchromatographisch (Eluens: EE) gereinigt. Es werden 54.6 mg (84 μmol) Produkt (**79**) isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 43% bezogen auf **14**.

$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_{15}$ (661.6)

farbloser Sirup

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8^\circ$ ($c = 0.7$, CHCl_3)

$R_f = 37$ (EE)



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): $\delta = 7.52$ (s, 1H, H-3_{arom.}); 7.48 (s, 1H, H-6_{arom.}); 5.72 (ddd, 1H, H-8); 5.53 (dd, 1H, H-7); 5.05 (ddd, 1H, H-4); 4.59 (dd, 1H, H-9); 4.48-4.36 (m, je 1H, H-5, H-6); 4.32 (dd, 1H, H-9'); 3.26 (s, 3H, COOCH₃); 2.95 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.43 (s, 3H, Ph-CH₃); 2.35 (dd, 1H, H-3_{ax}); 2.06, 2.04, 1.96, 1.84, 1.70 (je s, je 3H, COCH₃) ppm.

$J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 13.1$; $J_{3\text{ax},4} = 12.0$; $J_{3\text{eq},4} = 4.8$; $J_{4,5} = 9.7$; $J_{5,6} = 10.7$; $J_{6,7} = 1.5$; $J_{7,8} = 8.9$; $J_{8,9} = 2.8$; $J_{8,9'} = 6.1$; $J_{9,9'} = 12.2$ Hz.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, C_6D_6): $\delta = 170.44$ -169.86 (5 COCH₃); 167.87 (COOCH₃); 145.46 (C-2_{arom.}); 143.58 (C-4_{arom.}); 141.77 (C-1_{arom.}); 130.16 (C-5_{arom.}); 125.66 (C-3_{arom.}); 125.36 (C-

$\delta_{\text{arom.}}$); 101.83 (C-2); 74.26, 69.44, 68.80, 67.58 (C-6, C-8, C-4, C-7); 62.96 (C-9); 53.08 (COOCH₃); 49.51 (C-5); 39.00 (C-3); 23.22-20.59 (5 COCH₃); 20.30 (Ph-CH₃) ppm.

(4-Chlor-5-methyl-2-nitrophenyl)-methyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonyl)-onat (79a)

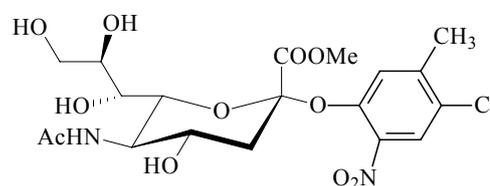
Nach AVV 2 werden 220 mg (333 μ mol) **79** deacetyliert. Nach Abbruch der Reaktion erfolgt eine säulenchromatographische Reinigung des Produkts (Eluens EE:MeOH 4:1). Es werden 98 mg (200 μ mol) des Produkts isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 60 %.

C₁₉H₂₅ClN₂O₁₁ (493.2)

farbloser amorpher Feststoff

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -45^{\circ}$ ($c = 1$, MeOH)

R_f = 37 (EE:MeOH 4:1)



¹H-NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.85$ (s, 1H, H-3_{arom.}); 7.66 (s, 1H, H-6_{arom.}); 3.84-3.68 (m, 5H, H-5, H-9, H-4, H-6, H-8); 3.70 (s, 3H, COOCH₃); 3.62 (dd, 1H, H-9'); 3.50 (dd, 1H, H-7); 2.81 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.41 (s, 3H, Ph-CH₃); 1.98 (s, 3H, COCH₃); 1.92 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{3\text{ax},3\text{eq}} = 12.9$; $J_{3\text{ax},4} = 11.2$; $J_{3\text{eq},4} = 4.6$; $J_{6,7} = 1.3$; $J_{7,8} = 8.9$; $J_{8,9'} = 5.4$; $J_{9,9'} = 11.5$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 174.11$ (COCH₃); 167.98 (COOCH₃); 145.02, 142.86, 141.82, 129.73 (C-1_{arom.}, C-2_{arom.}, C-4_{arom.}, C-5_{arom.}); 127.35 (C-3_{arom.}); 124.92 (C-6_{arom.}); 101.91 (C-2); 74.86 (C-8); 71.27 (C-6); 69.03 (C-7); 67.19 (C-4); 63.86 (C-9); 52.66, 52.44 (COOCH₃, C-5); 40.17 (C-3); 21.63 (COCH₃); 19.28 (Ph-CH₃) ppm.

(4-Chlor-5-methyl-2-nitrophenyl)-5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosonylonsäure (80)

Nach AVV 3 werden 90 mg (180 μ mol) **79a** mit 1 ml 0.1 M NaOH verseift. Es werden quantitativ 86 mg (148 μ mol) des Produkts **80** isoliert.

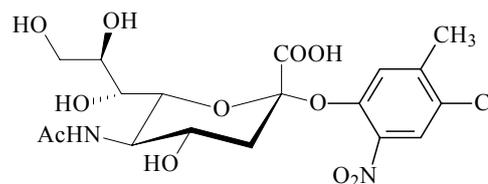
$C_{18}H_{23}ClN_2O_{11}$ (479.7)

leicht gelber amorpher Feststoff

$[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ ($c = 0.5$, H_2O)

Smp: $133^\circ C$

$R_f = 0.51$ (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



1H -NMR (400 MHz, MeOD): $\delta = 7.74$ (s, 1H, H-3_{arom.}); 7.60 (s, 1H, H-6_{arom.}); 3.92-3.64 (m, 5H, H-5, H-9, H-4, H-6, H-8); 3.54 (dd, 1H, H-9'); 3.40 (dd, 1H, H-7); 2.92 (dd, 1H, H-3_{eq}); 2.28 (s, 3H, Ph-CH₃); 1.88 (s, 3H, COCH₃); 1.76 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{3ax,3eq} = 12.8$; $J_{3ax,4} = 11.0$; $J_{3eq,4} = 4.5$; $J_{6,7} = 1.1$; $J_{7,8} = 9.0$; $J_{8,9'} = 5.4$; $J_{9,9'} = 11.3$ Hz.

^{13}C -NMR (100 MHz, MeOD): $\delta = 125.44$ (C-3_{arom.}); 125.23 (C-6_{arom.}); 74.63 (C-8); 71.37 (C-6); 69.03 (C-7); 67.90 (C-4); 64.51 (C-9); 52.58 (C-5); 41.77 (C-3); 21.94 (COCH₃); 19.35 (Ph-CH₃) ppm.

