

## Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 1)\*\*

C.-H. Wong\*, Randall L. Halcomb, Yoshitaka Ichikawa und Tetsuya Kajimoto

Die auf Zelloberflächen anzutreffenden Saccharide sind Informationsträger auf molekularer Ebene. Obwohl sich Säugetiere normalerweise auf die Verwendung von nur sieben oder acht Monosaccharidbausteinen beschränken, ist wegen der Multifunktionalität dieser Monomere der Aufbau einer schier unbegrenzten Zahl komplexer Strukturen möglich. So können beispielsweise mehrere Millionen topologisch unterschiedlicher Tetrasaccharide aus diesen wenigen Monosacchariden entstehen, wenn man die Art der Verzweigung, die Konfiguration des glycosidischen C-Atoms und Modifikationen der Hydroxy- und Aminogruppen in Betracht zieht. Oligosaccharide sind daher in der Lage, effizient die riesigen Datenmengen zu kodieren, die für biologische Erkennungs-

prozesse, von interzellulärer Kommunikation über Signalübertragung, Zelladhäsion, Infektion und Zelldifferenzierung bis hin zu Zellentwicklung und Metastase, benötigt werden. Trotz dieser zentralen Bedeutung ist die Entwicklung von pharmazeutischen Anwendungen dieser Substanzklasse verglichen mit der anderer Biomoleküle sehr langsam. Ein Grund dafür ist, daß Techniken zur Untersuchung komplexer Kohlenhydrate fehlen. So können Oligosaccharide weder für die Sequenzanalyse amplifiziert werden, noch gibt es eine Methode für ihre automatisierte Synthese. Darüber hinaus tragen die möglicherweise geringe Bioverfügbarkeit von Oligosacchariden und Schwierigkeiten bei ihrer Produktion in technischem Maßstab zweifellos nicht dazu bei, die Entwick-

lung zu beschleunigen. Die hier beschriebenen enzymatischen und chemoenzymatischen Methoden, besonders die unter Verwendung von Aldolasen und Glycosyl-Transferasen, erscheinen geeignet für die Synthese von Mono- und Oligosacchariden sowie verwandten Verbindungen. Es steht zu erwarten, daß weitere Fortschritte in der Glycobiologie neue Methoden eröffnen werden, mit denen die molekulare Erkennung bei Kohlenhydraten untersucht und bioaktive Saccharide und Saccharidmimetica zur gezielten Beeinflussung eben jener Erkennungsprozesse synthetisiert werden können.

**Stichworte:** Enzyme · Kohlenhydrate · Organische Synthese

Jüngste Fortschritte im Bereich der synthetischen Organischen Chemie haben den stereokontrollierten Zugang zu vielen organischen Verbindungen erschlossen. Man sieht sich in der organischen Synthese nunmehr zwei neuen Herausforderungen gegenüber: erstens dem Design von neuen Verbindungen für die Anwendung in den Bio- und Materialwissenschaften und zweitens der Entwicklung ökonomischer und umweltverträglicher Syntheseverfahren. Enzyme können zur Lösung beider Probleme beitragen und werden zunehmend als nützliche Katalysatoren in der organischen Synthese betrachtet. Zahlreiche enzymatisch katalysierte Verfahren, besonders solche unter Verwen-

dung von hydrolytischen Enzymen wie Lipasen, Esterasen und Amidasen, wurden entwickelt und gehören mittlerweile zum Handwerkszeug in der organischen Synthese. Neue Fortschritte in der enzymatischen Synthese haben den Nutzen dieser Verfahren noch erweitert und auch andere komplexe Reaktionstypen erschlossen. Dazu gehören Redoxreaktionen, die Knüpfung von C-C-Bindungen, Glycosylierungen und Gruppentransferreaktionen, die sich mit konventionellen Methoden schwer oder gar nicht durchführen lassen. Äußerst vielversprechend sind Enzyme für die Synthese von wasserlöslichen, polyfunktionellen organischen Molekülen, besonders Kohlenhydraten und verwandten Substanzklassen. Konventionelle Verfahren für die Herstellung solcher Verbindungen beinhalten den wiederholten Einsatz von Schutzgruppen und weisen das Problem unzureichender Stereokontrolle auf. Die hohe Regio- und Stereoselektivität sowie die milden Reaktionsbedingungen von enzymkatalysierten Reaktionen eröffnen neue Möglichkeiten, viele Schwierigkeiten bei der Synthese von Kohlenhydraten zu meistern. Das gilt besonders für Synthesen in größerem Maßstab. Dieser Aufsatz beschäftigt sich mit dem Einsatz enzymatischer und chemoenzymatischer Methoden in der Synthese von einfacheren

[\*] Prof. Dr. C.-H. Wong, D. R. L. Halcomb  
Department of Chemistry, The Scripps Research Institute  
10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)  
Telefax: Int. + 619/554-6731

Prof. Dr. Y. Ichikawa  
Department of Pharmacology and Molecular Sciences  
The Johns Hopkins University, Baltimore (USA)  
Dr. T. Kajimoto  
Frontier Research Program on Glycotechnology  
The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Wako City (Japan)

[\*\*] Teil 2: *Angew. Chem.* **1995**, *107*, Nr. 5; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, Nr. 5.

chen und komplexen Sacchariden einschließlich verwandter Verbindungen sowie mit deren Anwendung bei der Untersuchung von biologischen Erkennungsprozessen, die durch Kohlenhydrate vermittelt werden.

## 1. Die derzeitige Lage der enzymatischen organischen Synthese

Zu den Charakteristica von Enzymen, die ihren Einsatz in der Synthese erschwert haben, gehören geringe Stabilität, hohe Preise, schwierige Handhabung und enge Substratspezifität. Folglich war die Anwendung von Enzymen traditionell auf die Analytik und Synthese kleiner Mengen an Biochemikalien beschränkt. Diese Sichtweise hat sich jedoch in den letzten zehn Jahren dank neuer Entwicklungen in Chemie, Biologie und Verfahrenstechnik dramatisch geändert. Eine große Zahl bekannter und neuer Enzyme (Tabelle 1) sind für die Umsetzung natürlicher und nichtnatürlicher Substrate zu synthetisch nützlichen Zwischen- und Endprodukten genutzt worden. Techniken auf der Grundlage rekombinanter DNA ermöglichen es, Enzyme

kostengünstig herzustellen und ihre Eigenschaften gezielt zu beeinflussen. Die vielleicht vielversprechendsten Anwendungen der enzymatischen Katalyse liegen im Bereich der asymmetrischen Synthese definierter Verbindungen für den Einsatz in Biologie, Medizin und Landwirtschaft<sup>1-51</sup>.

Die biologische Aktivität der meisten Wirkstoffe beruht auf ihrer Fähigkeit in die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand oder zwischen Enzym und Substrat einzugreifen. Die gezielte Entwicklung von neuen Arzneimitteln setzt das Design, die Synthese und die Untersuchung einer Vielzahl von Enzymsubstraten, Inhibitoren und Liganden voraus, die sich mit klassischen Methoden wahrscheinlich nur schwer handhaben lassen. Angesichts der möglichen Vorteile der Enzymkatalyse bei der Synthese von Kohlenhydraten sowie eines zunehmenden ökologischen Bewußtseins und der Auflagen für die chemische und pharmazeutische Industrie von Seiten des Gesetzgebers ist die enzymatische organische Synthese besonders attraktiv, da sie saubere und milde Verfahren zur Herstellung von Materialien mit hoher optischer Reinheit anbietet.

Von großer Bedeutung ist die Frage, ob der Einsatz eines Enzyms in einer Synthese angebracht ist. Häufig sind enzymati-

Chi-Huey Wong studierte Chemie an der National Taiwan University und promovierte 1982 am Massachusetts Institute of Technology bei G. M. Whitesides. Nach einem einjährigen Postdoktorandenaufenthalt an der Harvard University lehrte er als Professor für Chemie sechs Jahre an der Texas A & M University. Seit 1989 ist er Ernest-W.-Hahn-Professor am Scripps Research Institute. Weiterhin ist er Leiter des Frontier Research Program on Glycotechnology am RIKEN-Institut in Japan. Seine Forschungsinteressen sind die bioorganische und synthetische Chemie, besonders der Einsatz von Enzymen für die organische Synthese und das Design neuer Enzyminhibitoren und Rezeptoren. Er wurde unter anderem mit Auszeichnungen als Presidential Young Investigator in Chemistry, Searle Scholar in Biomedical Sciences und A. C. Cope Scholar der American Cancer Society geehrt und erhielt den International Carbohydrate Award. Er ist Autor von mehr als 250 Veröffentlichungen, 30 Patenten und einem Buch.



C.-H. Wong



R. L. Halcomb



Y. Ichikawa



T. Kajimoto

Randall L. Halcomb, geboren 1965, studierte an der University of Alabama und promovierte 1992 an der Yale University bei S. J. Danishefsky. Danach verbrachte er zwei Jahre als Stipendiat der American Cancer Society am Scripps Research Institute. Seit Juni 1994 ist er Assistant Professor of Chemistry an der University of Colorado. Seine Forschungsinteressen gelten der Synthese und Untersuchung von biologisch aktiven Naturstoffen und komplexen Kohlenhydraten.

Yoshitaka Ichikawa wurde 1954 in Tokio geboren. Er studierte und promovierte (1986) an der University of Tokyo. Danach war er Postdoctoral Associate an der Johns Hopkins University und am Scripps Research Institute. Zur Zeit ist er Assistant Professor of Pharmacology and Molecular Sciences an der Johns Hopkins Medical School. Er interessiert sich für die Synthese und biologische Untersuchung von komplexen Kohlenhydraten.

Tetsuya Kajimoto wurde 1960 in Osaka geboren. Er promovierte 1989 bei K. Fuji an der Kyoto University. Nach einem Jahr als Assistant Professor an der Kumamoto University verbrachte er einen zweijährigen Postdoktorandenaufenthalt am Scripps Research Institute. Seit 1991 ist er stellvertretender Leiter des Frontier Research Program on Glycotechnology am RIKEN-Institut in Japan. Seine Forschung konzentriert sich auf die Entwicklung neuer Methoden für die Untersuchung von biologischen Erkennungsprozessen, die durch Kohlenhydrate bestimmt werden, und auf die Synthese von Inhibitoren für solche Prozesse.

Tabelle 1. In der organischen Synthese häufig verwendete Enzyme.

Enzyme, die keinen Cofaktor benötigen	Enzyme, die keine zugesetzten Cofaktoren benötigen	Enzyme, die Cofaktoren benötigen (Cofaktoren) [a]
1) Hydrolytische Enzyme:	1) Flavoenzyme: Esterasen Lipasen Amidasen Phospholipasen Epoxid-Hydrolasen Nucleosid-Phosphorylase SAM-Synthetase	1) Kinasen (ATP) 2) Oxidoreduktasen (NAD(P)(H)) 3) Methyl-Transferasen (SAM)
2) Isomerasen und Lyasen:	2) Pyridoxalphosphat-Enzyme: Transaminasen Tyrosinase $\delta$ -Aminolevulinsäure-Dehydratase Cystathionin-Synthetase	4) CoA-benötigende Enzyme 5) Sulfuryl-Lyasen (PAPS)
3) Aldolasen	3) Metalloenzyme: Galactose-Oxidase Monooxygenasen Dioxygenasen Hydrogenasen Enoat-Reduktasen	
4) Glycosyl-Transferasen	4) Aldolasen Carboxy-Lyasen Nitril-Hydrolase	
5) Glycosidasen	4) Thiaminpyrophosphat-Enzyme: Decarboxylasen Transaldolasen	
	5) andere: SAH-Hydrolase Vitamin-B <sub>12</sub> -abhängige Enzyme PQQ(Methoxatin)-Enzyme Oxynitrilasen	

[a] ATP = Adenosin-5'-triphosphat, NAD(P) = Nicotinamidadenindiphosphat (3'-phosphat), SAM = S-Adenosylmethionin, PAPS = 3'-Phosphoadenosyl-5'-phosphosulfat.

sche Umsetzungen lediglich eine – möglicherweise verbesserte – Alternative zu bestehenden chemischen Prozessen, deren Verdrängung durch Enzyme fraglich ist. In einigen Fällen ist das enzymatische Verfahren jedoch kostengünstiger und klassischen Methoden klar überlegen. So gibt es beispielsweise zur Manipulierung von DNA außer dem Verfahren mit DNA-Ligasen und Restriktions-Endonukleasen keine Alternative. Mehrere enzymatische Prozesse, die im industriellen Maßstab durchgeführt werden, haben gezeigt, daß sich Enzyme in der Produktion von Gebrauchs- und Feinchemikalien sowie Medikamenten einsetzen lassen. Dazu zählen die Enantiomerentrennung von Aminosäuren mit Acylase, die Produktion von Maisirup mit hohem Fructosegehalt (für die Getränkeindustrie) durch Gluco-Amylase und Gluco-Isomerase, die Umwandlung von Schweine-Insulin in menschliches durch Trypsin, die Herstellung von Penicillinanaloga durch Penicillin-Acylase, die Synthese des Süßstoffs Aspartam mit Thermolysin und die Herstellung von Acrylamid aus Acrylnitril mit Nitril-Hydrolase. Auch bei der Synthese und Modifizierung von Mono-, Oligo- und Polysacchariden sowie ihren Konjugaten und Analoga, bei der Modifizierung von rekombinaten DNA-Produkten wie Glycoproteinen und allgemein bei der regioselektiven Umsetzung anderer komplexer Moleküle können Enzyme von unschätzbarem Wert

sein. Es sollte allerdings betont werden, daß für die Herstellung kleiner Substanzmengen (im Milligrammbereich) die Entwicklung eines enzymatischen Syntheseweges in der Regel zu aufwendig und hier die klassische chemische Synthese vorzuziehen ist. Werden hingegen größere Mengen benötigt, lohnt sich der Aufwand, geeignete Enzyme zu entwickeln.

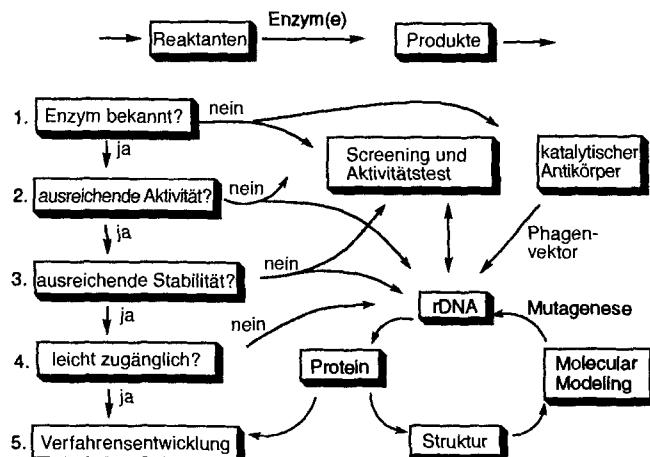
Sobald die Entscheidung für ein enzymatisches Verfahren getroffen worden ist, beginnt man mit der Auswahl von einem oder mehreren für diesen Reaktionstyp geeigneten Enzymen und optimiert die Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH, Lösungsmittel, Regulatoren, Schutzgruppen). Eine Reihe von Enzymen sind bereits im Handel erhältlich, und viele weitere können leicht isoliert werden. Als nächstes ist zu bestimmen, ob das Enzym die für die Umsetzung benötigte Aktivität aufweist. Dabei müssen sowohl Selektivität als auch spezifische Aktivität berücksichtigt werden. Die Aktivität eines Enzyms wird oft in U (units) angegeben: 1 U eines Enzyms synthetisiert 1  $\mu$ mol Produkt pro Minute bei maximaler Umsatzgeschwindigkeit; die Zahl von Units pro Milligramm Enzym ist die spezifische Aktivität des Enzyms. Wenn die spezifische Aktivität zu niedrig ist, ist die benötigte Enzymmenge unrealistisch groß. In diesem Fall steht man vor der Wahl, entweder ein aktiveres Enzym einzusetzen, ein anderes Enzym durch Screening zu suchen oder durch ortsspezifische Mutagenese zu entwickeln oder aber das Projekt zugunsten eines klassischen chemischen Ansatzes aufzugeben. Ähnliche Überlegungen sind auch hinsichtlich der Selektivität anzustellen.

Wenn Selektivität und spezifische Aktivität für praktische Zwecke ausreichen, sind die verbleibenden Schritte relativ einfach. Ein Verfahren, das Enzym für Synthesen im Labormaßstab in ausreichender Weise zu stabilisieren, ist normalerweise leicht zu finden. Am einfachsten ist es, das Enzym zu immobilisieren; sollte dies nicht möglich sein, kann ohne weiteres das freie Enzym homogen in Lösung verwendet werden. Unter Umständen kann auch durch ortsspezifische oder ungerichtete Mutagenese die Stabilität erhöht werden. Anschließend kann das Enzym in großen Mengen durch Techniken auf der Grundlage von rekombinanter DNA gewonnen werden. Sobald alle kinetischen Parameter (z.B. die Geschwindigkeitskonstante  $k_{\text{kat}}$ , die Michaelis-Konstante  $K_M$ , die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung des Enzyms) bestimmt sind, steht der Synthese in großem Maßstab nichts mehr im Wege. Für den Fall, daß für eine bestimmte Umsetzung kein Enzym bekannt ist, ist die Suche nach einem geeigneten Enzym schwieriger und die chemische Synthese möglicherweise vorzuziehen. Bei wichtigen Umwandlungen kann sich jedoch ein Screening oder die Entwicklung eines katalytischen Antikörpers<sup>[16]</sup> lohnen. Sobald ein aus Aminosäuren aufgebauter Katalysator gefunden worden ist, können dessen Stabilität und Aktivität wie beschrieben erhöht werden. Ein nützliches Verfahren zum Screening von Proteinen auf Katalysatoreigenschaften ist deren Expression auf der Oberfläche eines Phagen<sup>[17]</sup>. Die in den letzten Jahren entdeckten katalytischen Ribonucleinsäuren haben eine neue Dimension in der Biokatalyse eröffnet, und proteinfreie Biokatalysatoren auf RNA-Basis stehen mittlerweile als synthetische Katalysatoren zur Verfügung<sup>[18]</sup>. In Tabelle 2 ist der augenblickliche Status der enzymatischen Katalyse zusammengefaßt. Die strategische Vorgehensweise zur Entwicklung von enzymatischen Katalysatoren für bestimmte Reaktionen ist in Schema 1 dargestellt. Zwar sind Biokatalysatoren eine vielseitige und

Tabelle 2. Entwicklungsstand der enzymatischen Katalyse.

gelöste Probleme	gegenwärtige Forschungsaufgaben	noch ungelöste Probleme
Immobilisierung	Entwicklung neuer Anwendungen von Enzymen im Labormaßstab	Design und Entwicklung neuer Enzymkatalysatoren
Regenerierung des Cofaktors (NAD(P), ATP, CoA, Zuckernucleotide)	Design nichtnatürlicher Substrate	chemoenzymatische Synthese von komplexen Verbindungen
Enzym-Desaktivierung (Thiol-Oxidation, Wirkung von Proteasen)	Verwendung organischer Lösungsmittel (Ein- und Zweiphasensysteme)	Entwicklung von Multienzymsystemen durch gezielte Veränderung von Metabolismuswegen
Verwendung rekombinanter DNA für die Produktion von Enzymen in großem Maßstab	Enzymstabilisierung Vermeidung der Produktinhibierung Regenerierung des Cofaktors (PAPS, SAM) Beeinflussung der Enzymaktivität und halbsynthetische Enzyme Mutagenese zur Veränderung von Enzymeigenschaften Suche nach Enzymen aus neuen Spezies für die Verwendung in der Synthese Scale-up pharmazeutisch wichtiger Synthesen mit Enzymen Entwicklung von Multienzymsystemen für die Synthese Anwendungen zur Synthese von Fein- und Spezialchemikalien Entwicklung von katalytischen Antikörpern	neue Katalysatoren aus monoklonalen Fab-Fragmenten

nützliche neue Klasse von Katalysatoren für asymmetrische Synthesen, doch bleibt ihre Verbesserung oder Veränderung durch ortsspezifische Mutagenese ein schwieriges Unterfangen. Dessen ungeachtet werden Chemiker, die Biokatalysatoren einsetzen und entwickeln, einen klaren Vorteil haben, wenn es darum geht, die neue Generation von Syntheseproblemen an der Grenze zwischen Biologie und Chemie anzugehen.



