

5 Zusammenfassung

Sialyloligosaccharide spielen eine zentrale Rolle in diversen biologischen Prozessen. Zur Untersuchung dieser Funktionen ist die Synthese von Oligosaccharidsequenzen mit terminal α -glycosidisch gebundenen Sialinsäureeinheiten von großer Bedeutung, da diese Strukturen bei der Isolierung aus biologischem Material meist nur in geringer Menge und unzureichender Reinheit gewonnen werden können.

Mit klassisch-chemischen Methoden sind hier bereits in den letzten Jahren beachtliche Fortschritte erzielt worden, allerdings sind die Synthesen präparativ meist sehr aufwendig und verlaufen nur selten stereo- sowie regioselektiv und mit befriedigenden Ausbeuten. Eine in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewinnende Alternative bietet hier die enzymatische Glycosidsynthese. Neben den Sialyltransferasen bieten durch geeignete Techniken auch die Sialidasen, die *in vivo* für die Hydrolyse von Sialyloligosacchariden zuständig sind, die Möglichkeit zum Sialyltransfer auf geeignete Akzeptorsubstrate. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sialidasen aus *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, Newcastle Disease Virus sowie die Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* auf ihr Transglycosylierungspotential untersucht und eine Reihe biologisch relevanter Strukturen dargestellt.

Speziell unter dem Gesichtspunkt der Stereo- und Regioselektivität bietet die Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi* eine überzeugende Alternative zu etablierten Verfahren. Die Fähigkeit des regio-spezifischen N-Acetylneuraminsäure-Transfers konnte synthetisch zur Darstellung von zahlreichen biologisch relevanten Neu5Ac α (2–3)Gal β 1-R-Motiven genutzt werden, die bisher sowohl klassisch-chemisch als auch enzymatisch nur äußerst schwer zugänglich waren. Insgesamt zeigt die Trans-Sialidase den Sialyltransferasen vergleichbare Eigenschaften des selektiven N-Acetylneuraminsäure-Transfers, ohne daß komplexe Zuckernucleotid-Donoren eingesetzt werden müssen bei einer gleichzeitig hohen Variabilität des Aglycons an der terminalen β -Galactosyleinheit.

So konnten unter anderem die regioselektiv sialylierten T_N- und T-Antigen-Epitope [Neu5Ac α (2-3/6)GalNAc α -O-Ser/Thr bzw. Neu5Ac α (2-3/6)Gal β (1-3)GalNAc α -O-Ser/Thr] synthetisiert werden, die als tumorassoziierte Zelloberflächenstrukturen bekannt sind und unter anderem in GM₁-Glycolipiden, menschlichen Erythrozyten und in einem Knochenmark-Makrophagenlektin als terminaler Glycanteil nachgewiesen worden sind. Die Darstellung der oben genannten und analoger Oligosaccharid-Strukturen ist für immunologische

Untersuchungen und für die Entwicklung von Impfstoffen gegen tumorassoziierte Antigene von besonderem Interesse.

Desweiteren konnte durch eine Kombination klassisch-chemischer mit chemoenzymatischen Methoden sialylierte Epitope der Lacto-N-tetraose und der Lacto-N-neotetraose synthetisiert werden. Diese Pentasaccharide spielen als Hauptbestandteile der Humanmilch eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen bakterielle und virale Infektionen des Gastrointestinaltrakts von Kleinkindern.

Durch eine Thioglycosid-unterstützte Blocksynthese von transglycolytisch hergestellten Building Blocks ließen sich gezielt die Vorteile der jeweiligen Methoden nutzen und Nachteile in bezug auf Stereo- und Regioselektivität, Transfereffizienz und intermediäre Reinigungsschritte umgehen.

