

Evaluierung bakterieller Enzyme für die Synthese neuartiger neo-Sialokonjugate

Mertsch, Alexander
(2020)

DOI (TUprints): <https://doi.org/10.25534/tuprints-00014124>

Lizenz:



CC-BY-NC-ND 4.0 International - Creative Commons, Attribution Non-commercial, No-derivatives

Publikationstyp: Ph.D. Thesis

Fachbereich: 07 Department of Chemistry

Quelle des Originals: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/14124>

Evaluierung bakterieller Enzyme für die Synthese neuartiger *neo*-Sialokonjugate



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
vorgelegt von

Dipl.-Chem. Alexander Mertsch

geboren in Berlin

Erstgutachter:

Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Harald Kolmar

Darmstadt, 2020

Tag der Einreichung: 24. Juli 2020

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2020

Alexander Mertsch: Evaluierung bakterieller Enzyme für die Synthese neuartiger
neo-Sialokonjugate

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt,

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUprints: 2020

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-141240

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2020

Veröffentlicht unter CC BY-NC-ND 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der TU-Darmstadt im Zeitraum von August 2015 bis März 2020 durchgeführt.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die vorgelegte Dissertation wurde in der vorliegenden oder einer ähnlichen Fassung zu keinem früheren Zeitpunkt an einer in- oder ausländischen Hochschule zum Promotionsversuch eingereicht.

Darmstadt, 24.07.2020



Alexander Mertsch

Erklärung der Übereinstimmung

Ich erkläre hiermit, dass die elektronische Version der Doktorarbeit mit der schriftlichen Version übereinstimmt. Die elektronische Version liegt dem Prüfungssekretariat vor.

Darmstadt, 24.07.2020



Alexander Mertsch

Teile dieser Arbeit sind bereits publiziert.

Zeitschriftenartikel:

A. Mertsch, N. He, D. Yi, M. Kickstein, W.-D. Fessner „An α 2,3-sialyltransferase from Photobacterium phosphoreum with broad substrate scope: Controlling hydrolytic activity by directed evolution“, Chem. Eur. J. **2020**, 26, 11614-11624.

DOI: 10.1002/chem.202002277

A. Mertsch, S. Poschenrieder, W.-D. Fessner „Semi-Synthetic Sialic Acid Probes for Challenging the Substrate Promiscuity of Enzymes in the Sialoconjugation Pathway“, Adv. Synth. Catal. **2020**, 362, in Druck.

DOI: 10.1002/adsc.202000859

Konferenzbeiträge:

Titel:

„Controlling hydrolytic activity of the sialyltransferase from Photobacterium phosphoreum by directed evolution“

- Poster: Biotrans **2019**, Groningen, Niederlande.
- Poster: Doktorandentag, FB Chemie TU Darmstadt **2019**, Darmstadt, Deutschland.
- Poster: Novel Enzymes **2018**, Darmstadt, Deutschland.
- Poster und Kurzvortrag: Summer School „Biocatalysis as a Key Enabling Technology“ **2017**, Siena, Italien.
- Poster und Kurzvortrag: 28th Joint Glycobiology Meeting **2017**, Aachen, Deutschland.

Titel:

„Synthesis of Neu5Ac Analogs for CSS Screening“

- Poster und Kurzvortrag: Training School „Systems Biocatalysis: New Enzymes, New Pathways, New Products“ **2016**, Siena, Italien.

Danksagungen

Ich bedanke mich besonders herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner für die Möglichkeit, meine Arbeit zu diesem spannenden und vielseitigen Thema bei ihm anfertigen zu dürfen sowie für das dabei in mich gesetzte Vertrauen, für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für die Freiheiten und Möglichkeiten der letzten Jahre.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für die Unterstützung und Organisation: Serbet Pinar-Safi für die reibungslose Organisation aller Angelegenheiten des Arbeitskreises, Michael Kickstein für die kompetente biochemische Unterstützung und die Geduld beim Erklären, Hans Michael Orfgen für die Wartung aller Geräte und der IT sowie Bettina Harnischfeger für Bestellung und Organisation von Material und Ausrüstung. Ich bedanke mich ebenso bei den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen des Instituts: Herrn apl. Prof. Dr. Meusinger für die Unterstützung bei den NOESY-Messungen, Frau Spanheimer bei den zeitaufwendigen NMR-Messungen, Herrn Runzheimer für die vielen NMR-Spektren sowie Frau Rudolph für die Aufnahme der MS-Spektren.

Ich danke allen Kollegen und Mitgliedern des Arbeitskreises für die angenehme und hilfsbereite Atmosphäre sowie für die gemeinsame Zeit bei Ausflügen. Besonderer Dank geht an meine Laborkolleginnen Yen Chi Thai und Anna Szekrenyi für die schöne Zeit und herzliche Aufnahme im Labor 305, Fabian Acke für die hilfreichen fachlichen, aber auch sonstigen Diskussionen, Ning He für ihre Hilfe rund um das Thema Sialinsäure sowie Silvan Poschenrieder für die Zusammenarbeit beim Sialidaseassay.

Elisabeth Memmel, Yen Chi Thai und meinen Eltern danke ich sehr für die aufmerksame und schnelle Durchsicht dieser Arbeit.

Aus tiefstem Herzen bedanke ich mich bei Bernd Grünewald, bei meinen Eltern und meiner Schwester sowie bei Thomas Schwiewager, Johannes Wehner und Elisabeth Memmel für all die Unterstützung, Ratschläge und schönen Stunden in den letzten Jahren!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Kohlenhydrate auf Zelloberflächen	1
1.2. Sialinsäuren	8
1.2.1. Struktur, natürliche Derivate und Funktion	8
1.2.2. Biosynthese von Sialokonjugaten.....	11
1.2.3. Chemische Synthese von Sialinsäuren	16
1.2.4. Chemo-enzymatische Synthesen	18
1.3. Glycan-bindende Proteine	18
1.3.1. Lectine	19
1.3.2. Siglecs.....	21
1.4. Protein Engineering	23
1.4.1. Gelenkte Evolution von Proteinen.....	24
1.4.2. Rationales Design von Proteinen.....	24
1.4.3. Semirationales Design von Proteinen.....	25
1.4.4. Screening	26
2. Zielsetzung	29
3. Allgemeiner Teil I:	
Synthese und Evaluierung neuartiger Sialinsäurederivate	33
3.1. Einleitung	33
3.2. Synthesestrategie zur Diversifizierung von Neu5Ac	33
3.3. Synthese des verkürzten C7-Sialinsäurealdehyd-Schlüsselintermediats	35
3.3.1. Weitere Produkte durch Diolsplaltung	37
3.4. Sialinsäurederivate durch Indium-vermittelte Barbier-Reaktionen	38
3.4.1. Grundlagen	38
3.4.2. Ergebnisse.....	40
3.4.3. Aufklärung der Konfiguration	43
3.5. Sialinsäurederivate durch oxidativen Kettenabbau	47
3.6. Probleme bei der Entschützung der anomeren Position	49
3.7. Sialinsäurederivate durch Funktionalisierung des Allylmotivs	51
3.7.1. Ozonolyse	51
3.7.2. Dihydroxylierung	53

3.8. Sialinsäurederivate durch Reduktion	54
3.9. Kinetisches Screening der Neu5Ac-Derivate durch CMP-Sialat-Synthetase	57
3.9.1. Analyse der Wechselwirkungen im Kristallstrukturmodell.....	60
3.10. Synthese von G_{M3}-Trisaccharidanaloga	61
3.11. Test der neo-Sialokonjugate auf Sialidaseaktivität.....	62
3.12. Zusammenfassung und Ausblick.....	65
4. Allgemeiner Teil II:	
2,3-Sialyltransferase aus <i>Photobacterium phosphoreum</i> – Kontrolle der Hydrolyseaktivität mittels gelenkter Evolution.....	69
4.1. Einleitung	69
4.1.1. 2,3-Sialyltransferase aus <i>Photobacterium phosphoreum</i>	69
4.1.2. Protein-Engineering-Ansatz und Analysemethoden.....	70
4.1.3. Multifunktionalität von Sialyltransferasen.....	70
4.1.4. Reaktionsbedingungen in der <i>Active Site</i>	71
4.2. Active Site-adressierte Sättigungsmutagenese.....	72
4.2.1. Erstellung eines Homologie-3D-Modells für 2,3-SiaT _{p_{ph}}	72
4.2.2. Sequenzalignment und Auswahl der Mutagenese-Kandidaten.....	74
4.3. Entwicklung eines kontinuierlichen, photometrischen, pH-abhängigen Assays zur Analyse von Sialyltransferasen	76
4.3.1. Bestimmung der allgemeinen Assaybedingungen	77
4.3.2. Bestimmung des Absorptionsmaximums und der Konzentration von Phenolrot	78
4.3.3. Kalibriergerade und Messbereich	78
4.3.4. Spezielle Assaybedingungen.....	80
4.4. Herstellung des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac	81
4.5. Screening nach Varianten mit verbessertem Verhältnis von Sialyltransfer und Hydrolyse	82
4.6. Bestimmung der kinetischen Parameter für SiaT_{p_{ph}} und die identifizierten Varianten	83
4.7. Analyse der thermischen Stabilität der Enzyme.....	84
4.8. Zweite Generation - Kombinationsvarianten	85
4.9. Individuelle Kombination der besten Varianten	87
4.10. Präparative Quantifizierung der Hydrolyseaktivität.....	88
4.10.1. Messmethode und Analyse	88
4.10.2. Ergebnisse	90

4.11. Untersuchung der Produkthydrolyse-Aktivität - Sialidase	91
4.12. Präparativer Vergleich von nativer 2,3-SiaT_{pph} und der Variante 2,3-SiaT_{pph} (A151D)	94
4.13. Zusammenfassung und Ausblick	95
5. Experimentalteil	97
5.1. Materialien und Geräte	97
5.1.1. Allgemeines	97
5.1.2. Lösemittel	97
5.1.3. Chromatographiemethoden	97
5.1.4. Gefriertrocknung	98
5.1.5. HR-ESI-Massenspektrometrie	98
5.1.6. NMR-Spektroskopie.....	99
5.1.7. UV/Vis-Spektren – Mikrotiterplatten-Reader	99
5.1.8. Ozonolysen	99
5.1.9. Chemikalien.....	99
5.1.10. Weitere Geräte.....	100
5.2. Allgemeine Arbeitsmethoden	101
5.2.1. Verwendete Enzyme.....	101
5.2.2. CSS-Assay – Bestimmung der kinetischen Parameter	101
5.2.3. Zellkultur-Medien und Zellen	102
5.2.4. Exprimierung von 2,3-SiaT _{pph}	103
5.2.5. Exprimierung von CSS.....	103
5.2.6. Mutagenese der 2,3SiaT _{pph}	104
5.2.7. Bibliotheks-Screening der 2,3-SiaT _{pph}	104
5.2.8. 2,3-SiaT-Assay – Bestimmung der kinetischen Parameter	105
5.2.9. HPTLC-Experimente.....	105
5.3. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) - Synthese	106
5.3.1. AAV1 Aktivierung von Dowex.....	106
5.3.2. AAV2 Barbier-Reaktionen	106
5.3.3. AAV3 Entschützung der anomeren Methoxygruppe.....	106
5.3.4. AAV4 Synthese von α 2,3-Sialyllactosiden mittels Δ 24- α 2,3-SiaT _{pph} _A151D.....	107
5.4. Synthesevorschriften	108
5.4.1. Versuche zu Kapitel 3.3	108
5.4.2. Versuche zu Kapitel 3.4	113
5.4.3. Versuche zu Kapitel 3.5	125
5.4.4. Versuche zu Kapitel 3.7	129
5.4.5. Versuche zu Kapitel 3.8	136

5.4.6. Versuche zu Kapitel 3.10	143
5.4.7. Versuche zu Kapitel 3.11	150
5.4.8. Versuch zu Kapitel 4.4.....	151
5.5. Experimentelle Daten zur 2,3-SiaTpph	153
5.5.1. Plasmidkonstruktion zur Expression von 2,3SiaTpph	153
5.5.2. Klonierung und Expression der 2,3-SiaT aus <i>Photobacterium phosphoreum</i> ...	153
5.5.3. Primer zur <i>site directed</i> Mutagenese Bibliothek (2,3SiaT _{pph}).....	154
5.5.4. Qualitätskontrolle der <i>best hits</i> -Einzelvarianten	155
5.5.5. Primer für die zweite Generation – Kombinationsvarianten	156
5.5.6. Qualitätskontrolle – Sequenzierung der Kombinationsvarianten.....	156
5.5.7. Primer zur Präparation der gezielten individuellen Kombinationsvarianten	159
5.5.8. Primer- und Templatkombination für gezielte individuelle Kombinationsvarianten	159
5.5.9. Versuche zu Kapitel 4.6 – Qualitätskontrolle der Kinetiken	160
5.5.10. Versuche zu Kapitel 4.10 – HPTLC-Messungen.....	161
5.5.11. Versuche zu Kapitel 4.11 – <i>In situ</i> -NMR-Messungen	162
6. Abkürzungsverzeichnis.....	163
7. Literaturverzeichnis	165
8. Anhang: Spektren.....	177

1. Einleitung

1.1. Kohlenhydrate auf Zelloberflächen

Die Erfindung des Mikroskops im 17. Jahrhundert ermöglichte erstmals die Betrachtung einer Zelle und war der Startpunkt für den bis heute andauernden Forschungsprozess um den Aufbau, die Strukturen, Bestandteile, Eigenschaften und Funktionen der Zelle. Mit der Entdeckung des Zellkerns 1825 durch *Purkinje* und der Anfärbung von Zellmembranen 1873 durch *Golgi* starteten die Entdeckungen der Organellen in eukaryotischen Zellen.^[1-3] Der Aufklärung der Zellstrukturen folgte die Frage nach der Funktion und Beschaffenheit der Organellen, Kompartimente, DNA, Gene, Nukleinsäuren und Proteine. Die Erkenntnis, dass Kohlenhydrate als weiterer Baustein des Lebens nicht nur Energiespeicher und Baugerüst der Natur sind, sondern eine enorme Komplexität aufweisen, rückte ihr Potential als Informationsspeicher und Signalkomponente erst in den letzten vier Jahrzehnten in den Vordergrund.^[4-5] Während drei verschiedene Nukleotide oder Aminosäuren nur sechs unterschiedliche Moleküle bilden können, ergeben sich aus drei Monosacchariden über 1000 potentielle Möglichkeiten. Dass die Natur dieses enorme Potential nicht ungenutzt lässt, um riesige Informationsmengen zu codieren und komplizierte Vorgänge zu steuern, erstaunt nicht.^[4-6]

Mit den voranschreitenden Methoden zur Visualisierung von Zellmembranen seit *Golgi* wurde klar, dass Membranen nicht nur das Innere (Cytosol) der Zelle von der extrazellulären Umgebung und Kompartimente innerhalb der Zelle trennen, sondern hochkomplex sind und für das Leben von Zellen unabdingbar.^[3] Die Zelloberfläche ist eine äußerst dynamische Kontakt- und Interaktionsfläche und ist an Prozessen wie der Zell-Zell-Kommunikation, Differenzierung, Adhäsion und Regulation beteiligt. Viele Prozesse auf der Zelloberfläche sind jedoch noch unbekannt und können nur mit detailliertem Wissen über die komplexen Strukturen und damit einhergehendem grundlegendem Verständnis der Wechselwirkungen zugunsten der medizinischen Forschung beeinflusst werden.

Eine entscheidende Rolle für die Interaktionen der Zelloberfläche spielt deren äußerste Schicht, die Glycokalyx (von griechisch »glyks«: süß sowie »kalyx«: Mantel), die mit Hilfe der Elektronenmikroskopie erstmals abgebildet werden konnte (siehe Abb. 1).^[7-8]

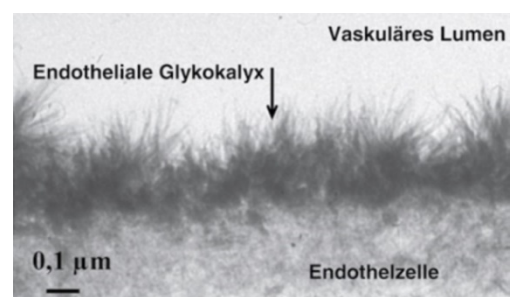


Abb. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer endothelialen Glycokalyx eines Koronargefäßes.^[8]

1. Einleitung

Es handelt sich hierbei um eine mehrere hundert Nanometer dicke Schicht aus komplexen Oligosacchariden, welche kovalent an Membranproteine und Membranlipide gebunden sind. Sie existiert sowohl auf eukaryotischen als auch auf prokaryotischen Zellen und unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau, deren Dynamik bislang noch größtenteils unklar ist.^[8-9] Da elektronenmikroskopische Abbildungen nur ein unvollständiges und statisches Abbild dieser Strukturen liefern können, stehen auch dynamische Visualisierungsmethoden von membranassoziierten Glycanen *in vivo* im Fokus. Hier sind die bioorthogonale Click-Chemie zur Markierung von Glycanen sowie hochauflösende und konfokale Mikroskopie (siehe Abb. 2) zur Visualisierung zu nennen.^[10-14]

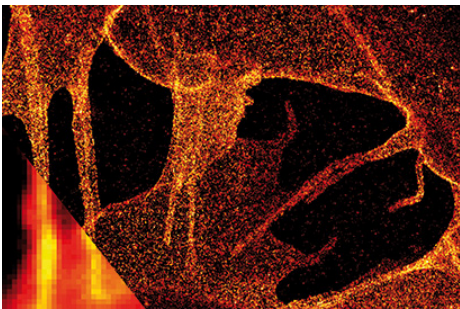
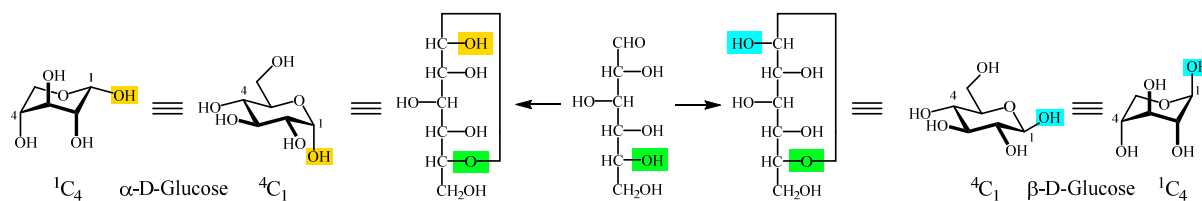


Abb. 2. Hochauflösende dSTORM-Aufnahme von Plasmamembran-Glycanen auf SK-N-MC-Neuroblastomazellen. Die Visualisierung der Glycane wird durch metabolische Inkorporierung von Azido-Zuckeranaloga und anschließender Färbung mittels Kupferkatalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) möglich. links unten: Vergleich zur Standard-Weitfeld-Aufnahme.^[15]

Um die Komplexität von Glycanen zu verstehen, müssen Struktur und Verknüpfungsmöglichkeiten von Monosacchariden betrachtet werden.

Alle Monosaccharide bestehen aus einer Kette von chiralen Hydroxymethyleinheiten und enden mit einer Hydroxymethylgruppe. Am anderen Ende steht entweder ein Aldehyd (Aldosen) oder ein α -Hydroxyketon (Ketosen). Die Anzahl der Stereoisomere entspricht 2^k , wobei k die Anzahl der asymmetrischen Kohlenstoffatome ist. Somit kann eine Aldohehexose ($C_6H_{12}O_6$) mit vier Stereozentren durch 16 isomere Formen beschrieben werden. Die Konfiguration eines Monosaccharids (D oder L) wird durch die absolute Konfiguration des am weitesten von der Carbonylgruppe entfernten stereogenen Zentrums bestimmt. In Lösung können Monosaccharide durch intramolekularen Ringschluss zwischen einer Hydroxylgruppe und der Carbonylgruppe zyklisieren und liegen somit im Gleichgewicht zwischen azyklischer und zyklischer Form vor. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Furan und Pyran werden dabei entstehende Fünfringe Furanosen und die entstehenden Sechsringe Pyranosen genannt. Bei der Bildung des Halbacetals entsteht ein neues Stereozentrum, welches als anomeres Zentrum bezeichnet wird. Je nach relativer Position des anomeren Sauerstoffs zum namensgebenden Stereozentrum können zwei Verbindungen vorliegen: α (Ringsauerstoff und Hydroxylgruppe am anomeren Zentrum in Fischerprojektion sind *cis* angeordnet) oder β (Ringsauerstoff und Hydroxylgruppe am anomeren Zentrum in Fischer-Projektion sind *trans* angeordnet).^[16] Um die beiden möglichen Sesselkonformationen unterscheiden zu können, wird die Schreibweise 4C_1 und 1C_4 genutzt. Die jeweils hochgestellte Zahl verdeutlicht dabei das Kohlenstoffatom „oberhalb der Sitzfläche“ und die tiefgestellte Zahl das Kohlenstoffatom „unterhalb der Sitzfläche“ (siehe Schema 1).^[16-17]



Schema 1. Fischerprojektion und Sesselkonformation von D-Glucose. Die Definition von α und β erfolgt je nach relativer Lage des namensgebenden Stereozentrums (grün) zum anomeren Sauerstoff (blau/ gelb).

Zwei Monosaccharide können über die glycosidische Bindung unter Bildung eines Vollacetals verknüpft werden. Die Bindung wird dabei zwischen dem anomeren Zentrum eines Monosaccharids und einer Hydroxylgruppe eines anderen Monosaccharids gebildet. Die charakteristische Diversität von Glycanen beruht dabei auf der Vielzahl der Möglichkeiten, diese Bindung auszubilden. Die vielen möglichen Isomere ergeben sich aus der Stereoisomerie des anomeren Zentrums (α oder β), aus den vielen Hydroxylgruppen des zweiten Monosaccharids, die verschiedene Regioisomere bei der Verknüpfung bilden und aus der Möglichkeit, mehr als eine glycosidische Bindung auszubilden und so eine komplexe Verzweigung zu schaffen. Die Verzweigungsmöglichkeit und Komplexität der Verknüpfung ist der wesentliche Unterschied zu Proteinen und Nucleinsäuren, deren bifunktionelle Monomereinheiten (20 Aminosäuren bzw. 4 Nucleinbasen) ausschließlich linear verknüpft werden.^[17] Ein weiterer Aspekt, der die Vielfalt weiter erhöht, ist die Modifikation der Saccharide durch Substituenten an den Hydroxylsauerstoffatomen und Aminostickstoffatomen. Dies können unter anderem Phosphat-, Sulfat- und Acetylgruppen sein. Erstaunlicherweise nutzt die Natur nur zehn bisher bekannte Monosaccharidbausteine, um Glycane auf Zelloberflächen in Vertebraten aufzubauen (Abb. 3).^[18-19]

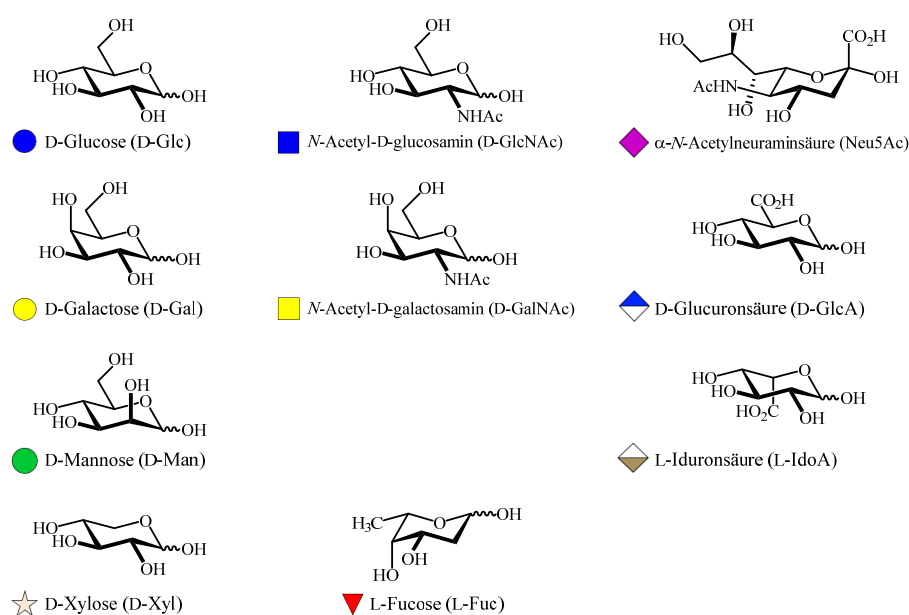


Abb. 3. Abbildung der in Vertebraten vorkommenden zehn Monosaccharidbausteine als Struktur und in Symboldarstellung nach CFG-Code (Consortium for Functional Glycomis).

1. Einleitung

Glycane auf Zelloberflächen sind mit Aminosäuren (Peptiden) oder Lipiden verknüpft, zusammen bilden sie die Glycokonjugate.

Glycoproteine lassen sich primär über die Art der Verknüpfung klassifizieren. *N*-Glycane sind über das Stickstoffatom des Asparagins gebunden und beinhalten meist einen *N*-Acetylglucosaminrest (GlcNAc) und die Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr. Es treten dabei drei Hauptklassen auf, die eine Pentasaccharideinheit gemeinsam haben: der Oligomannose-, der Komplex- und der Hybridtyp (siehe Abb. 4).^[20-21]

O-Glycane sind eine strukturell stark heterogene Gruppe. Eine relativ häufige Verknüpfung über *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) mit den Hydroxylgruppen von Serin oder Threonin der Polypeptidkette wird als Mucin-Typ bezeichnet; hier gibt es vier „Kern“-Strukturen (*Core*) (siehe Abb. 4). Es existieren jedoch viele verschiedene Typen von *O*-Glycanen, so kann die Anbindung auch über Tyrosin, Hydroxyprolin oder Hydroxylysin mit verschiedenen Sacchariden wie Mannose, Glucose, Galactose stattfinden. Selten tritt dagegen die *C*-Glycosylierung mit Verknüpfung über Tryptophan auf.^[21-22]

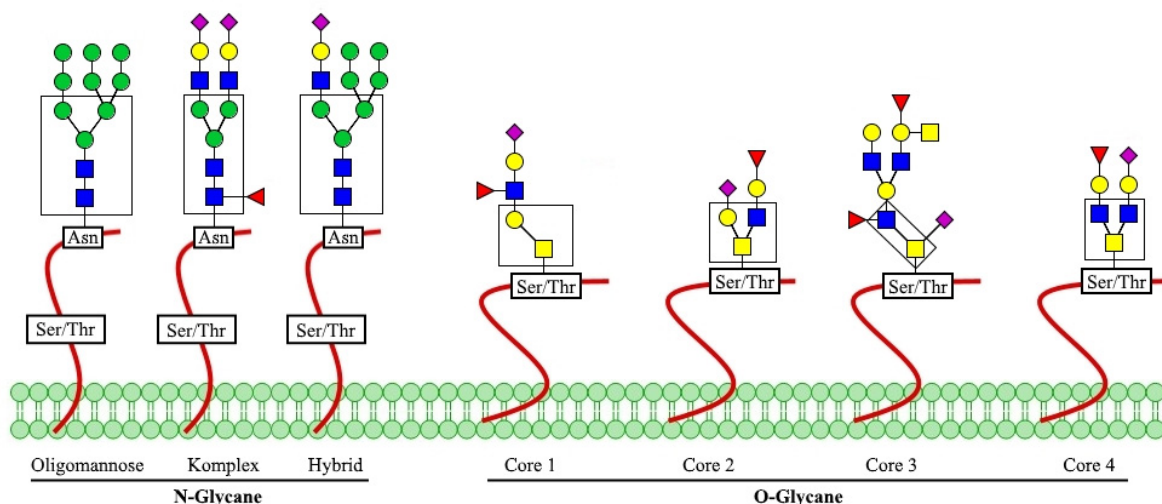


Abb. 4. Exemplarische Darstellung der Hauptklassen der *N*-Glycane mit gemeinsamer Pentasaccharidstruktur $\text{Man}_3(\text{GlcNAc})_2$ (mit Kästen markiert) sowie repräsentative Beispiele komplexer *O*-Glycane (*O*-GalNAc) mit Core-1-4-Struktur (jeweils eingerahmt).^[20, 22] Die CFG-Darstellung wurde mit GlycoWorkbench 2.1 erstellt.^[23]

Als äußerste Strukturen der Zelloberfläche sind Glycoproteine an entscheidenden Funktionen wie Regulation, Zell-Zell-Kommunikation, Signalübertragung und vielen weiteren, teilweise lebenswichtigen Prozessen beteiligt. *Congenital disorders of glycosylation* (CDG) wird eine Gruppe von Krankheiten genannt, denen genetische Defekte bezüglich der Anordnung von *N*-Glycanen zugrunde liegen. Diese sind vielfältig und können psychomotorische Retardierung, unvollständige Gehirnentwicklung, visuelle Probleme und Koagulationsdefekte verursachen. Aber nicht nur Entwicklung und Wachstum, sondern auch fortschreitende Krankheiten wie Muskeldystrophie und Prozesse der Immunabwehr, Infektion, Zelladhäsion und Metastase werden über Glycoproteine gesteuert.^[24-27]

Glycolipide sind ein zweiter wichtiger Bestandteil der Glycokalyx.^[28-29] Im Gehirn von Vertebraten machen Glycolipide mehr als 80% der Glycokongulate aus. Der größte Bestandteil sind dabei Glycosphingolipide (Abb. 5). Sie bestehen aus einem hydrophilen Zuckeranteil sowie einem hydrophoben Anteil, dem Ceramid, welcher als Membrananker dient. Der Ceramid-Rest wiederum setzt sich aus einem langkettigen Aminoalkohol (Sphingosin) und einer Fettsäure zusammen, die über eine Amidbindung verknüpft sind. Ceramide können in Länge, Hydroxylierung und Sättigung der Fettsäure als auch des Sphingosins variieren.^[30]

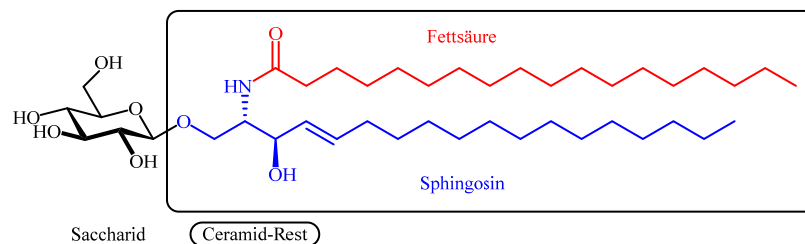


Abb. 5. Exemplarisches Glycosphingolipid: Ceramidrest bestehend aus einer Fettsäure (beispielhaft Stearinsäure) und Sphingosin, glycosidisch verknüpft mit einem Saccharid (beispielhaft Glucose).

Trotz der Diversität der Ceramide erfolgt die Klassifizierung der Glycosphingolipide traditionell über den Glycanrest. Cerebroside tragen eine mit dem Ceramid glycosidisch verknüpfte Monohexose (meist Galactose im Gehirn oder Glucose in Leber und Milz). Sulfatide tragen sulfatveresterte Monosaccharide, Globoside tragen neutrale Oligosaccharide als Kopfgruppen. Als Ganglioside (Abb. 6) werden mit dem Ceramid verknüpfte Oligosaccharide bezeichnet, die mindestens eine Sialinsäure beinhalten.^[30-31] Eine inoffizielle, aber weit verbreitete Nomenklatur für Ganglioside ist die von *Svennerholm*.^[32] In Bezeichnungen wie »G_{M3}« steht das G für Ganglioside, der zweite Buchstabe steht für die Anzahl an Sialinsäuren (M = mono, D = di usw.) und die Nummer (1, 2, 3 usw.) steht für die Migrationsfähigkeit bei der Dünnschichtchromatographie (z.B. G_{M3} > G_{M2} > G_{M1}). Eine komplexere Einteilung der Ganglioside erfolgt nach Struktur- und Verzweigungsmerkmalen in die a-, b- und c-Serie.^[30]

1. Einleitung

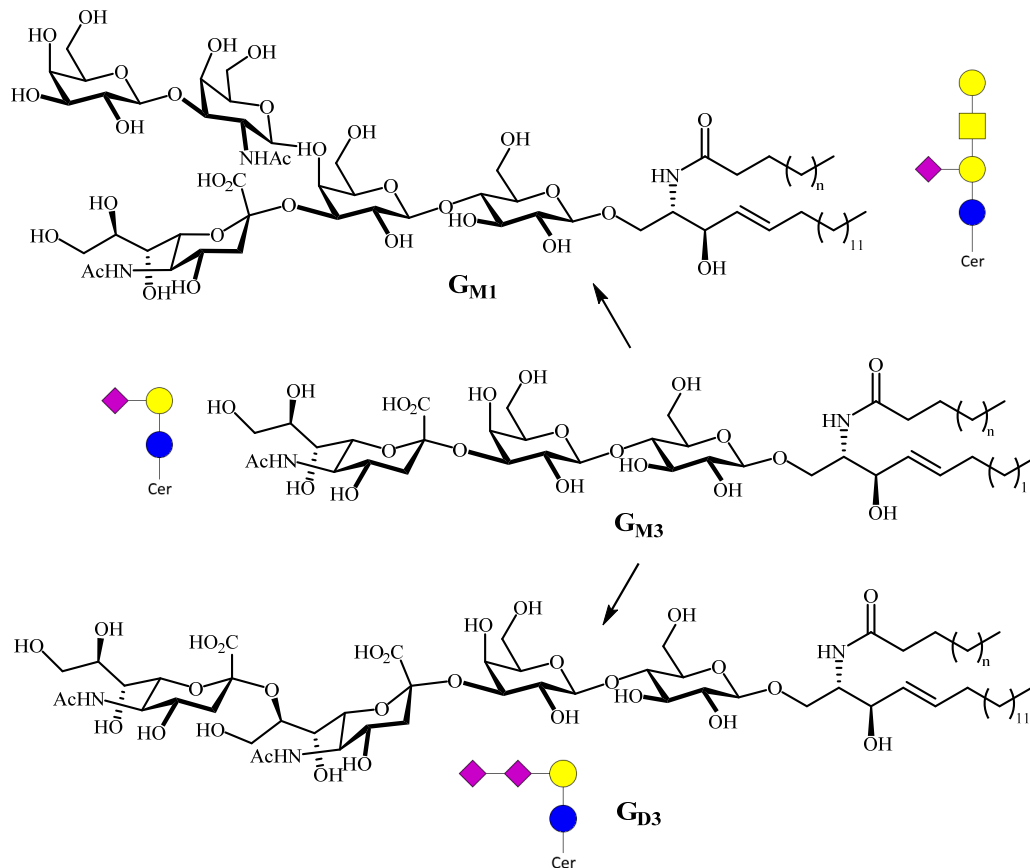


Abb. 6. Darstellung wichtiger Ganglioside. G_{M3} ist das strukturell einfachste und häufigste Gangliosid und dient als Precursor für komplexere Ganglioside wie G_{M1} oder G_{D3} .^[33]

Ganglioside kommen in allen Zellen von Vertebraten vor und sind vor allem im Hirngewebe angereichert. G_{M3} ist das strukturell einfachste Gangliosid und Precursor für alle anderen Ganglioside der a-, b- und c-Serie. Das Gangliosid G_{M3} ist seit längerer Zeit von Interesse für die Forschung, da in vielen Studien gezeigt wurde, dass es eine Rolle bei Zellwachstum, Adhäsion, Beweglichkeit und Differenzierung spielt. Diese Faktoren sind auch bei der Entstehung von Krebs wesentlich beeinflusst. Veränderungen des G_{M3} -Motivs zeigten Anti-Krebs-Aktivität. Ein Defekt der G_{M3} -Synthase (ST3GAL5) führt beispielsweise zu neurologischen und motorischen Ausfällen, Epilepsie und Wachstumshemmung.^[29, 33-35] Die Ganglioside scheinen daher ein relevanter Ansatzpunkt für therapeutische Zwecke zu sein. So wurde bei Parkinsonpatienten erfolgreich eine Verbesserung neurologischer und dopaminerger (Dopamin als Neurotransmitter) Funktionen durch G_{M1} -Behandlung festgestellt.^[36]

Bei der Betrachtung von Zelloberflächen dürfen auch die zu den Prokaryoten zählenden Bakterien nicht vernachlässigt werden. Da ihre Umgebung meist wechselnd und lebensfeindlich ist, muss die Zelloberfläche sehr robust und widerstandsfähig sein. Bakterien haben daher eine hochentwickelte, komplexe Zellhülle entwickelt, die Schutz bietet, aber auch für Nährstoffe selektiv durchlässig sein muss. Auch diese Zellhülle besitzt hochkomplexe Kohlenhydratstrukturen, die Monosaccharide enthalten, die in Eukaryoten nicht vorkommen.

Dazu zählen unter anderem *N*-Acetylmuraminsäure, 3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulonpyranosonsäure (KDO) und L-*Glycero*-D-mannoheptose.^[37] Die meisten Bakterien lassen sich nach der Architektur ihrer Zellwand in drei Kategorien einordnen: gram-negative Bakterien, gram-positive Bakterien und Mykobakterien (Abb. 7).^[38]

Gram-negative Bakterien (wie *E. coli* oder *Neisseria*) besitzen eine innere und einer äußere Membran, dazwischen liegt eine stabilisierende Peptidoglycanschicht (Murein). Diese besteht aus alternierenden Resten β -1,4-verknüpfter *N*-Acetylmuraminsäure und *N*-Acetylglucosamin.^[39] In der äußeren Membran sind Lipopolysaccharide (LPS), kapselförmige Polysaccharide (CPS) und Glycoproteine verankert.

Gram-positive Bakterien (wie *Staphylococcus*) besitzen nur eine Membran, die mit einer dicken Schicht von Peptidoglycanen verstärkt ist. Des Weiteren sind kapselförmige Polysaccharide, Teichonsäuren und Glycoproteine auf der Oberfläche zu finden.

Mykobakterien (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*) sind gram-positive Bakterien, die bestimmte Glycane auf der Zelloberfläche aufweisen. Dazu zählen Lipoarabinomannan, Arabinogalactan, Mykolsäuren und Trehalose-verknüpfte Lipide.^[40]

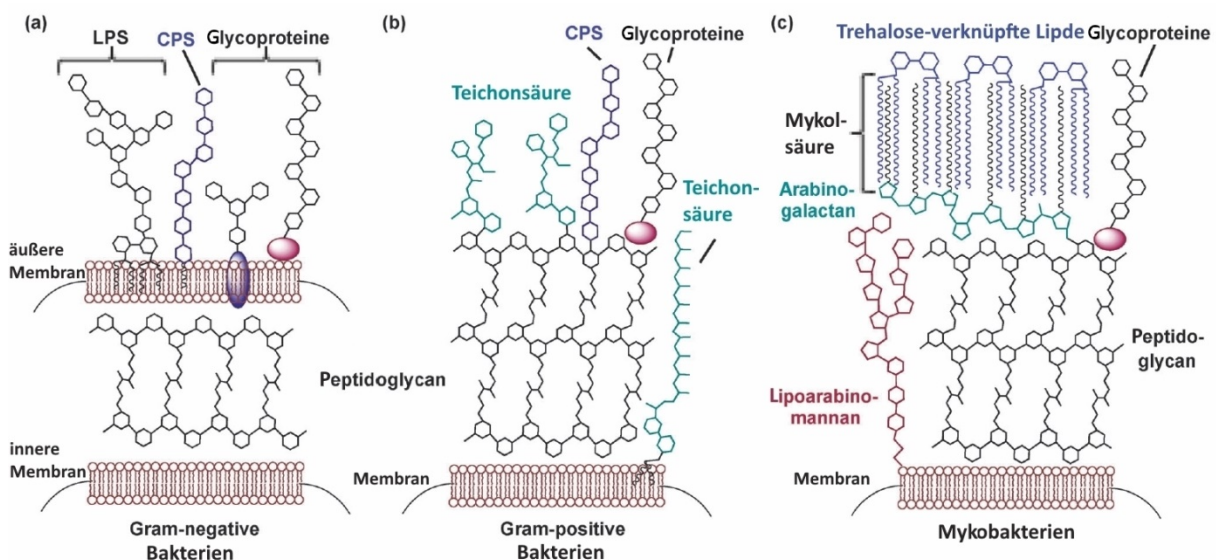


Abb. 7. Schematische Darstellung von bakteriellen Zellwänden: a) Gram-negative Bakterien mit innerer und äußerer Membran, getrennt durch eine Peptidoglycanschicht b) Gram-positive Bakterien mit einer Membran und einer dicken Peptidoglycanschicht und Teichonsäuren c) Mykobakterien mit Mykolsäuren, Lipoarabinomannan und Arabinogalactan. Grafik entnommen aus Referenz ^[38], variiert und bearbeitet.

Seit den 2000er Jahren wurde bekannt, dass auch Prokaryoten zahlreiche Proteine mit *N*- und *O*-verknüpften Sacchariden auf der Zelloberfläche synthetisieren können.^[40-42] S-layer-Proteine, Flagelline, Adhesine und Piline präsentieren unter anderem Zuckerstrukturen, die nur in Prokaryoten auftreten, wie beispielsweise Pseudaminsäure (Pse), Legionaminsäure (Lge), Bacillosamin und *N*-Acetylfucosamin.^[43] Mit diesen Erkenntnissen einer bakteriellen Glycokalyx, von Eukaryoten abweichenden Zuckermotiven und unterschiedlichem Zellaufbau werden auch die Kohlenhydratmotive sowie die daraus resultierenden Interaktionsprozesse von Bakterien intensiv untersucht.

Auch Viren, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, präsentieren auf ihrer Oberfläche Glycanstrukturen. HIV und Influenza beispielsweise präsentieren spezifische Oligosaccharide, um der Entdeckung durch das Immunsystems des Wirts zu entgehen. Virale Glycoproteine sind ebenso von Interesse wie kohlenhydratbindende Proteine der Viren, die die Identifizierung und Invasion der Wirtszelle erst möglich machen.^[44-48]

So zeigt sich, dass Kohlenhydrate durch ihre enorme Strukturvielfalt und ihre exponierte Lage auf Zelloberflächen von Eukaryoten, Prokaryoten und Viren ideal geeignet sind, Prozesse wie Kommunikation und Interaktion auszulösen und zu steuern. Die Zusammensetzung der Glycokalyx ist hochspezifisch und für jedes Individuum und jeden Zelltyp individuell. Die Erforschung von Kohlenhydrat-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen^[49-51] und kohlenhydratbindenden Proteinen (Lectine)^[52-55] (die hochselektiv Kohlenhydratmotive erkennen) sowie die Proteinforschung zur Erkundung des Kohlenhydrat-Metabolismus sind sehr komplex, alle miteinander verknüpft und zeigen, welche Bedeutung den Kohlenhydraten zukommt. Sialinsäuren^[56-57] als häufig endständiger Terminus in *N*- und *O*-Glycanen sowie Glycolipiden nehmen unter den Kohlenhydraten eine Sonderstellung ein.

1.2. Sialinsäuren

1.2.1. Struktur, natürliche Derivate und Funktion

Der Begriff Sialinsäure (Sia) ist ein generischer Begriff für eine Gruppe von Monosacchariden mit einem Gerüst aus neun Kohlenstoffatomen und einer α -Ketonsäure. 1936 isolierte *Gunnar Blix* und 1941 *Ernst Klenk* durch milde Säurehydrolyse von Gehirnlipiden und Speicheldrüsen-Mucin erstmals eine Substanz, die *Klenk* als Neuraminsäure bezeichnete.^[58-59] Erst ab den 50er Jahren wurde mit Aufklärung der Struktur deutlich, dass es sich um *N*-Acetamido-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure (*N*-Acetylneuraminsäure, Neu5Ac) handelte. Neu5Ac wird heute als wichtigster Vertreter der Sialinsäuren bezeichnet. Seit damals wurden bereits mehr als 50 natürliche Derivate identifiziert.^[60-63] Sialinsäuren sind eine besonders wichtige Gruppe von Signalzuckern, da sie meist endständig in Glycoproteinen und Glycolipiden gebunden sind. Sie sind in Wirbeltieren und auf Zelloberflächen von Bakterien zu finden, jedoch nicht in Pflanzen.^[62]

Vier Sialinsäuren werden in der Literatur als grundlegende („core“) Sia-Formen bezeichnet: Neu5Ac, die *N*-Acetyl-hydroxylierte Form *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc), eine deaminierte Form 3-deoxy-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure (KDN) und die nicht *N*-acylierte Form Neuraminsäure (Neu) (Abb. 8).^[60, 64] Neu5Ac ist die am häufigsten vorkommende Sialinsäure im Menschen und anderen Säugetieren. In tierischen Organismen findet sich sehr häufig Neu5Gc, während es im Menschen so gut wie gar nicht gefunden wird.^[65] Bei unseren nächsten Verwandten, den Menschenaffen, kommt es, unter Ausnahme des Hirngewebes, in größerer Menge vor. Im Metabolismus wird es durch Katalyse der

CMP-Neu5Ac-Hydroxylase (CMAH) aus CMP-Neu5Ac erzeugt und ist somit ein Biosynthesederivat aus Neu5Ac. Studien zeigten, dass eine Mutation im menschlichen CMAH-codierenden Gen eine Deaktivierung verursacht.^[65-67] Daher findet sich Neu5Gc beim Menschen lediglich in mit der Nahrung aufgenommenen Anteilen bei bestimmten Krebsformen auf der Tumor-Zelloberfläche.^[68] Die zweithäufigste Sialinsäure in der Natur ist das 1986 entdeckte KDN, welches anstatt der *N*-Acetylgruppe eine Hydroxylgruppe besitzt.^[69] Es wurde in vielen Organismen wie Bakterien, niederen Vertebraten, Amphibien und Fischen sowie im Menschen auf Krebszellen nachgewiesen.^[70-72] Neu5Ac, Neu5Gc und KDN werden als Vorstufen aller anderen Sialinsäuren betrachtet.^[60, 62, 73]

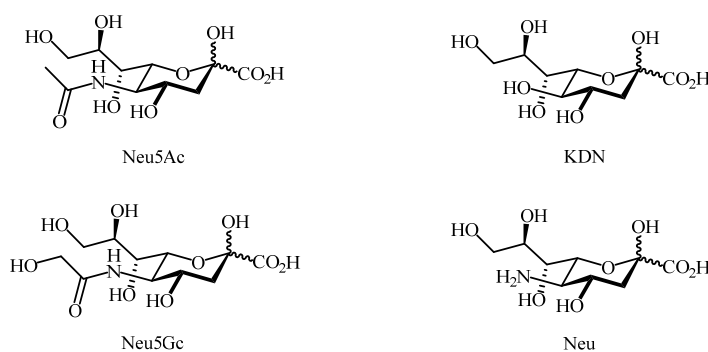


Abb. 8. Strukturen wichtiger natürlich vorkommender Sialinsäuren.