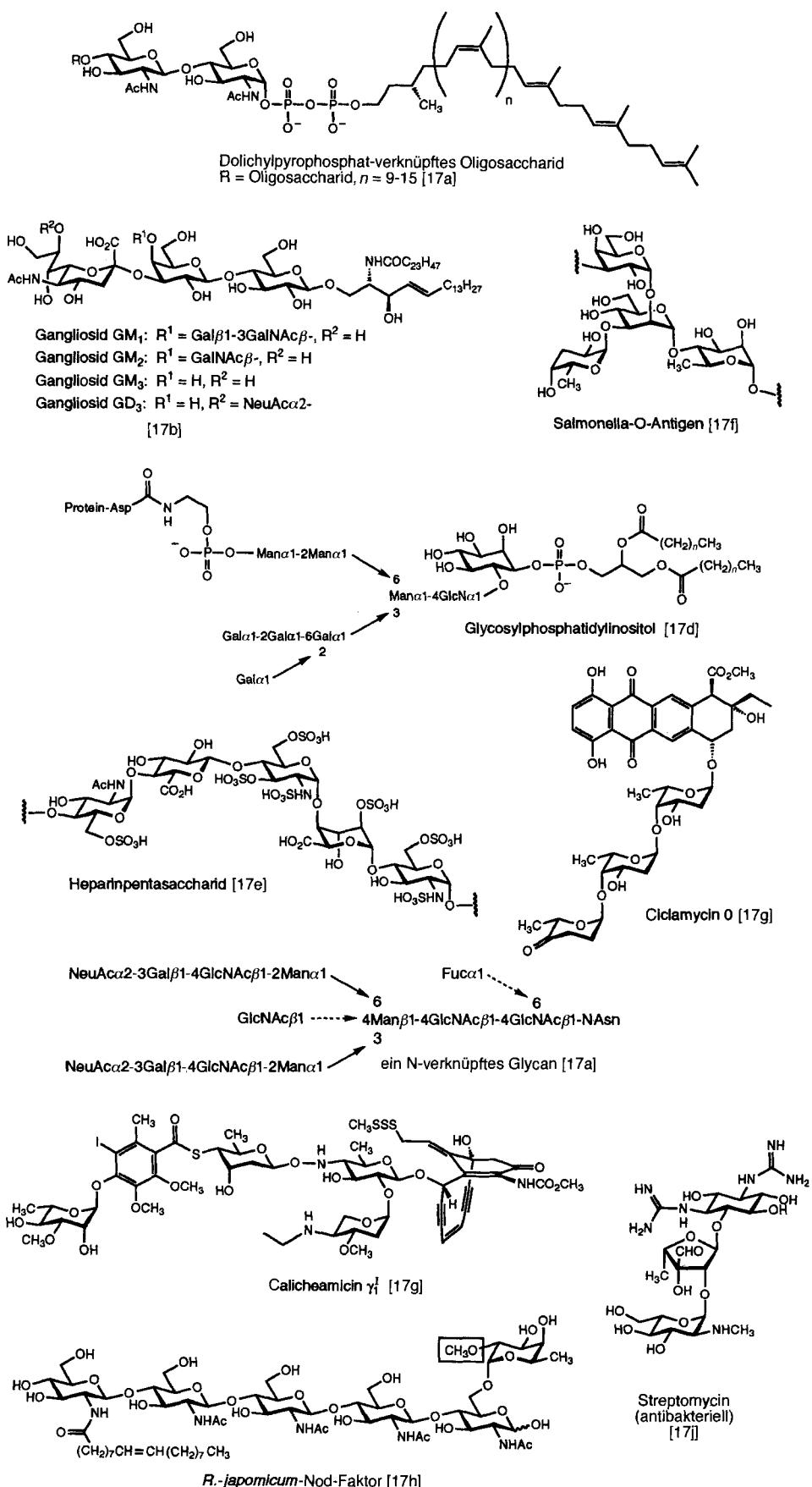
Schema 1. Strategie zur Entwicklung enzymatischer Katalysatoren. Ist das Enzym für die Katalyse einer bestimmten Umsetzung bekannt, kann seine Spezifität, spezifische Aktivität und Stabilität durch Protein engineering oder Screening verbessert werden. Ist das Enzym nicht bekannt, kann man es durch Screening finden oder gezielt einen katalytischen Antikörper entwickeln und durch Protein engineering verbessern (nach Lit. [5]).

## 2. Enzymatische Katalyse in der Glycobiologie

Komplexe Kohlenhydrate und deren Konjugate haben in biologischen Systemen entweder eine Rolle als Struktur- oder als Informationsträger. Auf der Zelloberfläche anzutreffende Oligosaccharidbestandteile von Glycokonjugaten sind an unterschiedlichen biochemischen Erkennungsprozessen beteiligt<sup>[9, 10]</sup>. Dazu gehören Wachstum, Entwicklung, Immunabwehr, Infektion, Zelladhäsion, Metastase und Signalübertragung. Oft gibt es von diesen Verbindungen nur winzige Mengen, was ihre Isolierung und Charakterisierung schwierig gestaltet. Die Synthese von ausreichenden Substanzmengen für biologische Untersuchungen und die Ermittlung des medizinischen Nutzens ist mühsam. Obwohl Säugetiere in der Regel nur sieben oder acht Monosaccharidbausteine verwenden<sup>[11]</sup>, ist wegen der Polyfunktionalität dieser Monomere der Aufbau einer Vielzahl von äußerst komplexen Strukturen möglich. So können beispielsweise mehrere Millionen unterschiedlicher Tetrasaccharide aus dieser begrenzten Zahl von Monosacchariden entstehen, wenn man den Ort der Verknüpfung, die Konfiguration des glycosidischen C-Atoms und mögliche Modifikationen in Betracht zieht. Oligosaccharide sind daher in der Lage, effizient die riesigen Datenmengen zu kodieren, die für biologische Erkennungsprozesse benötigt werden. Die an der Biosynthese und am Abbau der Oligosaccharide beteiligten Enzyme, z.B. Glycosidasen, sind wertvolle Reagenzien für die Strukturbestimmung<sup>[12]</sup> und werden außerdem zusammen mit den für die Knüpfung von glycosidischen Bindungen verantwortlichen Enzymen, z.B. Glycosyl-Transferasen, für die Saccharidsynthese eingesetzt<sup>[13, 14]</sup>. Da diese Glycoenzyme möglicherweise bei Stoffwechselkrankheiten eine Rolle spielen, sind sie zudem interessante Ziele für die Entwicklung von Inhibitoren<sup>[15, 16]</sup>. Schema 2 zeigt einige natürlich vorkommende Kohlenhydrate und Glycokonjugate mit wichtiger, biologischer Aktivität<sup>[17]</sup>. Einige dieser Verbindungen weisen ungewöhnliche glycosidische Bindungen oder Modifizierungen (z.B. Sulfatierung, Methylierung) auf, für die noch keine enzymatischen Synthesewege ausgearbeitet worden sind. Angeichts der Komplexität und Polyfunktionalität dieser Strukturen bleibt die Synthese dieser Substanzen – einschließlich verwandter Verbindungen und Mimetica – eine Herausforderung. Im folgenden beschreiben wir mehrere enzymatische Reaktionstypen, die in Kombination mit einfachen chemischen Umsetzungen einen Zugang zu dieser Substanzklasse eröffnen.

## 3. Synthese von Monosacchariden und verwandten Verbindungen mit Aldolasen

Die mehr als zwanzig heute bekannten Aldolasen katalysieren üblicherweise die stereospezifische Aldolkondensation eines Aldehydacceptors und eines Ketondonors. Man unterscheidet zwei Formen: Typ-I-Aldolasen, die hauptsächlich in Tieren und höheren Pflanzen vorkommen, benötigen kein Metall-Ion als Cofaktor. Die vorwiegend in Mikroorganismen verbreiteten Typ-II-Aldolasen weisen ein als Lewis-Säure agierendes  $Zn^{2+}$ -Atom im aktiven Zentrum auf. Beide Typen akzeptieren ein beachtliches Spektrum nichtnatürlicher Aldehyde als Substrate, und oft ist die Stereoselektivität der Reaktion durch das Enzym festgelegt und kann vorhergesagt werden. In Tabelle 3 sind die



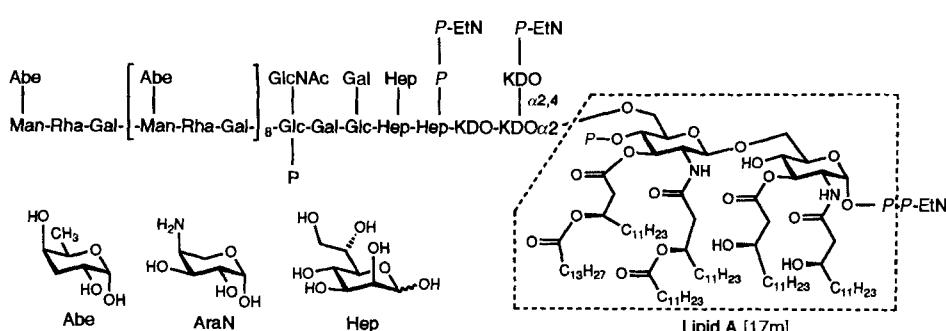
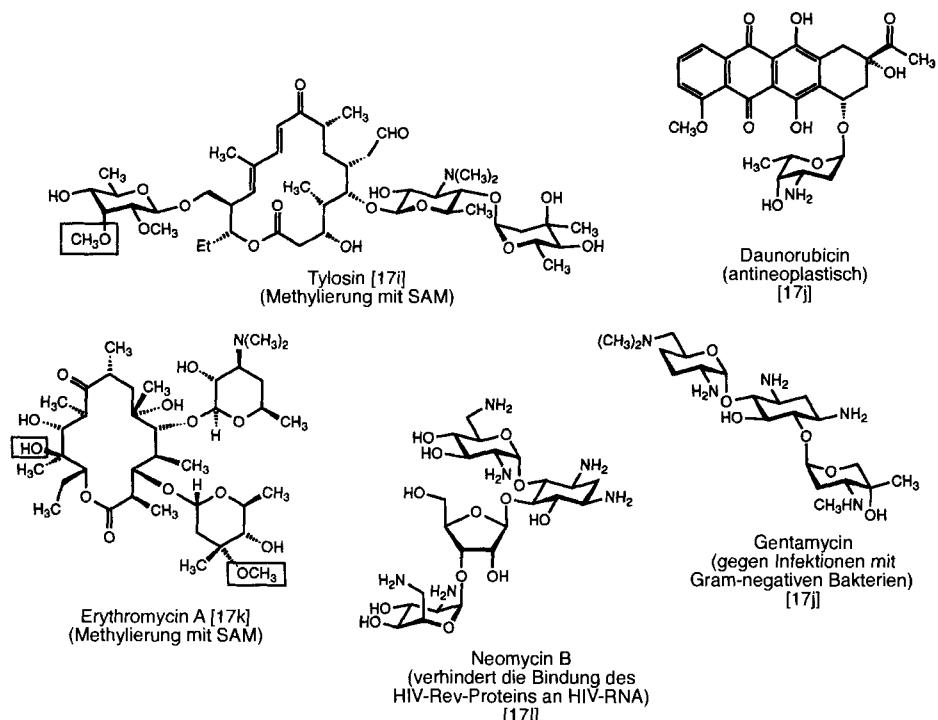
bisher untersuchten Aldolasen aufgelistet. Die Pfeile kennzeichnen die an der Reaktion beteiligte C-C-Bindung. Aldolasen haben sich in der Synthese sowohl von gängigen als auch von ungewöhnlichen Monosacchariden als nützlich erwiesen, und einige instruktive Beispiele sollen hier besprochen werden.

### 3.1. Fructose-1,6-diphosphat-(FDP)-Aldolase [EC 4.1.2.13]

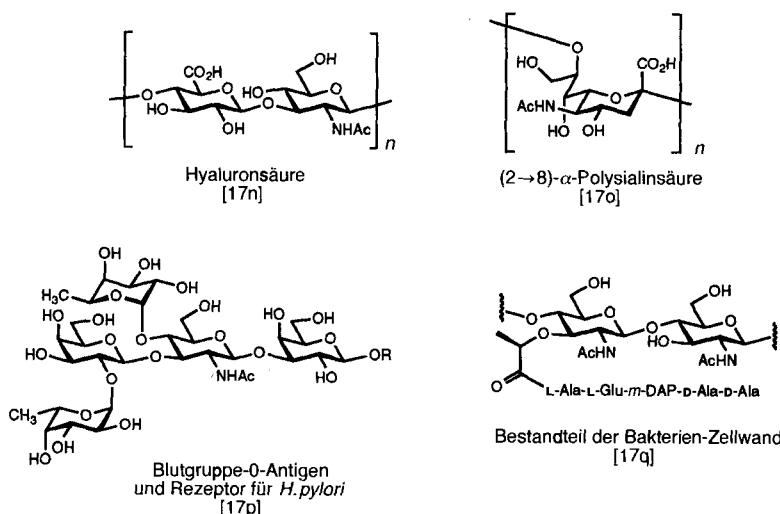
FDP-Aldolase katalysiert die reversible Aldolreaktion von Dihydroxyacetophosphat (DHAP) und D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) zu D-Fructose-1,6-diphosphat (FDP). Das Gleichgewicht liegt mit  $K_{\text{aq}} \approx 10^4 \text{ M}^{-1}$  auf der Seite des Kondensationsproduktes FDP (siehe Schema 3). Enzyme beider Formen wurden aus Eukaryoten und Prokaryoten isoliert. Die mechanistischen Untersuchungen wurden zumeist mit FDP-Aldolasen aus Kaninchen (Rabbit Muscle Aldolase, RAMA)<sup>[18]</sup> oder Hefe<sup>[19]</sup> durchgeführt. Wie die Kristallstruktur (2.7 Å)<sup>[20]</sup> von RAMA zeigt, bildet Lys-229 eine Schiff-Base mit DHAP<sup>[21]</sup>. Im aktiven Zentrum beträgt der Abstand zwischen dem Iminostickstoffatom der Schiff-Base und der Phosphatgruppe von G3P-Berechnungen zu folge 8.3 Å<sup>[22]</sup>. Ein zweiter Lysinrest im aktiven Zentrum (Lys-107) ist etwa 8.9 Å von der Schiff-Base entfernt<sup>[20]</sup> und stabilisiert wahrscheinlich die negativ geladene Phosphatgruppe in G3P (Schema 3). RAMA ist kloniert und überexprimiert worden, und durch ortspezifische Mutagenese wurde gezeigt, daß auch Asp-33 an der Katalyse beteiligt ist<sup>[23]</sup>.

Aldolasen des Typs I liegen normalerweise als Tetramere ( $M_r \approx 160$ ), die des Typs II als Dimere ( $M_r \approx 80$ ) vor. Die Sequenzen aller bekannten Typ-I-Enzyme sind in hohem Maße homolog (> 50%), und die Sequenz ihres aktiven Zentrums wurde im Laufe der Evolution erhalten<sup>[20]</sup>. Deutliche Unterschiede bestehen im C-terminalen Bereich und könnten für die Substratspezifität verantwortlich sein<sup>[20]</sup>. Einige Typ-I-Aldolasen sind im Handel erhältlich und

Schema 2. Biologisch aktive Kohlenhydrate und Glykokonjugate. SAM = S-Adenosylmethionin, DAP = Diaminopimelinsäure (Fortsetzung siehe nächste Seite).



Lipopolysaccharid: Abe = Abequose; Rha = Rhamnose; Hep = L-Glycero-D-manno-heptose; AraN = 4-Amino-L-arabinose; KDO = 2-Keto-3-desoxy-D-manno-octulosonsäure; P = Phosphat; EtN = Ethanolamin



Schema 2. (Fortsetzung)

weisen eine brauchbare spezifische Aktivität auf (ca. 60 U mg<sup>-1</sup>). Trotz einer freien Thiolgruppe im aktiven Zentrum sind sie nicht allzu oxidationsempfindlich. Die Halbwertszeit des freien Enzyms von etwa 2 Tagen bei pH = 7.0<sup>[24]</sup> kann durch Immobilisierung oder Einschluß in eine Dialysemembran verlängert werden<sup>[25]</sup>. Ebenfalls kommerziell erhältlich ist die Typ-II-Aldolase aus Hefe. Die Klonierung und Überexpression weiterer mikrobiischer Aldolasen wurde kürzlich beschrieben<sup>[24, 26-28]</sup>. Besonders stabil ist das Enzym aus *E. coli* (Halbwertszeit 60 Tage in 0.3 mM Zn<sup>2+</sup>-Lösung, pH = 7), das keine freie Thiolgruppe im aktiven Zentrum aufweist<sup>[24]</sup>. Interessanterweise haben das Enzym aus *E. coli* (Typ II) und RAMA (Typ I) trotz einer sehr geringen Sequenzhomologie fast dieselbe Substratspezifität.

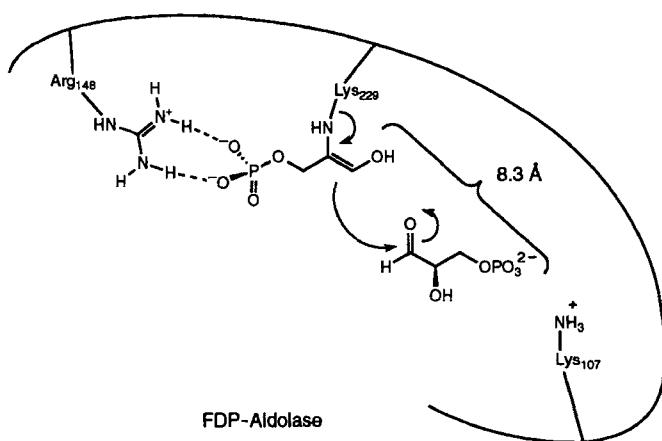
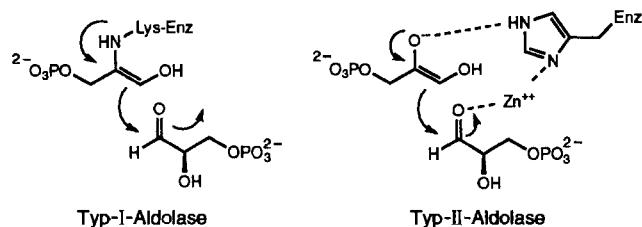
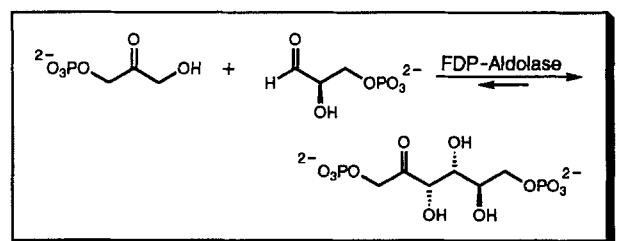
Zur Zeit ist FDP-Aldolase, besonders RAMA, die am meisten benutzte Aldolase in der organischen Synthese. Das Enzym toleriert ein breites Spektrum von Aldehydacceptoren als Kondensationspartner von DHAP. Die Produkte sind (3S,4R)-Diöle, was einer D-threo-Konfiguration entspricht<sup>[22, 24, 25, 29-57]</sup>. Geeignete Acceptoren sind ungehinderte, aliphatische Aldehyde<sup>[25]</sup> sowie Mono-saccharide und deren Derivate<sup>[39]</sup>. Phosphorylierte Aldehyde reagieren schneller als die entsprechenden nicht-phosphorylierten Verbindungen<sup>[39]</sup>. Aromatische,  $\alpha, \beta$ -ungesättigte und sterisch gehinderte, aliphatische Aldehyde reagieren nicht<sup>[25]</sup>. Die Spezifität für den Donor DHAP ist wesentlich ausgeprägter. Für RAMA sind sechs DHAP-Analoga als Substrate bekannt<sup>[25, 40, 44b]</sup>.

