

Rekombinante ganze Zellen als Katalysatoren für die enzymatische Synthese von Oligosacchariden und Glycopeptiden**

Guido F. Herrmann, Peng Wang, Gwo-Jenn Shen und Chi-Huey Wong*

Die Synthese von Oligosacchariden^[1] mit isolierten Glycosidasen^[2] und Glycosyltransferasen^[3] oder mit einer Kombination von beiden^[4] wurde in der letzten Dekade ausgiebig untersucht. Obwohl einige Glycosyltransferasen nach Klonierung und Überexpression in der organischen Synthese genutzt werden konnten^[5], ist die generelle Verwendung dieser Enzyme durch die geringe Verfügbarkeit und ihren hohen Preis limitiert. Wir berichteten über die Expression einer α -1,2-Mannosyltransferase (α -1,2-ManT) in *E. coli* XL1-Blue in einer Konzentration von ca. 1 U L^{-1} ^[6]. Das Enzym wurde zur Mannosylierung von Sacchariden und Glycopeptiden eingesetzt. Da die Isolierung der α -1,2-ManT und anderer Glycosyltransferasen schwierig und zeitaufwendig ist, haben wir ganze rekombinante *E. coli*-Zellen auf ihre Katalysatoreigenschaften untersucht. Obwohl Biotransformationen unter Verwendung ganzer Zellen, z. B. von Bäcker-Hefe^[7], breite Anwendung finden, ist kein Beispiel einer Glycosylierung mit rekombinanten Zellen bekannt. Um den Nutzen dieser Vorgehensweise zu demonstrieren, haben wir die enzymatische Mannosylierung einer Reihe von Acceptoren mit GDP-Man als Mannosyl-Donor (Abb. 1) untersucht.

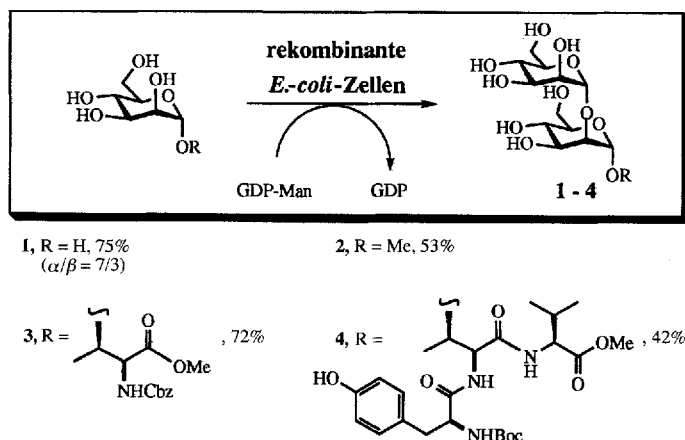


Abb. 1. Enzymatische Synthese der Disaccharide **1** und **2** sowie der Glycopeptide **3** und **4** unter Verwendung ganzer rekombinanter *E. coli*-Zellen. Man = Mannose, GDP = Guanosindiphosphat, Cbz = Benzoyloxycarbonyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl.

Die Disaccharide Man(α 1-2)Man **1** und Man(α 1-2)ManMe **2** sowie die dimannosylierten Glycopeptide Cbz- α [Man(α 1-2)Man]Thr-OMe **3** und Boc-Tyr- α [Man(α 1-2)Man]Thr-Val-OMe **4** wurden in mittlerer bis guter Ausbeute erhalten (Cbz = Benzoyloxycarbonyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl). Da keine Produktinhibierung durch das freigesetzte Guanosindiphosphat (GDP) beobachtet werden konnte, wurde auf den Zusatz von alkali-

scher Phosphatase zur Hydrolyse von GDP verzichtet. Eine mögliche Erklärung für den Mechanismus der Mannosylierung könnte eine durchlässige Zellwand von *E. coli* XL1-Blue sein, die den Transport der Substrate und der Produkte durch Diffusion oder Konvektion erlauben würde. Ein Austritt der α -1,2-ManT aus dem periplasmatischen Raum von *E. coli* in das Medium konnte ausgeschlossen werden, da keine Mannosylierungsaktivität im Medium nach der Abtrennung der Zellen festgestellt wurde.