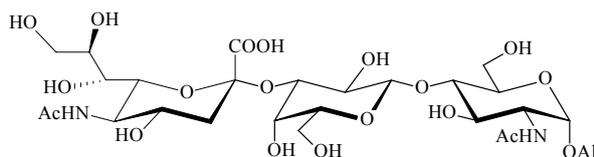
Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl-onsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-(2-acetamido-2-desoxy)- α -D-glucopyranosid (87)

60 mg (230 μ mol) α -All-GlcNAc werden zusammen mit 15 mg (50 μ mol) *p*NP-Gal in 1 ml Tris-HCl-Puffer (100 mmol, 0.02 % BSA, pH = 7.5) gelöst und mit 100 μ l Galactosidase aus *Bacillus circulans* versetzt. Bei $23^\circ C$ wird das Reaktionsgemisch 36 Std. inkubiert. Die Bildung des Disaccharids wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (Eluens: BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2). Anschließend wurden der Lösung 10 mg (23 μ mol) *p*NP-Neu5Ac und 200 μ l Enzymlösung (Trans-Sialidase, entsprechend 200 μ g) zugegeben, und die weitere Inkubation erfolgte für 12 Std. Nach einer dünnschichtchromatographischen Kontrolle der Reaktion (Eluens: BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2) wird diese durch die Zugabe von 2 ml EtOH abgebrochen. Nach der Zentrifugation wird der Überstand lyophilisiert und über eine RP-18 Säule (Eluens H₂O) vorgereinigt. Anschließend wird das Produkt gelpermeationschromatographisch (Biogel P-2, Eluens H₂O) weiter gereinigt. Das Produkt wird in einer Auswaage von 2.8 mg (3.9 μ mol) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute 17 % bezogen auf *p*NP-Neu5Ac.

$C_{28}H_{46}N_2O_{19}$ (714.7)

farblos amorpher Feststoff

$R_f = 0.11$ (BuOH:HOAc:H₂O 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 737.2$ $[M+Na]^+$

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 6.04$ (dddd, 1H, All-2), 5.51 (dd, 1H, All-3_{cis}), 5.38 (dd, 1H, All-3_{trans}) 4.48 (d, 1H, H-1'), 4.42 (d, 1H, H-1), 4.39 (m, 1H, All-1a), 4.31 (dd, 1H, H-4), 4.25 (m, 1H, All-1b), 4.09 (dd, 1H, H-3'), 4.01 (ddd, 1H, H-5), 2.78 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.02, 1.99 (je s, je 3H, COCH₃), 1.80 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{All-1a,2} = 5.2$ $J_{All-1b,2} = 6.2$, $^2J_{All-1a/b} = 10.8$, $J_{All-2,3cis} = 11.1$, $J_{All-2,3trans} = 8.7$, $J_{1,2} = 3.7$, $J_{3,4} = 9.1$, $J_{4,5} = 2.8$, $J_{5,6a} = 5.8$, $J_{5,6b} = 5.6$, $J_{5,6a} = 6.1$, $J_{1',2'} = 8.1$, $J_{2',3'} = 8.7$, $J_{3',4'} = 3.3$, $^2J_{3ax'',H3eq''} = 13.1$, $J_{3ax'',H4''} = 12.9$, $J_{3eq,4} = 4.7$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂): $\delta = 129.98$ (CH_{allyl}), 120.19 (CH_{2-allyl}), 103.45 (C-1'), 102.71 (C-1), 77.01 (C-3'), 75.63 (C-4), 54.87 (OCH₂) 38.70 (C-3''), 21.81, 21.60 (je COCH₃) ppm.

Aufgrund der Komplexität der Spektren und der geringen Substanzmenge war die Zuordnung der fehlenden Signale im ¹H-NMR und im ¹³C-NMR nicht möglich. Die Strukturaufklärung ist aber aufgrund der Zuordnung der charakteristischen Signale gesichert.

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy- α -D-galacto-2-nonulopyranosyl-onsäure)-(2-3)-(β -D-galactopyranosyl)-(1-4)-(2-acetamido-2-desoxy)- α -D-glucopyranosid (88)

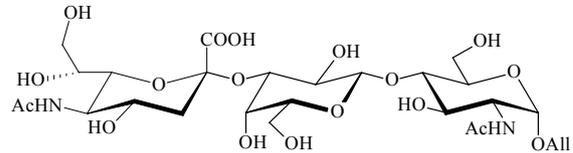
60 mg (230 μ mol) α -All-GlcNAc werden zusammen mit 15 mg (50 μ mol) *p*NP-Gal in 1 ml Tris-HCl-Puffer (100 mmol, 0.02 % BSA, pH = 7.5) gelöst und mit 100 μ l Galactosidase aus *Bacillus circulans* versetzt. Bei 23° C wird das Reaktionsgemisch 36 Std. inkubiert. Die Bildung des Disaccharids wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (Eluens: BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2). Anschließend werden der Lösung 10 mg (25 μ mol) *p*NP-Oct5Ac und 200 μ l Enzymlösung (Trans-Sialidase, entsprechend 200 μ g) zugegeben und die weitere Inkubation erfolgt für 12 Std.. Nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle der Reaktionslösung (Eluens: BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2) wird die Reaktion durch die Zugabe von 2 ml EtOH abgebrochen. Nach der Zentrifugation wird der Überstand lyophilisiert und

über eine RP-18 Säule (Eluens H₂O) vorgereinigt. Anschließend wird das Produkt gelpermeationschromatographisch (Biogel P-2, Eluens H₂O) gereinigt. Das Produkt wird in einer Auswaage von 2.1 mg (3.0 μmol) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute 12 % bezogen auf *p*NP-Oct5Ac.

C₂₇H₄₄N₂O₁₈ (685.6)

farbloser amorpher Feststoff

R_f = 0.13 (BuOH:HOAc:H₂O 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 707.1 [M+Na]^+$

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 6.10 (dddd, 1H, All-2), 5.55 (dd, 1H, All-3_{cis}), 5.43 (dd, 1H, All-3_{trans}), 4.44 (d, 1H, H-1'), 4.39 (d, 1H, H-1), 4.37-4.35 (m, 1H, All-1a), 4.29 (dd, 1H, H-4), 4.25 (m, 1H, All-1b), 4.13 (dd, 1H, H-3'), 4.01 (ddd, 1H, H-5), 2.74 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.06, 1.98 (je s, je 3H, COCH₃), 1.82 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{All-1a,2} = 4.6$ $J_{All-1b,2} = 5.9$, $^2J_{All-1a/b} = 10.1$, $J_{All-2,3cis} = 11.3$, $J_{All-2,3trans} = 8.8$, $J_{1,2} = 3.6$, $J_{3,4} = 9.3$, $J_{4,5} = 2.6$, $J_{5,6a} = 5.7$, $J_{5,6b} = 5.6$, $J_{5,6a} = 6.2$, $J_{1',2'} = 8.3$, $J_{2',3'} = 8.5$, $J_{3',4'} = 3.2$, $^2J_{3ax'',H3eq''} = 13.2$, $J_{3ax'',H4''} = 12.5$, $J_{3eq,4} = 4.6$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂): δ = 129.65 (CH_{allyl}), 121.02 (CH_{2-allyl}), 103.85 (C-1'), 102.13 (C-1), 77.21 (C-3'), 75.11 (C-4), 54.49 (OCH₂) 38.72 (C-3''), 21.21, 20.49 (je COCH₃) ppm.