Die Diastereoselektivität der FDP-Aldolase-katalysierten Aldolreaktion hängt von den Reaktionsbedingungen ab. So wird z.B. unter kinetischer Kontrolle das D-Enantiomer von G3P zwanzigmal schneller als die L-Form umgesetzt<sup>[25]</sup>. Eine geringere Diastereoselektivität (ca. 5:1) wurde mit dem nichtphosphorylierten ( $\pm$ )-Glycerinaldehyd als Substrat festgestellt. Auch die racemischen Gemische nicht-natürlicher Aldehydacceptoren können teilweise kinetisch getrennt werden. Nach einem für RAMA ent-

Tabelle 3. Natürliche Substrate der wichtigsten Aldolasen. Unter den Aldolprodukten, die den Aldoldonoren zugeordnet sind, ist jeweils der Name des Enzyms aufgeführt. Die Pfeile kennzeichnen die gebildete oder gebrochene Bindung. FDP = Fructose-1,6-diphosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, KDO = 3-Desoxy-D-manno-octulosonat.

Donor									
FDP-Aldolase	DAHP-Synthetase	3-Desoxy-2-oxo-6-P-gluconat-Aldolase	4-Hydroxy-2-oxo-glutarate-Aldolase	3-Desoxy-2-oxo-L-arabinos-5-P-Aldolase	2-Desoxyribose 5-P-Aldolase				
Fuculose-1-P-Aldolase	KDO-Synthetase	KDO-Aldolase	4-Hydroxy-4-methyl-2-oxo-glutarate-Aldolase	3-Desoxy-2-oxo-D-pentanoate-Aldolase					
Rhamnulose-1-P-Aldolase	Sialinsäure-Synthetase	Sialinsäure-Aldolase	3-Desoxy-2-oxo-D-galactonat-Aldolase	3-Desoxy-2-oxo-D-galactonat-Aldolase	Ser-Hydroxymethyl-Transferase				

wickelten Modell zur Erklärung der kinetischen Selektivität werden anionisch substituierte Aldehyde sekundär an Lys-107 gebunden, das üblicherweise mit G3P wechselwirkt<sup>[22]</sup>. Daraus



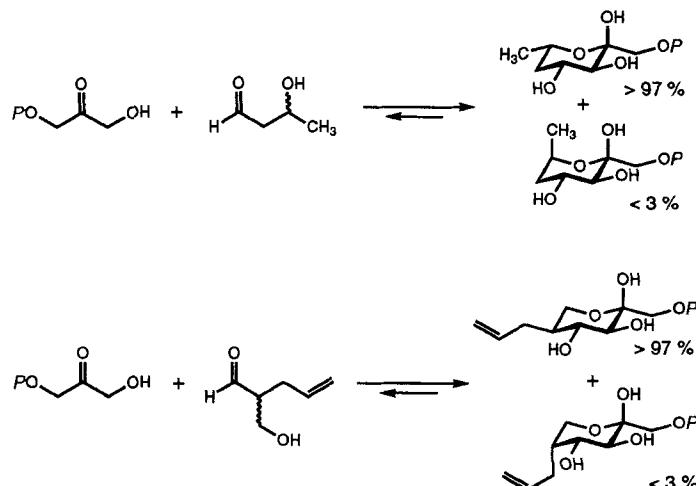
Schema 3. Mechanismus der Aldolase-katalysierten Aldolreaktion.

resultiert eine durch Zweipunktbinding (Anion und Aldehydgruppe) fixierte Konformation, so daß der folgende nucleophile *si*-Seiten-Angriff auf den (*S*)-Aldehyd durch den  $\alpha$ -Substituenten behindert wird und daher der (*R*)-Aldehyd schneller reagiert. Dieses Modell wird durch Untersuchungen gestützt<sup>[22]</sup>, in denen  $\omega$ -Carboxylato-substituierte  $\alpha$ -Hydroxyaldehyde ( $-\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{-CH(OH)CHO}$ ,  $n = 1-3, 5$ ) mit DHAP unter RAMA-Katalyse reagierten. Die höchsten Enantiomerenüberschüsse wurden mit den Substraten erzielt, für die eine besonders enge Wechselwirkung zwischen der Carboxylatgruppe und Lys-107 vorhergesagt wurde.

Wenn das Produkt unter Bildung eines sechsgliedrigen Hemiacetals cyclisieren kann, ist eine Racematspaltung chiraler Aldehyde möglich, sofern die enzymatische Reaktion thermodynamisch kontrolliert abläuft. Da die Reaktion reversibel ist, dominiert nach Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts das Produkt mit den wenigsten 1,3-diaxialen Wechselwirkungen. So wird z.B. aus racemischem  $\beta$ -Hydroxybutyraldehyd<sup>[25, 32]</sup> oder 2-Hydroxymethyl-4-pentenal<sup>[33]</sup> jeweils nur das Diastereomer erhalten, in dem die Methyl- bzw. Allylgruppe in äquatorialer Position ist (Schema 4).

### 3.2. Synthese von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)

DHAP kann am einfachsten enzymatisch *in situ* aus FDP mit FDP-Aldolase und Triosephosphat-Isomerase (TPI) hergestellt werden<sup>[29, 30]</sup>. Dabei wird FDP in der von FDP-Aldolase katalysierten Retroaldolreaktion zu DHAP und G3P gespalten und dieses durch TPI rasch zu einem zweiten Äquivalent DHAP isomerisiert. Der Nachteil dieser Methode ist, daß die Bildung von FDP thermodynamisch begünstigt sein kann und die Reaktion unter Umständen unvollständig bleibt. Weiterhin kann FDP bei der Isolierung des gewünschten Produktes stören. Bei einer anderen enzymatischen Methode zur Herstellung von DHAP wird Glycerin-Kinase für die Phosphorylierung von Dihydroxyaceton (DHA) mit ATP unter *In-situ*-Regenerierung



Schema 4. Thermodynamisch kontrollierte Racematspaltung racemischer Aldehyde mit FDP-Aldolase aus Kaninchenmuskel (RAMA).

von ATP verwendet<sup>[29]</sup>. Nach einem verbesserten Verfahren zur Synthese von Acetylphosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP)<sup>[41]</sup> wird DHAP in 83 % Ausbeute und mit einer Reinheit von 87 % erhalten. DHAP kann auch auf chemischem Weg durch Phosphorylierung des Ethylacetals des Dihydroxyacetondimers mit  $(BnO)_2PNEt_2$  und  $H_2O_2$ <sup>[42]</sup> sowie mit  $POCl_3$  oder  $(PhO)_2POCl$ <sup>[43]</sup> synthetisiert werden (Schema 5). Die reduktive

D-Fructose in nahezu quantitativer Ausbeute gebildet<sup>[45]</sup>. Dabei fungiert Dihydroxyacetonarsenat zunächst als Substrat der Isomerase, was zur Bildung von D-Glycerinaldehyd führt. Dieser reagiert dann mit verbleibendem DHA-Arsenat zu Fructose. Wegen der Toxizität des Arsenats ist bei diesem Verfahren jedoch Vorsicht geboten. Zudem sind die Reaktionsgeschwindigkeiten bei Verwendung der Arsenate recht gering, und oft werden niedrige Ausbeuten erhalten.

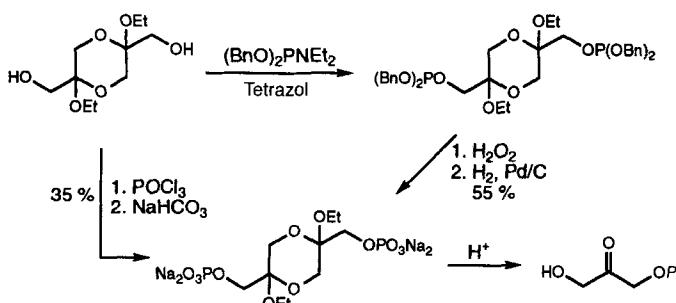
Vanadate reagieren ebenfalls mit DHA zu den entsprechenden Vanadatestern. Allerdings können diese Verbindungen nicht als DHAP-Analoga eingesetzt werden, da Vanadat DHA langsam oxidiert. Bei anderen Enzymen, die organische, phosphathaltige Substrate benötigen, und wo eine Oxidation ausgeschlossen ist, wurden Vanadat-Substratanaloga erfolgreich eingesetzt<sup>[45]</sup>.

Unter den Methoden zur Synthese von DHAP ist – abgesehen von wenigen Ausnahmen – die mit  $(PhO)_2POCl$  in der Praxis wohl die beste, da nicht wie mit  $POCl_3$  Phosphodiester gebildet werden. Die nach Verwendung von  $(PhO)_2POCl$  erforderliche Entfernung der Phenylgruppen entfällt bei der Phosphoramidit-Methode. Zwar ist  $(BnO)_2PNEt_2$  nicht im Handel erhältlich, doch kann es im Labor leicht aus  $PCl_3$ , Benzylalkohol und Diethylamin hergestellt und bei Raumtemperatur längere Zeit aufbewahrt werden.

### 3.3. Beispiele für die Verwendung von FDP-Aldolase

Es gibt zahlreiche Beispiele für die Verwendung von FDP-Aldolase in der organischen Synthese. Dazu zählen die Herstellung von  $^{13}C$ -markierten Zuckern<sup>[29, 46, 47]</sup>, stickstoffhaltigen Zuckern<sup>[24, 33 – 35]</sup>, Desoxyzuckern<sup>[30 – 32]</sup>, Fluorzuckern<sup>[31, 48]</sup> und längerkettigen Zuckern mit 7 – 9 C-Atomen<sup>[29, 30, 32, 39]</sup>. Die benötigten Aldehyde können in racemischer Form eingesetzt werden, doch werden viele nichtnatürliche Aldehyde, weil sie enantiomerenrein hergestellt wurden, auch so verwendet. Dabei wird die Aldehydfunktion auf zwei Arten maskiert: als terminales Olefin, das durch Ozonolyse gespalten werden kann<sup>[40]</sup>, oder als Acetal, das sauer hydrolysiert wird<sup>[24]</sup>.  $\alpha$ -Chirale Aldehyde lassen sich durch nucleophile Ringöffnung der einfach zugänglichen (R)- und (S)-Enantiomere des Glycidaldehyddiethylacetals (oder des entsprechenden Aziridins oder Thiirans) synthetisieren<sup>[49]</sup>. Die Enantiomere dieser Verbindung lassen sich durch Lipase-katalysierte Racematspaltung von 3-Chlor-2-hydroxypropanal<sup>[24, 49]</sup> und anschließende basische Cyclisierung zum Epoxid herstellen. Auf die enzymatische Synthese neuer, bioaktiver Monosaccharide aus nichtnatürlichen Aldehyden mit FDP-Aldolase wollen wir nun näher eingehen.

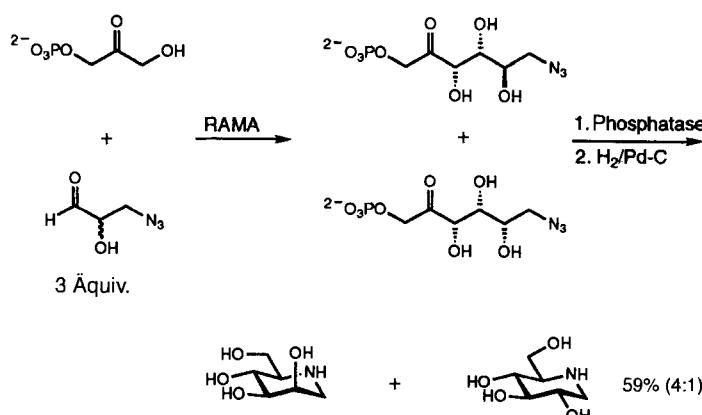
Die im folgenden als Azazucker bezeichneten Polyhydroxy-N-heterocyclen haben deutlich an Bedeutung gewonnen, seitdem man weiß, daß sie Inhibitoren des Saccharidmetabolismus sind<sup>[15, 50]</sup>. Zwei wirksame Glycosidaseinhibitoren, Desoxynojirimycin und Desoxymannojirimycin, lassen sich in drei Schritten synthetisieren, wobei die entscheidende C-C-Bindung RAMA-katalysiert geknüpft wird<sup>[33, 34]</sup>. Ausgehend von racemischem 3-Azido-2-hydroxypropanal und DHAP wurde ein Gemisch der diastereomeren 6-Azidoketosen erhalten. Nach Entfernen der Phosphatgruppe mit saurer Phosphatase und anschließender reduktiver Aminierung (Schema 6) wurden die bei-



Schema 5. Chemische Synthese von DHAP. Bn = PhCH<sub>2</sub>.

Entfernung der aromatischen Schutzgruppen bzw. – im Fall von  $POCl_3$  – die Hydrolyse des Chlorophosphats liefert dann ein stabiles Dimer, das durch saure Hydrolyse leicht in DHAP überführt werden kann. Die Gesamtausbeute beträgt ca. 55 % für die Route mit  $(PhO)_2POCl$  und ca. 33 % bei der Synthese mit  $POCl_3$ . Ein Multienzymsystem, das Sucrose in DHAP umwandelt, wurde ebenfalls in Aldolasereaktionen verwendet<sup>[44a]</sup>. In jüngster Zeit ist auch eine Kombination aus Glycerinphosphat-Oxidase und Peroxidase für die Oxidation von Glycerinphosphat zu DHAP beschrieben worden. Die Oxidase akzeptiert auch die durch isosteren Ersatz eines Sauerstoffatoms durch S oder NH abgeleiteten Phosphate<sup>[44b]</sup>.

Weiterhin kann DHAP durch ein Gemisch aus DHA und Arsenat ersetzt werden<sup>[31, 45]</sup>. Dabei entsteht in reversibler Reaktion ( $k \approx 2.4 \times 10^{-3} M^{-1} s^{-1}$ ) Dihydroxyacetonarsenat, das DHAP als Donor-Substrat von Aldolasen ersetzen kann. So wird aus DHA in Gegenwart von RAMA, TPI und Arsenat



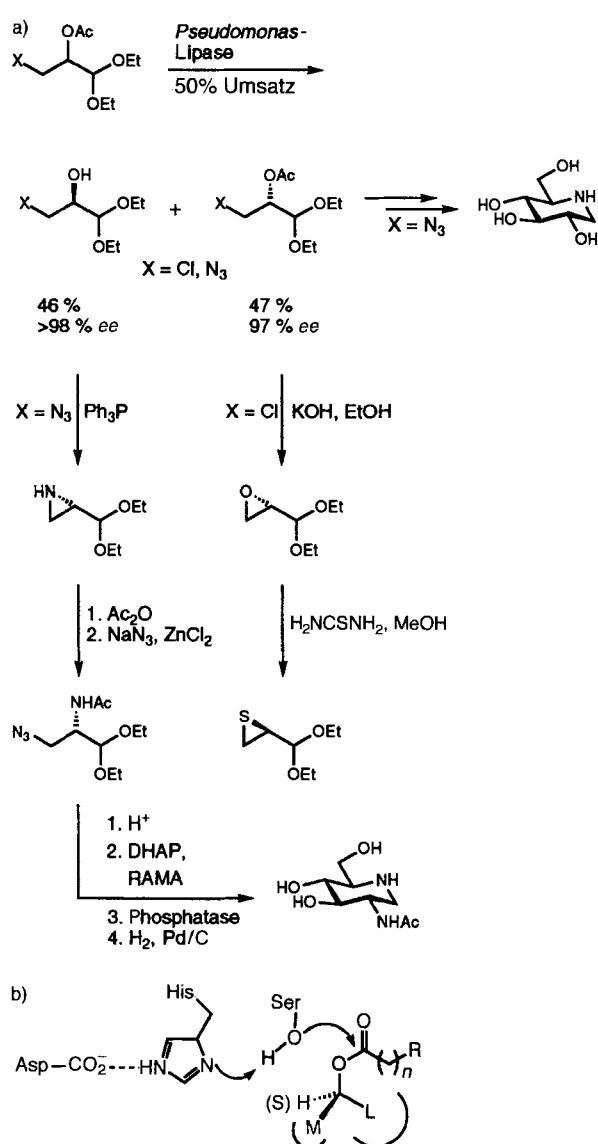
Schema 6. Synthese von Azazuckern aus racemischen Aldehyden mit RAMA.

den Glycosidaseinhibitoren im Verhältnis 4:1 zugunsten des *manno*-konfigurierten Azazuckers isoliert. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit FDP-Aldolase aus *E. coli* erzielt<sup>[24]</sup>. Reine Produkte erhält man, wenn die entsprechenden, optisch aktiven Azidoaldehyde eingesetzt werden<sup>[24]</sup>. Sowohl (*R*)- als auch (*S*)-3-Azido-2-hydroxypropanal wurden durch Racematspaltung der Acetalvorstufe mit Lipase LP-80 mit >98 % ee hergestellt (Schema 7)<sup>[24, 49]</sup>. Analog lassen sich auch andere 3-substituierte 2-Hydroxypropanalacetale erhalten und zu 6-substituierten Ketosen umsetzen<sup>[49]</sup>.

Durch RAMA-katalysierte Aldolreaktion und anschließende reduktive Aminierung wurden ebenso die von *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmannosamin abgeleiteten Azazucker aus (*S*)- bzw. (*R*)-2-Acetamido-3-azidopropanal synthetisiert (Schema 7)<sup>[51]</sup>.

Werden für diese Reaktionsfolge 2-Azidoaldehyde als Ausgangsverbindungen verwendet, erhält man polyhydroxylierte Pyrrolidine (Schema 8)<sup>[52, 53]</sup>. 1,4-Didesoxy-1,4-imino-D-arabinitol wurde aus Benzylloxycarbonyl(Cbz)-geschütztem Aminoacetaldehyd<sup>[24]</sup> und aus Azidoacetaldehyd<sup>[52]</sup> hergestellt. Ähnlich wurde (*2R,5R*)- sowie (*3R,4R*)-Dihydroxy-(*2S,5R*)-bis(hydroxymethyl)pyrrolidin aus racemischem 2-Azido-3-hydroxypropanal synthetisiert, wobei das kinetische Aldolprodukt zum (*2R,5R*)-Isomer<sup>[52]</sup> und das thermodynamische zum (*2S,5R*)-Isomer umgesetzt wird<sup>[53]</sup>. Analog wurden aus 3-Acetamido-2-azidopropanal auch die mit *N*-Acetylglucosamin verwandten fünfgliedrigen Azazucker hergestellt<sup>[58]</sup>. Mit einem Azidobutyraldehyd wurde ein Homoazazucker erhalten (siehe Schema 9)<sup>[59]</sup>. Ein Versuch, die Methode der reduktiven Aminierung zur Synthese von siebengliedrigen Azazuckern auszudehnen, schlug allerdings fehl: Die Azidogruppe wurde nur zum Amin reduziert (siehe Schema 10)<sup>[57]</sup>. Die palladiumkatalysierte reduktive Aminierung von Azidoketosen ist stereoselektiv. Vermutlich wird dabei das intermediär gebildete Imin zum *trans*-Produkt reduziert. Ist eine axiale Hydroxygruppe im Intermediat vorhanden, wird die Imindoppelbindung auf der entgegengesetzten Seite hydriert, was wahrscheinlich auf sterische Wechselwirkungen zurückzuführen ist (siehe Schema 11).