Zwei Vertreter bakterieller Sialinsäuren sind Legionaminsäure (Leg), die im Lipopolysaccharid von *Legionella pneumophila* auftritt, und Pseudaminsäure (Pse), die im Lipopolysaccharid von *Pseudomonas*-Spezies zu finden ist (Abb.9). Da nach IUPAC-Nomenklatur für Kohlenhydrate nur Vertreter mit *D-glycero-D-galacto*-Konfiguration als Sialinsäuren bezeichnet werden, ist Pseudaminsäure mit *L-glycero-L-manno*-Konfiguration streng genommen keine Sialinsäure, sondern nur eine isomere Form. Die Phosphoenolpyruvat (PEP)-abhängige Pse-Synthase ist allerdings evolutionär homolog zur Neu5Ac-Synthase.^[64]

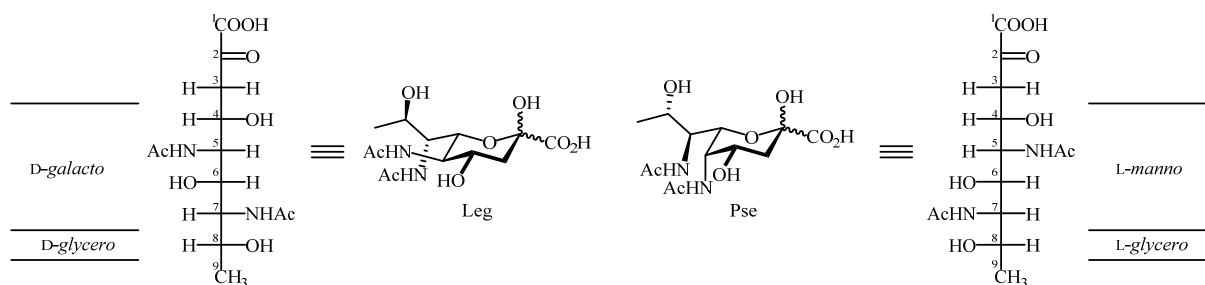
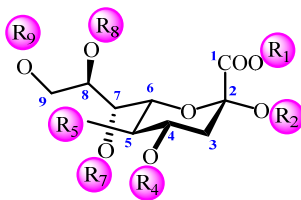


Abb. 9. Zwei wichtige bakterielle Sialinsäuren und deren Klassifizierung nach IUPAC-Nomenklatur.

Die meisten anderen bekannten Sialinsäuren leiten sich durch ein oder mehrere post-synthetische Veränderungen der Hydroxylgruppen an den Positionen C4, C7, C8 und C9 ab. Bekannt sind hierbei *O*-Acetylierung, *O*-Methylierung, *O*-Sulfatierung, *O*-Lactoylierung oder

1. Einleitung

Phosphorylierung.^[60, 62] Die Carbonsäuregruppe der C1-Position ist bei physiologischem pH-Wert typischerweise ionisiert, kann aber mit intramolekularen oder Hydroxylgruppen anderer Glycane Lactone bilden. Mit freien Aminogruppen, z.B. in Neuraminsäure, ist eine Lactambildung möglich. Ebenfalls intramolekular ist die Bildung von Anhydroverbindungen zwischen C2 und O7 oder C4 und O8 möglich. Ungesättigte Verbindungen wie 2-deoxy-2,3-didehydro-Neu5Ac (Neu2en5Ac) existieren ebenso, liegen aber durch das Fehlen einer konjugationsfähigen α -Ketogruppe nur in freier Form vor (ebenso wie die Anhydroverbindungen).^[74] Allein diese chemische Diversität von Sialinsäuren führt schon zu einer enormen Variationsmöglichkeit von Glycanstrukturen auf Zelloberflächen. Hinzu kommen noch zahlreiche Verknüpfungsmöglichkeiten zu anderen Sacchariden. Abbildung 10 soll einen Überblick über bisher bekannte Substitutionen am Sialinsäurerüst und bekannte verknüpfte Saccharide geben.^[64]



Substituenten	Intramolekular	Intermolekular
R ₁ = H, Tauryl	Lacton (C-7), Lactam (C-5)	
R ₂ = H	2,7-Anhydro, OH eliminiert: Doppelbindung zu C-3 (Neu2en5Ac)	α -verknüpft mit: Gal (3/4/6), GlcNAc (4/6), Sia (8/9), 5-O-NeuGc
R ₄ = H, Acetyl,	4,8-Anhydro	Fuc, Gal
R ₅ = Amino, N-Acetyl, N-Glycolyl, OH, N-Acetylimidoyl, N-Glycolyl- O-acetyl, N-glycolyl-O-methyl,		
R ₇ = H, Acetyl; Substitution durch: N-Acetyl (Leg), NH ₂	2,7-Anhydro	
R ₈ = H, Acetyl, Methyl, Sulfat	4,8-Anhydro	Sia, Glc
R ₉ = H, Acetyl, Lactyl, Phosphat, Sulfat; Substitution durch: H (Leg)		Sia

Abb. 10. Diversität natürlich vorkommender Sialinsäuren in α -Konfiguration sowie intra- und intermolekulare Verknüpfungsmöglichkeiten.^[60, 62, 64, 75-76] Anhydro- und ungesättigte Verbindungen in 2-Position können keine weiteren intermolekularen Verknüpfungen über die 2-Position eingehen.

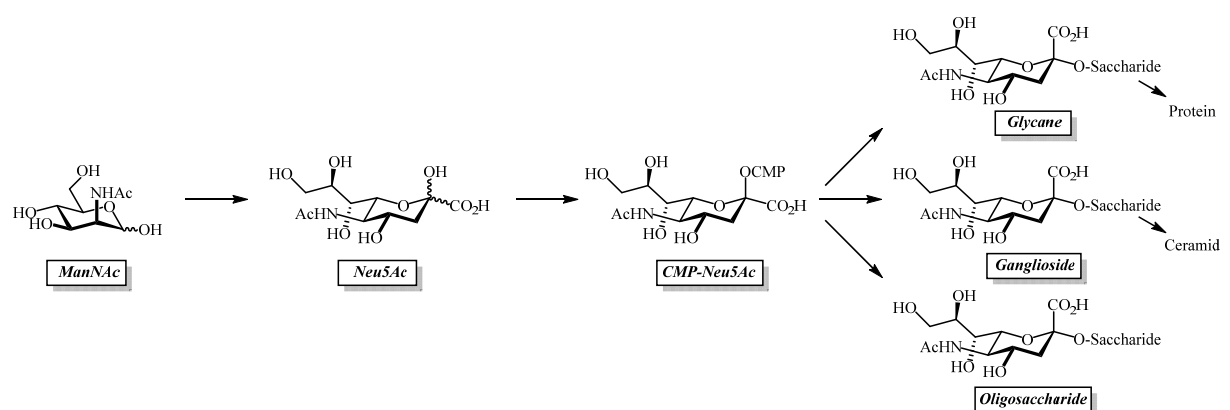
Sialinsäuren liegen üblicherweise als Pyranose-Ringstruktur in 2C_5 -Sesselkonformation vor.^[77] In freier Lösung besitzen sie dabei fast immer β -Konfiguration (92-95%, C2-OH axial), während sie als Komponenten von Glycokonjugaten ausschließlich α -glycosidisch gebunden sind.^[78-79] Die einzige natürlich vorkommende Ausnahme ist die β -glycosidisch verknüpfte Cytidin-5'-monophosphat-aktivierte Form (CMP-Sia), die als aktivierter Donor Vorstufe zu allen Glycokonjugaten ist. Bei der Verknüpfung mittels Sialyltransferase tritt somit Inversion ein. Typische Verknüpfungen sind α -2,3 und α -2,6 zu Galactose, α -2,6 zu GalNAc oder α -2,8 und α -2,9 zu anderen Sialinsäureresten (siehe Abb.10).^[76] Polysialinsäuren sind meist α -2,8-verknüpft und können in bestimmten tierischen Glycoproteinen auftreten.^[64] Kapsel-Polysaccharide oder Lipopolysaccharide bestimmter pathogener Bakterien (z.B. *Salmonella arizonae*) enthalten interne Sialinsäuren als Anteil sich wiederholender Oligosaccharid-Einheiten. Diese ionischen Polysaccharide sind wichtige pathogene Virulenzfaktoren.^[80-81] Wie bei den Glycoproteinen, Gangliosiden (G_M3) oder Polysacchariden erwähnt sind Sialinsäuren als terminale Bausteine wichtiger Bestandteil von

Motiven für Rezeptoren. So bindet Influenza C beispielsweise bevorzugt Glycoproteine mit terminaler 9-*O*-acetylierter Sialinsäure.^[82] Aufgrund ihrer anionischen Ladung beeinflussen Sialinsäuren aber auch über physikalische Prozesse wichtige physiologische und pathogene Prozesse. Aus mehr als 10^7 Sialinsäure-Einheiten pro menschlichem Erythrozyt resultiert eine negative Gesamtladung, die Aggregation durch elektrostatische Abstoßung verhindern kann oder eine Zusammenlagerung zu einem Zellverband über Calcium-Brückenbildungen ermöglicht. Ionentransporte durch die Zellmembran, Stabilität der Konformation von Proteinen und Enzymen sowie die Viskosität von Biofluiden und Mucinen werden ebenfalls durch An- und Abwesenheit von Sialinsäuren gewährleistet und beeinflusst.^[83]

Neben der Funktion als Bestandteil von Erkennungsmotiven haben Sialinsäuren eine weitere wichtige Funktion: die Maskierung. Als biologische Masken sind Sialinsäuren in der Lage, Antigen-Strukturen zu blockieren und so eine Immunreaktion zu unterbinden. Erythrozyten, Lymphozyten und Thrombozyten sind durch Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche vor dem Abbau von Makrophagen geschützt. Entnimmt man sie dem Körper und desialyliert sie mit Hilfe von Sialidase (welche die glycosidische Bindung von Sialinsäuren spezifisch spaltet), werden sie bei erneuter Injektion innerhalb weniger Stunden von Macrophagen über Galactose-spezifische Lectine gebunden und vernichtet.^[84] Der Sialylierungsgrad entscheidet also ebenfalls über die natürliche Lebensspanne von Zellen (im frühen Entwicklungsstadium zeigen Zellen sehr große Mengen Sialinsäure) und über den programmierten Zelltod (Apoptose).

1.2.2. Biosynthese von Sialokonjugaten

Der Biosyntheseweg von Sialinsäuren zum Aufbau und zur Verknüpfung auf der Zelloberfläche lässt sich im Grunde genommen auf drei Schritte reduzieren (siehe Schema 2): die Bildung von Neu5Ac aus ManNAc, die Aktivierung von Neu5Ac mittels eines CMP-Restes und die Verknüpfung der Sialinsäure mittels Sialyltransferase zum Glycokonjugat.



Schema 2. Biosyntheseweg von Sialokonjugaten.

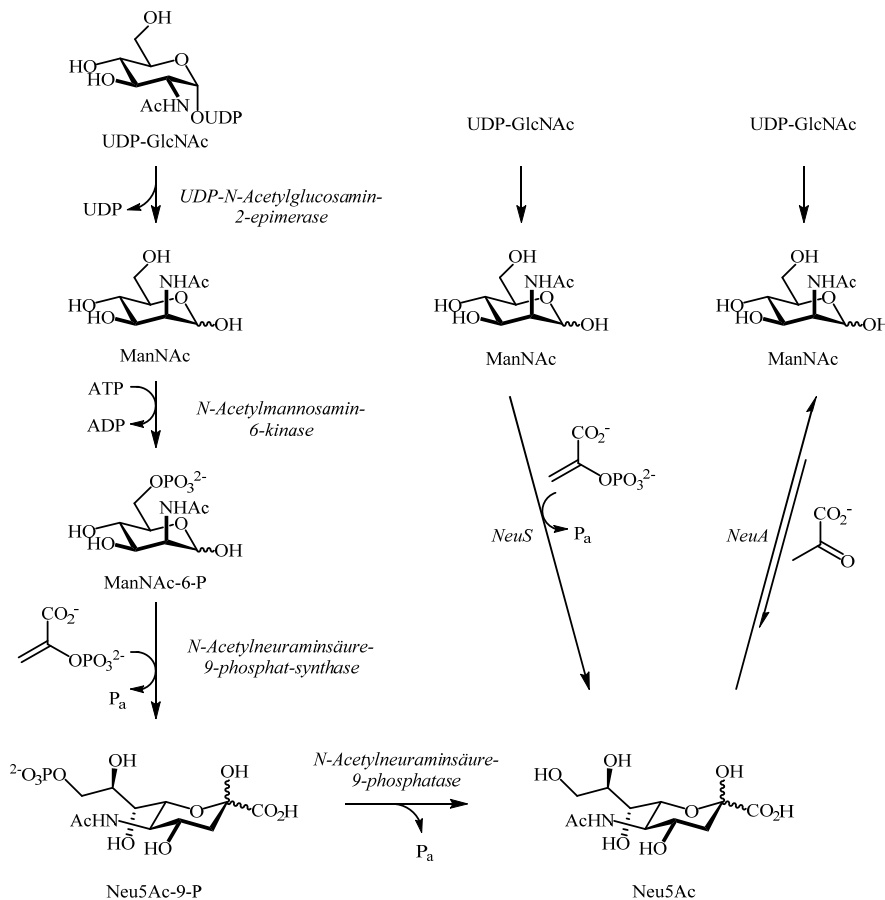
(1) Bildung der Sialinsäure

Bei der Bildung der Sialinsäure gibt es drei unterschiedliche Biosynthesewege (Schema 3):

a) In Säugetierzellen wird aus UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) in vier Schritten Neu5Ac gebildet. Dazu wird UDP-GlcNAc im ersten Schritt mittels einer Epimerase hydrolysiert und das entstehende ManNAc unter Verbrauch von ATP an der O6-Position durch eine Kinase phosphoryliert. Eine Phosphat-synthase katalysiert die Verknüpfung mit Phosphoenolpyruvat (PEP) zum 9-Phosphat von Neu5Ac unter Freisetzung von anorganischem Phosphat. Im letzten Schritt wird durch Dephosphorylierung mittels einer spezifischen Phosphatase freie Neu5Ac gebildet.^[85]

b) In humanpathogenen Bakterien wie *Neisseria meningitidis*^[86-87] oder *E. coli* K1^[88] wird Neu5Ac in nur zwei Schritten aus UDP-GlcNAc gebildet. Nach der Hydrolyse durch UDP-GlcNAc-2-Epimerase wird das entstandene ManNAc mittels *N*-Acetylneuraminsäure-Synthase (NeuS, EC 4.1.3.19) und PEP direkt zu Neu5Ac kondensiert.^[85, 89-90] Diese Reaktion ist unter Freisetzung von anorganischem Phosphat irreversibel.

c) Sowohl in Säugern als auch in Bakterien kommt *N*-Acetylneuraminsäure-Aldolase (NeuA, EC 4.1.3.3) vor.^[91-94] Die eigentliche biologische Funktion dieser Aldolase ist die Spaltung von Neu5Ac. Sie katalysiert unter reversibler Abspaltung von Pyruvat die Bildung von ManNAc aus Neu5Ac.

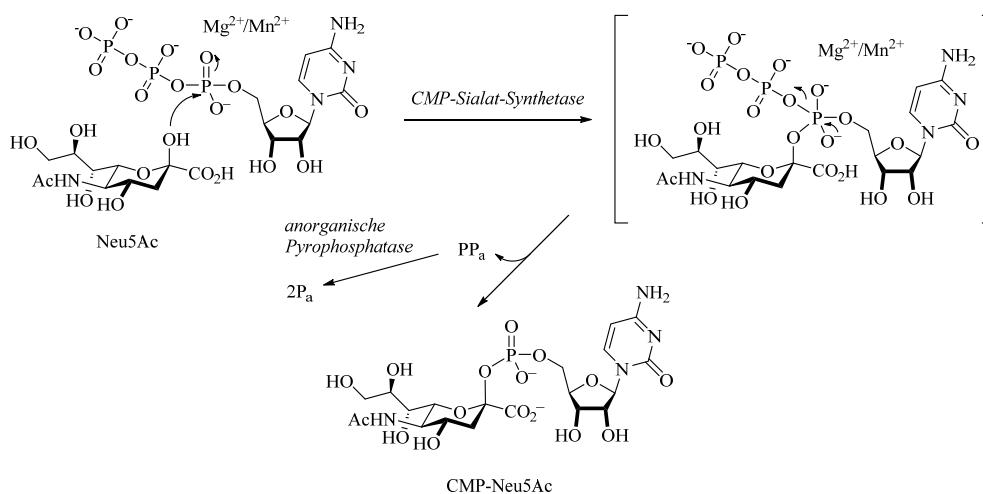


Schema 3. Drei verschiedene Biosynthesewege zur Synthese von Sialinsäuren.

Bei präparativen enzymatischen Synthesen von Neu5Ac und seinen Analoga kommt meist NeuA zum Einsatz. Das Gen wurde aus verschiedenen Quellen wie *Clostridium perfringens*,^[93] *E. coli*^[94] oder *Pasteurella multocida*^[95] isoliert. Es ist aus verschiedenen Quellen kommerziell verfügbar und die (Über-)Expression, z. B. in *E. coli*, optimiert worden.^[94, 96] Auch nicht natürliche Derivate mit variierten Substituenten oder ungewöhnlicher Stereoselektivität wurden damit erfolgreich synthetisiert.^[97-98] Das Gleichgewicht kann durch einen Überschuss an Na-Pyruvat als Standard-Donorsubstrat zugunsten der Sialinsäure als Produkt verschoben werden, wodurch sich gute Ausbeuten erzielen lassen.^[92]

(2) Aktivierung der Sialinsäure

Damit Sialinsäure für die Glycanbiosynthese als Donorsubstrat von Sialyltransferasen genutzt werden kann, muss diese enzymatisch mittels eines Nukleotids aktiviert werden (Schema 4). Diese Aktivierung wird durch eine CMP-Sialat-Synthetase (EC 2.7.7.43, CSS) katalysiert. Weitere Namen dieses Enzyms sind *N*-Acylneuraminat-Cytidyltransferase, CMP-Sialat-Pyrophosphorylase oder CMP-Sia-Synthetase (häufig auch CMAS abgekürzt). Sie katalysiert die Reaktion des nukleophilen Angriffs der β -anomeren C2-OH-Gruppe der Sialinsäure auf das α -Phosphat des Cytidintriphosphats (CTP) unter Abhängigkeit des Cofaktors Mg^{2+}/Mn^{2+} und ist in mehrfacher Hinsicht einzigartig.^[99-103] Das Produkt Cytidin-5'-monophosphat-*N*-acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) liegt hauptsächlich in β -Konfiguration vor und bildet damit eine Ausnahme zur sonst α -verknüpften Sialinsäure.^[104] In allen bisher untersuchten eukaryotischen Zellen findet dieser Prozess im Zellkern statt, während CMP-Sia in prokaryotischen Zellen im Cytoplasma synthetisiert wird. Auch die Aktivierung anderer Zucker in eukaryotischen Zellen findet im Cytoplasma statt. Die Mehrheit der Zucker wird mit Guanosindiphosphat (GDP) oder Uridindiphosphat (UDP) aktiviert. CMP-Aktivierung ist außer bei Sialinsäuren sonst nur bei 2-Keto-3-deoxy-D-manno-2-octulosäure (KDO) bekannt.^[100]



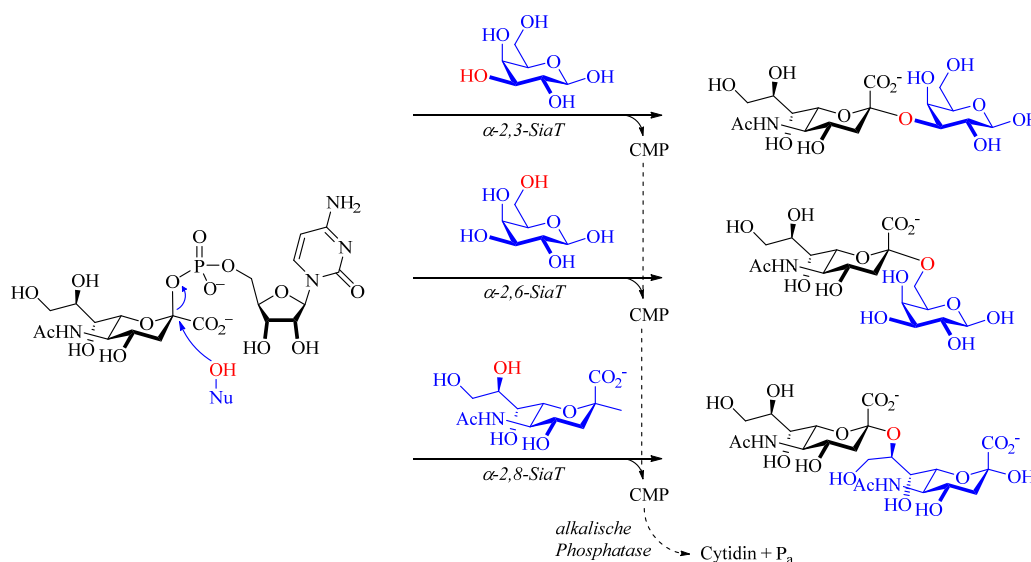
Schema 4. Enzymatische Nukleotid-Aktivierung von Neu5Ac durch CMP-Sialat-Synthetase (CSS). Das bei der Reaktion freigesetzte anorganische Pyrophosphat (PP_i) ist ein Inhibitor der CSS, weshalb es bei präparativer Nutzung durch eine anorganische Pyrophosphatase zu Phosphat hydrolysiert wird, um eine gute Katalyseeffizienz zu gewährleisten.^[103, 105]

1. Einleitung

CSS ist mittlerweile aus verschiedenen prokaryotischen und eukaryotischen Quellen isoliert worden: *E. coli*,^[106] *Neisseria meningitidis*,^[99] *Streptococci* Gruppe B,^[107] *Haemophilus ducreyi*,^[108] *Pasteurella haemolytica*,^[109] *Photobacterium leiognathi*^[110] oder eine thermostabile Variante aus *Clostridium thermocellum*^[111] (optimale Aktivität bei 50°C). Bis auf die thermostabile Variante liegt das Temperaturoptimum bei 37°C und das pH-Optimum im basischen Bereich von 8,5-9,0. Für den präparativen Einsatz eignet sich besonders die CSS aus *Neisseria meningitidis*, die ein sehr hohes Expressionsniveau, hohe Substratflexibilität und höchste Katalyseeffizienz aufweist. Sie wurde bereits zur präparativen Synthese von verschiedenen Derivaten mit C5-, C8- oder C9-Modifikationen genutzt.^[112] Pionierarbeiten zu dieser CSS wurden von *Knorst et al.* 2001 im Arbeitskreis *Fessner* (TU Darmstadt) geleistet.^[113] Dort wurde sie auch zur präparativen Synthese von Neu5Ac-Derivaten und Analogen (z.B. KDN und KDO) genutzt sowie durch *directed evolution* optimiert, um die Substrattoleranz zu erweitern.^[112-116]

(3) Transfer der aktivierten Sialinsäure

Der dritte und letzte Schritt beim Aufbau von Glycokonjugaten ist die Verknüpfung der CMP-aktivierten Sialinsäure mit einem geeigneten Akzeptor mittels Sialyltransferase (SiaT, EC 2.4.99.x) unter Inversion der Konfiguration. Bis heute wurden viele Sialyltransferasen in Säugetieren, Bakterien und Viren entdeckt. Der Prozess des Sialyltransfers findet im Golgi-Apparat statt. Abhängig von der gebildeten glycosidischen Bindung und dem Monosaccharid-Akzeptor werden vier Familien unter den Vertebrat-SiaT unterschieden: Galactosid α 2,3-SiaT (ST3Gal), Galactosid α 2,6-SiaT (ST6Gal), GalNAc α 2,6-SiaT (ST6GalNAc) sowie α 2,8-SiaT (ST8Sia).^[117]

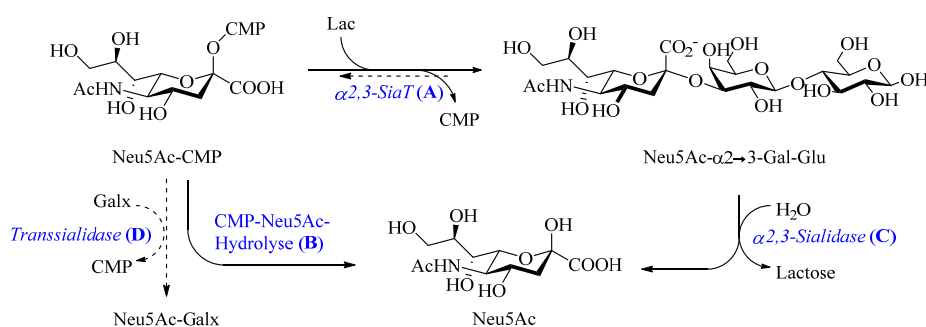


Schema 5. Verknüpfungsmöglichkeiten beim enzymatischen Sialyltransfer mit Galactose und Neu5Ac. Die inhibitorische Wirkung von freiwerdendem CMP auf die SiaT^[118] kann in präparativen Synthesen durch eine Spaltung zu Cytidin und Phosphat durch alkalische Phosphatase unterdrückt werden. Eine Alternative dazu ist eine Nukleotid-Regenerierung mittels Myokinase und Pyruvatkinase.^[119]

Nach der Art der glycosidischen Bindung wird nur in α 2,3-SiaT (EC 2.4.99.4), α 2,6-SiaT (EC 2.4.99.1) oder α 2,8-SiaT (EC 2.4.99.8) unterschieden (Schema 5), während eine andere Einteilung auf Basis von Proteinsequenz-Homologie in der CAZy (*Carbohydrate-Active enZyme*) Datenbank erfolgt.^[120] Hier sind die SiaT in fünf unterschiedliche Glycosyltransferase(GT)-Familien (GT 29, GT 38, GT 42, GT 52 and GT 80) eingeteilt.^[121-122] In der GT-Familie 29 sind verschiedene SiaT aus Eukaryoten und Viren zu finden, alle bakteriellen SiaT gehören dagegen in die Familien GT 38, GT 42, GT 52 und GT 80.^[123]

Für synthetische Anwendungen sind bakterielle SiaT gegenüber ihren Säugetier-Orthologen bevorzugt, da sie unter präparativen Bedingungen stabiler und einfacher zu exprimieren sind, weil sie nicht selbst glycosyliert sind.^[123] Es sind mittlerweile mehr als 20 SiaT aus verschiedenen Bakterien kloniert, wie z.B. α 2,8/9-Polysialyltransferasen aus *Escherichia coli*^[124-125] und *Neisseria meningitidis*^[126] (GT-Familie 38), Lipopolysaccharid α 2,3/ α 2,8-SiaT aus *Campylobacter jejuni*^[127] oder α 2,3-SiaT aus *Haemophilus influenzae*^[128] (GT-Familie 42), α 2,3-SiaT aus *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis*^[129] (GT-Familie 52) sowie α 2,6-SiaT aus *Photobacterium damsela*,^[130] α 2,6-SiaT aus *Photobacterium leiognathi*^[131] sowie α 2,3/ α 2,6-SiaT aus *Pasteurella multocida*^[132] und α 2,3-SiaT aus *Photobacterium phosphoreum*^[133] (GT-Familie 80).

Viele α 2,3- und α 2,6-Sialyltransferasen der GT-Familie 80 zeigen eine erstaunliche Multifunktionalität (siehe Schema 6). So ist neben der SiaT-Aktivität (**A**) auch Sialidase- (**C**) und Transsialidase- (**D**) Aktivität zu finden. Mittlerweile ist bekannt, dass die Transsialidaseaktivität mechanistisch auf einer Reversibilität des Transfers **A** mit transientser CMP-Neu5Ac-Bildung beruht.^[134] Eine unerwünschte Nebenreaktion ist die Hydrolyse der aktivierten Sialinsäure (**B**).



Schema 6. Katalysierte Reaktionen multifunktionaler SiaT am Beispiel einer α 2,3-SiaT. **A:** Sialyltransfer, **B:** Substrathydrolyse, **C:** Produkthydrolyse, **D:** Transsialidase über Reversibilität von **A**.

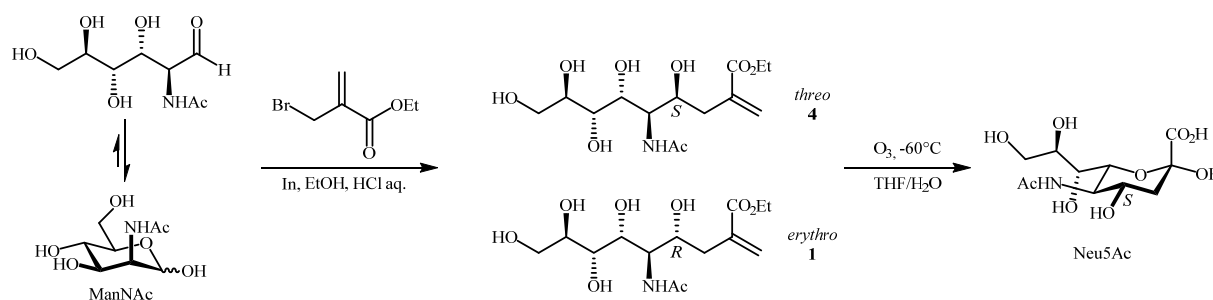
Mit der Aufklärung der Kristallstruktur und dem Fortschreiten der Möglichkeiten einer gelenkten Evolution (*directed evolution*) von Enzymen wurde in vielen Ansätzen versucht, diese Aktivitäten gezielt auszubeuken, zu unterdrücken oder das Substratspektrum an spezifische

1. Einleitung

Anforderungen anzupassen. *Pasteurella multocida* weist beispielsweise α 2,3- und α 2,6-SiaT-, α 2,3-Sialidase- und Transsialidase-Aktivität von Sia in α 2,3-Sialylgalactosiden auf andere Galactoside auf.^[132] *Campylobacter jejuni* kann α 2,3- und α 2,8-SiaT-, α 2,8-Sialidase- und α 2,8-Transsialidase-Aktivitäten katalysieren.^[135] Die breite Substrattoleranz wurde zum Beispiel in Drei-Enzym-Eintopf-Systemen genutzt, um verschiedene Sialosid-Derivate zu synthetisieren und Sialidasestudien im Hochdurchsatzverfahren zu testen.^[132, 136-137]

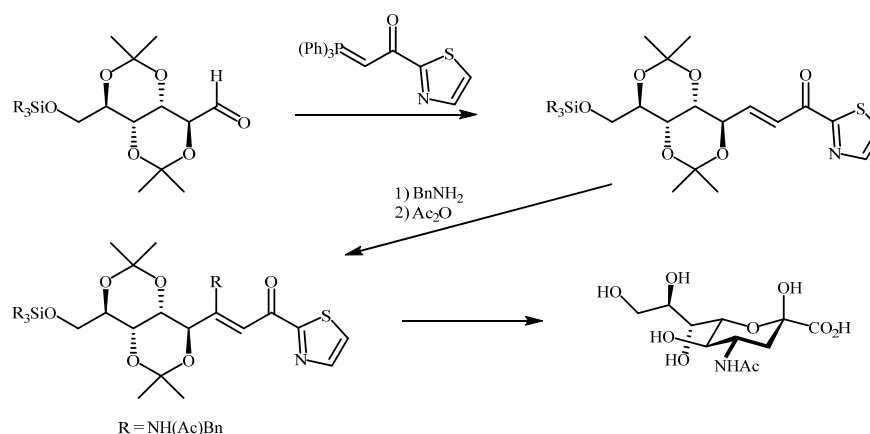
1.2.3. Chemische Synthese von Sialinsäuren

Es gibt mittlerweile eine Vielzahl chemischer Synthesen von Sialinsäuren, deren Anfänge in den 1980er Jahren liegen. Die erste *de novo* Synthese wurde 1988 von *Danishefsky* durchgeführt.^[138-139] Eine der ersten kurzen und eleganten Synthesen beruht auf der Kondensation von ManNAc mit Ethyl- α -brommethylacrylat in Gegenwart von Indium in verdünnter wässriger salzsaurer Lösung (Schema 7).^[140] Das resultierende Enolat liegt als Diastereomergemisch (*threo*/*erythro* 4:1) vor und kann mit anschließender Ozonolyse unter oxidativer Aufarbeitung gespalten werden. Das resultierende Aldehyd cyclisiert in Lösung sofort zu Neu5Ac und konnte nach Trennung des 4-Epimers durch Kristallisation in 11% Ausbeute gewonnen werden. Auch KDN und verkürzte Sialinsäurederivate konnten durch Indium-vermittelte Synthesen synthetisiert werden.^[141-142]



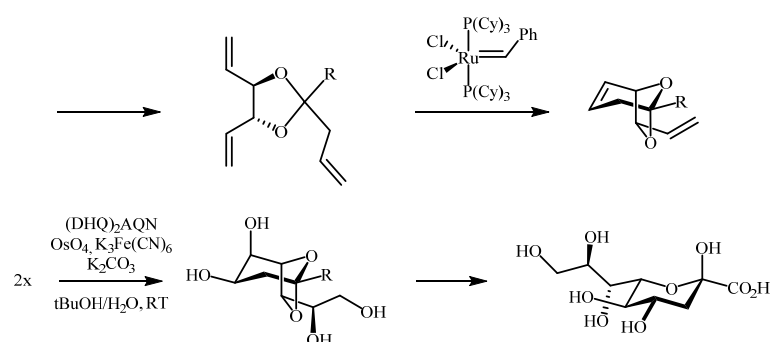
Schema 7. Indium-vermittelte Kupplung von ManNAc und folgende Ozonolyse zur Synthese von Neu5Ac nach Chan.^[140]

Dondoni et al. entwickelten in den 1990er Jahren die Thiazolmethode, um C4-Derivate von KDN zu erzeugen.^[143-144] Das Kohlenstoffgerüst wurde hierbei durch eine Wittig-Reaktion zwischen einem geschützten Mannose-Derivat und einem Thiazol-Ylid aufgebaut. Konjugierte Addition von Benzylamin an das entstandene Enon liefert überwiegend das *syn*-Addukt (*threo*), welches nach Umwandlung in einem 4-Acetamido-4-deoxy-KDN-Derivat resultiert (Schema 8).



Schema 8. Thiazolmethode nach *Dondoni* zur Synthese von KDN-Derivaten.

Eine weitere bekannte Totalsynthese von KDN (und KDO) wurde von *Burke* vorgestellt. Hierbei waren die Ringschlussmethatase eines C2-symmetrischen Triens nach *Grubb's* und eine doppelte stereoselektive Dihydroxylierung nach *Sharpless* die entscheidenden Schritte zum Aufbau (Schema 9).^[145-146]



Schema 9. Totalsynthese von KDN nach *Burke*.

Die Ausbeuten von Totalsynthesen, die aufwändigen Schutzgruppenstrategien und die Komplexität der Stereochemie sind bis heute die großen Hürden für Synthesen von Sialinsäuren. Dennoch wird nach weiteren Methoden gesucht, da Derivate von Neu5Ac wie Zanamivir^[147-149] oder Oseltamivir^[150-152] höchst effiziente Influenza-Neuraminidase-Inhibitoren sind (Abb. 11). Sialidase- oder Neuraminidase-Inhibitoren als antimikrobielle Therapeutika und hochaffine Sialosid-Liganden für Siglecs in der Immunzell-Target-Therapie sind weiterhin von größtem Interesse.

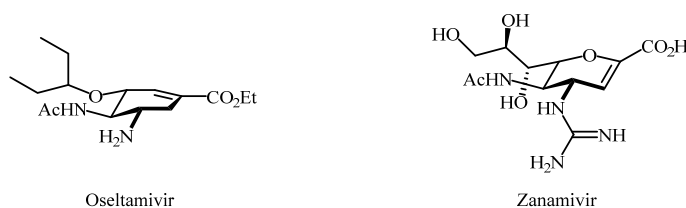


Abb. 11. Influenza Neuraminidase-Inhibitoren Oseltamivir (Tamiflu®) und Zanamivir (Relenza®).

1.2.4. Chemo-enzymatische Synthesen

Um die größten Hürden der chemischen Synthese zu umgehen, werden die meisten Sia-Derivate chemo-enzymatisch synthetisiert, womit die Vorteile der gewünschten Stereochemie aus Enzym-basierten Produkten genutzt werden. Sehr häufig kommen hierbei Mannose-Derivate und NeuA-Katalyse zum Einsatz, deren eingeschränktes Substratspektrum hierbei jedoch der limitierende Faktor ist. So müssen beispielsweise die polyhydroxylierten Precursoren mindestens die Größe von Pentosen besitzen.^[153] Eine Kombination aus beiden Synthesestrategien scheint daher am Vorteilhaftesten zu sein.

Auch die Verknüpfung der Sialinsäuren zu Sialokonjugaten ist chemisch eine große Herausforderung, was hauptsächlich durch drei Faktoren erschwert wird. Die Carboxyl-Funktion der Sialinsäure in Nachbarschaft zur C2-Position erschwert durch ihre Elektronenaffinität die Bildung eines Oxonium-Ions und damit auch einen nukleophilen Ersatz am C2-Atom. Des Weiteren sorgt sie für die Begünstigung einer intramolekularen Eliminierung zum 2,3-Dehydro-Derivat und stellt nicht zuletzt eine sterische Hinderung zur Ausbildung der glycosidischen Bindung dar. Schließlich fällt durch das Fehlen eines Substituenten in C3-Position der dirigierende Nachbargruppen effekt weg, was die Stereoselektivität reduziert. Auch hier schafft ein chemo-enzymatischer Ansatz Abhilfe. Chemisch oder chemo-enzymatisch synthetisierte Sialinsäure-Derivate können mit spezifischen Sialyltransferasen, deren Substratspektrum beispielsweise durch gelenkte Evolution (*directed evolution*) erweitert wurde, dann stereospezifisch zu Sialokonjugaten aufgebaut werden.

1.3. Glycan-bindende Proteine

Die enorme strukturelle Diversität der Glycane kann nur als Informationsspeicher fungieren, wenn die Kohlenhydratstrukturen auch erkannt werden und die Information decodiert wird. Um dieses Potential auszuschöpfen und die einzelnen Glycane für spezifische physiologische und pathologische Prozesse zu erkennen, hat die Natur Glycan-bindende Proteine (GBP) entwickelt. Es gibt keine lebenden Organismen, in denen bisher keine GBPs gefunden wurden.

Sieht man von Glycan-spezifischen Antikörpern ab, lassen sich GBPs in zwei Hauptklassen einteilen: Lectine und Glycosaminoglycan-bindende Proteine.^[82] Etwas genauer soll hier auf die Lectine und eine besondere Untergruppe, die Siglecs (sialinsäurebindende Proteine), eingegangen werden.

1.3.1. Lectine

Lectine sind als kohlenhydratbindende nicht-Antikörper-Proteine mit einem hochspezifischen Erkennungsmotiv und mindestens einer Domäne ohne enzymatische Aktivität definiert. Die kohlenhydratbindende Domäne (CRD – *carbohydrate recognition domain*) bildet meist keine tiefe Bindungstasche aus. Die Interaktion findet über eine flache polare Oberflächenstruktur des Proteins mittels Wasserstoffbrückennetzwerken und Van-der-Waals-Wechselwirkungen statt. Dabei sind oft nur ein bis drei Monosaccharide an den Wechselwirkungen beteiligt. Die Bindungsaffinitäten sind dabei meist relativ gering (K_d -Werte im hohen mikromolaren bis niedrig millimolaren Bereich). Um trotz der geringen Affinität biologisch relevante Interaktionen zu vermitteln, sind sowohl die Zuckermotive als auch die CRD meist mehrfach auf engstem Raum geclustert. Durch diese Multivalenz ist die Affinität wiederum aus entropischen Gründen um Größenordnungen höher, als die einzelnen Wechselwirkungsereignisse vermuten ließen. Lectine wurden vor mehr als 100 Jahren zuerst in Pflanzen entdeckt, sind aber mittlerweile überall in der Natur bekannt.^[52, 154-157]

Pflanzliche Lectine wurden 1888 von *Stillmark* entdeckt, der im Extrakt von Rizinussamen ein Protein fand, das rote Blutkörperchen verklumpen ließ (Agglutination). Proteine mit ähnlichen blutverklumpenden Eigenschaften wurden daher Hämagglutinine genannt. Der Begriff »*Lectin*« (von lateinisch »legere« und englisch »to select«: auswählen) entwickelte sich erst im zweiten Weltkrieg im Zuge der AB0-Blutgruppen-Typisierung, als man feststellte, dass bestimmte Lectine spezifisch für Blutgruppenderminanten und verschiedene andere Glycane sind.^[82]

Virale Lectine werden auch heute noch als Hämagglutinine bezeichnet. Das Influenzavirus-Hämagglutinin (Influenzavirus A) war das erste GBP, welches aus einem Mikroorganismus gegen 1950 isoliert wurde und ist heute das am besten untersuchte Lectin überhaupt. Die meisten viralen Lectine binden endständige Saccharidmotive. Humane Viren binden beispielsweise spezifisch Zellen mit dem Saccharidmotiv aus Sia-Gal mit α 2,6-verknüpfter Sialinsäure als Erkennungsmotiv, während tierische Viren bevorzugt α 2,3-verknüpfte Sialinsäure-Galactose-Termini binden (Abb. 12).^[82] Tritt nun beim tierischen Virus eine Mutation im Hämagglutinin auf, kann unter Umständen das α 2,6-verknüpfte Motiv erkannt und der Mensch infiziert werden. Dies ist sowohl beim Schweinegrippevirus H1N1^[158] als auch beim Vogelgrippevirus H5N1^[159-161] dokumentiert worden.

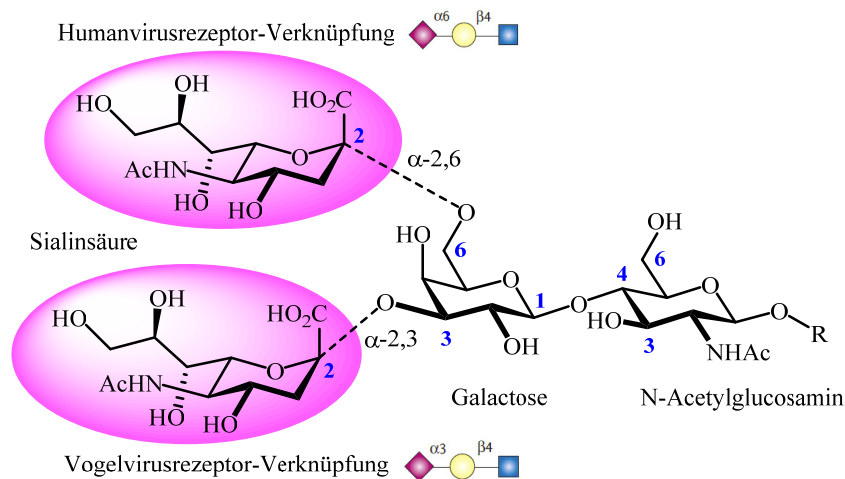


Abb. 12. Die beiden Verknüpfungsmöglichkeiten der Sialinsäure im Erkennungsmotiv von humanem und Vogel-Virus.

Bakterielle Lectine lassen sich in zwei Klassen einteilen: Adhäsine, welche auf der bakteriellen Oberfläche vorkommen und die Adhäsion auf Zelloberflächen ermöglichen, sowie bakterielle Toxine, die abgesondert werden. Eine Vielzahl bakterieller Lectine binden an Glycolipide, während nur wenige an Glycoproteine andocken. Nicht alle Interaktionen bakterieller Lectine sind pathogen. So ermöglicht das Saccharidmotiv Gal α 1-4Gal im Dickdarm die Besiedelung mit *Bacteroides*, *Lactobacillus* oder *E. coli*, die ein natürlicher Teil der Darmflora und für die Verdauung wichtig sind. Ein prominentes Beispiel für glycanbindende abgesonderte bakterielle Toxine ist das Cholera toxin aus *Vibrio cholerae*. Es verursacht schwere Durchfallerkrankungen und ist Auslöser der Cholera.^[82]

Tierische Lectine sind etwa seit den 1980er Jahren bekannt. Die mittlerweile identifizierte Diversität ist erstaunlich und umfasst mindestens 12 strukturelle Familien. Tierische Lectine binden nicht nur Kohlenhydrate, sondern auch Proteine, Lipide oder Nukleinsäuren. Die meisten treten in Zusammenhang mit Erkennungsprozessen des Immunsystems auf, sei es Verteidigung gegen Pathogene, Zell-Transportsignale oder (Auto-)Immunregulierung. Unter den vielen Klassen tierischer Lectine sind blutgruppendifferenzierende Lectine, β -galactosidbindende Lectine (Galectine), Pentraxine, Collectine und Selectine zu nennen.^[53]

Die Klassifizierung der Lectine ist äußerst komplex und überschneidet sich teilweise, zum Beispiel in dem Ansatz, nach Kohlenhydratspezifität einzuteilen. Lectine werden daher gerne auf Grundlage von Sequenz- und Strukturhomologie eingeteilt. Dabei werden fünf bzw. sieben etablierte Hauptgruppen unterschieden (Tabelle 1):

Tabelle 1. Klassifizierung der Lectine in weit verbreitete, anerkannte Hauptklassen aufgrund von Sequenz- und Strukturhomologie.^[162-169]

Lectin	Benennung nach	Eigenschaften, Vorkommen; Liganden
R-Typ ^[162]	<i>Ricinus communis</i> (Ricin)	in Pflanzen, Tieren und Bakterien; variabel: u. a. Gal/GalNAc, Man, α -2,6Sia
L-Typ ^[163]	Leguminosen	Ca ²⁺ -abhängig, in Pflanzen, Tieren, Bakterien; variabel: u. a. Man, Glc, Gal, GalNAc, GlcNAc, Fuc
P-Typ ^[164-165]	Phosphat-bindend	Erkennung von Lysosomen, konservierte CRD, in Tieren; Man6-PO ₄ (M6P)
C-Typ ^[166]	Calcium-abhängig	konservierte CRD (110-130 AS), Ca ²⁺ -abhängig, beinhaltet Collectine, Selectine, Endocytose-rezeptoren und Proteoglycane, in Tieren; variabel: u. a. Man, Gal, Fuc, Heparin
I-Typ ^[167]	Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF)	Ig-artige Faltung (100-120 AS), beinhaltet Siglecs (sialic acid binding lectins), in Tieren; variabel: u. a. Sia-Lac
Galectin ^[168]	Bindungsmotiv Gal	konservierte CRD (8 AS), in Tieren (Gal-1 bis Gal-15) und Pflanzen; β -Gal
Pentraxin ^[169]	»penta« und »axis« (griechisch: fünf, Achse)	radiale Symmetrie aus 5 identischen Monomeren, Ca ²⁺ -abhängig, in Tieren; variabel: u. a. Man, Gal, PO ₄ - und SO ₄ -haltige Kohlenhydrate ^[170]

Auf weitere Gruppen, wie z.B. F-Typ-Lectine (Fucose-bindende Lectine)^[171], soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie teilweise noch nicht genau festgelegt sind, sich mit anderen Gruppen überschneiden oder (noch) nicht allgemein akzeptiert sind.

1.3.2. Siglecs

Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins (Siglecs) gehören zur Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF) und damit zu den I-Typ Lectinen.^[167] Wie die Namensgebung bereits klar macht, handelt es sich um sialinsäurebindende Proteine. Da sowohl *N*- und *O*-Glycane sowie Glycoproteine häufig sialinsäureterminiert sind, kommen Sialinsäuren und Siglecs daher eine besondere Stellung bei Oberflächen-Wechselwirkungen und Immunreaktionen zu.^[84]

1. Einleitung

Siglecs kommen vorwiegend auf Zellen des blutbildenden Systems vor und sind alle Typ-1-Membranproteine (Aminoterminus extrazellulär). Sie besitzen eine Sia-bindende, aminotermine V-Set Domäne und eine variierende Anzahl an C2-Set Ig-Domänen, die als Platzhalter zwischen Bindestelle und Plasmamembran fungieren. Siglecs sind hochspezifisch für Sialinsäure und binden nicht nur die negativ geladene Carboxylgruppe, sondern bilden auch Kontakte zur hydroxylierten Seitenkette, zur *N*-Acyl- und zur C4-Hydroxylgruppe aus. Schon eine Sulfatierung führt zum Bindungsverlust. Setzt man Sialidasen ein, wird eine Erkennung von Zelltargets oder Glycokonjugaten durch Siglecs effektiv unterbunden.^[167] Beim Menschen sind bis dato 15 Siglecs bekannt (siehe Abb. 13).