Aufgrund der Komplexität der Spektren und der geringen Substanzmenge war die Zuordnung der fehlenden Signale im ¹H-NMR und im ¹³C-NMR nicht möglich. Die Strukturaufklärung ist aber aufgrund der Zuordnung der charakteristischen Signale gesichert.

Allyl-(5-acetamido-3,5-dideoxy-α-L-arabino-2-nonulopyranosylsäure)-(2-3)-(β-D-galactopyranosyl)-(1-4)-(2-acetamido-2-desoxy)-α-D-glucopyranosid (89)

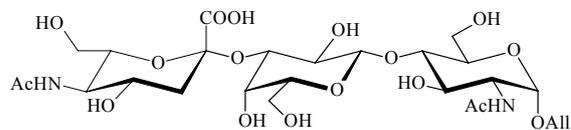
60 mg (230 μmol) α-All-GlcNAc werden zusammen mit 15 mg (50 μmol) *p*NP-Gal in 1 ml Tris-HCl-Puffer (100 mmol, 0.02 % BSA, pH = 7.5) gelöst und mit 100 μl Galactosidase aus *Bacillus circulans* versetzt. Bei 23° C wird das Reaktionsgemisch für 36 Std. inkubiert. Die Bildung des Disaccharids wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (Eluens:

BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2). Anschließend werden der Lösung 10 mg (27 μmol) *p*NP-Hept5Ac und 200 μl Enzymlösung (Trans-Sialidase, entsprechend 200 μg) zugegeben und die weitere Inkubation erfolgt für 12 Std. Nach einer dünnschichtchromatographischen Kontrolle der Reaktionslösung (Eluens: BuOH:HOAc:H₂O 5:2:2) wird die Reaktion durch die Zugabe von 2 ml EtOH abgebrochen. Nach der Zentrifugation wird der Überstand lyophilisiert und über eine RP-18 Säule (Eluens H₂O) vorgereinigt. Anschließend wird das Produkt gelpermeationschromatographisch (Biogel P-2, Eluens H₂O) gereinigt. Das Produkt wird in einer Auswaage von 1.8 mg (2.7 μmol) erhalten. Dies entspricht einer Ausbeute 10 % bezogen auf *p*NP-Hept5Ac.

C₂₆H₄₂N₂O₁₇ (654.3)

farblos amorpher Feststoff

R_f = 0.13 (BuOH:HOAc:H₂O = 5:2:2)



MALDI-Tof (DHB, positive mode): $m/z = 688.6 [M+Na]^+$

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 6.08 (dddd, 1H, All-2), 5.57 (dd, 1H, All-3_{cis}), 5.46 (dd, 1H, All-3_{trans}), 4.47 (d, 1H, H-1'), 4.41 (d, 1H, H-1), 4.38-4.35 (m, 1H, All-1a), 4.31 (dd, 1H, H-4), 4.24 (m, 1H, All-1b), 4.16 (dd, 1H, H-3'), 4.11 (ddd ≈ dt, 1H, H-5), 2.76 (dd, 1H, H-3_{eq}), 2.03, 1.99 (je s, je 3H, COCH₃), 1.79 (dd, 1H, H-3_{ax}) ppm.

$J_{All-1a,2} = 4.9$ $J_{All-1b,2} = 5.8$, $^2J_{All-1a/b} = 10.2$, $J_{All-2,3cis} = 11.1$, $J_{All-2,3trans} = 8.3$, $J_{1,2} = 3.5$, $J_{3,4} = 9.3$, $J_{4,5} = 2.4$, $J_{5,6a} = 5.6$, $J_{5,6b} = 5.9$, $J_{5,6a} = 6.4$, $J_{1',2'} = 8.5$, $J_{2',3'} = 8.2$, $J_{3',4'} = 3.3$, $^2J_{3ax'',H3eq''} = 13.4$, $J_{3ax'',H4''} = 12.7$, $J_{3eq,4} = 4.8$ Hz.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂): δ = 128.22 (CH_{allyl}), 122.24 (CH_{2-allyl}), 103.44 (C-1'), 102.39 (C-1), 76.99 (C-3'), 75.54 (C-4), 54.91 (OCH₂), 38.56 (C-3''), 21.10, 20.22 (je COCH₃) ppm.

Aufgrund der Komplexität der Spektren und der geringen Substanzmenge war die Zuordnung der fehlenden Signale im ¹H-NMR und im ¹³C-NMR nicht möglich. Die Strukturaufklärung ist aber aufgrund der Zuordnung der charakteristischen Signale gesichert.

Enzympräparation für die NMR-Experimente

Für die STD-Experimente wird eine deuterierte Pufferlösung hergestellt (PBS, 100 mmol NaCl in D₂O pH = 7.5). Das Enzym wird 3 Stunden gegen den deuterierten Puffer dialysiert (QuixSep Micro Dialyzer 1ml Dialysekammer) und anschließend zur Entsalzung auf eine PD-10 Säule (Fa. Amersham) gegeben. Als Eluens dient der deuterierte PBS-Puffer. Fraktionen von 5 Tropfen werden gesammelt und der Proteingehalt wird anschließend nach Bradford bestimmt.¹⁶⁹

NMR-STD-Experimente

Die STD-NMR-Spektren sind bei 5° C an einem 500 MHz Spektrometer der Fa. Bruker durchgeführt worden. Dieses Spektrometer verfügt über einen dreifachen Resonanz-Probenkopf mit inkorporierten Gradienten in der z-Achse. Die Proben beinhalten 15 µM Enzym und jeweils 5 mM des entsprechenden Substrats. Für die Aufnahme der STD-Spektren wird eine 1D Pulssequenz mit einem T_{1ρ} Filter benutzt. Die on-resonance Bestrahlung wird bei -1 ppm und die off-resonance Bestrahlung bei 20 ppm angeregt. Die Strahlung wird mit einem 50 Gaussian Puls mit 1 % Abweichung erzeugt, dauert jeweils 49 ms und wird um 1 ms verzögert, so dass eine Gesamtsättigungszeit von 2 s resultiert. Die Zeitspanne des T_{1ρ} Filter ist 15 ms. Die STD-NMR-Spektren werden mit 1536 Scans aufgenommen. Dazu werden 32 Dummy-scans aufgenommen, um die Gleichgewichtseinstellung der Probe zu ermöglichen. Die Spektralbreite ist 5 kHz mit 32768 Datenpunkte. Die Referenzspektren werden unter den gleichen Bedingungen mit 768 Scans aufgenommen.

Um die Größe des STD-Effektes zu bestimmen, wird die Signalintensität des STD mit der Intensität des Referenzspektrums verrechnet. Ein 100 %iger STD-Effekt würde auftreten, wenn Referenz- und STD-Spektren gleich wären. Für das Epitop-Mapping wird dieser Effekt auf das stärkste STD-Signal des Liganden auf 100 % normiert.