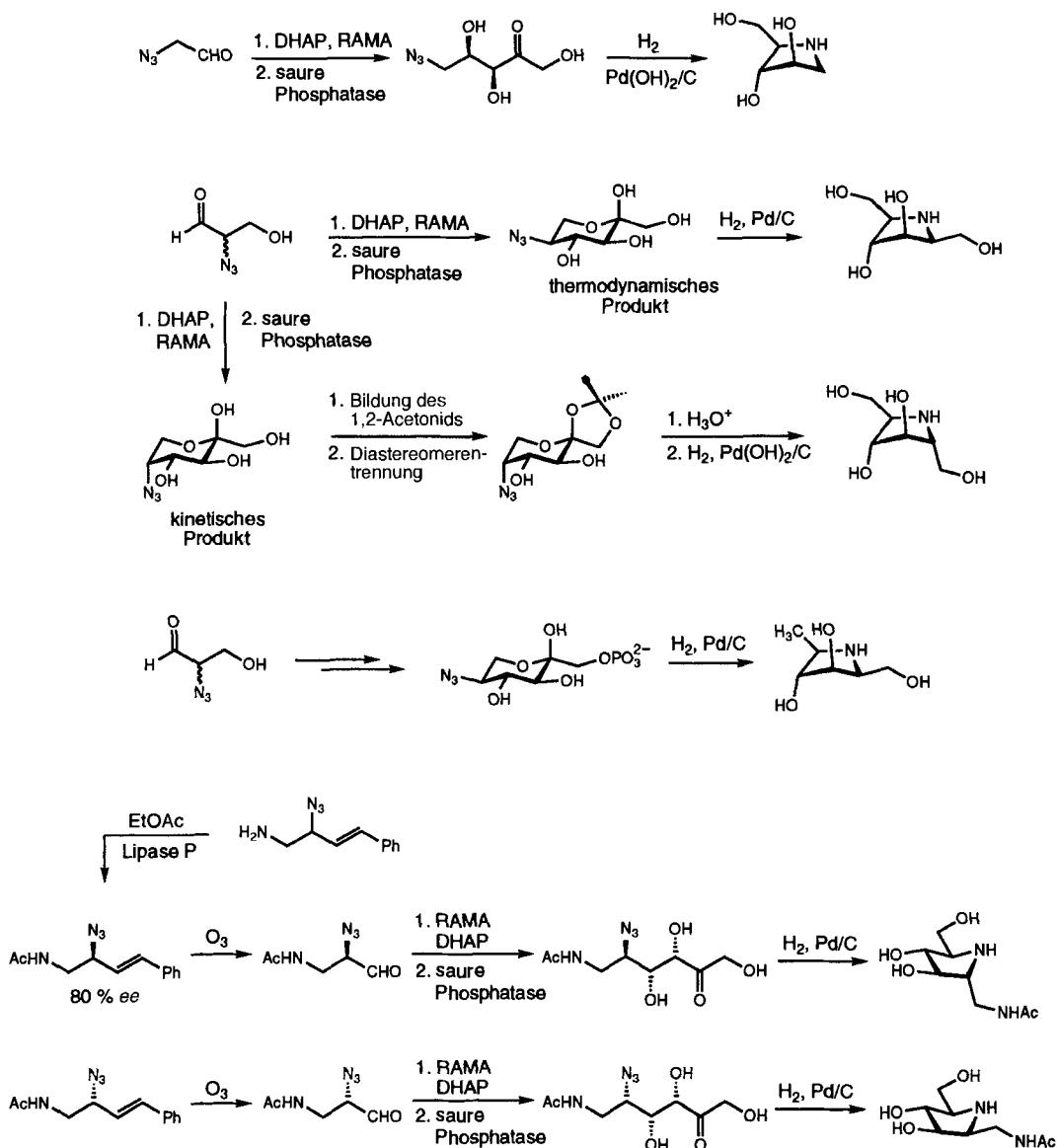
6-Desoxyazazucker und deren Analoga können auch durch direkte reduktive Aminierung der Aldolprodukte ohne vorherige Entfernung der Phosphatgruppe erhalten werden<sup>[51]</sup>. Wie in Schema 11 gezeigt, wird wahrscheinlich das cyclische Imin, das in Position 6 noch phosphoryliert ist, reduziert.



Schema 7. Synthese von Azazuckern aus enantiomerenreinen Aldehyden mit RAMA. a) Die chiralen Aldehyde können durch Racematspaltung mit Lipasen gewonnen werden und in nützliche chirale Synthesebausteine sowie Substrate für Aldolreaktionen überführt werden. b) Stereochemischer Verlauf der lipasekatalysierten Esterspaltung (mit S, M und L sind der kleinste, der mittelgroße und der größte Ligand bezeichnet).

Außer in der Synthese von Azazuckern wurde RAMA auch in der Herstellung von sauerstoffhaltigen Heterocyclen verwendet. So wurde 3-Desoxy-D-*arabino*-heptulosonsäure-7-phosphat (DAHP), ein wichtiges Intermediat im Shikimisäureweg zur pflanzlichen Biosynthese von aromatischen Aminosäuren, aus *N*-Acetylasparagin- $\beta$ -aldehydsäuremethylester in vier Schritten und in 13 % Ausbeute erhalten (siehe Schema 12)<sup>[36]</sup>. Der enzymatische Schritt lieferte die gewünschte D-*threo*-Konfiguration, und die chemische Reduktion (60 % Ausbeute) die (6*R*)-Konfiguration. Da die Substratspezifität von RAMA recht breit ist, sollte es auch möglich sein, Analoga von DAHP auf diesem Weg herzustellen.

Die mit RAMA erhaltenen Aldoladdukte lassen sich auch zur Synthese von Carbocyclen verwenden<sup>[38]</sup>. So kann Allylmagnesiumbromid an die aus Chloracetaldehyd und DHAP im enzymatischen Aldolschritt hergestellte Chlorketose nucleophil ad-



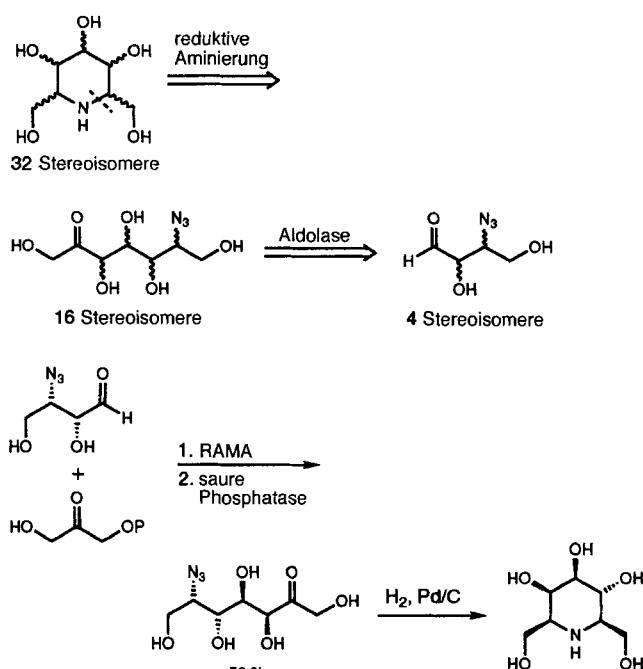
Schema 8. Synthese von poly-hydroxylierten Pyrrolidinen mit RAMA.

dient werden (siehe Schema 13). Das Produkt läßt sich radikalisch unter Bildung eines Cyclitols cyclisieren. Wird das Grignard-Reagens statt in Ether in Tetrahydrofuran zugefügt, wird Chlorid substituiert, und das Hauptprodukt ist C-Allyl-*threo*-pentulosid. Im Prinzip kann diese Methode auch auf Produkte anderer Aldolase-katalysierter Reaktionen angewendet werden, um zu stereoisomeren Derivaten zu gelangen.

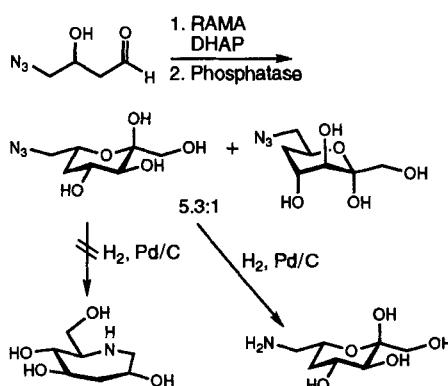
Die Entdeckung, daß RAMA auch Pentose- und Hexosephosphate umsetzt, hat einen neuen Syntheseweg zu längerkettigen Monosacchariden eröffnet. Mehrere solcher Verbindungen wurden bereits auf diesem Weg erhalten, darunter Analoga von Sialinsäure (*N*-Acetylneuraminsäure) und 3-Desoxy-*D-manno*-octulosonat (KDO)<sup>[39]</sup>. Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind allerdings vergleichsweise niedrig.

Synthesen mit RAMA sind nicht auf Kohlenhydrate beschränkt. Als Beispiel sei die Synthese des Käferpheromons (+)-*exo*-Brevicomin (siehe Schema 14) angeführt, in der die Aldolasereaktion zum Aufbau beider stereogenen Zentren dient<sup>[55]</sup>. Ein weiteres Beispiel ist die Synthese von C-verknüpften Homonucleosiden (siehe Schema 15)<sup>[60]</sup>.

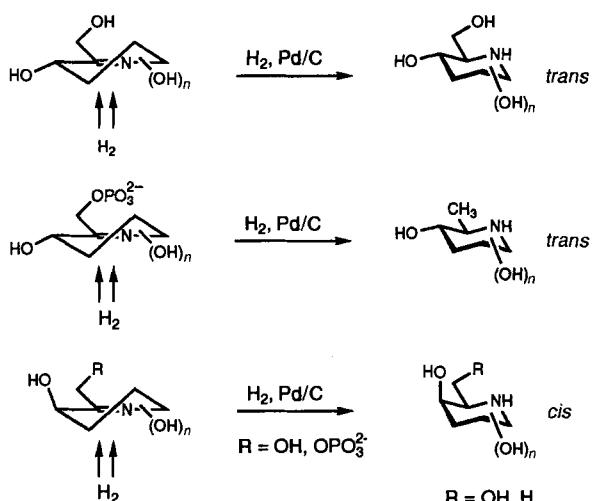
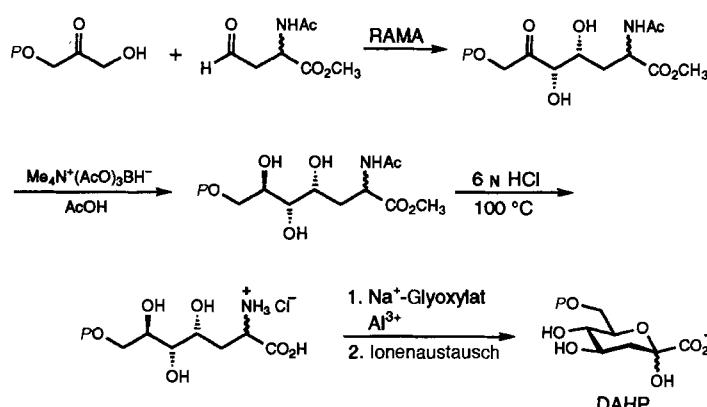
Wie aus den bisher diskutierten Beispielen ersichtlich, produzieren FDP-Aldolasen stets Ketosen. Viele wichtige, natürlich vorkommende Monosaccharide sind jedoch Aldosen. Eine Möglichkeit, um aus Produkten der FDP-Aldolasereaktion Aldosen herzustellen, ist die Isomerisierung mit Glucose-Isomerase (GI, = Xylose-Isomerase [EC 5.3.1.5])<sup>[31, 61]</sup>. Glucose-Isomerase katalysiert die Umwandlung von Fructose in Glucose und wird in der Lebensmittelindustrie zur Herstellung von Maissirup mit hohem Fructosegehalt verwendet. Das Enzym akzeptiert auch Fructoseanaloga, die in Position 3, 5 oder 6 modifiziert sind (siehe Schema 16)<sup>[31]</sup>. Viele mit FDP-Aldolase erhaltene Produkte können so zu einem Gemisch aus Ketose und Aldose isomerisiert werden, das sich in Form der  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Ba}^{2+}$ -Salze an Ionenaustauschersäulen trennen läßt. Aldoseanaloga wie 6-Desoxy-, 6-Fluor-, 6-*O*-Methyl- und 6-*O*-Azidoglucose sind so synthetisiert worden. Dieser Ansatz führt allerdings nicht immer zum Erfolg. Bei 5-Desoxy-*D*-fructose beispielsweise liegt das Gleichgewicht so weit auf der Seite der Ketose, daß die Reaktion erfolglos ist; andere Ketosen aus der Aldolasereaktion sind keine Substrate der GI.



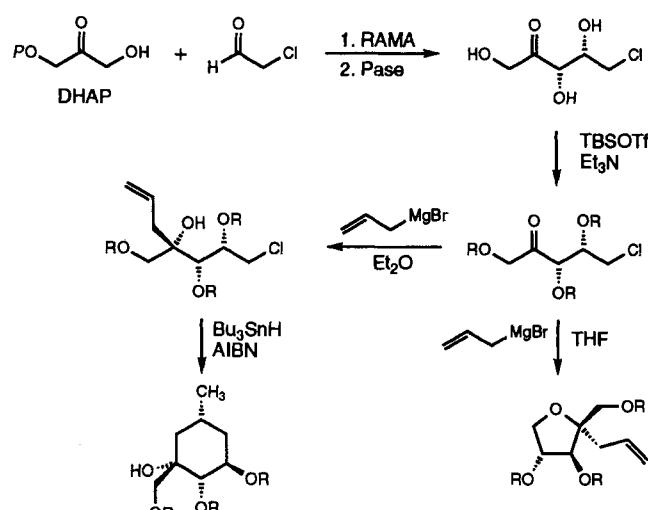
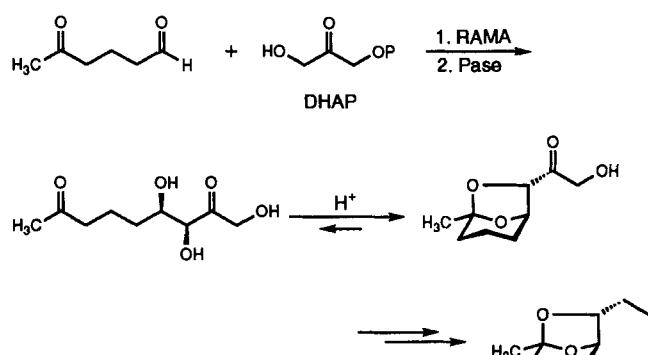
Schema 9. Synthese von polyhydroxylierten Piperidinen mit RAMA.



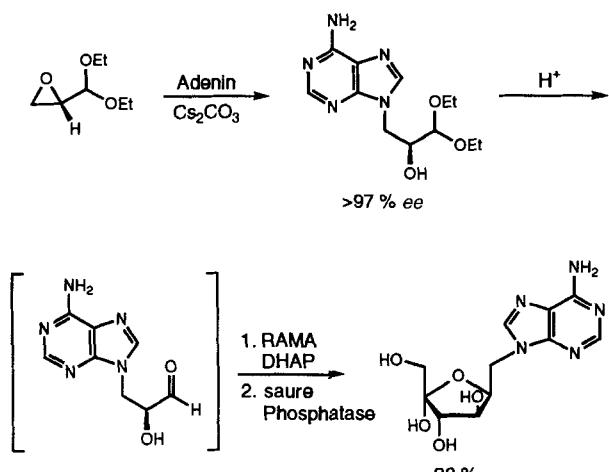
Schema 10.

Schema 11. Stereochemischer Verlauf der intramolekularen reduktiven Aminierung. Die *trans*-Produkte werden gebildet, um die Torsionsenergie zu verringern, die *cis*-Produkte, um sterische Wechselwirkungen zu verringern.

Schema 12. Synthese von DAHP mit RAMA.

Schema 13. Synthese eines Cyclitols und eines C-Glycosids mit RAMA. AIBN = Azoisobutyronitril, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, Tf = Triflat = SO2CF3, R = TBS, Pase = Phosphatase.Schema 14. Synthese von (+)-*exo*-Brevicomin mit RAMA.

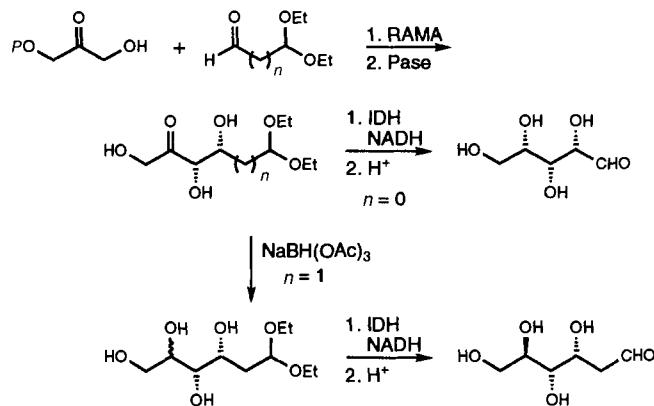
Eine Alternative zur Synthese von Aldosen durch Isomerisierung von Produkten der FDP-Aldolaserreaktion ist die sogenannte „Inversionsstrategie“<sup>[37]</sup>. Dabei wird ein partiell geschützter Dialdehyd in die Aldolaserreaktion eingesetzt, was zur Bildung eines geschützten Ketoaldehyds führt. Die Ketogruppe wird anschließend chemisch oder enzymatisch (mit Iditol-Dehydrogenase) stereoselektiv reduziert und die Aldehyd-



Schema 15. Synthese eines Homo-C-Nucleosids. Pase = Phosphatase.

Schema 16. Substratspezifität der Glucose-Isomerase (GI). R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = OH, H; R<sup>3</sup> = OH, H, F, OCH<sub>3</sub>, N<sub>3</sub>.

schutzgruppe entfernt, was zur Bildung der Aldose führt (Schema 17). Die NADH-abhängige Iditol-Dehydrogenase (IDH) aus *Candida utilis* (auch als Sorbitol- oder Polyol-Dehydrogenase bekannt [EC 1.1.14]), wurde bereits zur Reduktion der Carbonylgruppe in Ketosen unter Bildung des (S)-Alkohols eingesetzt<sup>[30]</sup>. Der (R)-Alkohol konnte (mit nur geringer Stereoselektivität) durch Reduktion mit  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  erhalten werden; das verunreinigende (S)-Epimer wurde selektiv durch Oxidation mit IDH<sup>[37]</sup> entfernt.



Schema 17. Synthese von L-Xylose (n = 0) und 2-Desoxy-D-arabinohexose (n = 1) nach der Inversionsstrategie. Pase = Phosphatase, IDH = Iditol-Dehydrogenase.

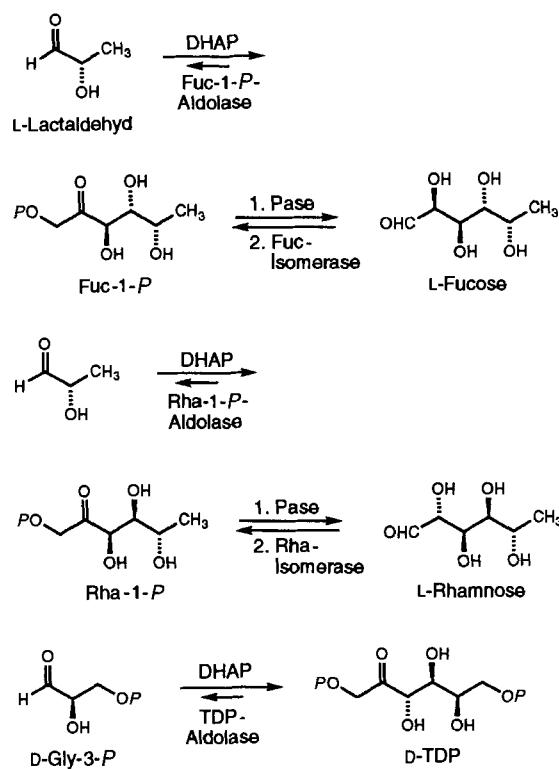
Obwohl bei den meisten mit FDP-Aldolase katalysierten Reaktionen die im Handel erhältliche RAMA verwendet wird, besteht immer noch großes Interesse an der Nutzung weiterer Aldolasen aus anderen Quellen<sup>[57]</sup>. Hier sind besonders die eingangs erwähnten Typ-II-Aldolasen aus *E. coli*<sup>[24]</sup> und Hefe<sup>[27]</sup> zu erwähnen, die geklont und überexprimiert worden

sind. Anders als RAMA haben sie den synthetisch wichtigen Vorteil, daß sie stabiler sind und statt aus einem Säugetier aus Mikroorganismen gewonnen werden.