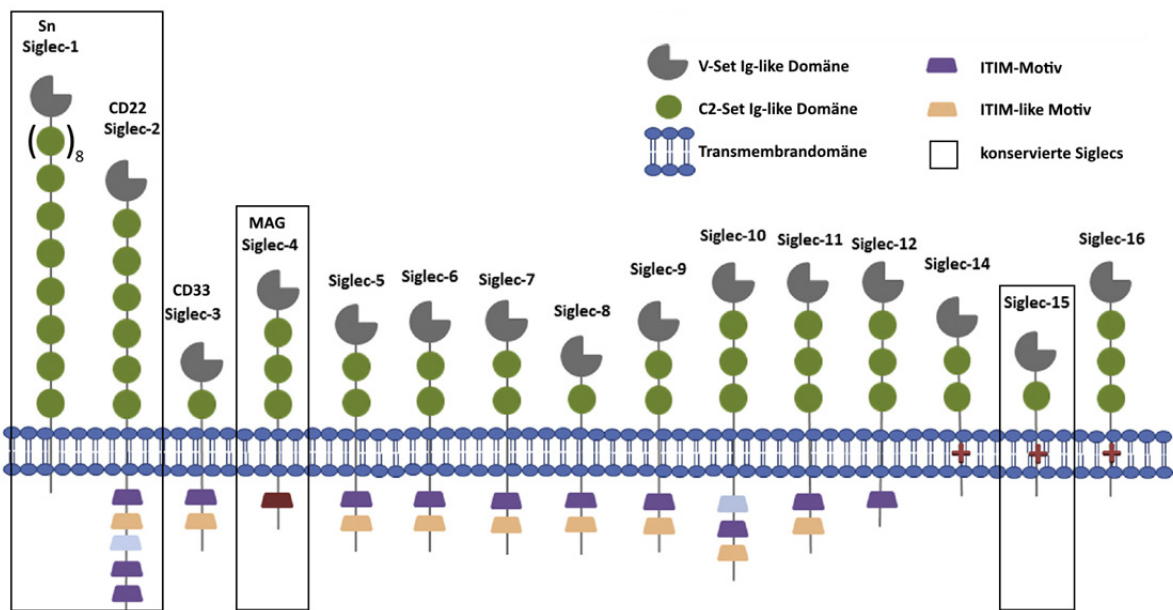


Abb. 13. Struktur der 15 beim Menschen bekannten Siglecs. Grafik entnommen aus Referenz^[172], variiert und bearbeitet.

Siglecs können, basierend auf Sequenzähnlichkeit und Konservierung in verschiedenen Säugetierspezies, in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet Sialoadhesin (Sn, Siglec-1), CD22 (Siglec-2), Myelin-assoziiertes Glycoprotein (MAG, Siglec-4) und Siglec-15, für die es in allen untersuchten Säugetierspezies eindeutige Orthologe gibt (konservierte Siglecs). Die zweite Gruppe sind *CD33-related* Siglecs (CD33rSiglecs), welche 50-99% Sequenzähnlichkeit aufweisen, aber nur sehr schwer in Orthologe einzuteilen sind. Beide Gruppen besitzen Aktivierungs- und Inhibitionsrezeptoren (ITAM und ITIM = immune receptor tyrosine-based activation/inhibition motifs), die die Initiierung von Immunreaktionen aktivieren oder hemmen können.^[172]

Es gibt einige prägnante Beispiele für Siglecfunktionen. Sialoadhesin spielt eine Rolle bei rheumatischer Arthritis und ist phagozytischer Rezeptor für Pathogene wie *Neisseria meningitidis* oder *Trypanosoma cruzi*. CD22 ist als negativer Regulator bei der B-Zellen-Aktivierung bekannt.^[173] CD33r-Siglecs werden zumeist im Immunsystem

exprimiert und werden generell mit der Regulierung der Leukozytenfunktionen während der Entzündung und Immunantwort in Verbindung gebracht, indem sie Sialinsäuredekoration als „selbst“ erkennen.^[174]

Die genannten Eigenschaften als endozytotische Rezeptoren machen Siglecs zu attraktiven molekularen Zielen für eine direkte Therapie von Immunzellen-vermittelten Krankheiten oder Krebs. Ein Ansatz kann hierbei die Synthese von sialinsäurebasierten Siglecinhibitoren sein.^[174-178] Die selektive Adressierung von Lectinen durch hochaffine Sialoside wurde durch Variation der Sialinsäurestruktur an den Positionen C4, C5 and C9 erfolgreich für die Diskriminierung von Sialoadhesin (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3) oder MAG (Siglec-4) gezeigt.^[176, 179-182]

1.4. Protein Engineering

Die Entwicklung von neuen Enzymen hat in den letzten 25 Jahren sehr große Fortschritte gemacht. Dies ist der Grund, warum Enzyme heute in nahezu allen Bereichen des Lebens anwendbar sind, sei es bei alltäglichen Dingen wie der Erzeugung von Lebensmitteln, als Bestandteil von Waschmitteln und Zahnpasta oder in der verarbeitenden Papier- und Textilindustrie, bei der Gewinnung von Biokraftstoffen oder bei der Herstellung von Feinchemikalien und pharmazeutischen Wirkstoffen.^[183] Für die chemische Industrie ist die Entwicklung von biotechnologischen Verfahren deshalb essentiell, weil sie umweltfreundliche Verfahren durch die Vermeidung von Lösemitteln oder giftigen Übergangsmetallen ermöglichen und die Katalyse hochspezifischer Reaktionen (chemo-, regio- und stereoselektiv) zugänglich machen. Durch die Fortschritte in der Molekularbiologie ist der Zugang zu Enzymen heute leichter und kostengünstig möglich. Ein gezieltes Proteindesign ermöglicht die Entwicklung maßgeschneiderter Enzyme für spezifische Reaktionen.^[184-185]

Protein engineering bezeichnet im Wesentlichen die Modifikation der Aminosäuresequenz eines existierenden Enzyms. Diese Veränderungen zielen darauf ab, die enzymatische Aktivität zu steigern, die Substrattoleranz zu erweitern, die Temperatur- oder Lösemittelstabilität zu erhöhen oder bestimmte katalytische (Neben-)Reaktionen auszulöschen.^[186] Eine Schwierigkeit des *protein engineering* ist die Vorhersagbarkeit der Auswirkungen durch die Aminosäuremodifikation, da der Zusammenhang zwischen Primärstruktur (Aminosäuresequenz), Tertiärstruktur und Funktion des Enzyms oft unklar ist.

Prinzipiell gibt es zwei Ansätze, die auf Modifikationen bekannter Enzyme aufbauen. Man unterscheidet zwischen gelenkter Evolution (*directed evolution*) und rationalem Proteindesign. Um effiziente Lösungen zu finden, werden sehr häufig Teile und Methoden beider Ansätze kombiniert. Die häufigsten und wichtigsten Methoden werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.4.1. Gelenkte Evolution von Proteinen

Bei der gelenkten Evolution werden zwei leistungsfähige Technologien kombiniert. Zum einen sind dies Methoden zur Erstellung zufälliger genetischer Bibliotheken; zum anderen sind es Strategien zur Selektion von Enzymvarianten, die spezifische Eigenschaften besitzen.^[185] Die bei der Veränderung eines Proteins durch zufällige Mutation entstehenden Enzymvarianten werden durch *Screening* auf die gewünschten Eigenschaften getestet und danach meist iterativ erneut dem Prozess unterzogen, um weiter verbesserte Varianten zu erhalten.^[187-188] Um die riesige Menge an generierten Varianten untersuchen zu können, werden leistungsfähige (Hochdurchsatz-)Screeningmethoden benötigt, um die Bibliotheken von bis zu 10^8 Varianten analysieren zu können.

Für den zufälligen Austausch von Aminosäuren in der Proteinsequenz gibt es verschiedene Ansätze. Die bekannteste und am weitesten verbreitete Methode ist die *error prone* PCR (*epPCR*).^[189] Hierbei werden zufällige Kopierfehler bei der Vervielfältigung der DNA erzeugt. Durch ungleiche Konzentrationsverhältnisse der Desoxyribonukleotide (dNTP), Zugabe von Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen kann die Fehlerrate der eingesetzten *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase auf mehr als 1% erhöht werden.^[190] Da die *Taq*-Polymerase nicht in der Lage ist, Fehler zu korrigieren, werden hierdurch Varianten mit zufälligen Mutationen erzeugt. Als älteste und am besten untersuchte Methode wurde die *epPCR* – beispielsweise durch neue Polymerasen – stetig weiter entwickelt, so dass anfängliche Schwierigkeiten wie ein homogenes Mutationsspektrum (*error bias*) oder der Austausch benachbarter Aminosäuren heute nicht mehr so ein großes Problem darstellen.^[191] Zahlreiche Kits und verschiedene Protokolle sind heute kommerziell verfügbar.

Ein Vorteil bei der Methode der gelenkten Evolution ist, dass keine detaillierte 3D-Struktur des Proteins benötigt wird. Es reicht aus, Funktion und DNA-Sequenz des Enzyms zu kennen. Weitere Methoden sind oligonukleotidbasierte Ansätze (spezifische Lokalisation der Mutation) oder DNA-*Shuffling* (Kombination von DNA-Fragmenten).^[192-194]

1.4.2. Rationales Design von Proteinen

Der Ansatz des rationalen Designs ist deutlich zielgerichteter als der Ansatz der gelenkten Evolution, benötigt aber auch zusätzlich Informationen zur 3D-Struktur, zum Beispiel ein Modell oder eine Kristallstruktur. Rationales Design als zweiter großer Bereich des *protein engineering* bezeichnet die computergestützte Identifizierung von Aminosäuren, welche für zielgerichtete Mutationen in Frage kommen, um die gewünschten Proteineigenschaften zu manipulieren. Hierfür ist ein grundlegendes Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehung notwendig, worin, wie bereits beschrieben, die Schwierigkeiten begründet liegen. Die größte Herausforderung des rationalen Designs liegt daher in der Identifikation der entscheidenden Aminosäuren. Um diese zu finden, gibt es sequenzbasierte und strukturbasierte Ansätze.^[195]

(1) Sequenzbasiertes Design

Für das sequenzbasierte Design werden Sequenzvergleiche zweier oder mehrerer Enzyme (*multiple sequence alignments*) herangezogen, um konservierte Aminosäuren zwischen homologen Proteinsequenzen zu identifizieren. Um verwandtschaftliche Beziehungen homologer Proteine zu finden, werden wiederum phylogenetische Analysen durchgeführt. Aus dem Vergleich der Sequenzen wird dann versucht, sogenannte *hotspots* zu identifizieren, die funktionelle Positionen oder Bereiche durch besondere Konservierung oder auch Variabilität offenbaren. Eine genaue Kenntnis des katalytischen Mechanismus ist hierbei von großem Vorteil, aber häufig nicht gegeben. Durch die mittlerweile hochtechnisierte Analyse sind in den Datenbanken immer mehr Sequenzen verfügbar, deren Funktion und/oder strukturellen Information noch nicht aufgeklärt sind.^[196] Um Informationen aus Sequenz- und Strukturdaten zu kombinieren, kann auf viele Datenbanken wie zum Beispiel den *HotSpot Wizard Server* oder die *3DM* Datenbank zurückgegriffen werden.^[197-199] Durch zahlreiche Filter, Klassifizierung von Protein-Superfamilien sowie Informationskombination aus Gen-datenbanken und Proteindatenbanken (PDB) sind solche Programme in der Lage, einzelne Aminosäuren, die zur Mutation in Frage kommen, vorzuschlagen.^[196]

(2) Strukturbasiertes Design

Für das strukturbasierte Design wird die Auswahl der zu verändernden Aminosäuren auf Grundlage der 3D-Struktur getroffen. Bei der Analyse der aktiven Tasche (*Active Site*) werden Kontaktstellen zwischen Substrat und Protein identifiziert und können nachfolgend so verändert werden, dass beispielsweise die Bindung eines ungewünschten Enantiomers durch das Einführen von großen Resten blockiert wird. Auch die Veränderung der Polarität und damit der Bindungsumgebung spielt in diesem Konzept eine wesentliche Rolle. Die Schwierigkeit besteht wiederum in der Vorhersagbarkeit der Effekte. Proteindynamik oder Proteinfaltung können mit starren Röntgenkristallstrukturen nicht erfasst werden. Häufig fehlen in Kristallstrukturen auch die gebundenen Substrate, so dass die Kristallstruktur mitunter gar nicht den aktiven Zustand des Enzyms wiedergibt. Auch hier gibt es zahlreiche Ansätze wie *Docking*-Studien oder *Cavity Search* und Programme wie *CAVER* oder *YASARA*, die Tunnel und Kanäle in Proteinstrukturen identifizieren sollen und molekulare Mechanismen simulieren.^[195, 200-202]

1.4.3. Semirationales Design von Proteinen

Die Schwierigkeit des rationalen Designs liegt somit in der exakten Identifizierung einer Aminosäure und ihrer Funktion. Das semirationale Design (auch *smart library* oder *knowledge-based library*) verknüpft nun die beiden Ansätze aus gelenkter Evolution und rationalem Design. Sind Informationen aus der Struktur, Sequenzalignment und Funktion vorhanden, lassen sich die daraus identifizierten Aminosäuren gezielt durch zufällige Mutation austauschen.^[195] Die Beschränkung auf festgelegte Positionen verringert die Größe

der Bibliothek dramatisch und erlaubt auch den Einsatz von Screeningmethoden, die für ein Hochdurchsatzverfahren nicht geeignet sind, aber genauere Aussagen über die Funktion der Enzyme liefern. Eine weitere positive Auswirkung ist, dass oftmals weniger Iterationen bis zum gewünschten Erfolg nötig sind. Die Beschränkung auf wenige Aminosäuren birgt wie erläutert jedoch weiterhin das Risiko, relevante Aminosäuren nicht in die Bibliothek integriert zu haben.

Als weitere Methode sei noch das *computational engineering* erwähnt. Semiempirische *molecular dynamics* (MD) ermöglichen die rechnergestützte Simulation von möglichen Konformationen und Übergangszuständen, deren Geometrie theoretisch häufiger einen katalytischen Prozess begünstigen als andere.^[203-204] Über *computational engineering* lassen sich ganze virtuelle Bibliotheken von Varianten *in silico* erstellen. Sie werden evaluiert und automatisch nach energetischer Reihenfolge oder geometrischen Beschränkungen sortiert, so dass am Ende wenige Varianten übrig bleiben, die manuell begutachtet und im Labor hergestellt werden.^[205] Ein bekanntes Programm hierfür ist *RosettaDesign*.^[206]

Je nach Problematik sowie nach den zur Verfügung stehenden Informationen, Ressourcen und Methoden muss also individuell entschieden werden, welcher Ansatz die jeweils besten Ergebnisse liefern könnte.

1.4.4. Screening

Alle vorgestellten Techniken des *protein engineerings* können nur erfolgreich sein, wenn die hergestellten Varianten in hocheffizienten Screenings nach Güte und Effektivität eingeordnet und sortiert werden können. Bei der gelenkten Evolution mit extrem großen Bibliotheken ist ein Hochdurchsatzverfahren unerlässlich, während bei den wenigen Varianten des *rational designs* das Hauptinteresse der exakten Verifizierung von Verbesserungen gilt. Es gibt zahlreiche Methoden, die nach Selektion und Screening sowie nach *in vivo*- und *in vitro*-Verfahren unterschieden werden können (Abb. 14).

Selektionstechniken (*in vivo*) beruhen auf einer direkten Verknüpfung zwischen Zellwachstum und verbesserter bzw. benötigter Enzymfunktion. Zellen werden mit der Bibliothek transformiert und auf selektive Medien ausplattiert. Selektionen sind daher auf Enzyme beschränkt, deren Syntheseprodukte essentielle Nährstoffe für die Zelle sind, oder die so entwickelt wurden, dass sie durch Entgiftung der Zelle deren Überleben sichern.^[207]

Agarplatten-Screening beruht auf der Erzeugung eines visuellen Signals wie Farbe oder Fluoreszenz bei der Expression von Enzymen mit den gewünschten Funktionen. Das exprimierte Produkt des Enzyms muss durch vielfältige Techniken (u. a. pH-Indikator, Farb-reaktion des Produkts mit weiteren Reagenzien) sichtbar gemacht werden, um die farbige Kolonie auszuwählen. Die Methode ist einfach und robust, um aktive Varianten zu detektieren, aber schwach in der Differenzierung katalytischer Geschwindigkeiten.^[207]

Mikrotiterplatten-Screening ist die gebräuchlichste Methode zur Identifizierung geeigneter Enzymvarianten. Einzeltransformationen wachsen in den Mikrotiterplatten, die als Duplikat separat gelagert werden. Nach Zellyse können die Varianten einer Platte untersucht werden. Dazu werden sie meist in weitere Platten mit Substrat überführt und ebenfalls über kolorimetrische Assaymethoden analysiert. Die Produktbildung kann auch über Antikörper visualisiert sowie mit Chromatographie oder Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Mikrotiterplatten eignen sich hervorragend für verschiedenste Analysemethoden, sind in der Kapazität aber auf etwa 10^4 Varianten pro Tag begrenzt.^[207-208] Eine gewisse Steigerung ist durch das Erweitern des Plattenformats von 96-well auf 384-, 1536- oder 3456-well möglich.

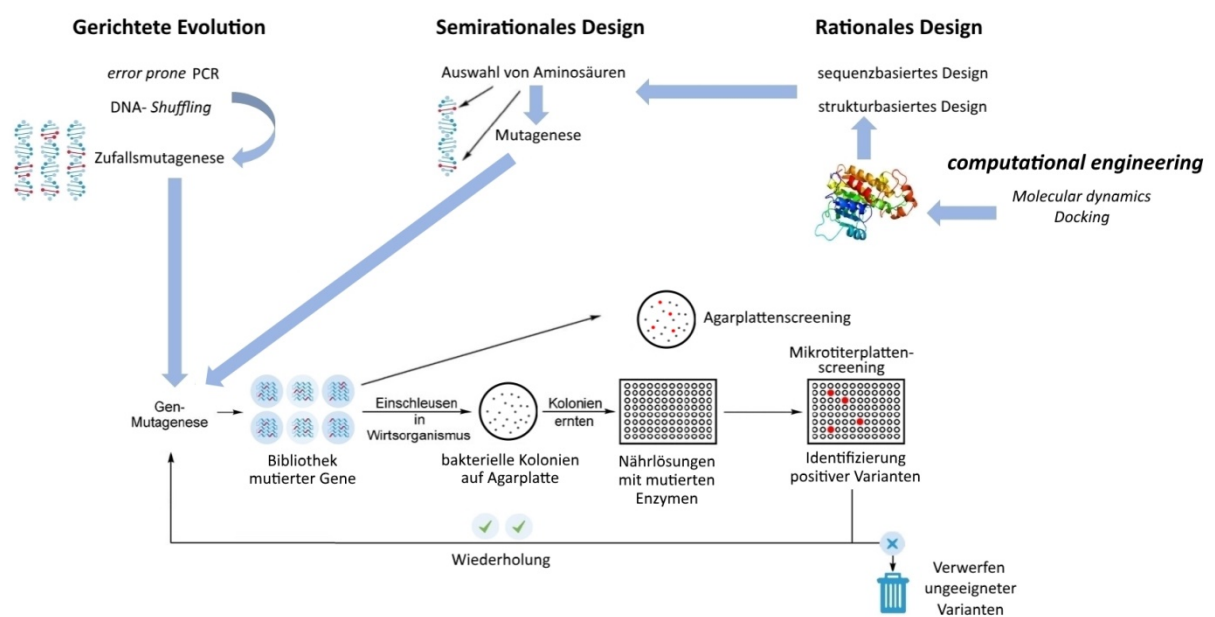


Abb. 14. Übersicht zu Methoden des *Protein engineering* und *Screening*.

Weitere Methoden sind Pico- und Femtoliterreaktoren-Mikrofluidik. Hierbei werden innerhalb winziger Tröpfchen (*Droplets*) in Wasser-Öl-Gemischen Substrate, Enzyme und Zellen zusammengehalten. Tröpfchen, in denen Reaktionen positiv ablaufen, können dann z. B. mittels Fluoreszenz sortiert (*fluorescence-activated cell sorting system*, FACS) werden. Auch einzelne Zellen lassen sich als Mikroreaktoren betrachten und mit Hilfe des FACS selektieren.^[207]

In vitro-Selektion ermöglicht die Selektion von Genbibliotheken (einfache lineare PCR-Produkte) mit einer geeigneten Transkriptions-/Translationsmischung in einer Ölemulsion. Die codierten Proteine innerhalb der *Droplets* können dann durch weitere Methoden selektiert werden.^[207]

1. Einleitung

Die Anforderungen an eine Screeningmethode sind daher, dass sie ausreichend sensitiv ist, reproduzierbar und stabil läuft, akkurat positive und negative *hits* differenziert und ökonomisch sinnvoll ist.^[208] Für die Visualisierung gibt es unzählige direkte oder indirekte Methoden. Bekannte Beispiele sind die Zugabe von pH-Indikator, die Einbeziehung eines Cofaktors wie NAD(P)H, fluoreszenzmarkierte Substrate, Fluoreszenzquenching durch Protonen oder der Einsatz von Enzymkaskaden.^[208]

2. Zielsetzung

Glycokonjugate, die terminale Sialinsäuren enthalten, sind omnipräsent in tierischen Glycanen wie Glycoproteinen und Glycolipiden und auf der äußersten Schicht der Zelloberfläche zu finden. Die häufigste Form der Sialinsäure ist *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), der aufgrund ihrer exponierten Position an den nicht-reduzierenden Enden oder Zweigen der Glycane eine außergewöhnliche Bedeutung für die Steuerung von biologischen Prozessen zukommt. Die strukturelle Komplexität natürlicher Neu5Ac wird durch eine außergewöhnliche Diversität an bekannten Derivaten verstärkt, welche durch *N*- oder *O*-Modifikation wie Acetylierung, Methylierung, Lactoylierung, Phosphorylierung, Sulfatierung sowie intramolekulare Lactam- oder Lactonbildung generiert wird.^[60-63] Diese Komplexität ist direkt mit zahlreichen biologischen Erkennungs- und Steuerungsprozessen assoziiert wie interzellulärer Kommunikation, Entzündungen und Immunantworten, Zell-Zell-Adhäsion, Blutgerinnung oder Organentwicklung.^[73, 84, 209] Auf der anderen Seite können Sialokonjugate als Andockstation für Viruspartikel dienen oder als biologische Maske für pathogene Bakterien fungieren, die sialinsäurehaltige Oligosaccharide produzieren, um sich vor dem Immunsystem des Wirts zu schützen.^[174, 210] Ähnliche Mechanismen werden von verschiedenen Krebszellen genutzt, die sich durch starke Übersialylierung gegen die humorale und zelluläre Immunantwort schützen.^[211]

Die Erkennung von Sialinsäuren durch Siglecs vermittelt die regulatorische Funktion des Immunsystems. Das eröffnet Möglichkeiten für innovative therapeutische Strategien gegen eine Vielzahl an Autoimmun-Fehlsteuerungen oder Krebs.^[173-174, 177-178] Die Identifizierung und Synthese hochaffiner Sialosidliganden, welche die natürlichen Siglecliganden verdrängen können, ist ein hochaktuelles Thema Immunzellen-adressierter Therapiestrategien.^[175, 212]

Andere attraktive Ziele für pharmazeutische Entwicklungen sind virale und bakterielle Sialidasen, die die Abspaltung terminaler Sialinsäurereste katalysieren. Als Substrate dieser maßgeblichen Enzyme, die pathogenen Bakterien als Sialinsäurequelle dienen und die Kolonisierung und Infektion des Wirts vereinfachen, sind Sialinsäuren und -konjugate potentielle Inhibitoren und somit potentielle antimikrobielle Therapeutika.

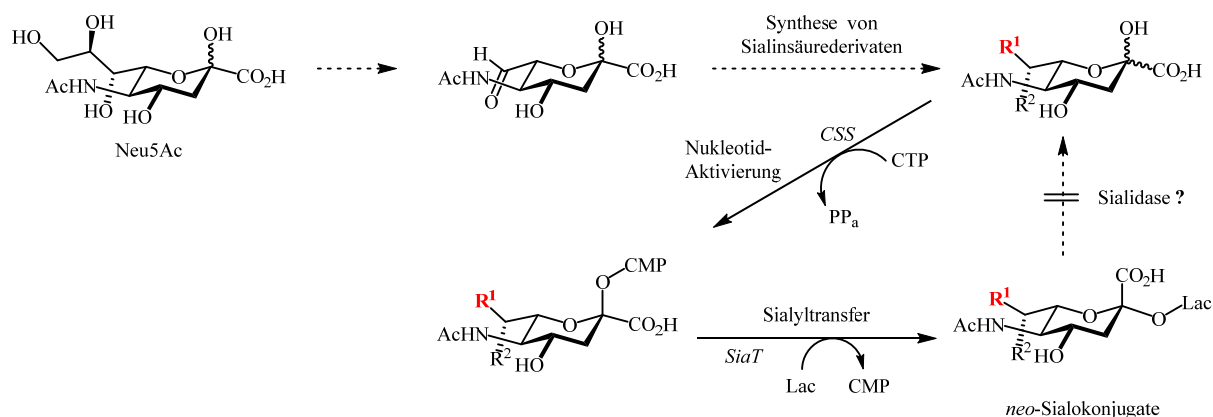
Das Ziel dieser Arbeit war daher zum einen die Synthese einer ganzen Reihe von bisher unbekanntem Derivaten der Neu5Ac als neuartige Sonden, zum anderen sollte die Akzeptanz dieser Substrate von Enzymen des Leloir-Biosynthesewegs evaluiert werden. Die produzierten *neo*-Sialokonjugate als Ergebnis dieser chemoenzymatischen Synthesen sollten ihrerseits an bakteriellen Sialidasen auf Substratspezifität getestet werden.

Synthesen von Sialinsäurestrukturen mit strukturellen Variationen der Positionen C4, C5 und C9 wurden bereits erfolgreich chemoenzymatisch umgesetzt^[115] und beispielsweise zur Diskriminierung von Sialoadhesin (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3) oder Myelin-assoziiertem Glycoprotein (MAG, Siglec-4) genutzt.^[176, 179-182] Auch einfache funktionelle

2. Zielsetzung

Modifikationen wie Acylierung, Sulfatierung oder Methylierung an 7-, 8- oder 9-*O* der terminalen Neu5Ac-Kohlenstoffkette sind bekannt.^[62, 181] Da der chemoenzymatische Zugang zu Variationen des terminalen Kohlenstoffrückgrats jedoch begrenzt ist, war für die vorliegende Arbeit ein neuartiger semisynthetischer Ansatz geplant. Dieser sollte, ausgehend von natürlicher Neu5Ac über eine Spaltung des C7-C9-Rückgrats und darauffolgende Einführung nicht natürlicher Struktur motive, eine Synthese von chemoenzymatisch nicht zugänglichen Derivaten und Analoga ermöglichen. Bekannte Sialidaseinhibitoren wie Zanamivir oder Oseltamivir, deren Grundstruktur auf Neu5Ac basiert und die nicht-natürliche Motive tragen, sind als antivirale und antibakterielle Wirkstoffe im Einsatz und versprechen ein großes Potential der geplanten Derivate.

Als Ausgangspunkt der Synthese sollte nach Verkürzung des Rückgrats der bekannte C7-Aldehyd von Neu5Ac (Schema 10) dienen. Ein Aldehyd bietet als Startpunkt vielfältige Möglichkeiten für eine Funktionalisierung, so u. a. durch Carboligation zur Kettenverlängerung, Reduktion, Aminierung oder Oxidation zur Carbonsäure mit nachfolgender Amidbildung.



Schema 10. Geplante Synthese von Sialinsäurederivaten mit folgender Nukleotidaktivierung, Sialyltransfer und anschließendem Test auf Neuraminidaseaktivität.

Die Cytidinmonophosphat-Sialat-Synthetase (CSS) dient im ersten Schritt des Leloir-Biosynthesewegs zur Aktivierung der Sialinsäure. Anschließend kann das Nukleotid-aktivierte Derivat mittels einer Sialyltransferase (SiaT) auf einen geeigneten Akzeptor (z. B. Lactose) übertragen werden.

Erfolgreich synthetisierte Derivate sollten daher mittels eines pH-sensitiven Assays kinetisch auf Toleranz durch die CSS untersucht und eingeordnet werden. Hierfür wurde die CSS aus *Neisseria meningitidis* ausgewählt, da sie eine außergewöhnliche Substrattoleranz aufweist. Im Weiteren sollten ausgewählte Derivate mittels SiaT auf Lactose übertragen werden, um verschiedene *neo*-Sialokonjugate des korrespondierenden natürlichen G_{M3} -Trisaccharids zu

erzeugen. Diese können nachfolgend zur Untersuchung auf Resistenz gegen Neuraminidaseaktivität bakterieller Sialidasen genutzt werden. Zur Untersuchung der Neuraminidaseaktivität war die Entwicklung eines geeigneten Assays notwendig.

Für ein tiefgreifendes Verständnis der entscheidenden Rolle sialylierter Glycane in biologischen Systemen ist eine effiziente Synthese definierter Sialoglycokongulate als individuelle Sondenmoleküle entscheidend.^[115, 213-214] Im gleichen Maße benötigt die Modifikation von Biopharmazeutika effiziente Möglichkeiten für spezifische Glycokongulation. Die Sialylierung von Glycanen kann entweder enzymatisch oder chemisch durchgeführt werden, wobei die chemische Sialylierung aufgrund von sterischer Hinderung, stereoelektronischen Effekten und aufwändiger Schutzgruppenchemie^[215-217] als eine der herausforderndsten Glycosylierungsreaktionen betrachtet wird. Die direkte enzymatische Sialylierung mit Hilfe von Enzymen des Leloir-Biosynthesewegs stellt daher die bisher beste Methode dar, um aufwändige Mehrstufensynthesen zu vermeiden.^[218]

Mit der CSS aus *Neisseria meningitidis* stand für die Aktivierung der Sialinsäurederivate ein probates Enzym mit großer Effektivität und Substrattoleranz zur Verfügung. Für den Transfer der aktivierten Derivate auf Sialylakzeptoren gibt es viele Sialyltransferasen mit unterschiedlicher Spezifität. Häufig werden hierfür bakterielle Transferasen aus der GT80-Familie genutzt, da sie einfacher als humane SiaT zu handhaben sind. Ein Vertreter dieser Familie mit α 2,3-spezifischer Verknüpfung aus *Photobacterium phosphoreum* (α 2,3-SiaT_{p_{ph}}) ist für eine gute Substrattoleranz bekannt, jedoch wird die Effektivität des Transfers, wie auch bei anderen SiaT, durch Hydrolyseaktivität gemindert. In der vorliegenden Arbeit sollten daher die Substrat- und die Produkthydrolyse (Sialidaseaktivität) der α 2,3-SiaT_{p_{ph}} untersucht und eine Unterdrückung dieser Aktivitäten angestrebt werden.

Zur Umsetzung war die Erstellung eines geeigneten 3D-Modells geplant, um in Kombination mit einem Sequenzalignment verwandter SiaT alle Aminosäuren des reaktiven Zentrums, die an einem katalytischen Transfer beteiligt sein könnten, zu identifizieren. In einem Ansatz gelenkter Evolution sollten dann alle relevanten Aminosäurereste einer Sättigungsmutagenese unterzogen werden. Zur Analyse der entstehenden Varianten wurde ein optimierter Assay benötigt, der idealerweise ebenfalls auf der pH-Verschiebung während der Reaktion beruhen sollte. Die Entwicklung des pH-Assays, das Screening der Varianten und die detaillierte Ermittlung der kinetischen Daten aller optimierten Varianten sollte Aufschluss über Bindungsverhältnisse und mögliche Ursachen der Hydrolyse liefern. Zum Abschluss der Arbeiten sollte in einer zweiten Generation – durch Erzeugung von Kombinationsvarianten aus den zuvor identifizierten, verbesserten Varianten – evaluiert werden, ob sich die positiven Effekte und Eigenschaften vorteilhaft kombinieren lassen.

3. Allgemeiner Teil I:

Synthese und Evaluierung neuartiger Sialinsäurederivate

3.1. Einleitung

In Kapitel 1.2 wurde bereits ausführlich beschrieben, dass Sialinsäuren bei Säugern als äußerste Zuckerstrukturen der Membranen omnipräsenter Bestandteil von Glycoproteinen und Glycolipiden auf den Zelloberflächen sind. Die häufigste Sialinsäurestruktur ist dabei die 5-Acetamido-D-glycero-D-galacto-2-nonulosonsäure (*N*-Acetylneuraminsäure, Neu5Ac, **1**), während verwandte 9-desoxygenierte 5,7-Bisamido-Analoga wie Legionaminsäure **2** und ihr Diastereomer Pseudaminsäure **3** in pathogenen Bakterien zu finden sind (Abb. 15).^[219-220]

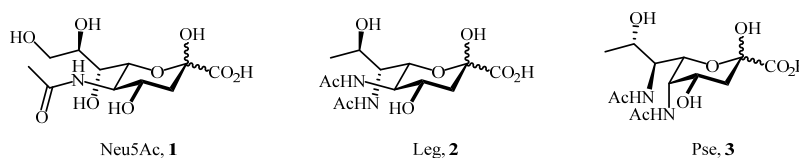


Abb. 15. Wichtige natürlich vorkommende Sialinsäurestrukturen.

Umfangreiche Variationen des natürlichen Neu5Ac-Motivs durch *N*- oder *O*-Modifikationen (siehe Abb. 10) erzeugen eine hohe strukturelle Diversität, woraus sich die Möglichkeit der Differenzierung einer Vielzahl spezifischer biologischer Erkennungsprozesse ergibt.^[60-63] Die unzähligen Funktionen von Sialokonjugaten in biologischen Erkennungsprozessen – als Andockmotiv für Viren, als biologische Maske pathogener Bakterien, als Erkennungsmotiv für Siglecs oder als Substrat viraler und bakterieller Sialidasen (oder Neuraminidasen) – machen Sialinsäuren zu höchst attraktiven Zielen für medizinisch-pharmazeutische Entwicklungen.^[221] Die Synthese neuartiger Sialinsäurederivate und Sialokonjugate als Substrate für spezifische Reaktionen und als Inhibitoren von Erkennungsmotiven ist somit unerlässlich bei der Erforschung ihrer Funktionen und der Entwicklung neuer Therapien.

3.2. Synthesestrategie zur Diversifizierung von Neu5Ac

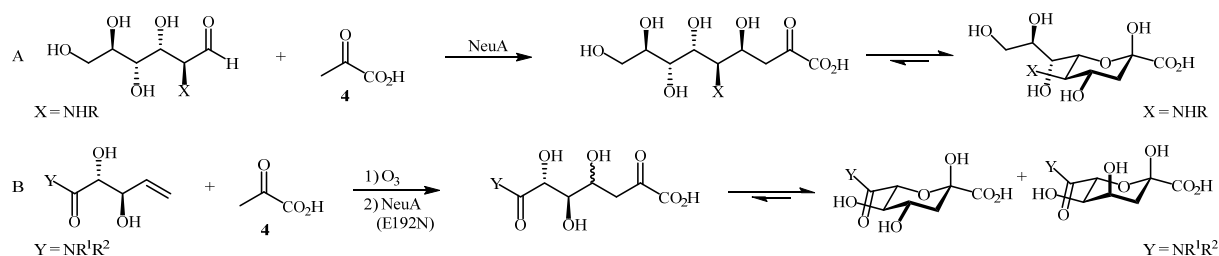
Die funktionelle Modifizierung der terminalen Kohlenstoffkette von Neu5Ac wie Acylierung, Sulfatierung oder Methylierung von 7-, 8- oder 9-*O* ist dafür bekannt, bemerkenswerte Effekte auf biologische Erkennungsprozesse, Regulation der Immunantwort, Apoptose und Tumorummunologie zu haben. In jüngerer Vergangenheit wurden einige Sialokonjugate hergestellt, welche funktionelle Modifizierungen der C7-, C8- und C9-Position trugen und Einfluss auf hochaffine Selectinbindung, Sialidaseresistenz oder virale Anheftung haben.^[179, 181, 212, 222]

Meist werden Sialinsäurederivate (chemo-)enzymatisch unter Verwendung von *N*-Acetylneuraminsäurealdolase (NeuA) durch Addition von Pyruvat (**4**) an (modifiziertes) *N*-Acetylmannosamin hergestellt (siehe Schema 11, A). Die Einführung von Substituenten in C5-Position ist mit diesem Ansatz relativ problemlos möglich und wurde vielfach gezeigt.

3. Allgemeiner Teil I

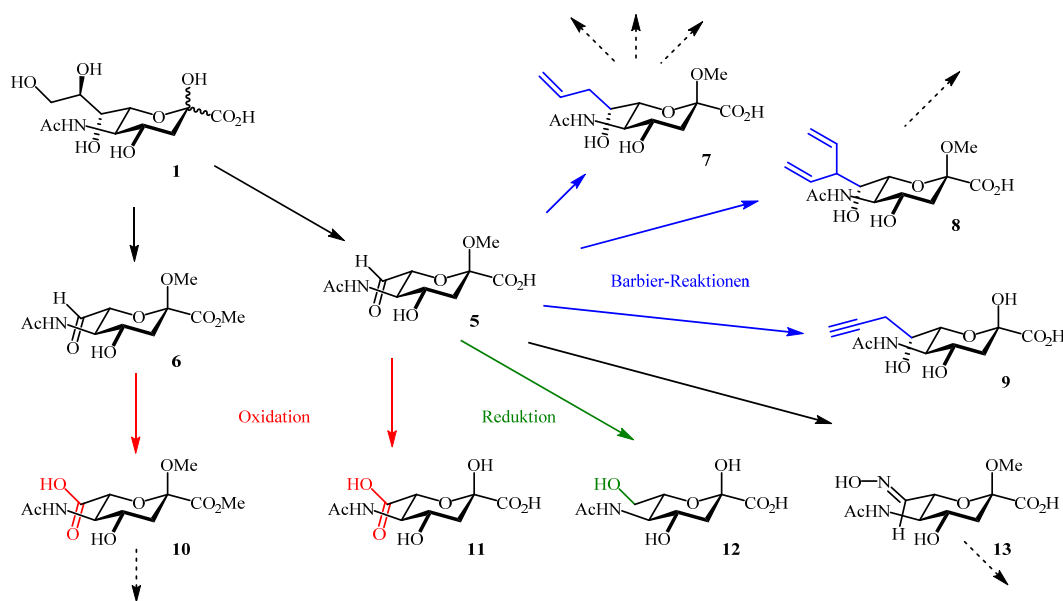
Die Einführung von Substituenten in die terminale Kohlenstoffkette ist hingegen deutlich komplexer. Da das eingeschränkte Substratspektrum von NeuA auf polyhydroxylierte Precursor mit einer Mindestgröße von Pentosen reduziert ist, ist die Möglichkeit der erzeugbaren Sialinsäurevarianten durch enzymatische *de novo*-Synthese erheblich limitiert.^[153]

Ansätze, Sialinsäurederivate mit Variationen ab der C7-Position über diesen Weg aufzubauen, beinhalteten aufwendiges *protein engineering* der NeuA und vorherige Synthese geeigneter Reaktanden (siehe Schema 11, B). Die Ausbeuten betragen lediglich zwischen 6 und 30% und lieferten zudem ein Epimerengemisch.^[153]



Schema 11. Chemoenzymatische Synthese von Sialinsäurederivaten unter Verwendung des Enzyms NeuA und Pyruvat (4). Die Einführung von Substituenten an C5-Position (X) ist bei der Verwendung von NeuA deutlich einfacher zu realisieren als die Verkürzung der polyhydroxylierten Kohlenstoffkette (Y).

Für die Synthese der Sialinsäurederivate in der vorliegenden Arbeit wurde ein komplementärer semisynthetischer Ansatz genutzt, der auf der Verkürzung der C7-C9-Kohlenstoffkette beruht. Nachfolgend wurden mit Hilfe stereoselektiver Kettenrekonstruktionen nicht-natürliche Funktionalitäten eingeführt oder verkürzte Derivate synthetisiert. Diese sind über die direkte Modifizierung funktioneller Gruppen natürlicher Neu5Ac nur sehr schwierig zugänglich oder wären sogar unerreichbar.



Schema 12. Synthesestrategie zur Derivatisierung der Neu5Ac.

Die Hauptsynthesestrategie sollte auf der Metall-vermittelten Addition allylischer Reagenzien an das verkürzte C7-Aldehyd (**5**) basieren, welche das Kohlenstoffrückgrat der Sialinsäure wiederherstellen sollte. Die hieraus resultierenden Homoallylalkohole sollten zahlreiche Optionen für nachfolgende chemo-, regio- und stereoselektive Modifizierungen eröffnen und somit potentiell Zugang zu Strukturmotiven verschaffen, die eine andere Polarität, einen anderen räumlichen Anspruch und andere funktionelle Diversität aufweisen (Schema 12). Der Vorteil solcher Barbier-artigen Additionen von Allylierungsreagenzien an Carbonylverbindungen ist die Durchführbarkeit in Wasser (und damit insbesondere bei Indiumreagenzien unter umweltfreundlichen Bedingungen), was eine Toleranz vieler funktioneller Gruppen und damit einhergehend den Verzicht auf Schutzgruppen ermöglicht, welche sonst in der Kohlenhydratchemie typischerweise notwendig sind.

Ausgehend von den C7-Aldehyden **5** und **6** (an Positionen 1/2, einfach oder doppelt geschützt) könnten zudem über Oxidation und Reduktion der Aldehydfunktion zugängliche Derivate erzeugt und weiter funktionalisiert werden.

3.3. Synthese des verkürzten C7-Sialinsäurealdehyd-Schlüsselintermediats

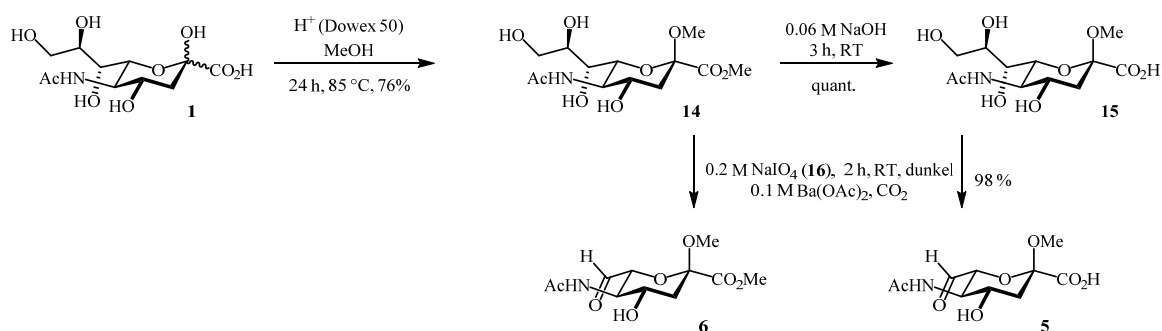
Der Grundbaustein zur Synthese der Sia-Derivate mit modifizierten Substituenten in C7-C9-Position ist das verkürzte C7-Aldehydmotiv (**5** und **6**). Zur Herstellung wurde kommerziell verfügbares Neu5Ac (**1**) genutzt. In einem ersten Schritt war es notwendig, ein Minimum an Schutzgruppen für die Substituenten des sensiblen anomeren Zentrums einzuführen, da damit nachfolgend einige Schwierigkeiten umgangen werden können. Durch die Schützung der anomeren Hydroxylgruppe über ein Methylglycosid wird eine Ringöffnung des Kohlenhydrats und somit die unerwünschte Freisetzung eines reaktiven Ketons an C2 verhindert. Ein weiterer positiver Nebeneffekt ist die Unterdrückung der Mutarotation, so dass durch Fixierung der Methoxygruppe in β -Position bei der NMR-analytischen Untersuchung nur ein Signalsatz in den Spektren zu sehen ist. Im selben Schritt wurde die Schützung der Carboxylfunktion ebenfalls über die Methoxygruppe zum Ester vollzogen. Für einen Großteil der Derivate wurde diese Schutzgruppe durch nachfolgende Verseifung wieder entfernt, da sie nicht nötig war. Für Synthesewege mit geplanter späterer Oxidation der Aldehydfunktion zur Carboxylgruppe sowie Amidkupplung wurde sie jedoch beibehalten, um eine doppelte Funktionalisierung und Nebenreaktionen zu vermeiden. Eine Vorschrift nach *Veronesi* diente als Vorlage und wurde entsprechend variiert.^[223] Die Ausbeute des Schützungsschritts konnte von literaturbekannten 51% auf 76% optimiert werden, indem das Sieden in Methanol mit katalytischer Säure unter Rückfluss in einer Soxhletapparatur durchgeführt wurde, welche mit trockenem Molsieb (3 Å) befüllt war. Zudem wurde der Ionenaustauscher (=katalytische Säure) in besonderer Vorbereitung so weit wie möglich von Wasser befreit (siehe Experimententeil 5.3.1). Der Kristallisationsprozess wurde dreimal bei -20°C mit einem Diethylether/Methanol-Gemisch unter Steigerung des unpolaren Anteils von anfänglich 3 : 1

3. Allgemeiner Teil I

auf 6:1 durchgeführt. Hierbei wird ausschließlich das Produkt mit β -ständiger Methoxygruppe (**14**) erhalten (Nachweis mittels NOESY, siehe Kapitel 3.4.3).

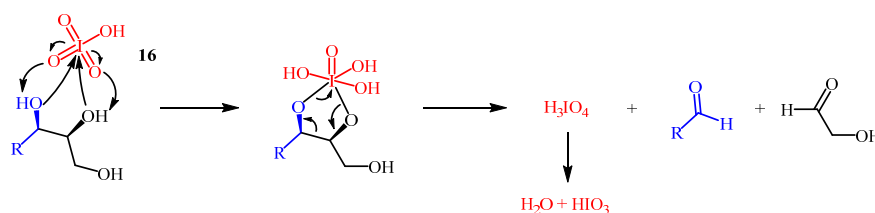
Die Isolierung mittels Säulenchromatographie liefert dagegen ein Gemisch aus α - und β -Glycosiden. Bei der nachfolgenden Esterverseifung konnte quantitativer Umsatz erreicht werden (**15**, Schema 13).

Da die anomere Position nunmehr geschützt und die Ringöffnung unterdrückt ist, wird eine vollständige Diolsplaltung zwischen C8 und C7 bzw. C9 möglich, ohne dass eine Spaltung zwischen C7 und C6 auftritt.



Schema 13. Synthese des C7-Aldehydprecursors **5** durch oxidative Spaltung von **15** an C7-C8.