Messungen zur Kinetik

Zur Bestimmung der Umsatzraten werden 5 mM Substrat mit 15 µM Enzym bei 5° C unter NMR Bedingungen in deuteriertem PBS-Puffer umgesetzt. Dabei werden alle 2.16 min ein 1D ¹H-Spektrum mit 32 Scans und 8 Dummy Scans an einem 250 MHz Spektrometer (Fa. Bruker) aufgenommen. Die Geräteeinstellung sind die gleichen wie bei den STD-

Experimenten Die resultierenden Daten werden durch die abnehmende Signalintensität für isolierte Signale der entsprechenden Donorsubstrate aufgenommen.

14. Sicherheitshinweise

4-(Dimethylamino)-pyridin [T]	R 25-36/38	S 37-45
Aceton [F, Xi]	R 11-36-66-67	S 9-16-26
Acetonitril [F, T]	R 11-23/24/25	S 16-27-45
Acetylchlorid [F, C]	R 11-14-34	S 9-16-26-45
Benzol [F, T]	R 45-11-48/23/24/25	S 53-45
Benzyltriethylammonium- chlorid [Xi]	R 22	S 24/25
Bortrifluorid Etherat [T]	R 20/22-34-48/23-52	S 8-26-36/37/39-45-61
Chloroform [Xn]	R 22-38-40-48/10/22	S 36/37
Dichlormethan [Xn]	R 40	S 23.2-24/25-36/37
Dimethylsulfoxid [Xi]	R 36/38	S 26
Essigsäure [C]	R 10-35	S 23.2-26-45
Essigsäureanhydrid [C]	R 10-34	S 26-45
Ethanol [F]	R 11	S 7-16
Ethylacetat [F, Xn]	R 11-36-66-67	S 16-26-33
Methanol[F, T]	R 11-23/24/25-39	S 7-16-36/37-45
Methylumbelliferon [Xi]	R 36/37/38	S 26-36
<i>N</i> -Acetylneuraminsäure		S 22-24/25
Natriumcyanoborhydrid [F, C]	R 15-32-34	S 26-36/37/39-43-45
Natriumhydroxid [C]	R 45	S 26-37/39-45
Natriummethanolat [F, C]	R 11-14-34	S 8-26-43.6-45
Natriumperiodat [O]	R 8	S 17
n-Butanol [Xn]	R 10-20	S 16
Oxalessigsäure [C]	R 34	S 26-45-36/37/39
Petrolether 50-70 [F, Xn]	R 11-52/53-65	S 9-16-23.2-24-33-62
<i>p</i> -Nitrophenol [Xn]	R 20/21/22-33	S 28.1
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure- Monohydrat [Xi]	R 36-37-38	S 27-37
Pyridin [F, Xn]	R 11-20/21/22	S 26-28.1
Salzsäure [C]	R 34-37	S 26-36/37/39-45
Schwefelsäure [C]	R 35	S-26-30-45

Tetrabutylammonium- hydrogensulfat [Xn]	R 22	
Toluol [F, Xn]	R 11-20	S 16-25-29-33
Trimethylorthoacetat [F, Xi]	R 11-36/38	S 9-16
Triphenylmethylchlorid [C]	R 34	S 26-36/37/39-45
Vinylacetat [F]	R 11	S 16-23.2-29-33

15. Literatur

- (1) Mann, J. *Secondary Metabolism*; 2 ed., Clarendon Press: Oxford, **1987**, 6-21
- (2) Stryer, L. *Biochemistry*; 4 ed., W. H. Freeman and Company: New York, **1995**, 463-482
- (3) Montreuil, J.; Vliegenhart, J. F. G.; Schachter, H., *Glycoproteins*; Elsevier; Amsterdam, **1995**, 1-10
- (4) Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1473, 4-8
- (5) Laine, R. A., *Glycobiology*, **1994**, 4, 759-767
- (6) Fukuda, M., *Bioorg. Med. Chem.*, **1995**, 3, 207-215
- (7) Sharon, N.; Lis, H., *The Proteins*, 5 ed.; Academic Press: New York, **1982**, 1-124
- (8) Paulson, J. C. *The Receptor*; 2 ed.; Academic Press: New York, **1985**, 131-219
- (9) Feizi, T., *Nature*, **1995**, 314, 53-57
- (10) Lasky, L., A. *Science* **1992**, 258, 964-969
- (11) Schauer, R., *Zoology*, **2004**, 107, 49-64
- (12) Varki, A., *Glycobiology*, **1992**, 2, 25-40
- (13) Schauer, R.; Kamerling, J. P., *Glycoproteins II*; Elsevier, Amsterdam, **1997**, 243-402
- (14) Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J. (eds.), *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1999**, 35-110
- (15) Corfield, A.P.; R. Schauer (eds.) *Sialic Acids -Chemistry, Metabolism and Function*, Cell Biology Monographs, Springer, New York, N.Y. **1982**, 5-50
- (16) Schauer, R. *Glycoconjugate J.* **2000**, 17, 485-499
- (17) Angata, T.; Varki, A. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 22127-22135
- (18) Irie, A.; Koyama, S.; Kozutsumi, Y.; Kawasaki, T.; Suzuki, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15866-15871
- (19) Malykh, Y. N.; Schauer, R.; Shaw, L., *Biochimie*, **2001**, 83, 623-634
- (20) Tangvoranuntakul, P.; Gagneux, P.; Diaz, S.; Bardor, M.; Varki, N.; Varki, A., Muchmore, E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 12045-12050
- (21) Kelm, S.; Schauer, R., *Int. Rev. Cytol.*, **1997**, 175, 137-240
- (22) Schauer, R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **2004**, 426, 426-441
- (23) Jancik, J.; Schauer, R., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1974**, 355, 395-400
- (24) Müller, E.; Schröder, C.; Schauer, R.; Sharon, N., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **1983**, 364, 1419-1429
- (25) Malisan, F.; Testi, R., *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, 1585, 179-187