### 3.4. Fuculose-1-phosphat(Fuc-1-P)-Aldolase

[EC 4.1.2.17], Rhamnulose-1-phosphat(Rha-1-P)-Aldolase [EC 4.1.2.19] und Tagatose-1,6-diphosphat(TDP)-Aldolase

Außer FDP-Aldolase kennt man drei weitere Aldolasen, die DHAP als Donor nutzen: Fuc-1-P-Aldolase, Rha-1-P-Aldolase und TDP-Aldolase. Fuc-1-P-Aldolase katalysiert die reversible Kondensation von DHAP und L-Lactaldehyd zu L-Fuc-1-P, während Rha-1-P-Aldolase aus denselben Ausgangsverbindungen L-Rha-1-P produziert (Schema 18). Beide Enzyme gehören zu den Typ-II-Aldolasen und finden sich in einigen Mikroorganismen<sup>[62]</sup>. Ihre Klonierung, Überexpression und Reinigung ist beschrieben worden<sup>[63, 64]</sup>. TDP-Aldolase ist eine Typ-I-Aldolase, die am Galactosemetabolismus von Coccen beteiligt ist, und katalysiert die reversible Bildung von D-TDP aus DHAP und G3P.

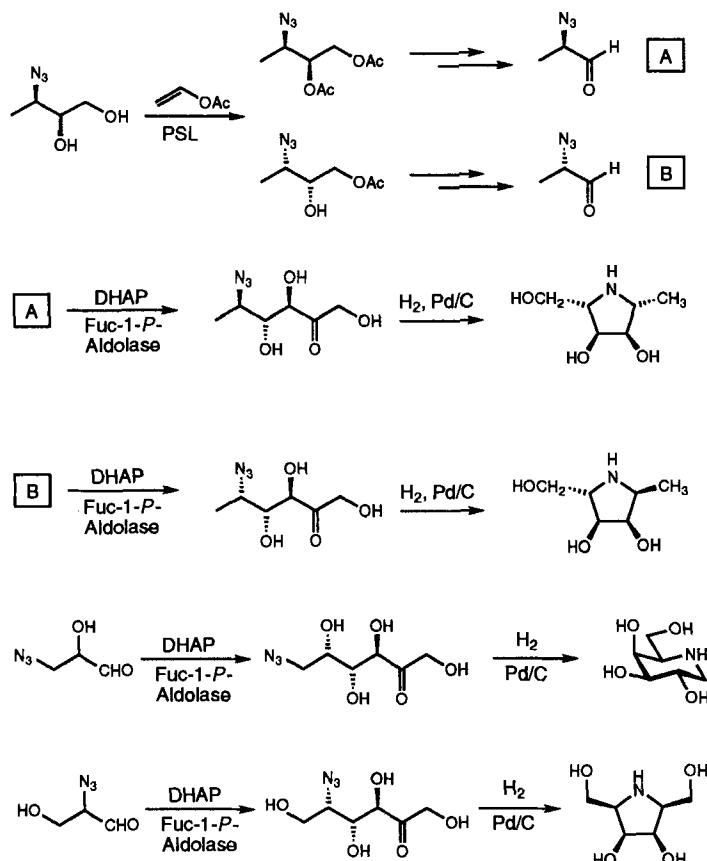


Schema 18. Die durch Fuc-1-P-, Rha-1-P- und TDP-Aldolase in vivo katalysierten Reaktionen. Fucose- und Rhamnose-Isomerase können verwendet werden, um die jeweiligen Ketosen nach der Dephosphorylierung mit Phosphatase (Pase) zu Aldosen zu isomerisieren.

Sowohl Fuc-1-P- als auch Rha-1-P-Aldolase akzeptieren eine Reihe von Aldehydsubstraten, aus denen sie D-*erythro*- bzw. D-*threo*-konfigurierte vicinale Diole bilden<sup>[62-64]</sup>. Dabei werden stereoselektiv Produkte mit (3*R*)-Konfiguration erhalten; die Stereoselektivität der Reaktion ist bezüglich der Konfiguration an C-4 bei manchen Substraten etwas geringer. Mit sterisch

ungehinderten 2-Hydroxyaldehyden werden allerdings durchweg hohe Diastereoselektivitäten erzielt.

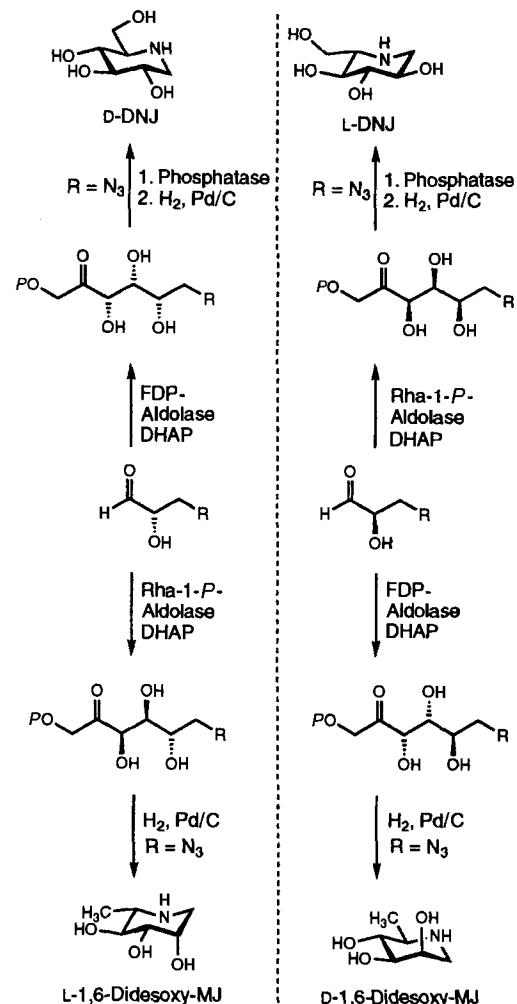
Beide Aldolasen weisen eine deutliche Präferenz für L-konfigurierte Hydroxyaldehyde auf (>95:5) und lassen sich daher zur kinetischen Racematspaltung solcher Verbindungen verwenden<sup>[56]</sup>. Weiterhin wurden mit ihnen seltene Ketose-1-phosphate<sup>[56]</sup> sowie Aza- und Desoxyazazucker hergestellt<sup>[53, 54, 65]</sup>. Als Beispiel sei die Synthese von Azazuckern mit Fuc-1-P-Aldolase angeführt (Schema 19). Die Enantiokomplementarität der beiden Enzyme wird in Schema 20 verdeutlicht.



Schema 19. Synthese von Azazuckern mit Fuc-1-P-Aldolase und *Pseudomonas*-Lipase (PSL).

Fuc-1-P-Aldolase und Rha-1-P-Aldolase können auch ohne Isolierung in Form ganzer Zellen in Gegenwart von DHA und Arsenat verwendet werden<sup>[45]</sup>. So wurde aus L-Lactaldehyd und DHA/Arsenat mit Rha-1-P-Aldolase L-Rhamnulose und daraus mit der ebenfalls in der Zelle vorhandenen Rhamnose-Isomerase L-Rhamnose erhalten. Dagegen wird das aus L-Glycolaldehyd gebildete Aldolaseprodukt L-Xylulose nicht isomerisiert. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, daß Rhamnose- und Fucose-Isomerase jeweils nur (2R,3R)- bzw. (2S,3S)-konfigurierte Substrate umsetzen<sup>[56]</sup>.

Ein alternativer Zugang zu den Rha-1-P- und Fuc-1-P-Ketose-1-phosphaten, die mit Aldolase hergestellt werden, ist mit Rhamnose- und Fucose-Isomerase möglich<sup>[56]</sup>. Dabei wird die Aldose nur teilweise isomerisiert, doch kann das Gleichgewicht durch Phosphorylierung der Ketose zu deren Gunsten verschoben werden. So wurden in Gegenwart von Rhamnulose-Kinase

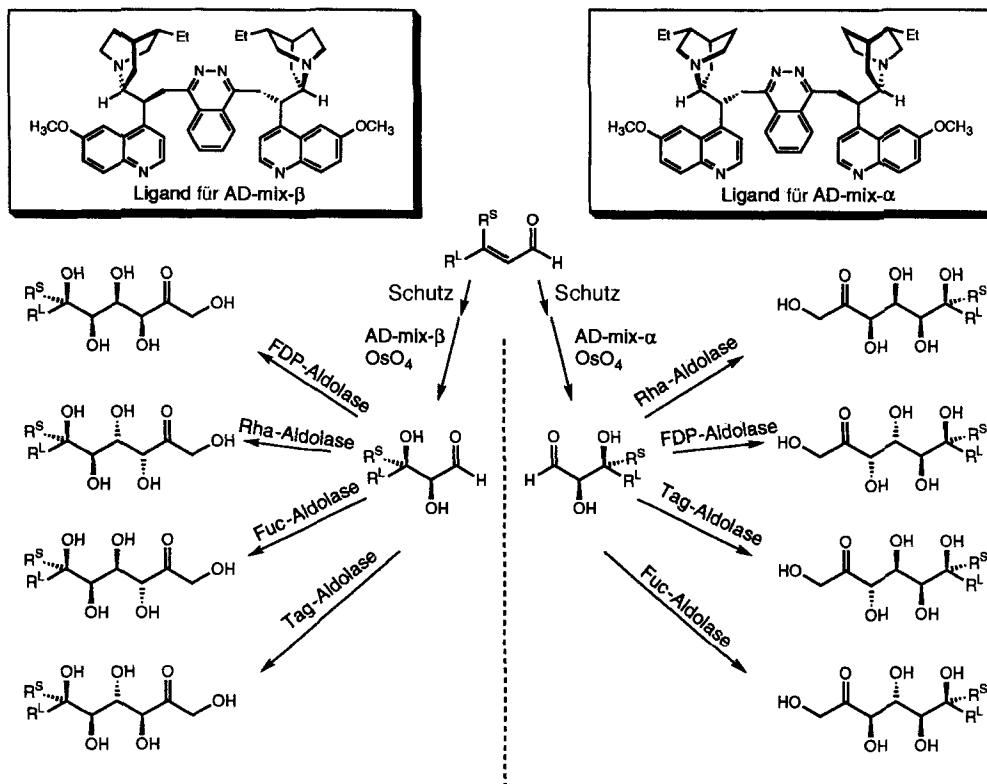


Schema 20. Synthese beider Enantiomere von Desoxynojirimycin (DNJ) und 1,6-Didesoxymannojirimycin (1,6-Didesoxy-MJ) mit Aldolasen.

Ketose-1-phosphate in Ausbeuten zwischen 72 und 90 % hergestellt.

TDP-Aldolase ist aus mehreren Quellen isoliert worden<sup>[66]</sup>. Das Enzym aus *E. coli* weist ein schmales pH-Profil mit einem Optimum bei pH = 7.5 auf, doch auch bei pH = 6.5–7 ist die Enzymaktivität noch ausreichend hoch. Wie andere DHAP-abhängige Aldolasen akzeptiert das Enzym eine Reihe von Aldehydsubstraten, z.B. D- und L-Glycerinaldehyd, Acetaldehyd und Isobutyraldehyd<sup>[67]</sup>. Allerdings wurden in allen bisher untersuchten Fällen Diastereomerengemische erhalten. Statt der wie in D-Tagatose vorliegenden *erythro*-Konfiguration war in allen Fällen die *threo*-Konfiguration wie in D-Fructose mit über 90 % vorherrschend. Nur ausgehend von D-Glycerinaldehyd weist das Hauptprodukt, D-TDP, die Konfiguration von Tagatose auf. Wegen dieser mangelhaften Stereoselektivität kann TDP-Aldolase derzeit nicht für die Synthese verwendet werden. Es ist aber durchaus möglich, daß durch Protein engineering oder Screeningverfahren eine stereoselektivere Form dieser Aldolase zugänglich gemacht werden kann.

Vom Standpunkt der Synthese betrachtet, ergänzen sich die DHAP-abhängigen Aldolasen in bezug auf die Konfiguration an C-3 und C-4 der Produkte, womit diese vicinale Diol-einheit in allen vier Konfigurationen über Aldolasen zugänglich



Schema 21. Strategie zur enantioselektiven Synthese sämtlicher 2-Ketohexoseisomere. (Mit R<sup>S</sup> und R<sup>L</sup> sind der jeweils kleinere und größere Substituent gekennzeichnet.)

ist. FDP-, Rha-1-P-, Tag-1-P- und Fuc-1-P-Aldolase bilden aus vielen nichtnatürlichen Aldehyden jeweils eines der vier möglichen Diastereomere. Prinzipiell kann jede der C3/C4-stereoiso-meren Ketosen mit diesen Enzymen, die heute als rekombinante Zelllinien in *E. coli* von der American Type Culture Collection (ATCC) erhältlich sind, hergestellt werden. Ausgehend von geeigneten Aldehyden können so auf enzymatischem Wege viele gewöhnliche und ungewöhnliche Monosaccharide hergestellt werden. Zwar stehen viele Methoden zur Herstellung der optisch aktiven Aldehyde zur Verfügung, doch ist die von Sharpless et al. entwickelte osmiumtetroxidkatalysierte Dihydroxylierung<sup>[68]</sup> besonders hervorzuheben, da sie beide Enantiomere eines vicinalen Diols zugänglich macht (Schema 21). Dieses Prinzip wurde in der Synthese von D- und L-Fructose sowie von entsprechenden Derivaten angewendet (Schema 22)<sup>[69]</sup>. Andere enzymatische Wege zur Herstellung von D- und L-Zuckern sind die enantioselektive Acylierung von Glycalen<sup>[70]</sup> und cyclischen Mesotriolen<sup>[71]</sup> mit Lipasen sowie Alkohol-Dehydrogenase-katalysierte Reduktionen (Schema 23)<sup>[72]</sup>.

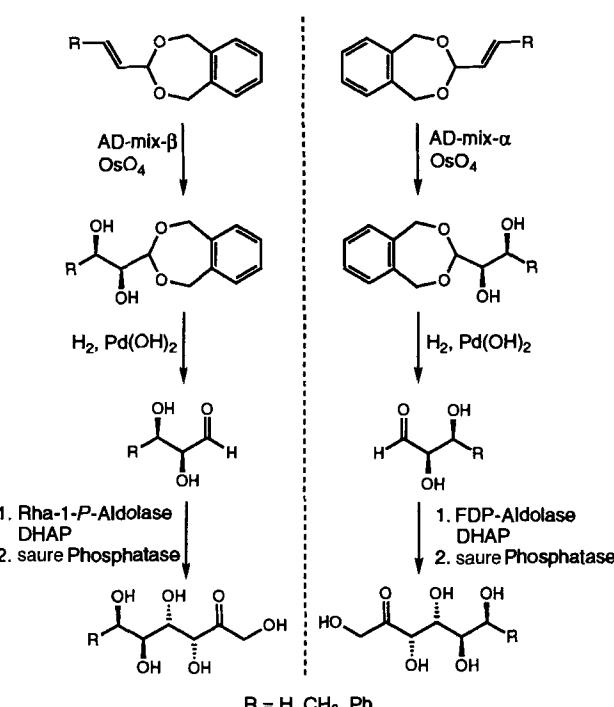
### 3.5. N-Acetylneuraminsäure(NeuAc)-Aldolase [EC 4.1.3.3] und NeuAc-Synthase [EC 4.1.3.19]

NeuAc-Aldolase – auch bekannt unter dem Namen Sialinsäure-Aldolase – katalysiert die reversible Kondensation von Pyruvat und D-N-Acetylmannosamin (ManNAc) zu N-Acetyl-5-amino-3,5-dideoxy-D-galacto-D-glycero-2-nonulosonsäure (NeuAc, Sialinsäure; Schema 24)<sup>[73, 74]</sup>. Obwohl in Lösung hauptsächlich das  $\beta$ -Anomer vorliegt, verwendet das Enzym

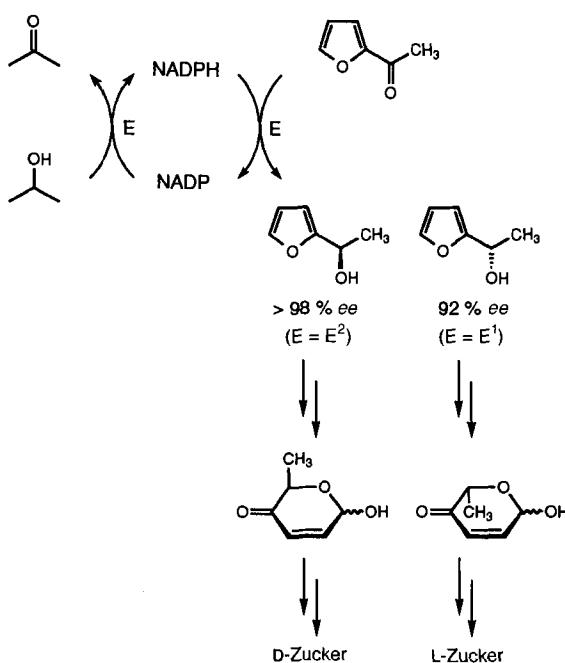
nur das  $\alpha$ -Anomer, und das zuerst gebildete Produkt der Aldolspaltung sind  $\alpha$ -D-ManNAc und Pyruvat<sup>[75]</sup>. In vivo hat das Enzym eine katabolische Funktion, wobei die Gleichgewichtskonstante für die Retroaldolreaktion 12.7 M<sup>-1</sup> beträgt. Für synthetische Zwecke lässt sich dieses Gleichgewicht allerdings durch einen Überschuss Pyruvat zugunsten des Aldolproduktes verschieben<sup>[74]</sup>. NeuAc-Aldolase wurde sowohl aus Bakterien als auch aus Tieren isoliert. Beide Enzyme sind Typ-I-Aldolasen, bei denen also Schiff-Basen als Intermediate auftreten. Das pH-Optimum liegt bei 7.5, doch ist das Enzym im Bereich pH = 6–9 hinreichend aktiv und nicht sauerstoffempfindlich<sup>[74, 76]</sup>. Die Enzyme aus *Clostridia* und *E. coli* sind mittlerweile kommerziell erhältlich, und das Enzym aus *E. coli* wurde erfolgreich gekloniert und überexprimiert<sup>[77]</sup>. NeuAc-Aldolase

wurde als solche oder immobilisiert eingesetzt<sup>[78–82]</sup>; in einigen Fällen wurde sie eingeschlossen in eine Dialysemembran verwendet<sup>[83]</sup>.

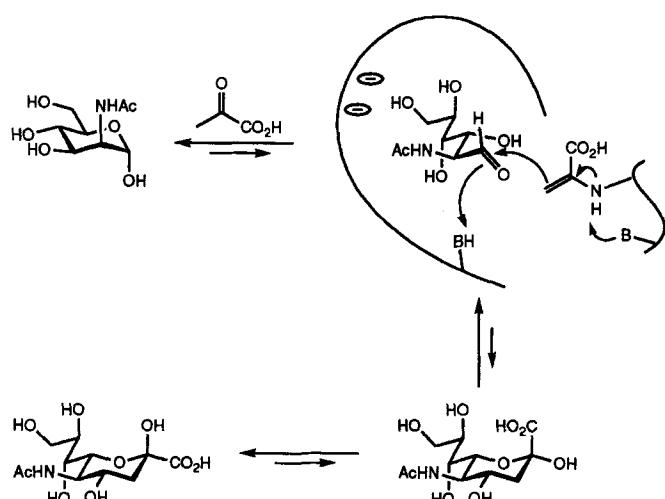
Mit dem isolierten Enzym wurde bei der Reaktion von ManNAc zu NeuAc ein Umsatz von ca. 90 % erreicht, indem sieben



Schema 22. Synthese von D- und L-Zuckern durch asymmetrische Dihydroxylierung und anschließende Aldolreaktion.



Schema 23. Enantioselektiver Zugang zu L- und D-Zuckern durch enzymatische asymmetrische Reaktion.  $E^1$  = Alkohol-Dehydrogenase aus *Thermoanaerobium brockii*,  $E^2$  = Alkohol-Dehydrogenase aus *Lactobacillus*.



Schema 24. Mechanismus der NeuAc-Aldolase-Reaktion. B = Base.

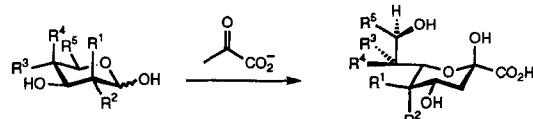
Äquivalente Pyruvat verwendet wurden. Ein solcher Überschuß kann vermieden und die Isolierung der Produkte erleichtert werden, wenn man die Aldolasereaktion mit einer thermodynamisch günstigeren Reaktion verknüpft. Ein Beispiel hierfür ist die Kopplung der Aldolasereaktion von ManNAc und einer anschließenden Sialyl-Transferase-Reaktion zur Bildung von Sialylglycosiden<sup>[84]</sup>. In einer Variante dieser Reaktionsfolge wurde ein Gemisch aus ManNAc und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) eingesetzt, das durch chemische<sup>[85]</sup> oder enzymatische Epimerisierung (mit N-Acetylglucosamin-2-Epimerase)<sup>[86]</sup> gewonnen wurde. Die Aufarbeitung kann auch durch Pyruvat-Decarboxylase vereinfacht werden, die überschüssiges Pyruvat zerstört.