Eine rekombinante Glycosyltransferase konnte vorteilhaft zur Synthese von Oligosacchariden und Glycopeptiden ohne die schwierige und zeitaufwendige Reinigung des Enzyms eingesetzt werden. Werden rekombinante Zellen (z. B. durch Geleinschluß^[8]) immobilisiert, ist ein Scale-up der enzymatischen Synthese von Oligosacchariden möglich. Weiterhin könnte die Verwendung von zwei oder mehr rekombinanten *E. coli*-Stämmen, die zur Expression von Glycosyltransferasen befähigt sind, eine Eintopfsynthese von Oligosacchariden ermöglichen.

Experimentelles

Kultivierung der rekombinanten *E. coli*-Zellen [ATTC Nr. 77379]. Der *E. coli*-Stamm, der das Plasmid pManlag20 beherbergt, wurde in Schüttelkolben kultiviert^[6]. Im allgemeinen wurden 2–4 g Zellen (Feuchtwert) pro Liter Medium erhalten. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren abgetrennt und das entstandene Pellet anschließend mit 10 mM HEPES-Puffer (HEPES = 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure, pH 7) einmal gewaschen. Die Zellen wurden in 50proz. (w/w) Suspension in 10 mM HEPES-Puffer (pH 7) bei -20°C gelagert. Diese Lagerung der Zellen bei -20°C hatte keinen Einfluß auf die Aktivität der α -1,2-ManT über einen Zeitraum von mehreren Monaten.

Bestimmung der Enzym-Aktivität. Die Aktivität der α -1,2-ManT wurde unter den folgenden Bedingungen bestimmt: Eine Pufferlösung, die 1 mM GDP-Man^[9], 15,6 nCi GDP-[^{14}C]-Man (Amersham, England), 100 mM ManMe, 50 mM HEPES-Puffer (pH 7.2), 0.1% Triton X, 10 mM MnCl_2 , Phosphatase-Inhibitoren^[10] (5 mM ATP, 3 mM Theophyllin, 3 mM Cimetidin) und 10 μL einer ca. 50proz. Lösung (w/w) intakter rekombinanter *E. coli*-Zellen in einem Gesamtvolumen von 40 μL enthielt, wurde 15–60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 μL eiskaltem QAE-Sephadex-A-25 in H_2O (50% (v/v)) gestoppt. Die Suspension wurde 10 min bei 10000 g zentrifugiert und 200 μL des Überstandes wurden zur Bestimmung der Radioaktivität in 10 mL Scinti Verse SX 1-4 (Fisher, USA) gegeben.

1 [11]. Zu 1.5 mL des oben beschriebenen Puffers wurden GDP-Man (24.2 mg, 20 mmol), Man (72 mg, 200 mmol) und rekombinante *E. coli*-Zellen (0.5 mL, 50% (w/w)) gegeben. Die Mischung wurde 23 h bei Raumtemperatur gerührt, und die Kontrolle der Reaktion erfolgte dünnsschichtchromatographisch (System I: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} = 6/2.5/0.25$ (v/v/v); $R_f(\text{Man}) = 0.18$, $R_f(1) = 0.08$; System II: $i\text{PrOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_3 = 7/2/1$ (v/v/v); $R_f(\text{Man}) = 0.36$, $R_f(1) = 0.26$, $R_f(\text{GDP-Man}) = 0.16$). Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen durch 15 min Zentrifugieren bei 10000 g abgetrennt. Das Pellet wurde zweimal mit je 3 mL Wasser gewaschen und die vereinigten Überstände wurden mit 40 mL MeOH versetzt und 15 min gerührt. Nach Entfernen des entstandenen Niederschlags durch 20 min Zentrifugieren bei 10000 g wurde der Überstand lyophilisiert und auf einer Biogel-P4-Säule (120 \times 4 cm, H_2O) chromatographiert. Die gewünschten Fraktionen wurden lyophilisiert und ergaben **1** in einer 71/29-Mischung (bestimmt nach $^1\text{H-NMR}$) der α - und β -Anomeren (10.3 mg, 75% Ausbeute). Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz, D_2O) ergab gute Übereinstimmung mit den publizierten Daten^[12]. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **1** belegt die α -Selektivität der α -1,2-ManT, da kein Signal einer β -mannosidischen Bindung detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen unsere Resultate mit gereinigter α -1,2-ManT^[6].