-
- (26) Ofek, I.; Doyle, J., (eds.) *Bacterial Adhesion to Cells and Tissues*, Chapman & Hall, New York, **1994**, 35-67
- (27) von Itzstein, M.; Wu, W.-Y.; Jin, B., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 259, 301-305
- (28) European Space Agency, www.esa.int/esacp/semte9adfd_index_0.html, **2004**
- (29) Tomlinson, S. ; Raper, J. *Parasitol. Today*, **1998**, 14, 354-359
- (30) Buschiazzo, A. ; Tavares, G.A.; Campetella, O.; Spinelli, S.; Cremona, M.L.; Paris, G.; Amaya, M.F.; Frasc, A.C.; Alzari, P.M., *EMBO. J.*, **2000**, 19, 16-24
- (31) Schenkman, S.; Jiang, M.S.; Hart, G.W.; Nussenzweig, V., *Cell*, **1991**, 65, 1117-1125
- (32) Pollevick, G.D.; Di Noia, J.M.; Salto, M.L.; Lim, C.; Leguizamon, M.S.; de Lederkremer, R.M.; Frasc, A.C., *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 27671-27680
- (33) Buschiazzo, A.; Amaya, M.F.; Cremona, M.L.; Frasc, A.C.; Alzari, P.M., *Molecular Cell*, **2002**, 10, 757-768
- (34) Todeschini, A.R.; Mendoca-Previato, L.; Previato, J.O.; Varki, A.; van Halbeek, H., *Glycobiology*, **2000**, 10, 213-221
- (35) Scudder, P.; Doom, J.P.; Chuenkova, M.; Manger, I.D.; Pereira, M.E.A., *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 9886-9891
- (36) Haselhorst, T.; Wilson, J.C.; Liakatos, A. Kiefel, M.J.; Dyason, J.C.; von Itzstein, M., *Glycobiology*, **2004**, 14, 895-907
- (37) Watts, A.G.; Damager, I.; Amaya, M.F.; Buschiazzo, A.; Alzari, P.M.; Frasc, A.C.; Whithers, S.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 7532-7533
- (38) Meindl, P.; Tuppy, H., *Monatsh. Chem.*, **1969**, 100, 1295-1306
- (39) Meindl, P.; Bodo, G.; Palese, P.; Schulmann, J.; Tuppy, H., *Virology*, **1974**, 58, 457-463
- (40) Agusti, R.; Paris, G.; Ratier, L.; Frasc, A.C. de Lederkremer, R.M., *Glycobiology*, **2004**, 14, 659-670
- (41) Cerecetto, H.; Gonzalez, M., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2002**, 2, 1187-1213
- (42) Kirchhoff, L.V., *Curr. Infect. Diss. Rep.*, **2003**, 5, 59-65
- (43) Urbina, J.A.; Docampo, R., *Trends Parasitol.*, **2003**, 19, 495-501
- (44) Faller, A., *Der Körper des Menschen*; 11 ed.; Georg Thieme Verlag; Stuttgart, **1988**, 45-52, 314-323
- (45) Changeux, J.P., *Sci. Am.*, **1993**, 269, 58-62
- (46) Stoffel, W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1990**, 29, 958-975
- (47) Hucho, F., *Neurochemistry-Fundamentals and Concepts*, VCH: Weinheim, **1986**

-
- (48) Schnaar, R.L., In *Carbohydrates in Chemistry and Biology*; Ernst, B. Hart, G.W. Sinay, P., (eds.); Wiley-VCH: Weinheim, **2000**, 1013-1027
- (49) Bosio, A.; Binczek, E.; Haupt, W.F., *J. Neurochem.*, **1998**, *70*, 308-315
- (50) Kelm, S. In *Results and Problems in Cell Differentiation*, Crocker, P.R. (eds.), Vol. 33 *Mammalian Carbohydrate Recognition Systems*, Springer-Verlag Berlin, **2001**, 153-176
- (51) May, A.P.; Robinson, R.C.; Vinson, M.; Crocker, P.R.; Jones, E.Y., *Mol. Cell*, **1998**, , 719-728
- (52) Li, C.; Tropak, M.D.; Gerlai, R.; Clapoff, S.; Abramow-Newerly, W.; Trapp, B.; Peterson, A.; Roder, J., *Nature*, **1994**, *369*, 747-750
- (53) Coolins, B.E.; Yang, L.J.S.; Mukhopadhyay, G.; Filbin, M.T.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Schnaar, R.L., *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 1248-1255
- (54) Collins, B.E.; Kiso, M.; Hasegawa, A.; Tropak, M.B.; Roder, J.C.; Crocker, P.R.; Schnaar, R.L., *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 16889-16895
- (55) Schnaar, R.L.; Collins, B.E.; Wright, L.P.; Kiso, M.; Tropak, M.B.; Roder, J.C.; Crocker, P.R., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1998**, *845*, 92-105
- (56) Mukhopadhyay, G.; Doherty, P.; Walsh, F.S.; Crocker, P.R.; Filbin, M.T., *Neuron*, **1994**, *13*, 757-767
- (57) Fawcett, J.W.; Keynes, R.J., *Annu. Rev. Neurosci.*, **1990**, *13*, 43-60
- (58) Vyas, A.A.; Patel, H.V.; Fromholt, S.E.; Heffer-Laue, M.; Vyas, K.A.; Dang, J.; Schachter, M.; Schnaar, R.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 8412-8417
- (59) Vinson, M.; Strijbos, P.J.L.M.; Rowles, A.; Facci, L.; Moore, S.E.; Simmons, D.L.; Walsh, F.S., *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 20280-20285
- (60) Liu, B.P.; Fournier, A.; Grand Pre, T.; Strittmatter, S.M., *Science*, **2002**, *297*, 1190-1193
- (61) Hunt, D.; Coffin, R.S.; Anderson, P.N., *J. Neurocytol.*, **2002**, *31*, 93-120
- (62) Yamashita, T.; Higuchi, H.; Tohyama, M., *J. Cell Biol.*, **2002**, *157*, 565-570
- (63) Kaplan, D.R.; Miller, F.D., *Nature Neurosci.*, **2003**, *6*, 435-436
- (64) Boons, G.-J.; Demchenko, A.V., *Chem. Rev.*, **2000**, *100*, 4539-4565
- (65) Khorlin, A.Y.; Privalova, I.M.; Bystrova, I.B., *Carbohydr. Res.*, **1971**, *19*, 272-275
- (66) Paulsen, H.; Tietz, H., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1982**, *21*, 927-928
- (67) Takahashi, T.; Tsukamoto, H.; Yamada, H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 113-118
- (68) Haberman, J.M.; Gin, D.Y., *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 1665-1668