Zur Diolsplaltung wurde die Malaprade-Reaktion unter Verwendung von Natriummetaperiodat (NaIO_4 , **16**) eingesetzt. Der Mechanismus ist nicht vollständig geklärt, jedoch wird angenommen, dass die oxidative Spaltung über einen zyklischen Periodsäurediester mit darauf folgender Freisetzung von Wasser und Iodsäure analog zur Glycolspaltung mit Bleitetraacetat abläuft (Schema 14).^[224]

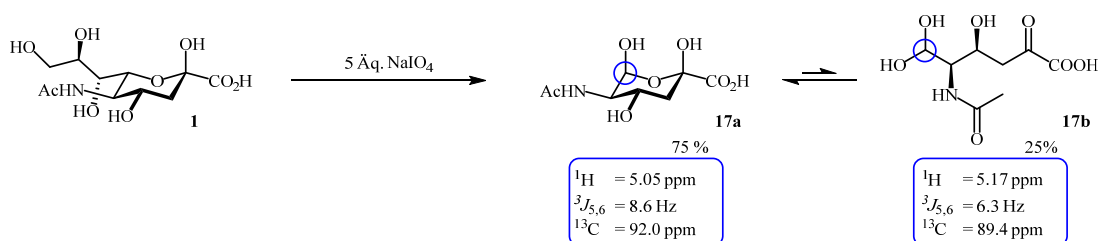


Schema 14. Wahrscheinlicher Mechanismus der Malaprade-Reaktion über einen fünf-gliedrigen zyklischen Periodsäureester.

Da mit äquimolaren Mengen an Oxidationsmittel bevorzugt der C8-Aldehyd durch Spaltung des terminalen Diols entsteht, wurde die gewünschte oxidative Spaltung zwischen C7 und C8 mit einem Überschuss von 5.3 Äquivalenten NaIO_4 (**16**) in 98 % Ausbeute durchgeführt.^[223] Zur Entfernung der Iodid- und Iodatsalze wurde Bariumacetatlösung verwendet. Nachfolgend wurde CO_2 eingeleitet, um überschüssiges Ba^{2+} zu entfernen. Die vollständige Entfernung der Salze war allerdings nur durch Säulenchromatographie möglich.

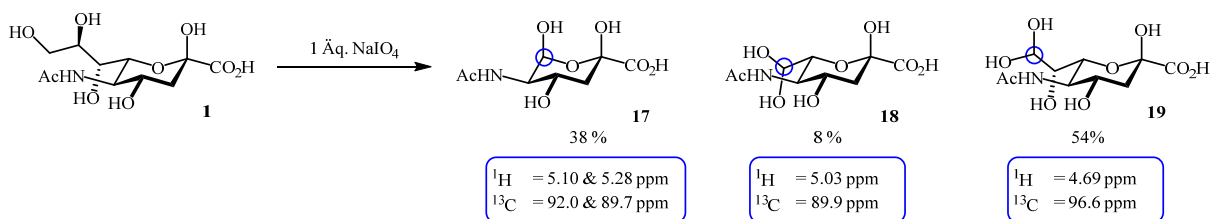
3.3.1. Weitere Produkte durch Diolsplaltung

Um das C7-Aldehyd **5** aus geschütztem Neu5Ac zu erhalten, wurde erfolgreich mit 5 Äquivalenten NaIO_4 gearbeitet. Da Neu5Ac in wässriger Lösung im Gleichgewicht von ringgeschlossenem Halbacetal sowie offenem Aldehyd vorliegt, wurde zusätzlich getestet, welche Produkte bei einer Diolsplaltung ohne Verwendung von Schutzgruppen zu beobachten sind. Ebenfalls mit 5 Äquivalenten NaIO_4 kam es erwartungsgemäß auch zu einer Spaltung zwischen C6 und C7. Aus der Analyse des NMR-Spektrums in D_2O ergab sich, dass hierbei zu ca. 75% die geschlossene Ringstruktur **17a** und zu ca. 25% die offene Struktur **17b** vorliegen (Schema 15). Die offene Struktur wurde in D_2O in Form des Hydrats identifiziert. Für die Ringstruktur lässt eine $^3J_{5,6}$ -Kopplung von 8.6 Hz eher eine axiale Positionierung der OH-Gruppe vermuten.



Schema 15. Beobachtete Reaktionsprodukte nach Spaltung ungeschützter Neu5Ac mit 5 Äquivalenten NaIO_4 .

Durch Reduzierung auf ein Äquivalent NaIO_4 wurde überprüft, ob eine gezielte Synthese des C7- (**18**) oder C8-Aldehyds (**19**) durch Steuerung der Menge an Periodat möglich ist. Im NMR wurde eine Mischung aus allen drei Spaltprodukten gefunden (Schema 16). Der Spaltungsmechanismus scheint zwar mit 54% beobachtetem C8-Hydrat bevorzugt am terminalen Ende stattzufinden, jedoch gleichzeitig parallel auch an den anderen Positionen abzulaufen.



Schema 16. Beobachtetes Gemisch nach Spaltung ungeschützter Neu5Ac mit nur 1 Äquivalent NaIO_4 .

Durch Vorliegen der Spaltprodukte als Hydrat oder Aldehyd und zusätzlich als offene oder ringförmig geschlossene Struktur (vor allem beim C6-Produkt) ergibt sich in der Dünnschichtchromatographie ein untrennbares Gemisch. Eine Trennung per Silica-Chromatographie ist ohne Verwendung weiterer Schutzgruppen nicht möglich. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt, zumal vom gewünschten C7-Aldehyd (**18**) in der Mischung mit 8% am wenigsten Material vorlag. Ausgehend von geschütztem Neu5Ac ist eine Isolierung des C8-Aldehyds bekannt.^[225]

3.4. Sialinsäurederivate durch Indium-vermittelte Barbier-Reaktionen

3.4.1. Grundlagen

Zwei große Herausforderungen bei der Synthese von Kohlenhydraten sind die Schutzgruppenchemie bzw. deren Vermeidung und die hohe Polarität der Verbindungen, welche die Bandbreite verwendbarer Lösemittel deutlich einschränkt. Möchte man nun außerdem Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungsknüpfungen realisieren, die an sich bereits eine große stereochemische Herausforderung für Chemiker sind, braucht es sehr spezielle Reaktionen.

Die Entwicklung von metallorganischen Verbindungen zur C-C-Bindungsknüpfung geht auf die Synthese des Diethylzinks durch *Frankland* im Jahre 1849 zurück.^[226] Seit dieser Zeit sind viele Additionsreaktionen unter Anwendung metallorganischer Nucleophile entwickelt worden, dazu zählen u. a. die Reaktionen von *Reformatski*,^[227] *Barbier*,^[228] *Grignard*^[229] und *Gilman*.^[230] Die wahrscheinlich bekannteste dieser Reaktionen ist die Grignard-Reaktion mit Allylmagnesiumbromid. Der entscheidende Nachteil der Mehrheit der eingesetzten metallorganischen Verbindungen ist ihre extreme Hydrolyseempfindlichkeit, welche den Einsatz von aprotischen Lösemitteln notwendig macht und daher in der Kohlenhydratchemie zwangsweise den Einsatz von Schutzgruppen nach sich zieht.

Um dies zu vermeiden und Reaktionen zur C-C-Verknüpfung direkt in protischen, polaren Solventien durchführen zu können, wurde die Verwendung „weicher“ Metalle (im Sinne des HSAB-Prinzips) wie Zink, Zinn, Bismut, Indium, Cadmium oder Blei vorangetrieben und erforscht. Hydrolyse der aktiven Reagenzien nach Angriff durch „hartes“ Wasser ist bei diesen Metallen deutlich reduziert.^[231] Den Grundstein dafür legte *Wolinsky* 1977 mit der erfolgreichen Allylierung einer Carbonylverbindung im protischen Milieu (95% Ethanol) durch Zink und Allylbromid.^[232] Wird wie bei *Wolinsky* das metallorganische Reagenz *in situ* generiert und verbraucht, handelt sich formal um eine Barbier-Reaktion, erfolgt dies stufenweise mit zwischenzeitlicher Isolierung des metallorganischen Reagenz, handelt es sich um eine Grignard-Reaktion.

Um die passivierende Oxidschicht von der Metalloberfläche abzulösen, damit genügend reaktive Zentren zur Verfügung stehen und um eine zusätzliche Aktivierung zu erreichen, werden in der Regel saure Bedingungen (Zusatz von HCl, HBr oder NH₄Cl), erhöhte Temperatur und/oder Ultraschall eingesetzt.^[231, 233] Gerade beim Einsatz von Magnesium, Zink oder Zinn ist dies unerlässlich, um gute Reaktionsgeschwindigkeiten und Ausbeuten zu erzielen.^[231] Der Einsatz von Säure führt zudem zu einer verbesserten Stereoselektivität.^[142] Indium weist im Vergleich zu anderen Metallen einige Eigenschaften auf, die es besonders attraktiv beim Einsatz in Wasser oder sogar basischen Lösungen macht.^[234] Es besitzt im Gegensatz zu Magnesium (-2.356 V) und Zink (-0.763 V) mit -0.338 V ein sehr niedriges Reduktionspotential,^[235] so dass Nebenprodukte wie Alkohole, die durch Reduktion der Carbonylverbindungen entstehen, vermieden werden. Dies macht Indium zu einem sehr selektiven Reagenz.^[234] Gleichzeitig stellten *Li* und *Chan* in den 1990er Jahren jedoch fest,

dass Indium-vermittelte Barbier-Reaktionen oft keiner weiteren Aktivierung bedürfen. Mit einem *single electron transfer* (SET)-Mechanismus kann dieser scheinbare Widerspruch erklärt werden, da SET-Reaktionen von einem niedrigen ersten Ionisierungspotential des Indiums profitieren würden (siehe Tabelle 2).

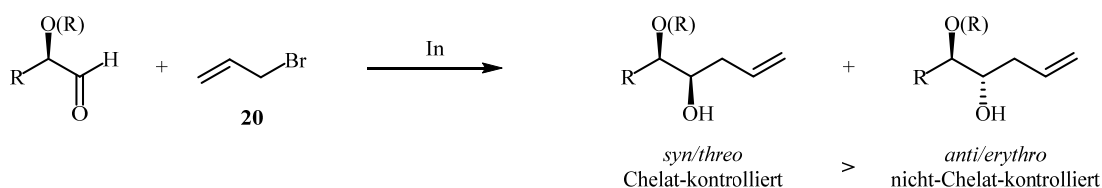
Tabelle 2. Ionisierungspotentiale gebräuchlicher Metalle für Barbier-Reaktionen in [eV].^[234]

Metall	I	II	III
Indium	5.79	18.86	28.03
Aluminium	5.98	18.82	28.44
Magnesium	7.65	15.04	80.14
Zink	9.39	17.96	39.70
Zinn	7.34	14.63	30.49

Der problemlose Einsatz in siedendem Wasser und in Laugen, Inertheit gegen Oxidbildung an Luft,^[234] Toleranz gegenüber Ester-, Carboxy- und Amidgruppen^[236] sowie keine bekannte Toxizität bieten viele reaktionsbedingte, aber auch ökologische und ökonomische Vorteile gegenüber anderen Metallen und rechtfertigen damit auch höhere Kosten für den Einsatz von Indium.

Indium bietet somit einige Vorteile, die gerade in der Kohlenhydratchemie genutzt werden können.^[237-240] Dies zeigt die Synthese sehr prominenter Beispiele komplexer Kohlenhydrate, wie die Synthese der Sialinsäuren Neu5Ac, KDN^[142] oder KDO.^[241-244] Hierbei dienten D-Mannose, *N*-Acetyl-D-mannosamin und D-Arabinose als Ausgangsmaterial, die Verlängerung der Carbonylverbindungen fand jeweils mit 2-(Brommethyl)acrylsäure (oder entsprechenden Estern) statt.

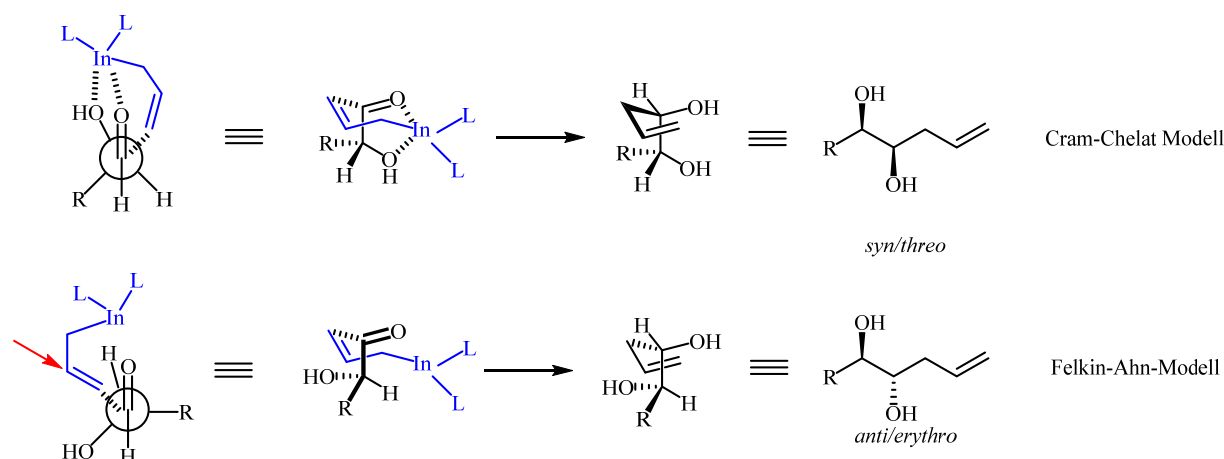
Im Zuge der Barbier-Reaktion an Aldehyden wird ein neues chirales Zentrum generiert, welches entweder *threo* (*syn*) oder *erythro* (*anti*) konfiguriert sein kann (Schema 17). Die Diastereoselektivität hängt hierbei von zwei Faktoren ab. Zum einen nimmt der Substituent der Allylhalogenverbindung und zum anderen der Substituent an der Aldehydverbindung entscheidenden Einfluss auf die Konfiguration.^[245-247] Neben dem sterischen Anspruch von Substituenten im Aldehyd kommt es vor allem auf mögliche Chelat-induzierende Substituenten in α -Position zur C=O-Gruppe an. *Paquette* konnte zeigen, dass Chelat-bildende Substituenten mehrheitlich zum *syn*-Diastereomer führen.^[248-249]



Schema 17. Indium-vermittelte asymmetrische Allylierung von α -oxygenierten Aldehyden.

3. Allgemeiner Teil I

Nach dem Cram-Chelat-Modell ist die Hydroxylgruppe durch Chelatisierung über das Metallion fixiert, während das Nukleophil von der sterisch weniger gehinderten Seite angreift.^[250] Ist keine Chelatisierung möglich, kann das Felkin-Anh-Modell^[251] zur Vorhersage der Stereochemie genutzt werden. Hierbei ist der größte Substituent im 90°-Winkel zur Carbonylgruppe ausgerichtet. Das Nukleophil greift nun über die Bürgi-Dunitz-Trajektorie in einem Winkel von etwa 107° an (siehe Schema 18, roter Pfeil).^[247] Dieser Angriff erfolgt über den kleinsten Substituenten (hier H).

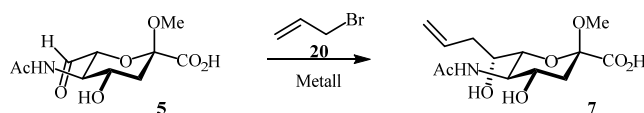


Schema 18. Diastereoselektive Angriffsmöglichkeiten auf die Carbonylfunktion nach dem Cram-Chelat-Modell bzw. nach dem Felkin-Anh-Modell.

Die Meinungen, welche Indiumspezies in Wasser während einer Barbier-Reaktion tatsächlich vorliegt, gehen auseinander und werden kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Argumente für In(I)- wie auch für In(III)-Oxidationszustände.^[252-253] Es existieren auch Vorschläge, die die Koordination mehrerer Allylreste an ein Indiumzentrum propagieren. Diese Unklarheiten in Kombination mit den vielfältigen Substitutionsmustern in den eingesetzten Aldehydverbindungen, die für Chelatisierungseffekte oder sterische Hinderung sorgen können, machen die Vorhersage der Diastereoselektivität komplex. Eine Überprüfung über 2D-NMR-Spektroskopie ist somit erforderlich. Hierbei geeignete Methoden für eindeutige Aussagen zu finden, ist ebenfalls nicht trivial.^[248]

3.4.2. Ergebnisse

Zur Umsetzung des C7-Aldehyds **5** in Barbier-Reaktionen wurden drei komplementäre allylische Bromidreagenzien verwendet, um ein Allyl-, Propargyl und Pentadienylmotiv einzuführen. Nach ausführlicher Recherche wurde ein THF-Wassergemisch eingesetzt, da in Gemischen aus THF/Wasser von 2:1 bis 0:1 für Reaktionen mit Kohlenhydraten eine gute Ausbeute und in vielen Fällen ein großer Überschuss eines Stereoisomers beschrieben wurden.^[236, 240, 254-256] Da Allylbromid (**20**) in Wasser sehr schlecht löslich ist, bedarf es einer unpolaren (THF-) Komponente. Zur Erprobung der optimalen Bedingungen wurde hauptsächlich die Allylierung untersucht und die besten Ergebnisse dann auf weitere homologe Reaktionen übertragen (Schema 19).



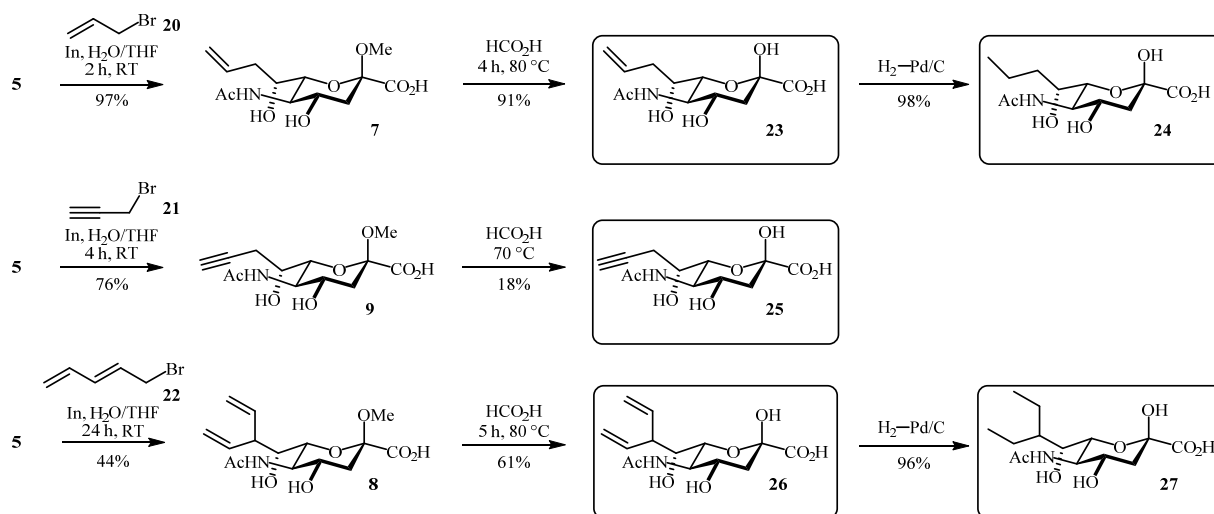
Schema 19. Allylierung des C7-Aldehyds **5** mittels Allylbromid **20**.

Tabelle 3. Übersicht einer Auswahl an untersuchten Bedingungen zur Allylierung des Aldehyds **5**.

a) Quantifizierung per DC. b) Quantifizierung nach Isolierung durch Säulenchromatographie.

Metall	Lösemittel	Ultraschall	Temperatur	Dauer	Ausbeute
Zink	2 : 1 (THF/H ₂ O)	/	RT	48 h	/ ^a
Zink	1 : 1 (THF/H ₂ O)	/	RT	48 h	< 5 % ^a
Zink	1 : 1 (THF/NH ₄ Cl _{aq.} (3.5 M))	/	RT-40 °C	48 h	< 15 % ^a
Zink	1 : 1 (THF/NH ₄ Cl _{aq.} (3.5 M))	1 h	RT 40 °C	24 h 24 h	45 % ^b
Indium	1 : 1 (THF/H ₂ O)	1 h	RT	24 h	73 % ^b
Indium	1 : 1 (THF/H ₂ O)	1 h	40 °C	24 h	84 % ^b
Indium + InCl ₃	1 : 1 (THF/H ₂ O)	1 h	RT	2 h	97 % ^b

Die Reaktionsbedingungen mit einer Mischung aus THF/Wasser von 1:1, Aktivieren des Metalls durch anfängliche Ultraschallbehandlung und das Hinzufügen einer katalytischen Menge Indiumchlorid lieferten das beste Ergebnis (Tabelle 3). Das Hinzufügen von In(III) bewirkte ein schnelleres Starten und eine starke Beschleunigung der Reaktion. Die Bildung der Allylindiumkomponente ist bereits mit bloßem Auge durch Bildung silbern schimmernder Flocken zu erkennen. Mit Indiumchlorid konnten die Reaktionsbedingungen soweit optimiert werden, dass auch mit nicht aufgearbeitetem Rohprodukt des Aldehyds **5** nach 24 h exzellente Ausbeuten erzielt wurden (Schema 20).



Schema 20. Synthese von Sialinsäureanaloga durch auf Barbier-Reaktionen basierender Kettenverlängerung.

3. Allgemeiner Teil I

Bei unsubstituierten Allylmotiven erfolgt die Addition der generierten Allylindiumreagenzien an die Carbonylfunktion normalerweise S_N2'-artig exklusiv in γ -Position des Allylhalogens. Im Falle des Pentadienylreagenz (**22**) führt diese γ -Regioselektivität erwartungsgemäß zur Bildung eines verzweigten Motivs des nicht konjugierten Homoallylalkohols **26** als einzigem Produkt (siehe Abb. 16).

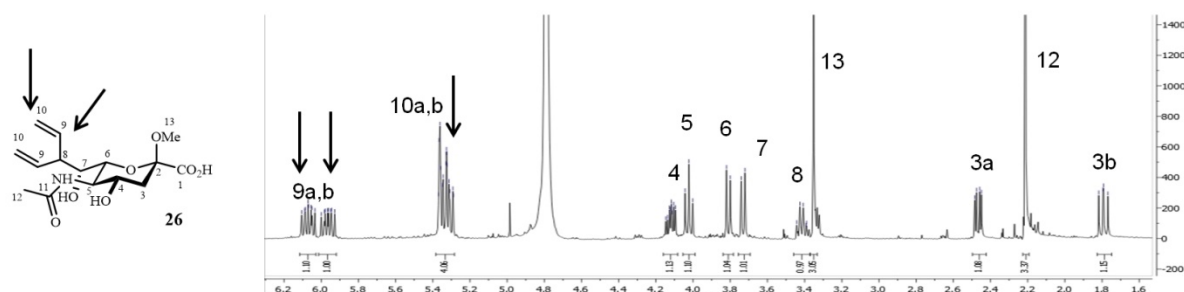


Abb. 16. ¹H-NMR-Spektrum des verzweigten Allylalkohols **26**. Charakteristischer Produktnachweis sind die Signale der symmetrischen CH- und CH₂-Gruppen 9 und 10 (markiert durch Pfeile).

Das benötigte Pentadienylbromid **22** wurde durch Reaktion des kommerziell erhältlichen Penta-1,4-dien-3-ols (**28**) in Diethylether mit Phosphortribromid (PBr₃) bei 0 °C hergestellt (Abb. 17).^[257]

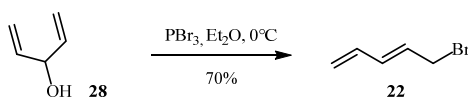


Abb. 17. Synthese von Pentadienylbromid.

Für das Propargylreagenz dient ein Gleichgewicht zwischen der Propargyl- und Allenylmetallspezies durch metallotrope Umlagerung als Erklärung für die ausschließliche Bildung des Homopropargylalkohols **9** als Produkt. Die Ausbeuten bei Verwendung von Allylbromid waren nahezu quantitativ (97%, **7**), bei Propargylbromid gut (75%, **9**) und bei dem sterisch anspruchsvollen Pentadienylbromid akzeptabel (44%, **8**) (Schema 20). Erste Versuche zur Umsetzung mit Propargyl- und Pentadienylbromid zeigten deutliche Schwierigkeiten beim Starten der Reaktion und jeweils deutlich verlängerte Reaktionszeiten von 5 bis 10 Tagen. Der Einsatz von Ultraschall und Indium(III)chlorid als zusätzliche katalytische Indiumspezies bewirkten eine drastische Verbesserung. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit zur Verkürzung der Reaktionszeit könnte die ausschließliche Verwendung von InCl₃ zur *in situ*-Erzeugung von Indium über Elektrolyse mittels Platinelektroden sein. Diese Methode führte in der Literatur sowohl für Zink als auch für Indium zu deutlich verkürzten Reaktionszeiten in THF.^[248, 258] Für einen technischen Maßstab wäre diese Methode ein vielversprechender Ansatz, um Ausbeuten und Reaktionszeiten zu optimieren. Gerade bei größeren Ansätzen (>0.4 g) wurden in eigenen Experimenten Schwierigkeiten beim Starten der Barbier-Reaktionen beobachtet.

Die Abspaltung der glycosidischen Methoxyschutzgruppen erfolgte durch Erhitzen in verdünnter Ameisensäure. Temperatur und Reaktionsdauer mussten individuell angepasst werden, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen. Eine ausführliche Diskussion zu den dabei auftretenden Schwierigkeiten bei den jeweiligen Derivaten findet sich in Kapitel 3.6.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Entfernung der Schutzgruppen wurde eine Hydrierung der ungesättigten Sialinsäuren **7** und **8** erst nach erfolgreicher Acetalhydrolyse durchgeführt (siehe Schema 20). Die Ausbeuten auf diesem Weg waren deutlich besser und ersparten eine wiederholte Entschützung. Somit konnten Verbindungen **23**, **24** und **25** aus Allylierung und Propargylierung in guten Ausbeuten gewonnen werden. Sie teilen ein C₁₀-Rückgrat, sind aber an den Positionen C8, C9 und C10 nicht hydroxyliert. Damit ist der räumliche Anspruch vergleichbar zu Neu5Ac, während die Polarität und Flexibilität durch die ungesättigten Seitenketten stark verringert sind.

Das Pentadienylanalogon **26** und die gesättigte Verbindung **27** weisen ein verzweigtes Motiv auf, welches in Polarität und Größe dem Motiv des bekannten antiviralen Wirkstoffes *Oseltamivir* (**29**) ähnelt (Abb. 18). Dieser kommt bei der Behandlung von Influenza erfolgreich zum Einsatz.^[259] Die korrespondierenden Derivate **26** und **27** sind daher aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit vielversprechende Kandidaten als potentielle Sialidaseinhibitoren. Diese inhibitorische Aktivität wird in Kapitel 3.11 im Detail erläutert.

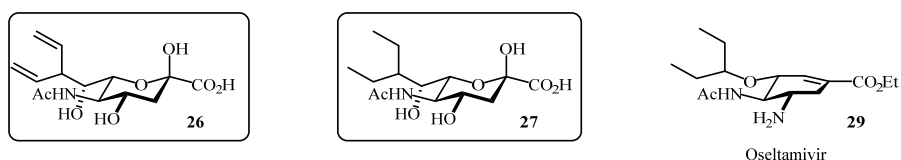


Abb. 18. Vergleich der Strukturverwandtschaft des verzweigten 3-Pentylmotivs zum Anti-Influenza-Wirkstoff *Oseltamivir*.

3.4.3. Aufklärung der Konfiguration

Wie in Kapitel 3.4.1 erläutert, entsteht bei der C-C-Bindungsknüpfung durch metallvermittelte Barbier-Reaktionen an Aldehyde ein neues Stereozentrum. Da es im vorliegenden Fall essentiell ist zu bestimmen, ob die Konfiguration der Sialinsäurederivate der des natürlichen Diastereomers entsprechen, war eine Untersuchung des neu generierten Stereozentrums an C7 nötig.

Unter den beschriebenen Bedingungen wurde in allen Indium-vermittelten Reaktionen jeweils ausschließlich ein einziges diastereomeres Produkt durch NMR-Analyse nachgewiesen. Aufgrund der rigiden Ringkonformation des Aldehyds **5** war ein hohes Level an Stereokontrolle zu erwarten. Generell sind zwei Modelle für die π -faciale Stereokontrolle in der Additionsreaktion diskutabel (Abb. 19): a) Ist die Carbonylfunktion des Aldehyds durch eine

3. Allgemeiner Teil I

intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zur benachbarten Amidgruppe vororientiert, sollte ein nukleophiler Angriff von der sterisch weniger gehinderten Seite unter Generierung des (*S*)-konfigurierten Carbinols erfolgen; b) Werden dagegen durch β -Chelatisierung des Indiumreagenz sowohl die Carbonylfunktion des Aldehyds als auch das Ringsauerstoffatom komplexiert, sollte ein Angriff von der entgegengesetzten π -facialen Seite unter Bildung des (*R*)-konfigurierten Carbinols erfolgen. Ein zusätzlicher Faktor zur Komplexbildung des Indiumreagenz ist der anomere Effekt, der durch das senkrecht stehende freie Elektronenpaar am axialen Sauerstoffatom die Komplexbildung unterstützt. Sogar in wässriger Lösung ist die Chelatbildung der dominierende Faktor für die π -faciale Stereokontrolle in azyklischen α -oxygenierten Aldehyden, welche mehrheitlich zu *syn*-Produkten führt.^[245-246, 249] Im vorliegenden Fall entspricht dies der absoluten (*R*)-Konfiguration.

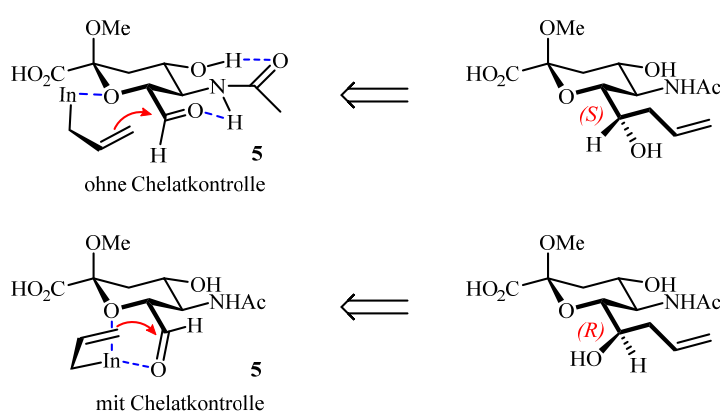


Abb. 19. π -Faciale Stereokontrolle für den Indium-vermittelten Allyltransfer auf Aldehyd **5**;
intramolekulare Carbonyl-Vororientierung *versus* reagenzbasierter Chelatisierungseffekt.

Für eine zweifelsfreie Bestimmung der C7-Konfiguration war eine starre vicinale Orientierung nötig, welche durch Bildung des 1,7-Lactons **31** erreicht werden sollte. Nach Sättigung/Hydrierung der Doppelbindung, um Eliminierungen zu vermeiden, wurde Benzyl-oxycarbonylchlorid (CbzCl, Chlorameisensäurebenzylester) zur chemoselektiven Aktivierung der Carboxylgruppe verwendet. Dieses milde Reagenz ist für Kohlenhydrate besonders geeignet, da es nicht mit sekundären Alkoholen reagiert.^[260-262] Bei einer (*R*)-Konfiguration an C7, wie sie unter Chelatkontrolle zu erwarten ist und natürlicherweise in Neu5Ac vorliegt, muss eine positive Wechselwirkung zwischen den räumlich nahen Protonen an C5 und C7 erkennbar sein (siehe Abb. 20), während ein fehlendes Signal nur ein Indiz auf eine (*S*)-Konfiguration wäre. Tatsächlich konnte nach erfolgreicher Synthese des bicyklischen Lactons **31** ein positiver Kreuzpeak zwischen den Protonensignalen von 5-H und 7-H im NOESY NMR-Experiment (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) nachgewiesen werden (Abb. 21). Über Wechselwirkungen zwischen koppelnden Kerndipolen, die direkt über den Raum übertragen werden, entsteht ein Magnetisierungstransfer über den Raum. Mit dem Nachweis dieses Kern-Overhauser-Effektes konnte die fixierte räumliche *syn*-Orientierung und somit die absolute (*R*)-Konfiguration im Produkt **7** zweifelsfrei bestätigt

werden. Der Vergleich der vicinalen Kopplungsmuster für 7- und 6/8-H bestätigte, dass in allen Produkten der Barbier-Reaktionen die identische Konfiguration durch konsistente Chelatisierung erzeugt wurde. Die Bestätigung der natürlichen Konfiguration in allen Derivaten ist essentiell, da hierdurch ein Vergleich zur natürlichen Neu5Ac erst möglich ist und die Analyse der Bindungsverhältnisse sinnvoll wird.

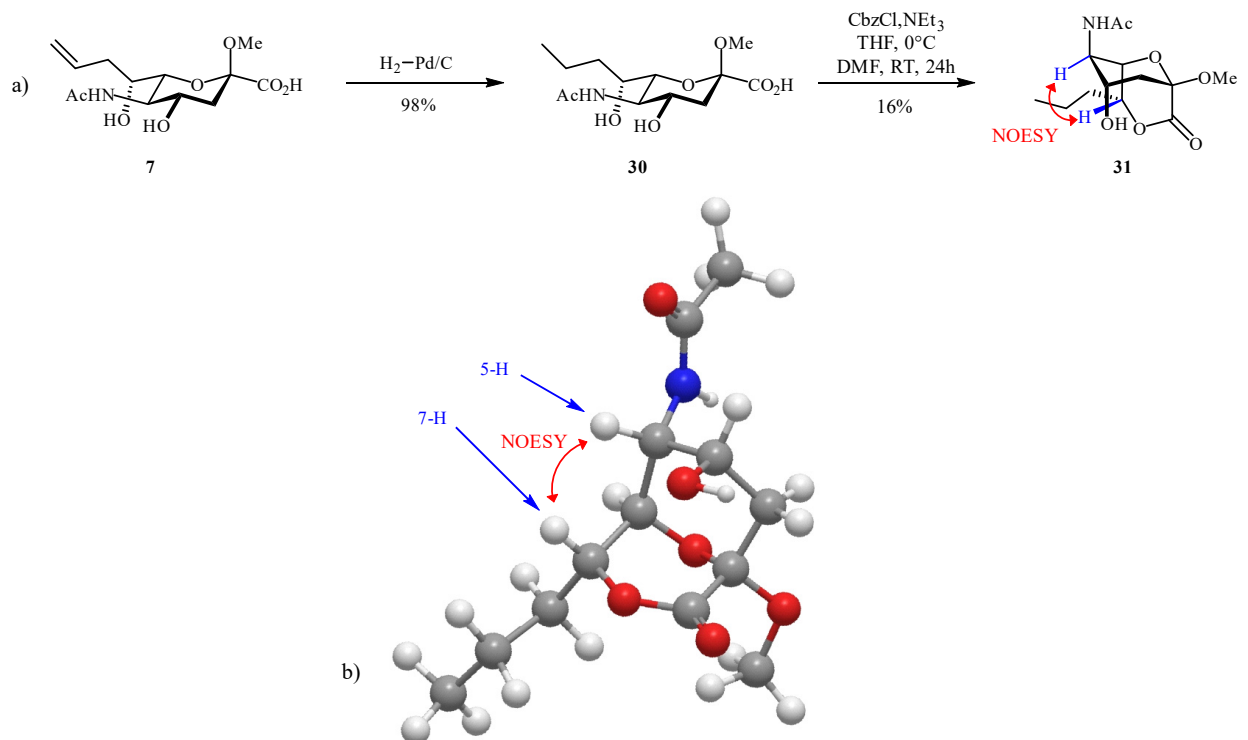


Abb. 20. a) Intramolekulare 1,7-Lactonbildung zur eindeutigen Konfigurationsbestimmung von **7**;
b) 3D-Modell des bicyclischen Lactons **31** (erzeugt mit *ChemBio3D Ultra* via Energieminimierung).

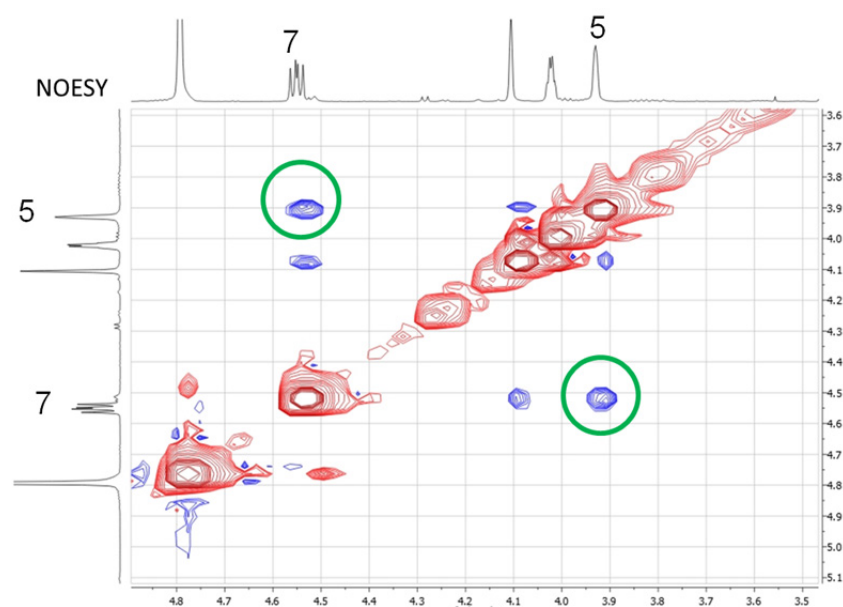


Abb. 21. NOESY-Spektrum des 1,7-Lactons **31** mit deutlichen Kreuzpeaks zwischen 5-H und 7-H zur zweifelsfreien Bestätigung der (*R*)-Konfiguration.

3. Allgemeiner Teil I

Interessanterweise wurde beim Versuch der Entschützung des anomeren Zentrums von **30** zur erwarteten freien Sialinsäure **32** eine intramolekulare 2,7-Transacetalbildung zu **33** als Nebenprodukt beobachtet. Die NOESY-Analyse der 2,7-Anhydrosialinsäure **33** bestätigte ebenfalls die (7*R*)-Konfiguration durch 5-H/7-H Kreuzpeaks (Abb. 22). Bemerkenswert an diesen 2,7-Anhydrosialinsäuren ist, dass Derivate mit spezifischen C5-N-Substitutionen selektive mikromolare Inhibitoren bestimmter bakterieller Sialidasen sind.^[263-264]

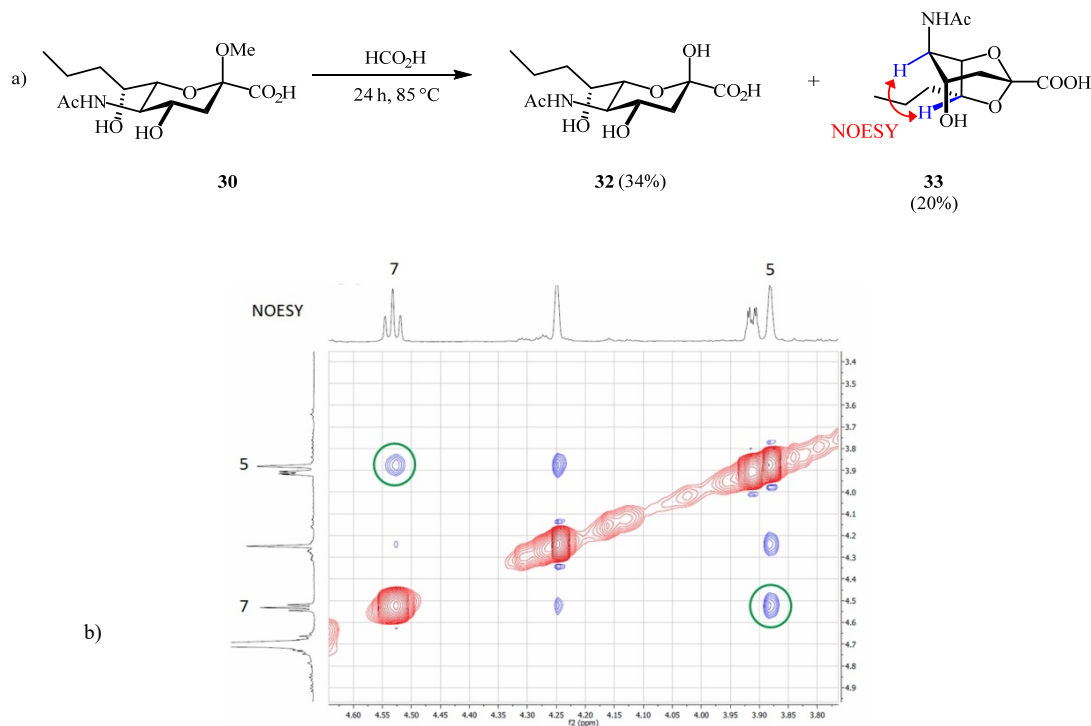


Abb. 22. a) Entschützung von **30** und unerwartete intramolekulare Acetalbildung zu **33**;
b) NOESY-Spektrum der 2,7-Anhydroverbindung bestätigt die (7*R*)-Konfiguration.

Die Aufnahme eines weiteren NOESY-Spektrums bestätigte für Verbindung **30** die axiale Fixierung der Methoxygruppe in 2-Position (Abb. 23), die nicht nur wegen des anomeren Effekts, sondern auch aufgrund der Kopplungsmuster in Aldehyd **5** bereits sehr stark vermutet wurde. Ein Kreuzpeak zwischen der Methoxygruppe und 6-H bestätigt dies zweifelsfrei.

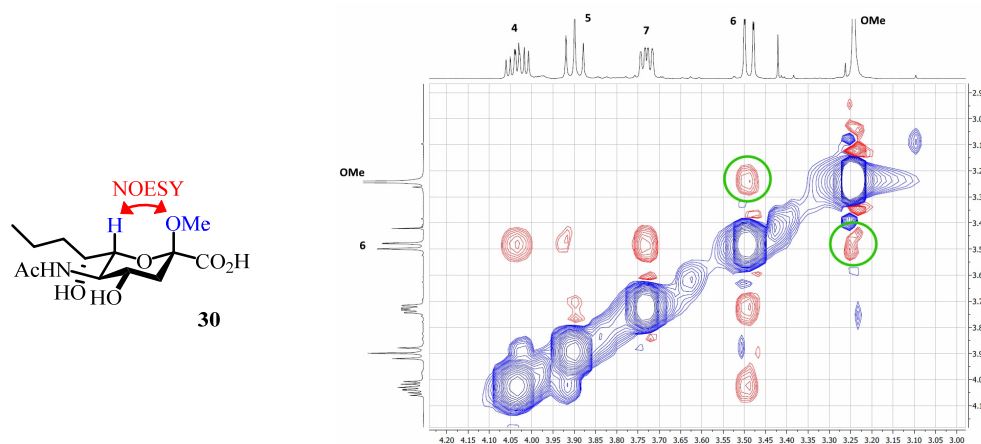
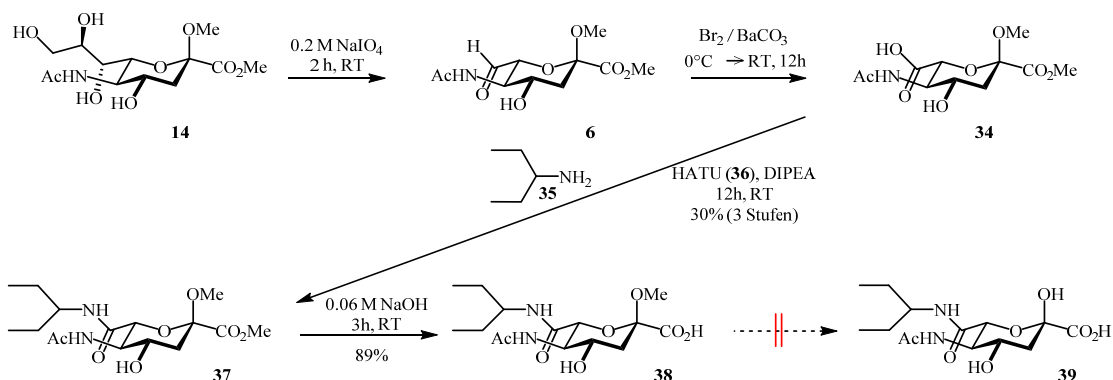


Abb. 23. NOESY-Spektrum von Verbindung **30** zur Bestätigung der axialen Methoxygruppe.

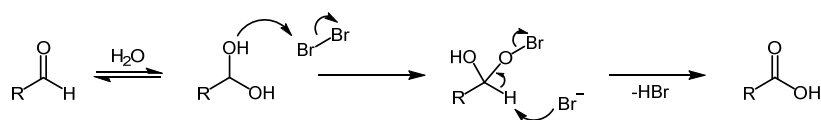
3.5. Sialinsäurederivate durch oxidativen Kettenabbau

Eine zweite Reihe von Sia-Analoga sollte mittels Oxidation des C7-Aldehyds zur korrespondierenden Säure eröffnet werden, da diese einfachen Zugang zu struktureller Diversifikation durch Amidbildung bietet (Schema 21). Da eine selektive Amidbildung nur mit vollständig geschützten C1-/C2-Positionen durchführbar ist, wurde mit dem entsprechenden C7-Aldehyd **6** begonnen.



Schema 21. Syntheseroute über C7-Carbonsäure (**34**) zu Amiden in C7-Position. Die vollständige Entfernung der anomeren Schutzgruppen von **38** war nicht erfolgreich.

Nach erfolglosen Versuchen, die 4-OH-Position als Benzylether zu schützen, um anschließend via Pinnickoxidation die Aldehydfunktion oxidieren zu können, wurde stattdessen eine hochchemoselektive Oxidationsreaktion verwendet, die keiner Schutzgruppenchemie bedarf.^[265-266] Die Oxidation mittels Brom und Bariumcarbonat als Base (siehe Schema 22) stellte sich als ausreichend selektiv für die Aldehydfunktion mit Erzielung exzellenter Ausbeute heraus (97% für **40**).

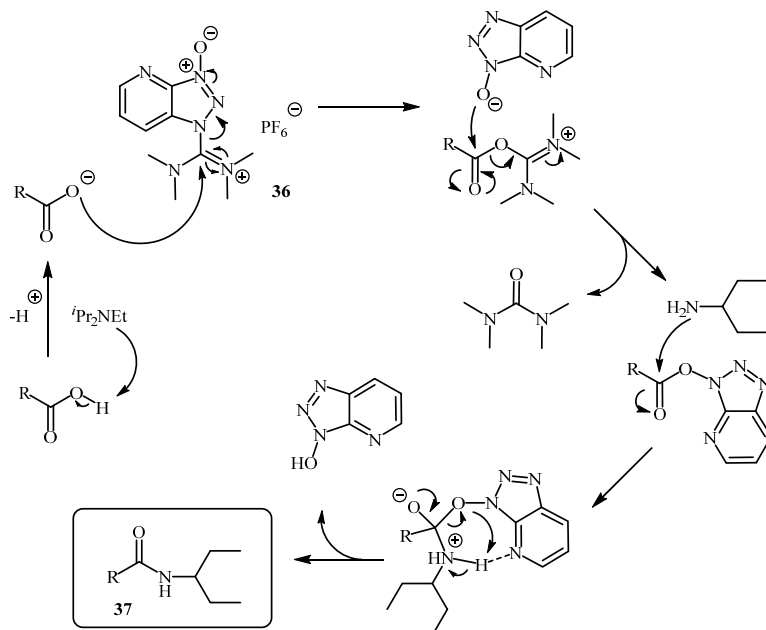


Schema 22. Selektive Oxidation einer Aldehydfunktion durch Brom.

