

# Enzyme in der organischen Synthese: das Problem der molekularen Erkennung von Kohlenhydraten (Teil 2)\*\*

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

Die molekulare Erkennung von Kohlenhydraten durch Proteine und Nucleinsäuren ist hochspezifisch, obwohl die Dissoziationskonstanten aufgrund der bei Kohlenhydraten fehlenden hydrophoben Gruppen in der Regel nur im millimolaren oder im oberen mikromolaren Bereich liegen. Die hohe Spezifität dieser schwachen Bindungen ist die Folge zahlreicher Wasserstoffbrückenbindungen und der Koordination von Metallatomen als Brücken zwischen Saccharid und Rezeptor. Zwar gibt es auch schwache hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Zuckerbausteinen und Proteinen, doch sind hauptsächlich die durch den anomeren und den *exo*-anomeren Effekt festgelegte räumliche Struktur (die Torsionswinkel an der glycosidischen Bindung variieren im allgemeinen wenig) und die topographische Orientierung der Hydroxygruppen so-

wie der Einfluß von geladenen Gruppen am Erkennungsprozeß beteiligt. Für ein Studium der Beziehung zwischen der Struktur und der Funktion komplexer Kohlenhydrate ist daher eine gezielte Veränderung der dreidimensionalen Form und der funktionellen Gruppen erforderlich, was in der Regel durch die Synthese von Oligosacchariden aus veränderten Monosaccharidbausteinen erreicht wird. Die Verfügbarkeit unterschiedlich modifizierter Monosaccharide für die Oligosaccharidsynthese und die Ergebnisse aus Strukturuntersuchungen (z.B. NMR- und Kristallstrukturanalysen von Zucker-Protein-Komplexen) sind die Grundlage für ein Verständnis der Erkennung komplexer Oligosaccharide. Das Ziel ist die Entwicklung neuer Verbindungen, die nicht aus Saccharideinheiten bestehen und leicht zu synthetisieren sind, um sie als

neue Liganden für Oligosaccharidrezeptoren oder als Enzyminhibitoren (z.B. für Glycosidasen und Glycosyl-Transferasen) einzusetzen. Wichtig ist dabei eine gute Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen. Im ersten Teil dieses Aufsatzes haben wir einige Ansätze zur Synthese von Monosacchariden und ihren Analoga beschrieben. Hier wenden wir uns der enzymatischen und der chemoenzymatischen Synthese von Oligosacchariden und ihren Analoga zu, wobei wir ein besonderes Augenmerk auf die an der Erkennung von E-Selectin beteiligten Verbindungen legen. Weiterhin diskutieren wir Strategien zur Inhibierung von Glycosidasen und Glycosyl-Transferasen.

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

## 5. Enzymatische Knüpfung von glycosidischen Bindungen

Zwei Enzymgruppen werden in der Natur zur Biosynthese von Oligosacchariden eingesetzt: die Enzyme des Leloir-Weges<sup>[136]</sup> und die aus Nicht-Leloir-Wegen. Die Enzyme des Leloir-Weges sind maßgeblich an der Synthese der Mehrzahl aller N- und O-verknüpften Glycoproteine und anderer Glyco-

konjugate in Säugetieren beteiligt. Die N-verknüpften Oligosaccharide sind durch eine  $\beta$ -glycosidische Bindung zwischen einem GlcNAc-Rest und dem Stickstoffatom der Amidseitenkette eines Asparaginrestes gekennzeichnet. Die weniger weit verbreiteten O-verknüpften Glycoproteine weisen eine  $\alpha$ -glycosidische Bindung zwischen GalNAc (oder Xylose) und der Hydroxygruppe eines Serin- oder Threoninrestes auf. Die Proteine werden cotranslational im endoplasmatischen Reticulum und im Golgi-Apparat N- oder O-glycosyliert<sup>[11, 137]</sup>. Bei der Biosynthese von N-verknüpften Glycoproteinen wird im endoplasmatischen Reticulum ein Dolicholpyrophosphoryl oligosaccharid durch GlcNAc-Transferasen und Mannosyl-Transferasen gebildet. Dieses Glycokonjugat wird mehrfach glucosyliert, und der gesamte Oligosaccharidteil wird durch die Oligosaccharyl-Transferase auf einen Asn-Rest der wachsenden Peptidkette übertragen<sup>[137]</sup>. Asn liegt dabei normalerweise in der Sequenz Asn-X-Ser(Thr) vor ( $X \neq \text{Pro, Asp}$ )<sup>[137-141]</sup>. Vor dem Transport in den Golgi-Apparat werden die Glucoseeinheiten und einige Mannosereste durch die Glucosidasen I und II und eine

[\*] Prof. Dr. C.-H. Wong, Dr. 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 1: *Angew. Chem.* **1995**, 107, 453-474; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, Nr. 4. Die Numerierung der Kapitel, der Literaturstellen, der Schemata und der Tabellen wird im zweiten Teil fortgeführt.

Mannosidase entfernt. Dieser Prozeß wird als „Trimming“ bezeichnet und führt zur Freilegung eines Pentasaccharidkerns (Peptid-Asn-(GlcNAc)<sub>2</sub>-(Man)<sub>3</sub>). Dieser wird anschließend im Golgi-Apparat durch Mannosidasen und Glycosyl-Transferasen zu einem mannosereichen, zu einem komplexen oder zu einem hybriden Oligosaccharid umgesetzt. Danach werden schrittweise noch weitere Monosaccharide addiert.

Anders als bei der über Dolicholpyrophosphat verlaufenden Synthese von N-verknüpften Oligosacchariden befinden sich Glycosyl-Transferasen für die O-Glycosylierung im Golgi-Apparat<sup>[137]</sup>. Auch ist der biosynthetische Aufbau der O-verknüpften Glycopeptide grundsätzlich andersartig, da die Monosaccharide schrittweise addiert werden.

Mit Ausnahme der Erythrocyten besitzen alle Säugetierzellen die Fähigkeit zur Glycosylierung. In einigen Sekretionszellen ist der Anteil an Transferasen allerdings größer<sup>[142]</sup>.

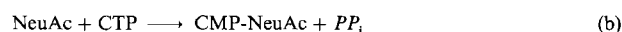
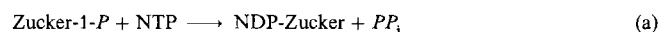
Die Glycosyl-Transferasen des Leloir-Weges setzen als Glycosyldonoren Monosaccharide um, die als Nucleosidmono- oder Nucleosiddiphosphate aktiviert sind<sup>[137]</sup>. Nicht-Leloir-Transferasen verwenden Glycosylphosphate als Donoren. Die Leloir-Glycosyl-Transferasen beschränken sich im wesentlichen auf acht Zuckernucleotide: UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-Gal, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc, UDP-GlcUA und CMP-NeuAc. Die zahlreichen anderen, bei Säugetieren anzutreffenden Monosaccharidbausteine, wie anionische oder sulfatierte Zucker in Heparin oder Chondroitinsulfat, werden normalerweise durch Modifizierung eines Zuckerbausteins nach dessen Einbau in das Oligosaccharid biosynthetisiert. Eine große Zahl unterschiedlicher Monosaccharide (z.B. Xylose, Arabinose, 3-Desoxy-manno-octulosonat (KDO), Desoxyzucker) und Oligosaccharide findet sich auch in Mikroorganismen, Pflanzen und Nichtvertebraten<sup>[143, 144]</sup>. Die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligten Enzyme sind bisher nur selten in der organischen Synthese eingesetzt worden, doch folgen sie den gleichen Prinzipien wie die Säugetierenzyme.

Die Glycosyl-Transferasen des Leloir- und des Nicht-Leloir-Weges<sup>[14, 145, 146]</sup> sind ebenso wie Glycosidasen<sup>[13]</sup> für die Synthese von Oligosacchariden und Glycokonjugaten verwendet worden. Zwar ist die Funktion von Glycosidasen in vivo die Spaltung von glycosidischen Bindungen, aber unter geeigneten Bedingungen können sie auch in synthetischer Richtung eingesetzt werden. Beide Enzymgruppen haben Vor- und Nachteile: Glycosyl-Transferasen sind hochspezifisch für die Bildung von Glycosiden, aber ihre geringe Verfügbarkeit ist begrenzt. Glücklicherweise ist wegen der neueren Fortschritte beim Genetic engineering und bei der Gewinnung rekombinanter Enzyme eine Besserung der Situation in Sicht. Glycosidasen sind in der Regel leichter verfügbar und kostengünstiger, aber weniger spezifisch als Glycosyl-Transferasen und liefern zudem die Produkte in schlechteren Ausbeuten. Für die Knüpfung von N-glycosidischen Bindungen, wie sie unter anderem in Nucleosiden vorkommen, stehen noch einige weitere enzymatische Methoden zur Verfügung.

## 5.1. Donorsubstrate für Glycosyl-Transferasen

Die Mehrzahl der von Glycosyl-Transferasen<sup>[137]</sup> verwendeten Zuckernucleosiddiphosphate werden in vivo aus den entspre-

chenden Monosacchariden aufgebaut. Der erste Schritt ist dabei eine Phosphorylierung zum Glycosylphosphat, die durch eine Kinase katalysiert wird. Anschließend wird das Glycosylphosphat durch eine Zuckernucleosiddiphosphat-Pyrophosphorylase katalysiert mit einem Nucleosidtriphosphat (NTP) zum Zuckernucleosiddiphosphat umgesetzt [Gl. (a)]. Andere Zuckernucleotide wie GDP-Fuc oder UDP-GlcUA werden durch weitere enzymatische Modifizierung dieser Schlüsselbausteine erhalten. Eine weitere Ausnahme ist CMP-NeuAc, das direkt aus NeuAc und CTP gebildet wird [Gl. (b)]. Einige Enzyme der Biosynthese von Zuckernucleotiden akzeptieren auch nichtnatürliche Substrate. Im allgemeinen sind die Reaktionsgeschwindigkeiten allerdings recht niedrig, was den Nutzen dieses Ansatzes begrenzt.



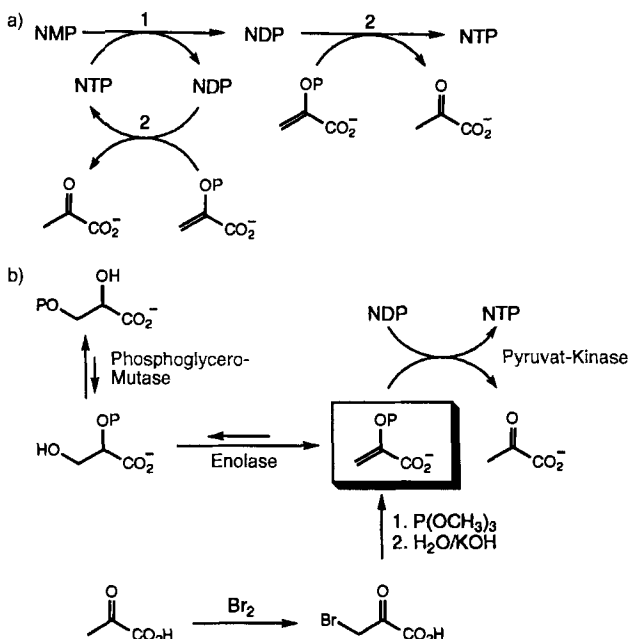
### 5.1.1. Die Synthese von Nucleosidtriphosphaten

Die chemische Synthese von Zuckernucleotiden ist bekannt<sup>[147]</sup>. In der Regel handelt es sich dabei um Reaktionen eines aktivierten Nucleosidmonophosphats (NMP)<sup>[148–152]</sup> mit einem Glycosylphosphat unter Bildung eines Zuckernucleosiddiphosphats. Als aktivierte NMP-Derivate verwendet man Phosphoramidate, besonders Phosphorimidazolidate<sup>[153–155]</sup> und Phosphormorpholide<sup>[148–152]</sup>. Diese NMP-Derivate lassen sich auch für die Synthese von Nucleosidtriphosphaten mit Pyrophosphat als Reaktionspartner einsetzen<sup>[155]</sup>. Für die Synthese von Glycosylphosphaten stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung: Die Reaktion eines Phosphats mit einem aktivierten Glycosyldonor<sup>[156]</sup> und die Phosphorylierung der freien anomeren Hydroxygruppe<sup>[151–153, 157]</sup> sind gleichermaßen nützlich. Auch Glycosylphosphate können erfolgreich eingesetzt werden<sup>[158]</sup>. Daneben gibt es enzymatische Methoden: Glycogen-Phosphorylase<sup>[159]</sup> und Sucrose-Phosphorylase<sup>[160]</sup> produzieren  $\alpha$ -Glucose-1-phosphat. Eine Alternative ist die Isomerisierung des mit Hexokinase erhältlichen Glucose-6-phosphats zu Glucose-1-phosphat durch Phosphogluco-Mutase<sup>[161]</sup>.

Die Zuckernucleotide werden in vivo aus den entsprechenden Nucleosidtriphosphaten synthetisiert. Eine praktikable Synthese von Nucleosidtriphosphaten im Labormaßstab ist daher eine Voraussetzung für die enzymatische Herstellung von Zuckernucleotiden.

Die meisten präparativen enzymatischen Synthesen von Nucleosidtriphosphaten gehen von käuflichen Nucleosidmonophosphaten aus. Eine Mischung aller Nucleosidmonophosphate kann durch partielle Verdauung von Hefe-RNA preiswert erhalten werden<sup>[162]</sup>. Auch sind die NMPs leicht chemisch zugänglich. Ausgehend von Nucleosidmonophosphaten sind zwei Kinase-katalysierte Phosphorylierungen notwendig, durch die zunächst das entsprechende Nucleosiddiphosphat und dann das Triphosphat gebildet werden. Für den zweiten Schritt stehen drei Kinasen zur Verfügung, die jeweils einen anderen Phosphoryldonor verwenden: Pyruvat-Kinase [EC 2.7.1.40] + Phosphoenolpyruvat (PEP)<sup>[163, 164]</sup>, Acetat-Kinase [EC 2.7.2.1] + Acetylphosphat und Nucleosiddiphosphat-Kinase [EC 2.7.4.6] + ATP. Unter diesen ist im allgemeinen der Pyruvat-Kinase der

Vorzug zugeben, da sie preiswerter als Nucleosiddiphosphat-Kinase<sup>[155, 165]</sup> und ihr Cofaktor PEP stabiler als Acetylphosphat ist. Zudem liegen die thermodynamischen Gleichgewichte für PEP günstiger (Schema 34).



Schema 34. a) Synthese von Nucleosidtriphosphaten (NTPs). 1. Adenylat-Kinase, [EC 2.7.4.3, N = A, C, U]; Guanylat-Kinase [EC 2.7.4.8, N = G]; Nucleosidmonophosphat-Kinase [EC 2.7.4.4, N = U]; 2. Pyruvat-Kinase [EC 2.7.1.40]; b) Synthese von Phosphoenolpyruvat (PEP).

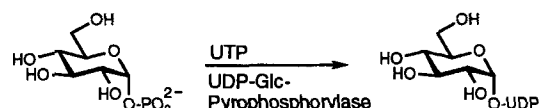
Schwieriger ist die Phosphorylierung der Nucleosidmonophosphate, die je nach NMP ein anderes Enzym erfordert. Adenylat-Kinase [EC 2.7.4.3] phosphoryliert AMP<sup>[155]</sup> und CMP<sup>[166]</sup> sowie – allerdings langsamer – UMP. Guanylat-Kinase [EC 2.7.4.8] katalysiert die Phosphorylierung von GMP. Nucleosidmonophosphat-Kinase [EC 2.7.4.4] verwendet ATP zur Phosphorylierung von AMP, CMP, GMP und UMP, ist jedoch recht teuer und nicht besonders stabil<sup>[155]</sup>. Weiterhin gibt es spezielle Kinasen für CMP und UMP, die allerdings nicht kommerziell erhältlich sind. Bei Kinasen, die ATP als Phosphoryldonor verwenden, wird dieses nur in katalytischer Menge eingesetzt, und aus dem gebildeten ADP wird mit Pyruvat-Kinase/PEP oder Acetat-Kinase/Acetylphosphat das verbrauchte ATP nachgebildet<sup>[167]</sup>. Phosphoenolpyruvat kann sowohl chemisch aus Pyruvat<sup>[163]</sup> als auch enzymatisch aus D-3-Phosphoglycerat<sup>[164]</sup> hergestellt werden (Schema 34).

Ein Vergleich der chemischen und enzymatischen Methoden für die Synthese der Nucleosidtriphosphate<sup>[155]</sup> ergab, daß CTP und GTP am besten enzymatisch hergestellt werden. Die chemische Desaminierung von CTP ist der einfachste Weg zur Synthese von UTP<sup>[155]</sup>. ATP ist relativ preiswert; es wurde allerdings auch schon enzymatisch im 50 mmol-Maßstab aus AMP hergestellt. Ein Gemisch der Nucleosidtriphosphate kann schrittweise aus RNA mit Nuclease P1, Polynucleotid-Phosphorylase und Pyruvat-Kinase erhalten werden<sup>[168]</sup>. Diese Mischung kann nach Zugabe eines bestimmten Glycosyl-1-phosphats und der entsprechenden Zuckernucleotiddiphosphat-Pyrophos-

phorylase direkt zur selektiven Herstellung von Zuckernucleotiden verwendet werden<sup>[168]</sup>.

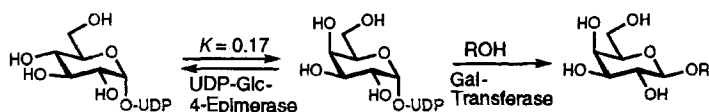
### 5.1.2. UDP-Glucose (UDP-Glc) und UDP-Galactose (UDP-Gal)

UDP-Glucose wurde UDP-Glucose-Pyrophosphorylase-katalysiert aus UTP und Glucose-1-Phosphat hergestellt (Schema 35)<sup>[155, 161, 169]</sup>. Analog erhält man UDP-Gal mit UDP-



Schema 35. Synthese von UDP-Glc.

Gal-Pyrophosphorylase<sup>[170]</sup>. Außerdem kann UDP-Gal auch aus UDP-Glc durch Epimerisierung mit UDP-Glc-4-Epimerase gewonnen werden (Schema 36)<sup>[161]</sup>. Zwar liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion auf der Seite von UDP-Glc, doch kann es durch In-situ-Glycosylierung mit Galactosyl-Transferase zugunsten von UDP-Gal verschoben werden.

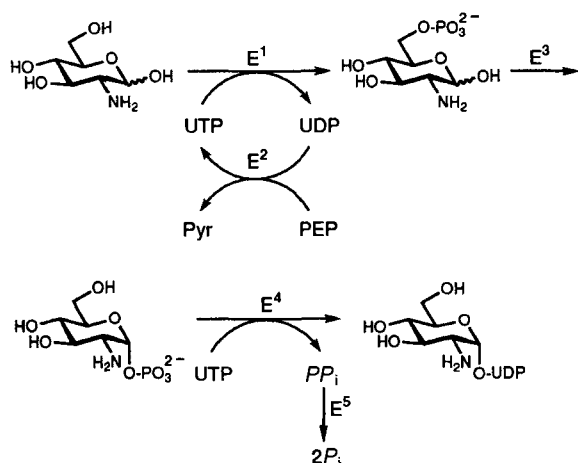


Schema 36. Synthese von UDP-Gal und dessen Verwendung bei Glycosylierungen.

Dieses Konzept wurde bei der Synthese von *N*-Acetylglucosamin im Großmaßstab angewendet<sup>[161]</sup>. Im Grammaßstab wurde UDP-Gal aus UDP-Glc und Gal-1-*P* unter Katalyse von UDP-Gal-Uridyl-Transferase<sup>[172]</sup> synthetisiert, wobei sich ebenfalls ein Galactosyltransfer in situ anschloß. Außerdem ist UDP-Gal aus UMP und Galactose in Gegenwart von getrockneten *Torulopsis-candida*-Zellen hergestellt worden<sup>[169]</sup>. Dabei werden Gal-1-*P* und UTP in situ gebildet und mit UDP-Gal-Pyrophosphorylase umgesetzt. Eine chemische Synthese von UDP-2-Desoxygalactose und dessen Verwendung für Glycosylierungen ist vor kurzem beschrieben worden<sup>[173]</sup>.

### 5.1.3. UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAC)

Zwei enzymatische Methoden für die Synthese von UDP-GlcNAC sind bisher entwickelt worden. Bei der ersten werden GlcNAC-1-Phosphat und UTP unter Katalyse von UDP-GlcNAC-Pyrophosphorylase umgesetzt<sup>[169]</sup>. Die Pyrophosphorylase ist zur Zeit nicht im Handel erhältlich, kann aber durch ganze Zellen aus Bäckerhefe oder das aus Kalbsleber isolierte Enzym<sup>[170]</sup> ersetzt werden. In einem zweiten Verfahren wird UTP und Glucosamin-1-phosphat (GlcN-1-*P*) UDP-Glc-Pyrophosphorylase-katalysiert zu UDP-Glucosamin kondensiert (Schema 37)<sup>[172a]</sup>. Das Produkt UDP-GlcN kann dann selektiv *N*-acetyliert werden. GlcN-1-*P* wurde durch Phosphorylierung der Position 6 in GlcN mit Hexokinase und anschließende Iso-

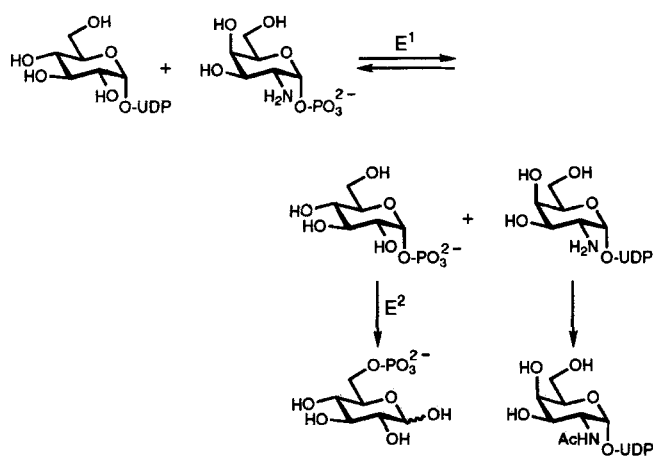


Schema 37. Synthese von UDP-GlcNAc. E<sup>1</sup> = Hexokinase aus Hefe, E<sup>2</sup> = Pyruvat-Kinase, E<sup>3</sup> = Phosphoglucose-Mutase, E<sup>4</sup> = UDP-Glc-Pyrophosphorylase, E<sup>5</sup> = Pyrophosphatase, Pyr = Pyruvat.

merisierung mit Phosphoglucose-Mutase gewonnen. Diese Sequenz lässt sich in einem Hohlfaserreaktor durchführen<sup>[174]</sup>.

#### 5.1.4. UDP-N-Acetylgalactosamin (UDP-GalNAc)

UDP-GalNAc kann entweder aus GalNAc-1-P und UTP mit UDP-GalNAc-Pyrophosphorylase oder aus UDP-GlcNAc mit einer Epimerase erhalten werden. Beide Enzyme stehen jedoch nicht direkt zur Verfügung. Eine Alternative ist der enzymatische UMP-Austausch zwischen UDP-Glc und GalN-1-P unter Katalyse von UDP-Glucose:Galactosephosphat-Uridyl-Transferase [EC 2.7.7.12], die kommerziell erhältlich ist (Schema 38)<sup>[171, 175]</sup>. Gal-1-P ist das natürliche Substrat des Enzyms,



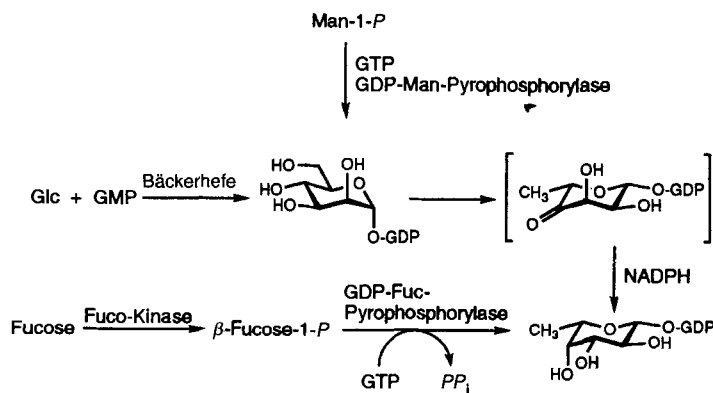
Schema 38. Synthese von UDP-GalNAc. E<sup>1</sup> = UDP-Glc:Galactosylphosphat-Uridyl-Transferase, E<sup>2</sup> = Phosphoglucose-Mutase.

doch werden auch 2-Desoxygalactose-1-phosphat, 2-Desoxyglucose-1-phosphat und GalN-1-P umgesetzt. Die Gleichgewichtskonstante für diese Reaktion beträgt etwa 1, doch kann das Gleichgewicht durch Entfernen von Glc-1-P mit Phosphoglucose-Mutase zugunsten von UDP-GalN verschoben werden. Die nachfolgende Acetylierung mit Essigsäureanhydrid liefert UDP-GlcNAc.