- (69) Okamoto, K.; Kondo, T.; Goto, T., *Tetrahedron*, **1987**, 27, 5233-5236
- (70) Ito, Y.; Ogawa, T., *Tetrahedron*, **1990**, 46, 89-102
- (71) Ercegovic, T.; Magnusson, G.J., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1994**, 831-832
- (72) Leloir, L.F., *Science*, **1971**, 172, 1299-1303
- (73) Evers, B., *Dissertation*, Universität Hamburg, **1996**
- (74) Evers, B.; Mischnick, P.; Thiem, J., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 262, 335-341
- (75) Mischnick, P.; Evers, B.; Thiem, J., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 264, 293-304
- (76) Stangier, P. *Dissertation*, Universität Hamburg, **1992**
- (77) Ichikawa, Y.; Liu, J. L.-C.; Shen, G.-J.; Wong, C.-H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 6300-6302
- (78) Ichikawa, Y.; Shen, L.-C.; Wong, C.-H., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4698-4700
- (79) Kajihara, Y.; Yamamoto, T.; Nagae, H.; Nakashizuka, M.; Sakakibara, T.; Terada, I., *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 8632-8635
- (80) Yamamoto, T.; Nagae, H.; Kajihara, Y.; Terada, I., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1998**, 62, 210-214
- (81) Wen, D.X.; Livingston, B.D.; Medzihradsky, K.F.; Kelm, S.; Burlingame, A.L.; Paulson, J.C., *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267, 21011-21019
- (82) Yu, H.; Yu, G.; Karpel, R.; Chen, X., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 6427-6435
- (83) Thiem, J.; Sauerbrei, B., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 1503-1505
- (84) Ajisaka, K.; Fujimoto, H.; Isomura, M., *Carbohydr. Res.*, **1994**, 259, 103-115
- (85) Schmidt, D.; Thiem, J., *Chem. Comm.* **2000**, 19, 1919-1920
- (86) Makimura, Y.; Ishida, H.; Kondo, A.; Hasegawa, A.; Kiso, M., *J. Carbohydr. Chem.*, **1998**, 17, 975-979
- (87) Wilson, J.C.; Angus, D.I.; von Itzstein, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 4214-4217
- (88) Schmidt, D.; Sauerbrei, B.; Thiem, J., *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 8518-8526
- (89) Rothermel, J.; Faillhard, H., *Carbohydr. Res.*, **1990**, 196, 29-40
- (90) Warner, T.G.; O'Brien, J.S., *Biochemistry*, **1979**, 18, 2783-2786
- (91) Engstler, M.; Talhouk, J.W.; Smith, R.E.; Schauer, R., *Anal. Biochem.*, **1997**, 250, 176-180
- (92) Zémplén, G.; Pacsu, E., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1929**, 63, 1613-1618
- (93) Abuin, G.; Freitas-Junior, L.H.G.; Colli, W.; Alves, M.J.M.; Schenkman, S., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 13041-13047
- (94) Laroy, W.; Conteras, R., *Protein Expr. Purif.*, **2000**, 20, 389-393

-
- (95) Marchal, I.; Cerutti, M.; Mir, A.M.; Juliant, S.; Devauchelle, G.; Cacan, R.; Verbert, A., *Glycobiology*, **2001**, *11*, 593-603
- (96) Ribeiro, M.; Pereira-Chiocola, V.L.; Eichinger, D.; Rodriguez, M.M.; Schenkman, S., *Glycobiology*, **1997**, *7*, 1237-1246
- (97) Cremona, M.; Frasch, A.C., unveröffentlichte persönliche Mitteilungen, **2002**
- (98) Vetere, A.; Paoletti, S., *FEBS Lett.*, **1996**, *399*, 203-206
- (99) Vetere, A.; Miletich, M.; Bosco, M.; Paoletti, S., *Europ. J. Biochem.*, **2000**, *267*, 942-949
- (100) Ito, Y.; Paulson, J.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 7862-7863
- (101) Sun-Gu, L.; Byung-Gee, K., *Enzym. Microbiol. Tech.*, **2001**, *28*, 161-167
- (102) Schmidt, D., *Dissertation*, Universität Hamburg, **2000**
- (103) Neubacher, B.; Schmidt, D.; Ziegelmeüller, P.; Thiem, J., *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 1551-1556
- (104) Gambert, U.; Thiem, J., *Carbohydr. Res.*, **1997**, *299*, 85-89
- (105) Kröger, L., *Dissertation*, Universität Hamburg, **2003**
- (106) Gambert, U.; Gonzales Lio, R.; Farkas, E.; Thiem, J.; Verez-Bencomo, V.; Liptak, A., *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 1285-1291
- (107) Farkas, E.; Thiem, J. *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 3073-3077
- (108) Kimura, T.; Takayama, S.; Huang, H.; Wong, C.-H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 2348-2350
- (109) Mac Manus, D. A.; Grabowska, U.; Biggadike, K.; Bird, M. I.; Davies, S.; Vulfson, E. N.; Gallagher, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1999**, 295-305
- (110) Weingarten, S., *Dissertation*, Universität Hamburg, **2003**
- (111) Sauerbrei, B.; Thiem, J., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 201-203
- (112) Lee, K. B.; Lee, Y. C., *Anal. Biochem.*, **1994**, *216*, 358-364
- (113) Takahashi, N.; Lee, K. B.; Nakagawa, H.; Tsukamoto, Y.; Kawamura, Y.; Li, Y. T.; Lee, Y. C., *Anal. Biochem.*, **1995**, *230*, 333-342
- (114) Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2897-2904
- (115) Amaya, M. F.; Watts, A. G.; Damager, I.; Wehenkel, A.; Nguyen, T.; Buschiazzo, A.; Paris, G.; Frach, A. C.; Withers, S. G.; Alzari, P. M., *Structure*, **2004**, *12*, 775-784
- (116) Carr, C. M.; Peter, S. K., *Science*, **1994**, *266*, 234-237
- (117) Greengard, O.; Poltoratskaja, N.; Leikina, E.; Zimmerberg, J.; Moscona, A. *J. Virology*, **2000**, *74*, 11108-11114

-
- (118) Iwersen, M.; Schmid, H.; Gase, S.; Kohla, G.; Schauer, R., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *384*, 1035-1047
- (119) Shi, W. X.; Chammas, R.; Varki, A., *Glycobiology*, **1998**, *8*, 199-205
- (120) Higa, H. H.; Butor, C.; Diaz, S.; Varki, A., *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 19427-19434
- (121) Tiralongo, J.; Schauer, R., *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **2004**, *16*, 635-644
- (122) Chen, H. Y.; Varki, A., *J. Exp. Med.*, **2002**, *196*, 1529-1533
- (123) Yu, R. K.; Macala, L. J.; Taki, T.; Weinfield, H. M.; Yu, F. S., *J. Neurochem.*, **1988**, *50*, 1825-1829
- (124) Chammas, R.; Sonnenburg, J. L.; Watson, N. E.; Tai, T.; Farquhar, M. G.; Varki, N. M.; Varki, A., *Cancer Res.*, **1999**, *59*, 1337-1346
- (125) De, M. R.; Lenti, L.; Malisan, F.; D'Agostino, F.; Tomassini, B.; Zeuner, A.; Rippo, M. R.; Testi, R., *Science*, **1997**, *277*, 1652-1655
- (126) Malisan, F.; Franchi, L.; Tomassini, B.; Ventura, N.; Condo, I.; Rippo, M. R.; Rufini, A.; Liberati, L.; Nachtigall, C.; Kniep, B.; Testi, R., *J. Exp. Med.*, **2002**, *196*, 1535-1541
- (127) Schroven, A., *Diplomarbeit*, Universität Hamburg, **2005**
- (128) Ogura, H.; Furuhata, K.; Sato, S.; Anazawa, K.; Itoh, M.; Shitori, Y., *Carbohydr. Res.*, **1987**, *167*, 77-86
- (129) Kiefel, M. J.; Wilson, J. C.; Bennet, S.; Gredley, M.; von Itzstein, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *8*, 657-664
- (130) Nadano, D.; Iwasaki, M.; Endo, S.; Kitajima, K.; Inoue, S.; Inoue, Y., *J. Biol. Chem.*, **1986**, *261*, 11550-11557
- (131) Inoue, S.; Kitajima, K.; Inoue, Y. J., *Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 24341-24344
- (132) Knirel, Y. A.; Kocharova, N. A.; Shashkov, A. S.; Kochetov, N. K.; Mamontova, V. A.; Solov'eva, T. F., *Carbohydr. Res.*, **1989**, *188*, 145-155
- (133) Kimura, M.; Hama, Y.; Sumi, T.; Asakawa, M.; Rao, B. N.; Horne, A. P.; Li, S. C.; Li, Y. T.; Nakagawa, H., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 32138-32143
- (134) Angata, T.; Kitajima, K.; Inoue, S.; Chang, J.; Warner, T. G.; Troy, F. A.; Inoue, Y., *Glycobiology*, **1994**, *4*, 517-523
- (135) Sun, X. L.; Haga, N.; Ogura, H.; Takayanagi, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, *42*, 2352-2356
- (136) Terada, T.; Kiso, M.; Hasegawa, A., *Carbohydr. Res.*, **1994**, *259*, 201-218
- (137) Gross, H. J.; Brossmer, R., *Eur. J. Biochem.*, **1988**, *177*, 583-589
- (138) Angata, T.; Matsuda, T.; Kitajima, K., *Glycobiology*, **1998**, *8*, 277-284