Weitreichende Untersuchungen zur Substratspezifität von NeuAc-Aldolase sind durchgeführt worden. Nur Pyruvat wird

als Donor akzeptiert; Acetylphosphonat, 3-Fluorpyruvat, 3-Brompyruvat, 3-Hydroxypyruvat und 2-Oxobutyrat sind keine Substrate<sup>[81]</sup>. Hinsichtlich Acceptorsubstraten ist das Enzym flexibler: Die Atome C-2, C-4 und C-6 können anders als in ManNAc substituiert sein, und die *manno*-Konfiguration an C-4, C-5 und C-6 ist nur leicht bevorzugt<sup>[81, 87–91]</sup>. Einige Pentosen und ihre Analoga sind ebenfalls Substrate, aber C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Aldehyde werden nicht umgesetzt.

In neuerer Zeit ist das Interesse an NeuAc-Analoga wegen ihrer Bedeutung in der Zellbiologie stark gestiegen. NeuAc und ihre Derivate kommen an den Termini von Glycokonjugaten in Säugetieren vor, wo sie eine wichtige Rolle bei der biochemischen Erkennung spielen<sup>[92]</sup>. Auch Polysialinsäuren treten in tierischen und bakteriellen Geweben auf; sie sind vermutlich an der Zelladhäsion und der interzellulären Kommunikation beteiligt<sup>[10]</sup>. Da NeuAc-Aldolase wenig substratspezifisch ist und in genügender Menge zur Verfügung steht, konnte eine große Zahl biologisch interessanter Sialinsäuren mit ihr hergestellt werden (Tabelle 4)<sup>[93–97]</sup>.

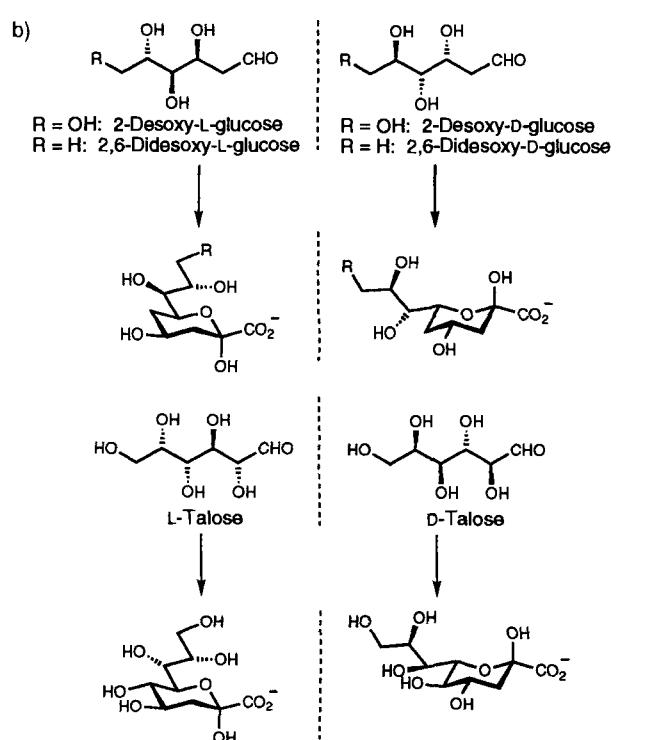
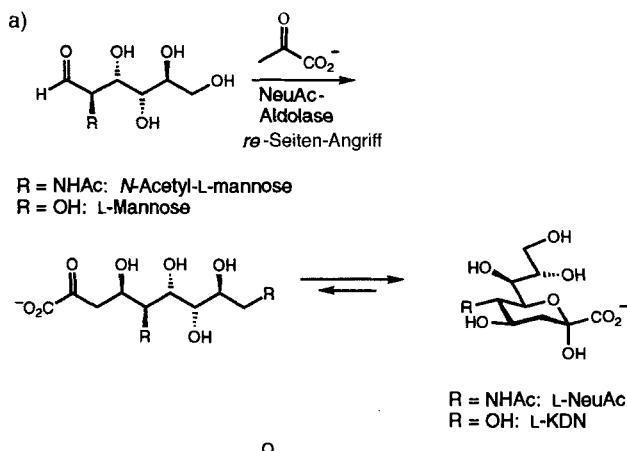
Tabelle 4. Substratspezifität von NeuAc-Aldolase.



$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$	$R^5$	$k_{\text{rel}}$	Lit.
AcNH	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	1	78, 81, 83
AcNH	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OAc	0.2	78, 81
AcNH	H	OH	H	CH <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	0.6	82, 91
AcNH	H	OH	H	CH <sub>2</sub> F	0.6	82
OH	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	2	80
OH	H	H	H	CH <sub>2</sub> OH	–	89
OH	H	H	F	CH <sub>2</sub> F	–	82
OH	H	OH	H	H	0.1	90
H	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	1.3	90
H	OH	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	0.07	89
Ph	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	–	90
AcNH	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	–	
AcNH	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OCOCH(OH)CH <sub>3</sub>	–	
N <sub>3</sub>	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	–	
AcNH	H	OH	H	CH <sub>2</sub> OP(O)Me <sub>2</sub>	–	82

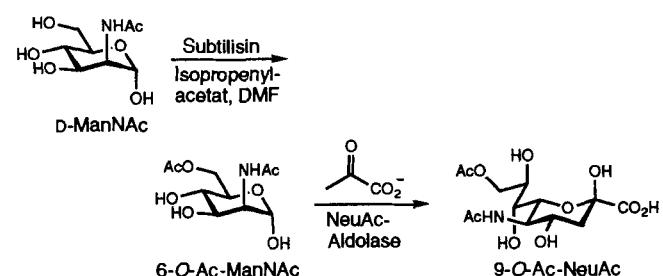
Von den zahlreichen mit NeuAc-Aldolase erhaltenen Produkten sind die meisten an C-4 (S)-konfiguriert. Nach neueren Ergebnissen lässt sich diese absolute Konfiguration an C-4 mit einigen Substraten unter thermodynamischen Bedingungen umkehren. So wurde in der durch NeuAc-Aldolase katalysierten Synthese von KDO aus D-Arabinose ein Gemisch aus den C-4-Epimeren isoliert<sup>[90]</sup>. NMR-Untersuchungen mit mehreren anderen Zuckern (z.B. L-Mannose, D-Glucose und 2-Azido-2-deoxy-L-mannose) ergaben, daß in einigen Fällen nach längerer Reaktionszeit Produkte mit einer äquatorialen Gruppe an C-4 überwiegen, auch wenn das in einigen Fällen der eigentlichen stereochemischen Präferenz des Enzyms zuwiderläuft<sup>[98]</sup>. Offensichtlich greift Pyruvat den Acceptoraldehyd unter Bildung des thermodynamisch stabileren Produktes an, und die Stereoselektivität stammt lediglich von der Präferenz für das Produkt, das die C-4-Hydroxygruppe in äquatorialer Stellung aufweist.

Daher ist es möglich mit NeuAc-Aldolase auch biologisch interessante L-Zucker herzustellen, darunter L-NeuAc, L-KDO und 3-Desoxy-L-galacto-L-glycero-nonulosonsäure (L-KDN) (Schema 25). Dabei wurde das überschüssige Pyruvat mit Pyruvat-Decarboxylase zerstört, um die Isolierung der Produkte zu vereinfachen<sup>[98b]</sup>.



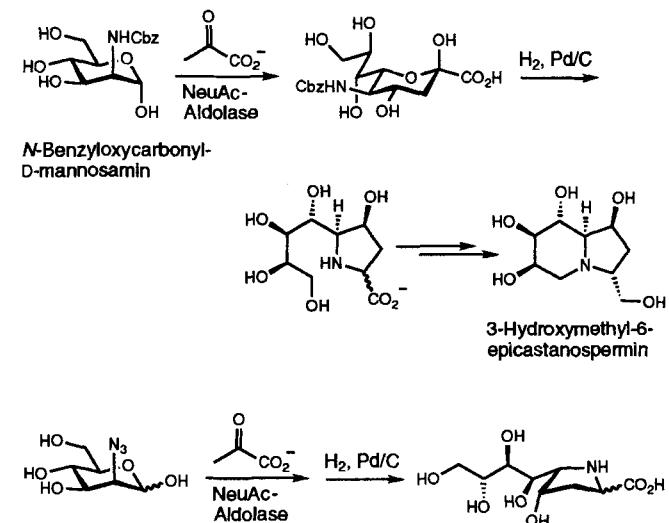
Schema 25. a) Synthese von L-NeuAc, L-KDN und L-KDO mit NeuAc-Aldolase; b) enantiokomplementärer Verlauf von NeuAc-Aldolasereaktionen mit L- und D-Zuckern: Bildung von Produkten durch einen *re*-Seiten-Angriff (links) und von solchen durch einen *si*-Seiten-Angriff (rechts).

Die Synthese von 9-O-Ac-NeuAc<sup>[79]</sup> konnte in zwei enzymatischen Schritten, durch regioselektive, irreversible Acetylierung von ManNAc mit der Protease Subtilisin und anschließende NeuAc-Aldolase-katalysierte Reaktion des entstandenen 6-O-Ac-ManNAc und Pyruvat, in ca. 80 % Gesamtausbeute erhalten werden (Schema 26)<sup>[81]</sup>. Auch andere in Position 9 acyierte Derivate konnten so hergestellt werden<sup>[82]</sup>.



Schema 26. Synthese von 9-O-Ac-NeuAc durch kombinierte Anwendung von Subtilisin und NeuAc-Aldolase.

NeuAc-Aldolase wurde ebenfalls erfolgreich für die Synthese des  $\alpha$ -Methylglycosids von *N*-ungeschützter Neuraminsäure eingesetzt, das zur Einführung anderer Substituenten am Stickstoffatom verwendet werden kann<sup>[89]</sup>. Auch Polyacrylamide mit  $\alpha$ -Sialosid-Seitenketten<sup>[95]</sup> und Polymere aus C-verknüpften Sialosiden<sup>[96]</sup>, die die Agglutination von Erythrozyten durch den Influenzavirus deutlich inhibieren, wurden hergestellt. Ein Derivat des äußerst wirksamen Glycosidaseinhibitors Castanospermin wurde ebenfalls mit NeuAc-Aldolase aus *N*-Cbz-D-Mannosamin und Pyruvat synthetisiert. Dabei entsteht durch die reduktive Aminierung des Aldoladdukts ein Piperidin, das eine Vorstufe von 3-Hydroxymethyl-6-epicastanospermin ist (Schema 27)<sup>[99]</sup>. Die Sequenz von Aldolasereaktion und reduktiver Aminierung lässt sich auch mit 2-Azido-2-desoxymannose durchführen<sup>[100]</sup>.

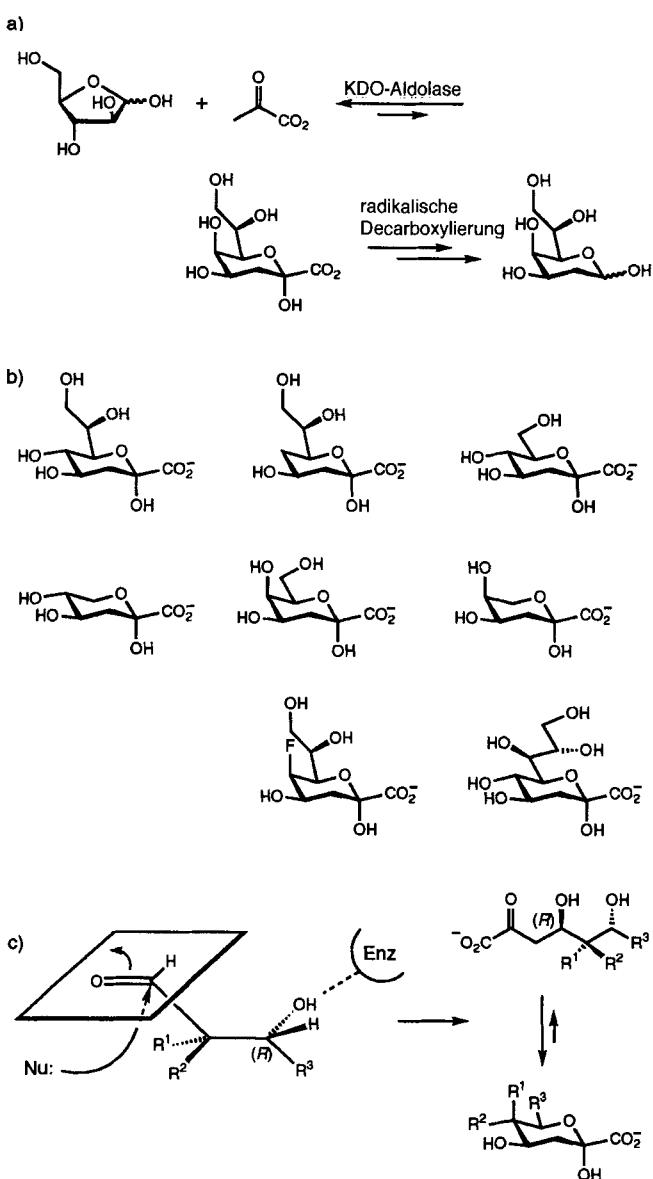


Schema 27. Synthese von Azazuckern mit NeuAc-Aldolase.

In vivo wird NeuAc durch NeuAc-Synthetase gebildet<sup>[176]</sup>, die die irreversible Kondensation von PEP und ManNAc katalysiert. Dieses Enzym, das bisher weder gereinigt noch charakterisiert worden ist, könnte sich in Zukunft als sehr nützlich erweisen, da die Reaktion im Vergleich zur einfachen Aldolkondensation thermodynamisch und kinetisch begünstigt ist.

### 3.6. 3-Desoxy-D-manno-2-octulosonat-Aldolase [EC 4.1.2.23] und 3-Desoxy-D-manno-2-octulosonat-8-phosphat-Synthetase [EC 4.1.2.16]

3-Desoxy-D-manno-2-octulosonat-Aldolase, die auch als 2-Keto-3-desoxyoctanoat(KDO)-Aldolase bekannt ist, katalysiert



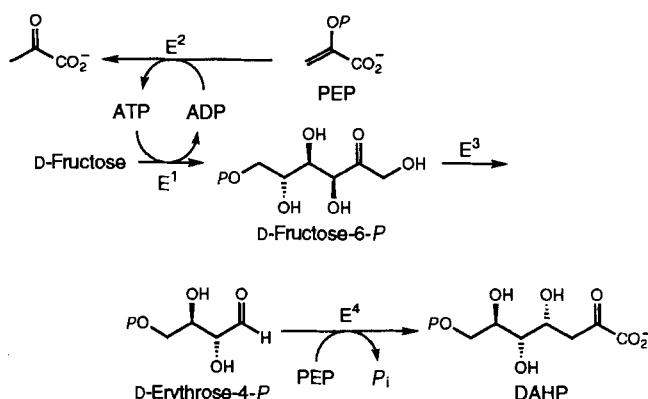
Schema 28. a) Synthese von längerkettenigen 2-Desoxyzuckern mit KDO-Aldolase; b) einige KDO-Derivate, die mit KDO-Aldolase synthetisiert wurden; c) Mechanismus der KDO-Aldolasereaktion: *re*-Seiten-Angriff des Nucleophils Nu; das kinetisch bevorzugt gebildete Produkt ist (*R*)-konfiguriert ( $R^1 = OH, R^2 = H$ ), das thermodynamisch bevorzugt gebildete (*S*)-konfiguriert ( $R^1 = H, R^2 = OH$ ).

siert die reversible Kondensation von Pyruvat und D-Arabinose zu KDO. Die Gleichgewichtskonstante der Spaltung beträgt  $K = 0.77 \text{ M}^{-1}$  (Schema 28). KDO und dessen aktivierte Form, Cytidinmonophosphat-KDO, spielen eine wichtige Rolle in der Synthese des in der Membranaußenschicht von Gram-negativen Bakterien vorkommenden Lipopolysaccharids (LPS)<sup>[101]</sup>. Analoga von KDO sind daher als potentielle Inhibitoren der LPS-Biosynthese und des LPS-Bindungsproteins von Interesse<sup>[102-107]</sup>. KDO-Aldolase wurde aus *E. coli*<sup>[108]</sup> sowie aus *Aerobacter cloacae*<sup>[109]</sup> isoliert und gereinigt. Erste Untersuchungen ergaben eine hohe Spezifität für KDO bei der Spaltung und eine etwas niedrigere bei der Kondensation. Eine Reihe von nichtnatürlichen Substraten, darunter D-Ribose, D-Xylose, D-Lyxose, L-Arabinose, D-Arabinose-5-phosphat und *N*-Acetylmannosamin, sind langsam reagierende Substrate (Umsetzungsgeschwindigkeit relativ zu D-Arabinose  $< 5\%$ )<sup>[108]</sup>. Das Substratspektrum der KDO-Aldolase aus *Aureobacter barkei* (Linie KDO-37-2) ist noch breiter: Triosen, Tetrosen, Pentosen und Hexosen werden von dieser Form des Enzyms umgesetzt<sup>[110]</sup>. Das Enzym ist spezifisch für Substrate mit einer (*R*)-Konfiguration an C-3, während die Konfiguration an C-2 variiert werden kann. Unter kinetischer Kontrolle ist die (*S*)-, unter thermodynamischer die (*R*)-Konfiguration an C-2 bevorzugt. Mit diesem Enzym wurden mehrere Aldoladditionen in präparativem Maßstab durchgeführt, einschließlich der Synthese von KDO, das in 67% Ausbeute isoliert wurde. In allen Fällen wird die Carbonylgruppe des Acceptors von der *re*-Seite durch Pyruvat angegriffen.

3-Desoxy-D-manno-2-octulosonat-8-phosphat-Synthetase, auch bekannt als 8-Phospho-2-keto-3-desoxyoctanoat(KDO-8-P)-Synthetase, katalysiert die irreversible Aldolreaktion von PEP und D-Arabinose-5-phosphat zu KDO-8-P<sup>[111]</sup>. Das Enzym wurde aus *E. coli*<sup>[112]</sup> und aus *Pseudomonas aeruginosa*<sup>[113]</sup> isoliert. Die KDO-8-P-Synthetase aus *E. coli* wurde geklont und in *E. coli* sowie in *Salmonella typhimurium* überexprimiert<sup>[114]</sup>. Eine erste Anwendung des Enzyms war die Synthese von KDO-8-P<sup>[112]</sup>, wobei das Ausgangsmaterial, D-Arabinose-5-phosphat, durch Phosphorylierung von D-Arabinose mit Hexokinase<sup>[108]</sup> oder durch enzymatische Isomerisierung von D-Ribose-5-phosphat<sup>[113]</sup> gewonnen wurde. Bisher wurde die Substratspezifität der KDO-8-P-Synthetase noch nicht untersucht, doch nach vorläufigen Untersuchungen weist dieses Enzym eine hohe Spezifität für die natürlichen Substrate auf.