Eine Amidkupplung mit 3-Pentylamin (**35**) unter Verwendung von DCC (*N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid) und HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) war zunächst nicht erfolgreich, so dass das noch reaktivere Azabenzotriazolderivat HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluorphosphat, **36**) verwendet wurde. Die hohe Reaktionsrate dieses Reagens ist auf einen 7-gliedrigen Übergangszustand zurückzuführen, in welchem das Stickstoffatom in 7-Position des Benzotriazols das angreifende Amin koordiniert (Schema 23).

3. Allgemeiner Teil I

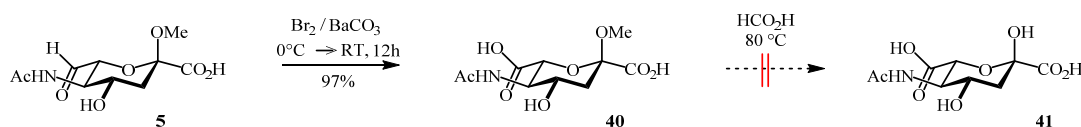
Zudem begünstigt das Pyridin-*N*-Atom aufgrund der Elektronegativität die Abgangsqualität der Gruppe aus dem gebildeten *O*-Acylester.^[267]



Schema 23. Mechanismus der Amidbildung mit Aktivierung der Säure und Bildung des Übergangszustands durch HATU.

Bei dieser Kupplung ließ sich das Produkt in einer Ausbeute von 30% über drei Schritte isolieren, wobei Diolsplaltung und Oxidation nahezu quantitativ ablaufen. Eine Entfernung der anomeren Methoxygruppe war unter den üblichen sauren Standardbedingungen nicht möglich. Drastischere Bedingungen wie Erhöhung der Temperatur oder die Verwendung verdünnter Salzsäure oder Essigsäure führten nur zu Zersetzung. Das *N*-(3-Pentyl)amidmotiv aus **38** wäre eine interessante Verbindung mit korrelierendem Motiv zu **27** und Oseltamivir gewesen, insbesondere da strukturell verwandte *N,N*-Dialkylamide als potentielle Neuraminidasen-inhibitoren kürzlich über Carboligation hergestellt wurden, wengleich nur mit niedriger Diastereoselektivität.^[268-269]

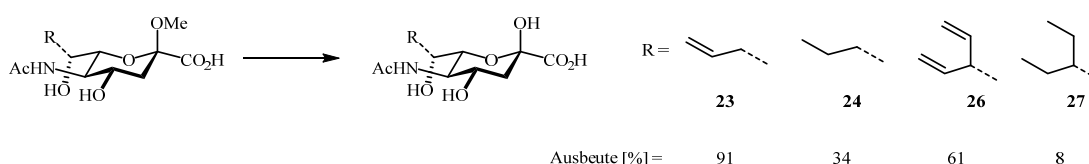
Als Kontrollexperiment und um möglicherweise die *C*7-Dicarbonsäure **41** isolieren zu können, wurde der einfach geschützte Aldehyd **5** ebenfalls oxidiert und mit zahlreichen Methoden die Entschützung der anomeren Position versucht (Schema 24). Leider konnte auch bei diesem Derivat die Methoxygruppe nicht erfolgreich entfernt werden.



Schema 24. Oxidation des einfach geschützten Aldehyds **5**. Versuchte Entschützung der anomeren Position.

3.6. Probleme bei der Entschützung der anomeren Position

Abhängig vom Substitutionsmotiv in der C7-Position ergaben sich erstaunliche Unterschiede in der Reaktivität bei der Entfernung der anomeren Methoxygruppe (Schema 25). Während sich die ungesättigten Verbindungen (**23**, **26**) (Allyl und Pentadienyl) in guten Ausbeuten entschützen ließen, traten bei den jeweils gesättigten Analoga (**24**, **27**) größere Ausbeuteverluste durch Zersetzung auf.



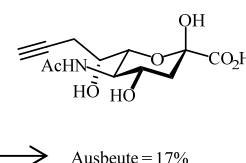
Schema 25. Überblick der Ausbeuten nach Entschützung der anomeren Position.

Neben der Standardmethode mit wässriger Ameisensäure wurden zahlreiche andere Säuren getestet, unter anderem Salzsäure, Schwefelsäure, Essigsäure sowie Bromwasserstoffsäure. Selbst bei Raumtemperatur konnte hauptsächlich nur Zersetzung beobachtet werden. Der Einsatz von saurem Ionenaustauscher führte ebenfalls nicht zur vollständigen Entschützung. Dies stellt für die vorliegenden Derivate jedoch ein Problem für die Produktisolierung dar, da die R_f -Werte für die jeweils geschützten und ungeschützten Verbindungen so ähnlich sind, dass sie mit Standard-Silicasäulenchromatographie nicht getrennt werden konnten. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei der Detektion. Da die DC-Analyse keine eindeutigen Aussagen zuließ, musste die Reaktion jedesmal gestoppt und ihr Fortschritt mittels NMR analysiert werden. Eine Derivatisierung der bei der Entschützung entstehenden freien Aldehydfunktion mit *O*-Benzylhydroxylaminhydrochlorid in Pyridin nach der Probenentnahme lieferte auf der DC einen veränderten R_f -Wert, so dass eine Aussage zum Reaktionsstand möglich wurde. Diese Methode war zwar meist erfolgreich, ließ aber dennoch eine Reaktionsverfolgung per DC nur zu einem gewissen Grad zu. Eine Menge von weniger als ca. 15% Edukt machte eine Detektion mittels DC fast unmöglich, jedoch war das Edukt im NMR weiterhin deutlich detektierbar.

Wie bei den gesättigten Verbindungen war auch für das Propargylderivat eine aufwendige mehrfache Reaktionswiederholung unter hohem Ausbeuteverlust nötig, um das entschützte Sia-Derivat zu erhalten (Tabelle 4).

Tabelle 4. Reaktionsbedingungen zur Entschützung von **9**.

Ansätze	Dauer [h]	Konz. HCO ₂ H [mM]	Temp. [°C]	Edukt [%]
1	5	60 mM	70	60
2	8	240 mM	70	50
3	24	240 mM	70	30
4	24	240 mM	70	10
5	24	240 mM	70	0



3. Allgemeiner Teil I

Während für das Propargylderivat zunächst noch eine relativ geringe Konzentration von 240 mM Ameisensäure benutzt wurde, wurde das Entschützungsprotokoll am Allylderivat **7** auf 1.3 M wässrige Ameisensäure in Wasser und 80 °C optimiert. Bei höherem Erhitzen unter Rückfluss wurden vermehrt Eliminierungsprodukte ohne gleichzeitige signifikante Beschleunigung der Entschützungsreaktion identifiziert (siehe Abb. 24). Ob es sich um eine Eliminierung zwischen C3 und C4 (**42**) oder C3 und C2 (**43**) handelt, konnte im Gemisch mit Zersetzungsprodukten mittels NMR-Analyse nicht zweifelsfrei ermittelt werden. Bei 80 °C und 1.3 M Ameisensäure ließen sich für einen Großteil der Derivate die besten Entschützungsergebnisse erzielen.

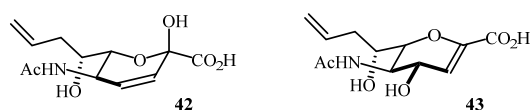


Abb. 24. Mögliche Eliminierungsprodukte durch zu drastische Reaktionsbedingungen während der anomeren Entschätzung.

Durch die teilweise Zersetzung wurde die anschließende Isolierung der Produkte ebenfalls erschwert. Um die lila-schwarzen Zersetzungsrückstände, welche mit der Standardsolvensmischung zur Chromatographie dieser Verbindungen mit eluiert wurden, abtrennen zu können, wurde das Lösungsmittelgemisch zur Elution während der Trennung gewechselt (bei automatisierter Elution lässt sich alternativ ein Gradient benutzen). Mit einem anfänglichen Gemisch von Methanol/CH₂Cl₂ (1 : 5) wurden zunächst die Zersetzungsprodukte mit ca. 1.5 Säulenvolumen eluiert, um danach zur Standardmischung MeOH : Aceton : H₂O : CH₂Cl₂ = 4 : 2 : 1 : (12-7) zu wechseln. Durch die höhere Polarität mit MeOH und H₂O im Lösungsmittel konnte jeweils das Produkt eluiert werden. Zur Verbesserung der Ausbeuten sollte zukünftig auch die *reversed-phase*-Chromatographie in Betracht gezogen werden. Inwieweit die Zersetzungsprodukte dabei abtrennbar wären, müsste mit entsprechendem Vorgehen eruiert werden.

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Nebenreaktionen während der Entschätzung könnte die relativ einfache Bildung des 1,7-Lactons sowie des 2,7-Acetals (siehe Abb. 20 und 22) liefern, da die Instabilität von Lactonen in verwandten Fällen für die erheblichen Ausbeuteverluste verantwortlich gemacht wurde.^[262] Möglicherweise assistiert die Carbinol-einheit an C7 über Transacetalisierung bei der Entschätzung. Für Derivat **40** mit einer Carbonsäurefunktion oder **38** mit einem Amid dagegen könnten die elektronenziehenden Eigenschaften in C7-Position nachteilig für die Stabilität eines möglichen Glycosylkations sein. Zucker ohne C7-C9-Rückgrat oder Sialinsäuren ohne verändertes Rückgrat zeigen interessanterweise keine gravierenden Probleme bei der Deglycosylierung, auch wenn die Ausbeuten häufig unter 70 % liegen.^[143] Bei mehreren Arbeiten zur Synthese von Sialinsäurederivaten mit Variationen in C9- und C4-Position zur Verwendung als Siglec-Inhibitoren wurde ohne Begründung auf die Entschätzung der Methoxygruppe verzichtet und die Derivate direkt als Sialoside für Inhibitionsstudien eingesetzt.^[177, 270]

Als alternative Ansätze zur Entschützung mittels Säure wurden TMSI in CH_3CN und Bromierung der anomeren Position mit HBr /Eisessig versucht. Die NMR-Spektren der jeweiligen Reaktionsmischungen lassen auf Eliminierungen schließen. Die charakteristischen Peaks der 3-Position waren im Rohprodukt nicht mehr identifizierbar, so dass die Isolierung nicht weiter verfolgt wurde. Die stark sauren Bedingungen in Eisessig dürften zudem zu drastisch für die Sia-Verbindungen sein.

Für eine gezielte Synthese von Sialokonjugaten sollte in Betracht gezogen werden auf eine vollständige Methylglycosidentfernung zu verzichten. Die Rückgewinnung des geschützten Anteils und folgende erneute Entschützung sowie Konjugation könnten effizienter sein.

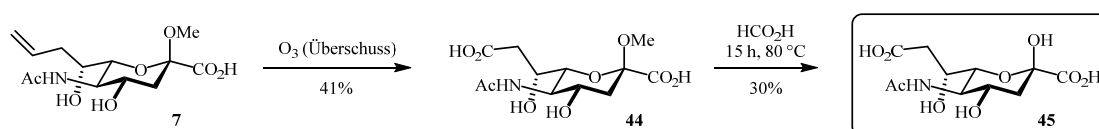
3.7. Sialinsäurederivate durch Funktionalisierung des Allylmotivs

Verbindung **7** bietet mit dem gut zugänglichen Allylmotiv in der Seitenkette die Möglichkeit für weitere Funktionalisierungen. Im Rahmen der Untersuchungen wurden Ozonolyse und Dihydroxylierung durchgeführt.

3.7.1. Ozonolyse

Durch kontrollierte Ozonolyse lässt sich das C_{10} -Rückgrat an der endständigen Allylfunktionalität spalten und somit das natürliche C_9 -Rückgrat zurück gewinnen. Je nach weiterer Aufarbeitung des Spaltproduktes sollte sich das C_8 -Desoxyderivat oxidativ als C_9 -Carbonsäure oder reduktiv als C_9 -Hydroxyderivat (8-Desoxy-Neu5Ac) isolieren lassen.

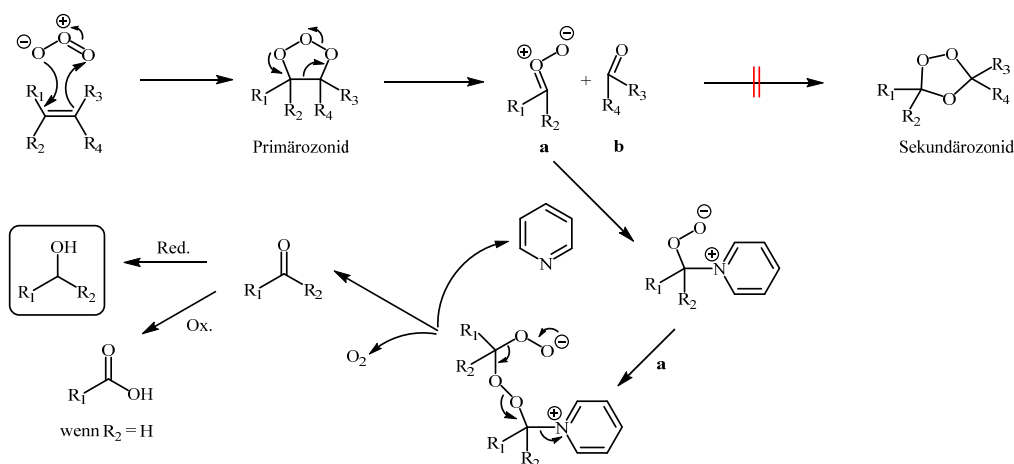
In allgemeinen Vorschriften zu Ozonolysen wird zumeist nur eine Zeitspanne angegeben, in der Ozon durch die Reaktionslösung geleitet wird. Dabei fehlt fast immer die Angabe der Ozonkonzentration im Gasdurchfluss.^[271] Angaben von 15 Minuten bis zu einer Stunde sind häufig zu finden. Die Ozonolyse wurde daher zunächst in trockenem Methanol bei -78°C und 15 min Gasdurchfluss mit einer Ozonkonzentration von 3 g/h (≈ 15 mmol) durchgeführt (auf 0.8 mmol Edukt). Nach reduktiver Aufarbeitung mit Natriumborhydrid wurde überraschenderweise lediglich das überoxidierte Carbonsäurederivat **44** isoliert (Schema 26). Bei zu hoher Ozonkonzentration und Spuren von Säure kann bei der Ozonolyse eine Überoxidation des Aldehyds zur Carbonsäure auftreten. Die Ozonolyse wurde aufgrund ausreichender Substratmenge nicht mit oxidativer Aufarbeitung optimiert, sondern das bereits oxidierte Produkt entschützt und somit das C_9 -Carbonsäurederivat **45** erhalten.



Schema 26. Isolierung von **44** in 41 % nach Überoxidation durch Ozonolyse sowie anschließende Entschützung.

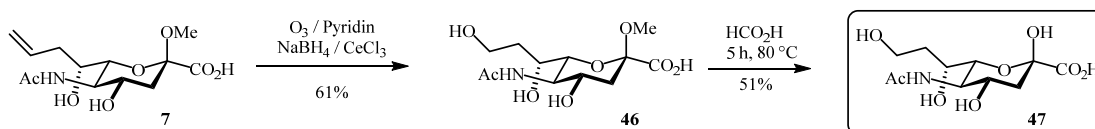
3. Allgemeiner Teil I

Um Oxidation durch mögliche Säurespuren zu vermeiden und da das Sialinsäuresubstrat **7** natürlicherweise bereits eine Carbonsäurefunktion beinhaltet, wurde entschieden, die Reaktion unter basischen Bedingungen zu wiederholen. Hierbei wurde bei der Recherche Pyridin als Katalysator für Ozonolysen identifiziert. Bei Pyridinkatalyse soll sich nach Zerfall des Primärozonids nicht das Sekundärozonid aus dem Carbonyloxid **a** und der Carbonylkomponente **b** bilden, weil Pyridin das Carbonyloxid unter Bildung eines Zwitterions abfängt, welches dann von einem weiteren Carbonyloxid angegriffen werden kann (Schema 27).^[272]



Schema 27. Mechanismus der Pyridin-katalysierten Ozonolyse.

Die Ozonolyse wurde daher unter Pyridinkatalyse wiederholt. Um erneute Überoxidation auszuschließen, wurde ein Gasdurchfluss mit 3 g/h Ozon (≈ 1 mmol) für nur 60 Sekunden gewählt (auf 0.8 mmol Edukt). Um eine möglichst vollständige reduktive Aufarbeitung zu erreichen, wurden 0.3 Äquivalente Cer(III)chlorid zum Natriumborhydrid hinzugefügt. Mit 61% Ausbeute konnte dadurch das reduzierte Ozonolyseprodukt **46** erhalten werden (Schema 28).



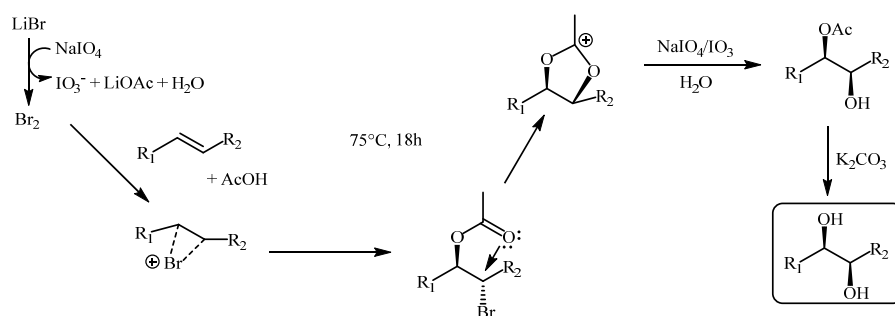
Schema 28. Erfolgreiche Pyridin-katalysierte Ozonolyse zu 8-Desoxy-Neu5Ac **47**.

Nach erfolgreicher Glycosidentschätzung wurde 8-Desoxy-Neu5Ac (**47**) in 51% Ausbeute isoliert.

3.7.2. Dihydroxylierung

Die Dihydroxylierung des Allylmotivs in **7** sollte Zugang zu einer Sialinsäure mit hydroxyliertem, verlängertem C₁₀-Rückgrat schaffen.

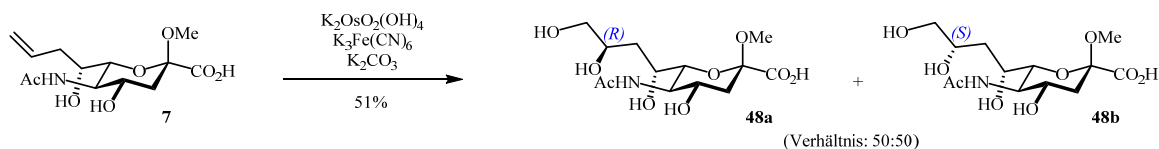
Um das teure und sehr toxische OsO₄ zu vermeiden, wurde eine alternative Dihydroxylierung mittels Natriumiodid und Lithiumbromid in Essigsäure durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sollte eine selektive *syn*-Dihydroxylierung von Olefinen möglich sein. Durch die *in situ*-Bildung von Brom, die Entstehung eines verbrückenden Bromoniumions und die anschließende Koordinierung durch Acetat wurde eine selektive *syn*-Diolbildung beschrieben (Schema 29).^[273]



Schema 29. Mechanismus der Dihydroxylierung mittels LiBr und NaIO₄.

Die NMR-Produktanalyse erwies sich als äußerst komplex und legte die Vermutung nahe, dass im Reaktionsgemisch mindestens drei Substanzen enthalten waren. Da das Allylmotiv nicht mehr zu detektieren war, ist davon auszugehen, dass die Dihydroxylierung zwar teilweise erfolgreich, aber weder zu großen Teilen stereoselektiv noch unter vollständiger Substitution abgelaufen ist. Vermutlich war ein Gemisch aus *syn*- und *anti*-Diol, Zwischenprodukt mit verbliebenen Acetatgruppen sowie diverse Zersetzungsprodukte enthalten. Da eine Extraktion des Reaktionsgemisches nicht möglich war und die isolierten Mengen eine Gesamtausbeute von unter 10% ergaben sowie zeitgleiche Entschützungsexperimente mit Essigsäure zeigten, dass unter Hitze Zersetzung auftritt, wurde dieser Versuch abgebrochen.

Für einen Test der Dihydroxylierung unter Standardbedingungen und um NMR-Spektren als Referenz zu erhalten, wurde die Reaktion zunächst mittels unselektiver Dihydroxylierung nach *Sharpless* durchgeführt.^[274] Hierbei wurden 0.2 mol-% K₂OsO₂(OH)₄, 3.0 Äquivalente K₃Fe(CN)₆ und 3.0 Äquivalente K₂CO₃ eingesetzt (Schema 30). Die Reaktion verlief erfolgreich, aber wie erwartet nicht diastereoselektiv unter Entstehung eines 1:1-Gemischs der Diastereomere (**48**).



Schema 30. Unselektive Dihydroxylierung nach *Sharpless*.

3. Allgemeiner Teil I

Auch hier war wegen der hohen Polarität der Sialinsäure keine Extraktion des Produkts möglich. Nach Filtration und aufwendiger Säulenchromatographie zur Abtrennung aller Salze konnte eine isolierte Ausbeute von 51 % erhalten werden. Da die Komponenten im Gemisch nur im NMR-Spektrum zu identifizieren und eine chromatographische Trennung nicht möglich war, wurde die Reaktion unter stereoselektiven Sharplessbedingungen unter Verwendung des AD-mix wiederholt.

Mit Hilfe von AD-mix β sollte sterisch bevorzugt die (9*R*)-Konfiguration (**48a**) entstehen (siehe Abb. 25) Im Versuch konnte tatsächlich eine Verschiebung der Selektivität zugunsten der (9*R*)-Konfiguration beobachtet werden, allerdings nur in einem völlig unzureichenden Verhältnis von 65 : 35. Bei einer endständigen Allylgruppe ist die sterische Hinderung für den ungünstigeren Angriff möglicherweise nicht stark genug. Die isolierte Ausbeute fiel mit 42 % etwas geringer als unter unselektiven Sharplessbedingungen aus.

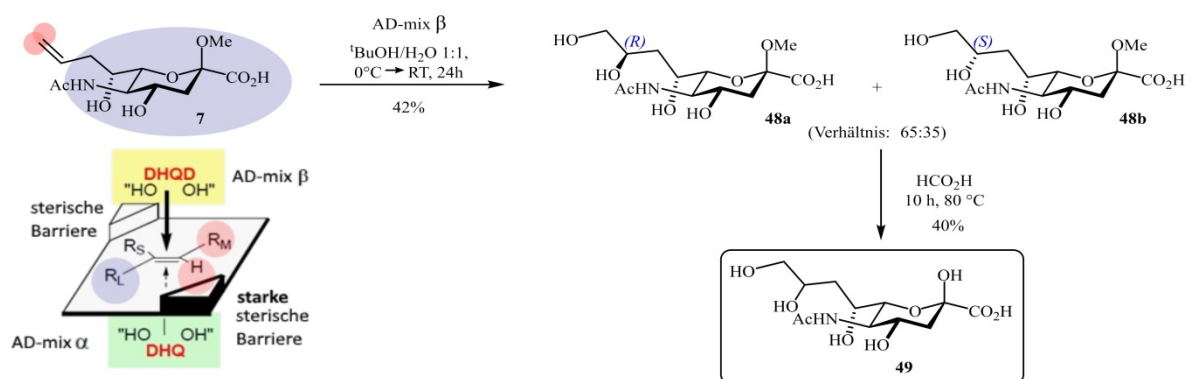


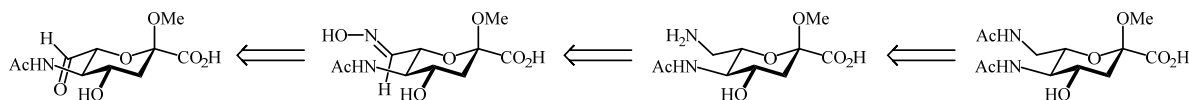
Abb. 25. Übersicht zur Sharpless-Dihydroxylierung mittels AD-mix.

Da wie zuvor eine Trennung der Diastereomere mittels Standard-Silicachromatographie nicht möglich war, wurde die Entschützung im Gemisch durchgeführt. Nach Entfernen der Methoxygruppe wurde das verlängerte Sia-Derivat **49** mit einem hydroxylierten C₁₀-Rückgrat erhalten.

3.8. Sialinsäurederivate durch Reduktion

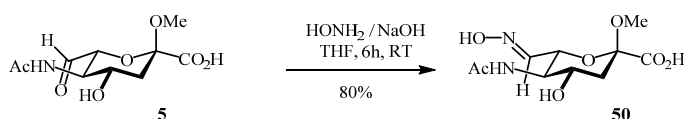
Zur weiteren Funktionalisierung des Aldehyds **5** bieten sich die reduktive Aminierung oder eine Reduktion zum Alkohol an. Reduktive Aminierungen mit sperrigen Adamantylaminen waren bereits als Route zu potentiell antiviralen Wirkstoffen beschrieben worden.^[223]

Zur potentiellen Isolierung des freien Amins in C7-Position einer zwitterionischen Aminosäure wurde in einem komplementären Ansatz Oximbildung mit direkt anschließender Reduktion geplant, was dann Zugang zu einem Diacetamidderivat als verkürztem Analogon der Legionaminsäure ermöglichen sollte (Schema 31).



Schema 31. Syntheseplanung zur Amin-/Amidfunktionalisierung der C7-Position.

Nach problemloser Synthese des Oxims **50** (siehe Schema 32) mussten zahlreiche Methoden zu seiner Reduktion erprobt werden, bevor die geplante Umsetzung erfolgreich realisiert werden konnte (siehe Tabelle 5).

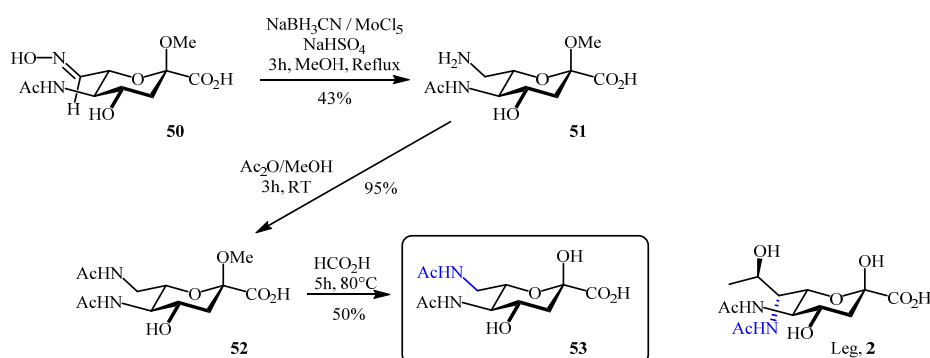


Schema 32. Synthese des Oxims **50**.

Tabelle 5. Getestete Reaktionsbedingungen für die Reduktion des Oxims in C7-Position.

#	Bedingungen	Literatur	Ergebnis
1	3 eq. NH_4HCO_2 , 2 eq. Zn, 30 min	Ref ^[275]	kein Umsatz
2	3 eq. NH_4HCO_2 , 2 eq. Zn, 3.5 h	Ref ^[275]	kein Umsatz
3	H_2 , Pd/C, 24 h RT, 24 h 50 °C	Ref ^[276]	Zersetzung
4	NaBH_4 in NaOH, 3 eq., 2 h RT	Ref ^[276]	Edukt (90 %) + unbekanntes NP
5	NaBH_4 in MeOH*, 10 eq., 4 h RT + 4 h 65 °C	Ref ^[276]	kein Umsatz
6	H_2 17 bar, PtO_2 , 4 h, RT	Ref ^[276]	Edukt + Zersetzung
7	Oxim : NaBH_3CN : MoCl_5 : NaHSO_4 = 1 : 4 : 1 : 3 eq. MeOH, Reflux, a) 1 h; b) 3 h	Ref ^[277]	a) 50 % Umsatz b) 100 % Umsatz

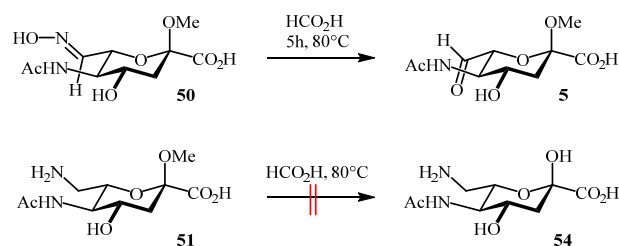
Die Verwendung von Natriumcyanoborhydrid mit Molybdänchlorid als Katalysator unter Schlenk-Bedingungen führten schließlich zu einem vollständigen Umsatz. Das verwendete Natriumhydrogensulfat sollte vor Gebrauch sorgfältig im Vakuum getrocknet werden. Das Amin **51** wurde in 43 % Ausbeute isoliert und anschließend problemlos *N*-acyliert. Nach Entschützung konnte so das verkürzte Diacetamidoderivat **53** als Analogon zur Legionaminsäure **2** gewonnen werden (Schema 33).



Schema 33. Synthese des Diacetamidoderivats **53** und Strukturvergleich zu Legionaminsäure (Leg. 2).

3. Allgemeiner Teil I

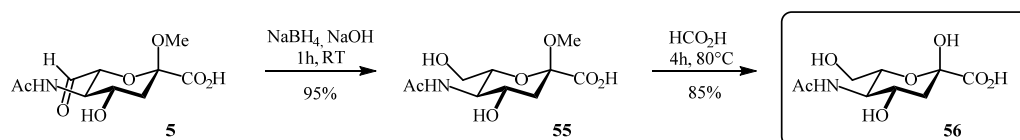
Erwartungsgemäß wurde beim Versuch der sauren Entschützung des Oxims **50** lediglich der C7-Aldehyd **5** zurückgewonnen. Die Entschützung des Amins **51** verlief leider erfolglos (Schema 34).



Schema 34. Gescheiterte Entschützungsversuche von Zwischenstufen der Diacetamidderivat-Synthese.

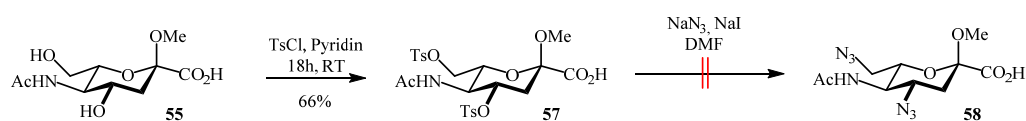
Da das Aminderivat **51** nicht entschützt werden kann, sollte zukünftig zur Verbesserung der Ausbeute – analog zur Gewinnung der Adamantylamide^[223] – auch eine Kupplung des Aldehyds mit Acetamid mittels Borhydrid zur Synthese des Diacetamidderivats **53** in Erwägung gezogen werden.

Für die verkürzte C7-Sialinsäure (**56**) wurde Aldehyd **5** in exzellenter Ausbeute mit NaBH_4 reduziert und anschließend entschützt (Schema 35). Dieses Derivat sollte in der Analyse des Aktivierungsverhaltens mittels der CMP-Sialat-Synthetase weiteren Aufschluss zur Rolle der terminalen Kohlenstoffkette bei der Bindung der Sialinsäuren geben.



Schema 35. Reduktion des Aldehyds und Entschützung zum verkürzten C7-Derivat **56**.

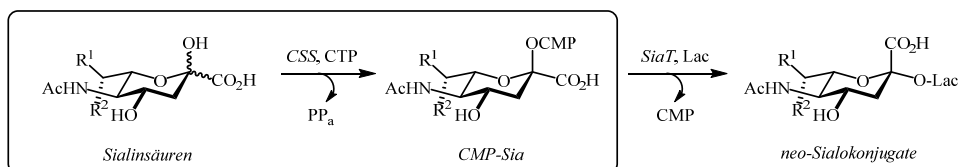
Eine Umsetzung des verkürzten C7-Derivats **55** mit Tosylchlorid ergab, dass ohne erkennbare Selektivität beide Hydroxylgruppen tosyliert werden. Der Versuch, nachfolgend durch Substitution Azidfunktionalitäten einzuführen, war nicht erfolgreich (Schema 36). Auch Natriumiodid als mögliches „Hilfsnukleophil“ brachte keinen Erfolg. Da über diesen Ansatz jedoch scheinbar keine Selektivität der C7-Substitution möglich ist, wurde dieser Reaktionsansatz schließlich nicht weiter verfolgt.



Schema 36. Tosylierung und Versuch der Azidsubstitution von **55**.

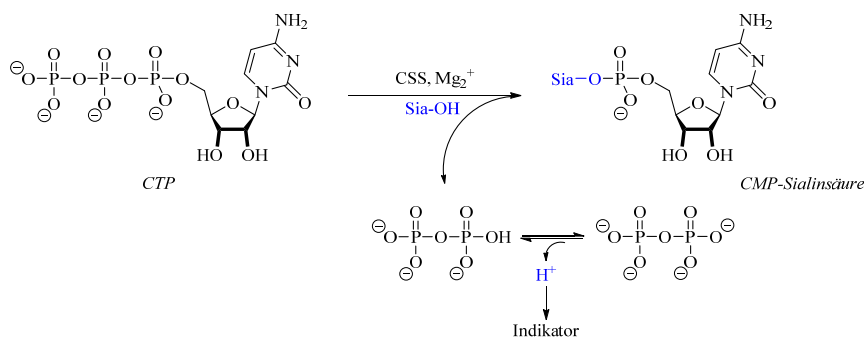
3.9. Kinetisches Screening der Neu5Ac-Derivate durch CMP-Sialat-Synthetase

Die erfolgreiche enzymatische Synthese von *neo*-Sialokonjugaten ist entscheidend von der Nukleotidaktivierung der Sialinsäureanaloge durch CSS als Schlüsselschritt abhängig (Schema 37).



Schema 37. Biokatalytische Synthese modifizierter *neo*-Sialokonjugate über den Leloir-Stoffwechselweg.

Die Substratbindung der CSS findet in einer tiefen Spalte über einen *induced-fit*-Mechanismus statt, während die meisten Sialyltransferasen, die für den konsekutiven Konjugationsschritt benötigt werden, eine eher oberflächliche Bindungstasche für die Sialinsäureeinheit besitzen und daher strukturelle Modifikationen gut tolerieren. Um die kinetischen Eigenschaften der neu produzierten Neu5Ac-Analoga zu evaluieren, wurde ein colorimetrischer pH-sensitiver Assay eingesetzt, der zuvor von *Ning He* im Arbeitskreis *Fessner* entwickelt wurde.^[114, 225] Hierbei wird im Wesentlichen durch Freisetzung eines Äquivalents dissoziierbaren Pyrophosphats, welches vom Substrat CTP während des Nukleotidyltransfers unter Bildung von CMP-Sialinsäure abgespalten wird, gleichzeitig ein Proton freigesetzt. Dieses Proton lässt sich durch einen pH-Indikator quantifizieren und ermöglicht die kontinuierliche Verfolgung des Reaktionsfortschritts (Schema 38). Weitergehende Diskussion zum Assayprinzip und zur erfolgten Weiterentwicklung für die Analyse des Sialyltransfers sind in Kapitel 4.3 zu finden.



Schema 38. Mechanismus der Freisetzung eines detektierbaren Protons während des Nukleotidyltransfers.

Die Nukleotidaktivierung der zehn synthetisierten Neu5Ac-Analoga mittels CSS aus *Neisseria meningitidis* wurde mit Hilfe dieses Assays im Mikrotiterplattenformat kinetisch analysiert. Die natürliche Sialinsäure Neu5Ac war zum Vergleich als Referenz mit enthalten.

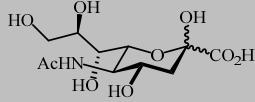
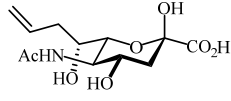
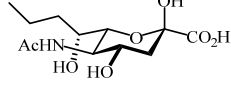
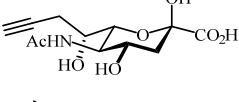
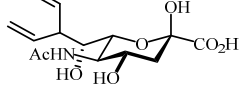
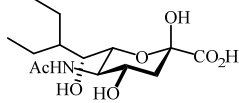
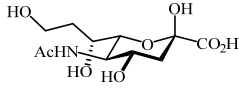
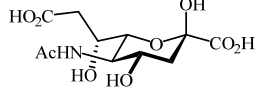
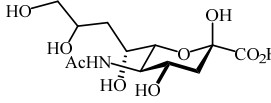
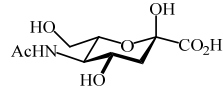
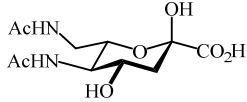
3. Allgemeiner Teil I

Die Analyse bestätigte hierbei die ungewöhnlich breite Substratpromiskuität der CSS aus *N. meningitidis*, da alle getesteten Substratanaloga vom Enzym umgesetzt wurden (siehe Tabelle 6). Frühere Arbeiten fokussierten sich hauptsächlich auf Variationen der Amideinheit, Kettenverkürzung sowie stereochemische Variation des Hydroxylierungsmusters.^[113-114] Die hier neu vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass auch die konstitutionellen Modifikationen des Kohlenstoffrückgrats mit ungesättigter, vollständig desoxygenierter, verzweigter oder kettenverlängerter Kohlenstoffkette toleriert werden.

Die Bindungsaffinität scheint stark mit der Polaritätsänderung der terminalen Zuckerkette zu korrelieren. Die C8-Desoxygenierung in **47** resultiert interessanterweise in einem 5-fach niedrigeren K_M -Wert im Vergleich zu Neu5Ac (**1**) und der stärksten Bindungsaffinität aller getesteten Verbindungen, welche jedoch gleichzeitig mit 5-facher Reduzierung des k_{cat} einhergeht. Verbindung **49** mit dem gleichen Strukturmotiv, aber durch eine weitere Hydroxymethylengruppe erweitert, zeigt eine 26-fach schwächere Bindungsaffinität und 34-fach geringere katalytische Effizienz. Dies weist auf einen sehr limitierten Raum der aktiven Tasche der CSS in dieser Region hin.

Erfreulicherweise zeigen alle hydrophoben Barbier-Produkte (**23**, **26**) und ihre hydrierten Derivate (**24**, **27**) Affinitäten im Bereich der nativen Neu5Ac mit eher kleineren Abweichungen. Die Allylgruppe in **23** scheint am besten in die Tasche zu passen, während die geräumige und eher rigide Pentadienyleinheit in **26** erwartungsgemäß konformative Komplikationen zu verursachen scheint. Bemerkenswert ist zudem, dass die beiden ungesättigten Verbindungen (**23**, **26**) eine mindestens doppelt so hohe katalytische Effizienz im Vergleich zu den korrespondierenden gesättigten Verbindungen (**24**, **27**) aufweisen. Wie zu erwarten war, zeigen alle Analoga reduzierte k_{cat} -Werte im Vergleich zum natürlichen Substrat Neu5Ac. Substrat **45** mit einer geladenen Carboxylgruppe in 9-Position zeigt die geringste Bindungsaffinität und eine >50-fach niedrigere katalytische Effizienz relativ zur natürlichen Neu5Ac. Umgekehrt zeigen die verkürzten Analoga **56** und **53** exzellente Bindungsaffinitäten, aber die geringsten Wechselzahlen. Offenbar kann die Acetamideinheit in **53** nicht den Verlust des natürlichen hydroxylierten Rückgrats kompensieren (Zusammenfassung siehe Tabelle 6).

Tabelle 6. Apparente kinetische Gleichgewichtsparameter^{a)} für Substratanaloga der CSS.

Verbindung	K_M [mM]	k_{cat} [1/min]	k_{cat}/K_M [mM ⁻¹ min ⁻¹]
1 	0.153 ± 0.033	647.2 ± 37.1	4227.3
23 	0.069 ± 0.019	120.4 ± 7.4	1745.4
24 	0.175 ± 0.044	112.4 ± 5.8	643.3
25 	0.144 ± 0.027	160.6 ± 7.8	1117.3
26 	0.254 ± 0.060	371.9 ± 23.9	1462.3
27 	0.170 ± 0.043	123.4 ± 7.2	726.6
47 	0.029 ± 0.012	127.3 ± 9.8	4441.7
45 	1.596 ± 0.616	132.3 ± 15.2	82.9
49 	0.756 ± 0.425	98.2 ± 10.3	129.9
56 	0.035 ± 0.014	54.0 ± 3.7	1527.2
53 	0.039 ± 0.005	74.4 ± 1.9	1917.0

a) Kinetische Daten wurden mittels colorimetrischem pH-sensitivem Assay mit variierenden Konzentrationen der Sialinsäuresubstrate unter Standardbedingungen (0.5 mM CTP, 10 mM MgCl₂, 0.026 mM Kresolrot, 1.27 µg CSS) ermittelt und per Michaelis-Menten-Analyse mit *Origin* ausgewertet.

3.9.1. Analyse der Wechselwirkungen im Kristallstrukturmodell

Zur Interpretation der kinetischen Diskriminierung der Substratanaloga wurde das bereits zuvor genutzte Substratbindungsmodell^[114] aus dem Strukturalignment der CSS aus *N. meningitidis* (PDB-Eintrag 1EYR)^[278] und dem korrespondierenden murinen Enzym (PDB-Eintrag 1QWJ)^[101] verwendet (Abb. 26). Die zuvor aufgestellte Hypothese,^[114] dass der Verlust einer Wasserstoffbrücke zwischen Gln104 zum 8-OH eine konformative Änderung der Seitenkette des Gln104 hervorrufen könnte, welche sich möglicherweise auf die katalytische Aktivierung des O-2-Nukleophils störend auswirkt, wird durch die Ergebnisse der neuen Derivate, die alle keine 8-OH-Gruppe besitzen, bestätigt. Alle Derivate zeigen reduzierte k_{cat} -Werte, übereinstimmend mit einer Störung des Wasserstoffbrückennetzwerks, im Besonderen in Bezug auf Gln104 oder Asp211. Die 8-OH-Funktionalität scheint daher weniger zur Bindungsenergie beizutragen als vielmehr k_{cat} zu beeinflussen. Interessanterweise werden die Derivate trotz Unbeweglichkeit und hohen sterischen Anspruchs des ungesättigten Rückgrats sowie ihrer hydrophoben Natur gut in der aktiven Tasche toleriert, die abgesehen von Pro174 eigentlich nicht sehr unpolar ist. Die sehr niedrige Bindungsaffinität für Derivat **45** könnte auf die 9-Carboxylgruppe zurückzuführen sein, welche direkt auf den unpolaren Rest Pro174 gerichtet ist.

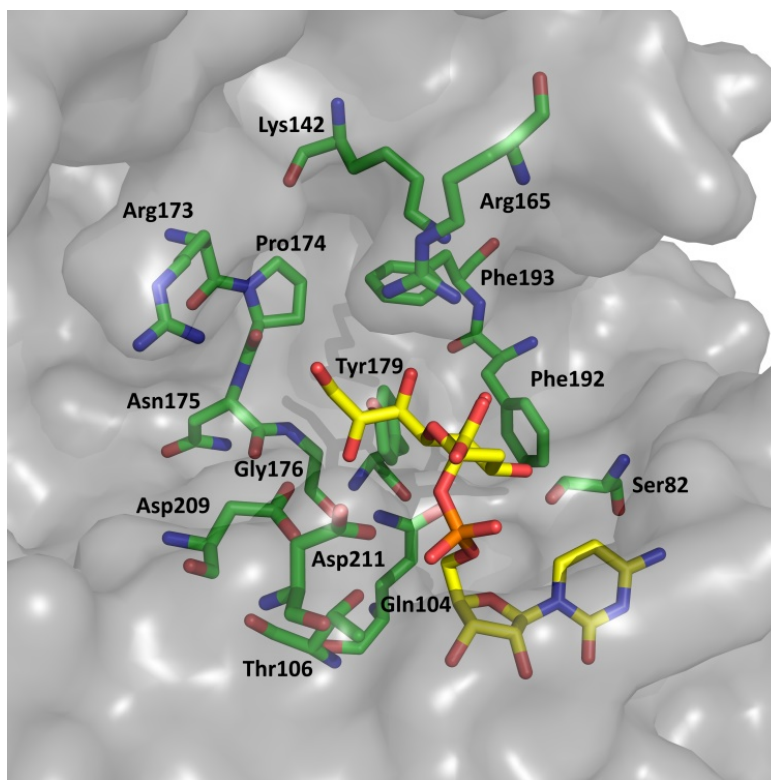
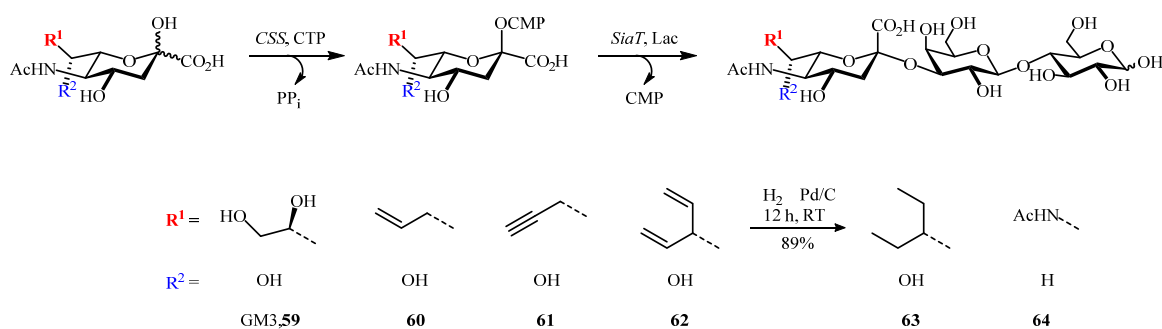


Abb. 26. Modell der Bindung von CMP-Neu5Ac in der Kristallstruktur der CSS.^[279] Die Kohlenstoffketten der Aminosäurereste in der aktiven Sialinsäure-Tasche der CSS aus *Neisseria meningitidis*, welche vermutlich in der Substratbindung involviert sind, sind grün dargestellt (PDB-Eintrag 1EYR).^[278] Das Kohlenstoffskelett des gebundenen Substrats CMP-Neu5Ac ist gelb dargestellt und in der gleichen Konformation, wie in der murinen CSS-Struktur (PDB-Eintrag 1QWJ)^[101] beobachtet, eingefügt und angepasst. Das Substrat wurde durch Alignment der beiden Proteintaschen mit einer Korrektur durch Gewichtung der Nukleotideinheit des Substrats „gedockt“. Die Darstellung wurde mit PyMOL erzeugt.

3.10. Synthese von G_{M3}-Trisaccharidanaloga

Zur Validierung der kinetischen Studien wurden die Substratanaloga **23**, **25**, **26** und **53** im präparativen Maßstab in einer Eintopf-Reaktionskaskade mit zwei Enzymen umgesetzt (Schema 39). Die Nukleotidaktivierung wurde mit dem Wildtyp der CSS aus *Neisseria meningitidis* durchgeführt, gefolgt vom Sialyltransfer auf Lactose unter Einsatz einer Variante der α 2,3-Sialyltransferase aus *Photobacterium phosphoreum* (2,3SiaT_{p_{ph}}_A151D). Die Studien zum *protein engineering* dieser Variante mit signifikant reduzierter Hydrolyseaktivität finden sich in Teil II dieser Arbeit.



Schema 39. Übersicht zur Synthese der G_{M3}-Analoga.