Die beschriebene Methode konnte mit leichten Modifizierungen für die Synthese von großen Mengen an UDP-GalNAc verwendet werden<sup>[172b]</sup>. Dabei wurde GalN-1-P aus Galactose mit Galacto-Kinase in Gegenwart eines ATP-Regenerierungssystems erhalten und als Substrat für Uridyl-Transferase eingesetzt. UDP-Glc wurde in situ aus UTP und Glc-1-P unter Katalyse von UDP-Glc-Pyrophosphorylase regeneriert. Dadurch wurde außerdem das Gleichgewicht zugunsten von UDP-GalN verschoben. Abschließend wurde mit N-Acetoxy succinimid unter Bildung von UDP-GalNAc acetyliert. Analog wurde UDP-GalN für Glycosylierungsreaktionen mit Regenerierung des Cofaktors synthetisiert, woraus dann  $\beta$ -Glycoside von GalN hergestellt werden können.

#### 5.1.5. GDP-Mannose (GDP-Man) und GDP-Fucose (GDP-Fuc)

GDP-Man ist aus Glucose und GMP mit getrockneter Bäckerhefe hergestellt worden<sup>[82]</sup>. Dabei wird zunächst Man-1-P gebildet, das anschließend durch GDP-Man-Pyrophosphorylase zu GDP-Man umgesetzt wird. Auch mit einem zellfreien Hefeextrakt wurde GDP-Man aus Mannose erhalten<sup>[176]</sup>. Die direkte Synthese ausgehend von chemisch gewonnenem Man-1-P und GTP unter Katalyse von GDP-Man-Pyrophosphorylase [EC 2.7.7.13] ist für größere Ansätze vorzuziehen (Schema 39)<sup>[155]</sup>.



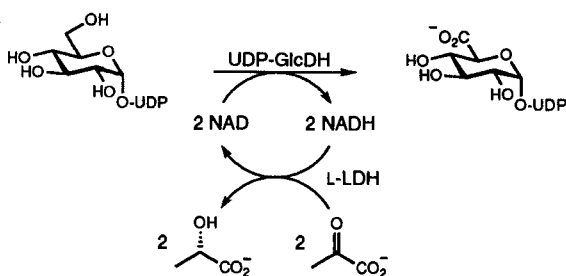
Schema 39. Synthese von GDP-Fuc.

GDP-Fucose wird in vivo aus GDP-Man mit einem NADPH-abhängigen Oxidoreduktase-Enzymsystem gebildet, das auch in vitro eingesetzt werden kann. So wurde GDP-Fuc aus GDP-Man mit einem rohen Enzympräparat aus *Agrobacterium radiobacter* erhalten<sup>[177]</sup>. NADPH wurde dabei in situ aus Glc-6-P mit Glc-6-P-Dehydrogenase regeneriert<sup>[178]</sup>. Ähnlich konnte GDP-Fucose in situ für eine anschließende Glycosylierung mit  $\alpha$ 1-3-Fucosyl-Transferase gebildet werden (siehe Abschnitt 5.2.3)<sup>[179]</sup>. Auch die Enzyme eines zweiten biosynthetischen Weges mit geringerer In-vivo-Bedeutung sind für die Synthese von GDP-Fucose herangezogen worden. Dabei wird GDP-Fucose über L-Fucose-1-phosphat<sup>[179]</sup> aus L-Fucose<sup>[180]</sup> gebildet. Zunächst phosphoryliert Fuco-Kinase [EC 2.7.1.52] L-Fucose zu L-Fucose-1-phosphat, das dann mit GTP in Gegen-

wart von GDP-Fucose-Pyrophosphorylase zu GDP-Fucose reagiert. Mehrere chemische Methoden zur Herstellung von GDP-Fucose wurden ebenfalls beschrieben<sup>[181]</sup>.

### 5.1.6. UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcUA)

UDP-Glucuronsäure wird in vivo durch Oxidation von UDP-Glc an C-6 mit der NAD-abhängigen UDP-Glc-Dehydrogenase synthetisiert. Enzympräparate aus Rinderleber sind für die Synthese von UDP-GlcUA im Grammaßstab verwendet worden (Schema 40)<sup>[155, 182]</sup>. Der Cofaktor NAD wurde mit Lactat-



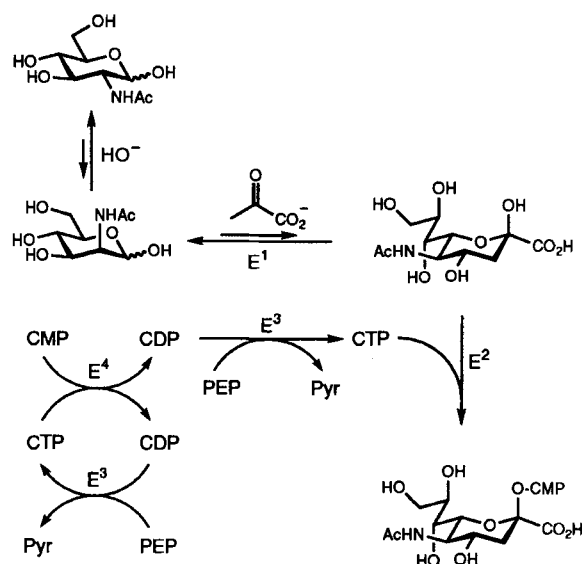
Schema 40. Synthese von UDP-GlcUA.

Dehydrogenase (LDH) und Pyruvat als Reduktionsmittel regeneriert. Weiterhin wurde UDP-GlcUA in situ mit Extrakten aus der Leber von Meerschweinchen für Glycosylierungen mit Glucuronyl-Transferasen gebildet<sup>[183]</sup>.

### 5.1.7. CMP-N-Acetylneuraminsäure (CMP-NeuAc)

CMP-N-Acetylneuraminsäure ist enzymatisch in kleinen Mengen (<0.5 mmol) aus CTP und NeuAc mit CMP-NeuAc-Synthetase [EC 2.7.7.43] hergestellt worden<sup>[184]</sup>. Bei einem verbesserten Verfahren, das auch im Grammbereich eingesetzt werden kann, wird CTP in situ mit Adenylat-Kinase und Pyruvat-Kinase gebildet<sup>[185]</sup>. Adenylat-Kinase katalysiert die Äquilibrierung von CTP und CMP zu CDP, das durch Pyruvat-Kinase zu CTP phosphoryliert wird. NeuAc konnte über eine NeuAc-Aldolase-Reaktion von Pyruvat und N-Acetylmannosamin gebildet werden, wobei letzteres durch basenkatalysierte Epimerisierung von N-Acetylglucosamin erhalten wurde<sup>[166]</sup>. Ausgehend von N-Acetylglucosamin läßt sich dieses Verfahren als Eintopfsynthese verwenden (Schema 41)<sup>[186]</sup>. Auch die chemische Synthese von CMP-NeuAc ist bekannt<sup>[187–189]</sup>.

Das Gen für die CMP-NeuAc-Synthetase aus *E. coli* wurde geklont<sup>[190, 191]</sup> und in *E. coli* überexprimiert. Dafür wurde der  $\lambda$ -ZAP-Vektor und der LacZ-Promotor<sup>[192, 193]</sup> oder der PKK223-Vektor und der Tac-Promotor verwendet<sup>[194]</sup>. Auch das Enzym aus Kalbshirn ist kloniert und überexprimiert worden. CMP-NeuAc-Synthetase akzeptiert eine Reihe von NeuAc-Derivaten als Substrate. Dazu gehören 9-Desoxy-, 7,9-Didesoxy- und 4,7,9-Tridesoxy-NeuAc<sup>[195]</sup>. Die 4-, 7- oder 8-Oxo-derivate von NeuAc oder deren Dimethylacetale werden nicht umgesetzt<sup>[196]</sup>. Viele NeuAc-Derivate, die an C-9 modifiziert wurden, sind bei wenig verändertem Wert für die Michaelis-Konstante Substrate des Enzyms<sup>[186, 197–199]</sup>.



Schema 41. Multienzymsynthese von CMP-NeuAc. E<sup>1</sup> = NeuAc-Aldolase, E<sup>2</sup> = CMP-NeuAc-Synthetase, E<sup>3</sup> = Pyruvat-Kinase, E<sup>4</sup> = Adenylat-Kinase, Pyr = Pyruvat.

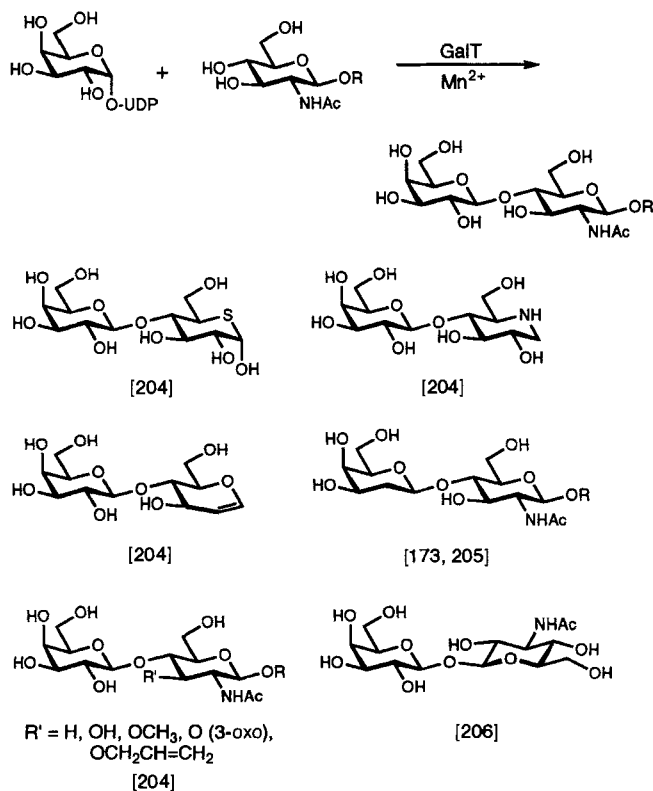
## 5.2. Substratspezifität von Glycosyl-Transferasen und deren Anwendung in der Synthese

Im allgemeinen gibt es für jeden Zuckernucleotid-Glycosyl-donor mehrere Glycosyl-Transferasen, die sich in ihrer Spezifität in Hinblick auf den Acceptor unterscheiden. Es wird oft angenommen, daß alle Glycosyl-Transferasen völlig spezifisch für den Acceptor und den Donor sowie die Position und die Konfiguration der geknüpften Bindung sind. Diese Spezifität ist als sogenanntes „Ein-Enzym/eine-Bindung“-Konzept bekannt<sup>[111]</sup>. Die Grundidee ist, daß die Spezifität der Glycosyl-Transferasen in vivo die genaue Reproduktion eines Glycosylierungsmusters auch ohne ein Templat, d. h. ohne eine genetische Codierung der Oligosaccharidsequenz, garantiert. Obwohl die In-vitro-Spezifität der meisten Glycosyl-Transferasen bisher nicht ausreichend untersucht worden ist, zeichnen sich heute schon Abweichungen von diesem Modell der absoluten Spezifität sowohl für den Donor als auch für den Acceptor ab. Untersuchungen, die auf das Design von Inhibitoren der Glycoproteinbiosynthese gerichtet sind, bestätigen dies<sup>[200]</sup>.

### 5.2.1. Galactosyl-Transferase (GalT)

Wegen ihrer guten Verfügbarkeit gehört  $\beta$ 1-4-Galactosyl-Transferase (UDP-Gal:*N*-Acetylglucosamin- $\beta$ 1-4-Galactosyl-Transferase [EC 2.4.1.22])<sup>[201, 202]</sup> hinsichtlich der synthetischen Verwendung und der Substratspezifität zu den am besten untersuchten Glycosyl-Transferasen aus Säugetieren. Das Enzym katalysiert den Galactosetransfer von UDP-Gal auf die 4-Position eines  $\beta$ -verknüpften GlcNAc-Restes unter Bildung der Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-Partialstruktur. In Gegenwart von Lactalbumin ist jedoch Glucose der bevorzugte Acceptor, was zur Bildung von Lactose (Gal $\beta$ 1-4Glc) führt. Das Enzym ist für die In-vitro-Synthese von *N*-Acetyllactosamin und dessen Glycosiden wie auch für die Herstellung anderer Galactoside eingesetzt worden.

Galactosyl-Transferase verwendet die folgenden Acceptor-substrate<sup>[201]</sup>: GlcNAc, Glucose sowie deren  $\beta$ -Glycoside, 2-Desoxyglucose, D-Xylose, 5-Thioglucose, *N*-Acetylmuramin-säure und *myo*-Inositol. Modifizierungen an der 3- und der 6-Position in GlcNAc werden toleriert. Beispiele für Substrate mit modifizierter Position 6 sind Fuc $\alpha$ 1-6GlcNAc und NeuAc $\alpha$ 2-6GlcNAc<sup>[203]</sup>. Zu den Acceptoren, die in Position 3 derivatisiert sind, zählen 3-*O*-Methyl-GlcNAc<sup>[203]</sup>, 3-Desoxy-GlcNAc, 3-*O*-Allyl-GlcNAc $\beta$ OBu und 3-Oxo-GlcNAc<sup>[204]</sup>. Alle bekannten Glycoside von GlcNAc, die Acceptorsubstrate der Galactosyl-Transferase sind, sind  $\beta$ -glycosidisch verknüpft. Eine Ausnahme bildet Glucose, deren  $\alpha$ -Glycoside in Gegenwart von Lactalbumin umgesetzt werden können. Andere gängige Monosaccharide wie D-Mannose, D-Galactose, D-Ribose, D-Xylose und D-Allose sind keine Substrate. Monosaccharide mit einer negativen Ladung, z.B. Glucuronsäure und  $\alpha$ -Glucose-1-phosphat, werden ebenfalls nicht akzeptiert. Schema 42 zeigt mehrere Disaccharide, die mit Galactosyl-Transferase synthetisiert worden sind<sup>[173, 204–206]</sup>. Besonders interessant ist die Bildung eines  $\beta$ , $\beta$ ,1-verknüpften Disaccharids, wobei die anomere Hydroxygruppe von 3-Acetamido-3-desoxyglucose als Acceptor fungiert<sup>[206b]</sup>. Offenbar bestimmt die Acetamidogruppe den Ort des Glycosyltransfers.



Schema 42. Einige Disaccharide, die mit  $\beta$ 1-4-Galactosyl-Transferase synthetisiert wurden.

$\beta$ 1-4-Galactosyl-Transferase ist in der Festphasensynthese von Oligosacchariden zur Galactosylierung von *gluco*- oder *cellobio*-konfigurierten, polymergebundenen Oligo- und Polysacchariden eingesetzt worden<sup>[207]</sup>. Das fertige Oligosaccharid kann anschließend photochemisch oder enzymatisch (durch

Chymotrypsin) vom Polymer gelöst werden. Als Festphasen lassen sich Polyacrylamid oder wasserlöslicher Polyvinylalkohol verwenden. *N*-Acetylglucosaminylaminosäuren und -peptide sind ebenfalls als Substrate für Galactosyl-Transferase zur Bildung galactosylierter Glycopeptide eingesetzt worden<sup>[205, 208]</sup>. Die Saccharidkette kann dann durch weitere Transferasen, z.B. Sialyl-Transferasen, verlängert werden<sup>[205, 208]</sup>. Dieses Prinzip wurde in der Synthese eines Ceramids verwendet, das zunächst galactosyliert und dann zu einem  $\text{G}_\text{M}_3$ -Derivat sialyliert wurde<sup>[209]</sup>.

Als Donorsubstrate verwendet Galactosyl-Transferase außer Galactose noch Glucose, Arabinose, Glucosamin, Galactosamin, *N*-Acetylgalactosamin, 2-, 4- und 6-Desoxygalactose sowie 2-Desoxyglucose in Form ihrer UDP-Derivate. Dies öffnet den Weg zu  $\beta$ -1,4-verknüpften Oligosacchariden, deren Terminus nicht Galactose ist (Tabelle 5)<sup>[210–213]</sup>. Ein beachtenswertes Beispiel ist der Transfer von 5-Thiogalactose<sup>[212]</sup>. Zwar ist die Geschwindigkeit des Transfers mit einigen dieser nichtnatür-

Tabelle 5. Relative Geschwindigkeiten für den Transfer von Donorsubstraten mit  $\beta$ 1-4-Galactosyl-Transferase.

Donorsubstrat	$k_{\text{rel}}$	Lit.
UDP-Gal	100	[211 a]
UDP-Glc	0.3	[210, 211 a]
UDP-4-Desoxy-Glc	5.5	[211 a]
UDP-Ara	4.0, R = H 1.3, R = CH <sub>3</sub> 0.2, R = CH <sub>2</sub> F	[211 a] [211 b] [211 b]
UDP-GalNAc	4.0	[210]
UDP-GlcNAc	0.00	[210]
UDP-GlcN	0.09	[210]
UDP-5-Thio-Gal	5.0	[212]
UDP-2-Desoxy-Gal	90	[173] [a], [205] [b]

[a] Mit Galacto-Kinase/Uridyl-Transferase in situ aus 2-Desoxygalactose gebildet [213]. [b] Mit Hexo-Kinase/Mutase/UDP-Glc-Pyrophosphatase/Epimerase aus 2-Desoxyglucose hergestellt.

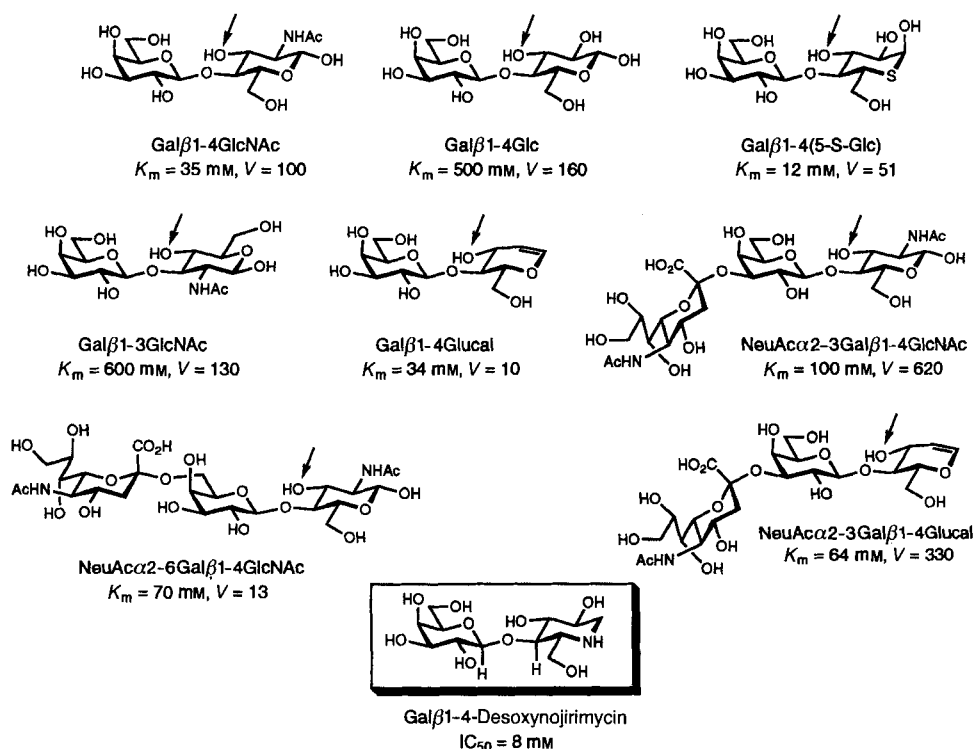
lichen modifizierten Donorsubstrate recht niedrig, doch für Synthesen im Milligrammbereich ist die Aktivität ausreichend. Ebenfalls erwähnt werden sollten die  $\alpha$ 1-3-Galactosyl-Transferase und die  $\alpha$ 1-3-GlcNAc-Transferase, die am Aufbau des B- bzw. A-Blutgruppenantigens beteiligt sind<sup>[210b]</sup>.

### 5.2.2. Sialyl-Transferase (SiaT)

Sowohl  $\alpha$ 2-6- als auch  $\alpha$ 2-3-Sialyl-Transferasen sind für die Oligosaccharidsynthese eingesetzt worden<sup>[214–216]</sup>. Diese Enzyme übertragen *N*-Acetylneuraminsäure normalerweise auf die 6- bzw. die 3-Position von terminalen Galactose- oder GalNAc-Einheiten. Weiterhin ist eine  $\alpha$ 2-8-Sialyl-Transferase bekannt, die an der Biosynthese von  $\alpha$ -2,8-verknüpfter Polysialinsäure<sup>[217]</sup> beteiligt ist. Einige Sialyl-Transferasen akzeptieren CMP-NeuAc-Analoga mit unterschiedlichen Substituenten in Position 9<sup>[197–199, 218]</sup>. So läßt sich die Hydroxygruppe an C-9 durch eine Amino-, Fluor-, Azido-, Acetamido- oder Benzamidogruppe ersetzen. Auch der Acceptor kann modifiziert werden: Analoga der Acceptoren Gal $\beta$ 1-4GlcNAc und Gal $\beta$ 1-3GalNAc, in denen die Acetamidogruppe gegen eine Azid-, Phthalimid-, Carbamat- oder Pivaloylgruppe ausgetauscht ist, sind Substrate dieser Enzyme<sup>[219]</sup>. Eine kürzlich veröffentlichte enzymatische Synthese von  $G_M$ , beginnt mit einem Disaccharylceramid, in dem die mit einer Fettsäure acylierte Aminogruppe durch eine Azidogruppe ersetzt worden ist<sup>[220]</sup>. Der Einbau anderer Sialinsäureanaloga in Sialoside ist problematisch, da Sialyl-Transferasen recht substratspezifisch sind.

### 5.2.3. Fucosyl-Transferase (FucT)

Fucosyl-Transferasen sind an der Biosynthese vieler Oligosaccharide beteiligt, die als Blutgruppenderminanten, als Zelloberflächen- oder als Tumorentigene eine Rolle spielen. Die Fucosylierung gehört zu den späten Modifizierungen eines Oligosaccharids *in vivo*. Mehrere Fucosyl-Transferasen sind isoliert und für die *In-vitro*-Synthese genutzt worden<sup>[221–224]</sup>. Zum Beispiel wurden mit  $\alpha$ 1-3-Fucosyl-Transferase der GlcNAc-Rest in *N*-Acetyllactosamin sowie der in Sialyl $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc in 3-Position L-fucosyliert, was zur Bildung der Lewis<sup>x</sup>- bzw. Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Einheiten führt<sup>[179, 221]</sup>. Auch einige andere Acceptorsubstrate mit modifiziertem GlcNAc-Rest können erfolgreich fucosyliert werden (Schema 43)<sup>[179]</sup>. Dazu zählen Gal $\beta$ 1-4Glc, Gal $\beta$ 1-4Glucal und Gal $\beta$ 1-4(5-S-Glc). Auch die  $\alpha$ 1-3/4-Fucosyl-Transferasen sind für Synthesen verwendet worden. Diese Enzyme fucosylieren die GlcNAc-3-Position in Gal $\beta$ 1-4GlcNAc bzw. die GlcNAc-4-Position in



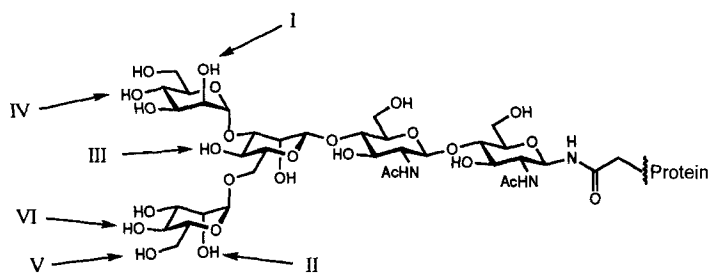
Schema 43. Substrate und Inhibitoren für Fucosyl-Transferase. Der Grund, warum Gal $\beta$ 1-4-Desoxyojirimycin als Inhibitor wirkt, könnte auf eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der NH-Gruppe des Inhibitors und der Base des Enzyms, die die Hydroxygruppe in Position 3 des Acceptors (durch Pfeil gekennzeichnet) deprotoniert, zurückzuführen sein.

Gal $\beta$ 1-3GlcNAc unter Bildung von Lewis<sup>x</sup> bzw. Lewis<sup>a</sup><sup>[221, 222]</sup>. Auch die entsprechenden sialylierten Substrate wurden fucosyliert<sup>[221]</sup>.