- (139) Kajihara, Y.; Akai, S.; Nakagawa, T.; Sato, R.; Ebata, T.; Kodama, H.; Sato, K. I., *Carbohydr. Res.*, **1999**, *315*, 137-141
- (140) Nakamura, M.; Furuhata, K. Ogura, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *37*, 821-823
- (141) Cornforth, J. W.; Firth, M. E.; Gottschalk, A., *Biochem J.*, **1958**, *68*, 57-64
- (142) Nakamura, M.; Furuhata, K. Ogura, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, *36*, 4807-4813
- (143) Schauer, R.; Kamerling, J. P., *New Comp. Biochem.*, **1997**, *29 b*, 243-402
- (144) Khorlin A.Y.; Privalova I. M.; Bystrova, I. B., *Carbohydr. Res.*, **1971**, *19*, 272-275.
- (145) Eschenfelder V.; Brossmer R., *Carbohydr. Res.*, **1987**, *162*, 294-297
- (146) Auge, C.; Gautheron, C., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 789-790.
- (147) Simon, E. S.; Bednarski, M. D.; Whitesides, G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 7159-7163
- (148) Herrmann, G. F.; Ichikawa, Y.; Wandrey, C.; Gaeta, F. C. A.; Paulson, J. C.; Wong, C. H., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 3091-3094
- (149) Kren, V.; Thiem, J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 893-895
- (150) Sakai, K.; Katsumi, H.; Ohi, H.; Usui, T.; Ishido, Y., *J. Carbohydr. Chem.*, **1992**, *11*, 553-565
- (151) Farkas, E.; Thiem, J., *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 3073-3077
- (152) Takayama, S.; Shimazaki, M.; Qiao, L.; Wong, C.-H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 1123-1126
- (153) Vetere, A.; Paoletti, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, *219*, 6-13
- (154) Meyer, B.; Peter, P., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2003**, *42*, 864-890
- (155) Mayer, M.; Meyer, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 6108-6117
- (156) Mayer, M.; Meyer, B., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1999**, *38*, 1784-1788
- (157) Shin, S.; Gaethje, H.; Schwardt, O.; Ernst, B. Kelm, S.; Meyer, B., *Glycobiology*, **2005**, in Revision
- (158) Shin, S., *Dissertation*, Universität Hamburg, **2005**
- (159) Kelm, S.; Brossmer, R.; Isecke, R. Gross, H. J.; Streng, K.; Schauer, R., *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *255*, 663-672
- (160) Kelm, S.; Brossmer, R., *Chem. Abstr. number: CA2451051*, **2003**
- (161) Tang, S.; Shen, Y.J.; DeBellard, M.E.; Mukhopadhyay, G.J.; Salzer, L.; Crocker, P.R.; Filbin, M.T., *J. Cell. Biol.*, **1997**, *138*, 1355-1366
- (162) Wilson, J. C.; Kiefel, M. J.; Albouz-Abo, S.; von Itzstein, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, *10*, 2791-2794
- (163) Biet, T.; Peters, T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4189-4192

-
- (164) Biet, T., *Dissertation*, Universität Lübeck, **2003**
- (166) Vogtherr, M.; Peters, T., *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 6093-6099
- (166) Maaheimo, H.; Kosma, P.; Brade, L.; Brade, H.; Peters, T., *Biochemistry*, **2000**, *39*, 12778-12788
- (167) Klein, J.; Meinecke, R.; Mayer, M.; Meyer, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 5336-5337
- (168) Auge, C.; Gautheron, C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1987**, 859-860
- (169) Bradford, M. M., *Anal. Biochem.*, **1976**, *72*, 248-254

Danksagung:

- Als erstes möchte ich meiner Familie und besonders meinen Eltern danken, die mich während der ganzen Zeit an der Uni Hamburg begleitet und unterstützt haben.
- Meinem Bruder Christoph für seine stete brüderliche Kritik und sein entspanntes Interesse am Verlauf der Arbeit.
- Meiner Freundin Patricia für ihr unersättliches Verständnis wenn's mal wieder länger dauerte und dafür, dass sie immer motivierend den einen oder anderen Faden in der Hand hatte.
- Ganz herzlich Danke ich den Urbewohner des Romantik-Dschungel OC-313 (Karin und Synke), die mich herzlich aufgenommen hatten und mir die Transformation des ehemaligen Brigitte Labor erlaubten.
- Andreas Schroven und Lars Kröger danke ich nicht nur für Bereitstellung von Substraten für meine enzymatischen Umsetzung, sondern auch unzählige getrunkene Biere .
- Prof. A. C. C. Frasch (Buenos Aires) danke ich für die Bereitstellung des Trans-Sialidase Klons aus *T. cruzi*.
- Dr. Patrick Ziegelmüller für die Expression des Enzyms und viele biochemische Diskussionen.
- Prof. Dr. Roland Schauer für sein stetiges Interesse an meiner Arbeit und vieler wissenschaftlicher Diskussionen.
- Prof. Dr. Thomas Peters und Dr. Astrid Blume für die interessante Zusammenarbeit und Vertiefung meiner NMR-Kenntnisse sowie die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.
- Prof. Bernd Meyer und Svenja Scheid für die MAG-Untersuchungen sowie Prof. Dr. Sörge Kelm für die Bereitstellung des MAG.
- Prof. Dr. Paul Kosma für die Unterstützungen in der KDN-Synthese und der freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Seinen Mitarbeitern Cadet und Axel sei ganz besonders gedankt, da sie mir das schöne Wien bei Tag und auch Nacht näher gebracht haben... Prost!
- Dr. Peter Greimel möchte ich nicht nur als Kollegen, sondern als sehr gutem Freund danken mit dem man einfach viel erleben konnte und der im Gegensatz zu anderen temporären Mitbewohnern ein reiner Titan im Romantik-Labor war.
- Ich danke Saskia, die immer für ein Kaffee gut war und sich auch privat als große Köchin entpuppte.
- Dem neuen Brigitte Labor (Janna und Agnes) danke ich für den weiblichen Charme und femininen Wind den sie in den AK brachten.
- Ich danke meinen Schwerpunktpraktis Jan und Sebastian sowie fast allen OC-F und BC Praktikanten, die mir mit ihren Synthesen beim Fortschritt dieser Arbeit behilflich waren.
- Den festen Größen Lilia und Kirsten danke ich für so manche gekochte Stufe, Kaffee, den es immer im Überschuss gab, und für so manche lustige Geschichte, die es in den Jahren zu erzählen gab, sowie Ira, die immer Kippen hat und weiß welcher Dealer wo was und wann hat.
- Meinen Freunden Henning, Olli, Tommy und Lars mit denen ich nicht nur auf dem Wasser den ganzen Frust vergessen habe, sondern auch an Land nie trocken lief.
- Meinen Kollegen von der RVS durch die ich bei der Rettung immer wieder erinnert wurde, was wirklich lebenswichtig ist.
- Am Ende muss ich es tun, ich danke Sven Regener und Element of Crime für die herrliche Musik und die reine Männerromantik, sowie allen, die an dieser Musik teilgehabt haben und mich gewähren liessen.