2. Die Reaktion wurde wie für **1** beschrieben mit ManMe (38.8 mg, 100 mmol) anstelle von Man als Acceptor durchgeführt. Die Mischung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt und mittels DC kontrolliert (System I: $R_f(\text{ManMe}) = 0.39$, $R_f(2) = 0.12$; System II: $R_f(\text{ManMe}) = 0.48$, $R_f(2) = 0.32$). Der Überstand wurde nach dem gleichen Aufarbeitungsschema wie für **1** erhalten und anschließend lyophilisiert. Nach chromatographischer Reinigung an Silicagel (System I) wurde **2** erhalten (7.6 mg, 53% Ausbeute). Die Befunde des $^1\text{H-NMR}$ - (500 MHz, D_2O) und des $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektren (D_2O) waren identisch mit publizierten Daten^[6]. HRMS für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_{11}\text{Cs}^+$ [$M + \text{Cs}^+$]: ber.: 489.0373; gef.: 489.0370.

3a. Zu einer Lösung von 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosylbromid (2.0 g, 4.86 mmol) in getrocknetem Dichlormethan (30 mL) wurden bei -20°C Cbz-Thr-OMe (1.3 g, 4.86 mmol), Silbertriflat (1.5 g, 1.2 Äquiv., 5.84 mmol) und Trichlylamin (0.59 g, 1.2 Äquiv., 5.84 mmol) gegeben. Die Suspension wurde bei -20°C 4 h gerührt und anschließend durch Celite filtriert. Das Filtrat wurde je zweimal mit Wasser und gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet, im Vakuum konzentriert

* Prof. Dr. C.-H. Wong, G. F. Herrmann, Dr. P. Wang, Dr. G.-J. Shen
Department of Chemistry, The Scripps Research Institute
10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Telefax: Int.: + 619/554-6731

** Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (GM 44154) gefördert. G. F. H. dankt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für finanzielle Unterstützung (Doktorandenstipendium HSP II/AUFE).

und der Rückstand an Silicagel chromatographisch gereinigt (EtOAc/Hexan = 6/1 (v/v)). Das gewünschte Produkt **3a** war ein weißes Pulver (1.9 g, 68% Ausbeute). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 1.30 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 4.00 (m, 1H), 4.06 (dd, J = 2.5, 12.5 Hz, 1H), 4.21 (dd, J = 6.0, 12.5 Hz, 1H), 4.35 (dd, J = 2.5, 6.5 Hz, 1H), 4.43 (dd, J = 2.5, 9.5 Hz, 1H), 4.82 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 4.96 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 5.21 (dd, J = 1.5, 4.5 Hz, 2H), 5.46 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.25–7.32 (m, 5H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{NMR}$ (CDCl_3): δ = 17.6, 20.4, 20.6, 52.6, 58.3, 62.1, 62.2, 65.9, 67.0, 68.2, 68.3, 69.3, 98.5, 127.7, 127.9, 128.0, 128.3, 135.7, 156.3, 169.4, 169.6, 170.3; HRMS für $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_1\text{O}_4\text{Cs}^+$ [$M + \text{Cs}^+$]: ber.: 829.1796; gef.: 829.1796.

3b. Zu einer Lösung von **3a** (300 mg, 0.28 mmol) in 20 mL wasserfreiem Methanol wurde bei 0°C 1% MeONa in wasserfreiem Methanol (ca. 500 μL) gegeben. Die Lösung wurde bei 0°C 1.5 h gerührt und anschließend mit Dowex- H^+ versetzt bis die Mischung pH 4.0 aufwies. Nach einer Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und so **3b** als eine farblose Flüssigkeit erhalten (152 mg, 82% Ausbeute). $[\alpha]_D^{20}$ = +44.11 (c = 0.045 in MeOH); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ = 1.12 (d, J = 6.0, 3H), 3.19 (m, 1H), 3.43–3.48 (m, 2H), 3.52–3.58 (m, 3H), 3.63 (s, 3H), 3.68 (dd, J = 1.5, 11.5 Hz, 1H), 4.22 (m, 2H), 4.65 (s, 1H), 5.00 (s, 2H), 7.20–7.28 (m, 5H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{NMR}$ (CD_3OD): δ = 18.9, 52.8, 60.3, 62.9, 67.9, 68.5, 72.1, 72.2, 75.1, 77.0, 103.1, 128.9, 129.0, 129.5, 138.1, 159.1, 172.6; HRMS für $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{NO}_{10}\text{Cs}^+$ [$M + \text{Cs}^+$]: ber.: 562.0073; gef.: 562.0098.