Die an der Bildung von Lewis<sup>a</sup> beteiligte  $\alpha$ 1-4-Fucosyl-Transferase kann auch die GDP-Ester nichtnatürlicher Fucosederivate als Substrate verwenden. So wurden 3-Desoxyfucose und L-Arabinose auf Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ O(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> mit einer Geschwindigkeit von 2.3 bzw. 5.9% bezüglich der mit L-Fucose übertragen<sup>[224]</sup>. Auch Fucose, die in Position 6 mit einer sterisch sehr anspruchsvollen Gruppe substituiert ist, wird umgesetzt. So konnte ein synthetisches Blutgruppenantigen in dieser Position angeknüpft und über den GDP-Ester dieses Oligosaccharids durch Fucosyl-Transferase auf einen Acceptor übertragen werden<sup>[225]</sup>. Mit dieser Strategie konnten beispielsweise die antigenen Eigenschaften von Glycoproteinen an der Zelloberfläche verändert werden.

### 5.2.4. *N*-Acetylglucosaminyl-Transferase

*In vivo* werden die Verzweigungsstellen in *N*-verknüpften Glycoproteinen durch *N*-Acetylglucosaminyl-Transferasen festgelegt<sup>[226, 227]</sup>. Sie übertragen GlcNAc von UDP-GlcNAc auf einen Mannoserest oder einen anderen Acceptor, wobei das anomere Zentrum stets  $\beta$ -konfiguriert ist. Die GlcNAc-Transferasen I–VI, die am Ausbau des Pentasaccharidkerns von Asparagin-Glycoproteinen beteiligt sind (Schema 44) wurden isoliert und charakterisiert<sup>[226–228]</sup>. Zusammen mit anderen GlcNAc-Transferasen sind sie in der Oligosaccharidsynthese eingesetzt worden<sup>[229, 230]</sup>.



Schema 44. Spezifität der GlcNAc-Transferasen I–IV.

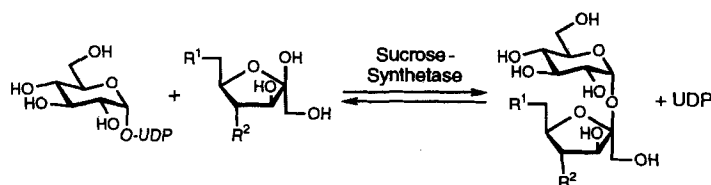
GlcNAc-Transferasen sind auch mit modifizierten, nicht-natürlichen Donoren eingesetzt worden. GlcNAc-Transferase I aus Humanmilch überträgt außer GlcNAc auch 3-, 4- und 6-Desoxy-GlcNAc auf den Acceptor Man $\alpha$ 1-3(Man $\alpha$ 1-6)Man $\beta$ O-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub><sup>[229]</sup>. Die 4- und 6-Desoxy-GlcNAc-Derivate können auch mit GlcNAc-Transferase II übertragen werden, nicht aber 3-Desoxy-GlcNAc<sup>[229]</sup>. Eine von vielen synthetischen Anwendungen von GlcNAc-Transferase ist die *N*-Acetylglucosaminylierung zu GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\alpha$ -Dolichylpyrophosphat, das für die Untersuchung von Oligosaccharyl-Transferasen eingesetzt wird<sup>[231a]</sup>. Eine GlcNAc-Transferase aus Mausnieren wurde in der Synthese eines Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Hexasaccharids verwendet. Es katalysiert den Transfer von GlcNAc auf die 6-OH-Gruppe von GlcNAc in Gal $\beta$ 1-3GlcNAc<sup>[231b]</sup>.

#### 5.2.5. Mannosyl-Transferase

Viele Mannosyl-Transferasen übertragen Mannose oder 4-Desoxymannose aus ihren GDP-Estern auf Acceptoren<sup>[232]</sup>. Die  $\alpha$ 1-2-Mannosyl-Transferase aus Hefe ist in *E. coli* geklont und überexprimiert worden (spezifische Aktivität ca. 1 U L<sup>-1</sup>). Sie transferiert Mannose auf die 2-Position vieler unterschiedlich derivatisierter  $\alpha$ -Mannoside und  $\alpha$ -Mannosylpeptide, wobei die Man $\alpha$ 1-2Man-Einheit gebildet wird<sup>[233]</sup>. Mannosyl-Transferase aus Schweineleber akzeptiert GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc-Phytanylpyrophosphat, ein Analogon des natürlichen Substrats (mit Dolichol statt Phytanol)<sup>[234]</sup>.

#### 5.2.6. Sucrose-Synthetase

Mit den Fructosen 1-Azido-1-desoxy-, 1-Desoxy-1-fluor-, 6-Desoxy-, 6-Desoxy-6-fluor- und 4-Desoxy-4-fluorfructose als Glycosylacceptoren wurden Sucrose-Synthetase-katalysiert Sucroederivate hergestellt (Schema 45)<sup>[235]</sup>. 6-Desoxy- und 6-Desoxy-6-fluorfructose wurden aus den entsprechenden Glucosen in situ durch Isomerisierung mit Glucose-Isomerase gebildet<sup>[235]</sup>. Da die Reaktion reversibel ist, kann Sucrose-Synthetase (aus Reis) auch für die Synthese von UDP-Glc eingesetzt



Schema 45. Synthese von Sucroseanalogia mit Sucrose-Synthetase. Das Enzym kann auch für die Regenerierung von UDP-Glc aus Sucrose und UDP eingesetzt werden. a, R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = OH; b, R<sup>1</sup> = F, R<sup>2</sup> = OH; c, R<sup>1</sup> = OH, R<sup>2</sup> = F.

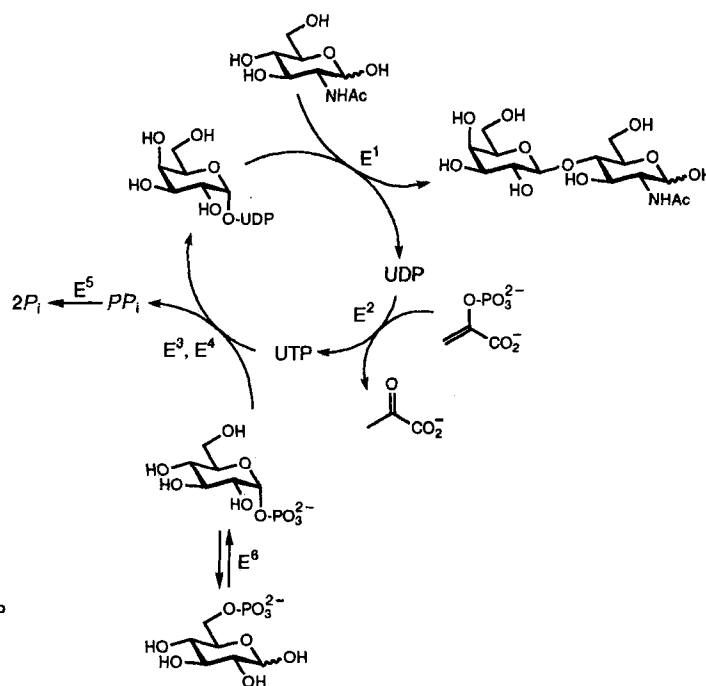
werden. Das Enzym akzeptiert ebenfalls TDP, ADP und GDP<sup>[236]</sup>.

#### 5.2.7. Oligosaccharyl-Transferase

Wie bereits erwähnt, katalysiert Oligosaccharyl-Transferase den Transfer eines Oligosaccharids aus zwei GlcNAc-, neun Mannose- und drei Glucoseeinheiten von einem Dolichylpyrophosphat auf einen Asn-Rest eines entstehenden Peptids oder Proteins<sup>[137]</sup>. Das Enzym transferiert auch die Minimaleinheit GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc von dem entsprechenden Dolichylpyrophosphat oder von einem kürzeren oder einfacheren Lipid<sup>[141]</sup>. Das kürzeste Peptid, das noch als Acceptor dienen kann, ist Asn-X-Ser/Thr. Mit Oligosaccharyl-Transferase wurden mehrere Peptide mit glycosylierten Asn-Resten in vitro synthetisiert. Die Glycopeptide Bz-Asn(Oligosaccharyl)-Leu-Thr-NH<sub>2</sub><sup>[237]</sup>, Bz-Asn(GlcNAc<sub>2</sub>)-Leu-Thr-NH<sub>2</sub><sup>[238]</sup> und Ac-Asn(GlcNAc<sub>2</sub>)-Leu-Thr-OCH<sub>3</sub>/NHCH<sub>3</sub><sup>[140]</sup> wurden ebenso synthetisiert wie glycosylierte cyclische Peptide, z.B. Cys-Ala-Asn(GlcNAc<sub>2</sub>)-Cys-Thr-Ser-Ala<sup>[140]</sup>.

#### 5.2.8. In-situ-Regenerierung des Cofaktors

Obwohl Synthesen mit Glycosyl-Transferasen im analytischen und im kleinen Maßstab sehr effizient sind, sind bei größeren Ansätzen die hohen Kosten der Zuckernucleotide sowie die Produktinhibierung durch die bei der Reaktion freigesetzten Nucleosidmono- oder -diphosphate von Nachteil. Eine einfache Lösung für beide Probleme ist die In-situ-Regenerierung des Zuckernucleotids aus dem entstandenen Nucleosiddiphosphat. Diese Strategie wurde erstmals in der durch Galactosyl-Transferase katalysierten Synthese von *N*-Acetyllactosamin angewendet (Schema 46)<sup>[161]</sup>. Mit einer katalytischen

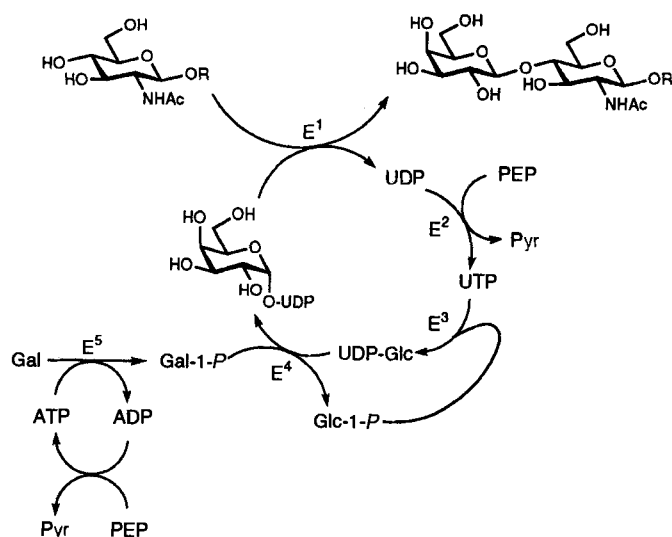


Schema 46. Glycosylierung mit Galactosyl-Transferase und In-situ-Regenerierung von UDP-Gal mit UDP-Glc und UDP-Glc-4-Epimerase. E<sup>1</sup> =  $\beta$ 1-4-Galactosyl-Transferase, E<sup>2</sup> = Pyruvat-Kinase, E<sup>3</sup> = UDP-Glc-Pyrophosphorylase, E<sup>4</sup> = UDP-Glc-4-Epimerase, E<sup>5</sup> = Pyrophosphatase, E<sup>6</sup> = Phosphogluco-Mutase.



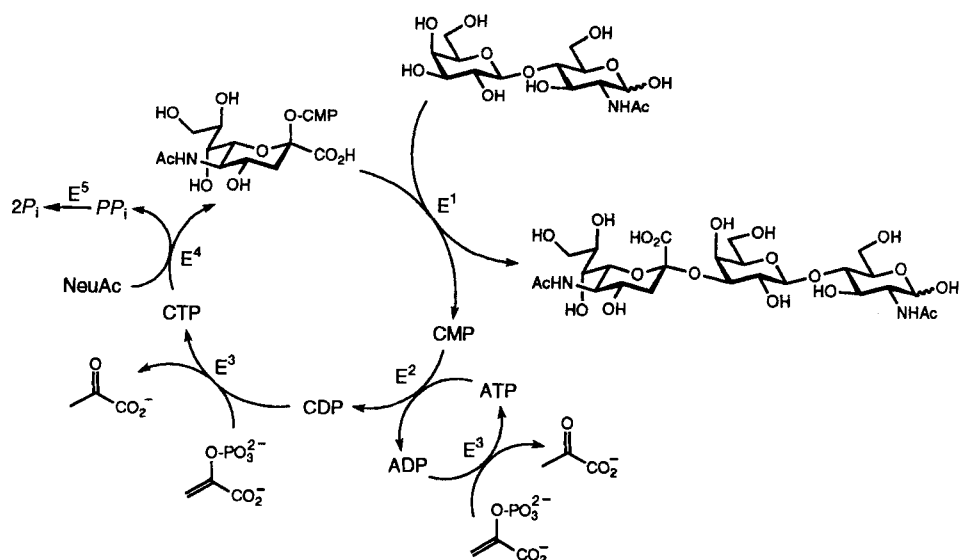
Menge an UDP-Gal wird zunächst GlcNAc glycosyliert; danach wird UDP-Gal aus dem freigesetzten UDP und Galactose durch eine enzymatisch katalysierte Sequenz regeneriert, bei der eine stöchiometrische Menge an einem Phosphorylierungsmittel benötigt wird. Eine Reihe von Oligosacchariden ist so synthetisiert worden<sup>[203]</sup>. Ein zweites Regenerierungssystem für UDP-Gal basiert auf Galactose-1-phosphat-Uridyl-Transferase<sup>[213]</sup> und ist bei der Herstellung von 2'-Desoxy-LacNAc und 2'-Amino-2'-desoxy-LacNAc verwendet worden (Schema 47). Eine dritte Methode zur Regenerierung von UDP-Gal ist die Sucrose-Synthetase-katalysierte Bildung von UDP-Glc aus Sucrose und UDP<sup>[236]</sup>.

Die Regenerierung des Cofaktors in situ bietet mehrere Vorteile. Zum einen kann eine katalytische Menge an Nucleosiddiphosphat und eine stöchiometrische Menge an Monosaccharid statt einer stöchiometrischen Menge an Zuckernucleotid ver-



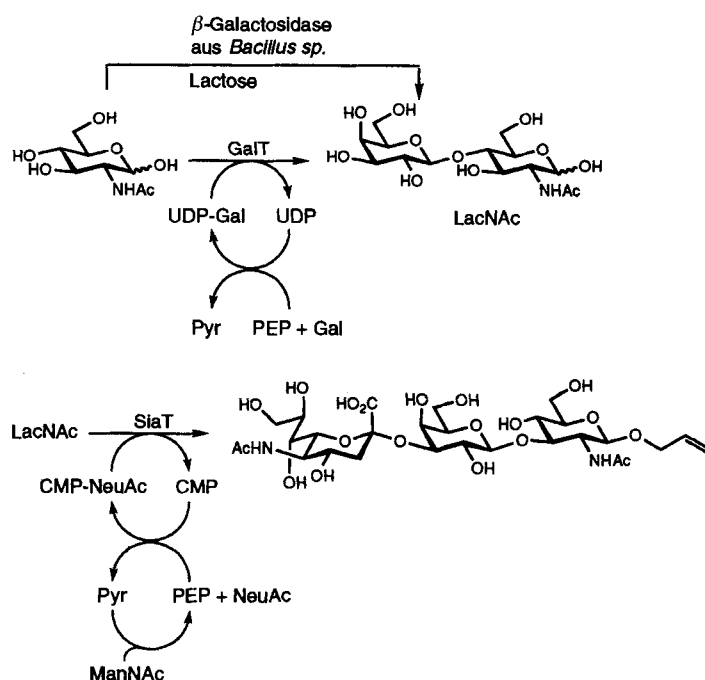
Schema 47. Glycosylierung mit Galactosyl-Transferase und In-situ-Regenerierung von UDP-Gal mit UDP-Glc und Gal-1-P-Uridyl-Transferase. E<sup>1</sup> = β1-4-Galactosyl-Transferase, E<sup>2</sup> = Pyruvat-Kinase, E<sup>3</sup> = UDP-Glc-Pyrophosphorylase, E<sup>4</sup> = Gal-1-P-Uridyl-Transferase, E<sup>5</sup> = Galcto-Kinase, Pyr = Pyruvat.

wendet werden, was die Kosten deutlich senkt. Zum anderen ist die Inhibierung durch das freigesetzte Nucleosiddiphosphat wegen seiner niedrigen Konzentration drastisch verringert. Darüber hinaus wird die Isolierung des Produktes erheblich vereinfacht. Ein Regenerierungssystem für CMP-NeuAc (Schema 48) ist ebenfalls entwickelt worden<sup>[1192, 239]</sup>. Die Regenerierungssysteme für UDP-Gal und CMP-NeuAc können auch in einer Eintopfreaktion kombiniert und für die Synthese von Sialylo-



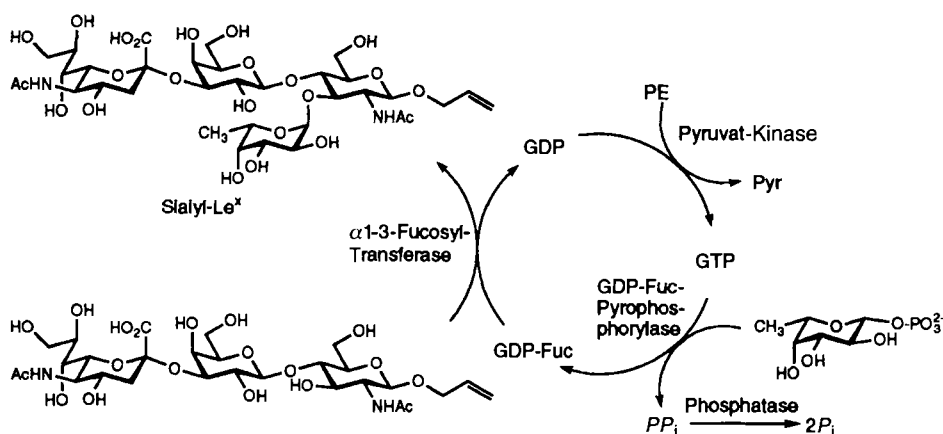
Schema 48. Enzymatische Sialylierung mit In-situ-Regenerierung von CMP-NeuAc. E<sup>1</sup> = α2-3-Sialyl-Transferase, E<sup>2</sup> = Nucleosidmonophosphat-Kinase, E<sup>3</sup> = Pyruvat-Kinase, E<sup>4</sup> = CMP-NeuAc-Synthetase, E<sup>5</sup> = Pyrophosphatase.

gosacchariden eingesetzt werden (Schema 49)<sup>[1179]</sup>. Mit diesen Regenerierungssystemen sowie denen für UDP-GlcNAc<sup>[240]</sup>, GDP-Man<sup>[233]</sup>, GDP-Fuc<sup>[1179]</sup> und GDP-GlcUA<sup>[183]</sup> sollte der breiten Anwendung von Glycosyl-Transferasen für die Oligo-



Schema 49. Synthese eines Trisaccharids mit der Enzymkombination Galactosidase/Sialyl-Transferase oder Galactosyl-Transferase/Sialyl-Transferase. Die enzymatische Sialylierung von LacNAc in situ liefert ein Trisaccharid, das nicht mehr durch Galactosidase angegriffen wird. Pyr = Pyruvat.

saccharidsynthese nichts mehr im Wege stehen. Ein Beispiel für eine gelungene Synthese ist die enzymatische von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (Schema 50)<sup>[1179]</sup>



Schema 50. Enzymatische Fucosylierung mit In-situ-Regenerierung von GDP-Fucose.

### 5.3. Klonierung und Expression von Glycosyl-Transferasen und Zuckernucleotid-Synthetasen

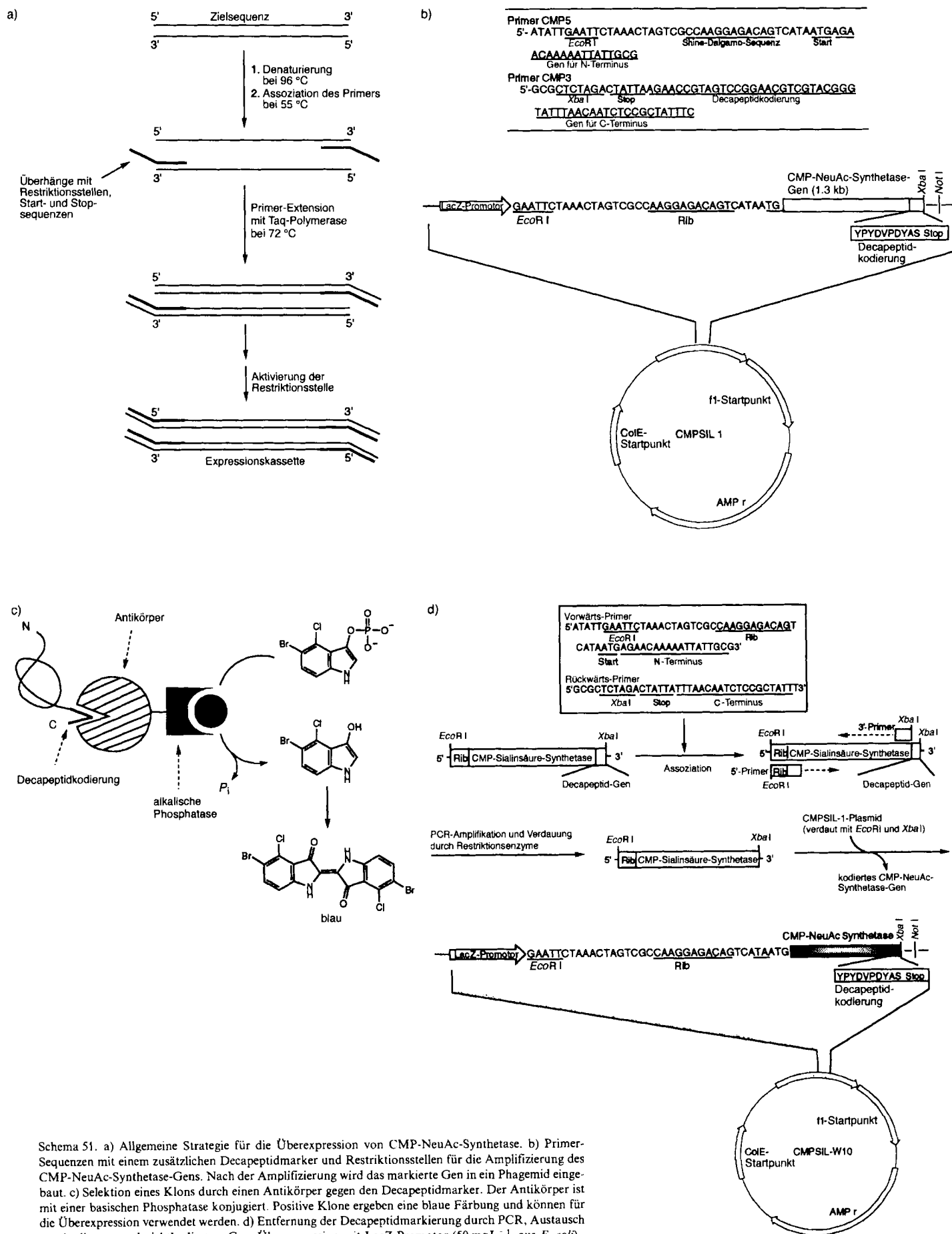
Obwohl viele Glycosyl-Transferasen ähnliche Reaktionen katalysieren und oft dasselbe Substrat verwenden, scheint bei den unterschiedlichen Transferasen nur eine geringe Sequenzhomologie zu bestehen. Allerdings gibt es eine deutliche Homologie bei denselben Enzymen aus unterschiedlichen Spezies. Beispielsweise sind die Sequenzen von  $\beta$ 1-4-Galactosyl-Transferase aus Mensch und Ratte zu 86 % identisch. Die Glycosyl-Transferasen sind einander insofern ähnlich, als alle bis heute beschriebenen cDNA-Sequenzen Peptide mit einem kurzen N-Terminus, einer hydrophoben Transmembransequenz, einer kurzen Stammsequenz und einer großen C-terminalen katalytisch aktiven Domäne kodieren<sup>[244]</sup>. Außer den membrangebundenen Enzymformen sind Glycosyl-Transferasen auch in löslicher Form in Körperflüssigkeiten wie Blut, Milch oder Galle identifiziert worden. In einigen Fällen wurden die Enzyme aus diesen Flüssigkeiten isoliert<sup>[241–243]</sup>. Ein Vergleich der cDNA-Sequenzen dieser löslichen Enzyme mit den bisher bekannten N-terminalen Sequenzen membrangebundener Transferasen führt zu dem Ergebnis, daß die Stammsequenz gespalten und so die katalytisch aktive Domäne freigesetzt wird. Solche proteolytischen Abtrennungen des Membranankers treten wahrscheinlich bei allen Glycosyl-Transferasen auf<sup>[244]</sup>.