### 3.7. 3-Desoxy-D-arabino-2-heptulosonsäure-7-phosphat-(DAHP)-Synthetase [EC 4.1.2.15]

DAHP, auch bekannt als Phospho-2-keto-3-desoxyheptanoat, ist ein wichtiges Intermediat bei der pflanzlichen Biosynthese von aromatischen Aminosäuren über Shikimisäure<sup>[115]</sup>. In vivo katalysiert DAHP-Synthetase die Synthese von DAHP aus PEP und D-Erythrose-4-phosphat<sup>[116]</sup>. Das Enzym wurde geklont und für die Synthese von DAHP verwendet (Schema 29)<sup>[117]</sup>. Dazu wurde D-Erythrose-4-phosphat in situ aus Fru-6-P mit Transketolase in Gegenwart von D-Ribose-5-phosphat hergestellt. Als Ausgangsmaterial wurde D-Fructose ver-



Schema 29. Multienzmysynthese von DAHP. E<sup>1</sup>: Hexokinase; E<sup>2</sup>: Pyruvatkinase; E<sup>3</sup>: Transketolase + D-Ribose-5-P; E<sup>4</sup>: DAHP-Synthetase.

wendet, die durch Hexokinase mit ATP in Gegenwart eines ATP-Regenerierungssystems in das 6-Phosphat überführt wurde. Weitere Untersuchungen dieses Enzymsystems ergaben, daß es einfacher und kostengünstiger ist, ganze Zellen einzusetzen, die ein DAHP-Synthetase-Plasmid enthalten<sup>[118]</sup>. Ein solches Zellsystem beinhaltet auch alle weiteren notwendigen Enzyme für die Synthese von DAHP. Zur Substratspezifität der DAHP-Synthetase ist bisher wenig bekannt.

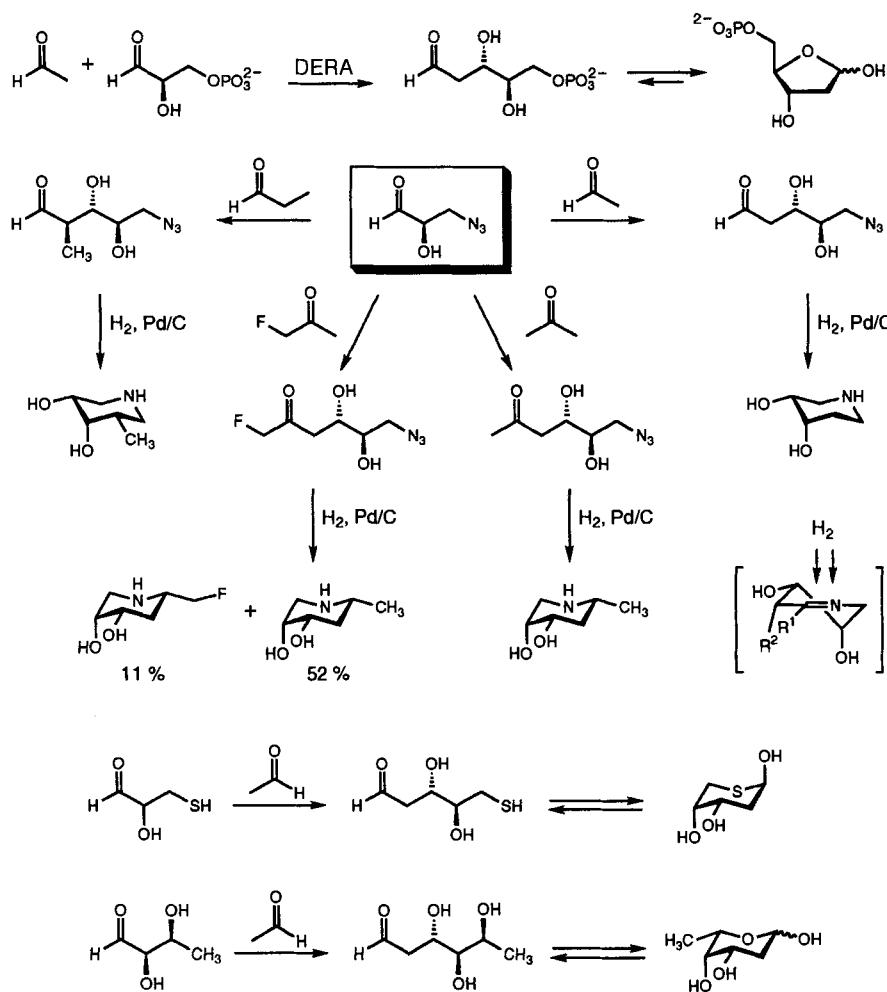
phosphat, 2-Phosphoglycolaldehyd,  $\alpha$ -Ribose-5-phosphat,  $\alpha$ , $\beta$ -Glycerinaldehyd,  $\alpha$ -Erythrose und  $\alpha$ -Threose, aber nicht  $\alpha$ -Ribose oder Glycolaldehyd<sup>[124b]</sup>. Nur Propionaldehyd kann Acetaldehyd als Donor ersetzen, was allerdings zu wesentlich geringeren Reaktionsgeschwindigkeiten führt. Das Enzym aus *E. coli* kann darüber hinaus Aceton und Fluoraceton als Donoren nutzen<sup>[123]</sup>. Das Acceptorspektrum umfaßt aliphatische Aldehyde, Zucker und Zuckerphosphate. Allerdings verläuft die Reaktion in einigen Fällen sehr langsam (0.4–1% verglichen mit dem natürlichen Substrat). Unter den mit DERA aus *E. coli* synthetisierten Verbindungen befinden sich eine Fluorketose und ein Trideoxyazazucker (Schemma 30).

Außer Hydroxy- und Azidoaldehyden lassen sich auch Thioaldehyde als Acceptorsubstrate verwenden, wodurch 5-Des-oxy-5-thiazucker zugänglich werden (Schema 31). Auch andere Aldolasen, wie die DHAP-abhängigen, können Thioaldehyde als Substrate verwenden, und auf diese Weise sind eine Reihe von Desoxythioldosen und Thioketosen synthetisiert worden<sup>[125]</sup>. DERA katalysiert darüber hinaus sequentielle Aldolreaktionen mit drei Aldehydsubstraten<sup>[125]</sup>.

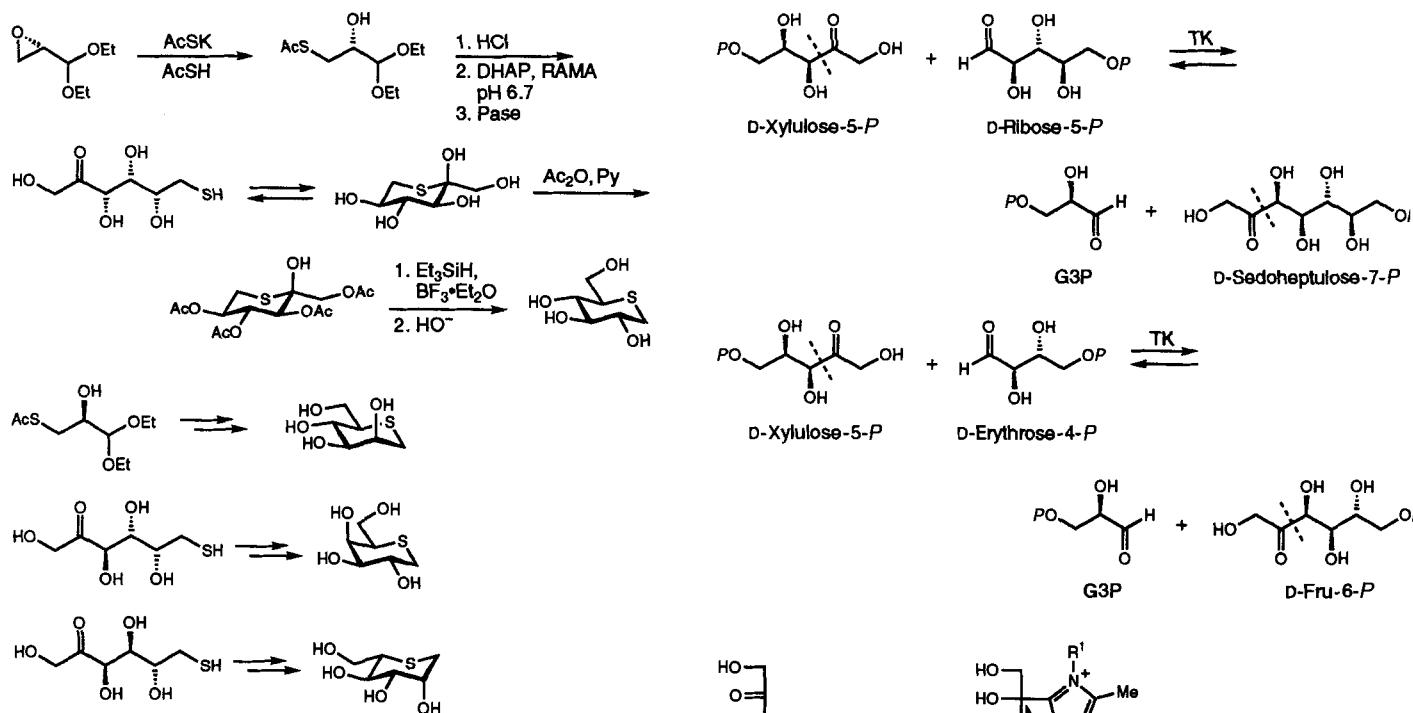
### 3.8. 2-Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase (DERA) [EC 4.1.2.4]

Das Enzym DERA<sup>[119]</sup> nimmt eine Sonderstellung unter den Aldolasen ein, da es einen Aldehyd als Donor (und als Acceptor) verwendet. In vivo katalysiert das Enzym die reversible Kondensation von Acetaldehyd und G3P zu D-2-Desoxyribose-5-phosphat (Schema 30). Die Gleichgewichtskonstante beträgt  $2 \times 10^{-4}$  M. DERA zählt zu den Typ-I-Aldolasen und wurde sowohl aus Tieren<sup>[120]</sup> als auch aus einigen Mikroorganismen<sup>[121]</sup> isoliert. Das *E. coli*-Gen, das dieses Enzym kodiert, wurde sequenziert, subkloniert<sup>[122]</sup> und anschließend in *E. coli* überexprimiert<sup>[123]</sup>. Bei 25 °C und pH = 7.5 ist das Enzym recht stabil und weist nach 10 Tagen etwa 70% seiner ursprünglichen Aktivität auf.

DERA akzeptiert eine Reihe von nicht-natürlichen Substraten. Das neu gebildete stereogene Zentrum ist stets (S)-konfiguriert. Untersuchungen zur Substratspezifität wurden am Enzym aus *Lactobacillus plantarum* (spezifische Aktivität ca. 6000 U mg<sup>-1</sup> bezüglich der Kondensation)<sup>[124]</sup> und aus dem *E. coli* (spezifische Aktivität 21 U mg<sup>-1</sup> für die Spaltung)<sup>[123]</sup> durchgeführt. Das Enzym aus *L. plantarum* akzeptiert unterschiedliche Acceptorsubstrate, darunter L-G3P, D-Erythrose-4-



Schema 30. Synthese von N-, S- und O-Heterocyclen mit DERA.

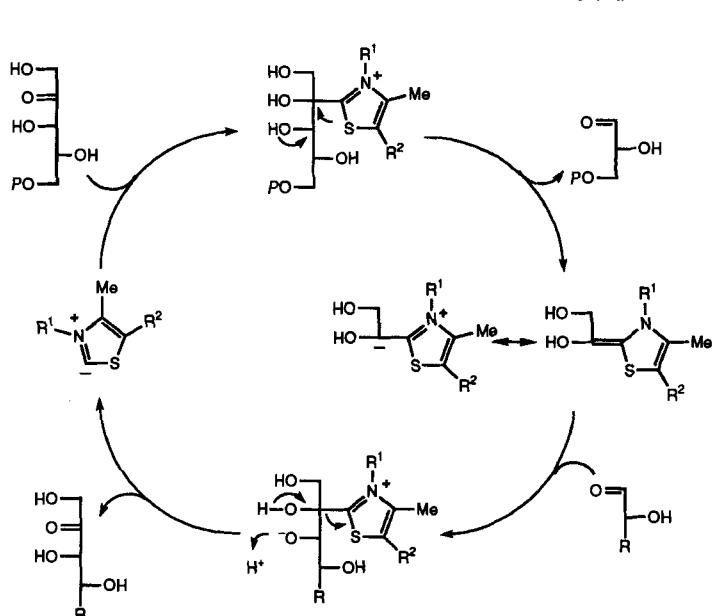


Schema 31. Synthese von Desoxythiozuckern mit Aldolasen. Die Ketosen in den letzten beiden Zeilen wurden Fuc-1-P- bzw. Rha-1-P-Aldolase-katalysiert hergestellt.

#### 4. Ketol- und Aldoltransferreaktionen

##### 4.1. Transketolase (TK) [EC 2.2.1.1]

Transketolase (TK)<sup>[126]</sup> ist ein Enzym des Pentosephosphatwegs und transferiert reversibel die C-1/C-2-Ketoleinheit von D-Xylulose-5-phosphat auf D-Ribose-5-phosphat, wodurch D-Sedoheptulose-7-phosphat und G3P entstehen. Das Enzym benötigt die Cofaktoren Thiaminpyrophosphat (TPP) und  $Mg^{2+}$ . TK aus Bäckerhefe<sup>[127]</sup> ist im Handel erhältlich. Weiterhin wurde das Enzym aus Spinat isoliert<sup>[128, 129]</sup>. TK aus Hefe zeigt eine etwas bessere Diastereoselektivität (ca. 100%)<sup>[129]</sup> als das Enzym aus Spinat (ca. 95%). In beiden Fällen ist das neu gebildete stereogene Zentrum (S)-konfiguriert. Außer auf D-Ribose-5-phosphat kann die Ketoleinheit auch auf D-Erythrose-4-phosphat übertragen werden, was zur Bildung von D-Fru-6-P und G3P führt (Schema 32). Weiterhin kann auch  $\beta$ -Hydroxybrenztraubensäure (engl.  $\beta$ -hydroxypyruvic acid, HPA) als Ketoldonor fungieren<sup>[130]</sup>; deren Ketoleinheit wird mit einer Geschwindigkeit von 4% relativ zu der bei der Umsetzung von D-Xylulose-5-phosphat übertragen<sup>[128]</sup>, was aber dadurch mehr als aufgewogen wird, daß die Transferreaktion wegen der Abspaltung von Kohlendioxid irreversibel ist. Der Versuch, HPA durch andere  $\alpha$ -Ketosäuren, wie 2,3-Dioxopropionsäure, 3-Hydroxy-2-oxobuttersäure, 2-Oxomalonsäure oder 2-Oxogluconsäure, zu ersetzen, schlug fehl<sup>[131]</sup>. Als Ketolacceptoren läßt sich eine breite Palette von Aldehyden verwenden, darunter aliphatische,  $\alpha, \beta$ -ungesättigte, aromatische und heterocyclische<sup>[131, 132]. Eine Hydroxy- oder Ketofunktion an C-2 und/oder C-3 wirkt sich reaktionsbeschleunigend aus, während sterisch anspruchsvolle Substituenten in der Nähe der Aldehydfunktion die Reak-</sup>



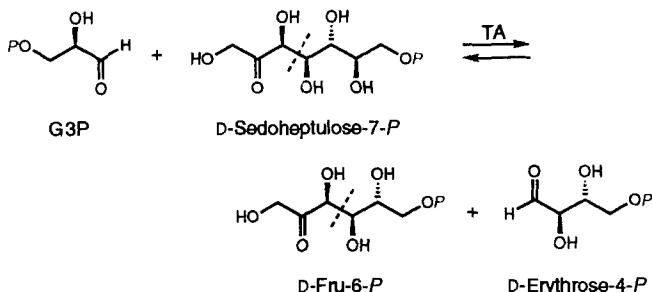
Schema 32. Durch Transketolase (TK) katalysierte Ketoltransferreaktionen aus dem Pentosephosphatweg sowie Mechanismus der Transketolisierung.

tion verlangsamen. Racemische Gemische aus  $\beta$ -Hydroxyaldehyden kann man mit Transketolase trennen, da nur die (2R)-konfigurierten Enantiomere reagieren, wodurch man 3,4-D-threo-konfigurierte Produkte erhält<sup>[131, 133]</sup>. Anderweitig scheint das Enzym keine stereochemische Präferenz aufzuweisen.

Als Beispiele für die Verwendung von TK sind die Synthese von (+)-*exo*-Brevicomin<sup>[134]</sup> und die von 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol<sup>[135]</sup> zu nennen. In beiden Synthesen wird die Ketoleinheit von HPA stereoselektiv ausschließlich auf das D-Enantiomer des racemischen 2-Hydroxyaldehyds übertragen.

##### 4.2. Transaldolase (TA) [EC 2.2.1.2]

Wie Transketolase ist auch Transaldolase (TA) ein Enzym aus dem Pentosephosphatweg<sup>[126]</sup>. TA, die intermediär eine Schiff-



Schema 33. Durch Transaldolase (TA) katalysierte Aldoltransferreaktionen aus dem Pentosephosphatweg.

Base bildet, katalysiert den reversiblen Transfer der C-1/C-3-Aldeleinheit von D-Sedoheptulose-7-phosphat auf G3P, was zur Bildung von D-Fru-6-P und D-Erythrose-4-phosphat führt (Schema 33). Obwohl kommerziell erhältlich, wurde das Enzym bisher kaum in der organischen Synthese eingesetzt und entsprechend wenig ist über das Substratspektrum bekannt. Ein Beispiel hierzu ist die Synthese von D-Fructose aus Stärke<sup>[135]</sup>. Dabei wurde die Aldoleinheit im letzten Schritt dieser Multienzymsynthese von Fru-6-P auf D-Glycerinaldehyd übertragen.

## Zusammenfassung

Enzymatische Aldolreaktionen sind eine neue, nützliche Methode zur Synthese von Monosacchariden und verwandten Verbindungen. Die Produkte sind interessant für die Untersuchung der auf Kohlenhydraten basierenden biologischen Erkennungsprozesse und als Bausteine für die Synthese von komplexen Oligosacchariden. In diesem Aufsatz wird nur ein Teil der mehr als zwanzig bisher isolierten Aldolasen diskutiert, von denen bereits einige kloniert und überexprimiert worden sind. Wegen ihrer hohen Stereoselektivität und ihrer Flexibilität bezüglich des Acceptors sollten sich Aldolasen und Transaldolasen in Zukunft wachsender Popularität bei der Synthese von Kohlenhydraten erfreuen, wo sie die vorhandenen enzymatischen (mit Oxidoreduktasen und Lipasen) und chemischen Methoden sinnvoll ergänzen.

Eingegangen am 31. Januar 1994 [A 47a]  
Übersetzt von Martin Hendrix, La Jolla, CA

- [1] J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman, *Application of Biochemical Systems in Organic Chemistry*, Wiley, New York, 1976; C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* 1985, 97, 617; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1985, 24, 617; H. Yamada, S. Shimizu, *ibid.* 1988, 100, 640 bzw. 1988, 27, 622; C.-S. Chen, C. J. Sih, *ibid.* 1989, 101, 711 bzw. 1989, 28, 695; C.-H. Wong, *Science* 1989, 244, 1145; A. M. Klibanov, *Acc. Chem. Res.* 1990, 23, 114; V. Schellenberger, H.-D. Jakubke, *Angew. Chem.* 1991, 103, 1440; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 1437; H. Waldmann, *Kontakte* 1991 (2) 33; S. David, C. Auge, C. Gautheron, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1991, 49, 175; W. D. Fessner, *Kontakte* 1992 (3), 3; *ibid.* 1993 (1), 23; U. Korf, J. Thiem, *ibid.* 1992 (1), 3.
- [2] H. G. Davies, R. H. Green, D. R. Kelly, S. M. Roberts, *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry*, Academic Press, London, 1989.
- [3] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin, 1992.
- [4] S. M. Roberts, K. Wiggins, G. Casy, *Preparative Biotransformations*, Wiley, London, 1992.