3. Zu 0.375 mL Pufferlösung, die GDP-Man (6.15 mg, 20 mM) und **3b** (4.29 mg, 20 mM) enthielt, wurden 25 μL Aceton und 10 μL 50 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gelöst in DMF gegeben. Rekombinante *E. coli*-Zellen (0.125 mL, 50% (w/w)) wurden hinzugefügt, und die Mischung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Verlauf der Reaktion wurde dünnsschichtchromatographisch kontrolliert (System I: $R_f(\text{3b})$ = 0.68, $R_f(\text{3})$ = 0.36; System II: $R_f(\text{3b})$ = 0.8, $R_f(\text{3})$ = 0.65). Das aus dem Überstand erhaltene Rohprodukt wurde an Silicagel chromatographisch gereinigt (System I) und ergab **3** (4.29 mg, 72% Ausbeute). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{NMR}$ (CD_3OD): δ = 18.7, 30.2, 30.8, 53.1, 60.4, 62.9, 63.0, 67.9, 68.5, 68.9, 71.7, 71.8, 72.4, 74.9, 75.1, 77.0, 77.3, 80.9, 101.4, 104.3, 128.9, 129.1, 129.5; HRMS für $\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{NO}_{11}\text{Na}^+$ [$M + \text{Na}^+$]: ber.: 614.2061; gef.: 614.2078.

4. Zu 0.375 mL Pufferlösung, die GDP-Man (6.15 mg, 20 mM) und **4a** (6.57 mg, 20 mM) enthielt, wurden 25 μL Aceton und 10 μL 50 mM PMSF (gelöst in DMF) gegeben. Rekombinante *E. coli*-Zellen (0.125 mL, 50% (w/w)) wurden hinzugegeben, und die Mischung wurde 17.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnsschichtchromatographisch kontrolliert (System I: $R_f(\text{4a})$ = 0.81, $R_f(\text{4})$ = 0.5). Der Feststoff, der aus den Überständen erhalten wurde, wurde an Silicagel chromatographiert (System I) und ergab **4** (3.4 mg, 42% Ausbeute). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}\text{NMR}$ (CD_3OD): δ = 18.6, 19.5, 28.7, 31.8, 38.3, 42.1, 52.7, 57.5, 58.4, 59.3, 63.0, 63.4, 68.9, 69.1, 71.8, 72.4, 75.1, 76.6, 80.5, 101.3, 101.7, 104.1, 116.2, 129.2, 131.4, 143.5, 157.2, 171.1, 173.52; HRMS für $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_{18}\text{H}^+$ [$M + \text{H}^+$]: ber.: 820.3715; gef.: 820.3710.

Eingegangen am 31. Januar 1994 [Z 6659]

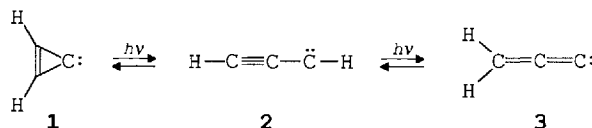
- [1] a) Y. Ichikawa, G. C. Look, C.-H. Wong, *Anal. Biochem.* **1992**, 202, 215; b) E. J. Toone, E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *Tetrahedron* **1989**, 45, 5365; c) S. David, C. Augé, C. Gautheron, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1991**, 49, 175; d) U. Korf, J. Thiem, *Kontakte (Darmstadt)* **1992** (1), 3.
- [2] a) K. G. I. Nilsson, *TIBTECH* **1988**, 6, 256; b) G. F. Herrmann, U. Kragl, C. Wandrey, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1399; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1342; c) S. Bay, A. Namane, D. Cantacuzene, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 2515–2520.
- [3] a) Y. Ichikawa, Y.-C. Lin, D. P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, K. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9283; b) C. Augé, C. Mathieu, C. Merienne, *Carbohydr. Res.* **1986**, 151, 147; c) J. Thiem, T. Wiemann, *Synthesis* **1992**, 141.
- [4] G. F. Herrmann, Y. Ichikawa, C. Wandrey, F. C. A. Gaeta, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3091–3094.
- [5] a) K. Nakazawa, K. Furukawa, H. Narimatsu, A. Kobata, *J. Biochem.* **1993**, 113, 747–753; b) C. Krezdorn, G. Watzel, R. B. Kleene, S. X. Ivanov, E. G. Berger, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 212, 113–120; c) W. Gillespie, S. Kelm, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 21004.
- [6] P. Wang, G.-J. Shen, Y.-F. Wang, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3985–3990.
- [7] a) S. M. Roberts, K. Wiggins, G. Casy, *Preparative Biotransformations: Whole Cells and Isolated Enzymes in Organic Chemistry*; Wiley, Chichester, **1992**; b) S. Servi, *Synthesis* **1990**, 1; c) R. Csuk, B. I. Glänzer, *Chem. Rev.* **1991**, 91, 49–97; d) W. Charney, H. L. Herzog, *Microbial Transformations of Steroids*; Academic Press, New York, **1967**; e) F. Zilliken, P. N. Smith, C. S. Rose, P. György, *J. Biol. Chem.* **1954**, 208, 299–305; f) F. Zilliken, P. N. Smith, C. S. Rose, P. György, *ibid.* **1955**, 217, 79–82. Zilliken et al. beschreiben die Aktivität einer β -Galactosidase mit ganzen Zellen von *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*. *N*-Acetylglucosamin wurde in 5.4% Ausbeute erhalten, wenn Lactose und *N*-Acetylglucosamin mit ganzen Zellen von *L. bifidus* unter anaeroben Bedingungen inkubiert wurden.
- [8] M. A. Mazid, *Bio/Technology* **1993**, 11, 690–695.
- [9] J. E. Heidlas, K. W. Williams, G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 307.