Die Menge an einer Glycosyl-Transferase, die aus einer natürlichen Quelle isoliert werden kann, ist oft durch die niedrige Konzentration dieser Enzyme in den meisten Geweben und Körperflüssigkeiten begrenzt. Die Reinigung wird außerdem durch die relative Instabilität der Enzyme dieser Klasse erschwert<sup>[11]</sup>. Daher ist die Klonierung von Glycosyl-Transferase-Genen in einfach zu handhabende Expressionssysteme von großer Bedeutung. Die Strategie dafür ist in Schema 51 a zusammengefaßt. Das gewünschte Glycosyl-Transferase-Gen muß zunächst aus dem Pool der mRNAs durch Klonierung der cDNA unter Bildung einer cDNA-Bibliothek identifiziert und isoliert werden. Durch Screening wird es unter den ca.  $10^6$  Sequenzen der Bibliothek identifiziert. Nach der Sequenzierung des Gens kann es durch gezielte Klonierung in einen Expressionsvektor eingebaut werden. Dieses sehr arbeitsaufwendige Verfahren ist von mehreren Gruppen erfolgreich eingesetzt worden<sup>[5, 244–253, 256–265]</sup>. Aus unterschiedlichen Geweben wird

cDNA gewonnen und über einen geeigneten Linker beispielsweise in das Genom des Phagen  $\lambda$  eingebaut und in Bakteriophagen eingeschleust. Diese werden dann in *E. coli* kultiviert und die Zellkultur auf das gewünschte Gen oder Genprodukt hin untersucht. Das Glycosyl-Transferase-Gen wird in der Regel durch Hybridisierung mit radiomarkierten DNA-Sonden identifiziert<sup>[245–248]</sup>. Bei dieser Art des Screenings ist eine vorherige Kenntnis der Gensequenz erforderlich. Diese Information kann manchmal durch Extrapolation aus einem Teil der Proteinsequenz oder aus der DNA-Sequenz

für eine Glycosyl-Transferase aus einer ähnlichen Quelle erhalten werden. Zwei andere Techniken sind für ein Screening von Glycosyl-Transferase-cDNA-Bibliotheken verwendet worden, wobei allerdings jeweils eine erfolgreiche Transkription und Translation des Genprodukts vorausgesetzt wird. Bei der Klonierung von  $\alpha$ 2-6-Sialyl-Transferase aus Rattenleber nutzten Weinstein et al. polyklonale Antikörper gegen das gereinigte Enzym für das Screening<sup>[253]</sup>. Bei der zweiten Methode von Larsen et al.<sup>[251]</sup> muß die Gensequenz nicht vollständig bekannt sein; man nutzt die Spezifität eines Lectins (eines kohlenhydratbindenden Proteins), das ein an der Zelloberfläche exprimiertes Glykokonjugat-Produkt der gesuchten  $\alpha$ 1-3-Galactosyl-Transferase erkennt. Die transformierten Zellen werden dann durch mehrfaches Panning auf Petrischalen isoliert, die mit einer Schicht des Lectins überzogen worden waren. Bei diesen Verfahren werden Bibliotheken eingesetzt, die jeweils nur sehr wenige Kopien des gewünschten Gens enthalten. Eine bessere Aussicht auf Erfolg besteht, wenn die Zahl der Kopien des Gens erhöht werden kann. Dies wurde durch die 1985 eingeführte In-vitro-Amplifizierungsmethode auf Grundlage der Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) möglich<sup>[254, 255]</sup>. Natürlich setzt PCR (und Expression-Cassette-PCR, ECPCR)<sup>[255]</sup> ebenso wie das Hybridisierungs-Screening die Kenntnis der Sequenz voraus.

Sobald das Gen identifiziert worden ist, wird es unter Anwendung von Standardtechniken sequenziert. Danach muß das Gen über einen Vektor in ein Expressionssystem kloniert werden. Dies gelang bisher nur mit wenigen Glycosyl-Transferasen. Togrohl et al. haben das Glucuronyl-Transferase-Gen aus Mausleber in den Hefevektor pEVP11 eingeschleust und das Enzym in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert<sup>[245]</sup>. Die Glucuronyl-Transferase aus Rattenleber wurde über den SV40-Vektor in COS-Zellen exprimiert<sup>[246]</sup>. Analog wurde die  $\beta$ 1-4-Galactosyl-Transferase aus Rind kloniert<sup>[247]</sup>. Ein bemerkenswerter Ansatz zur Expression einer Glycosyl-Transferase in *E. coli* ist für die humane  $\beta$ 1-4-Galactosyl-Transferase entwickelt worden<sup>[256]</sup>. Eine *RsrII*-Restriktionsstelle im Galactosyl-Transferase-Gen ermöglichte die Abtrennung der Membrananker-Sequenz. Das kohäsive Ende wurde mit dem Klenow-Fragment abgestumpft (das Klenow-Fragment ist die große Untereinheit der DNA-Polymerase I; es weist eine 3'→5'-Exonuclease-Aktivität auf und trennt die überstehenden Basen an der Restrik-



Schema 51. a) Allgemeine Strategie für die Überexpression von CMP-NeuAc-Synthetase. b) Primer-Sequenzen mit einem zusätzlichen Decapeptidmarker und Restriktionsstellen für die Amplifizierung des CMP-NeuAc-Synthetase-Gens. Nach der Amplifizierung wird das markierte Gen in ein Plasmid eingebaut. c) Selektion eines Klon durch einen Antikörper gegen den Decapeptidmarker. Der Antikörper ist mit einer basischen Phosphatase konjugiert. Positive Klone ergeben eine blaue Färbung und können für die Überexpression verwendet werden. d) Entfernung der Decapeptidmarkierung durch PCR, Austausch von kodiertem und nichtkodiertem Gen, Überexpression mit LacZ-Promotor ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ , aus *E. coli*).

tionsstelle ab) und das glatte Ende mit einer ebenfalls mit dem Klenow-Fragment abgestumpften *EcoRI*-Restriktionsstelle des Expressionsvektor *pIN-III-ompA*<sub>2</sub> verbunden<sup>[257]</sup>. So wurde der Code für ein Fusionsprotein aus Galactosyl-Transferase und der *ompA*-Signalsequenz (*ompA* = outer membrane protein A, ein *E.-coli*-Protein, das durch seine abspaltbare N-terminale Signalsequenz für die Sekretion bestimmt wird). Transcription und Translation dieser Sequenz in *E. coli* führt zu einem aktiven Enzym, das in den periplasmatischen Raum sekretiert wird. Reinigung des Proteins und Sequenzierung des N-Terminus bestätigten die Expression der löslichen Form der Galactosyl-Transferase, die am N-Terminus um drei Aminosäuren verlängert ist (diese bleiben nach proteolytischer Abspaltung des restlichen Signalpeptids übrig). Die kinetischen Parameter dieses Enzyms waren von denen des natürlichen nicht zu unterscheiden. Allerdings konnte so nur eine sehr geringe Menge an Enzym produziert werden ( $<0.014 \text{ U L}^{-1}$ ). Auch die Steigerung der Produktivität in einem modifizierten *E.-coli*-Wirt<sup>[204]</sup> auf das 30fache war unter diesen Umständen nicht ausreichend, um synthetisch brauchbar zu sein. Möglicherweise effektivere Expressionssysteme basieren auf dem Baculovirus<sup>[179]</sup> und Hefe<sup>[258]</sup>.

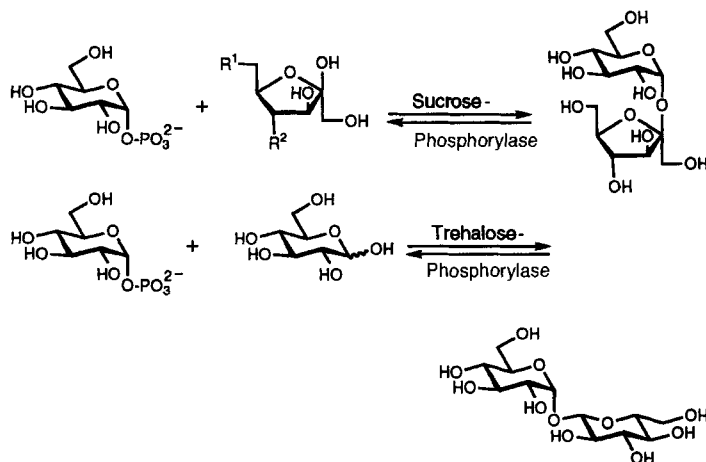
Bis heute sind nur sehr wenige Glycosyl-Transferasen kloniert und in für die enzymatische Synthese ausreichender Menge exprimiert worden<sup>[266]</sup>. Wegen der Vorteile der enzymatischen Synthese von Oligosacchariden gegenüber traditionellen Methoden ist allerdings zu erwarten, daß die Überexpression von Glycosyl-Transferasen auch in Zukunft großes Interesse auf sich ziehen wird. In Schema 51 b–d sind die Verfahren für die Überexpression von CMP-NeuAc-Synthetase in *E. coli* (ca.  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) dargestellt.

#### 5.4. Nicht-Leloir-Glycosyl-Transferasen: Glycosyltransfer aus Glycosylphosphaten und Glycosiden

Oligosaccharide können auch mit Nicht-Leloir-Glycosyl-Transferasen synthetisiert werden. Die Phosphorolyse von Polysacchariden wird von den sogenannten Glucan-Phosphorylasen katalysiert. Die Reaktion ist reversibel, und die Enzyme können auch in Syntheserichtung eingesetzt werden. Zwei besonders wichtige Beispiele sind die Synthesen von Sucrose und Trehalose, die durch Sucrose-<sup>[267]</sup> bzw. Trehalose-Phosphorylase<sup>[267]</sup> katalysiert werden (Schema 52). Zur selben Klasse gehören auch die Enzyme, die an der Biosynthese von Dextranen und Levanen beteiligt sind<sup>[268]</sup>.

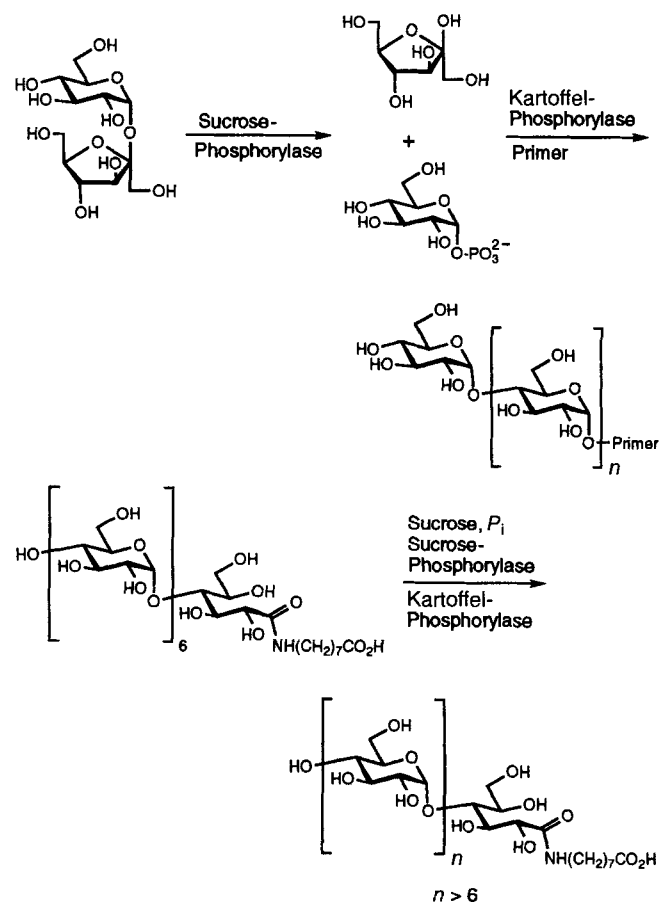
Nicht-Leloir-Glycosyl-Transferasen sind auch für die Synthese von Polysacchariden geeignet. Modifizierte Polysaccharide können interessante physikalische und biologische Eigenschaften aufweisen, die sich von denen der natürlichen unterscheiden. Andere Möglichkeiten zur Beeinflussung der Polymereigenschaften sind die Kontrolle der Genexpression der für ihre Synthese verantwortlichen Enzyme, die Regulierung der Enzymaktivität und eine Beeinflussung ihrer Biosynthese<sup>[269]</sup>. Mit Kartoffel-Phosphorylase [EC 2.4.1.1] wurden in vitro oligomere Maltose<sup>[159]</sup> und eine Reihe von linearen, kamm- oder sternförmigen Polymeren hergestellt<sup>[270]</sup>.

Dieses Verfahren wurde durch Verwendung eines gekoppelten Enzymsystems verbessert, wobei Glucose-1-phosphat in situ aus Sucrose und Phosphat mit Sucrose-Phosphorylase synthetisiert



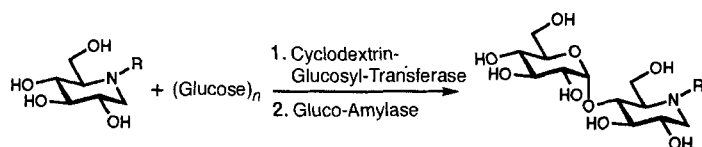
Schema 52. Synthese von Sucrose und Trehalose mit den jeweiligen Phosphorylasen.

wird<sup>[160]</sup>. So wird aus dem von der Kartoffel-Phosphorylase freigesetzten Phosphat Glucose-1-phosphat nachgebildet, so daß die Ausbeute an Polymer erhöht wird. Durch Kontrolle der Primer-Konzentration läßt sich das Molekulargewicht des entstehenden Polymers steuern. Mit nichtnatürlichen Primern, die zusätzliche funktionelle Gruppen haben, können Polysaccharide für weitere Modifizierungen, z.B. die Anknüpfung an ein Protein, maßgeschneidert werden (Schema 53).



Schema 53. Polysaccharidsynthese mit Phosphorylasen.

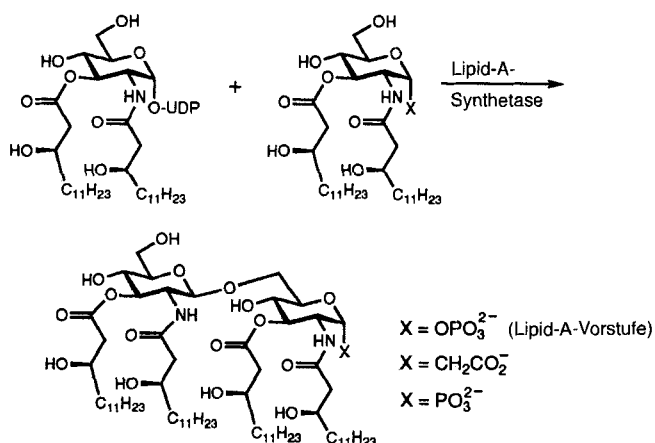
Cyclodextrin- $\alpha$ 1-4-Glucosyl-Transferase [EC 2.4.1.19] aus *Bacillus macerans* katalysiert die Cyclisierung von Oligomaltose zu  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin sowie den Transfer von Zuckereinheiten aus Cyclodextrin auf einen Acceptor unter Bildung von Oligosacchariden<sup>[271, 272]</sup>. Das Enzym setzt auch  $\alpha$ -Glucosylfluoride zu einer äquimolaren Mischung aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin sowie Oligomaltose um<sup>[273]</sup>. Durch Immobilisierung auf Kieselgel, das mit Glutaraldehyd funktionalisiert worden ist, konnte das Enzym so weit stabilisiert werden, daß nach vier Wochen Lagerung bei 4 °C kein Aktivitätsverlust festgestellt werden konnte. Mit geeigneten Acceptoren kann dieses Enzym Cyclodextrinanaloga und neuartige Oligosaccharide zugänglich machen. Nichtnatürliche Acceptoren, deren Strukturen der von Glucose ähneln, sind ebenfalls Substrate des Enzyms. Mit Desoxynojirimicin als Acceptor und Cyclodextrin als Donor wurde ein Oligoglucosyldesoxynojirimicin aufgebaut, das anschließend in 60 % Gesamtausbeute mit Gluco-Amylase zu 4-*O*- $\alpha$ -D-Glucopyranosyldesoxynojirimicin hydrolysiert wurde (Schema 54)<sup>[274]</sup>. Auch einige N-substituierte Derivate von



Schema 54. Synthese von *N*-Alkyldesoxynojirimicinglycosiden.

Desoxynojirimicin waren gute Substrate und wurden analog zu den entsprechenden Glucosylazazuckern umgesetzt. Eine dieser Verbindungen, 4-*O*- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-*N*-methyl-desoxynojirimicin, ist ein wirkungsvoller Inhibitor von Glucosidasen.

Ein wichtiger Schritt in der Biosynthese von Lipid A ist die Glycosylierung eines 2,3-Diacylglucosamin-1-phosphats in der 6-Position mit UDP-2,3-Diacylglucosamin als Donor unter Bildung einer Lipid-A-Vorstufe. Diese Reaktion wird durch Lipid-A-Synthetase katalysiert, die kloniert und überexprimiert worden ist<sup>[275]</sup>. Sie wurde auch für die In-vitro-Synthese dieser Lipid-A-Vorstufe und ihrer Analoga, z.B. C-Glycoside<sup>[276]</sup> und Phosphate, verwendet (Schema 55)<sup>[277]</sup>.



Schema 55. Synthese von Lipid-A-Analoga mit Lipid-A-Synthetase.

## 5.5. Glycosidasen und Transglycosidasen

Glycoside können mit Glycosidasen unter thermodynamisch oder kinetisch kontrollierten Bedingungen synthetisiert werden<sup>[13]</sup>. Zwar sind thermodynamische Bedingungen einfacher zu realisieren, doch sind die Ausbeuten in der Regel recht niedrig und überschreiten selten 15 %. Des weiteren ist die Isolierung und die Reinigung des Reaktionsproduktes wegen der geringen Ausbeute und der Bildung von Nebenprodukten erschwert.

Bei der kinetisch kontrollierten Synthese wird ein reaktives, enzymgebundenes Intermediat abgefangen, das aus einem aktivierten Glycosyldonor durch ein exogenes Nucleophil unter Knüpfung der glycosidischen Bindung gebildet wird<sup>[13]</sup>. Geeignete Glycosyldonoren für diese Transferreaktion sind Di- und Oligosaccharide, Arylglycoside und Glycosylfluoride. Die Reaktion muß sorgfältig überwacht werden, so daß sie nach vollständigem Verbrauch des Glycosyldonors sofort unterbrochen werden kann, um eine Hydrolyse des Produktes zu vermeiden. Die Ausbeuten, die mit diesem kinetisch kontrollierten Verfahren erzielt werden, liegen zwischen 20 und 40 %. Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln wird die Ausbeute im allgemeinen nicht erhöht, was im Gegensatz zu Erfahrungen mit der thermodynamisch kontrollierten Synthese steht.

Kinetisch kontrollierte Synthesen sind hauptsächlich mit solchen Glycosidasen durchgeführt worden, die Produkte unter Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum geben. Mit einer invertierenden Glycosidase und Glycosylfluoriden als Donoren verläuft die Reaktion dagegen unter Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum<sup>[278]</sup>. So wurden  $\alpha$ -Trehalase und  $\beta$ -Glucosylfluorid unter Bildung von  $\alpha$ -D-Glucopyranosyl- $\alpha$ -D-xylopyranosid  $\alpha$ , $\alpha$ -verknüpft<sup>[279]</sup>.

Normalerweise reagieren primäre Hydroxygruppen im Acceptor schneller als sekundäre, was zur bevorzugten Bildung von (1 $\rightarrow$ 6)-glycosidischen Bindungen führt. Eine gewisse Regiokontrolle kann man allerdings mit einer geeigneten Donor/Acceptor-Kombination erzielen<sup>[280]</sup>. Beispielsweise reagiert der Donor  $\alpha$ -Gal-Oph-*p*-NO<sub>2</sub> unter Katalyse von  $\alpha$ -Galactosidase mit  $\alpha$ -Gal-OMe (sowie  $\alpha$ -Gal-Oallyl) hauptsächlich zum  $\alpha$ -1,3-Disaccharid und mit  $\beta$ -Gal-OMe vorrangig zum  $\alpha$ -1,6-Disaccharid<sup>[280a, b]</sup>. Die Konfiguration am anomeren Zentrum des Acceptors beeinflusst also die Regiochemie der Glycosylierung. Dies wurde auch bei Reaktionen mit  $\beta$ -*N*-Acetyl-Galactosaminidase festgestellt<sup>[280c]</sup>. Wenn  $\alpha$ -Gal-Oph-*p*-NO<sub>2</sub> gleichzeitig als Donor und als Acceptor fungiert, kommt es vorwiegend zur  $\alpha$ -1,3-Verknüpfung, mit dem entsprechenden *ortho*-Nitrophenylglycosid wird überwiegend eine  $\alpha$ -1,2-Bindung gebildet<sup>[280a, b]</sup>. Mit  $\beta$ -Galactosidase entstehen hauptsächlich  $\beta$ -1,3-verknüpfte Disaccharide, wenn  $\beta$ -Benzyl- oder  $\beta$ -Allylgalactosiden als Donoren verwendet werden<sup>[13, 280]</sup>. Mit Glycalen als Acceptoren kann ebenfalls die Regioselektivität gesteuert werden<sup>[281]</sup>, wobei hauptsächlich 1,3-verknüpfte Glycoside entstehen, wenn die 6-Position ungeschützt oder blockiert vorliegt.

Man kann ebenfalls Glycosidasen aus unterschiedlichen Spezies einsetzen, um die Regioselektivität zu steuern. Beispielsweise katalysiert  $\beta$ -Galactosidase aus *Hoden* die Bildung von Gal $\beta$ 1-3GlcNAc und Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ SEt<sup>[282]</sup> aus Lactose und GlcNAc bzw. GlcNAc $\beta$ SEt. Die Nebenprodukte, die dabei entstanden, konnten mit *E. coli*- $\beta$ -Galactosidase hydrolysiert werden, die hauptsächlich  $\beta$ -1,6-verknüpfte Galactosylreste an-

greift. Die Ausbeute an  $\beta$ -1,3-verknüpften Disacchariden betrug 10–20 %. Auch Polysaccharide können durch kinetisch kontrollierte Glycosidase-Reaktionen synthetisiert werden: So wurde bei der durch Cellulase katalysierten Polymerisation von  $\beta$ -Cellobiosylfluorid zu Cellulose ein Polymerisationsgrad > 22 erreicht<sup>[283a]</sup>. Die  $\beta$ -Galactosidase von *Bacillus circulans* wurde in der Synthese von größeren Mengen an *N*-Acetylactosamin<sup>[283b]</sup> aus Lactose und GlcNAc verwendet. Diese Reaktion wurde in situ mit einer Sialyl-Transferase-Reaktion gekoppelt, so daß ein Sialyllactosamin entsteht (siehe Schema 49)<sup>[283c]</sup> und die Hydrolyse des Galactosidaseproduktes verhindert wird.

Auch der Glycosyltransfer auf andere Acceptoren als Kohlenhydrate ist möglich. Diese Reaktionen sind besonders interessant, da man ausgehend von racemischen oder *meso*-Alkoholen wegen der asymmetrischen Umgebung der aktiven Bindungsstelle eines Enzyms eine gewisse Diastereoselektivität oder optische Induktion erwarten darf. Tatsächlich konnten moderate bis außergewöhnlich hohe Diastereoselektivitäten festgestellt werden<sup>[14]</sup>.

Transglycosidasen sind den Glycosidasen insofern verwandt, als daß sie glycosidische Bindungen spalten, unterscheiden sich von ihnen aber dadurch, daß sie den Glycosylrest bei nur minimaler Hydrolyse auf einen anderen Acceptor übertragen. Transglycosidasen sind daher nützliche Instrumente zur Knüpfung von glycosidischen Bindungen. So wurde beispielsweise mit  $\beta$ -Fructofuranosidase aus *Antherobacter* sp. K-1-Fructose aus Sucrose auf die 6-Position eines Glucoserestes in Steviosid und in Rubusosid übertragen<sup>[284]</sup>. Eine Sucrase aus *Bacillus subtilis* katalysiert den reversiblen Transfer von Fructose aus Sucrose auf die 6-Position von Fructose am nichtreduzierenden Ende einer Levankette<sup>[285]</sup>. Mehrere nichtnatürliche Sucroederivate wurden ebenso synthetisiert<sup>[286]</sup>.