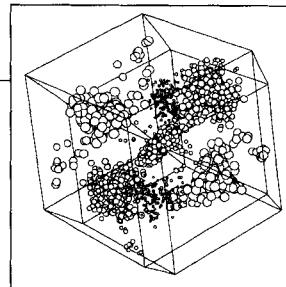
- [5] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, London, 1994.
- [6] R. A. Lerner, S. J. Benkovic, P. G. Schultz, *Science* 1991, 252, 659; P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Acc. Chem. Res.* 1991, 26, 391.
- [7] G. P. Smith, *Science* 1985, 228, 1315; J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell, *Nature (London)* 1990, 348, 552.
- [8] T. R. Cech, *Science* 1987, 236, 1532; *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1992, 2, 605.
- [9] A. Varki, *Glycobiology* 1993, 3, 97; A. Kobata, *Acc. Chem. Res.* 1993, 26, 319; K. G. Rice, Y. C. Lee, *Adv. Enzymol.* 1993, 66, 41; S. Hakomori, *Cancer Res.* 1985, 45, 2405; N. Sharon, H. Lis, *Sci. Am.* 1993, 268, 82; W. I. Weiss, K. Drickamer, W. A. Hendrickson, *Nature (London)* 1992, 360, 127; J. P. Carver, *Pure Appl. Chem.* 1993, 65, 763; R. U. Lemieux, *Chem. Soc. Rev.* 1989, 18, 347.
- [10] L. A. Lasky, *Science* 1992, 258, 964; J. C. Paulson in *Adhesion: Its Role in Inflammatory Disease* (Hrsg.: J. Harlan, D. Liu), Freeman, New York, 1992, S. 19; T. Feizi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1993, 3, 701.
- [11] A. T. Beyer, J. E. Sadler, J. I. Rearick, J. C. Paulson, R. L. Hill, *Adv. Enzymol.* 1981, 52, 24.
- [12] D. A. Ashford, *Curr. Opin. Biotechnol.* 1992, 3, 45; C. Edge, R. Parkh, T. Rademacher, M. Wormald, R. Dwek, *Nature (London)* 1992, 358, 693; A. Kobata, *Anal. Biochem.* 1979, 100, 1.
- [13] K. G. I. Nilsson, *Trends Biotechnol.* 1988, 6, 256.
- [14] Y. Ichikawa, G. C. Look, C.-H. Wong, *Anal. Biochem.* 1992, 202, 215.
- [15] G. C. Look, C. H. Fotsch, C.-H. Wong, *Acc. Chem. Res.* 1993, 26, 182.
- [16] Übersichtsartikel zu Glycosidaseinhibitoren: A. D. Elbein, *Annu. Rev. Biochem.* 1987, 56, 497; L. E. Fellows, *Chem. Br.* 1987, 23, 842; B. Winchester, G. W. Fleet, *Glycobiology* 1992, 2, 199. Für ein Bisubstratanalogen-Inhibitor von Glycosyltransferasen siehe: M. M. Palcic, L. D. Heerze, O. P. Srivastava, O. Hindsgaul, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 17174.
- [17] a) Siehe Lit. [11]; b) G. Schwarzmüller, K. Sandhoff, *Biochemistry* 1990, 29, 10865; H. Wiegandt in *New Comprehensive Biochemistry* (Hrsg.: A. Neuberger, L. L. M. van Deenen), Elsevier, Amsterdam, 1985, S. 199–260; c) Siehe Lit. [305]; d) M. G. Low, A. R. Saltiel, *Science* 1988, 239, 268; e) J. Choay, J.-C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinay, J. Fareed, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1981, 370, 664; f) M. Cygler, D. R. Rose, D. R. Bundle, *Science* 1991, 253, 442; g) Übersichtsartikel: K. C. Nicolaou, W.-M. Dai, *Angew. Chem.* 1991, 103, 1453; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1991, 30, 1387; h) Übersichtsartikel: J. Denarie, J. Cullimore, *Cell* 1993, 74, 951; i) S. E. Fishman, K. Cox, J. L. Larson, P. A. Reynolds, E. T. Seno, W.-K. Yeh, R. van Frank, C. L. Hershberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 8248; j) Übersichtsartikel: C. A. A. van Boeckel, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 1986, 105, 35; k) Übersichtsartikel: S. Masamune, G. S. Bates, J. W. Corcoran, *Angew. Chem.* 1977, 89, 602; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1977, 16, 585; l) M. L. Zapp, S. Stern, M. R. Green, *Cell* 1993, 74, 969; m) L. Anderson, F. M. Unger, *Bacterial Lipopolysaccharides (ACS Symp. Ser.* 1983, 231); n) J. van Brunt, *Bio/Technology* 1986, 4, 780; o) H. Baumann, J.-R. Brisson, F. Michon, R. Pon, H. J. Jennings, *Biochemistry* 1993, 32, 4007; p) T. Boren, P. Falk, K. A. Roter, G. Larson, S. Normark, *Science* 1993, 262, 1892; q) siehe Zitat 330 in C.-H. Wong, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, T. Kajimoto, *Angew. Chem.* 1995, 107, Nr. 5; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, Nr. 5.
- [18] D. J. Kuo, I. A. Rose, *Biochemistry* 1985, 24, 3947; I. A. Rose, J. V. B. Warms, *ibid.* 1985, 24, 3952.
- [19] J. T. Kadonaga, J. R. Knowles, *Biochemistry* 1983, 22, 130; J. G. Belasco, J. R. Knowles, *ibid.* 1983, 22, 122.
- [20] J. Sygusch, D. Beaudy, M. Allaix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 7846.
- [21] D. G. E. Lubini, P. Christen Lubini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 2527; C. Y. Lai, N. Nakai, D. Chang, *Science* 1974, 183, 1204.
- [22] W. J. Lees, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 1983, 58, 1887.
- [23] A. J. Morris, D. R. Tolan, *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 1095.
- [24] C. H. von der Osten, A. J. Sinskey, C. F. Barbas, Jr., R. L. Pederson, Y.-F. Wang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 3924; I. Henderson, E. Garcia-Junceda, K. K.-C. Liu, Y.-L. Chen, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* 1994, 2, 837.
- [25] M. D. Bednarski, E. S. Simon, N. Bischofberger, W.-D. Fessner, M.-J. Kim, W. Lees, T. Saito, H. Waldmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 627.
- [26] C. H. von der Osten, C. F. Barbas III, C.-H. Wong, A. J. Sinskey, *Mol. Microbiol.* 1989, 3, 1625.
- [27] P. R. Alefounder, S. A. Baldwin, R. N. Perham, N. Short, *Biochem. J.* 1989, 257, 529.
- [28] H. G. Schweißer, S. D. Kohlwein, F. Paltauf, *Eur. J. Biochem.* 1989, 180, 301.
- [29] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 1983, 48, 3199.
- [30] C.-H. Wong, F. P. Mazonod, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 1983, 48, 3493.
- [31] J. R. Durrwachter, D. G. Drueckhammer, K. Nozaki, H. M. Sweers, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 7812.
- [32] J. R. Durrwachter, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* 1988, 53, 4175.

- [33] T. Ziegler, A. Straub, F. Effenberger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 737; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 716.
- [34] R. L. Pederson, M.-J. Kim, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4645.
- [35] A. Straub, F. Effenberger, P. Fischer, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3926.
- [36] N. J. Turner, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 624.
- [37] C. W. Borysenko, A. Spaltenstein, J. A. Straub, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9275.
- [38] W. Schmid, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9670.
- [39] M. D. Bednarski, H. J. Waldmann, G. M. Whitesides, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5807. Fructose- und Sorbosediphosphat sind bessere Substrate als die entsprechenden 1-Phosphate: O. C. Richards, W. J. Rutter, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 3185.
- [40] N. Bischofberger, H. Waldmann, T. Saito, E. S. Simon, W. Lees, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3457; siehe auch Lit. [44b].
- [41] D. C. Crans, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7019; D. C. Crans, R. J. Kazlauskas, B. L. Hirschbein, C.-H. Wong, O. Abril, G. M. Whitesides, *Methods Enzymol.* **1987**, *136*, 263. Zur Synthese von Phosphoenolpyruvat siehe B. L. Hirschbein, F. P. Mazenod, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3765.
- [42] R. L. Pederson, J. Esker, C.-H. Wong, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2643.
- [43]  $\text{POCl}_3$ : F. Effenberger, A. Straub, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 1641;  $(\text{PhO})_2\text{POCl}$ : R. L. Colbran, J. K. N. Jones, N. K. Matheson, I. Rozema, *Carbohydr. Res.* **1967**, *4*, 355; S.-H. Jung, J.-H. Jeong, P. Miller, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7182.
- [44] a) W.-D. Fessner, C. Walter, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 643; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 614; b) W.-D. Fessner, G. Sinerius, *ibid.* **1994**, *106*, 217 bzw. **1994**, *33*, 209.
- [45] D. G. Druckhammer, J. R. Durrwachter, R. L. Pederson, D. C. Crans, L. Daniels, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 70.
- [46] A. S. Serianni, E. Cadman, J. Pierce, M. L. Hayes, R. Barker, *Methods Enzymol.* **1982**, *89*, 83.
- [47] C.-H. Wong, G.-J. Shen, R. L. Pederson, Y.-F. Wang, W. J. Hennen, *Methods Enzymol.* **1991**, *202*, 591.
- [48] C.-H. Wong, D. G. Druckammer, H. M. Sweers, *Fluorinated Carbohydrates: Chemical and Biochemical Aspects* (Hrsg.: N. F. Taylor) (ACS Symp. Ser. **1988**, *374*, 2942).
- [49] R. L. Pederson, K. K.-C. Liu, J. F. Rutan, L. Chen, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4897.
- [50] A. D. Elbein, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 497.
- [51] T. Kajimoto, K. K.-C. Liu, R. L. Pederson, Z. Zhong, Y. Ichikawa, J. A. Porco, Jr., C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6187.
- [52] R. R. Hung, J. A. Straub, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3849.
- [53] a) K. K.-C. Liu, T. Kajimoto, L. Chen, Z. Zhong, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6280; b) T. Kajimoto, L. Chen, K. K.-C. Liu, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6678.
- [54] Y.-F. Wang, D. P. Dumas, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 403.
- [55] M. Schultz, H. Waldmann, W. Vogt, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 867.
- [56] W.-D. Fessner, J. Badia, O. Eyrisch, A. Schneider, G. Sinerius, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5231.
- [57] K. K.-C. Liu, R. L. Pederson, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2669.
- [58] Y. Takaoka, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4809.
- [59] I. Henderson, K. Laslo, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 359.
- [60] K. K.-C. Liu, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4789.
- [61] C. A. Collyer, K. Henrick, D. M. Blow, *J. Mol. Biol.* **1990**, *212*, 211.
- [62] T.-H. Chiu, D. S. Feingold, *Biochemistry* **1969**, *8*, 98; Y. Takagi, *Methods Enzymol.* **1966**, *9*, 542; T.-H. Chiu, R. Otto, J. Power, D. S. Feingold, *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *127*, 249.
- [63] A. Ozaki, E. J. Toone, C. H. von der Osten, A. Sinskey, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4970.
- [64] W.-D. Fessner, G. Sinerius, A. Schneider, M. Dreyer, G. E. Schulz, J. Badia, J. Aguilar, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 596; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 555.
- [65] W. J. Lees, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* **1992**, *20*, 173.
- [66] V. L. Crow, T. D. Thomas, *J. Bacteriol.* **1982**, *151*, 600; D. L. Bissett, R. L. Anderson, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8750; R. J. van Rooijen, S. van Schalkwijk, W. M. de Vos, *ibid.* **1991**, *266*, 7176.
- [67] W.-D. Fessner, O. Eyrisch, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 76; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 56.
- [68] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K.-S. Jeong, H.-L. Kwong, K. Morikawa, Z.-M. Wang, D. Xu, X.-L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768; zit. Lit.
- [69] I. Henderson, K. B. Sharpless, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 558.
- [70] D. B. Berkowitz, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5497.
- [71] C. R. Johnson, A. Golebiowski, D. H. Steensma, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9414.
- [72] C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532.
- [73] D. G. Comb, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2529; P. Brunett, G. W. Jourdian, S. Roseman, *ibid.* **1962**, *237*, 2447; G. H. Devries, S. B. Binkley, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *151*, 234.
- [74] Y. Uchida, Y. Tsukada, T. Sugimori, *J. Biochem. (Tokyo)* **1984**, *96*, 507; Y. Uchida, Y. Tsukada, T. Sugimori, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 181.
- [75] C. M. Deijl, J. F. G. Vliegenthart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *111*, 668.
- [76] R. S. Blacklow, L. Warren, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3520; R. I. Merker, F. A. Troy, *Glycobiology* **1990**, *1*, 93; L. Warren, R. S. Blacklow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1962**, *7*, 433.
- [77] K. Aisaka, S. Tamura, Y. Arai, T. Uwajima, *Biotechnol. Lett.* **1987**, *9*, 633; DNA-Sequenz des NeuAc-Aldolase-Gens: B. Kawakami, T. Kudo, Y. Narahashi, K. Horikoshi, *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50*, 2155.
- [78] C. Auge, S. David, C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *25*, 4663.
- [79] C. Auge, S. David, C. Gautheron, A. Veyrieres, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2439.
- [80] C. Auge, C. Gautheron, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 859.
- [81] W. M.-J. Kim, J. Hennen, H. M. Sweers, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6481.
- [82] J. L.-C. Liu, G.-J. Shen, Y. Ichikawa, J. R. Rutan, C. Zapata, W. F. Vann, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3901.
- [83] M. D. Bednarski, H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1283.
- [84] Y. Ichikawa, J. L.-C. Liu, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6300.
- [85] E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7159.
- [86] U. Kragl, D. Gygax, O. Ghisalba, C. Wandrey, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 854; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 827.
- [87] A. K. Shukla, R. Schauer, *Anal. Biochem.* **1986**, *158*, 158.
- [88] C. Auge, S. David, C. Gautheron, A. Malleron, B. Cavaye, *New J. Chem.* **1988**, *12*, 733.
- [89] A. Schrell, G. M. Whitesides, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 1111.
- [90] C. Auge, C. Gautheron, S. David, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 201.
- [91] R. Brossmer, U. Rose, D. Kasper, T. L. Smith, H. Grasmuk, F. M. Unger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *96*, 1282.
- [92] R. Schauer, *Trends Biochem. Sci.* **1985**, *10*, 357; A. P. Corfield, R. Schauer in *Sialic Acids* (Hrsg.: R. Schauer), Springer, New York, **1982**, S. 195; J. C. Paulson, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 272.
- [93] D. C. Druckammer, W. J. Hennen, R. L. Pederson, C. F. Barbas III, C. M. Gautheron, T. Krach, C.-H. Wong, *Synthesis* **1991**, 499.
- [94] S. David, C. Auge, C. Gautheron, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1991**, *49*, 175; R. L. Halcomb, W. Fitz, C.-H. Wong, *Tetrahedron Asymmetry*, **1994**, *5*, 2437.
- [95] A. Spaltenstein, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 686.
- [96] J. O. Nagy, M. D. Bednarski, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3953; W. Spevak, J. O. Nagy, D. H. Charych, M. E. Schaefer, J. H. Gilbert, M. D. Bednarski, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1146.
- [97] C. Auge, B. Bouxom, B. Cavaye, C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2217.
- [98] a) C. Gautheron-Le Narvor, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7816; b) C.-H. Lin, T. Sugai, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *ibid.* **1992**, *114*, 10138.
- [99] P. Zhou, H. M. Salleh, J. F. Honek, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 264.
- [100] R. L. Halcomb, C.-H. Wong, unveröffentlicht.
- [101] C. R. H. Raetz, W. Dowhan, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1235.
- [102] R. R. Schumann, S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, *Science* **1990**, *249*, 1429.
- [103] S. M. Hammond, A. Claesson, A. M. Jansson, L.-G. Pring, C. M. Town, B. Ekstrom, *Nature (London)* **1987**, *327*, 730; K. Luthman, M. Orbe, T. Wählund, A. Claesson, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3777.
- [104] F. O. Andersson, B. Claesson, B. Samuelsson, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4699.
- [105] D. W. Norbeck, J. B. Kramer, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 773.
- [106] P. H. Ray, J. E. Kelsey, E. C. Biogham, C. D. Benedict, T. A. Miller, *Bacterial Lipopolysaccharides* (ACS Symp. Ser. **1983**, *231*, 141).
- [107] S. J. Danishefsky, M. P. Deninno, *Angew. Chem.* **1987**, *99*, 15; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 15.
- [108] M. A. Ghalambor, E. C. Heath, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 3222.
- [109] M. A. Ghalambor, E. C. Heath, *Methods Enzymol.* **1966**, *9*, 534.
- [110] T. Sugai, G.-J. Shen, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 413.
- [111] P. H. Ray, *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 635; P. H. Ray, *Methods Enzymol.* **1982**, *83*, 525.
- [112] M. D. Bednarski, D. C. Crans, R. DiCosimo, E. S. Simon, P. D. Stein, G. M. Whitesides, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 427.
- [113] D. H. Levin, E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2532.
- [114] M. Woisetschläger, G. Hogenauer, *J. Bacteriol.* **1986**, *168*, 437.
- [115] E. Haslam *The Shikimate Pathway* Butterworth, London **1974**.
- [116] D. B. Sprinson, P. R. Srinivasan, M. Katagiri, *Methods Enzymol.* **1962**, *5*, 394.
- [117] L. M. Reimer, D. L. Conley, D. L. Pompiano, J. W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 8010.
- [118] J. W. Frost, A. Berry, G. L. Disbrow, R. J. Staversky, J. C. Lievense, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3956.

- [119] E. Racker, *J. Biol. Chem.* **1952**, *196*, 347.
- [120] M. G. McGeown, F. H. Malpress, *Nature (London)* **1952**, *170*, 575.
- [121] P. A. Hoffee, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *126*, 795.
- [122] P. Valentin-Hansen, F. Boetius, K. Hammer-Jespersen, I. Svendsen, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *125*, 561.
- [123] C. F. Barbas III, Y.-F. Wang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2013; L. Chen, D. P. Dumas, C.-H. Wong, *ibid.* **1992**, *114*, 741.
- [124] a) W. E. Pricer, Jr., B. L. Horecker, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 1292; b) O. M. Rosen, P. Hoffee, B. L. Horecker, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 1517.
- [125] F. Effenberger, A. Straub, V. Null, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, *1297*; W.-C. Chou, L. Chen, J.-M. Fang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6191. Zu sequentiellen Aldolreaktionen siehe H. J. M. Gijssen, C.-H. Wong, *ibid.*, **1994**, *116*, 8422.
- [126] E. Racker in *The Enzymes*, Vol. V (Hrsg.: P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback), Academic Press, New York, 1961, S. 397; A. Mocali, D. Aldinucci, F. Paoletti, *Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 288.
- [127] DNA-Sequenz der Transketolase aus Hefe: T. S. Fletcher, I. L. Kwee, T. Nakada, C. Largman, B. M. Martin, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1892.
- [128] J. Bolte, C. Demuynck, H. Samaki, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5525; G. R. Hobbs, M. D. Lilly, N. J. Turner, J. M. Ward, A. J. Willets, J. M. Woodley, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1993**, 165.
- [129] C. Demuynck, F. Fisson, I. Bennani-Baiti, H. Samaki, J.-C. Mani, *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 3073.
- [130] P. Srere, J. R. Cooper, M. Tabachnick, E. Racker, *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *74*, 295.
- [131] Y. Kobori, D. C. Myles, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5899.
- [132] C. Demuynck, J. Bolte, L. Hecquet, V. Dalmas, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5085.
- [133] F. Effenberger, V. Null, T. Ziegler, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5157.
- [134] D. C. Myles, P. J. Andrus III, G. M. Whitesides, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4835.
- [135] A. Moradian, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6980.

Y. Ohashi (ed.)

## Reactivity in Molecular Crystals



1993. XII, 348 pages. Hardcover. DM 198.00.  
ISBN 3-527-29098-2

Do you need to design syntheses that are

- highly selective
- fast
- enantioselective with quantitative enantiomeric yield?

This book describes in detail how best to exploit the enormous synthetic potential of solid state reactions. Written by leading experts, it provides in depth information on

- the theoretical and physico-chemical approach to solid state reactions
- solid-to-solid organic reactions
- stereoselective solid state photoreactions
- reactivity and crystal structure

An ideal companion to Bürgi and Dunitz's *Structure Correlation*, this book will be highly useful to synthetic organic chemists, stereochemists, crystallographers, and solid-state chemists.

To order please contact your bookseller or:

VCH, P.O. Box 10 11 61,  
D-69451 Weinheim,  
Telefax (0) 62 01 - 60 61 84  
VCH, Hardstrasse 10,  
P.O. Box, CH-4020 Basel  
VCH, 8 Wellington Court, Cambridge  
CB1 1HZ, UK  
VCH, 220 East 23rd Street,  
New York, NY 10010-4606, USA  
(toll free: 1-800-367-8249)  
VCH, Eikow Building,  
10-9 Hongo 1-chome,  
Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