Der relative Reaktionsfortschritt und die Ausbeuten der Sialokonjugate wurden mit den Ergebnissen der Positivkontrolle Neu5Ac unter Synthese des natürlichen G_{M3}-Trisaccharids (Neu5Ac-Lac, **59**) verglichen. Hierzu wurden zuerst alle Sialinsäuren (jeweils 40 mg, >0.1 mmol) mit 1.5 Äquivalenten CTP unter Katalyse von CSS und anorganischer Pyrophosphatase unter DC-Kontrolle umgesetzt. Das 3-Pentadienylanalogon **26** zeigte bereits nach 2 Stunden komplette Umsetzung, Allyl- (**23**) und Propargylverbindung (**25**) benötigten 3.5 Stunden, während das Acetamidoderivat **53** auch nach 5.5 Stunden noch nicht vollständig umgesetzt war. Diese Beobachtungen stimmen mit den erhobenen kinetischen Daten des Assays sehr gut überein. Nach Zusatz von 3 Äquivalenten Lactose wurden die Reaktionsmischungen für weitere 24 Stunden mit der α 2,3-SiaT_{p_{ph}}_A151D inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte über Größenausschlusschromatographie und Isolierung über anschließende Gefrier-trocknung. Im Vergleich zu **59** (93%) sind auch die Ausbeuten der korrespondierenden Allyl- (**60**, 80%), Propargyl- (**61**, 90%) und 3-Pentadienyl- (**62**, 78%) Analoga exzellent bis sehr gut. Um zum Oseltamivir-verwandten verzweigten 3-Pentylmotiv (**63**) zu gelangen, wurde das Trisaccharid **62** über katalytische Hydrierung gesättigt. Das Trisaccharid **64** wurde aus **53** mit nur 63% Ausbeute gewonnen, da die CMP-Aktivierung unvollständig ablief (30% **53** wurden zurückgewonnen). Trotzdem ist Verbindung **64** sehr interessant, da sie das *bis dato* erste verkürzte analoge Legionaminsäure-beinhaltende Oligosaccharid ist. Diese sind bisher aufgrund eines Mangels an leicht zugänglichen Substraten und Enzymen des korrespondierenden Stoffwechsels schwierig herzustellen.^[280]

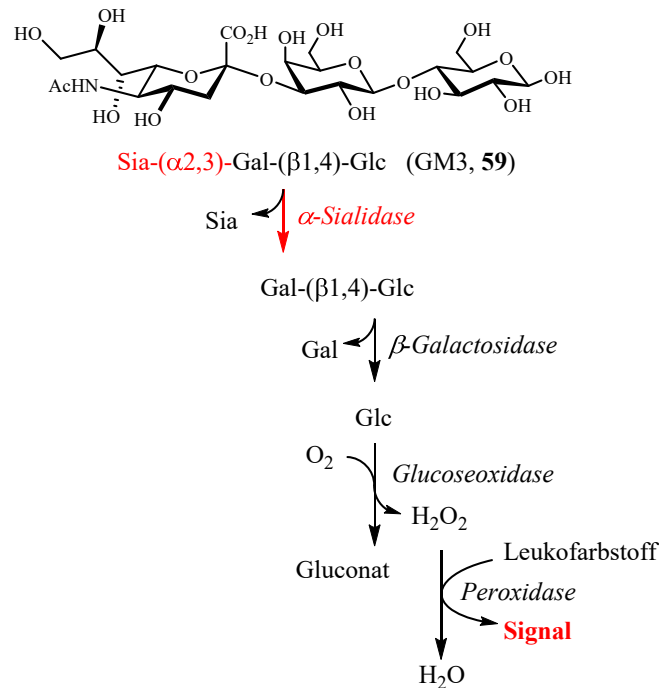
Erfolgt die Aufreinigung der Trisaccharide wie beschrieben nur mit Größenausschlusschromatographie, verbleiben im Produkt geringe Reste von Tris-Salz aus dem Puffersystem der Reaktion, welche im NMR Spektrum quantifiziert werden können, so dass eine relative Ausbeutebestimmung problemlos möglich ist. Eine Entfernung aller anderen Komponenten (Lactose, Cytidin, Phosphat, Enzym etc.) ist sehr effektiv möglich. Es wurde versucht, verbliebenes Salz mit Hilfe der Säulenchromatographie unter Verwendung des Laufmittels *n*-Propanol/Wasser/Ammoniak (20% aq.)=7:3:1 zu entfernen. Für die Aufreinigung des säureempfindlichen CMP-Neu5Ac hat sich diese Methode bewährt. Bei der Aufreinigung der Trisaccharide schien jedoch aus Ammoniak und dem Tris-Salz unerwartet ein symmetrisches, unidentifizierbares neues Salz zu entstehen. Es zeigt Peaks im ¹³C NMR zwischen 68-74 ppm. Für eine Optimierung der Aufreinigung sollte daher auf neutrale Laufmittel unter Verwendung von *reversed-phase*-Silicagel zurückgegriffen werden.

3.11. Test der *neo*-Sialokonjugate auf Sialidaseaktivität

Virale und bakterielle Sialidasen sind verbreitete Exoglycosidasen, die eine Rolle bei der pathogenen Infektion des menschlichen Wirts spielen.^[221] Sialidasen verschiedener Organismen variieren in der Präferenz zur Erkennung der diversen sialinsäureenthaltenden Strukturen. Üblicherweise werden Sialoside, die an Fluorophore konjugiert sind, zum Screening der Sialidaseaktivität eingesetzt, da dies den Durchsatz und die Empfindlichkeit des Assays erhöht. Eine Aussage über die Substratspezifität kann diese Vorgehensweise allerdings nicht liefern.^[281-282] Daher wurde ein neuer Assay zur kontinuierlichen colorimetrischen Bestimmung der Sialidaseaktivität entwickelt, um die Bibliothek der synthetisierten *neo*-Sialokonjugate auf ihre Substratspezifität für Sialidasen zu untersuchen.

In einem gekoppelten enzymatischen Assay (Schema 40) wurden dazu die individuellen Sialoside mit einer limitierenden Menge der jeweils zu untersuchenden Sialidase in Gegenwart eines Überschusses an β -Galactosidase und Glucoseoxidase inkubiert.

Ist das G_{M3}-Trisaccharidanalogen ein geeignetes Substrat der Sialidase, wird die terminale Sialinsäure abgespalten und Lactose freigesetzt. Der Überschuss an Hilfsenzymen ist nun in der Lage, schnell stöchiometrische Mengen an Wasserstoffperoxid zu produzieren, welches anschließend durch Peroxidase-katalysierte Bildung eines Äquivalents eines Farbstoffs detektiert werden kann. Hierzu kann wieder ein gewöhnlicher Mikrotiterplatten-Reader eingesetzt werden. Ohne Sialidaseaktivität kann kein Signal generiert werden, da die Galactosidase ebenfalls eine Exoglycosidase ist, welche keine internen Galactoside hydrolysieren kann.



Schema 40. Gekoppelter enzymatischer Assay zur kontinuierlichen colorimetrischen Analyse der Sialidaseaktivität gegenüber G_{M3}-Motiven.

In einer ersten Untersuchung wurden zwei kommerzielle bakterielle Sialidasen (α 2-3,6,8-Neuraminidasen) aus *Clostridium perfringens* und *Vibrio cholerae* getestet. Die Ergebnisse für die modifizierten Sialinsäurekonjugate wurden relativ zum natürlichen G_{M3}-Substrat normiert, welches auf 100% gesetzt wurde. Wie in Abb. 27 zu sehen ist, zeigt die Sialidase aus *C. perfringens* eine moderate Aktivität mit dem Propargyl- (**61**), Allyl- (**60**) und Diacetamid-Derivat (**64**) bei jeweils 44%, 43% und 7% relativer Aktivität, während das Enzym aus *V. cholerae* mit jeweils 0.3%, 5% und 0% Aktivität fast inaktiv ist.

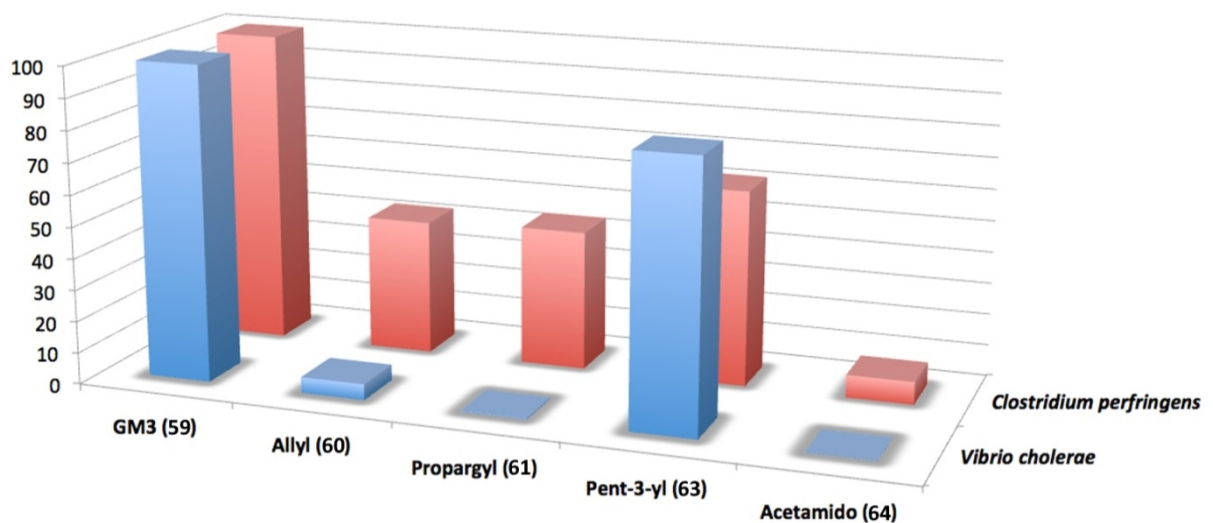


Abb. 27. Aktivitäten der Sialidasen aus *C. perfringens* und *V. cholerae* gegenüber den *neo*-Sialokonjugaten **60**, **61**, **63** und **64** relativ zum G_{M3}-Trisaccharid **59**.

3. Allgemeiner Teil I

Das sperrige 3-Pentyl-Derivat (**63**) zeigt interessanterweise mit jeweils 62% und 84% das höchste Aktivitätslevel für beide bakteriellen Enzyme. Dies weist offensichtlich auf eine signifikante und ausgeprägte strukturbezogene Substratbindung hin, im Gegensatz zur Neuraminidase des Influenzavirus, für die Oseltamivir der strukturell vergleichbare Targetinhibitor ist. Die Neuraminidase des Influenzavirus stand jedoch für einen direkten Vergleich nicht zur Verfügung.

Um kompetitive Bindungsaffinitäten zu testen, wurde eine Lösung des G_{M3} -Trisaccharids **59** mit jeweils gleicher Konzentration an **61** oder **64** versetzt und mit der Sialidase aus *V. cholerae* inkubiert. Die beobachtete Spaltungsrate, welche beim Propargylderivat **61** um ca. 20% im Vergleich zu purem G_{M3} -Trisaccharid reduziert ist, weist auf einen moderaten Inhibitionseffekt hin. Das Diacetamid **64** zeigte keine erkennbare Konkurrenz zum natürlichen G_{M3} -Motiv (Abb. 28).

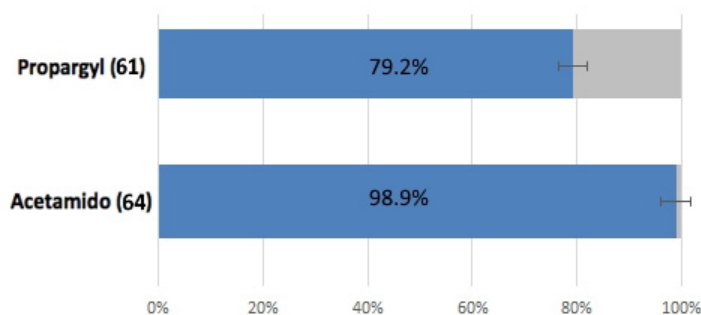
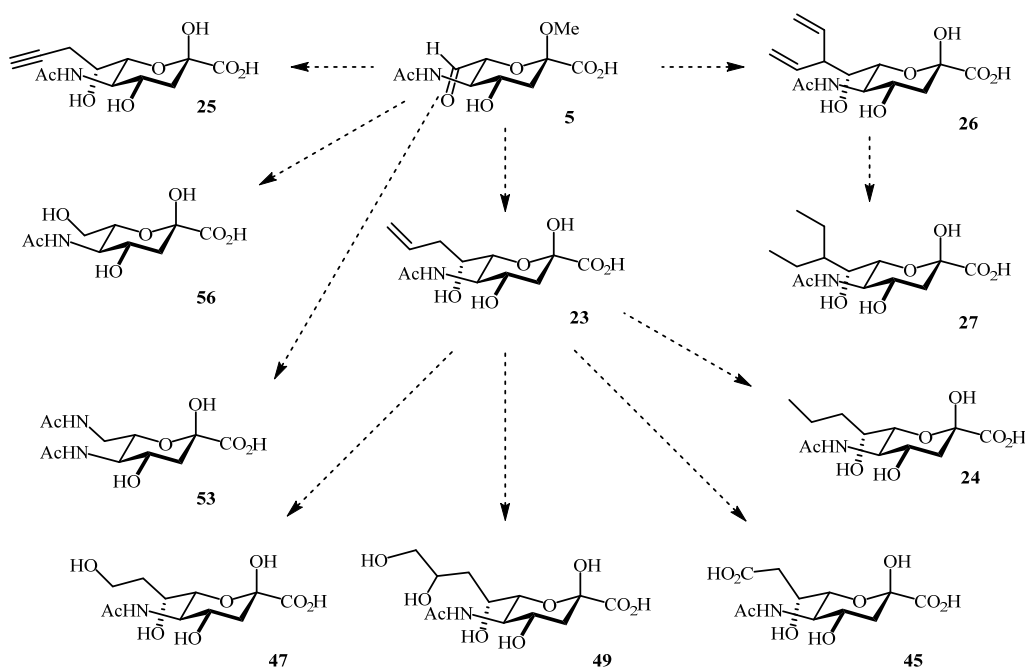


Abb. 28. Kompetitive Bindungsaffinität zwischen **59** und **61** sowie zwischen **59** und **64** für *V. cholerae*.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die terminal hydrophoben Sialinsäureanaloge eine signifikant höhere Substratpromiskuität für die Sialidase *Clostridium perfringens* aufzeigen. In einer Studie mit Modifikationen jeweils nur an C9-Position in Disacchariden (SiaGal β pNP), allerdings mit größtenteils polaren Resten, zeigte sich das Enzym aus *Vibrio cholerae* dagegen etwas toleranter als das aus *Clostridium perfringens*.^[283]

3.12. Zusammenfassung und Ausblick

Durch eine neue Synthesestrategie, welche auf der Barbier-artigen Carboligation eines verkürzten Neu5Ac-Derivats basiert, konnte eine Fülle neuer ungewöhnlicher Sialinsäureanaloge erfolgreich und in meist guten Ausbeuten synthetisiert werden (Schema 41). Der Verkürzung des Kohlenstoffrückgrats mittels Diolsplaltung zum C7-Aldehyd **5** folgte dabei eine hoch stereoselektive Barbier-artige Addition von Organoindiumreagenzien unter umweltfreundlichen Bedingungen in wässrigem Medium. Durch einen indiumvermittelten Chelatisierungseffekt wurden vollständig diastereomerenreine Verbindungen mit gesättigten und ungesättigten sowie linearen und verzweigten Alkylketten synthetisiert.



Schema 41. Überblick der zehn isolierten Sialinsäurederivate und -analoge.

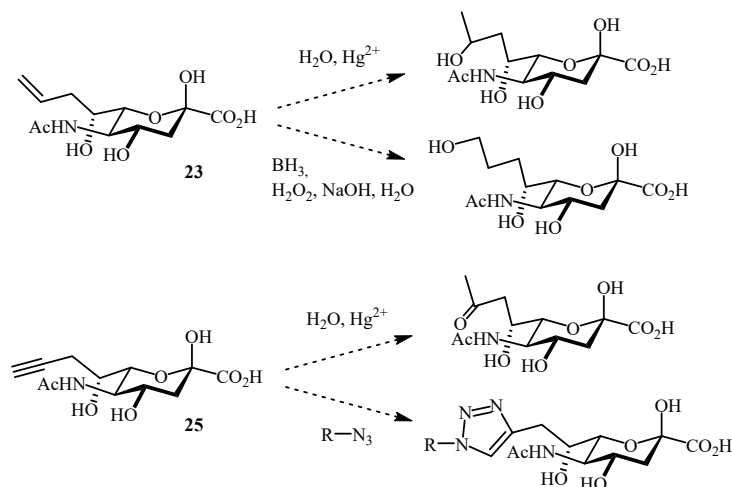
Das Allylladdukt wurde mit Hilfe verschiedener Methoden in weitere C₉/C₁₀-Analoge überführt, darunter die desoxygenierte Sialinsäure **47** und eine C8-desoxygenierte Sialindisäure **45**.

Der verkürzte C7-Aldehyd war neben dem Einsatz zur Carboligation ebenso ein nützliches Startmaterial für die direkte Umwandlung in andere funktionelle Gruppen. So konnte neben der verkürzten C7-Sialinsäure **56** das erste verkürzte Legionaminsäure-Analogon **53** hergestellt werden.

Als Ausblick bietet sich eine Fortführung der Funktionalisierung des ungesättigten Allyl- und Propargylmotivs an. So könnte beispielsweise der Allylrest mittels Oxymymercurierung oder Hydroborierung hydratisiert werden und so selektiv die C₁₀-kettenverlängerten Alkohole mit *Markovnikov*- oder *anti-Markovnikov*-Orientierung erzeugt werden. Eine Hydratisierung (Oxymymercurierung, Wacker-Addition) des Alkins hingegen würde zu einem Keton in 9-Position

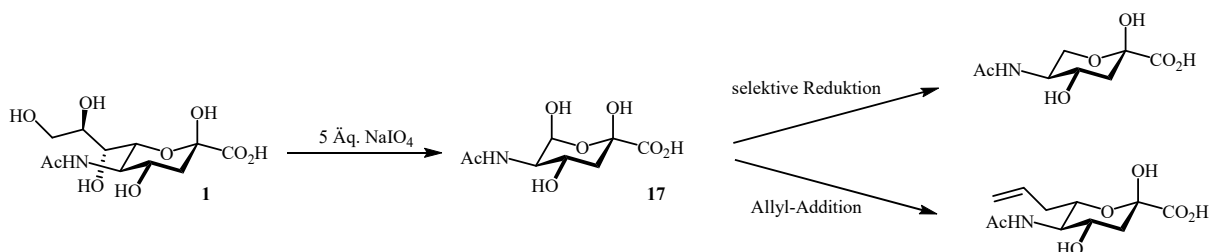
3. Allgemeiner Teil I

führen, auch dieses Motiv ist bislang unbekannt. Des Weiteren ist zwischen dem Alkin und einem Azid eine Cycloaddition mittels Click-Chemie möglich, sowohl vor als auch nach einem Sialyltransfer. Hier würden sich zahlreiche Motive verknüpfen lassen (Schema 42).



Schema 42: Ausblick zur weiteren Funktionalisierung der ungesättigten Verbindungen **23** und **25**.

Das durch oxidative Spaltung von ungeschützter Neu5Ac erzeugte Derivat **17** eröffnet ebenfalls weitere Möglichkeiten. So ließen sich über eine selektive Reduktion des Aldehyds in C6-Position die Substituenten an dieser Position komplett entfernen und eine Ketohehexose mit terminaler Säurefunktion herstellen. Auch stereoselektive Allyladditionen an das Lactol **17** wären denkbar, so dass Derivate völlig ohne Hydroxylgruppen in der Seitenkette zugänglich würden (Schema 43).



Schema 43: Ausblick zur Funktionalisierung des Derivats **17**.

Die Konfiguration des neu entstandenen Stereozentrums in C7-Position wurde über die intramolekulare Zyklisierung zum 1,7-Lacton **31** und Synthese einer 2,7-Anhydroverbindung **33** mittels 2D-NMR-Spektroskopie über den *Nuclear-Overhauser*-Effekt aufgeklärt (Abb. 29). Bei allen Homoalkylalkoholen wurde zweifelsfrei die (7*R*)-Konfiguration nachgewiesen, wie sie auch in der natürlichen Sialinsäure vorliegt.

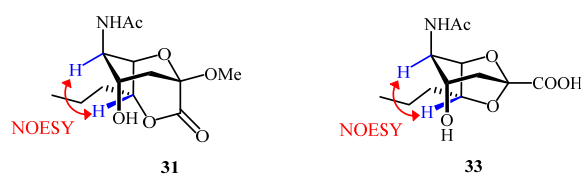


Abb. 29. 1,7-Lacton **31** und 2,7-Anhydrosialinsäure **33** zur Bestimmung der Konfiguration an C7.

Bei den Synthesen stellte sich heraus, dass die Spaltung des Methylglycosids entscheidend von der Beschaffenheit der C7-Funktionalität abhängt. Ein starker Elektronendefekt verursachte eine Resistenz gegen saure Entschützung der anomeren Position an drei Derivaten (Abb. 30). Die C7-Sialindisäure **40**, das durch Amidkupplung entstandene verzweigte Amid **38** sowie das freie Amin **51** lieferten drei weitere Sialoside mit interessanten Funktionalitäten. Zusammen mit den zehn entschützbaren Derivaten, welche zuvor alle als Methoxyglycoside vorliegen, konnten insgesamt 13 Sialoside synthetisiert werden, welche beispielsweise als potentielle Siglec-inhibitoren für weiterführende Studien in Frage kommen.

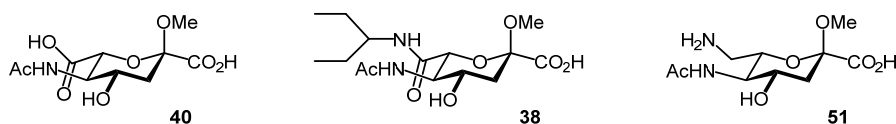
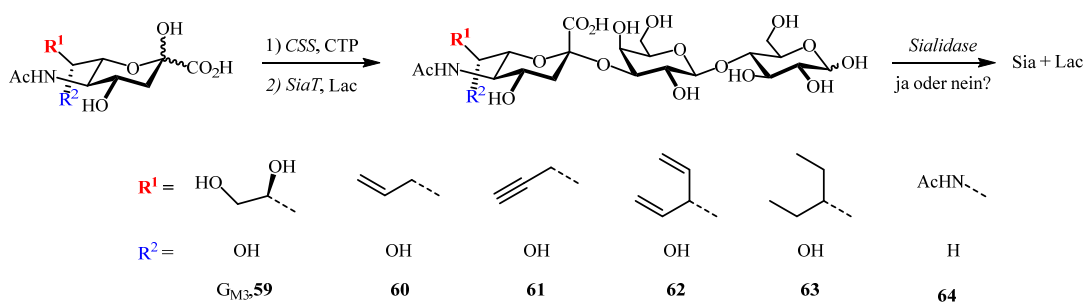


Abb. 30. Methoxylierte Sialoside.

Die zehn Neu5Ac-Derivate mit unterschiedlichen funktionellen Motiven im terminalen Kohlenstoffrückgrat wurden auf ihre Reaktionsfreudigkeit bezüglich der CMP-Aktivierung durch die CMP-Sialat-Synthetase (CSS) aus *Neisseria meningitidis* kinetisch analysiert. Hierzu wurde ein universeller pH-abhängiger Assay genutzt. Alle neuartigen Analoga wurden durch die ungewöhnlich tolerante CSS akzeptiert, auch wenn Kettenverlängerung, Verkürzung und hochpolare Carboxylgruppen sowohl die Bindungsaffinität als auch die Umsetzungsraten reduzieren. Hydrophobe aliphatische Reste wurden erstaunlich gut mit nur zwei- bis fünffacher Reduktion des k_{cat} umgesetzt.

Zur Validierung dieser Ergebnisse konnte die Eintopf-Aktivierung mit Sialyltransfer auf Lactose im präparativen Maßstab unter Verwendung der Variante A151D der α -2,3-Sialyltransferase aus *Photobacterium phosphoreum* demonstriert werden. Die Entwicklung der Variante α -2,3-SiaT_{p_{pp}}_A151D mit reduzierten hydrolytischen Aktivitäten ist Thema im Teil II dieser Arbeit. Das so synthetisierte natürliche G_{M3}-Trisaccharid **59** und fünf neue G_{M3}-Trisaccharidanaloga, welche in sehr guten Ausbeuten isoliert werden konnten, wurden schließlich eingesetzt, um die Substrattoleranz zweier bakterieller Sialidasen zu untersuchen (Schema 44).



Schema 44. Überblick der enzymatisch erzeugten G_{M3}-Trisaccharide und durchgeführter Sialidasetest.

3. Allgemeiner Teil I

Für die Derivate mit unnatürlichen Allyl- (**60**), Propargyl- (**61**) und Acetamidrest (**64**) konnte eine fast vollständige Resistenz gegenüber der Sialidase aus *Vibrio cholerae* festgestellt werden. Die Sialidase aus *Clostridium perfringens* erwies sich dagegen als toleranter gegenüber diesen Substraten.

Es wurde gezeigt, dass diese neuartige Strategie aus Verkürzung, allylischer Carboligation und Funktionalisierung ein vielseitiger Ansatz ist, der Zugang zu ungewöhnlichen Sialinsäureanaloga mit individuellen Funktionalisierungen eröffnet, welche durch konventionelle Syntheserouten von Sialinsäuren nur schwierig oder sogar unmöglich herzustellen sind.

Diese neuen Sialinsäurederivate und Analoga sowie die *neo*-Sialokonjugate, die daraus hervorgehen, werden als synthetische Forschungs sonden von Interesse für weitere glyco-biologische Studien sein – wie z.B. die Untersuchung der modifizierten Affinität gegenüber Siglecrezeptoren als Immunzellen-steuernde Liganden.^[177, 270] Im weiteren Verlauf könnte die Entwicklung von Inhibitoren für virale Pathogene folgen.

4. Allgemeiner Teil II:

2,3-Sialyltransferase aus *Photobacterium phosphoreum* – Kontrolle der Hydrolyseaktivität mittels gelenkter Evolution

4.1. Einleitung

4.1.1. 2,3-Sialyltransferase aus *Photobacterium phosphoreum*

Sialyltransferasen (SiaT) katalysieren den regio- und stereospezifischen Transfer von CMP-aktivierter Sialinsäure (typischerweise CMP-Neu5Ac) auf eine geeignete Glycanakzeptor-Einheit unter Inversion der Konfiguration. Für synthetische Zwecke ist die Einteilung der SiaT nach der gebildeten glycosidischen Verknüpfung in α 2,3-SiaT (EC 2.4.99.4), α 2,6-SiaT (EC 2.4.99.1) oder α 2,8-SiaT (EC 2.4.99.8) entscheidend. Hierbei werden bakterielle SiaT gegenüber Säugetier-SiaT bevorzugt, da sie unter anspruchsvollen Prozessbedingungen robuster und einfacher zu exprimieren sind.^[123]

Die 2,3-SiaT aus dem biolumineszenten marinen Bakterium *Photobacterium phosphoreum* JT-ISH-467 (2,3SiaT_{pph}) gehört zur GT80-Familie und bildet ausschließlich α 2,3-Sialylverknüpfungen.^[133] Mit einem Radiomarkierungsassay wurde gezeigt, dass diese SiaT eine außergewöhnlich breite Akzeptorsubstrattoleranz aufweist, die neben verschiedenen galactosylierten Oligosacchariden auch Methyl- α / β -glycoside von D-Galactose, D-Glucose, D-Mannose and D-Fucose beinhaltet.^[133] Die Röntgenkristallstruktur mit gebundenem CMP ist bekannt.^[284] Diese Voraussetzungen prädestinieren die α 2,3-SiaT_{pph} dazu, die Substrattoleranz modifizierter Sialinsäurederivate weiter zu untersuchen und spezifisch α 2,3-verknüpfte Sialoside herzustellen.

Für diese Arbeit wurde ein verkürztes synthetisches Gen verwendet,^[285] welches ein am N-Terminus um 24 Aminosäuren verkürztes Protein der 2,3-SiaT_{pph} codiert.^[133] Die Verkürzung um die N-terminale lipophile Signalsequenz vereinfacht die Handhabung des Proteins und ist für die Katalyse vernachlässigbar, wie u. a. in Vorarbeiten des Arbeitskreises Fessner gezeigt wurde.^[285] Ein N-terminales His₆-tag ermöglicht die Aufreinigung und Isolierung des rekombinanten Enzyms mit Hilfe von Ni-Affinitätschromatographie nach Expression aus *E. coli* BL21(DE3). Dieses verkürzte Enzym wird nachfolgend als natives Enzym (NE) bezeichnet, um eine Verwechslung mit nicht verkürztem Wildtyp zu vermeiden.

Es gab bereits einige Versuche, die hydrolytischen Nebenreaktionen von 2,3- und 2,6-SiaT aus *Pasteurella multocida*,^[286] *Photobacterium species*^[287-288] und *Photobacterium phosphoreum*,^[289] *Pasteurella dagmatis*^[290-291] oder *Photobacterium damsela*^[292] mittels einfacher Zugabe organischer Lösemittel, pH-Wert-Verschiebung oder rationaler gelenkter Mutagenese der *Active Site* zu kontrollieren. Die meisten Versuche, Nebenreaktionen mittels

gelenkter Mutagenese zu unterdrücken, bringen jedoch unglücklicherweise eine drastische Reduktion der Transferaktivität mit sich.^[286, 291] Für die 2,3-SiaT_{pph} wurde daher ein struktur-basierter Protein-Engineering-Ansatz genutzt, um die Transferelektivität des Enzyms zu verbessern, indem selektiv nur die Sialidase- und Hydrolyse-Aktivitäten unterdrückt werden.

4.1.2. Protein-Engineering-Ansatz und Analysemethoden

Die hochpolare Beschaffenheit und große Molekülstruktur sowohl von CMP-Sia wie auch des Sia-akzeptierenden Glycansubstrats, die im Übergangszustand in einer definierten Position im Enzym fixiert werden müssen, benötigen ein komplexes Netzwerk aus Wasserstoffbrücken, welches zu den Proteinresten in der aktiven Tasche ausgebildet wird. Um die Bindungsverhältnisse zu analysieren, ist eine Röntgenkristallstruktur mit gebundenen Substraten nötig, damit Aminosäurereste, die während des katalytischen Transfers in direktem Kontakt mit den Substraten stehen, identifizierbar sind. Für die verkürzte 2,3-SiaT_{pph} steht eine Röntgenkristallstruktur mit gebundenem CMP zur Verfügung, die es möglich macht, die Aminosäurereste zu identifizieren, aus denen die Phosphatbindestelle besteht und die Kontakt zu brückenbildenden Wassermolekülen haben oder die Kontakt zum Akzeptorsubstrat Lactose haben könnten. Auf Grundlage dieser Struktur wurde ein 3D-Modell konstruiert, welches als Grundlage für einen gelenkten Evolutions-Ansatz diente, in dem 13 Aminosäurereste ausgewählt wurden.

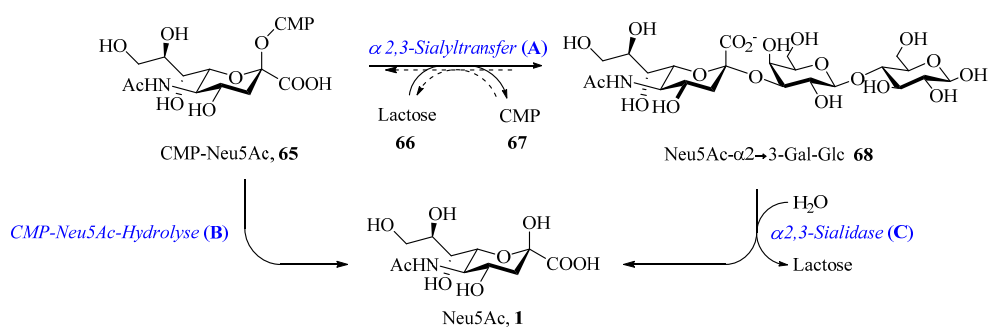
Für das Screening und die Erhebung der kinetischen Daten wurde ein kontinuierlicher colorimetrischer Assay angepasst, dessen Prinzip auf einem pH-Shift während der Freisetzung von CMP beruht, und der im Arbeitskreis *Fessner* entwickelt wurde.^[114]

Die konkurrierende Sialidaseaktivität (C, Schema 45) ist im Vergleich zum Transfer sehr langsam, weshalb die Analyse direkt in einer *in situ*-NMR-Studie durchgeführt wurde.

4.1.3. Multifunktionalität von Sialyltransferasen

Viele 2,3- und 2,6-SiaT-Enzyme der GT80-Familie zeigen eine Multifunktionalität. Neben dem gewünschten Sialyltransfer (A) wurden CMP-Neu5Ac-Hydrolyse (B, Sialyltransfer auf Wasser oder Phosphodiester-Hydrolyse) und Sialidase (C, hydrolytische Spaltung der Sialosid-Verknüpfung) belegt (Schema 45).^[132-133, 135, 293-296] Die Reversibilität des Sialyltransfers (A) wurde als Grund für trans-Sialidase-Aktivität (Sialyltransfer zwischen Sialosiden) ausgemacht und läuft über eine transiente CMP-Neu5Ac-Bildung ab.^[134] Der reverse Sialyltransfer (trans-Sialidase-Aktivität) / CMP-Neu5Ac-Hydrolyse (d. h. retro-A + B) der verwandten bakteriellen 2,6-SiaT wurde erst kürzlich dazu verwendet, regiospezifisch α 2,6-verknüpfte Sialokonjugate zu spalten und zu entfernen^[297] und konnte mittels Protein-

Engineering optimiert werden.^[298] Für syntheseorientierte Zwecke sind diese Nebenaktivitäten jedoch unerwünscht, da das CMP-aktivierte Startmaterial abgebaut sowie das Transferprodukt gespalten und somit die Ausbeute des gewünschten Transferprodukts verringert wird. Die ungewünschte Hydrolyse-Aktivität kann zwar durch eine Erhöhung der relativen CTP-Äquivalente kompensiert werden, macht eine präparative Synthese aber weniger wirtschaftlich. Um die relative Selektivität des Transfers gegenüber der Hydrolyse zu steigern, wurde ein strukturbasierter Protein-Engineering-Ansatz genutzt, um Einblicke in die Bindungsverhältnisse zu bekommen und den Ursprung des unvollständigen Transfers nachzuvollziehen.

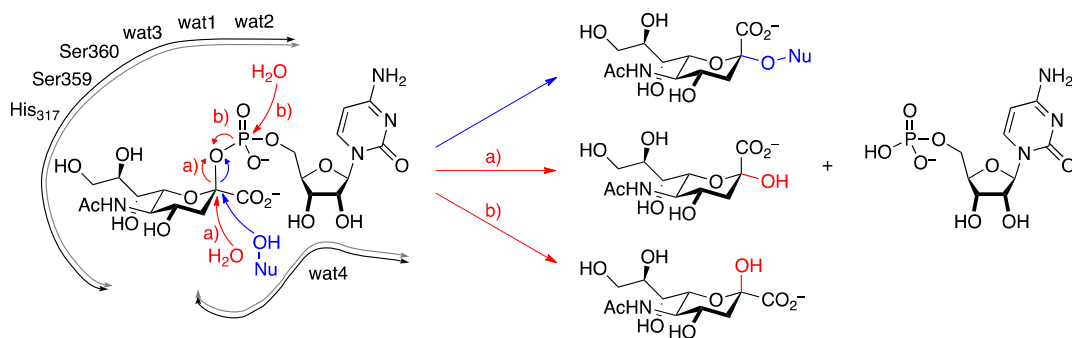


Schema 45. Katalysierte Reaktionen multifunktionaler SiaT am Beispiel einer α 2,3-SiaT.
A: Sialyltransfer, B: Substrathydrolyse, C: Produkthydrolyse.

4.1.4. Reaktionsbedingungen in der *Active Site*

Die unerwünschte Hauptaktivität, die unterdrückt werden soll, ist die der Hydrolyse von CMP-Neu5Ac (B), welche einem Sialyltransfer auf Wasser anstatt auf die 3-OH Gruppe der Galactosyleinheit entspricht. Wasser als alternatives Nukleophil ist allerdings unvermeidbar in Enzymreaktionen, da es als Lösemittel im großen Überschuss vorhanden ist. Für eine bessere Diskriminierung der Hydroxylgruppe des Zuckers als Nukleophil, welche leicht basischer und somit ein weiches Nukleophil als Wasser darstellt, wäre daher zum einen eine bessere Substratbindung wünschenswert. Zum anderen sollte der verfügbare Platz für Wasser in der aktiven Tasche minimiert und eine unspezifische Aktivierung des Wassers als Nukleophil unterdrückt werden.

Die Effekte aufgrund von Aminosäuremutationen in direktem Kontakt zu Wasser oder Substrat sind schwierig abzuschätzen und möglicherweise unerwartet, da das Wasserstoffbrückennetzwerk zu den hochpolaren Substraten und die Umverteilung der Ladungen aufgrund des nukleophilen Angriffs auf das C2-Atom der Sialyleinheit komplex ist. Die Dissoziation der anionischen Phosphorylabgangsgruppe und simultane Inversion der Sialylkonfiguration mit konsequentem Positionswechsel der C1-Carboxylgruppe (Schema 46) erfordern eine erhebliche Flexibilität der aktiven Tasche.^[299-301]



Schema 46. Mechanismus des Sialyltransfers (blauer Pfad) und mögliche Hydrolysewege (rot).

4.2. Active Site-adressierte Sättigungsmutagenese

4.2.1. Erstellung eines Homologie-3D-Modells für 2,3-SiaT_{pph}

Zur Identifizierung der substratbindenden Aminosäurereste bietet die 3D-Kristallstruktur der 2,3-SiaT_{pph} mit gebundenem CMP (PDB Eintrag 2ZWI) eine Orientierung. Da allerdings sowohl die elektrophile Sialyleinheit als auch das nukleophile Galactosid fehlen, ist es für eine detaillierte Analyse unzureichend. *Iwatani et al.* argumentierten bereits in der Publikation zur Kristallstruktur, dass diese „geöffnete“ Proteinstruktur wahrscheinlich nicht der aktiven Konformation entspricht.^[284] Daher wurde ein 3D-Modell konstruiert, in welchem die Struktur der originalen 2,3-SiaT_{pph} mit der geschlossenen Struktur der 2,3-SiaT aus *Pasteurella multocida* mit Hilfe des Alignment-Tools von *PyMOL* übereinander gelegt wurden. Dieses Modell erlaubte eine Imitation der wahrscheinlichsten Orientierung von gebundenem CMP-3F-Neu5Ac (PDB-Eintrag 2IHZ)^[302] und α -Lactose (PDB-Eintrag 2ILV)^[302] in der *Active Site* der 2,3-SiaT_{pph}. Die Positionierung der Lactose aus der Kristallstruktur 2ILV wurde im vorliegenden Alignmentmodell ausgesucht, da das benötigte 3'-OH-Nukleophil korrekt für die nukleophile Trajektorie zur Sialyleinheit orientiert ist. In der 2IHZ-Struktur ist Lactose dagegen in einer unproduktiven Orientierung gebunden.

Aufgrund der hochkonservierten Nukleotidbindestelle innerhalb der Proteinfamilie^[133, 303] wurde eine besondere Gewichtung auf die Angleichung der korrespondierenden CMP-Struktureinheiten gelegt, um eine optimale Orientierung zu gewährleisten. Diese Anordnung offenbarte nunmehr die Positionierung der Substrate CMP-3F-Neu5Ac und α -Lactose in ihrer reaktiven Konformation relativ zu den Proteinresten der 2,3-SiaT_{pph}-*Active Site* und erlaubte, die direkten Protein-Substrat-Wechselwirkungen zu analysieren (Abb. 30).

Auf Basis dieses Modells war es nun möglich, individuelle Abstände zwischen Substrat und korrespondierenden AS-Resten im Einzelnen zu untersuchen (Tabelle 7). Dies sollte eine grobe Abschätzung der Bindungsverhältnisse und der konformativen Änderungen beim Schließen der aktiven Tasche zulassen. In der Kristallstruktur der 2,3-SiaT_{pph} sind interessanterweise auch fixierte Wassermoleküle (wat 1-4) zu finden, die ein kompaktes

Wasserstoffbrückennetzwerk um die glycosidische Phosphateinheit bilden. Diese könnten die großen strukturellen und konformativen Änderungen während des katalytischen Vorgangs erklären, bieten aber auch die Möglichkeit, als Nukleophil zu agieren und wurden daher ebenfalls auf räumliche Nähe zu AS-Resten analysiert.

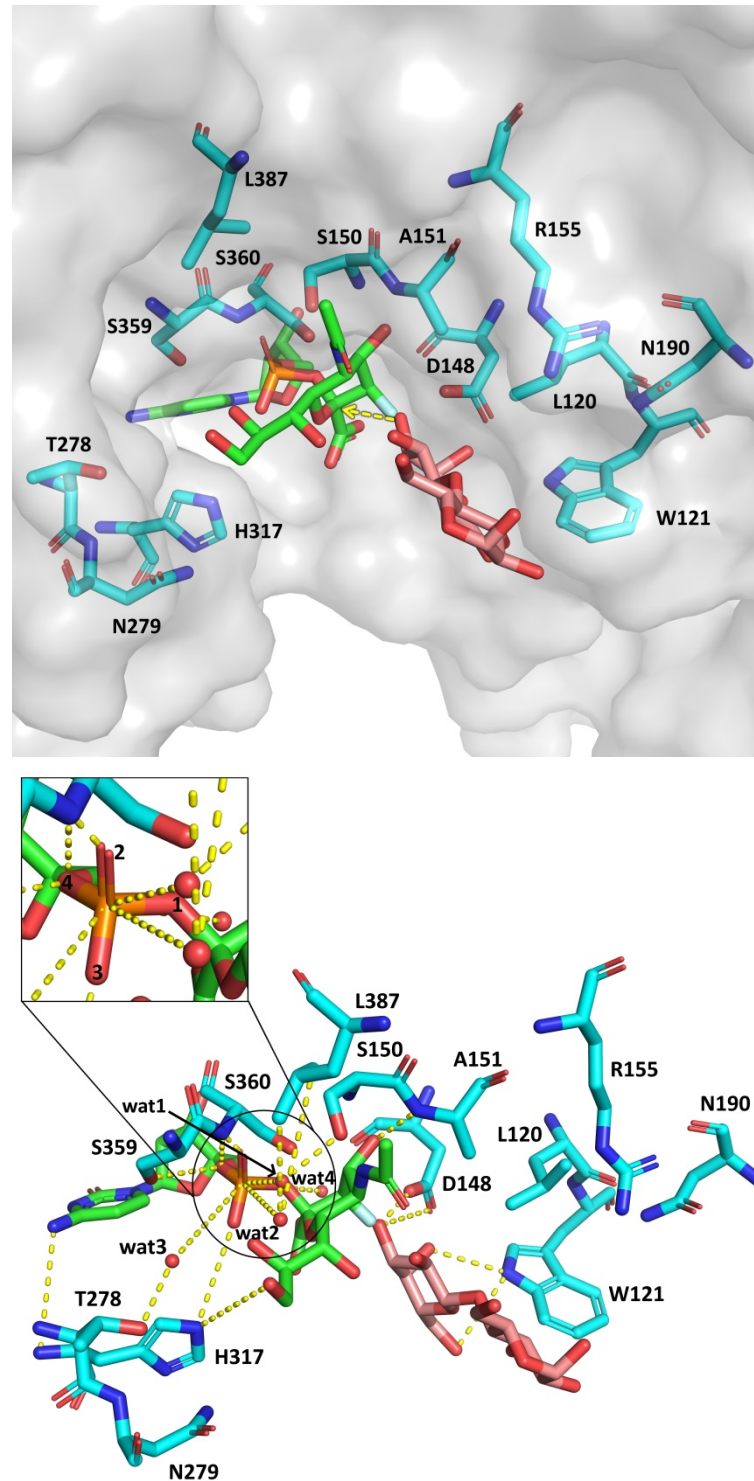


Abb. 31. Homologie-3D-Modell aus dem Alignment von *Photobacterium phosphoreum* JT-ISH-467 (PDB-Code 2ZWI) mit CMP-3F-Neu5Ac (PDB-Code 2IHZ) und α -Lactose (PDB-Code 2ILV), gebunden in der SiaT aus *Pasteurella multocida*. Mögliche polare Kontakte zu Substraten und Kristallwasser werden durch gestrichelte gelbe Linien visualisiert. Die Darstellungen wurden mit PyMOL erstellt.

4. Allgemeiner Teil II

Tabelle 7. Analyse der Abstände zwischen 13 selektierten Aminosäuren und Substraten oder Wasser in der aktiven Tasche sowie zwischen Wasser und den Zentren des nukleophilen Angriffs während des Transfers oder potentieller Hydrolyse (jeweils Sialosid C2 oder Phosphat).

AS-Position / degenerierendes Codon	Kontaktabstände [Å] ^{a)}					
L120 / NNK	CD2, GalO2: 4.7	CD2, GalO3: 5.0	CD2, GalO4: 4.1			
W121 / NNK	NE1, GalO4: 3.4	NE1, GalO5: 3.7	NE1, GalO6: 3.6			
D148 / NNK	OD2, GalO3: 2.1	OD2, GalO4: 2.4	OD2, SiaO4: 3.4	OD2, wat4: 4.5		
	OD1, GalO3: 3.7	OD1, GalO4: 1.9	O, SiaO4: 4.0	O, wat4: 2.7		
S150 / WVC	OG, SiaO1: 4.8	OG, SiaO4: 3.5	OG, PO2: 4.2	OG, wat1: 2.8	OG, wat2: 4.6	
	N, SiaO1: 4.3	N, SiaO4: 2.1	OG, SiaN5: 1.7			
A151 / NNK	N, SiaO10: 3.9	N, SiaN5: 3.0	N, SiaN5: 3.0		CB, GalO3: 4.3	
R155 / NNK	NH2, GalO1: 6.5	NE, GalO2: 7.8	NE, SiaO10: 7.3	NH2, GlcO1: 5.1		
N190 / NNK	ND2, GalO1: 7.2	ND2, GalO2: 9.1	ND2, GlcO1: 6.4			
T278 / WVC	OG1, wat3: 2.8	OG1, wat2: 6.1	OG1, SiaO9: 4.7	OG1, SiaO8: 5.5		
N279 / WVC	N, SiaO9: 6.6	O, SiaO9: 7.0	ND2, SiaO9: 5.8	OD1, SiaO9: 5.5		
H317 / NNK	NE2, PO3: 4.1	NE2, PO4: 6.3	NE2, PA: 5.6	NE2, SiaO8: 4.3	NE2, SiaO9: 5.4	N, CMPN4: 4.7
S359 / WVC	OG, PO2: 3.5	OG, PO3: 3.7	OG, PO4: 3.7	OG, PO4: 3.9	OG, wat3: 4.0	
					N, wat3: 4.3	N, wat2: 4.8
S360 / WVC	N, PO2: 1.3	N, PO3: 3.7	N, PA: 2.7	N, PO4: 3.4	N, wat1: 3.6	N, wat2: 5.6
	OG, PO2: 1.8	OG, PO3: 3.4	OG, PA: 2.2	OG, PO4: 3.2	OG, wat1: 3.8	OG, wat4: 5.3
	OG, PO1: 1.8					
L387 / NNK	CD2, wat1: 4.7	CD2, wat2: 4.0		CD1, SiaC11: 4.1	CD2, SiaC11: 5.2	CD2, PA: 8.7

Abstände zwischen Wassermolekülen und Phosphat/SiaC2

PA, wat1: 4.4	PA, wat2: 6.4	PA, wat3: 5.7	PA, wat4: 6.2
SiaC2A, wat1: 5.1	SiaC2A, wat2: 6.9	SiaC2A, wat3: 7.2	SiaC2A, wat4: 4.8

a) Basierend auf dem 3D-Alignment-Modell und mit *PyMOL* analysiert.