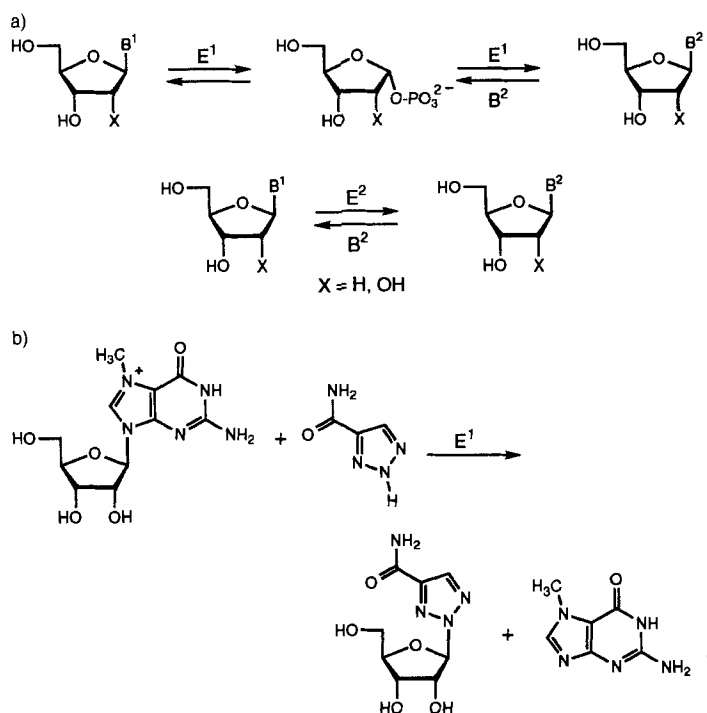
Eine Transsialidase aus *Tryptanosoma cruzi* überträgt Sialinsäure reversibel von und auf Position 3 eines terminalen  $\beta$ -Galactoserestes<sup>[287]</sup>. Ketten mit endständigen  $\alpha$ -verknüpften Galactoseresten sind keine Substrate. Eine Reihe von Oligosacchariden mit NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ -Substruktur sind so synthetisiert worden<sup>[288]</sup>. Darüber hinaus wurden mit diesem Enzym die terminalen Galactosereste in Glycoproteinen und -lipiden auf der Zelloberfläche von Erythrocyten resialyliert, die mit Sialidase behandelt worden sind<sup>[289]</sup>. Auch zur Sialylierung eines Galactosids wurde es verwendet<sup>[290]</sup>. Transsialidase aus *T. cruzi* ist also eine Alternative zur  $\alpha$ 2-3-Sialyl-Transferase.

## 5.6. Synthese von Nucleosiden

Nucleoside und deren Derivate kommen überall in der Natur vor. Sie sind an unzähligen biochemischen Abläufen, vor allem jedoch an der Speicherung und der Weitergabe der Erbinformation beteiligt. Das Interesse an dieser Verbindungsklasse ist zusätzlich dadurch gestiegen, daß einige Vertreter antiparasitische<sup>[291]</sup> (z.B. 1- $\beta$ -D-Ribofuranosyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-on, Allopurinolribosid) oder antivirale Eigenschaften<sup>[292, 293]</sup> (z.B. 3'-Azido-3'-desoxythymidin, Zidovudin, AZT) haben. Nucleoside werden traditionell auf unterschiedlichen chemischen Wegen hergestellt<sup>[294]</sup>. Dabei müssen Funktionsgruppen wiederholt ge- und entschützt und Positionen für die Glycosylierung aktiviert werden, was zu vielstufigen Synthesen

führt. Problematisch sind weiterhin die Kontrolle der Konfiguration am anomeren Zentrum, besonders wenn man die Synthese von  $\beta$ -D-Arabinofuranosyl- oder 2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosynucleosiden anstrebt, und die regiospezifische Bildung der glycosidischen C-N-Bindung mit nur einem der möglichen Nucleophile in der Purin- oder Pyrimidinbase.

Zwei enzymatische Methoden wurden für die Synthese von Nucleosiden verwendet (Schema 56a). Bei den meisten der bisher durchgeführten enzymatischen Synthesen von natürlichen sowie nichtnatürlichen Nucleosiden wird Nucleosid-Phosphorylase verwendet<sup>[295]</sup>.



Schema 56. a) Zwei Wege für die enzymatische Synthese von Nucleosiden. E<sup>1</sup> = Nucleosid-Phosphorylase, E<sup>2</sup> = Transribosylase. Sowohl E<sup>1</sup> als auch E<sup>2</sup> katalysieren reversible Reaktionen. b) Mit 7-*N*-Methylguanidin als Donor ist die durch E<sup>1</sup> katalysierte Reaktion irreversibel.

Dieses Enzym katalysiert die reversible Bildung von Purin- oder Pyrimidinnucleosiden und Phosphat aus Ribose-1-phosphat (R-1-P) und der Purin- bzw. Pyrimidinbase. Die Nucleosidbildung ist dabei thermodynamisch begünstigt. Die Riboseeinheit wird in der Regel von einem gut verfügbaren Nucleosid über intermediär gebildetes R-1-P auf eine Purin- oder Pyrimidinbase oder auf entsprechende Analoga übertragen, wobei in erster Linie isolierte Enzyme<sup>[296]</sup>, in einigen Fällen auch ganze Zellen verwendet wurden<sup>[297]</sup>. Die nachteilige Wirkung der Hydrolasen in den Zellen konnte durch eine Reaktionstemperatur von 60 °C weitgehend vermindert werden, während die Nucleosid-Phosphorylase unter diesen Bedingungen nach 3–5 Tagen noch > 70 % ihrer ursprünglichen Aktivität aufwies<sup>[297]</sup>.

Nucleosid-Phosphorylasen können je nach Ausgangsmaterial nach zwei Strategien verwendet werden. Bei der ersten wird R-1-P enzymkatalysiert bei hohen Phosphatkonzentrationen in guter Ausbeute aus einem Nucleosid erhalten<sup>[298]</sup>, isoliert und dann als Ribosyldonor enzymatisch mit Purin- oder Pyrimidin-

basen oder mit deren Analoga gekuppelt. Die zweite Möglichkeit ist eine Eintopfsynthese, in der in Gegenwart einer katalytischen Menge an Phosphat die Basen zweier Nucleoside gegeneinander ausgetauscht werden. Die erstgenannte Vorgehensweise (Isolierung des R-1-*P*) ist generell anwendbar, und fast jeder Heterocyclus, der ein Substrat für die Nucleosid-Phosphorylase ist, kann so glycosyliert werden. Die zweite Methode (In-situ-Bildung von R-1-*P*) ist dagegen eher begrenzt anzuwenden: Im besten Fall wird ein Gleichgewichtsgemisch aus Substrat- und Produktnucleosid gebildet, aus dem das gewünschte isoliert werden muß. In weniger günstigen Fällen agiert die freigesetzte natürliche Purin- oder Pyrimidinbase als wirkungsvoller kompetitiver Inhibitor gegenüber dem Purin- oder Pyrimidinanalogon, für das das Enzym eine geringere Affinität aufweist. So kann wegen der kompetitiven Inhibierung durch Hypoxanthin ( $K_M = 5.6 \text{ mM}$ ) 1,2,4-Triazol-3-carboxamid (TCA, das Aglycon von Virazol,  $K_M = 167 \text{ mM}$ ) nicht mit Inosin als Ribosyldonor und Purinnucleosid-Phosphorylase (PNPase) als Katalysator glycosyliert werden<sup>[299]</sup>. Dagegen gelang die Synthese von Virazol mit isoliertem R-1-*P* als Ribosyldonor<sup>[299]</sup>. Die Schwierigkeiten durch die Inhibierung können durch Verwendung eines Pyrimidinnucleosids als Glycosyldonor und eines Purins (oder Purinanalogons) als Acceptor umgangen werden, da das freigesetzte Pyrimidin die PNPase nicht inhibiert<sup>[300]</sup>. Wenn man diese Methode allgemein anwenden will, benötigt man sowohl eine Purinnucleosid-Phosphorylase als auch eine Pyrimidinnucleosid-Phosphorylase.

Mit aktivierten Purinen als Ribosyldonoren gelang der Austausch der Purinbasen ohne Isolierung von R-1-*P*<sup>[301]</sup>. Die aktivierten Purinderivate wurden durch 7-*N*-Methylierung von Inosin oder Guanosin erhalten; sie sind exzellente Substrate für die Phosphorolyse mit PNPase. Die freigesetzten 7-*N*-Methylpurine inhibieren die Produktbildung nicht, und das Gleichgewicht liegt ganz auf Seite der Produkte. Die Effektivität dieser Methode konnte durch die Eintopfsynthese von Virazol aus 1,2,4-Triazol-3-carboxamid und 7-*N*-Methylguanosin gezeigt werden (Schema 56b).

Nucleosid-Phosphorylasen akzeptieren eine breite Palette von Nucleosidanaloga, die im Basenteil und in der Zuckerkomponente modifiziert wurden. In der Regel wird auf eine Isolierung des Zuckerphosphat-Intermediats verzichtet, dessen Beteiligung wurde allerdings eindeutig nachgewiesen.

Nichtnatürliche Basen können erfolgreich mit natürlichen und mit nichtnatürlichen Glycosyldonoren verknüpft werden. Es gibt allerdings Einschränkungen. In der durch Purinnucleosid-Phosphorylase katalysierten Synthese einiger Imidazol[4,5-*c*]pyridinnucleoside (3-Desazapurinnucleoside) ging die normale Regioselektivität verloren, und ein Gemisch aus den an N-7 oder N-9 (Purinomenklatur) glycosylierten Produkten wurde erhalten. Ausgehend von Purinen mit einem Stickstoffatom in Position 3 wird hingegen nur ein Regioisomer erhalten: Die 2'-Desoxyribosylierung von unsubstituiertem Purin lieferte nur das 9-*N*-Glycosylpurin<sup>[300]</sup>. Offensichtlich sind entweder das Stickstoffatom N-3 der Purinbase oder ein geeigneter Substituent an C-6 für eine Orientierung der Base bei der regioselektiven Glycosylierung erforderlich.

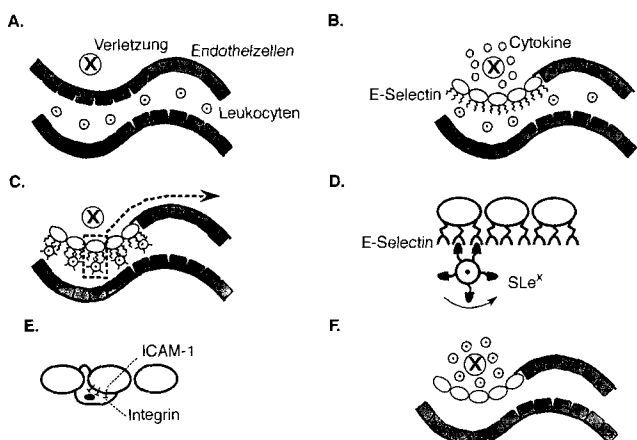
Nucleoside mit modifizierter Zuckerkomponente wurden ausgehend von Glycosyldonoren synthetisiert, die durch chemische Modifizierung von natürlich vorkommenden Nucleosiden

wie Uridin oder Cytidin hergestellt worden sind. Arabino-<sup>[297]</sup> und 2'-Amino-2'-desoxyribonucleoside<sup>[293]</sup> wurden auch enzymatisch in guter Ausbeute erhalten, 3'-Amino-2',3'-didesoxyribonucleoside hingegen nur in niedriger<sup>[302]</sup>. Die schlechte Ausbeute im letzteren Fall ist darauf zurückzuführen, daß beide Pyrimidinheterocyclus bei der Bindung an das Enzym konkurrieren oder daß die Reaktionsgeschwindigkeit wegen der Veränderung in Position 3, die für die Substraterkennung eine wichtige Rolle spielen könnte, insgesamt niedriger ist<sup>[303]</sup>.

Auch *N*-Transribosylasen wurden für die Synthese von Nucleosidanaloga eingesetzt<sup>[295,304]</sup>. Man unterscheidet hier zwei Unterklassen: Typ-I-Enzyme katalysieren den Transfer der Zuckereinheit zwischen zwei Purinen, Typ-II-Enzyme den Austausch zwischen zwei beliebigen Basen. Wie auch die Nucleosid-Phosphorylasen führen die Transribosylasen stereospezifisch zum  $\beta$ -Anomer des Nucleosids. Thymidin und 2'-Desoxycytidin sind die besten Glycosyldonoren. Was den Acceptor angeht, besteht ein gewisser Spielraum für Modifikationen. Die Transribosylase aus *L. leichmanii* wurde in der Synthese von 2-Chloradenosin, einem antileukämischen und immunosuppressiven Nucleosid verwendet<sup>[304c]</sup>.

## 5.7. Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und verwandte Verbindungen

Die durch Kohlenhydrate vermittelte Zelladhäsion ist ein wichtiger biologischer Prozeß, der durch Verletzungen des Gewebes sowie durch Infektionen ausgelöst werden kann und am Vorgang der Metastase beteiligt ist<sup>[10]</sup>. Ein erst vor kurzem entdeckter Adhäsionsprozeß ist die Wechselwirkung zwischen dem Glycoprotein E-Selectin (ein älterer Name für dieses Protein ist ELAM-1, Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule), das während einer Entzündung auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird, und einem Oligosaccharid auf der Oberfläche von Neutrophilzellen. Die von E-Selectin erkannte Liganstruktur ist das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (SLe<sup>x</sup>), das sich am Terminus von Glycolipiden an der Oberfläche von Neutrophilzellen befindet<sup>[305]</sup>. Der Adhäsionsprozeß<sup>[10]</sup> wird durch Signalmoleküle (Cytokine) oder andere entzündungsauslösende Faktoren (z.B. Toxine, Lipopolysaccharide, Leukotriene) eingeleitet, indem sie die Produktion von E-Selectin stimulieren. Durch Wechselwirkung mit den Endothelzellen rollen die Leukocyten auf der Oberfläche des Endothels. Weitere Adhäsion wird dann durch Wechselwirkung zwischen Proteinen erreicht, die durch Integrine an den Leukocyten und das die RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) enthaltende Protein ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) an den Endothelzellen vermittelt wird. Die Leukocyten können sich dann durch eine der schmalen Öffnungen zwischen den Endothelzellen zwängen und in das dahinterliegende Gewebe eindringen, wo sie zur Reparatur der Verletzung beitragen (Schema 57). Wenn aber zu viele Leukocyten an den Ort der Verletzung gebracht werden, können auch gesunde Zellen zerstört werden. Dies ist der Fall beim septischen Schock, bei chronischen Entzündungen wie Psoriasis (Schuppenflechte) und rheumatische Arthritis sowie bei der sogenannten Reperforationsverletzung, die nach einem Herzinfarkt oder einer Organtransplantation auftritt. Ein hoher Anteil an Sialyl-Lewis<sup>x</sup> befindet sich auch auf der Oberfläche von einigen Tumorzellen (z.B. bei Darm- und Lungenkrebs), was darauf



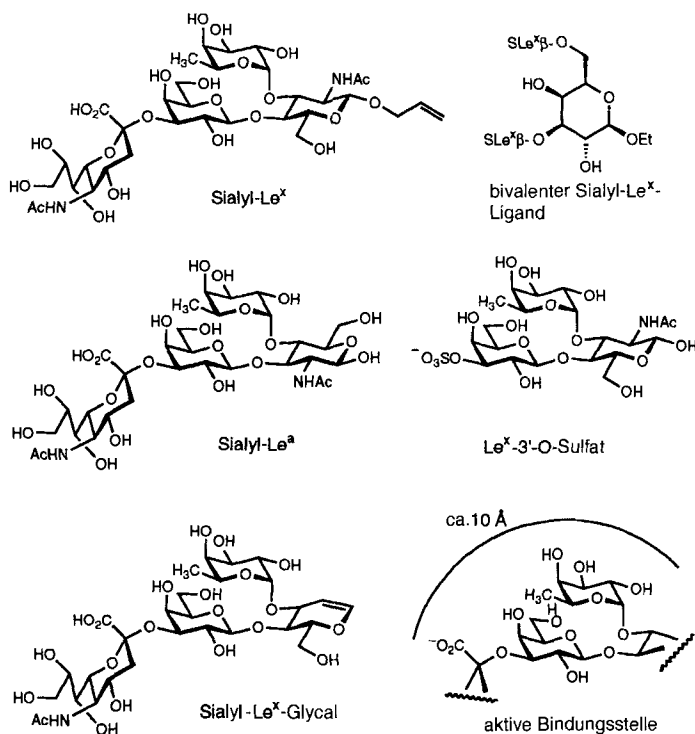
Schema 57. Die Bildung einer Entzündung beginnt durch einen Zelladhäsionsprozeß, der durch E-Selectin eingeleitet wird. Wenn eine Verletzung im Gewebe auftritt (A), werden Cytokine ausgeschüttet, um die Synthese von E-Selectin zu stimulieren (B). Die Adhäsion resultiert dann aus der Wechselwirkung zwischen E-Selectin und SLe<sup>x</sup> an der Oberfläche von Leukocyten (C). Sobald die Leukocyten entlang der Oberfläche des Endothels rollen (D), kommt es darüber hinaus zur Adhäsion durch Wechselwirkung zwischen Integrinen an den Leukocyten und einem Liganden an den Endothelzellen, der die Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) enthält und als ICAM-1 bezeichnet wird (E). Die Leukocyten gelangen durch schmale Öffnungen zwischen den Endothelzellen an den Ort der Verletzung (F).

hindeutet, daß Krebszellen die Adhäsion für ihre Metastase nutzen oder sich dadurch über die Blutbahn im Körper verbreiten<sup>[10]</sup>. Außer E-Selectin erkennen auch zwei andere kohlenhydratbindende Proteine, P- und L-Selectin, sialylierte Liganden während der Zelladhäsion.

Die Entdeckung, daß Sialyl-Lewis<sup>x</sup> der Ligand für E-Selectin ist<sup>[305]</sup>, hat der Entwicklung von Wirkstoffen für die Behandlung von entzündungsauslösenden Krankheiten und Tumoren einen neuen Anstoß gegeben. Da Sialyl-Lewis<sup>x</sup> in Lösung mit den Leukocyten um die Bindung von E-Selectin konkurriert, kann es den Adhäsionsprozeß unterbrechen und könnte daher zu einem nützlichen entzündungshemmenden oder Antitumormittel werden<sup>[10]</sup>. Eine Kenntnis der aktiven Konformation von Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, die durch E-Selectin erkannt wird, könnte zur Entwicklung von einfach zu synthetisierenden Analoga und nicht aus Kohlenhydraten bestehenden Mimetica mit besserer Bioverfügbarkeit führen. Ein anderer Ansatz ist die Inhibierung von Enzymen, die an der Biosynthese von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> beteiligt sind, z.B. von  $\alpha$ 1-3-Fucosyl-Transferase.

Beachtliche Forschungsanstrengungen sind auf die chemische Synthese von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> verwendet worden<sup>[306–309]</sup>. Allerdings sind bei diesen Synthesen in der Regel langwierige Schutzgruppenmanipulationen erforderlich, so daß ihre Durchführung in großem Maßstab schwierig ist. Die enzymatische Synthese von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> mit Glycosyl-Transferasen verläuft regio- und stereoselektiv in wäßriger Lösung und kommt ohne Schutzgruppen aus<sup>[179, 310, 311]</sup>. Durch Fortschritte in der Technik der DNA-Rekombination zur Klonierung und Überexpression von Enzymen und durch den Einsatz von Zuckernucleotid-Regenerierungsprozessen kann Sialyl-Lewis<sup>x</sup> heute in großen Mengen produziert werden (Cytel Co., San Diego, Kalifornien, produziert Sialyl-Lewis<sup>x</sup> in Kilogrammengen in Hinblick auf eine Anwendung als Arzneimittel für die Behandlung von Reperfu-sionsverletzungen).

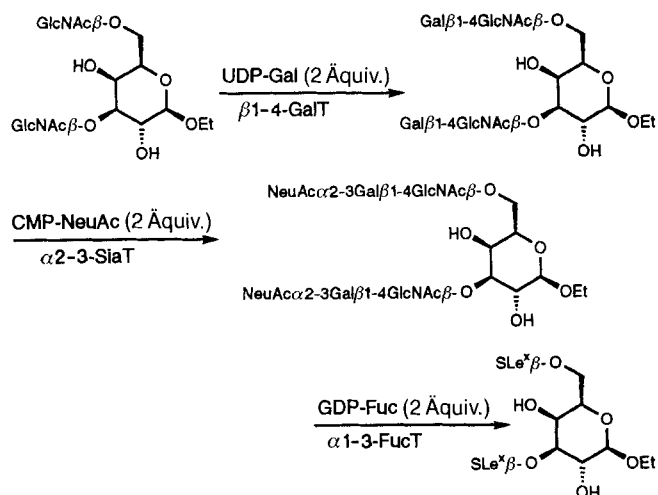
Das enzymatische Verfahren ist auch für die Synthese von [<sup>13</sup>C]Gal-1-markiertem Sialyl-Lewis<sup>x</sup> zur Konformationsanalyse durch NMR-Spektroskopie angewendet worden<sup>[179]</sup>. Die Konformationen und die biologischen Aktivitäten von Sialyl-Lewis<sup>a</sup><sup>[179, 312]</sup>, SLe<sup>x</sup>-Glycal<sup>[179]</sup> und Lewis<sup>x</sup>-3'-sulfat<sup>[313]</sup> entsprechen denen von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> (Schema 58). Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, daß die aktive Bindungsstelle von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> in erster Linie aus der Galactose- und der Fucoseeinheit sowie der Carboxylatgruppe der Sialinsäure besteht. Die Methylgruppe der Fucose ist nicht für die Bindung entscheidend, Fucose kann durch Arabinose ersetzt werden<sup>[314]</sup>. Die drei Hydroxygruppen der Fucose sind allerdings für die Bindung wichtig<sup>[314]</sup>.



Schema 58. Liganden für E-Selectin und die minimale Ligandstruktur für die Bindung an der aktiven Stelle. Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, Sialyl-Lewis<sup>a</sup>, Le<sup>x</sup>-3'-O-Sulfat und SLe<sup>x</sup>-Glycal weisen in vitro ähnliche Bindungsstärken gegenüber E-Selectin auf ( $IC_{50} \approx 1-2$  mM). Die Methylgruppe im Fucoserest ist nicht für die Bindung entscheidend, während alle drei Hydroxygruppen dieses Zuckers essentiell sind.  $Ca^{2+}$ -Ionen könnten mit Lewis<sup>x</sup> assoziiert sein, was durch Ergebnisse aus Ionenspray-Massenspektrometrie-Untersuchungen nahegelegt wird.