Lebenslauf

Björn Neubacher

*19.01.1975 in Hamburg

- | | |
|---------------------|--|
| 08/1981 bis 06/1985 | Besuch der Grundschule Alsterdorfer Straße (Hamburg) |
| 08/1985 bis 07/1994 | Besuch des Gymnasiums der Heinrich-Hertz- Schule (Hamburg) mit Abschluß der Hochschulreife |
| 08/1994 | Praktikum im Labor Dr. Kaiser & Dr. Woldmann GmbH im Bereich der instrumentelle Analytik (Hamburg) |
| 09/1994 bis 10/1995 | Zivildienst als Rettungssanitäter im Bereich des Rettungsdienstes bei Paramedic (Hamburg) und dem ASB (Boizenburg) |
| 10/1995 bis 10/1997 | Grundstudium der Chemie an der Universität Hamburg mit dem Abschluß des Vordiploms |
| 10/1997 bis 04/1998 | Praktikum in der Arbeitsgruppe von Dr. R. Furneaux (Industrial Research Ltd.) in Wellington/New Zealand |
| 04/1998 bis 12/2001 | Hauptstudium der Chemie an der Universität Hamburg mit dem Abschluß der Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. J. Thiem |
| Seit 01/2002 | Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. Joachim Thiem (Chemoenzymatische Synthese von Glycoconjugaten mit Hilfe von Trans-Sialidase aus <i>Trypanosoma cruzi</i>) |

Beruflicher Werdegang

- | | |
|---------------------|---|
| 10/1995 bis 11/2000 | Studentische Aushilfskraft als Rettungssanitäter in der Firma G.A.R.D (Gemeinnützige Ambulanz und Rettungsdienst GmbH) in Hamburg |
| 10/1999 bis 12/2001 | Lehrbeauftragter der Universität Hamburg im chemischen Praktikum für Studenten der Medizin |
| Seit 11/2000 | Aushilfe im Rettungsdienst des Landkreis Stormarn (Rettungsdienstverbund Stormarn) |
| 01/2002 bis 03/2003 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter im SFB 470 Glycostrukturen in Biosystemen –Darstellung und Wirkung |
| Seit 04/2003 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Organisch-Chemischen Grundpraktikum für Studierende der Chemie im Nebenfach |

Publikationsliste von Björn Neubacher

(Stand Sept. 2005)

Veröffentlichungen:

1. Neubacher, B.; Schmidt, D.; Ziegelmeier, P.; Thiem, J., *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1551-1556 (Preparation of sialylated oligosaccharides employing recombinant trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*)
2. Neubacher, B.; Scheid, S.; Kelm, S.; Frasch, A. C. C.; Meyer, B.; Thiem, J., *Angew. Chem.* **2005**, eingereicht (Synthesis of Neu5Ac Oligosaccharides and Analogs by Transglycosylation and their Binding Properties as Ligands to MAG)
3. Neubacher, B.; Thiem, J., *Glycoconj. J.*, **2005**, *22*, 203 (Trans-Sialidase for Convenient Syntheses of Complex Oligosaccharides)

Vorträge:

Invited Speaker:

1. Neubacher, B.; Thiem, J.: Chemoenzymatic Syntheses of Glycoconjugates employing trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*
gehalten am 24.11.04 am Dipartimento di Chimica Organica e Biochimica, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli
2. Neubacher, B.; Thiem, J.: Trans-Sialidase for Convenient Syntheses of Complex Oligosaccharides
gehalten im Rahmen des **XVIII International Symposium on Glycoconjugates**, Florenz, 2005

Oral Presentations:

1. Neubacher, B.; Schmidt, D.; Thiem, J.; Frasch, A. C. C.: Preparation of Sialylated Oligosaccharides Employing Trans-Sialidase from *T.cruzi*
gehalten im Rahmen des **2nd German-Polish-Russian Meeting on Bacterial Carbohydrates**, Moskau, 2002
2. Scudlo, A.; Kröger, L.; Neubacher, B.; Thiem, J.: Enzymatic Sialylation of Gal β 1-3GalNAc Derivatives Leading to Bioactive Structures
gehalten im Rahmen des Meetings: **Sugars in the Synthesis of Natural Products**, Paskowka, 2005
3. Thiem, J.; Neubacher, B. Convenient Synthesis of Complex Oligosaccharides by Use of Trans-Sialidase
gehalten im Rahmen des Meetings: **Sugars in the Synthesis of Natural Products**, Paskowka, 2005

Poster-Präsentationen:

1. Neubacher, B. Thiem; J.: Synthesis of sialylated oligosaccharides following a chemo-enzymatic approach
vorgestellt im Rahmen des **Carbohydrate Workshop**, Güstrow, 2003
2. Neubacher, B. Thiem; J.: Preparation of sialylated oligosaccharides employing a chemo-enzymatic approach
vorgestellt im Rahmen des **EUROCARB 12**, Grenoble, 2003
3. Neubacher, B. Thiem; J.: Preparation of Glycoconjugates Employing Trans-Sialidase from *Trypanosoma cruzi*
vorgestellt im Rahmen des Symposiums **Glycostructures in Biosystems XIII**, Hamburg, 2004

Eidesstattliche Erklärung

04. Oktober 2005

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und verfasst habe, sowie nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Björn Neubacher