- [10] Zum Einsatz von Phosphatasen-Inhibitoren siehe T. Metaye, Y. Mettey, J. Lehuède, J. M. Vierfond, P. Lalegerie, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37, 4263.
- [11] Zur Synthese von **1** mit anderen α -1,2-Mannosyltransferasen siehe a) H. Ankel, E. Ankel, J. S. Schutzbach, J. C. Garancis, *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 3945–3955; b) J. S. Schutzbach, H. Ankel, *ibid.* **1971**, 246, 2187–2194; c) A. K. Verma, M. K. Raizada, J. S. Schutzbach, *ibid.* **1977**, 252, 7235–7242; d) Y.-C. Lee, C. E. Ballou, *Biochemistry* **1965**, 4, 257–264.
- [12] a) A. Allerhand, E. Berman, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 2400–2412; b) H. Kobayashi, N. Shibata, S. Konno, K. Hisamichi, S. Suzuki, *Carbohydr. Res.* **1992**, 229, 369–375.

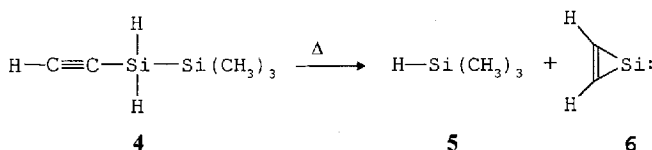
C₂H₂Si-Isomere: Erzeugung durch gepulste Blitzpyrolyse und matrixspektroskopische Identifizierung**

Günther Maier*, Hans Peter Reisenauer und Harald Pacl

Der matrixspektroskopische Nachweis^[1] der isomeren Carbene Cyclopropenyliden **1**, Propinyliden **2** und Propadienyliden **3** und ihre gegenseitigen photochemischen Umwandlungen^[1] sind in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung. Zum einen illustriert die Isolierung von **1–3** sowie die von chlorierten^[2] und fluorierten^[3] Derivaten das Potential der Matrixisolationsspektroskopie. Zum anderen unterstreicht der auf dem Vergleich von gefundenen und berechneten IR-Spektren basierende Strukturwettbewerb dieser Spezies die Notwendigkeit, quantenchemische Rechnungen gleichberechtigt mit den spektroskopischen Messungen einzusetzen. Zudem sind die Reaktionen $\text{1} \rightleftharpoons \text{2} \rightleftharpoons \text{3}$ exemplarische Fälle für Carben/Carben-Umlagerungen, eine Reaktionsklasse, für die es bisher kaum Beispiele gibt. Nicht zuletzt spielen **1**^[4] und **3**^[5] eine maßgebliche Rolle in der Chemie der interstellaren Wolken^[6].



Nach Rechnungen von H. F. Schäfer et al.^[7] sollte **6** die stabilste C₂H₂Si-Spezies sein. In Einklang damit wird **6** als das Produkt der Assoziation von Si-Atomen an Acetylen diskutiert^[8,9]. Nach H. Schwarz et al.^[10] läßt sich bei der Ionisation von Chlortrimethylsilan in der Gasphase mit der Neutralisations-Reionisations-Massenspektroskopie ein Teilchen nachweisen, dessen Konnektivitäten für Struktur **6** sprechen.



[*] Prof. Dr. G. Maier, Dr. H. P. Reisenauer, Dipl.-Chem. H. Pacl
Institut für Organische Chemie der Universität
Heinrich-Buff-Ring 58, D-35392 Gießen
Telefax: Int. + 641/702-5712

[**] Hetero- π -Systeme, 20. Mitteilung. Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. – 19. Mitteilung: [17].