Deskriptoren beinhalten: CD2 (Kontaktstelle innerhalb der AA, Kontaktatom unterstrichen), GalO2 (Kontaktstelle des Substrats oder Wassers); CD2: *PyMOL* Atom-Deskriptor. Zur Klarheit wurden die *PyMOL*-Deskriptoren mit Sia für Neu5Ac und Gal für die Galactosyleinheit und Glc für die Glucoseeinheit in Lactose ergänzt.

4.2.2. Sequenzalignment und Auswahl der Mutagenese-Kandidaten

Für eine sorgfältige Auswahl der Aminosäurereste, die im Mutagenese-Ansatz berücksichtigt werden sollten, wurde zusätzlich ein Sequenzalignment verschiedener SiaT durchgeführt (Tabelle 8), um Korrelationen zwischen hochkonservierten Sequenzmotiven und den rationalen Kriterien auf Basis des 3D-Modells zu identifizieren. *Yamamoto et al.* identifizierten drei hochkonservierte Sequenzmotive in der GT80-Familie.^[303] Sie vermuteten, dass die sogenannten YDDGS-, FKGHP- und SS-Motive eine entscheidende mechanistische Rolle bei der Transferreaktion, Protonenverfügbarkeit und Bindungssituation spielen.

Tabelle 8. Partielles Protein-Sequenzalignment für SiaT der GT80-Familie im Bereich der Reste, die in Substratkontakt stehen. Zum Alignment wurde das *ClustalΩ*-Tool der Universität Tübingen verwendet.^[304]

SiaT Quelle	Verknüpfung	Accession-Nummer		YDDGS Motiv	
<i>P. phosphoreum</i> (JT-ISH-467)	α2,3	BAF63530	G N T L W ¹²¹	L N F Y ¹⁴⁶ D D G S ¹⁵⁰ A E Y V R ¹⁵⁵ L Y	F D N ¹⁹⁰
<i>Photobacterium</i> sp. (JT-ISH-224)	α2,3	BAF92025	G N T L W ¹²¹	L N F Y ¹⁴⁶ D D G S ¹⁵⁰ A E Y V R ¹⁵⁵ L Y	F E N ¹⁹⁰
<i>Photobacterium</i> sp. (JT-ISH-224)	α2,6	BAF92026	S N T A H ²⁰⁴	I D L Y ²³⁰ D D G S ²³⁴ A E Y V N ²³⁹ L Y	E D T ²⁷¹
<i>Vibrio</i> sp.	α2,3	BAF91160	G N T L W ¹¹⁵	L H F Y ¹⁴⁰ D D G S ¹⁴⁴ A E Y V R ¹⁴⁹ I Y	F K N ¹⁸⁴
<i>Pasteurella dagmatis</i>	α2,3	AFY98851	L N I A H ⁸⁵	L N L Y ¹¹² D D G T ¹¹⁶ M E Y V D ¹²¹ L E	F D N ¹⁵⁴
<i>Pasteurella multocida</i>	α2,3/α2,6	AA89061	L N I A H ¹¹²	L N L Y ¹³⁹ D D G S ¹⁴³ M E Y V D ¹⁴⁸ L E	F D N ¹⁸¹
<i>Photobacterium damsela</i>	α2,6	BAA25316	T N T A H ²⁰¹	I S L Y ²²⁷ D D G S ²³¹ S E Y V S ²³⁶ L Y	P D A ²⁶⁸
<i>Photobacterium leiognathi</i>	α2,6	BAF91416	T N T G H ²⁰¹	I N L Y ²²⁷ D D G S ²³¹ A E Y V S ²³⁶ L Y	S E K ²⁶⁸
<i>Haemophilus ducreyi</i>	α2,3	AAP95068	L N L F H ⁹⁶	L Q L Y ¹²³ D D G S ¹²⁷ E G I V T ¹³² Q H	V P N ¹⁶⁶

Fortsetzung Tabelle 8.

SiaT Quelle	Verknüpfung	Accession-Nummer		FKGHP Motiv	SS Motiv	
<i>P. phosphoreum</i> (JT-ISH-467)	α2,3	BAF63530	I G T N ²⁷⁹	F K G H P ³¹⁸	G G M G S S ³⁶⁰ V F	L ³⁸⁷ I Q V M
<i>Photobacterium</i> sp. (JT-ISH-224)	α2,3	BAF92025	V G T N ²⁷⁹	F K G H P ³¹⁸	G G M G S S ³⁶⁰ V F	L ³⁸⁷ I Q V M
<i>Photobacterium</i> sp. (JT-ISH-224)	α2,6	BAF92026	T G T T ³⁶³	F K G H P ⁴⁰⁶	A G I A S S ⁴⁵⁰ L Y	L ³⁸⁷ V Q V M
<i>Vibrio</i> sp.	α2,3	BAF91160	I G S N ²⁷³	F K G H P ³¹²	G G M G S S ³⁵⁴ V F	L ³⁸⁷ I Q V M
<i>Pasteurella dagmatis</i>	α2,3	AFY98851	T G T T ²⁴¹	F K G H P ²⁸⁵	G G V A S S ³²⁹ L Y	Y ³⁸⁷ V R V M
<i>Pasteurella multocida</i>	α2,3/α2,6	AA989061	T G T T ²⁶⁸	F K G H P ³¹²	G G V A S S ³⁵⁶ L Y	Y ³⁸⁷ V K V M
<i>Photobacterium damsela</i>	α2,6	BAA25316	T G T T ³⁵⁹	F K G H P ⁴⁰²	A G I A S S ⁴⁴⁶ L Y	L ³⁸⁷ V Q V M
<i>Photobacterium leiognathi</i>	α2,6	BAF91416	T G T T ³⁵⁹	F K G H P ⁴⁰²	G G I A S S ⁴⁴⁶ L Y	L ³⁸⁷ V Q V M
<i>Haemophilus ducreyi</i>	α2,3	AAP95068	T G T T ²⁵³	I K G H A ²⁹⁷	G G F A S T ³⁴¹ S Y	L ³⁸⁷ M Y S L

Aus dem Sequenzalignment wurden die Positionen S150, A151 und R155 innerhalb des YDDGS-Motivs ausgewählt, da sie eine gewisse Variabilität trotz der großen Konservierung innerhalb der GT80-Familie zeigen. Beispielsweise ist in *P. dagmatis* Position S150 natürlicherweise durch ein Threonin¹¹⁶ ersetzt und es wurde eine Beteiligung an der Kontrolle der Stereoselektivität beim Sialyltransfer sowie am Level der Sialidaseaktivität gezeigt.^[294] Position A151 ist in *P. multocida* und *P. dagmatis* gegen Methionin^{144/117} oder in *P. damsela* gegen Serin²³² ausgetauscht. Der Kontakt von S150 zum Wassermolekül 1 (Abb. 31), sowie die geringe Distanz zur Sialinsäure (1.7-4.3 Å) könnten einen Einfluss auf den Reaktionsverlauf haben. Die Motive FKGHP und SS sind dagegen hochkonserviert mit nur einer kleinen Variation in der Sequenz des Enzyms aus *H. ducreyi*. Das SS-Motiv wurde dennoch im Mutationsansatz aufgrund der sehr geringen Distanz zum Phosphat (1.3-3.9 Å, siehe Tabelle 7) und den Wassermolekülen 1 bis 4 (3.6-5.6 Å) sowie aufgrund einer möglichen Beteiligung bei der Aktivierung von Wasser als konkurrierendem Nukleophil zu Lactose ausgewählt. Ebenfalls mit aufgenommen wurden die gegensätzlichen komplett konservierten Reste D148 und H317, die von *Iwatani et al.* jeweils als katalytische Base und Säure vorhergesagt wurden.^[284] Mit den geringsten Abständen von 1.9-2.4 Å zum Galactose-rest und 3.4-4.0 Å zum Sialinsäurerest für D148 sowie 4.1-5.6 Å zum Sialylphosphatrest von CMP-Neu5Ac für H317 sind diese beiden Reste essentiell bei der Interaktion für Bindung und Koordination zwischen und zu den Substraten. Etwas weiter entfernt, aber dennoch in Kontakt zur Sialinsäureinheit, sind T278 und N279. Des Weiteren hat T278 Kontakt zum Wassermolekül 3. Mit einer Entfernung von 8.7 Å zum Phosphat ist L387 relativ weit entfernt vom Reaktionszentrum des Transfers bzw. der Hydrolyse, aber mit 4.1-5.2 Å zur Neu5Ac-Acylgruppe noch in Substratkontakt. Die Seitenkette ist außerdem zu den Wassermolekülen 1 und 2 orientiert. Reste L120 und W121 wurden berücksichtigt, da sie im Eingang der aktiven Tasche lokalisiert sind und mit Abständen von 3.4-5.0 Å zu Lactose mehrere Kontaktstellen haben. Daher kommen sie für einen potentiellen Einfluss auf die korrekte Positionierung der Galactosyleinheit beim Transferprozess der Sialylgruppe in Frage.

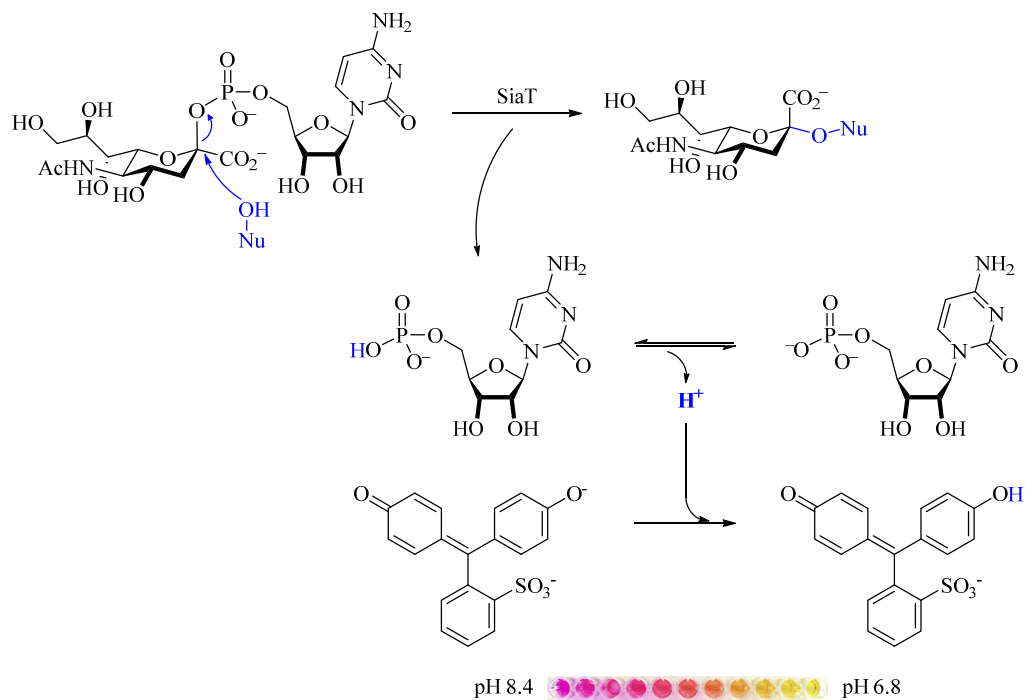
Mit Auswahl dieser 13 Positionen als Kandidaten (siehe Tabelle 7) war auch die Definition einer Strategie für die Zufallsmutagenese nötig, um die Anzahl der Codons möglichst gering und die Bibliotheksgröße möglichst handhabbar zu gestalten. Zusammenliegende Positionen (278/279 und 359/360) wurden aus Effizienzgründen jeweils gemeinsam mutiert. Für die

Reste S, T sowie N279 wurde das degenerierte Codon WVC (welches für N, T, S und Y codiert) bestimmt, während alle anderen unter Verwendung des NNK-Codons (welches für alle 20 proteinogenen AS codiert) mutiert wurden. Alle 11 Plasmidbibliotheken wurden in BL21-Tuner-Zellen transformiert, in welchen die Galactosidaseaktivität praktisch abwesend ist, so dass rohes Lysat nicht mit Assaykomponenten wechselwirken kann. Für jede Einzelmutanten-Bibliothek wurden 96 Kolonien gepickt, während für die WVC-Doppelmutanten 192 Kolonien gepickt wurden. Dies garantiert in jedem Fall eine Abdeckung von 95%. Insgesamt wurden 1248 Kolonien gepickt und analysiert.

4.3. Entwicklung eines kontinuierlichen, photometrischen, pH-abhängigen Assays zur Analyse von Sialyltransferasen

Die meisten bisher verwendeten Methoden zur Untersuchung der Sialyltransferaseaktivität in einem Assay sind diskontinuierlich und erfordern das Stoppen der katalytischen Reaktion mit nachfolgender Produktanalyse.^[305] Das Stoppen der Transferreaktion in bestimmten Zeitintervallen ist jedoch zeitaufwendig und umständlich. Zusätzlich ist das Messen von Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten aufgrund der Verzögerung beim Reaktionsabbruch fehleranfällig und bereitet Probleme. Die meist im Anschluss verwendete HPLC-Analyse von fluoreszenzmarkierten Substraten^[286] ist indirekt und Silica-Chromatographie kann die chemische Spaltung der empfindlichen CMP-Neu5Ac oder 2,3-Sialylbindung zur Folge haben. Ein weiterer Nachteil von markierten Surrogatsubstraten ist eine mögliche Abweichung des kinetischen Verhaltens im Vergleich zu den nativen Substraten.^[306] Als Methoden, um Sialyltransferase- und Sialidase-Assays zu stoppen, wurden u. a. starke pH-Wert-Änderung oder Hitzeschock bei 100 °C eingesetzt.^[289, 307] Beide Methoden können jedoch die Spaltung des Produkts und des Substrats zur Folge haben oder sogar ungeeignet zum Beenden der katalytischen Reaktion sein. Der einzige kontinuierliche Assay für SiaT-Aktivität basiert auf der indirekten Detektion von CMP-Freisetzung mittels enzymatischem Verbrauch von NADPH, welcher aber für die Analyse der Sialidaseaktivität unbrauchbar ist.^[308]

Im Gegensatz zu HPLC-, radioaktiven Markierungs-, Kapillarelektrophorese- oder ESI-MS-Assays, die teure und aufwendige Instrumente benötigen, sind Assays, die auf Änderungen des pH-Wertes als Folge einer Reaktion basieren, einfach im Gebrauch für kontinuierliche Messungen^[309] und universell, da sie unabhängig von Substratvarianten sind. Während des Transfers der Sialylgruppe aus CMP-Neu5Ac wird ein Proton als Konsequenz der CMP-Bildung freigesetzt, was zu einem sinkenden pH-Wert des Reaktionsmediums führt. Diese Protonenfreisetzung kann über die Farbänderung eines passenden pH-Indikators detektiert und unter geeignet kontrollierten Bedingungen quantifiziert werden (Schema 47).



Schema 47. Funktionsprinzip des pH-abhängigen Assays zur Untersuchung der Sialyltransferaseaktivität.

Hierfür wurde der Assay für die Analyse von CMP-Sialat-Synthetase, der im Arbeitskreis *Fessner* zuvor entwickelt wurde,^[114] adaptiert und für die Bedingungen der Sialyltransferase optimiert. Es wurde so ein simpler colorimetrischer pH-Assay für die Messung der Aktivität der Sialyltransferase entwickelt.

4.3.1. Bestimmung der allgemeinen Assaybedingungen

Die 2,3-Sialyltransferase aus *P. phosphoreum* besitzt eine sehr breite Aktivitätsspanne bei einem pH-Wert zwischen 5 und 11 und in einem Temperaturbereich zwischen 15 und 35 °C.^[133, 289] Da im sauren Milieu die Gefahr einer chemischen Spaltung (Hydrolyse) des empfindlichen CMP-Neu5Ac erhöht ist und bei multifunktionalen Sialyltransferasen die Zunahme der Sialidaseaktivität unterhalb von pH 6.0 bekannt ist, wurde der Startpunkt des Assays auf pH 8.0 festgelegt, um beschriebene Effekte so weit wie möglich auszuschließen. Der pH-Wert des Reaktionssystems sinkt in 2 mM Tris-Puffer während des Transfers von 8.0 auf ca. 7.0. Im bereits entwickelten CSS-Assay wird Kresolrot als Indikator mit einem Startpunkt von pH 8.5 eingesetzt. Da Kresolrot bereits bei pH 7.0 das Ende seines Umschlagsbereiches erreicht, wurde Phenolrot als neuer Indikator gewählt. Phenolrot besitzt einen Umschlagsbereich bei pH 8.4-6.8 und hat einen etwas niedrigeren pK_a von 7.4. Es hat einen hohen Absorptionskoeffizienten ($\Delta\varepsilon = 56\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bei 557 nm) und gewährleistet somit eine hohe Assaysensitivität.^[310] Die bereits zuvor eingesetzte minimale Pufferkon-

zentration von 2 mM erwies sich weiterhin als geeignet. Höhere Pufferkonzentrationen von beispielsweise 50 mM, wie sie in präparativen Experimenten zum Einsatz kommen, würden einen messbaren Farbumschlag unterdrücken. Gänzlich ohne Puffer ist das System zu fehleranfällig, da es bereits auf minimalen Änderungen sehr empfindlich reagiert. Phenolrot ist ein Triphenylmethanfarbstoff (siehe Schema 47) und enthält zwei Hydroxylgruppen und ein instabiles Sulfonolacton. In wässrigem Medium liegt die gelb gefärbte chinoide Form vor, in der dieser Ring gespalten ist. Im basischen Milieu wird die phenolische Hydroxylgruppe deprotoniert, wodurch der Indikator eine rotviolette Färbung zeigt. Für eine verlässliche Aktivität, die instrumentell gut quantifizierbare und reproduzierbare Transfergeschwindigkeiten liefert, wurden 30 °C gewählt.

4.3.2. Bestimmung des Absorptionsmaximums und der Konzentration von Phenolrot

Die Bestimmung des Absorptionsmaximums von Phenolrot erfolgte per photometrischer Messung. Im Basischen liegt das Absorptionsmaximum bei 560 nm und überschneidet sich nicht mit dem im Sauren bei 430 nm. Dies ist Voraussetzung, um eine sensitive Abnahme der optischen Dichte während der Messung zu detektieren. Die Messung der Abnahme (bei Start im Basischen pH 8.0 und Absorption bei 560 nm) ist allgemein sensitiver als die Messung der Zunahme (im Sauren bei 430 nm), da das Detektionslimit des Geräts hier eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Konzentration des Indikators Phenolrot wurde vergleichbar zur Konzentration von Kresolrot im CSS-Assay (0.026 mM) gewählt. Bei einer Konzentration von 0.028 mM (2 µL pro well einer 10 mg L⁻¹-Stammlösung) lag der Startpunkt der instrumentellen gemessenen optischen Dichte im Bereich von OD 0.7. Da der instrumentell sensitivste Bereich zwischen OD 0.9 und 0.3 liegt, ist somit ein verlässlicher Messbereich gewährleistet.

4.3.3. Kalibriergerade und Messbereich

Um die Korrelation der Menge an freigesetzten Protonen zur Absorption des Indikators zu erhalten, wurde eine Kalibriergerade durch Zugabe von HCl zur gesamten Reaktionsmischung, jedoch ohne Lactose erstellt (Abb. 32). Die Kalibriergerade wurde bei 560 nm mit einer Protonenkonzentration zwischen 0 und 0.8 mM aufgenommen. Dies entspricht der Konzentration an Protonen, die während des Transfers produziert werden.

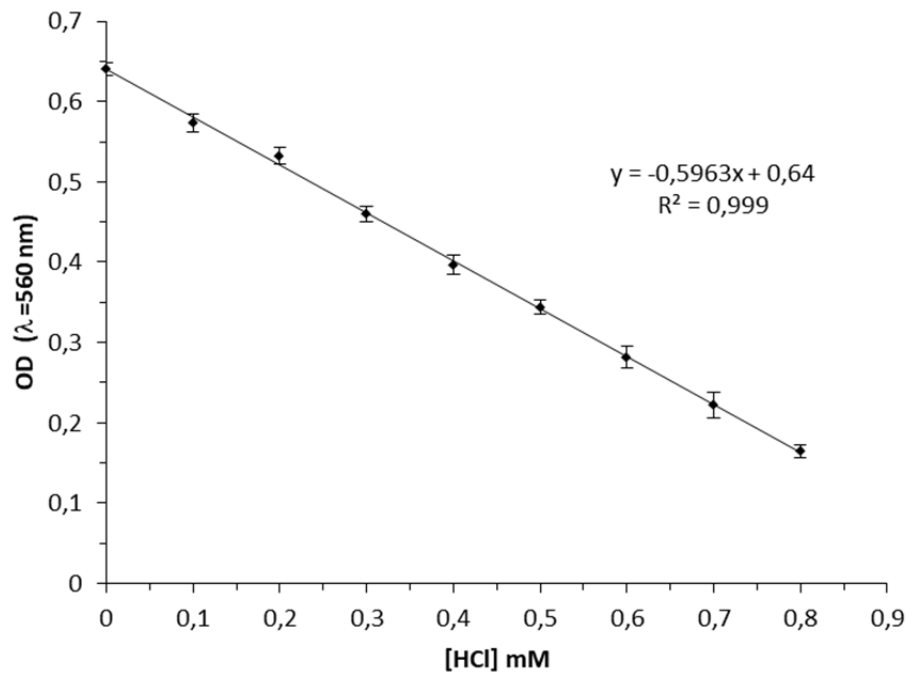


Abb. 32. Kalibriergerade für den SiaT-Assay.

Messbedingungen: 1 mM CMP-Neu5Ac, 0.028 mM Phenolrot, 3 µg SiaT_{p_{ph}} in 2 mM Tris-Puffer, Gesamtvolumen: 200 µL; T = 30 °C; [HCl] = 0-0.8 mM.

Mit Hilfe der Kalibriergeraden kann die Beziehung zwischen der Konzentration der freigesetzten Protonen und der optischen Dichte (OD bei 560 nm) über die Zeit bestimmt werden.

$$OD_{\lambda=560 \text{ nm}} = A + B [H^+] \xrightarrow{\text{Differential nach der Zeit}} \frac{d(OD_{\lambda=560 \text{ nm}})}{dt} = B \frac{d(H^+)}{dt}$$

$$\frac{d(H^+)}{dt} = \frac{1}{B} \frac{d(OD_{\lambda=560 \text{ nm}})}{dt}$$

Für die Bestimmung der kinetischen Daten wird die Abnahme der optischen Dichte im Zeitverlauf gemessen (Abb. 33 links). Aus der Steigung des linearen Anfangsbereichs können dann mit Hilfe der Steigung der Kalibriergeraden die Initialgeschwindigkeiten bei verschiedenen Konzentrationen errechnet werden. Durch die Verwendung des linearen Anfangsbereichs sind mehrere Aspekte sichergestellt. Eine lineare Korrelation zwischen OD und Protonenkonzentration ist gegeben, der pH-Assay befindet sich nicht im erschöpften Bereich des Indikators und der pH-Wert ist noch im optimalen Arbeitsbereich des Enzyms. Für die Analyse der Initialgeschwindigkeiten der Transferreaktion sind bereits die Messwerte der ersten 60 bis maximal 120 Sekunden ausreichend. Die Variation der Menge an SiaT_{p_{ph}} für eine äquivalente Änderung der OD bestätigt die lineare Korrelation zwischen Aktivität und Menge Enzym und wurde bereits in Vorarbeiten von *Dong Yi* im Arbeitskreis *Fessner* gezeigt.^[285]

4. Allgemeiner Teil II

Die ermittelten Initialgeschwindigkeiten werden gegen die jeweilige Konzentration an CMP-Neu5Ac aufgetragen. Über Auswertung nach der *Michaelis-Menten*-Gleichung können dann die kinetischen Parameter bestimmt werden (Abb. 33 rechts).

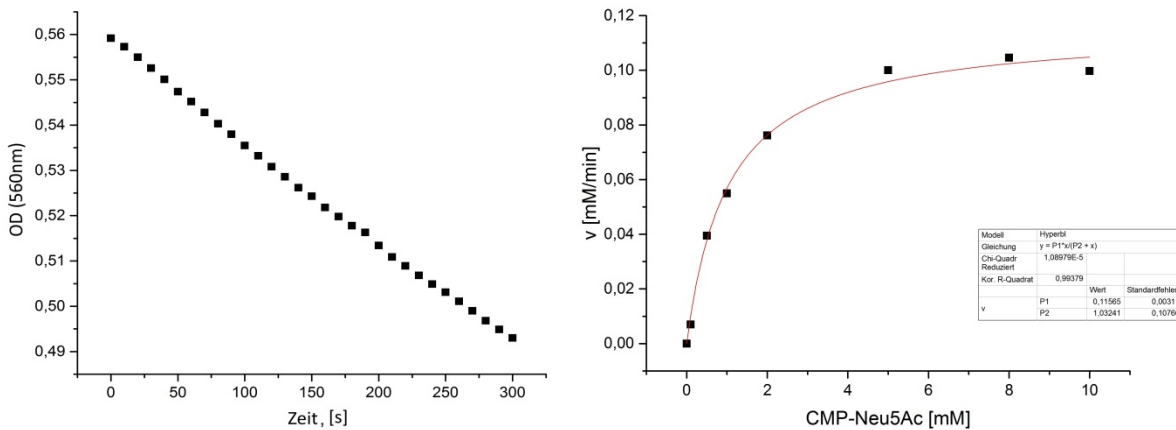


Abb. 33. links: Messung der Abnahme der optischen Dichte für 1 mM CMP-Neu5Ac; rechts: Gefittete Initialgeschwindigkeiten der verschiedenen CMP-Neu5Ac-Konzentrationen und Auswertung nach Michaelis-Menten-Gleichung unter Verwendung von *Origin*.

Reaktionsbedingungen: 5 mM Lactose, 0.028 mM Phenolrot, 3.9 μ g SiaTpph in 2 mM Tris-Puffer; pH 8.0; T = 30 °C.

4.3.4. Spezielle Assaybedingungen

Bei der praktischen Umsetzung des Assays muss auf einige Kriterien geachtet werden, die sich als essentiell für die Genauigkeit der Methode herausgestellt haben.

Zuerst ist auf die Temperierung aller Assaykomponenten zu achten. Die Reaktionstemperatur des Assays zeigt bei 30 °C eine gut analysierbare Geschwindigkeit, daher wird der Well-Plate-Reader bei dieser Temperatur betrieben. Bei der Messung ist es hierbei notwendig, dass die Multititerplatte nach dem Zusammengeben der Komponenten möglichst schnell die Starttemperatur des Assay erreicht. Werden die Komponenten bei Raumtemperatur zusammenpipettiert und erwärmen sich erst anschließend im Plate-Reader, kommt es zu einer Verfälschung bei der Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit über die Steigung. Typischerweise ist der Verlauf der gemessenen Kurve dann nicht linear, sondern steigt zunächst an, bevor sie fällt. Da bei der Messung die ersten 90 Sekunden entscheidend sind und danach bereits ein Abflachen der Kurve einsetzt, ist die Umsetzung nicht trivial. Alle Komponenten müssen daher während des Pipettierens unbedingt durchgehend temperiert werden. Sind bis auf die Startkomponente alle Substrate in der Multititerplatte, wird die Platte für ca. 60 Sekunden im Plattenschüttler temperiert, bevor die letzte Komponente hinzugefügt wird. Die Platte wird erneut für 5-10 Sekunden geschüttelt und dann sofort vermessen. Ein zügiges Arbeiten ist unbedingt erforderlich. Da der pH-Wert, gerade in Tris-Puffer, stark temperaturabhängig ist, muss bei der Einstellung der pH-Werte aller Lösungen ebenfalls auf eine korrekte Temperatur geachtet werden.

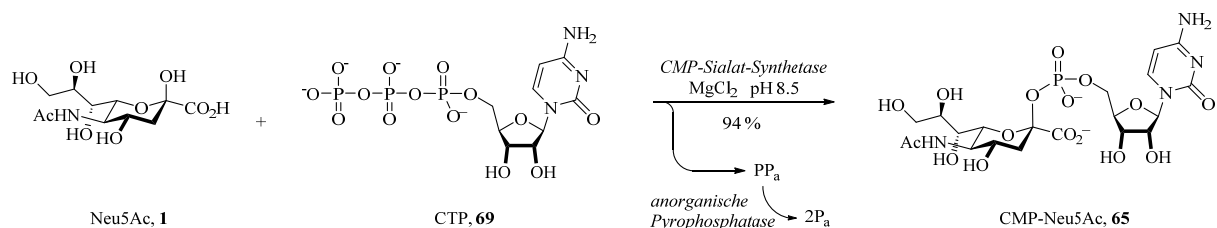
Auch beim Starten des Assays sollten unbedingt einige Aspekte berücksichtigt werden. Die Komponente zum Starten des Assays (im vorliegenden Fall eines der beiden Substrate

CMP-Neu5Ac oder Lactose) sollte mit 20 μL Volumen bei 200 μL Gesamtvolumen im *well* dazugegeben werden. Bei der Zugabe müssen die Pipettenspitzen in die vorgelegte Lösung eintauchen und zur guten Durchmischung die Lösung mehrfach aufgezogen und wieder ausgestoßen werden. Dabei darf der Druckpunkt der Pipette nicht überschritten werden, da sonst Luftbläschen im *well* die Messung unbrauchbar machen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt betrifft die Zugabe des Indikators. Es stellte sich heraus, dass ein Vormischen des Indikators Phenolrot und Tris-Puffer vermieden werden muss. Nach dem Vermischen zeigten Messungen, dass eine Abnahme der optischen Dichte über die Zeit stattfindet. Dies beeinflusst die Auswertung der Messungen an sich nicht, da die Steigung der Nullmessung bei der Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit subtrahiert wird. Jedoch scheint die Kapazität des Indikators in Tris-Lösung bereits nach 15 Minuten insgesamt nachzulassen. Daher sollte auf ein Vormischen von Indikator und Tris-Puffer verzichtet werden und die Komponenten direkt im *well* beim Zusammengeben aller Komponenten erfolgen. Vor dem Start ist auf eine gute Durchmischung der Assaykomponenten zu achten.

4.4. Herstellung des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac

Für das Screening der Varianten, das Ermitteln der kinetischen Daten und die spätere Analyse der Hydrolyseaktivität werden große Mengen des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac benötigt (Schema 48). Besonders wichtig ist hierbei eine hohe Reinheit ohne Spuren an Neu5Ac, CMP oder CTP aus dem Herstellungsprozess. Da das Substrat sehr teuer ist (25 mg kosten ca. 1500 € [*Sigma-Aldrich*: 11.05.2020]) und sehr sensitiv (das kommerzielle Produkt kann durchaus bereits Spuren an Neu5Ac enthalten), wurde es vor der Verwendung frisch selbst hergestellt und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.



Schema 48. Synthese des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac.

Zur Herstellung wurde Neu5Ac in 50 mM Tris-Puffer mit 50 mM MgCl₂ gelöst und mit 1.04 Äquivalenten CTP versetzt. Die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 8.5 eingestellt und auf 37°C temperiert. Zur Umsetzung wurde das Enzym CSS aus *Neisseria meningitidis* benutzt. Um freigesetztes Pyrophosphat zu entfernen, wurde anorganische Phosphatase zugesetzt. Nach Zugabe der CSS ist es wichtig, den pH-Wert konstant bei pH 8.5 zu halten. Dies geschieht durch einen automatischen Titrator, sollte anfangs aber per Hand unterstützt werden, da die anfängliche Änderung sehr schnell auftritt.

Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) werden präzipitierte Magnesium- und Phosphatsalze in der Kälte (4 °C) abzentrifugiert und das identische Volumen an eiskaltem Ethanol zugesetzt, um die Enzyme zu denaturieren und zu präzipitieren. Nach erneutem Zentrifugieren wird das Ethanol im Vakuum entfernt, dabei ist unbedingt auf einen leicht basischen pH-Wert der Lösung zu achten. Das eingeeengte Material wird dann über basische Säulenchromatographie sorgfältig gereinigt (*n*-Propanol / H₂O / NH₃ (20 % aq.) = 7 : 3 : 1). Es kann so eine exzellente Ausbeute von 94 % erreicht werden.

4.5. Screening nach Varianten mit verbessertem Verhältnis von Sialyltransfer und Hydrolyse

Um die Varianten zu identifizieren, die eine hohe Transferaktivität bei gleichzeitig reduzierter CMP-Neu5Ac-Hydrolyseaktivität aufweisen, wurden alle gepickten Varianten in einem Duplikats-Aktivitätsscreening getestet. Dazu wurden die transformierten BL21-TunerTM-Zellen in *deep well*-Platten induziert, um die Enzyme in ausreichender Menge zu produzieren. Da die Galactosidaseaktivität in BL21-Tuner-Zellen abwesend ist, kann nach Zentrifugieren, Entfernen des Überstandes, Zelllyse und erneutem Zentrifugieren direkt das enzymhaltige rohe Lysat ohne Gefahr von Nebenreaktionen verwendet werden. Jede 96-*well*-Platte wurde in Gegenwart von Lactose als Sialylakzeptor auf Transferaktivität und ohne Lactose auf CMP-Neu5Ac-Hydrolyseaktivität getestet, indem bei 560 nm die OD-Änderung verfolgt wurde. Alle Varianten, die ein Transfer- vs. Hydrolyse-Verhältnis größer als 2:1 aufwiesen – welches im Durchschnitt dem des nativen Enzyms entspricht (siehe Abb. 34) – wurden für ein *Rescreening* ausgewählt. Dieses wurde zweimal durchgeführt, um falsch-positive Treffer zu eliminieren und positive Treffer zu validieren. Neben dem reinen Verhältnis wurde auch berücksichtigt, dass die Varianten etwa die gleiche oder eine größere Aktivität als das native Enzym aufwiesen.

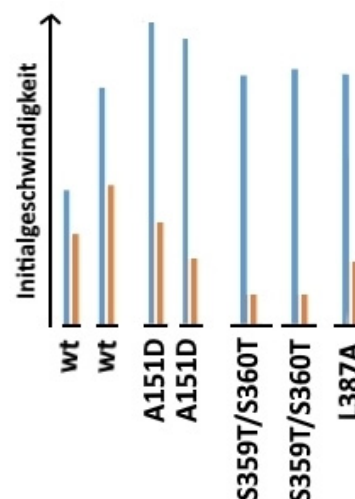


Abb. 34. Beispiele für positive Treffer aus dem Vergleich der Initialgeschwindigkeiten von Transfer (blau) und Hydrolyse (orange) im Screening.

Varianten, die diese Kriterien in beiden Wiederholungen zeigten, wurden sequenziert. Mit Hilfe dieser Methode wurden neun Varianten identifiziert, die jeweils mehrfach beim Sequenzieren gefunden wurden und die alle eine verbesserte Transferrate, reduzierte Hydrolyseaktivität oder beide Merkmale aufwiesen. Diese Varianten beinhalteten sechs verschiedene Positionen: S150T, A151D, A151L, A151M, A151N, N279S, S359T, S359T/S360T und L387A. Mit den Ergebnissen des Sequenzalignments übereinstimmend wurden Varianten der Positionen S150 und A151 identifiziert, die mit natürlichen Variationen in orthologen Enzymen identisch sind (Tabelle 8, S. 74-75).

4.6. Bestimmung der kinetischen Parameter für SiaT_{pph} und die identifizierten Varianten

Für eine detaillierte Analyse der kinetischen Daten wurden die identifizierten neun Varianten exprimiert, über Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt und per SDS-PAGE-Gel analysiert. Die Proteinkonzentration wurde jeweils über den Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) bestimmt.^[311]

Bei der kinetischen Analyse wurden apparente Werte ermittelt. Dies bedeutet, dass jeweils eine Komponente bei konstanter Konzentration belassen wird, während die andere variiert wird, um deren Bindungsaffinität (K_M) und Wechselzahl (k_{cat}) zu ermitteln. Für Lactose wurde die Konzentration hierfür bei 5.00 mM fixiert, was beim nativen Enzym einer Sättigung entspricht. Für CMP-Neu5Ac wurde die Konzentration aus Kostengründen bei 1.00 mM fixiert, welche dem K_M -Wert entspricht und eine reproduzierbare Vergleichbarkeit der Enzyme erlaubt. Um die kinetischen Parameter der Hydrolyse zu ermitteln, wurde in Abwesenheit von Lactose die CMP-Neu5Ac-Konzentration variiert. Durch das Fehlen der Lactose nimmt das in der Konzentration nicht variierbare Wasser als Konkurrenznukeophil dessen Platz ein. Die ermittelten Daten entsprechen daher der Affinität von CMP-Neu5Ac in Abwesenheit von Lactose und der Wechselzahl mit Wasser. Auf diese Weise lässt sich eine reproduzierbare Aussage über die Hydrolyse von CMP-Neu5Ac treffen.

Die Analyse der kinetischen Daten zeigte drei interessante Varianten, deren Eigenschaften gegenüber dem nativen Enzym deutlich verbessert sind: A151D, S359T/S360T und L387A. Alle drei Varianten weisen für die apparenten K_M -Werte eine verbesserte Bindungsaffinität kombiniert mit einer schnelleren Reaktionsrate für A151D und L387A auf. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) ist für alle drei Varianten um den Faktor 2 bis 5 gesteigert. Gleichzeitig weisen alle drei Varianten eine langsamere Hydrolyserate, kombiniert mit einer schwächeren Affinität zu CMP-Neu5Ac in Abwesenheit von Lactose, auf. Dies führt zu einer reduzierten katalytischen Effizienz der Hydrolyse um den Faktor 4.3 bis 10. Die reduzierte Bindungsaffinität gegenüber Lactose (A151D, L387A) wird mit einer höheren Reaktionsrate als der des nativen Enzyms kompensiert und kann in präparativen Experimenten einfach durch Erhöhung der Menge des günstigeren Substrats Lactose (oder verwandten Sialylakzeptoren) ausgeglichen werden. Alles in allem zeigt A151D die größte Verbesserung, sowohl hinsichtlich einer höheren Bindungsaffinität gegenüber CMP-Neu5Ac sowie einer besseren apparenten Wechselzahl k_{cat} für CMP-Neu5Ac und Lactose als auch hinsichtlich einer 4.3-fachen Reduktion der Hydrolyseeffizienz. Interessanterweise entspricht die Position der gefundenen Variante A151D in 2,3SiaT_{pph} der vorteilhaften Mutation M144D, die für *P. multocida* berichtet wurde.^[286] Die Änderung von Methionin zu Asparaginsäure verursachte eine 20-fache Reduktion der Hydrolyseaktivität, allerdings auf Kosten eines gleichzeitigen 18-fachen Verlusts der Effizienz für den α 2,3-Sialyltransfer auf Lactose und einer 9-fach schwächeren Bindungsaffinität.^[286] Variante A151D zeigt dagegen eine

4. Allgemeiner Teil II

reduzierte Hydrolyseaktivität bei gleichzeitiger Steigerung der Transfereffizienz und nur 3.7-fach geringerer Effizienz (k_{cat}/K_M) für Lactose (Zusammenfassung Tabelle 9). Offensichtlich hat die Änderung der Position 151 von einem hydrophoben Alanin zu einem geladenen Asparaginsäurerest die größte Reduktion der Hydrolyseaktivität zur Folge. Eine mögliche Erklärung könnte das Blockieren von Extraraum in der aktiven Tasche durch D151 sein, welches im nativen Enzym durch Wasser besetzt ist, das als alternatives Nukleophil agieren kann. Durch die Mutation kann aber ebenso eine Veränderung der nukleophilen Angriffstrajektorie des Wassers stattgefunden oder sich generell der pK_s -Wert des katalytisch aktiven D148-Restes verschoben haben.

Tabelle 9. Apparente kinetische Gleichgewichtsparameter für Varianten der $\alpha 2,3$ -SiaT_{p_{pph}}.^{a)}

		NE	S150T	A151D	A151L	A151M	A151N	N279S	S359T	S359T/S360T	L387A
CMP-Neu5Ac b), e)	K_M [mM]	1.12±0.11	1.91±0.78	0.79±0.26	0.41±0.11	0.27±0.03	0.71±0.39	0.99±0.13	0.98±0.51	0.05±0.01	0.74±0.15
	k_{cat} [s ⁻¹]	1.43±0.05	0.48±0.04	2.01±0.13	0.70±0.05	0.78±0.004	0.68±0.02	1.15±0.03	0.18±0.03	0.32±0.01	1.79±0.08
	k_{cat}/K_M [mM ⁻¹ s ⁻¹]	1.3	0.3	2.5	1.7	2.9	1.0	1.1	0.2	6.3	2.4
Lac c), e)	K_M [mM]	0.51±0.16	10.99±1.33	9.07±1.21	0.88±0.28	1.44±0.08	1.46±0.25	8.32±0.56	0.88±0.85	3.37±1.26	18.94±3.86
	k_{cat} [s ⁻¹]	0.51±0.05	1.42±0.07	2.41±0.32	0.46±0.04	0.65±0.01	0.57±0.03	1.47±0.05	0.46±1.00	0.16±0.02	1.27±0.12
	k_{cat}/K_M [mM ⁻¹ s ⁻¹]	1.0	0.1	0.3	0.5	0.5	0.4	0.2	0.5	0.1	0.1
Hydrolyse d), f)	K_M [mM]	0.14±0.03	0.02±0.01	0.38±0.11	0.05±0.00	0.08±0.02	0.08±0.01	0.11±0.01	0.21±0.09	0.07±0.03	0.42±0.08
	k_{cat} [s ⁻¹]	0.40±0.02	0.03±0.00	0.25±0.02	0.11±0.00	0.11±0.00	0.06±0.00	0.14±0.00	0.19±0.01	0.04±0.00	0.12±0.01
	k_{cat}/K_M [mM ⁻¹ s ⁻¹]	2.9	1.7	0.7	2.2	1.3	0.8	1.3	0.9	0.6	0.3

a) Kinetische Daten wurden per *Michaelis-Menten*-Gleichung unter Verwendung von *Origin* ermittelt.

b) Die Lactosekonzentration war konstant bei 5.00 mM.

c) Die CMP-Neu5Ac-Konzentration wurde konstant bei 1.00 mM gehalten.

d) Die CMP-Neu5Ac-Konzentration wurde unter Abwesenheit von Lactose variiert.

e) Die Enzymmengen variierten zwischen 2.6 und 15.9 µg pro Assay.

f) Die Enzymmengen variierten zwischen 13.2 und 38.8 µg pro Assay.

4.7. Analyse der thermischen Stabilität der Enzyme

Die Mutagenese von Proteinen führt häufig zu einer reduzierten thermodynamischen Stabilität, welche der Entfaltung der Proteinstruktur entspricht. Thermodynamische Stabilität von Enzymen ist generell ein erstrebenswerter Vorteil, erlauben doch thermisch stabile Enzyme eine Aufreinigung über Hitzeschock und beschleunigte Reaktionsprozesse bei erhöhten Temperaturen. Ebenso zeigen sie eine höhere kinetische Stabilität gegen chemische Zersetzung.^[312-313] Um thermische Instabilität für weitere Mutagenese auszuschließen und Stabilität für synthetische Anwendungen zu bestätigen, wurde die thermische Stabilität des nativen Enzyms und der identifizierten Varianten mittels *nanoscale differential scanning fluorimetry* (nanoDSF) analysiert. Dies ist eine wertvolle Methode, um schnell und verlässlich Proteinschmelzpunkte mittels Autofluoreszenzänderungen durch thermische Aktivierung in Lösung zu ermitteln.^[314] Mit dieser markierungsfreien Methode können Proteinproben sogar ohne aufwendige Aufreinigung (lediglich Zentrifugation des Rohextrakts) mit nur 10 µL Probengröße (<10 µg Protein) vermessen werden. Zur Messung wird die intrinsische Änderung der Tryptophan- und/oder Tyrosin-Fluoreszenz eines Proteins beim Entfalten der Struktur durch Temperaturanstieg ermittelt.

Die Ergebnisse des nativen Enzyms (siehe Tabelle 10) passen gut zu der Tatsache, dass die SiaT_{pph} aus einem mesophilen Organismus stammt und Einzelpunktmutagenese nur kleine Schmelzpunkttemperaturänderungen ($\Delta T_m \approx 2^\circ$) hervorruft. Die Doppelmutante mit Austausch von Serin gegen Threonin scheint sogar eine leicht stabilisierende Wirkung zu haben. Alle drei Varianten sind stabil und damit für eine weitere Mutagenese geeignet.

Tabelle 10. Thermodynamische Stabilität der 2,3SiaT_{pph} ermittelt per nanoDSF.

Enzymvariante	Schmelzpunkt T_m [°C]
natives Enzym	47.1
A151D	45.4
L387A	44.8
S359T/S360T	48.0

4.8. Zweite Generation - Kombinationsvarianten

Für eine zweite Generation der Mutagenese wurde eine kombinatorische Bibliothek der effektivsten Treffer, bestehend aus den Positionen 150, 151, 359 und 360, erstellt, um potentielle kooperative Effekte zu prüfen. Die Mutation des räumlich benachbarten katalytischen Restes D148 zu gleich großen Resten mit abweichender Polarität (Serin, Lysin) war als Kontrolle mit enthalten. Die Schwierigkeiten in der Umsetzung lagen vor allem darin, dass erste Versuche zur Erstellung der Kombinationsbibliothek am schlechten Bindeverhalten der Primer scheiterte. Durch die nah beieinander gelegenen Codons 148, 150 und 151 treten bei einer Ein-Schritt-Mutagenese zu viele nichtbindende Basen innerhalb der Primersequenzen auf, wodurch eine ausreichende, homogene Bindung der *Primer* nicht gegeben und die PCR nicht erfolgreich war. Deshalb wurde die Mutagenese sequentiell durchgeführt. Mit einem flankierenden, auf ganzer Länge bindenden *Primerpaar* wurde das Templat ohne diese 12 Nukleotide amplifiziert. Nach Ligation resultierte ein verkürztes Plasmid, in das die gewünschten Codons mittels Primern mit den entsprechenden Überhängen in einer zweiten PCR eingefügt wurden (Abb. 35). Das Produkt aus den ersten PCR-Runden enthielt die eingefügte Sequenz und diente als neues Templat in den folgenden Zyklen.

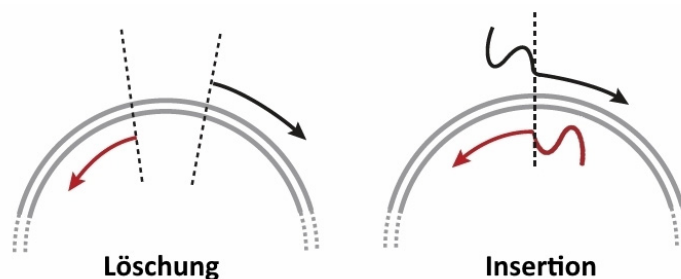


Abb. 35. Mutagenese mit untereinander nicht bindenden Primern.

links: Löschung durch *Forward-* und *Reverse-Primer*; rechts: Einfügen von gewünschten Mutationen durch einen Überhang am *Primer*, mit der Besonderheit, dass unterschiedliche *Forward-* und *Reverse-Primer* verwendet wurden. Verwendung des *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kits* von *NewEnglandBiolabs*[®].

