

## 5. Zusammenfassung

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) sind angeborene Stoffwechselerkrankungen, deren Ursache in einer Störung der Biosynthese der Glycoproteine liegt. Enzymdefekte innerhalb der Synthese führen zu einer allgemeinen Hypoglycosylierung unterschiedlicher Glycoproteine. Die verschiedenen CDG-Typen werden nach der intrazellulären Lokalisierung des Enzymdefektes eingeteilt. CDG-Ia ist der am längsten bekannte und am häufigsten diagnostizierte Typ. Bei dieser Erkrankung liegt eine Defizienz des Enzyms Phosphomannomutase 2 (PMM 2) vor. Als Folge ist die Umwandlung von Mannose-6-Phosphat in Mannose-1-Phosphat und damit die Synthese von GDP-Mannose, dem wichtigsten Mannose-Donor innerhalb der Glycoproteinsynthese, gestört. Eine Therapie dieser Erkrankung wäre durch Applikation von Mannose-1-Phosphat möglich, das aber aufgrund seiner Polarität und den daraus resultierenden hydrophilen Eigenschaften nicht in der Lage ist, durch die Membran in die Zelle zu penetrieren und dementsprechend in membrangängige Derivate umgewandelt werden soll.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden lipophile Derivate von Mannose-1-Phosphat unter Einsatz bioaktiver Phosphatschutzgruppen synthetisiert. Ausgehend von durch Ester und Carbonate geschützten Mannose-Bausteinen (**7**, **8**, **9** und **10**) wurde die Phosphat-Funktion nach der Phosphoramidit-Methode in das Molekül eingeführt. Anschließende Maskierung der Phosphatgruppe mit Acetoxymethyl- (AM) und Pivaloyloxymethyl-(POM)-Funktionen als biologisch reversiblen Schutzgruppen lieferte die gewünschten, potentiell membrangängigen Mannose-1-Phosphat-Derivate (**19** – **26**).

Nach Durchtritt dieser Phosphorsäuretriester durch die Zellmembran soll der ursprüngliche Phosphorsäuremonoester durch enzymatische Spaltung der bioaktiven Phosphatschutzgruppen zurückgebildet werden. Die Ester-Funktionen am Kohlenhydrat sollen hierbei in gleicher Weise geöffnet werden, die Abspaltung der Carbonate erfolgt bei physiologischen pH-Wert auf chemischem Wege. In einer ersten Studie der Verbindung **19** wurde der enzymatische Abbau der Fettlöslichkeit vermittelnden Schutzgruppen überprüft. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl die bioaktiven Phosphatschutzgruppen als auch die Butyryl-Funktionen am Kohlenhydrat enzymatisch abgespalten werden, so daß Mannose-1-Phosphat als Zielmolekül zugänglich wird.

Des Weiteren wurden die synthetisierten Substanzen in *in vitro* Tests an menschlichen Fibroblasten eingesetzt. Hierbei wird nachgewiesen, ob die Verbindungen in der Lage sind, sich am Aufbau der für die Glycoproteinsynthese notwendigen Oligosaccharidstrukturen zu beteiligen. Die Verbindungen **25** und **26** zeigten eine überragende biologische Aktivität. Nach ihrer Zugabe kam es zu einem vollständigen Aufbau der Oligosaccharideinheiten. Auch Verbindung **19** zeigte einen positiven Effekt, denn es kam zu einer teilweisen Korrektur. Die anderen Verbindungen zeigten keinen Effekt oder ein zu geringes Löslichkeitsverhalten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Mannose-1-Phosphat-Derivate synthetisiert, die *trans*-2-Hexen-1-ol, Farnesol oder Phytol als lipophile Einheit tragen. Es kamen wiederum die Mannose-Akzeptoren (**7**, **8**, **9** und **10**) zum Einsatz. Unter Anwendung der Phosphoramidit-Methode wurden die zuvor aus Hexenol als lipophile Modellsubstanz mit den Schutzgruppen 2-Cyanoethyl (CE), Allyl (All) oder 2,2,2-Trichlorethyl (TCE) synthetisierten Phosphoramidit-Reagenzien mit den Kohlenhydrat-Bausteinen zu den entsprechenden Phosphorsäuretriester **44** - **55** verknüpft. Die Synthese der Phosphoramidit-Reagenzien mit Farnesol und Phytol als lipophile Einheit gelang nicht in allen Fällen, ebenso wie die zugehörigen Kupplungsreaktionen. Versuche zur Entfernung der Schutzgruppen wurden durchgeführt. Ein alternativer Weg zur Synthese von Mannose-1-Phosphat-Derivaten wurde mit der H-Phosphonat-Methode besprochen, wobei H-Phosphonat-Monoester mit unterschiedlich geschützten Kohlenhydrat-Bausteinen und ein Phosphorsäurediester synthetisiert wurden.