Schließlich konnte gezeigt werden, daß die polymerunterstützte Flüssigphasensynthese auf Polyethylenglykol eine in hohem Maße geeignete Methode zum Aufbau biologisch relevanter Glykokonjugate und ihrer Derivate mit chemoenzymatischen Glycosylierungsmethoden ist. Aufgrund des experimentellen Konzepts einer Synthese in gelöster Phase und der Aufarbeitung unter Festphasenbedingungen können sowohl die kinetischen Vorteile einer Reaktion in Lösung genutzt als auch der weitgehende Verzicht auf zeit- und arbeitsaufwendige chromatographische Reinigungsschritte erreicht werden.

5 Summary

Sialylated oligosaccharides are playing a major role in a diversity of biological processes. The growing awareness of the crucial role sialylation plays in the regulation of cellular and molecular recognition in biological systems has led to an increased interest in this area. In order to establish structure-reactivity-relationships procedures have to be developed that allow the stereoselective synthesis of terminally sialylated oligosaccharides in sufficient quantities since isolation from natural sources has proved to be less effective and excludes access to non-natural derivatives.

Despite considerable recent progress classical chemical methods lack experimental simplicity and stereospecificity. Chemoenzymatic approaches employing sialyltransferases and sialidases as synthetic tools have offered an alternative access to the family of sialylated glycostructures with excellent stereospecificity.

The concept of using the reversible nature of glycosidases for the synthesis of various oligosaccharides has reached the status of a facile procedure and found extended use as a simple, cheap and efficient glycosylation method.

The major objective of this work was to demonstrate the feasibility of the transsialylation approach for the synthesis of various sialyl oligosaccharides and to develop a versatile toolbox for regioselective sialylation procedures that allow syntheses of a wide variety of natural and non-natural sialyl oligosaccharides.

By selecting glycosidases with different regioselectivities such as *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* and Newcastle disease virus sialidase and trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* synthetic access towards the two major naturally occurring glycosylation patterns, $\alpha(2-3)$ - and $\alpha(2-6)$ -sialylation, could be achieved.

Concerning stereo- and regioselectivity, especially the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* represents a convincing alternative to established procedures. Its ability to regio-specifically transfer *N*-acetylneuraminic acid in $\alpha(2-3)$ -position to Gal β 1-R motifs has been employed to synthesize a variety of biologically relevant structures of the type Neu5Ac $\alpha(2-3)$ Gal β 1-R.

Using the described techniques a diversity of sialylated glycostructures could be synthesized including regioselectively sialylated epitopes of T- and T_N-antigen [T: Neu5Ac $\alpha(2-3/6)$ -Gal $\beta(1-3)$ GalNAc α -O-Ser/Thr, T_N: Neu5Ac $\alpha(2-3/6)$ GalNAc α -O-Ser/Thr]. These compounds

are known to be tumor-associated antigens present in glycoproteins on the surface of tumor cells. Furthermore, they have been discovered in GM₁-glycolipids, on human erythrocytes and in a bone marrow macrophage lectin. The design of synthetic and semi-synthetic oligosaccharide epitopes for immunological testing and as potential cancer vaccines is, therefore, of special interest.

By a combined classical chemical and chemoenzymatic approach sialylated lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose were synthesized. These pentasaccharides play, as major constituents of human milk, an important role in the immune response of infants against bacterial and viral infections of the gastrointestinal tract.

Building blocks, prepared by transglycosylation procedures, were coupled in a block synthesis applying thioglycoside-methods. Thus, the synthetic advantages of the respective methods could be exploited, and disadvantages with regard to stereo- and regioselectivity, transfer efficiency and intermediate purification were avoided.

It could be demonstrated that the combination of glycosidase-catalyzed transglycosylation procedures with polymer-supported solution-phase methodology on polyethylene glycol represents a simple and useful method for the synthesis of biologically relevant glycoconjugates. Based on the solubility of the polymer under reaction conditions and its insolubility during workup in various ethers, the synthetic step can be performed in aqueous solution phase whereas workup follows solid-phase procedures and, therefore, avoids time-consuming chromatographic steps.