Weitere Untersuchungen zur Ligandenerkennung durch E-Selectin ergaben, daß das Oligosaccharid, das durch 1-3- und 1-6-Verknüpfung von zwei Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Resten mit Ethyl- $\beta$ -D-galactosid entsteht (bivalenter Ligand), die Zelladhäsion fünfmal besser inhibiert ( $IC_{50} = 0.4$  mM) als das monovalente Sialyl-Lewis<sup>x</sup>. Dies läßt auf eine polyvalente Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung schließen<sup>[314]</sup>. Die Bindungsaktivitäten wurden in vitro durch enzymgekoppelten Immunnachweis (Enzyme-linked Immunosorbant Assay, ELISA) bestimmt. Die In-vivo-Aktivität von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> ist weniger klar. Der  $IC_{50}$ -Wert für den Schutz gegen Lungenreperfu-sionsverletzungen in einem Rattenmodell beträgt beispielsweise nur ca. 1  $\mu$ M<sup>[315]</sup>. Während die Struktur des E-Selectin-Ligand-Komplexes und die Rolle

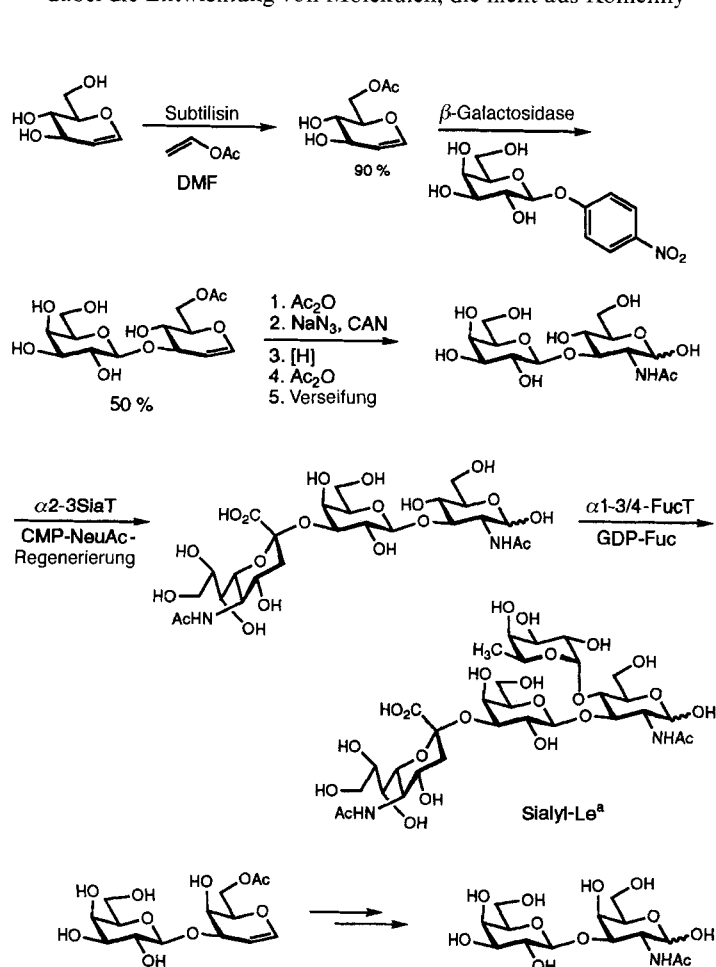
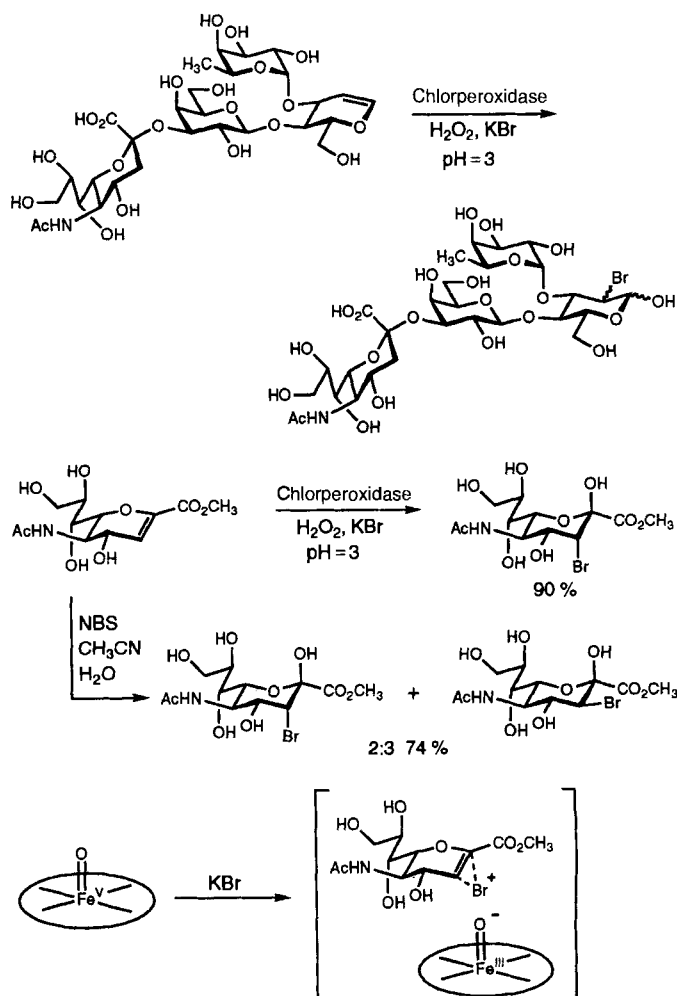


Schema 59. Synthese von bivalentem Sialyl-Lewis<sup>x</sup>.

von  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Bindung des Liganden weiterhin offen bleiben, ist durch weitere Untersuchungen mit definierten polyvalenten Liganden oder Mimetica, die durch einen geeigneten Spacer verknüpft sind, die durch E-Selectin eingeleitete Zelladhäsion aufzuklären, um darauf aufbauend neue Adhäsionsblocker entdecken und entwickeln zu können. Von besonderem Interesse ist dabei die Entwicklung von Molekülen, die nicht aus Kohlenhy-

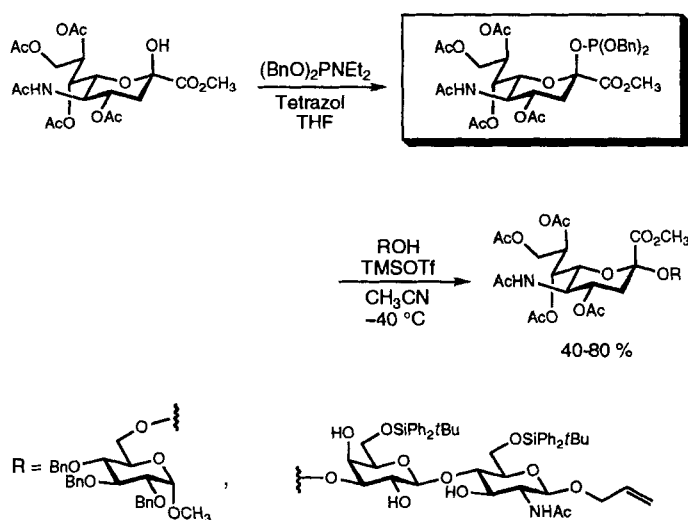
draten aufgebaut sind und die die Topographie der Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Bindungsregion aus Carboxylat, Galactose und Fucose nachahmen.

Die glycosidischen Bindungen in Sialyl-Lewis<sup>x</sup>, SLe<sup>x</sup>-Glycal und Lewis<sup>x</sup> können enzymatisch mit Glycosyl-Transferasen geknüpft werden. Die enzymatische Einführung einer Sulfatgruppe in die 3'-Position von Lewis<sup>x</sup> gekoppelt mit der Regenerierung des dafür notwendigen Cofaktors 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) ist im präparativen Maßstab bisher nicht entwickelt worden. Die Synthese eines bivalenten Oligosaccharidliganden, der zwei Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Reste enthält, gelang ausgehend von einem chemisch hergestellten Trisaccharid durch drei Glycosyl-Transferase-Reaktionen (Schema 59)<sup>[314]</sup>. Da die Glycosyl-Transferase zur Herstellung des Galβ1-3GlcNAc-Kerns von Sialyl-Lewis<sup>a</sup> nicht verfügbar ist, wurde dieses Disaccharid chemoenzymatisch aus Glucal durch Subtilisin-katalysierte Acetylierung sowie anschließende Galactosylierung mit β-Galactosidase und Azidonitrierung synthetisiert (Schema 60)<sup>[150]</sup>. Die restlichen glycosidischen Bindungen wurden dann durch geeignete Glycosyl-Transferasen geknüpft. Ein weiteres SLe<sup>x</sup>-Derivat wurde aus SLe<sup>x</sup>-Glycal durch Bromhydroxylierung mit Chlorperoxidase erhalten (Schema 61)<sup>[316]</sup>. Dieses halogenierte SLe<sup>x</sup>-Derivat könnte eine ähnliche Aktivität wie Sialyl-Lewis<sup>x</sup> aufweisen, da die aktive Konformation nicht ver-

Schema 60. Synthese von Sialyl-Lewis<sup>a</sup> mit Galactosidase/Sialyl-Transferase/Fucosyl-Transferase. Glucal wurde in DMF mit 3% eines wässrigen Phosphatpuffers regioselectiv acetyliert. CAN = Cerammoniumnitrat.Schema 61. Bromierung von Glycalen mit Chlorperoxidase. NBS = *N*-Bromsuccinimid.

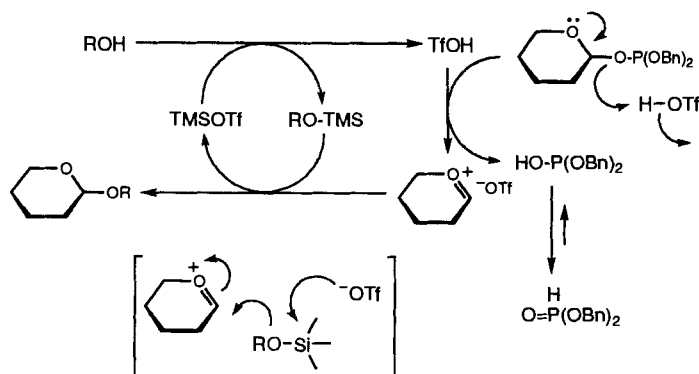
ändert sein sollte. Während die enzymatische Halohydroxylierung in diesem Fall nicht stereoselektiv verläuft, wird aus *N*-Acetylneuraminsäureglycal nur ein Regio- und Stereoisomer gebildet, die 3-Brom-*N*-acetylneuraminsäure mit dem Bromatom in axialer Stellung. Wahrscheinlich wird in beiden Fällen intermediär ein gebundenes Hydrobromit gebildet.

Es sollte beachtet werden, daß trotz der Nützlichkeit von Enzymen für die Oligosaccharidsynthese in großem Maßstab ihr Einsatzbereich begrenzt ist. Viele Oligosaccharidanaloga können enzymatisch nicht hergestellt werden. Für die Synthese von modifizierten Oligosacchariden sind daher chemische Glycosylierungsverfahren weiterhin erforderlich<sup>[317]</sup>. Die erst vor wenigen Jahren entwickelte Glycosylierung mit Glycosylphosphiten<sup>[318]</sup> ist hinsichtlich ihrer möglichen Anwendungen und ihres Mechanismus eingehend untersucht worden<sup>[319]</sup> und erscheint besonders geeignet für Sialylierungen (Schema 62). Me-



Schema 62. Herstellung von und chemische Sialylierung mit einem Sialylphosphit.

chanistische Untersuchungen von Glycosylierungen ergaben, daß Trifluormethansulfonsäure als Aktivator wirkt, wenn Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäureester (TMSOTf) als Katalysator verwendet wird (Schema 63)<sup>[319]</sup>.



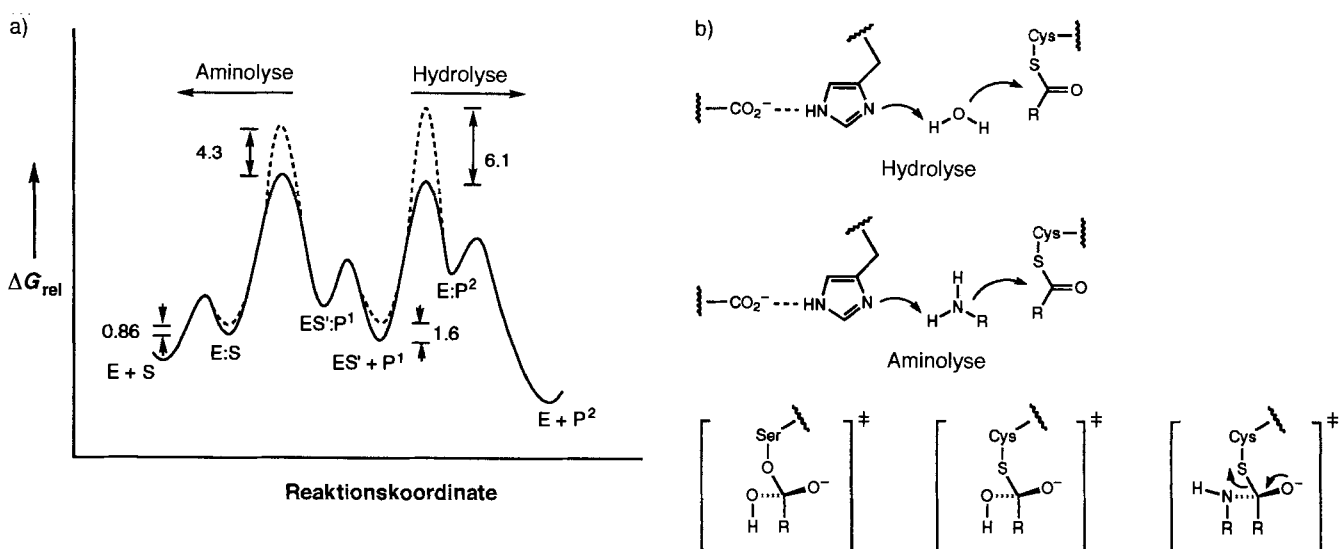
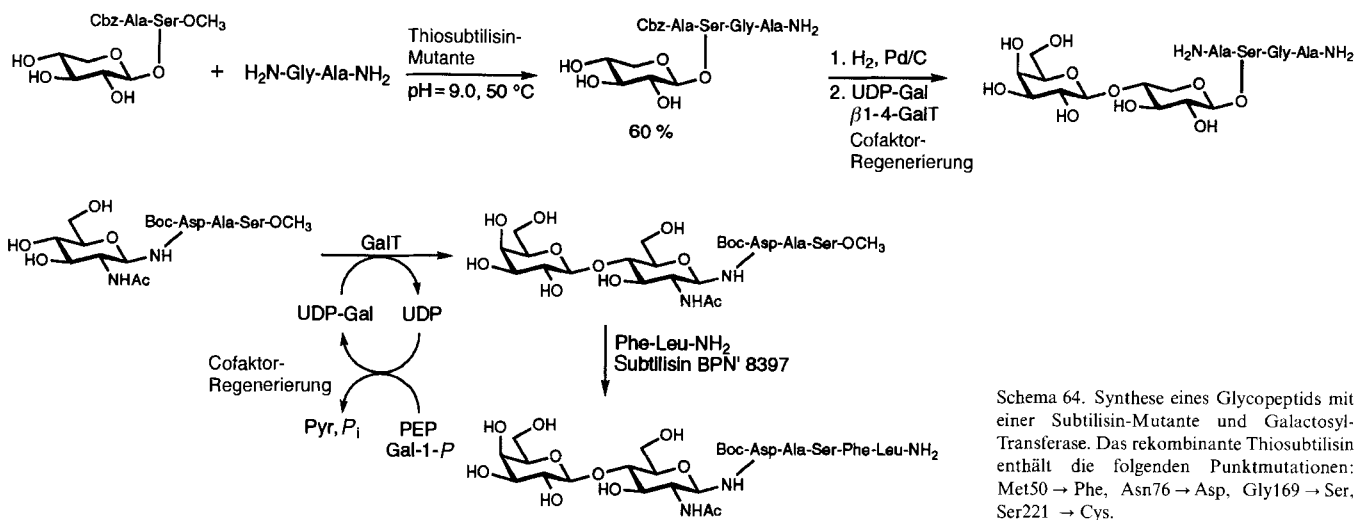
Schema 63. Vorgeschlagener Mechanismus für die Glycosylierung mit Phosphiten.

## 6. Glycopeptidsynthese und Glycopeptidremodeling

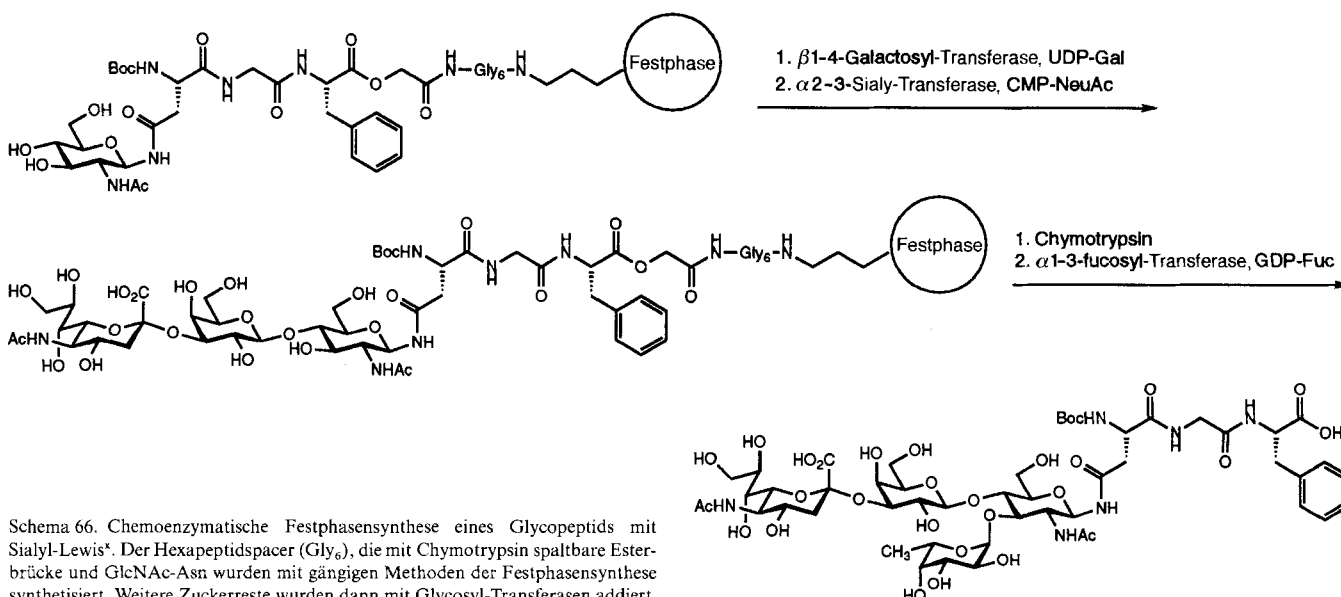
Viele Proteine, die als pharmazeutische Wirkstoffe interessant sind (der Gewebe-Plasminogenaktivator, das juvenile menschliche Wachstumshormon, CD4), sind Glycoproteine. Es besteht großes Interesse an der Entwicklung von Methoden, mit denen diese Glycoproteine gezielt durch Wegnehmen oder Hinzufügen von Saccharideinheiten modifiziert werden können (Glycoproteinremodeling). Auch die Synthese von neuartigen Protein-Oligosaccharid-Konjugaten ist ein wichtiges Forschungsziel<sup>[320, 321]</sup>. Die damit verbundene Hoffnung ist, daß durch Modifikationen der Zuckerkomponenten von natürlichen oder nichtnatürlichen Glycoproteinen die Halbwertszeit im Serum, die Löslichkeit sowie die Aufnahme in die Zielgewebe verbessert und gleichzeitig unerwünschte Immunantworten unterbunden werden können.

Enzyme sind naheliegende Werkzeuge für die Manipulation am Oligosaccharidteil und an der Oligosaccharidstruktur von Glycoproteinen. Die Empfindlichkeit und Polyfunktionalität von Proteinen diktiert die Notwendigkeit hoher Selektivität bei Modifizierungen, was sich nur schwer durch klassische Methoden erreichen läßt. Das Hauptproblem für den Einsatz von Enzymen für Glycoproteinremodeling und -synthese ist, daß viele der Glycosyl-Transferasen, die sich zu diesem Zweck anbieten würden, nicht zur Verfügung stehen. Des weiteren ist ungewiß, ob Glycosyl-Transferasen, die in vivo wahrscheinlich auf nicht oder nur teilweise gefaltete Proteine einwirken, auch an der Oberfläche eines vollständig gefalteten Proteins aktiv sind.

Eine nützliche Methode für die Synthese von Glycopeptiden ist der chemische<sup>[322]</sup> oder enzymatische<sup>[323]</sup> Einbau von Glycosylaminosäuren in Oligopeptide und der anschließende Ausbau des Saccharideils mit Glycosyl-Transferasen. Die enzymatische Knüpfung von Peptid- und Glycosidbindungen ist dabei besonders effektiv, weil beide Verfahren in wäßriger Lösung durchgeführt werden können und so die Zahl der Schutzgruppenmanipulationen in der Peptidsynthese auf ein Minimum beschränkt werden kann. Glycosylaminosäuren werden bei Subtilisin-katalysierten Kondensationen von Peptidsegmenten in den Positionen P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>2</sub> und P<sub>3</sub> toleriert. Mit einer thermostabilen Mutante des Enzyms, die durch ortsspezifische Mutagenese erhalten wurde und die im aktiven Zentrum statt Ser Cys aufweist, können Glycopeptide in wäßriger Lösung bei 60 °C gekuppelt werden (Schema 64)<sup>[323]</sup>. Die Aminolyse ist bei diesem Enzym gegenüber der Hydrolyse um einen Faktor von ca. 10000 bevorzugt, und kinetische Studien weisen darauf hin, daß die verbesserte Selektivität gegenüber Subtilisin auf der Stufe der Aminolyse des Acyl-Enzym-Intermediats erreicht wird (Schema 65)<sup>[323]</sup>. Die chemische Synthese von Glycopeptiden mit nachfolgender enzymatischer Glycosylierung läßt sich gut an einer aminopropylmodifizierten Kieselgel-Festphase durchführen<sup>[324]</sup>. Ein wesentliches Element dabei ist die Verbindung zwischen Acceptor und Festphase durch einen geeigneten Spacer mit einer selektiv spaltbaren Bindung. Nach dieser Strategie sind eine schnelle, iterative Bildung von Peptid- und Glycosidbindungen in organischen bzw. wäßrigen Lösungsmitteln sowie die enzymatische Abspaltung des Glycopeptids von der Festphase möglich (Schema 66).



Schema 65. a) Energiediagramm für die mit Subtilisin (—) oder Thiosubtilisin (---) katalysierte Aminolyse/Hydrolyse ( $E$  [kcal mol<sup>-1</sup>]). E = Enzym, ES' = acyliertes Enzym, S = Peptid, P<sup>1</sup> = Aminnucleophil, P<sup>2</sup> = Säure. b) Mechanismus der Hydrolyse und Aminolyse katalysiert durch Subtilisin und Thiosubtilisin. (Das Sauerstoff- und das Schwefelatom des Serin- bzw. Cysteinrestes sind zur Verdeutlichung separat dargestellt.)