## 5. Summary

Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) are metabolic diseases caused by a congenital defect in the biosynthesis of glycoproteins. Defective enzymes participating in the biosynthesis lead to hypoglycosylation of various glycoproteins. The different CDG types have been categorised according to the location of the enzyme defect. CDG-Ia was the first CDG type to be recognised, and is also the most commonly diagnosed variation. In CDG-Ia, patients suffer from a deficiency of the enzyme phosphomannomutase 2. This results in disturbance of the transformation of mannose-6-phosphate into mannose-1-phosphate, which impedes the biosynthesis of GDP-mannose, the most important mannose donor involved in glycoprotein synthesis. Treatment of CDG-Ia patients with mannose-1-phosphate would potentially inhibit the disease, however, the polarity of mannose-1-phosphate and its hydrophilic nature prevent this compound from penetrating the cell membrane. Hence, mannose-1-phosphate must be transformed into a membrane-permeant derivative.

In the first part of this work, lipophilic derivatives of mannose-1-phosphate with bioactive phosphate protecting groups were synthesised. Beginning with the mannose building blocks **7**, **8**, **9** and **10**, protected as esters and carbonates, the phosphate function was introduced via the phosphoramidite method. Subsequent masking of the phosphate group with acetoxymethyl (AM) and pivaloyloxymethyl (POM) groups, which served as biologically reversible protecting groups, delivered the desired potentially membrane-permeant mannose-1-phosphate derivatives (**19** - **26**).

It was hoped that after these phosphoric acid triesters had crossed the cell membrane, the original phosphoric acid monoester would be reformed by enzymatic cleavage of the biologically active protecting groups. The ester function on the carbohydrate should ideally also be released enzymatically, with the cleavage of the carbonate occurring chemically at physiological pH. In an initial investigation of compound **19**, the enzymatic degradation of the protecting groups which result in fat solubility was tested. It could be shown that the bioactive phosphate protecting group and also the carbohydrate butyryl function could be cleaved enzymatically, giving the target molecule mannose-1-phosphate.

In addition, compounds **19** – **20** were tested *in vitro* in human fibroblasts. These experiments were designed to show whether or not the compounds are able to be used in the biosynthesis of the necessary oligosaccharide structures. Compounds **25** and **26** exhibited outstanding biological activity. Treatment of the human fibroblasts with these compounds lead to complete and normal oligosaccharide synthesis. Compound **19** also had a positive effect, resulting in partial correction of the defective biosynthesis. The remaining compounds either demonstrated solubility problems or had no effect.

In the second part of this work, mannose-1-phosphate derivatives with hexenol, farnesol or phytol as lipophilic units were synthesised. The mannose acceptors **7**, **8**, **9** and **10** were employed again. The phosphoramidite reagents with hexenol as the lipophilic model substance and one protecting group (2-cyanoethyl, allyl or 2,2,2-trichloroethyl) were synthesised for application to the phosphoramidite method, giving the corresponding phosphoric acid triesters **44** – **55**. The synthesis of phosphoramidite reagents with farnesol and phytol as the lipophilic moiety were not successful in all cases, nor were the subsequent coupling reactions. Attempts to remove the protecting groups were made. An alternative synthetic pathway to mannose-1-phosphate derivatives, involving the H-phosphonate method, was investigated. H-Phosphonate monoesters with various protected carbohydrate building blocks and a phosphoric acid diester could be synthesised.