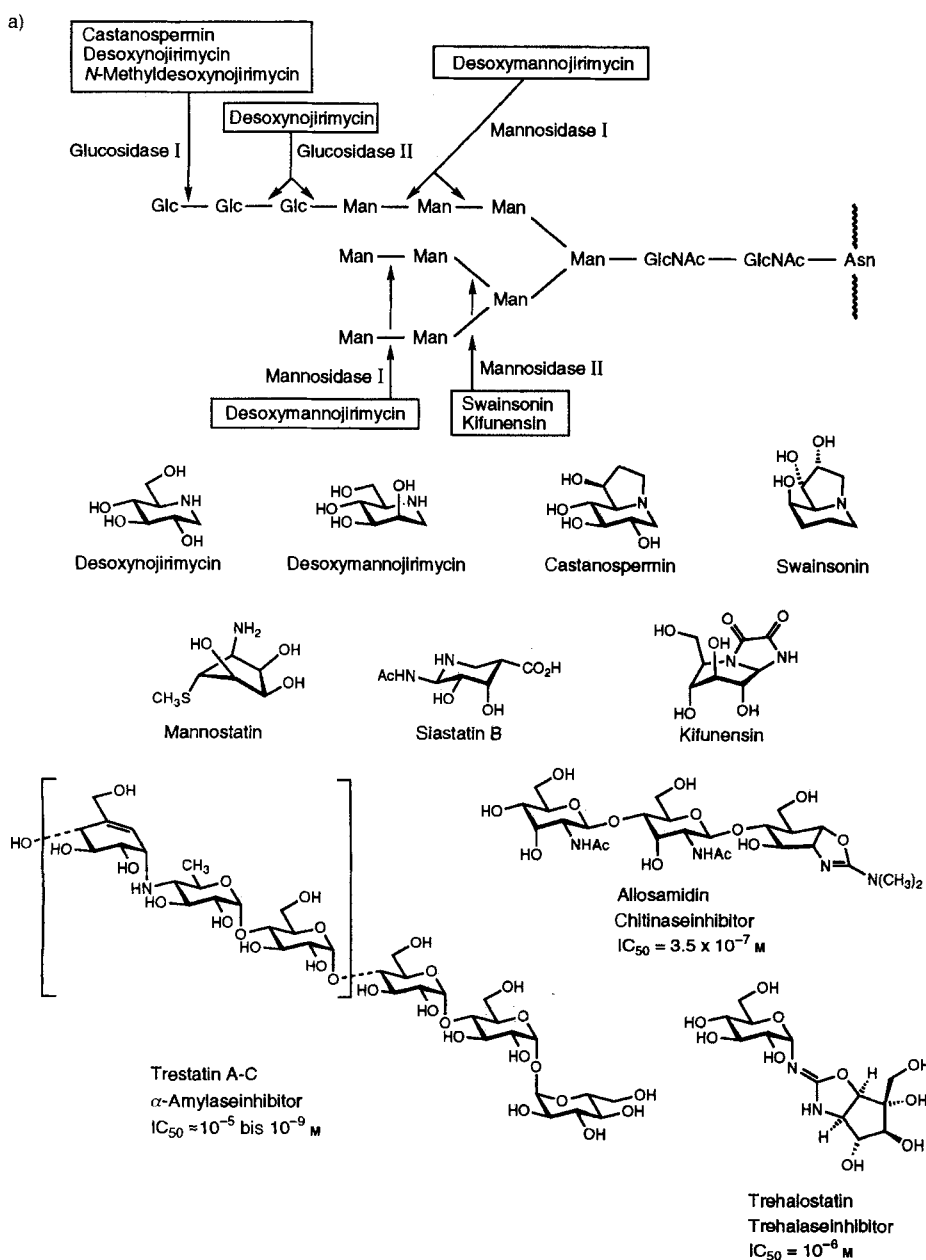


## 7. Inhibierung von Glycosidasen und Glycosyl-Transferasen

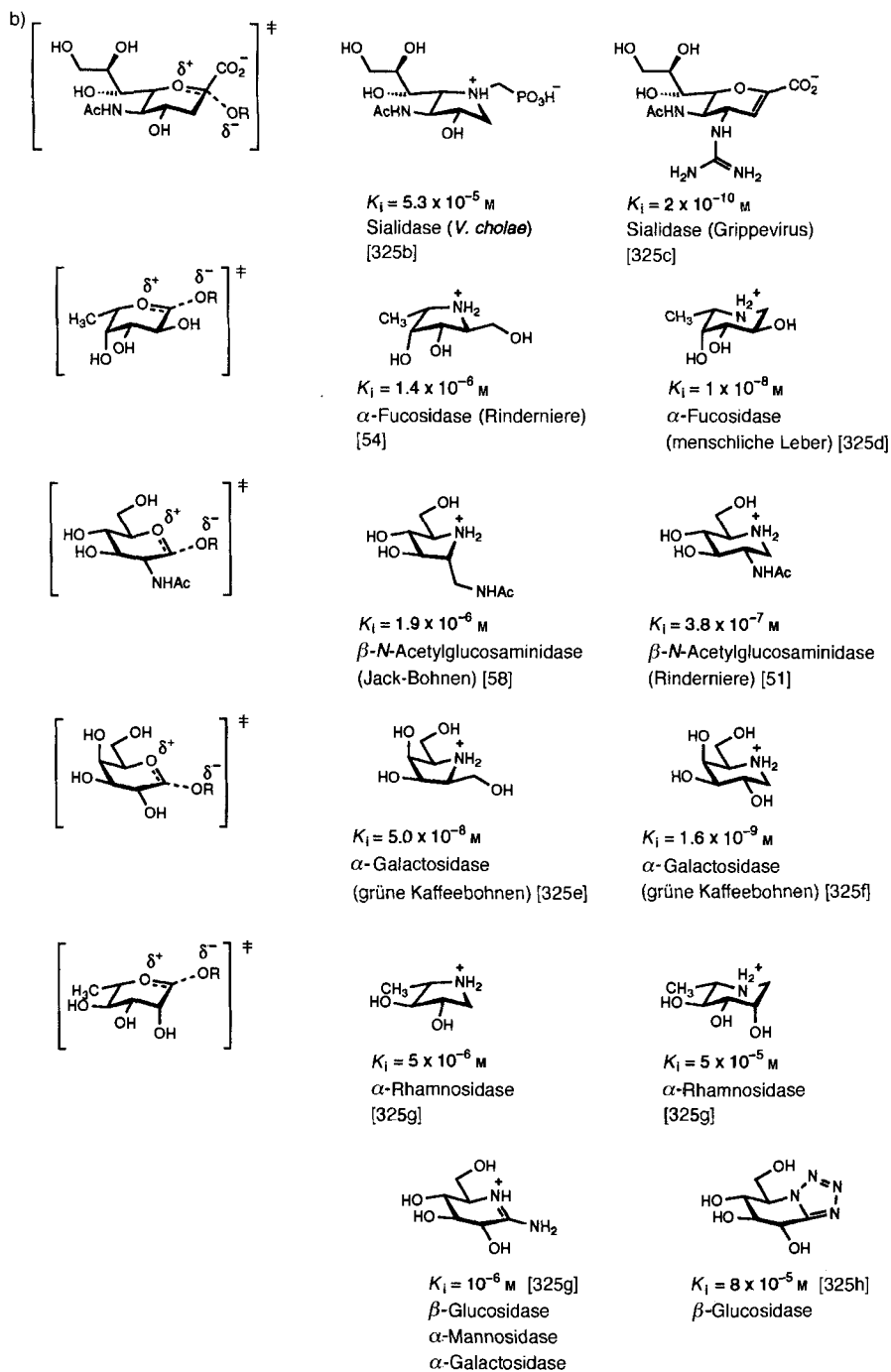
Glycosidasen und Glycosyl-Transferasen spielen eine wichtige Rolle bei der Biosynthese oligosaccharidhaltiger Glycopeptide und Glycolipide. Da diese Enzyme biologische Vorgänge wesentlich beeinflussen, ist die Entwicklung von entsprechenden Inhibitoren erstrebenswert<sup>[15, 16]</sup>. Mit Inhibitoren des Glycometabolismus wurden bereits Diabetes und andere metabolische Krankheiten behandelt. Ihr Einsatz ist auch für die Verhinderung von Infektionen, Entzündungen und Metastasen vorgeschlagen worden. Einige natürlich vorkommende sowie synthetische Inhibitoren von Glycosidasen und Glycosyl-Transferasen sind in Schema 67 und 68 zusammengestellt<sup>[325]</sup>.

Die Mechanismen der Reaktionen von Glycosidasen und zum Teil auch der von Glycosyl-Transferasen sind untersucht worden<sup>[326]</sup>. Im allgemeinen wird angenommen, daß die Reak-

tionen über einen Übergangszustand mit Halbsesselkonformation verlaufen, wobei das anomere Zentrum deutlich  $sp^2$ -hybridisiert ist. Dieser positiv geladene Übergangszustand entsteht säure- und basenkatalysiert, vermutlich unter Beteiligung der Carbonsäure- und Carboxylatreste im aktiven Zentrum des Enzyms. Verbindungen, die diesem Übergangszustand der Glycosidhydrolyse oder des Glycosyltransfers ähnlich sind, sind daher wirkungsvolle Inhibitoren dieser Enzyme. Die bereits besprochenen Azazucker scheinen diese Enzyme so zu inhibieren. Sowohl fünf- als auch sechsgliedrige Azazucker sind leicht über Aldolasereaktionen zugänglich und können als Bausteine für sequenzspezifische Glycosidase- oder Glycosyl-Transferase-Inhibitoren angesehen werden. Die synergistische Inhibierung von  $\alpha$ 1-3-Fucosyl-Transferase durch einen fucosylartigen, fünfgliedrigen Azazucker und GDP (siehe Schema 69)<sup>[179]</sup> ist besonders interessant, da sie einen neuen Ansatz für das Design von Glycosyl-Transferase-Inhibitoren aufzeigt. Ein weiterer, in-



Schema 67. a) Natürlich vorkommende Glycosidaseinhibitoren und der Ort ihrer Wirkung bei der Biosynthese von Glycoproteinen [325a] (Fortsetzung siehe nächste Seite).



Schema 67 (Fortsetzung). b) Synthetische Glycosidaseinhibitoren mit Fünf- oder Sechsring-Zuckerbausteinen. Angegeben sind die Inhibierungskonstanten  $K_i$  und das inhibierte Enzym.

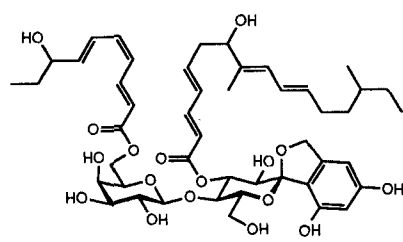
interessanter Befund ist, daß die meisten natürlich vorkommenden Glycosyl-Transferase-Inhibitoren keine Pyrophosphatgruppe enthalten. Möglicherweise können Zucker- (z.B. in Tunicamycin) oder Peptidreste zur Nachahmung des Pyrophosphat-Mn<sup>2+</sup>-Komplexes in Glycosyl-Transferase-Reaktionen verwendet werden. Andere Mimetica dieses Komplexes können als Verbindungsglied zwischen Nucleosid und Aza-

zucker bei der Entwicklung von Aza-zucker-Nucleosiden als synthetischen Glycosyl-Transferase-Inhibitoren nützlich sein. Die Frage nach der Stabilität und der Bioverfügbarkeit von Inhibitoren auf Saccharidbasis muß allerdings weiter untersucht werden, wenn Kohlenhydrate als Medikamente breitere Anwendung finden sollen. Die Entdeckung, daß C-Glycoside dieselbe Konformation wie die entsprechenden O-Glycoside aufweisen<sup>[327, 328]</sup>, ist wichtig, da C-Glycoside unter metabolischen Bedingungen stabil sind. Auch C-verknüpfte Azaglycoside, Glycoside mit einem Guanidinozucker<sup>[329]</sup> und O-verknüpfte Carbocyclen könnten die angestrebte Konformation aufweisen und somit sequenzspezifische Endoglycosidase- und Glycosyl-Transferase-Inhibitoren sein (siehe Schema 70). Was die Herstellung von Inhibitoren für Ligand-Rezeptor-Bindungsprozesse mit mehreren Wechselwirkungen angeht, bietet die durch Phospholipase D katalysierte Transphosphatidylierung<sup>[330]</sup> eine Möglichkeit für die Synthese von polyvalenten Inhibitoren, da die entstehenden Phospholipide durch molekulare Selbstorganisation Liposome bilden (siehe Schema 71).

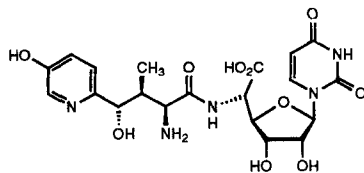
## 8. Ausblick

Die Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe auf Basis von Kohlenhydraten ist allgemein langsamer verlaufen als die von solchen aus anderen Naturstoffen. Dazu haben sicherlich die Schwierigkeiten bei der Synthese und der Analyse von Kohlenhydraten beigetragen. In mindestens drei Bereichen der Biologie und der Pharmazie hat man sich allerdings wieder den Kohlenhydraten zugewandt: Erstens bleibt die Blockierung des Aufbaus der bakteriellen Zellwand<sup>[331]</sup> eine der erfolgreichsten Strategien gegen bakterielle Infektionen. Da sich bakterielle Resistenz gegen die klassischen  $\beta$ -Lactamantibiotica (Pename und Cephame) immer wei-

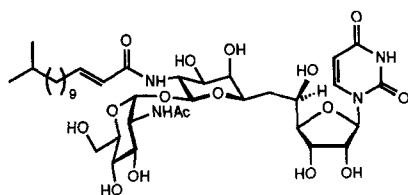
ter ausbreitet, besteht ein wachsendes Interesse daran, die Biosynthese von charakteristischen Kohlenhydratbestandteilen der Zellwand, wie KDO, Heptulose oder Lipid A, zu stören. Das Interesse an Bestandteilen der Zellwand erklärt sich zudem aus ihrer Bedeutung für Impfstoffe und als Ausgangspunkt für die Entwicklung von proteinfreien Immunomodulatoren. Zweitens sind Saccharide an der Zelloberfläche wichtig für die interzellular-



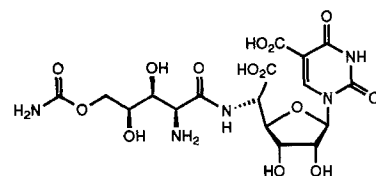
**Papulacandin B**  
Glucan-Synthase-Inhibitor  
 $IC_{50} = 1.2 \times 10^{-6} \text{ M}$



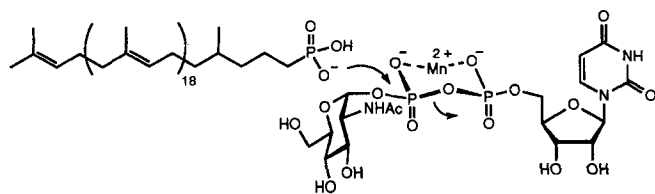
**Nikkomycin Z**  
Chitin-Synthetase-Inhibitor  
 $K_i = 1.4 \times 10^{-7} \text{ M}$



**Tunicamycin**  
Inhibitor des Transfers von  
UDP-GlcNAc

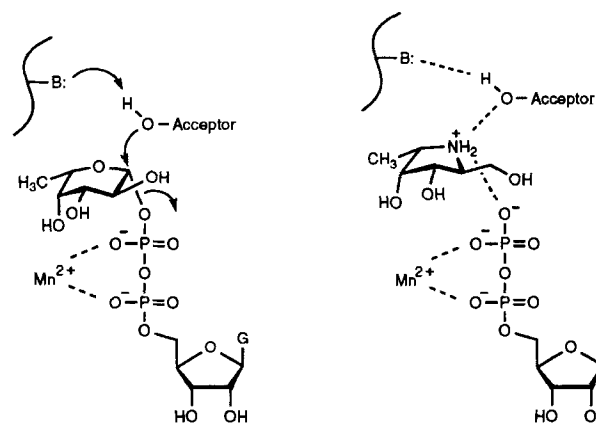


**Polyoxin D**  
Chitin-Synthetase-Inhibitor  
 $K_i = 9.0 \times 10^{-7} \text{ M}$



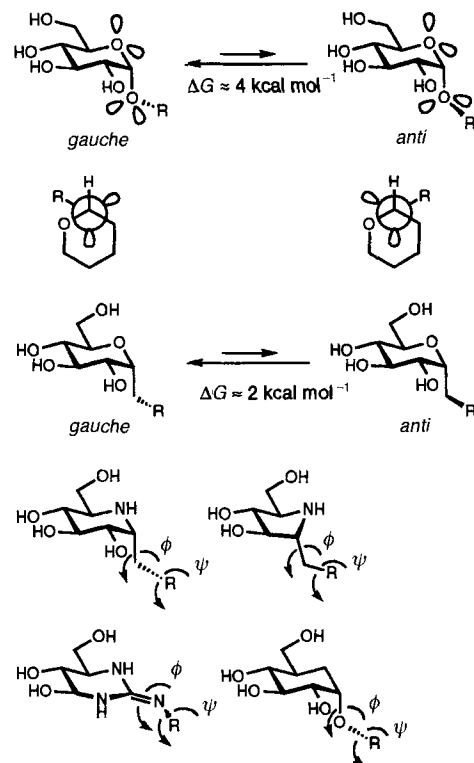
**GlcNAc-Phospho-Transferase-Reaktion**

Schema 68. Natürlich vorkommende Glycosyl-Transferase-Inhibitoren. Tunicamycin ahmt wahrscheinlich den Übergangszustand der GlcNAc-Phospho-Transferase-Reaktion nach.

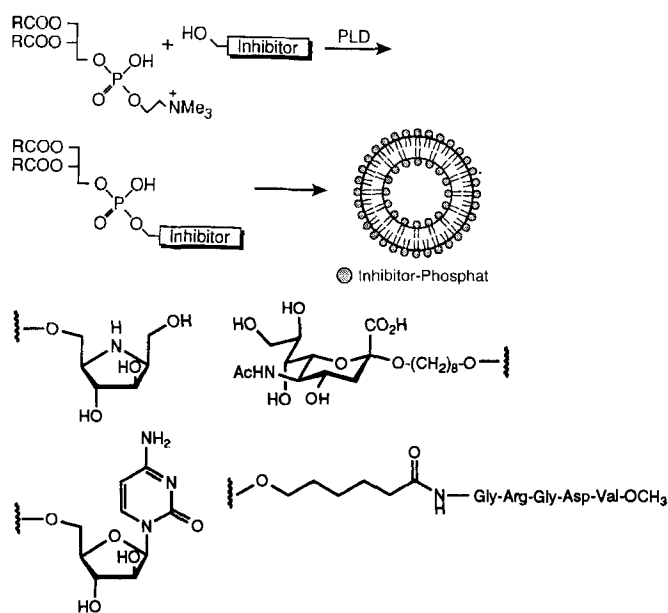


Schema 69. Mechanismus der Fucosyl-Transferase-Reaktion und synergistische Inhibierung des Enzyms durch GDP und einen Azazucker (einen Fucosidase-inhibitor).

läre Kommunikation und Zelladhäsion sowie für die Infektion, die Differenzierung und die Entwicklung von Zellen. Sie könnten eine Rolle in fehlgeleiteten Differenzierungsvorgängen spielen, wie sie in manchen Tumoren vorkommen. Die Synthese dieser Zelloberflächenliganden in Mengen, die für die Ermittlung ihres möglichen therapeutischen Nutzens ausreichen, durch enzymatische oder chemoenzymatische Methoden steht erst am Anfang ihrer Entwicklung. Die an der Biosynthese dieser Liganden beteiligten Enzyme sind im Hinblick auf therapeu-



Schema 70. Der *exo*-anomere Effekt und die Konformation synthetischer Glycosidaseinhibitoren.  $\alpha$ -Glycoside bevorzugen die *gauche*-Konformation aufgrund des anomeren und des *exo*-anomeren Effekts. Die Vorzugskonformation der C-Glycoside ist denen der verwandten O-Glycoside ähnlich. Die Konformation von C-verknüpften Azaglycosiden, N-verknüpften Guanidinozuckern und O-verknüpften Carbocyclen (potentielle sequenzspezifische Glycosidase- und Glycosyl-Transferase-Inhibitoren) muß noch eingehender untersucht werden.



Schema 71. Synthese von Phospholipid-Inhibitor-Konjugaten mit Phospholipase D (PLD). Durch Selbstorganisation entstehen Liposome, auf deren Oberfläche sich viele Inhibitoren befinden: So können polyvalente Liganden und Inhibitoren leicht hergestellt werden. Als Beispiele für Inhibitoren sind ein Azazucker, ein *arabino*-Nucleosid, phospholipidgebundene *N*-Acetylneuraminsäure (für den Hämagglutininrezeptor des Grippevirus) und ein RGD-Peptid (Ligand der Integrine) aufgeführt.

tische Anwendungen ebenfalls vielversprechende Zielverbindungen. Drittens hat das Interesse an Kohlenhydraten als Diagnostika in der Medizin zugenommen. Darüber hinaus gibt es weitere potentielle Anwendungen für Kohlenhydrate, z.B. als antivirale Verbindungen, als Bestandteile von Liposomen und als diätetische Zusätze in Nahrungsmitteln. Auf all diesen Gebieten leistet die enzymatische Synthese einen wichtigen Beitrag zur Forschung, indem sie die Kohlenhydrate leichter zugänglich macht.

*Die am Scripps Research Institute ausgeführten Arbeiten wurde von den National Institutes of Health, von der National Science Foundation und von der Cytel Corporation, San Diego, Kalifornien, gefördert. Die Arbeiten am RIKEN-Institute wurden von der Japanese Science and Technology Agency (Frontier Research Program) unterstützt. R. L. H. dankt der American Cancer Society für ein Postdoktorandenstipendium.*

Eingegangen am 13. Januar 1994 [A 47b]  
Übersetzt von Martin Hendrix, La Jolla, CA

- [136] L. F. Leloir, *Science* **1971**, 172, 1299.  
[137] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 631.  
[138] W. J. Lennarz, *Biochemistry* **1987**, 26, 7205.  
[139] S. C. Hubbard, *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, 50, 555.  
[140] a) B. Imperiali, K. L. Shannon, K. W. Rickert, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7942; b) B. Imperiali, K. L. Shannon, M. Unno, K. W. Rickert, *ibid.* **1992**, 114, 7944.  
[141] a) H. A. Kaplan, J. K. Welply, W. J. Lennarz, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 906, 161; b) A. Abbadi, M. Mcharfi, A. Aubry, S. Promilat, G. Boussard, M. Marrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2729; c) B. Imperiali, K. L. Shannon, *Biochemistry* **1991**, 30, 4374; d) C. B. Sharma, L. Lehle, W. Tanner, *Eur. J. Biochem.* **1981**, 116, 101.  
[142] J. Roth, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 906, 405.  
[143] H. Grisebach, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1978**, 35, 80.  
[144] J. H. Hash, *Methods Enzymol.* **1975**, 43; R. N. Russell, H.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7777; J. A. Vara, C. R. Hutchinson, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 14992; P. J. Oths, R. M. Hayer, H. G. Floss, *Carbohydr. Res.* **1990**, 198, 91.  
[145] O. Hindsgaul, *Semin. Cell Biol.* **1991**, 2, 319.  
[146] D. G. Drueckhammer, W. J. Hennen, R. L. Pederson, C. F. Barbas III, C. M. Gautheron, T. Krach, C.-H. Wong, *Synthesis* **1991**, 499.  
[147] a) J. E. Heidlas, K. W. Williams, G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 307; b) N. K. Kochetkov, V. N. Shibaev, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1973**, 28, 307.  
[148] H. G. Khorana, *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interests*, Wiley, New York, **1961**.  
[149] A. M. Michelson, *The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*, Academic Press, New York, **1963**.  
[150] V. M. Clark, D. W. Hutchinson, A. J. Kirby, S. G. Warren, *Angew. Chem.* **1964**, 76, 704; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, 3, 678.  
[151] L. A. Slotin, *Synthesis* **1977**, 737.  
[152] K. H. Scheit, *Nucleotides Analogs, Synthesis and Biological Function*, Wiley, New York, **1980**.  
[153] F. Cramer, H. Neunhoeffer, *Chem. Ber.* **1962**, 95, 1664.  
[154] D. E. Hoard, D. G. Ott, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 1785.  
[155] E. S. Simon, S. Grabowski, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1834.  
[156] a) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212; b) P. Pale, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4547.  
[157] U. B. Gokhale, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *Can. J. Chem.* **1990**, 68, 1063.  
[158] M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2260.  
[159] a) B. Pfannemüller, *Stärke* **1968**, 11, 341; b) W. Praznik, R. Ebermann, *Starch/Stärke* **1979**, 31, 288.  
[160] H. Waldmann, D. Gygas, M. D. Bednarski, W. R. Shangraw, G. M. Whitesides, *Carbohydr. Res.* **1986**, 157, C4.  
[161] C.-H. Wong, S. L. Haynie, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 5416.  
[162] H. J. Leucks, J. M. Lewis, V. M. Rios-Mercadillo, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 5829.  
[163] B. L. Hirschbein, F. P. Mazenod, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 3765.  
[164] E. S. Simon, S. Grabowski, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8920.  
[165] M.-J. Kim, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1987**, 16, 95.  
[166] E. S. Simon, M. D. Bednarski, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7159.  
[167] H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides in *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Vol. 6 (Hrsg.: G. E. Russell), Intercept, Wimborne, Dorset, **1988**, Kap. 6.  
[168] C.-H. Wong, S. L. Haynie, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 115.  
[169] a) K. Kawaguchi, H. Kawai, T. Tochikura, *Methods Carbohydr. Chem.* **1980**, 8, 261; b) T. Tochikura, K. Kawaguchi, H. Kawai, Y. Mugibayashi, K. Ogata, *Hakko Kagaku Zasshi* **1968**, 46, 970; c) T. Tochikura, H. Kawai, S. Tobe, K. Kawaguchi, M. Osugi, K. Ogata, *ibid.* **1968**, 46, 957.  
[170] U. Korf, J. Thiem, *Synlett* **1991**, 313.  
[171] V. Ginsburg, *Adv. Enzymol.* **1964**, 26, 35.  
[172] a) J. E. Heidlas, W. J. Lees, P. Pale, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 146; b) J. E. Heidlas, W. J. Lees, G. M. Whitesides, *ibid.* **1992**, 57, 152.  
[173] G. Srivastava, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *Carbohydr. Res.* **1993**, 245, 137.  
[174] P. A. Ropp, P.-W. Cheng, *Anal. Biochem.* **1990**, 187, 104.  
[175] F. Maley, *Methods Enzymol.* **1972**, 28, 271.  
[176] T. J. Grier, J. R. Rasmussen, *Anal. Biochem.* **1982**, 127, 100.  
[177] V. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **1960**, 235, 2196.  
[178] K. Yamamoto, T. Maruyama, H. Kumagai, T. Tochikura, T. Seno, H. Yamaguchi, *Agric. Biol. Chem.* **1984**, 48, 823.  
[179] Y. Ichikawa, Y.-C. Lin, D. P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9283.  
[180] R. Stiller, J. Thiem, *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 467.  
[181] a) H. A. Nunez, J. V. O'Connor, P. R. Rosevear, R. Barker, *Can. J. Chem.* **1981**, 59, 2086; b) V. B. Gokhale, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *ibid.* **1990**, 68, 1063; c) R. R. Schmidt, B. Wegmann, K.-H. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 191, 121; d) G. H. Veeneman, H. J. G. Broxterman, G. H. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6175; e) Y. Ichikawa, M. M. Sim, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2943.  
[182] E. J. Toone, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5603.  
[183] D. Gygas, P. Spies, T. Winkler, U. Pfarr, *Tetrahedron* **1991**, 28, 5119.  
[184] a) H. H. Higa, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 8838; b) J. Thiem, W. Treder, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 1100; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 1096; c) D. H. van den Eijnden, W. van Dijk, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1972**, 353, 1817; d) J. Haverkamp, J. M. Beau, R. Schauer, *ibid.* **1972**, 360, 159; e) E. L. Kean, *J. Biol. Chem.* **1970**, 9, 2391; f) C. Auge, C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 789.  
[185] J. Thiem, P. Stangier, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 1101.  
[186] J. L.-C. Liu, G.-J. Shen, Y. Ichikawa, J. F. Rutan, G. Zapata, W. F. Vann, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3901.  
[187] T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1765.  
[188] H. Kondo, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8748.  
[189] S. Makino, Y. Ueno, M. Ishikawa, Y. Hayakawa, T. Hata, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2775.  
[190] L. Warren, R. Blacklow, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3527; W. F. Vann, R. P. Silver, C. Abeiyon, K. Chang, W. Aaronson, A. Sutton, C. W. Finn, W. Lindner, M. Kotsatos, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 17562.  
[191] G. Zapata, W. F. Vann, W. Aaronson, M. S. Lewis, M. Moos, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 14769.  
[192] Y. Ichikawa, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4698.  
[193] G.-J. Shen, J. L.-C. Liu, C.-H. Wong, *Biocatalysis* **1992**, 6, 31.  
[194] S. L. Shames, E. S. Simon, C. W. Christopher, W. Schmid, G. M. Whitesides, L.-L. Yang, *Glycobiology* **1991**, 1, 187.  
[195] E. Schreiner, R. Christian, E. Zbiral, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 93.  
[196] M. Hartmann, R. Christian, E. Zbiral, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, 83.  
[197] H. J. Gross, A. Buensch, J. C. Paulson, R. Brossmer, *Eur. J. Biochem.* **1987**, 168, 595.  
[198] H. J. Gross, R. Brossmer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 177, 583.  
[199] R. Schauer, M. Wember, C. F. do Amaral, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1972**, 353, 883.  
[200] R.-T. Schwarz, R. Datema, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1982**, 40, 287.  
[201] a) F. L. Schanbacher, K. E. Ebner, *J. Biol. Chem.* **1970**, 245, 5057; b) L. J. Berliner, M. E. Davis, K. E. Ebner, T. A. Beyer, J. E. Bell, *Mol. Cell. Biochem.* **1984**, 62, 37; c) H. A. Nunez, R. Barker, *Biochemistry* **1980**, 19, 489.  
[202] a) I. P. Trayer, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 6666; b) P. Andrews, *FEBS Lett.* **1970**, 9, 297; c) R. Barker, K. W. Olsen, J. H. Shaper, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 7135; d) A. K. Rao, F. Garver, J. Mendicino, *Biochemistry* **1976**, 15, 5001.  
[203] a) M. M. Palcic, O. P. Srivastava, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1987**, 159, 315; b) C. Auge, S. David, C. Mathieu, C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 1467.  
[204] C.-H. Wong, Y. Ichikawa, T. Krach, C. Gautheron-Le Narvor, D. P. Dumas, G. C. Look, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8137.  
[205] J. Thiem, T. Wiemann, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 78; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 80.  
[206] a) Y. Nishida, T. Wiemann, J. Thiem, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 8043; b) Y. Nishida, T. Wiemann, V. Sinwell, J. Thiem, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2536; c) Y. Nishida, T. Wiemann, J. Thiem, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2905.

- [207] a) U. Zehavi, M. Herchman, *Carbohydr. Res.* **1984**, *133*, 339; b) U. Zehavi, S. Sadeh, M. Herchman, *ibid.* **1983**, *124*, 23.
- [208] C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9308; C. Auge, C. Gautheron, H. Pora, *Carbohydr. Res.* **1989**, *193*, 288.
- [209] B. Guilbert, T. H. Khan, S. L. Flitsch, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 1526.
- [210] a) M. M. Palcic, O. Hindsgaul, *Glycobiology* **1991**, *1*, 205; b) T. L. Lowary, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1993**, *249*, 163.
- [211] L. J. Berliner, R. D. Robinson, *Biochemistry* **1982**, *21*, 6340.
- [212] a) H. Yuasa, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5891; b) H. Kodama, Y. Kajihara, T. Endo, H. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 6419.
- [213] C.-H. Wong, R. Wang, Y. Ichikawa, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4343.
- [214] S. Sabesan, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2068.
- [215] J. Thiem, W. Treder, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 1100; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1096.
- [216] C. Auge, C. Gautheron, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 789.
- [217] R. D. McCoy, E. R. Vimr, F. A. Troy, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 12695; F. A. Troy, M. A. McCloskey, *J. Biol. Chem.* **1979**, *2*, 7377; J. Finne, *Trends Biochem. Sci.* **1985**, *10*, 129.
- [218] H. S. Condradt, A. Bunsch, R. Browmmer, *FEBS Lett.* **1984**, *170*, 295; C. R. Petrie, M. Sharma, O. D. Simmons, W. Korytnyk, *Carbohydr. Res.* **1989**, *186*, 326.
- [219] Y. Ito, J. J. Gaudino, J. C. Paulson, *Pure Appl. Chem.* **1993**, *65*, 753.
- [220] K. K.-C. Liu, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4933.
- [221] M. M. Palcic, A. P. Venot, R. M. Ratcliffe, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1989**, *190*, 1.
- [222] D. P. Dumas, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, J. B. Lowe, R. P. Nair, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 425.
- [223] P. R. Rosevear, H. A. Nunez, R. Barker, *Biochemistry* **1982**, *21*, 1421.
- [224] U. B. Gokhale, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 1063.
- [225] G. Srivastava, K. J. Kaur, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22356.
- [226] H. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* **1986**, *64*, 163.
- [227] I. Brockhausen, E. Hull, O. Hindsgaul, H. Schachter, R. N. Shah, S. W. Michnick, J. P. Carver, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11211.
- [228] I. Brockhausen, J. Carver, H. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* **1988**, *66*, 1134.
- [229] G. Srivastava, G. Alton, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1990**, *207*, 259.
- [230] a) K. J. Kaur, G. Alton, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1990**, *210*, 145; b) T. Linker, S. C. Crawley, O. Hindsgaul, *ibid.* **1993**, *245*, 323; c) I. Lindh, O. Hindsgaul, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 216.
- [231] a) B. Imperiali, J. W. Zimmerman, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6485; b) R. Oehrlein, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *Carbohydr. Res.* **1993**, *244*, 149.
- [232] W. McDowell, T. J. Grier, J. R. Rasmussen, R. T. Schwarz, *Biochem. J.* **1987**, *248*, 523.
- [233] P. Wang, G.-J. Shen, Y.-F. Wang, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3985.
- [234] a) S. L. Flitsch, J. P. Taylor, N. J. Turner, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, *380*, 382; b) S. L. Flitsch, H. L. Pinches, J. P. Taylor, N. J. Turner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 2087.
- [235] a) P. J. Card, W. D. Hitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5348; b) P. J. Card, W. D. Hitz, K. G. Ripp, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 158.
- [236] L. Elling, M. Grothus, M.-R. Kula, *Glycobiology* **1993**, *3*, 349.
- [237] R. S. Clark, S. Banerjee, J. K. Coward, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6275.
- [238] J. Lee, J. K. Coward, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4126.
- [239] Y. Ichikawa, J. J.-C. Liu, G.-J. Shen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6300.
- [240] G. C. Look, Y. Ichikawa, G.-J. Shen, G.-J. Cheng, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4326; J. C. Paulson, J. Weinstein, E. L. Ujita, K. J. Riggs, P.-H. Lai, *Biochem. Soc. Trans.* **1987**, *15*, 618.
- [241] K. Brew, F. J. Castellino, J. C. Vanaman, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 4570.
- [242] B. A. Bartholomew, G. W. Jourdan, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 5751.
- [243] M. Nagai, V. Dave, B. E. Kaplan, A. Yoshida, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 377.
- [244] J. C. Paulson, K. J. Colley, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17615.
- [245] F. Toghril, T. Kimura, I. S. Owens, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2349.
- [246] P. I. MacKenzie, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 6119.
- [247] A. S. Masibay, P. K. Qasba, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5733.
- [248] H. Narimatsu, S. Sinha, K. Brew, H. Okayama, P. K. Qasba, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 4720.
- [249] N. L. Shaper, W. W. Wright, J. H. Shaper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 791.
- [250] D. H. Joiasse, J. H. Shaper, D. H. van den Eijnden, A. J. Van Tunen, N. L. Shaper, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 14290.
- [251] R. D. Larsen, V. P. Rajan, M. M. Ruff, J. Kukowska-Latallo, R. D. Cummings, J. B. Lowe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 8227.
- [252] R. D. Larsen, L. K. Ernst, R. P. Nair, J. B. Lowe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6674.
- [253] J. Weinstein, E. U. Lee, K. McEntee, P.-H. Lai, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17735.
- [254] a) R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350; b) N. Arnheim, C. H. Levenson, *Chem. Eng. News* **1990**, *68*(40), 36.
- [255] K. D. MacFerrin, M. P. Terranova, S. L. Schreiber, G. L. Verdine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1937; K. Nakazawa, K. Furukawa, H. Narimatsu, A. Kobata, *J. Biochem.* **1993**, *113*, 747.
- [256] D. Aoki, H. E. Appert, D. Johnson, S. S. Wong, M. N. Fukuda, *EMBO J.* **1990**, *9*, 3171.
- [257] J. Ghayab, H. Kimura, M. Takahara, H. Hsiung, Y. Masui, M. Inouye, *EMBO J.* **1984**, *3*, 2437.
- [258] C. H. Krezdorn, G. Watsele, R. B. Kleene, S. X. Ivanov, E. G. Berger, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 113.
- [259] a) W. Gillespie, S. Kelm, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21004; b) D. X. Wen, B. D. Livingston, K. F. Medzihradsky, A. L. Burlingame, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21011.
- [260] N. L. Shaper, G. F. Hollis, J. G. Douglas, I. R. Kirsch, J. H. Shaper, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 10420.
- [261] G. D'Agostaro, B. Bendiak, M. Tropak, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *183*, 211.
- [262] K. Nakazawa, T. Ando, T. Kimura, H. Narimatsu, *J. Biochem.* **1988**, *104*, 165.
- [263] N. L. Shaper, J. H. Shaper, J. L. Meuth, J. L. Fox, H. Chang, I. R. Kirsch, G. F. Hollis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 1573.
- [264] K. A. Masri, H. E. Appert, M. N. Fukuda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *157*, 657.
- [265] a) FucT III: J. F. Kukowska-Latallo, R. D. Larsen, R. P. Nair, J. B. Lowe, *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1288; b) FucT IV: R. Kumar, B. Potvin, W. A. Muller, P. Stanley, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 21777; c) FucT V: B. W. Weston, R. P. Nair, R. D. Larsen, J. B. Lowe, *ibid.* **1992**, *267*, 4152; d) FucT VI: B. W. Weston, P. L. Smith, R. J. Kelly, J. B. Lowe, *ibid.* **1992**, *267*, 24575.
- [266] Übersichtsartikel: J. B. Lowe, *Seminars in Cell Biology* **1991**, *2*, 289.
- [267] S. L. Haynie, G. M. Whitesides, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1990**, *23*, 205.
- [268] R. Dedonder, *Methods Enzymol.* **1966**, *8*, 500.
- [269] a) D. Bolstein, R. W. Davis in *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression* (Hrsg.: J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach), Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, **1981**, S. 607; b) D. M. Carlson, *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59*, 1489.
- [270] G. Ziegast, B. Pfannemüller, *Carbohydr. Res.* **1987**, *160*, 185.
- [271] a) D. French, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1957**, *12*, 189; b) W. Saenger, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 343; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 344.
- [272] a) H. Bender, *Carbohydr. Res.* **1980**, *78*, 133; b) K. Wallenfels, B. Foldi, H. Niermann, H. Bender, D. Linder, *ibid.* **1978**, *61*, 359.
- [273] W. Treder, J. Thiem, M. Schlingmann, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5605.
- [274] a) Y. Ezure, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 2159; b) Y. Ezure, S. Maruo, N. Ojima, K. Konno, H. Yamashita, K. Miyazaki, T. Seto, N. Yamada, M. Sugiyama, *ibid.* **1989**, *53*, 61.
- [275] D. N. Crowell, M. S. Anderson, C. R. H. Raetz, *J. Bacteriol.* **1986**, *168*, 152.
- [276] H. Vypel, D. Scholz, I. Macher, K. Schindlmaier, E. Schutze, *J. med. Chem.* **1991**, *34*, 2759.
- [277] D. Scholz, K. Bednarik, G. Ehn, W. Neruda, E. Janzek, H. Loibner, K. Briner, A. Vasella, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2070.
- [278] a) E. S. Hehre, T. Sawai, C. F. Brewer, M. Nakano, T. Kanda, *Biochemistry* **1982**, *21*, 3090; b) T. Kasumi, Y. Tsumuraya, C. F. Brewer, H. Kersters-Hilderson, M. Claeysens, E. S. Hehre, *ibid.* **1987**, *26*, 3010.
- [279] T. Kasumi, C. F. Brewer, E. T. Reese, E. S. Hehre, *Carbohydr. Res.* **1986**, *146*, 39.
- [280] a) K. G. I. Nilsson, *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 95; b) *ibid.* **1988**, *180*, 53; c) D. H. G. Crout, D. A. MacManus, J.-M. Ricca, S. Singh, P. Critchley, W. T. Gibson, *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 1079; d) J. Lehmann, E. Schroter, *Carbohydr. Res.* **1979**, *71*, 65.
- [281] G. C. Look, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4253.
- [282] L. Hedby, E. Johansson, K. Mosbach, P. O. Larsson, A. Gunnarsson, S. Svensson, H. Lonn, *Glycoconjugate J.* **1989**, *6*, 161.
- [283] a) S. Kobayashi, K. Koshiwa, T. Kawasaki, S.-I. Shoda, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3079; b) G. F. Herrmann, U. Kragl, C. Wandrey, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1399; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1342; c) G. F. Herrmann, Y. Ichikawa, C. Wandrey, F. C. A. Gaeta, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3091.
- [284] H. Ishikawa, S. Kitahata, K. Ohtani, C. Ikutani, O. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 3137.
- [285] a) R. Dedonder, *Methods Enzymol.* **1964**, *8*, 500; b) F. Kunst, M. Pascal, J.-A. Lepesant, J. Walle, R. Dedonder, *Eur. J. Biochem.* **1974**, *42*, 611.
- [286] E. B. Rathbone, A. J. Hacking, P. S. J. Cheetham, *US-A 4617269*, **1986**.
- [287] S. Schenkman, J. Man-Show, G. W. Hart, V. Nussenzweig, *Cell* **1991**, *65*, 1117.
- [288] F. Vanderkerckhove, S. Schenkman, L. P. de Carvalho, S. Tomlinson, M. Kiso, M. Yoshida, A. Hasegawa, V. Nussenzweig, *Glycobiology* **1992**, *3*, 541.
- [289] S. Tomlinson, L. P. de Carvalho, F. Vanderkerckhove, V. Nussenzweig, *Glycobiology* **1991**, *2*, 549.
- [290] Y. Ho, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7862.
- [291] D. J. Hupe, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1986**, *21*, Kap. 23.



- [292] M. M. Mansuri, J. C. Martin, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1987**, 22, Kap. 15.
- [293] M. M. Mansuri, J. C. Martin, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1988**, 23, Kap. 17.
- [294] a) *Nucleic Acid Chemistry, Part 3* (Hrsg.: L. B. Townsend, R. S. Tipson), Wiley, New York, **1986**; b) *Nucleoside Analogs; Chemistry, Biology and Medicinal Applications* (Hrsg.: R. T. Walker, E. Declercz, F. Eckstein), Plenum, New York, **1979**.
- [295] D. W. Hutchinson, *Trends Biotechnol.* **1990**, 8, 348.
- [296] T. A. Krenitsky, G. W. Koszalka, J. V. Tuttle, J. L. Rideout, G. B. Elion, *Carbohydr. Res.* **1981**, 97, 139.
- [297] a) T. Utagawa, H. Morisawa, F. Yoshinaga, A. Yamazaki, K. Mitsugi, Y. Hirose, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, 49, 1053; b) T. Utagawa, H. Morisawa, S. Yamanaka, A. Yamazaki, F. Yoshinaga, Y. Hirose, *ibid.* **1985**, 49, 2167.
- [298] a) G. M. Tener, H. G. Khorana, *J. Chem. Soc.* **1957**, 79, 437; b) Y. Inoue, F. Ling, A. Kimura, *Agric. Biol. Chem.* **1991**, 55, 629.
- [299] T. Utagawa, H. Morisawa, S. Yamanaka, A. Yamazaki, F. Yoshinaga, Y. Hirose, *Agric. Biol. Chem.* **1986**, 50, 121.
- [300] T. A. Krenitsky, J. L. Rideout, E. Y. Chao, G. W. Koszalka, F. Gurney, R. C. Crouch, N. K. Cohn, G. Wolberg, R. Vinegar, *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 138.
- [301] W. J. Hennen, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4692.
- [302] T. A. Krenitsky, G. A. Freeman, S. R. Shaver, L. M. Beacham, S. Hurlbert, N. K. Cohn, L. P. Elwell, J. W. T. Selway, *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 891.
- [303] J. D. Stoecker, S. E. Ealick, C. E. Bugg, R. E. Parks, Jr., *Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1986**, 45, 2773.
- [304] a) J. Holguin, R. Cardinaud, *Eur. J. Biochem.* **1975**, 54, 505; b) *ibid.* **1975**, 54, 575; c) D. A. Carson, D. B. Wasson, E. Beutler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 2232; d) D. A. Carson, D. B. Wasson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, 155, 829; e) D. Betbeder, D. W. Hutchinson, A. O. L. Richards, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 4217.
- [305] M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. Hakomori, J. C. Paulson, *Science* **1990**, 250, 1130; G. Waltz, A. Aruffo, W. Kalanus, M. Bevilacqua, B. Seed, *ibid.* **1990**, 250, 1132; J. B. Lowe, L. M. Stoolman, R. P. Nair, R. D. Larson, T. L. Berhend, R. M. Marks, *Cell* **1990**, 63, 475. Kristallstrukturanalyse von E-Selectin: B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K.-S. Huang, D. M. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky, D. K. Burns, *Nature (London)* **1994**, 367, 532.
- [306] A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.* **1991**, 209, C1.
- [307] K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, N. J. Bockovich, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 870.
- [308] H. Kondo, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8748.
- [309] S. J. Danishefsky, K. Koseki, D. A. Griffith, J. Gervay, J. M. Peterson, F. E. McDonald, T. Oriyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8331.
- [310] M. M. Palcic, A. Venot, R. M. Ratcliffe, O. Hindsgaul, *Carbohydr. Res.* **1989**, 190, 1.
- [311] G. E. Ball, R. A. O'Neill, J. E. Schultz, J. B. Lowe, B. W. Weston, J. O. Nagy, E. G. Brown, C. J. Hobbs, M. D. Bednarski, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5449.
- [312] D. Tyrrell, P. James, N. Rao, C. Foxall, S. Abbas, F. Dasgupta, M. Nashed, A. Hasegawa, M. Kiso, D. Asa, J. Kidd, B. K. Brandley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 10372.
- [313] C.-T. Yuen, A. M. Lawson, W. Chai, M. Larkin, M. S. Stoll, A. C. Stuart, F. X. Sullivan, T. J. Ahern, T. Feizi, *Biochemistry* **1992**, 31, 9126.
- [314] S. A. De Frees, F. C. A. Gaeta, Y.-C. Lin, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7549.
- [315] M. S. Mulligan, J. C. Paulson, S. A. DeFrees, Z.-L. Zheng, J. B. Lowe, P. A. Ward, *Nature (London)* **1993**, 364, 149.
- [316] H. Fu, H. Kondo, Y. Ichikawa, G. C. Look, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 7265.
- [317] Repräsentative chemische Glycosylierungen: a) R. U. Lemieux, *Chem. Soc. Rev.* **1978**, 7, 423; b) H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 184; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 155; c) Lit. [156a]; d) H. Kunz, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 297; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 294; e) K. Okamoto, T. Goto, *Tetrahedron* **1989**, 45, 5835; f) K. C. Nicolaou, T. Caulfield, H. Kataoka, P. Kumazawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7910; g) D. R. Mootoo, P. Konradson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, *ibid.* **1988**, 110, 5583; R. L. Halcomb, S. J. Danishefsky, *ibid.* **1989**, 111, 6661; i) R. W. Friesen, S. J. Danishefsky, *ibid.* **1989**, 111, 6656; j) A. G. M. Barrett, B. C. B. Bezuidenhout, A. F. Gasielki, A. R. Howell, M. A. Russell, *ibid.* **1989**, 111, 1391; k) K. Briner, A. Vesella, *Helv. Chim. Acta* **1989**, 72, 1371; l) D. Kahne, S. Walker, Y. Cheng, D. Van Engen, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6881; m) K. Suzuki, H. Maeta, T. Matsumoto, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4853; n) Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1990**, 46, 89; o) A. Hasegawa, T. Nagahama, H. Ohki, H. Hotta, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.* **1991**, 10, 493; p) A. Marra, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1990**, 195, 303; q) H. Lonn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 115; r) E. Kirchner, F. Thiem, R. Dernick, J. Heukeshoven, J. Thiem, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, 7, 453; s) F. Barres, O. Hindsgaul, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 9376; t) G. Stork, G. Kim, *ibid.* **1992**, 114, 1087; u) P. J. Garegg, *Acc. Chem. Res.* **1992**, 25, 575; v) K. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1503.
- [318] Sialylierungen mit TMSOTf als Katalysator: a) T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6123; b) H. Kondo, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8748; M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, *ibid.* **1993**, 115, 2260. Mit ZnCl<sub>2</sub> als Lewis-Säure: c) Y. Watanabe, C. Nakamoto, S. Ozaki, *Synlett* **1993**, 115; E. J. Corey, Y.-J. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8871; d) Synthese von CMP-NeuAc: T. J. Martin, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 1765.
- [319] H. Kondo, S. Aoki, Y. Ichikawa, R. L. Halcomb, H. Ritzen, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 864.
- [320] a) H. S. Conradt, H. Egge, J. Peter-Katalinic, W. Reiser, T. Siklosi, K. Schaper, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 14600; b) S. P. Little, N. U. Bang, C. S. Harms, C. A. Marks, L. E. Mattler, *Biochemistry* **1984**, 23, 6191.
- [321] B. D. Livingston, E. M. D. Robertis, J. C. Paulson, *Glycobiology* **1990**, 1, 39.
- [322] H. Kunz, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 1223; H. Garg, R. W. Jeanloz, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1985**, 43, 135; T. Bielfeldt, S. Peters, M. Meldal, K. Bock, H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 881; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 857; F. E. McDonald, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 7001; S. T. Cohen-Anisfeld, P. T. Lansburg Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10531; A. L. Handlon, B. Fraser-Reid, *ibid.* **1993**, 115, 3796.
- [323] C.-H. Wong, M. Schuster, P. Wang, P. Sears, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5893.
- [324] M. Schuster, P. Wang, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1135.
- [325] a) Übersichtsartikel siehe Lit. [15]; b) L. Czollnev, J. Kuszmann, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 1338; c) M. von Itzstein, W.-Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, D. Jin, T. van Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hotham, J. M. Cameron, C. R. Penn, *Nature (London)* **1993**, 363, 418; d) B. Winchester, C. Barker, S. Baines, G. S. Jacob, S. K. Namgoong, G. Fleet, *Biochem. J.* **1990**, 265, 277; e) Y.-F. Wang, Y. Takaoka, C.-H. Wong, *Angew. Chem.*, im Druck; f) R. C. Bernotas, M. A. Pezzone, B. Ganem, *Carbohydr. Res.* **1987**, 167, 305; g) M. K. Tong, G. Papandreou, B. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6137; h) P. Ermert, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 2043; i) K. M. Robinson, M. E. Begovic, B. L. Rhinehart, E. W. Heineke, J.-B. Ducep, P. R. Kastner, F. N. Marshall, C. Danzin, *Diabetes* **1991**, 40, 825; j) G. B. Karlsson, T. D. Butters, R. A. Dwek, F. M. Platt, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 570; k) L. Provencher, D. H. Steensma, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.*, im Druck.
- [326] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1171; M. Ashwell, X. Guo, M. L. Sinnott, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10158; P. Deslongchamps, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 1161; R. Kuroki, L. H. Weaver, B. W. Matthews, *Science* **1993**, 262, 2030; N. C. J. Strynadka, M. N. G. James, *J. Mol. Biol.* **1991**, 220, 401; S. G. Withers, R. A. Warren, I. P. Street, K. Rupitz, J. B. Kempton, R. J. Aebersold, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5887; A. N. Singh, L. S. Hester, F. M. Raushel, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 2554.
- [327] T.-C. Wu, P. G. Goekjian, Y. Kishi, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4819.
- [328] K. N. Houk, J. E. Eksterowicz, Y.-D. Wu, C. D. Fuglesang, D. B. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4170.
- [329] C. Fotsch, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.*, im Druck.
- [330] P. Wang, M. Schuster, Y.-F. Wang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 10487.
- [331] C. T. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 2393; E. T. Rietschel, H. Brade, *Sci. Am.* **1992**, 267(2), 26.