4. Allgemeiner Teil II

Um alle Mutationskombinationen einzuführen, wurden als Besonderheit verschiedene *Forward*- und *Reverse*-Primer in verschiedenen Primermischungen verwendet (siehe Tabelle 11) und jeweils mit nativem Plasmid oder mit S359T/S360T als Templat kombiniert. Somit konnten alle Kombinationen aus ursprünglicher und gewünschter Aminosäure in den jeweiligen Positionen realisiert werden (Tabelle 12).

Tabelle 11. Primer und Primerkombinationen in den Mischungen A-D zur Generierung der Kombinationsvarianten.

Primer	Primermischungen
(1) SiaT-150S/T, SiaT151L/M_F	A = (1) + (2) B = (1) + (4) C = (2) + (3) D = (3) + (4)
(2) SiaT-D148S/L_R	
(3) SiaT-S150S/T, A151_F	
(4) D148_R	

Tabelle 12. Templat und Primermischungs-Kombinationen für die zweite Generation der Kombinationsbibliothek

Primermischung → Position ↓	A	B	C	D	A	B	C	D
		Templat: natives Gen				Templat: S359T/S360T		
D148	L/S	D	L/S	D	L/S	D	L/S	D
S150	S/T	S/T	S/T	S/T	S/T	S/T	S/T	S/T
A151	L/M	L/M	A	A	L/M	L/M	A	A

Der Erfolg wurde durch Sequenzierung des Plasmidgemisches kontrolliert. Im Falle von nicht eindeutigen Sequenzen wurden mehrere Einzelklone sequenziert (siehe Experimententeil 5.5.6).

Beim *Screening* und *Rescreening* der Kombinationsbibliothek konnten jedoch keine Varianten mit signifikanten Verbesserungen der Transferaktivität oder Reduktion der Hydrolyseaktivität nachgewiesen werden. Alle Variationen an Position D148 führten erwartungsgemäß zu einer Reduktion der Transferase-Aktivität um mindestens Faktor 2 und zeigten zudem dominante Hydrolyseaktivität (Transfer/Hydrolyse $\approx 0.5-1$ vs. natives Enzym ≈ 2).

Im Weiteren wurde eine individuelle Kombination der besten Varianten umgesetzt, um hierbei potentiell eine weitere Verbesserung zu erzielen und ein besseres Verständnis der spezifischen Effekte zu gewinnen, die aus den Kombinationen resultieren.

4.9. Individuelle Kombination der besten Varianten

Für die individuelle Kombination von Varianten wurden die drei besten Treffer der ersten Mutagenese-Generation ausgewählt: A151D, S359T/S360T und L387A. Des Weiteren wurde die Variante E342A und eine Kombination mit dem besten Treffer der ersten Generation A151D konstruiert. Position 342 ist in der CMP-Bindestelle lokalisiert und wurde als bedeutender Rest für die Sialidaseaktivität ausgemacht, da berichtet wurde, die Mutation E342A zeige keine α 2,3-Sialyllactose-Hydrolyse mehr.^[289]

Tabelle 13. Apparente kinetische Gleichgewichtsparameter^{a)} für individuelle Kombinationsvarianten der α 2,3-SiaT_{pPh}.

		NE	A151D/L387A	A151D/S359T/S360T	A151D/S359T/S360T/L387A	E342A	A151D/E342A
CMP-Neu5Ac	K_M [mM]	1.12±0.11	0.98±0.51	4.38±3.38	1.09±0.45	44.61±16.7	17.96±8.38
	^{b), e)} k_{cat} [s^{-1}]	1.43±0.05	0.18±0.03	0.49±0.13	0.26±0.03	0.86±0.18	0.38±0.07
	k_{cat}/K_M [$mM^{-1} s^{-1}$]	1.3	0.2	1.1	0.2	0.0	0.0
Lac	K_M [mM]	0.51±0.16	1.84±1.23	0.96±0.50	0.089±0.034	16.47±9.38	5.65±2.64
	^{c), e)} k_{cat} [s^{-1}]	0.51±0.05	0.17±0.04	0.45±0.07	0.26±0.02	0.32±0.09	0.09±0.01
	k_{cat}/K_M [$mM^{-1} s^{-1}$]	1.0	0.1	0.5	3.0	0.0	0.0
Hydrolyse	K_M [mM]	0.14±0.03	0.64±0.30	0.73±0.33	0.19±0.13	0.072±0.03	0.13±0.09
	^{d), e)} k_{cat} [s^{-1}]	0.40±0.02	0.06±0.01	0.34±0.04	0.34±0.04	0.02±0.00	0.04±0.00
	k_{cat}/K_M [$mM^{-1} s^{-1}$]	2.9	0.1	0.5	1.8	0.2	0.3

a) Kinetische Daten wurden per *Michaelis-Menten*-Gleichung unter Verwendung von *Origin* ermittelt.

b) Die Lactosekonzentration war konstant bei 5.00 mM.

c) Die CMP-Neu5Ac-Konzentration wurde konstant bei 1.00 mM gehalten.

d) Die CMP-Neu5Ac-Konzentration wurde unter Abwesenheit von Lactose variiert.

e) Die Enzymmengen variierten zwischen 1.9 und 12.3 μ g pro Assay.

Die kinetischen Daten der ausgewählten Kombinationsvarianten zeigten keine weitere Verbesserung gegenüber den Ausgangsvarianten A151D, L387A und S359T/S360T (siehe Tabelle 13). Eine übereinstimmende Ähnlichkeit bei allen Kombinationsvarianten ist die signifikante Reduktion der Wechselzahl k_{cat} für den Sialyltransfer. Selbst eine kombinierte A151D/L387A-Mutation mit bedeutender Reduktion der Hydrolyseeffizienz ist für praktische Anwendungen unbrauchbar, da gleichzeitig die Sialyltransferaktivität sehr niedrig ist. Dies hätte eine hohe stationäre CMP-Neu5Ac-Konzentration über einen verlängerten Zeitraum zur Folge, in dessen Konsequenz die chemische Hintergrundhydrolyse favorisiert wird. Dies wurde auch im semi-präparativen Maßstab bestätigt (Abb. 39). Bedauerlicherweise konnten die in der Literatur berichteten Daten für Variante E342A nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zum berichteten 5-fachen höheren k_{cat} -Wert für CMP-Neu5Ac und 9-fach höherem k_{cat} -Wert für Lactose^[289] wurden im Gegenteil ein 40% reduzierter k_{cat} -Wert und eine 40-fach niedrigere Bindungsaffinität für CMP-Neu5Ac mit der verwendeten pH-Assaymethode dokumentiert (Tabelle 13). Die Beobachtung der reduzierten CMP-Neu5Ac-Affinität ist jedoch plausibel, da die Mutation ein hochkonserviertes Motiv der CMP-Bindestelle in der GT80-SiaT-Familie betrifft.^[133, 303] Entsprechend der Kristallstruktur mit gebundenem CMP (2ZWI) bildet die Carboxylgruppe von E342 eine parallele zweifache Wasserstoffbrückenbindung zu den Sauerstoffatomen O2 und O3 der Riboseeinheit aus.^[284] Aufgrund seiner Position in der Nukleotidbindestelle kann E342 daher nicht an Kontakten zur

Sialinsäure oder zum Lactosesubstrat beteiligt sein, aber reduziert möglicherweise die Sialidaseaktivität (über reversen Sialyltransfer und CMP-Sia-Hydrolyse: retro-**A** + **B**, Schema 45) durch Schwächung der CMP-Affinität. Daher wurde die Variante ebenso wie die Kombination mit dem besten Treffer der ersten Generation (E342A/A151D) verworfen, da ihre Transferaktivität dramatisch reduziert ist.

4.10. Präparative Quantifizierung der Hydrolyseaktivität

Um die Ergebnisse der kinetischen Daten aus der Mutagenesestudie zu verifizieren und das vorteilhafte synthetische Potential zu evaluieren, wurden alle neuen Varianten in einem präparativen Maßstab bei der Sialylierung von Lactose erprobt. Dazu wurden in einem Ansatz von 560 μL 20 mM Tris-Puffer, CMP-Neu5Ac und Lactose (jeweils 15 mM) sowie 10 μg aufgereinigtes Enzym für 22 Stunden bei 30°C und pH 8.0 zur Reaktion gebracht. In definierten Zeitintervallen wurden 10 μL -Proben der Reaktionen entnommen und mittels Hochleistungsdünnschichtchromatographie (*high performance thin layer chromatography*, HPTLC) analysiert. Durch das Auftragen von Produkt (SiaLac) und Nebenprodukt (Neu5Ac) in verschiedenen Konzentrationen als Standard ist es möglich, den Reaktionsfortschritt und das Nebenprodukt mittels eines Scanners zu quantifizieren.

4.10.1. Messmethode und Analyse

Für jede Zeitpunktmessung wurden die Proben in definierter Konzentration und Menge auf jeweils zwei identische DC-Platten aufgebracht. Diese wurden jeweils in zwei unterschiedlichen Lösemittelgemischen entwickelt, um jeweils teilweise überlappende Banden zu separieren. Das basische Lösemittelgemisch aus *n*-Propanol / H_2O / NH_3 (20%_{aq.}) = 7 : 3 : 1 erlaubt eine separate Betrachtung des Neu5Ac-Spots (Abb. 36), während mit dem sauren Lösemittelgemisch aus *n*-Butanol / Aceton / AcOH / H_2O = 35 : 35 : 7 : 23 die separate Analyse von α 2,3-SiaLac möglich ist (Abb. 38). Nach dem Färben der DC-Platten mit Anisaldehydlösung ist eine quantitative Analyse gegen die aufgetragenen Standards durch Scannen bei 380 nm mittels DC-Scanner möglich (Abb. 37).

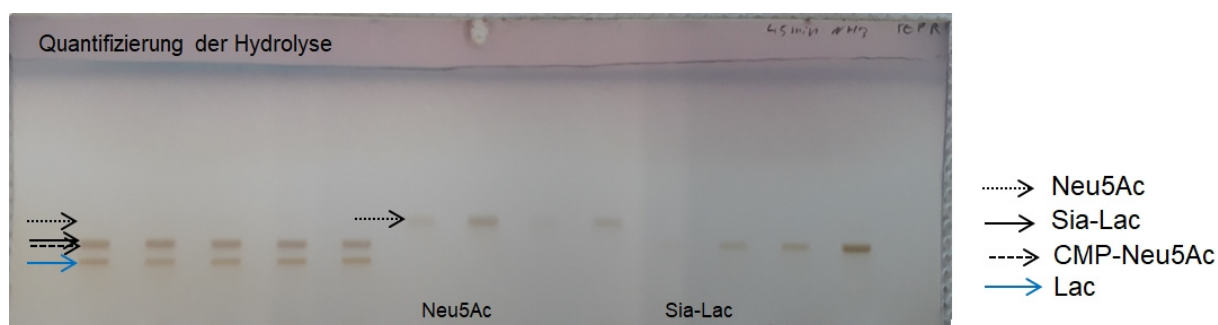


Abb. 36. Entwicklung der DC-Platte mittels basischem Laufmittel zur separaten Quantifizierung von Neu5Ac.

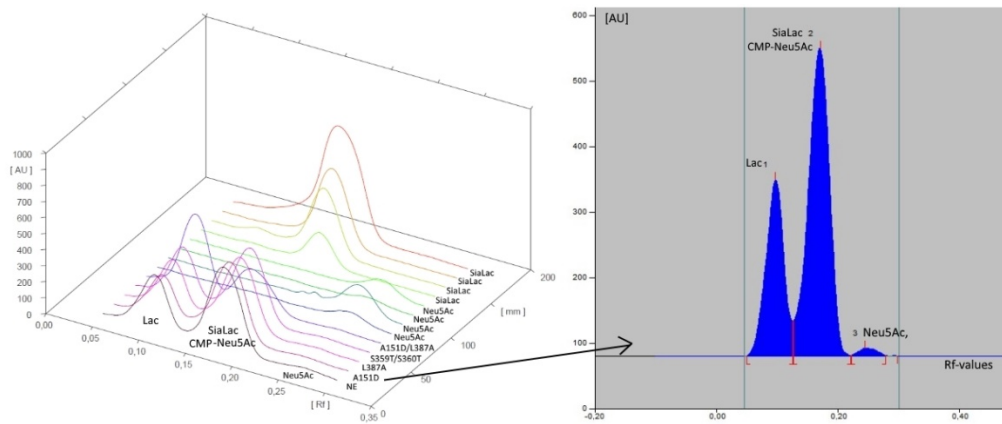


Abb. 37. Quantitative Analyse des DCs aus Abb. 36. Die Integration ist für die zweite Bande gezeigt. Neu5Ac kann separat quantifiziert werden.

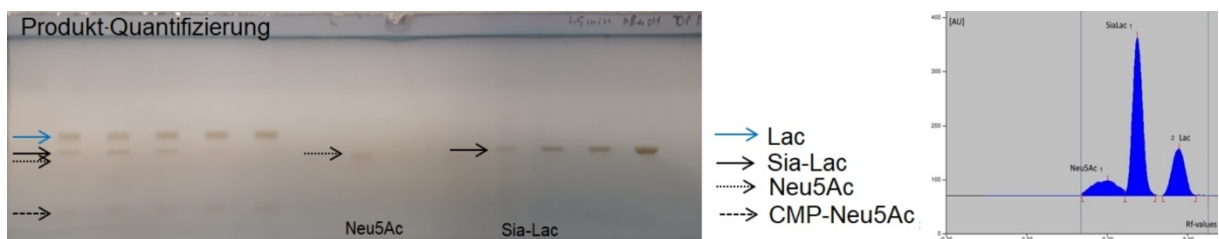


Abb. 38. Entwicklung der DC-Platte mittels saurem Laufmittel zur separaten Quantifizierung von SiaLac. Die Integration ist für die erste Bande gezeigt.

Nach 22 Stunden und Entnahme von sechs Proben wurde die verbleibende Reaktionsmischung mit eiskaltem Methanol versetzt, um die Reaktion zu stoppen, und das präzipitierte Enzym entfernt. Der Überstand wurde lyophilisiert und der Rückstand für eine Endpunktquantifizierung per $^1\text{H-NMR}$ -Analyse vermessen. Die definierte chemische Verschiebung der nicht überlappenden C3-Protonensignale von freier Sialinsäure, dem Konjugat $\alpha 2,3\text{-SiaLac}$ und CMP-Neu5Ac erlauben eine hochgenaue relative Quantifizierung der Umsetzung und Produktverteilung (Abb. 39).

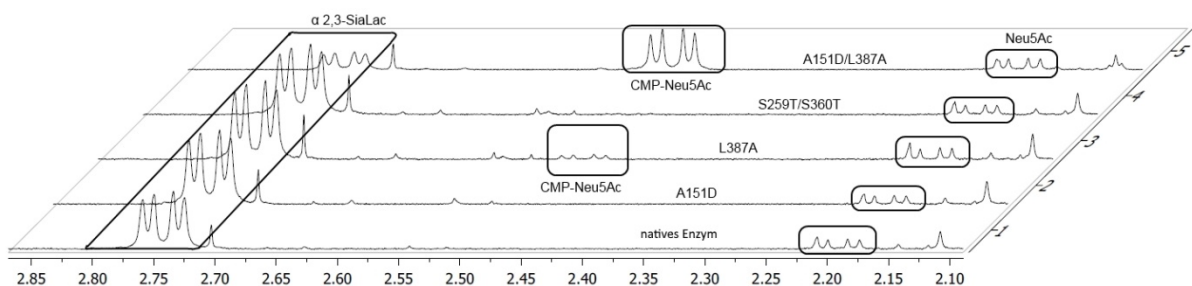


Abb. 39. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) Analyse der Bildung von Produkt $\alpha 2,3\text{-SiaLac}$, Nebenprodukt Neu5Ac und verbleibendem Substrat CMP-Neu5Ac nach 22 h Reaktionszeit.

4.10.2. Ergebnisse

Durch die manuelle Anfärbung der DC-Platten können minimale Abweichungen in der Färbungsintensität auftreten. Daher wurden mit Hilfe der per $^1\text{H-NMR}$ -Analytik bestimmten Endpunktwerte nach 22 Stunden die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie mit einem Skalierungsfaktor korrigiert, damit die absoluten Prozentzahlen identisch sind. Die Experimente wurden als Duplikate durchgeführt.

Für einen Vergleich beziehungsweise eine Kontrolle der kinetischen Parameter für A151D/L387A wurde die Variante in den HPTLC-Vergleich mit aufgenommen.

Tabelle 14. Ergebnis der $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) Endpunktermittlung nach 22 Stunden in Prozent für die Reaktionsprodukte α 2,3- SiaLac und Neu5Ac sowie verbliebenes Substrat CMP-Neu5Ac.

	α 2,3-SiaLac	Neu5Ac	CMP-Neu5Ac
NE	89.19	10.91	/
A151D	93.49	6.51	/
L387A	89.69	7.53	2.78
S359T/ S360T	92.56	7.44	/
A151D/L387A	34.70	12.92	52.38

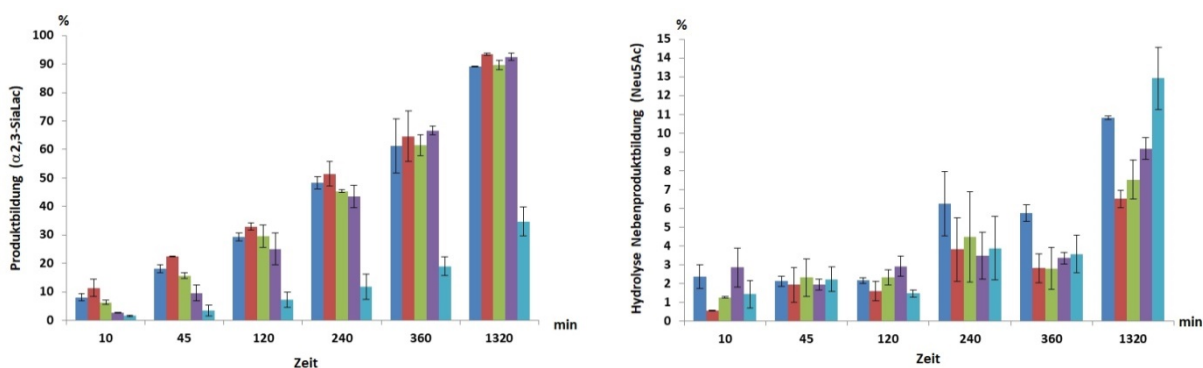


Abb. 40. HPTLC-Analyse der Produktbildung von α 2,3-SiaLac und des Hydrolyse-Nebenprodukts Neu5Ac des Sialyltransfers unter Vergleich von \diamond 2,3SiaT_pph und den Varianten $\color{red}\diamond$ A151D, $\color{green}\diamond$ L387A, $\color{purple}\diamond$ S359T/S360T, $\color{cyan}\diamond$ A151D/L387A. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar.

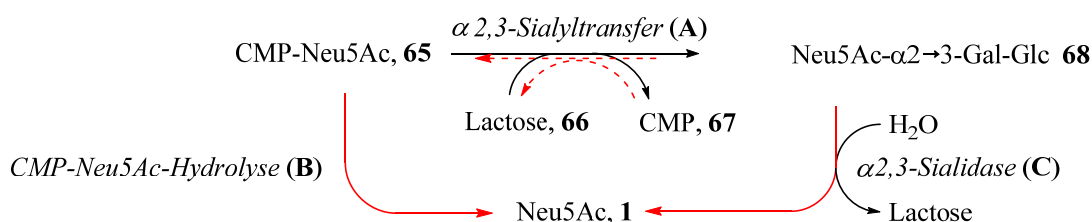
Vollständiger Umsatz wurde für das native Enzym 2,3SiaT_pph sowie für die Varianten A151D und S359T/S360T beobachtet (Tabelle 14). Die Varianten L387A und A151D/L387A zeigten jeweils 2.8% und 52.4% verbliebenes CMP-Neu5Ac aufgrund unvollständiger Umsetzung.

Nach kinetischer Analyse und präparativer Evaluierung stellte sich die Variante 2,3SiaT_pph A151D als bester Katalysator heraus. Die Bildung von Hydrolyse-Nebenprodukt ist um 40% verringert, während die Produktbildung vergleichbar schnell mit durchgehend ca. 5% höherer Ausbeute abläuft. Im Vergleich zeigt Variante S359T/S360T eine langsamere Reaktionsrate, erreicht nach 22 Stunden aber ebenso vollständigen Umsatz bei einer um 31%

reduzierten Hydrolyse. Variante L387A zeigt eine um 30% reduzierte Hydrolyse, der Sialyltransfer ist aber nach 22 Stunden Reaktionszeit immer noch unvollständig. Die Kombinationsvariante A151D/L387A ist signifikant weniger aktiv. Dies resultiert – aufgrund der kombinierten chemischen und enzymatischen Zersetzung des instabilen CMP-Neu5Ac – in einer 20% höheren Hydrolysefraktion relativ zum nativen Enzym.

4.11. Untersuchung der Produkthydrolyse-Aktivität - Sialidase

Die unvollständige Bildung des gewünschten Sialyltransferprodukts kann zum einen an der Hydrolyse des CMP-Neu5Ac (**65**) – als Ergebnis des Sialyltransfers auf Wasser oder Phosphodiesterhydrolyse – entlang des Reaktionswegs **B** liegen, die teilweise verstärkt wird, wenn der Sialyltransfer schnell reversibel ist (retro-**A**). Das gleiche Ergebnis (Bildung von Neu5Ac) kann zum anderen als Konsequenz der Produkthydrolyse entlang des Reaktionswegs **C** auftreten, wenn die 2,3-Sialyltransferase direkte Sialidaseaktivität zeigt (Schema 49).^[286-287, 289, 294]



Schema 49. Darstellung von Möglichkeiten der Produkthydrolyse (rot).

Der Nachweis von direkter Sialidaseaktivität **C** ist schwierig zu charakterisieren, da bereits minimale katalytische Mengen CMP (**67**) für den Rücktransfer der Sialylgruppe auf CMP mit nachfolgender CMP-Neu5Ac-Hydrolyse ausreichen.^[134, 315] Für die Quantifizierung der potentiellen Sialidaseaktivität wurde eine Reihe von NMR-Experimenten mit ausgewählten Enzymvarianten durchgeführt. Um das Phänomen zu untersuchen, wurden die Initialgeschwindigkeiten der Spaltungsraten von α2,3-SiaLac (**68**) unter Freisetzung von Neu5Ac (**1**) bestimmt. Dazu wurden 14.9 mM α2,3-SiaLac in 520 μL Tris-Puffer (20 mM, pH 8.0) in D₂O direkt im NMR-Röhrchen mit jeweils 10 μg nativem Enzym, A151D, L387A oder S359T/S360T für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden nach 18, 20, 22, 24, 42 und 48 Stunden *in situ* im 500 MHz ¹H-NMR spektroskopisch vermessen. Hierbei lassen sich die Protonensignale der 3-Position in freier Sialinsäure (Neu5Ac) und dem Edukt α2,3-SiaLac aufgrund der unterschiedlichen definierten chemischen Verschiebung gut quantifizieren (siehe Abb. 41).

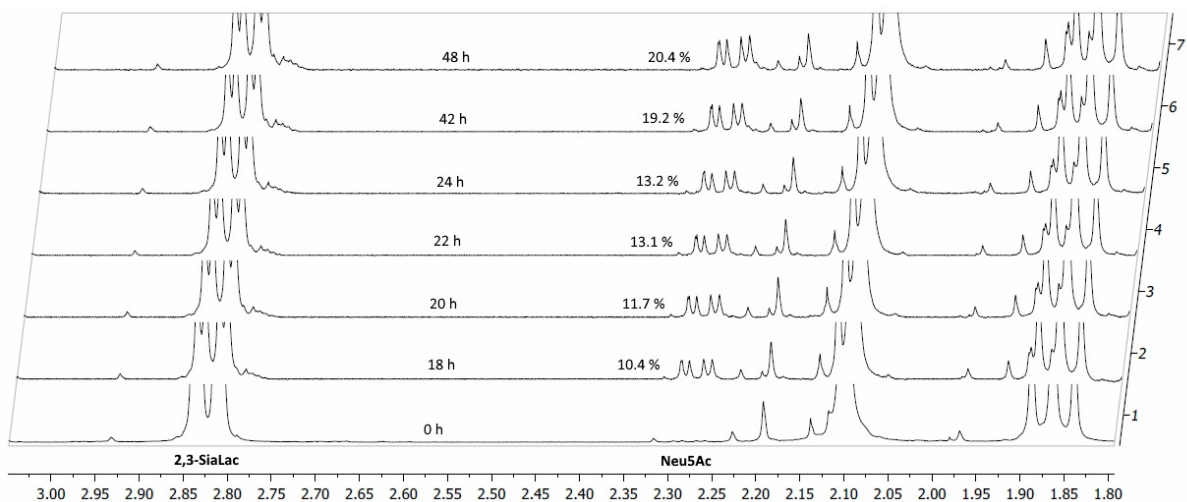


Abb. 41. ¹H-NMR-Spektren im zeitlichen Verlauf des Sialidaseexperiments für native 2,3-SiaT_{pph}. Die Menge an Neu5Ac ist jeweils relativ zur Menge 2,3-SiaLac bestimmt. Die Quantifizierung der Mengen an Neu5Ac erfolgte jeweils relativ zur Menge 2,3-SiaLac über die Integrale.

Die Quantifizierung über einen Zeitraum von zwei Tagen zeigte eine deutliche Sialidaseaktivität für das native Enzym 2,3-SiaT_{pph} (Abb. 42). Interessanterweise ist das Level der Sialidaseaktivität für die native 2,3-SiaT_{pph} ähnlich der katalytischen Rate der Substrathydrolyse in den zuvor bestimmten kinetischen Studien. Der parallele Substrat- und Produktabbau erklärt die Ausbeuteverluste der Synthesen.

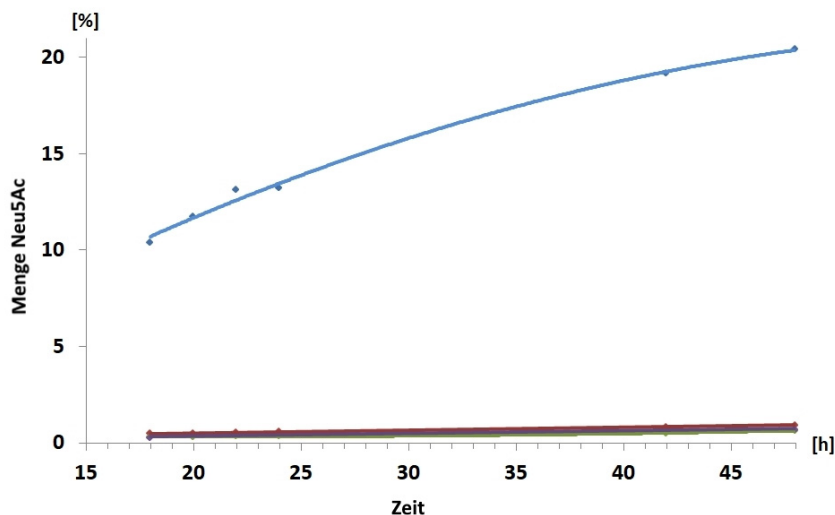


Abb. 42. Quantifizierung der Sialidaseaktivität der 2,3-SiaT_{pph} und Varianten mittels ¹H-NMR (500 MHz) *in situ*-Messung von Neu5Ac-Freisetzung aus α2,3-siaLac. ♦ natives Enzym ♦ A151D ♦ L387A ♦ S359T/S360T.

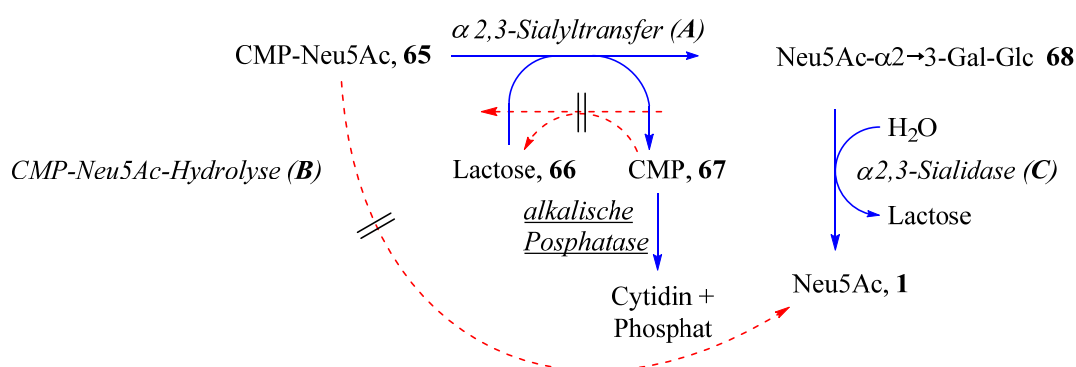
Aufgrund der praktischen Beschränkungen (begrenzt verfügbare Menge an Edukt, lange Messzeiten und begrenzte Messkapazitäten am Spektrometer) wurden die Experimente nur für eine einzige Konzentration von α 2,3-SiaLac durchgeführt. Das Ergebnis ist somit ein Vergleich der Initialgeschwindigkeiten der Sialidasereaktion bei einer Konzentration von 14.9 mM α 2,3-SiaLac (Tabelle 15).

Tabelle 15. Vergleich der direkten Sialidaseaktivitäten der Enzymvarianten.

Enzym	Initialgeschwindigkeit v_0 bei 14.9 mM 2,3SiaLac	Reduktion von v_0 um den Faktor
native 2,3-SiaT _{pph}	1.3×10^{-3} mmol/min	
A151D	4.9×10^{-5} mmol/min	26
L387A	1.9×10^{-5} mmol/min	68
S359T/S360T	7.1×10^{-5} mmol/min	18

Die Mengen freigesetzter Neu5Ac innerhalb von 48 Stunden verblieb unterhalb von 1 % für alle Varianten (0.92 % für A151D, 0.65 % für L387A und 0.66 % für S359T/S360T), während das native Enzym 20.45 % Neu5Ac freisetzte (Abb. 42). Dies bedeutet, dass für alle drei Varianten die Sialidaseaktivität **C** fast vollständig eliminiert und Substrathydrolyse-Aktivität **B** signifikant reduziert werden konnte, während die Sialyltransferasen im Vergleich zum nativen Enzym sogar teilweise erhöht werden konnten.

Um die direkte Sialidaseaktivität vom indirekten CMP-katalysierten Abbau des Produkts zu unterscheiden, wurden korrespondierende NMR-Kontrollexperimente in Gegenwart von alkalischer Phosphatase durchgeführt. Durch einen Überschuss der Phosphatase wird sichergestellt, dass keine Spuren von freiem CMP (**67**) mehr vorhanden sein können, die die Aktivität der direkten Sialosidhydrolyse beeinflussen könnten (Schema 50), auch wenn fest gebundenes CMP nicht völlig ausgeschlossen werden kann. Tatsächlich zeigten die Ergebnisse eine praktisch identische Menge an freigesetztem Neu5Ac, welche einen indirekten Hydrolysemechanismus ausschließen. Bereits zuvor wurde berichtet, dass zusätzliche Anwesenheit von CMP die Sialidaseaktivität nicht verstärkt.^[289] Daher kann eine dramatische Reduktion der Initialgeschwindigkeiten der Sialidaseaktivität für die neuen Varianten im Vergleich zum nativen Enzym bestätigt werden.



Schema 50. Kontrollexperiment zur Bestimmung der Sialidaseaktivität (blau) durch Zusatz alkalischer Phosphatase.

4.12. Präparativer Vergleich von nativer 2,3-SiaT_{p_{ph}} und der Variante 2,3-SiaT_{p_{ph}} (A151D)

In einem präparativen Experiment zur Synthese von Sia-Lac (G_{M3}) wurde das native Enzym und die Variante 2,3SiaT_{p_{ph}} (A151D) gezielt in einer Eintopf-Zwei-Enzym-Kaskadenreaktion verglichen. Dazu wurde über Aktivierung von Neu5Ac mittels CSS aus *N. meningitidis*, gefolgt vom Sialyltransfer mittels 2,3SiaT_{p_{ph}} und Variante A151D aus *P. phosphoreum*, das Trisaccharid G_{M3} im Maßstab von 0.16 mmol unter Standardbedingungen (1.5 eq. CTP und 3 eq. Lactose) synthetisiert und verglichen. Nach Produktisolierung über Gelpermeationschromatographie wurden für NE 88.2 mg und für A151D 93.4 mg α2,3-SiaLac isoliert. Dies entspricht einer isolierten Ausbeute von 86% bzw. 91% und damit einer signifikanten Steigerung für die 2,3-SiaT_{p_{ph}} (A151D) Variante im Vergleich zum nativen Enzym um 5%. Dieses Ergebnis korreliert mit der um 40% reduzierten Hydrolyserate.

Über 2D-NMR-Spektroskopie konnte nachfolgend gezeigt werden, dass die Variante A151D, genau wie das native Enzym, ausschließlich α2,3-verknüpftes G_{M3}-Trisaccharid generiert. Das HMBC-Signal zwischen ¹³C-2'' und ¹H-3' sowie die Verschiebung für H-3' bei 4.18 ppm bestätigen dies. Bei 2,6-verknüpften Analoga wäre das Signal des H-3'-Peaks hochfeldverschoben bei 3.6 ppm zu finden (Abb. 43).

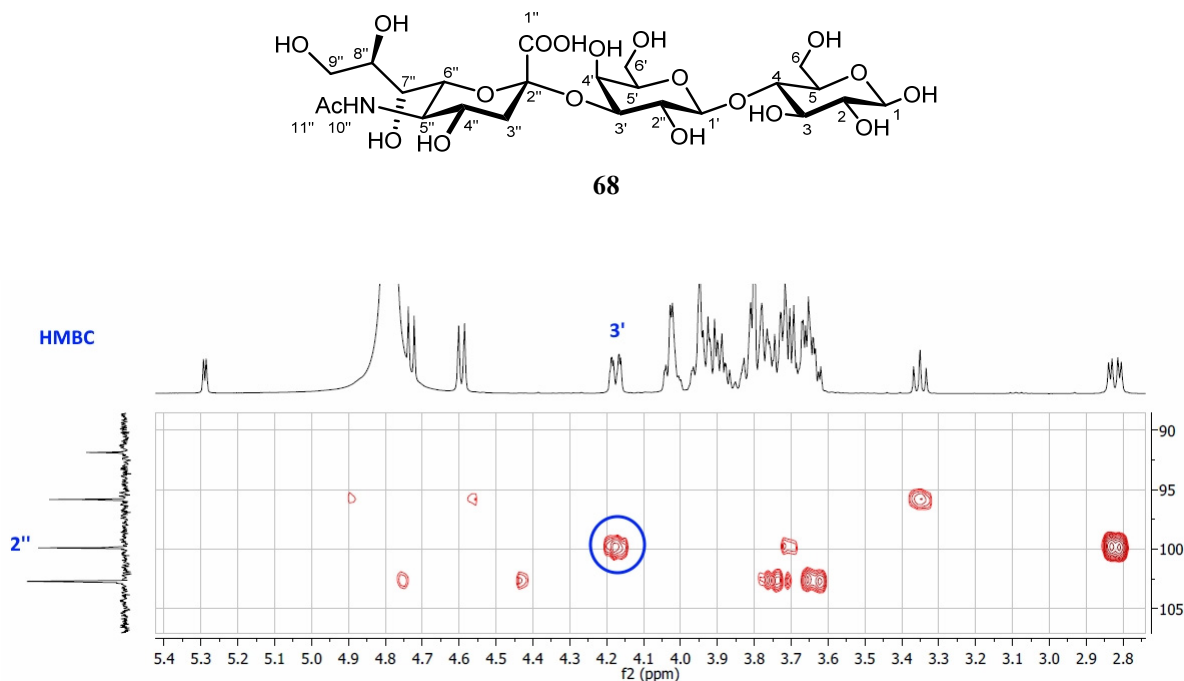


Abb. 43. HMBC-2D-NMR Spektrum von G_{M3} aus der Synthese mittels 2,3-SiaT_{p_{ph}} (A151D). Das markierte Kreuzsignal zwischen ¹³C-2'' und ¹H-3' bestätigt die 2,3-Verknüpfung.

4.13. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt und bestätigt werden, dass das native Enzym der α 2,3-Sialyltransferase aus *Photobacterium phosphoreum* verschiedene, mehrfache Spezifität für Sialyltransfer, CMP-Neu5Ac-Substrathydrolyse und Sialidaseaktivität besitzt. Für die Synthese von 2,3-Sialokonjugaten sind der Abbau des CMP-Neu5Ac-Startmaterials und die Zersetzung des Transferprodukts durch Sialidase jedoch unerwünscht, da der Transfer hierdurch unvollständig und ineffizient abläuft. Für den selektiven Sialyltransfer ist der nötige Überschuss an CTP, der zur Kompensation des kompetitiven Verbrauchs des CMP-Neu5Ac durch Hydrolyse in Eintopfsynthesen eingesetzt werden kann, ein erheblicher Kostenfaktor, insbesondere bei Reaktionen im größeren Maßstab.

Die Analyse der beiden Nebenreaktionen – Substrathydrolyse und Sialidaseaktivität – der 2,3-SiaT_{p_{ph}} und eine mögliche Unterdrückung waren das Ziel dieser Arbeit. In einem gelenkten Mutageneseansatz wurde angestrebt, die hydrolytischen Aktivitäten der 2,3-SiaT_{p_{ph}} zu minimieren.

Zur Analyse der Sialyltransferaseaktivitäten wurde eine neue kontinuierliche kolorimetrische Assaymethode entwickelt, welche auf der Detektion der pH-Wertverschiebung während der Reaktion beruht. Dieser universelle Assay kann prinzipiell unabhängig von Sialyldonor- und Akzeptorstrukturen zur Bestimmung der Aktivitäten eingesetzt werden. Mittels eines Indikators kann die Freisetzung von Protonen während der Reaktion visualisiert und im Hochdurchsatzverfahren mittels eines UV/VIS-Plate-Readers detektiert werden.

Zur Analyse der Bindungsverhältnisse wurde ein 3D-Strukturmodell der 2,3-SiaT_{p_{ph}} mit den gebundenen Substraten CMP-Neu5Ac und Lactose erstellt. Hierfür wurden die Substrate aus Kristallstrukturen der verwandten SiaT aus *Pasteurella multocida* mittels Alignment in eine vorhandene Kristallstruktur der 2,3-SiaT_{p_{ph}} eingefügt.

Durch dieses Modell konnten in einer strukturbasierten Sättigungsmutagenese der 2,3-SiaT_{p_{ph}} dreizehn Aminosäurepositionen rund um das reaktive Zentrum identifiziert und anschließend einzeln oder paarweise kombiniert mutiert werden.

Nach chemoenzymatischer Synthese des Donorsubstrats CMP-Neu5Ac wurde in einem Screening das Verhältnis von Sialyltransfer aus CMP-Neu5Ac auf Lactose *versus* CMP-Neu5Ac-Hydrolyse mittels des entwickelten Assays für alle erzeugten Varianten untersucht. Hierbei wurden *hot spots* in sechs Positionen identifiziert. In der kinetischen Charakterisierung wurden drei Varianten mit bis zu 5-fach höherer katalytischer Effizienz für den Sialyltransfer (S359T/S360T) und bis zu 10-fach reduzierter Effizienz der Hydrolyse (L387A) gefunden. Als Variante mit dem effektivsten Profil wurde Variante A151D charakterisiert, sie zeigt 4.3-fach reduzierter Hydrolyse und 1.9-fach gesteigerter Sialyltransfereffizienz. In einer NMR-Studie wurde schließlich bestätigt, dass die Sialidaseaktivität bei L387A bis zu 68-fach und bei A151D 26-fach reduziert ist.

4. Allgemeiner Teil II

Eine weiterhin durchgeführte Zufalls-Kombinationsmutagenese der identifizierten *hot spots* sowie eine gezielte Kombination der besten Varianten zeigte keine weiteren synergetischen Effekte, bei denen sich die verbesserten Eigenschaften ergänzten oder summierten.

In einem Vergleichsexperiment im präparativen Maßstab wurde gezeigt, dass durch die Reduktion der hydrolytischen Nebenreaktionen die Ausbeute des G_{M3} -Trisaccharids (α 2,3-Neu5Ac-Lac, **68**) in einer Eintopf-Zwei-Enzym-Kaskade unter Verwendung der modifizierten Variante 2,3-SiaT_{pph}_A151D signifikant von 86 % (natives Enzym) auf 91 % verbessert wird. Die NMR-Analyse des Produkts bestätigt zudem die selektive Bildung α 2,3-verknüpfter Sialokonjugate durch die Variante A151D.

Kombiniert mit den synthetischen Ergebnissen des Teil I dieser Arbeit – Synthese von G_{M3} -Trisaccharidanaloga – konnte gezeigt werden, dass die verkürzte α 2,3-Sialyltransferase aus *Photobacterium phosphoreum* ein nützlicher Katalysator zur regio- und stereospezifischen Synthese von Sialokonjugaten ist. Neben der bereits bekannten Toleranz gegenüber Variationen in C5- und C9-Position der Sialinsäureeinheit werden auch Variationen der gesamten Kohlenstoffkette von C7- bis C9-Position von der hydrolyseoptimierten Variante A151D gut toleriert. Die so erzeugten *neo*-Sialokonjugate konnten in exzellenten Ausbeuten isoliert werden.

Die vorliegenden Studien bestätigen und ermöglichen einen hocheffizienten synthetischen Zugang zu einer Vielzahl an komplexen natürlichen und neuartigen Sialokonjugaten für wichtige glycobiologische Studien.^[175, 316-318]

5. Experimentaltteil

5.1. Materialien und Geräte

5.1.1. Allgemeines

Alle Reaktionen wurden unter Rühren mittels eines beheizbaren Magnetrührers durchgeführt. RT steht hierbei für Raumtemperatur und entspricht 20-25 °C. Wurde die Reaktion unter Erhitzen durchgeführt, wurde ein PEG-Bad verwendet. Wurde das Lösemittel „im Vakuum entfernt“, kam ein Rotationsverdampfer unter Membranpumpenvakuum mit 40 °C Wasserbadtemperatur zum Einsatz. Nach Reduktion oder Entfernen des Lösemittels wurden die Substanzen in Wasser gelöst und mittels Gefriertrocknung an der Lyophille getrocknet. Reaktionen bei 0-20 °C wurden im Eisbad, wenn nötig unter Zugabe von Salz (NaCl), gekühlt. Reaktionen bei unter -50 °C wurden mit einem Gemisch aus 2-Propanol/Trockeneis im Dewar gekühlt. Reaktionen unter Schutzgas wurden unter Argon-Atmosphäre durchgeführt.

5.1.2. Lösemittel

Die Absolutierung der verwendeten Lösungsmittel erfolgte mit Trocknungsmitteln und anschließender Destillation nach den entsprechenden Standardverfahren.^[319]

- Methanol: Magnesium
- Ethanol: Natrium, Phthalsäurediethylester
- Tetrahydrofuran: Natrium/Benzophenon
- Dichlormethan: Calciumhydrid
- Diethylether: Natrium/Benzophenon
- Pyridin: Kaliumhydroxid

Eventuelle Lagerung erfolgte über 3 Å- bzw. 4 Å-Molsieb, welches zuvor bei 250 °C im Kugelrohrfen unter Vakuum ausgeheizt wurde.

5.1.3. Chromatographiemethoden

Dünnschichtchromatographie

Für die Analyse per Dünnschichtchromatographie wurden kieselgelbeschichtete Aluminiumplatten der Firma *Merck KGaA*, Darmstadt, genutzt: 60 F₂₅₄.

Zur Detektion wurden die DC-Platten in das jeweilige Färbereagenz getaucht. Trat keine direkte Färbung auf, wurden die DC-Platten anschließend unter Wärmeeinwirkung mittels einer Heizpistole entwickelt. Die angegebenen Laufmittelgemische entsprechen Volumenverhältnissen.

So weit nicht anders angegeben, wurde folgendes Laufmittel verwendet:

n-Butanol / Aceton / AcOH / H₂O = 35 : 35 : 7 : 23 .

5. Experimentalteil

Die Detektion erfolgte mit UV-Licht ($\lambda = 254\text{ nm}$) und unter Verwendung der folgenden Anfärbereagenzien:

- Zucker-Färbereagenz:
60 mg *N*-(1-Naphtyl)-ethylendiamin, 200 mL MeOH, 10 mL H₂SO₄ (konz.)
- Anisaldehyd-Färbereagenz:
200 mL EtOH (abs.), 7.5 mL H₂SO₄ (konz.), 2.2 mL AcOH, 5.5 mL Anisaldehyd
- DNPH-Färbereagenz:
0.3 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin, 20 mL H₂O, 50 mL EtOH, 15 mL H₂SO₄ (konz.)
- Amidfärbereagenz:
0.6 g Ninhydrin, 200 mL *n*-Butanol, 6.0 mL AcOH

Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte an Kieselgel einer Partikelgröße von 0.040-0.063 μm der Firma *Roth*. Bei den verwendeten polaren Lösemittelgemischen ist stark darauf zu achten, dass sich das Kieselgel nicht auflöst. Bei Kieselgel anderer Firmen war dies der Fall. In den meisten Fällen (bis auf säureempfindliche Produkte) wurde das Produkt zur Chromatographie auf Kieselgel aufrotiert oder mit Kieselgel zusammen in der Lyophille getrocknet, so dass es trocken auf die (nass) gepackte Säule aufgetragen werden konnte. Dies trägt bei Kohlenhydraten zu einer deutlichen Verbesserung der Trennung bei.

Zur Filtration wurde Kieselgur Celite 533 der Firma *Fluka* genutzt. Vor Gebrauch wurde es jeweils mit dem Lösemittel der Reaktionsmischung vorgespült.

Zur Größenausschlusschromatographie wurde Bio Gel P-2fine, Korngröße $65 \pm 20 \mu\text{m}$ der Firma *BioRad* genutzt.

5.1.4. Gefriertrocknung

Das Gefriertrocknen (Lyophilisieren) von Proben erfolgte an einer Lyophille des Typs *LyoQuest* der Firma *Telstar*.

5.1.5. HR-ESI-Massenspektrometrie

Die Aufnahme von ESI-Massenspektren erfolgte mit einem Gerät der Firma *Bruker*: Impact II ESI-Q-TOF.

5.1.6. NMR-Spektroskopie

Alle Proben wurden in deuteriertem Lösungsmittel gelöst und an folgendem Gerät vermessen:

Bruker 500 MHz DRX 500:

500 MHz ^1H -NMR und 125.8 MHz ^{13}C -NMR (+DEPT), ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC und ^1H - ^1H -NOESY

Die angegebenen Werte der chemischen Verschiebung wurden auf das deuterierte Lösungsmittel, relativ zum Tetramethylsilanstandard bei $\delta = 0$ ppm, normiert:^[320]

- D_2O : $\delta(^1\text{H}) = 4.79$ ppm
- Methanol- d_4 : $\delta(^1\text{H}) = 3.31$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 49.00$ ppm
- CDCl_3 : $\delta(^1\text{H}) = 7.26$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 77.16$ ppm

Alle Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben. Bei der Zuordnung stehen s für Singulett, d für Dublett, t für Triplett, q für Quartett und m allgemein für Multipllett.

Zur Auswertung der NMR-Spektren wurde die Software *MestReNova 11.0.3* verwendet. Zur quantitativen Bestimmung der NMR-Studien wurde eine akkurate manuelle Phasenkorrektur ausgeführt und die Basislinienkorrektur mittels *Whittaker Smoother Method* durchgeführt.

5.1.7. UV/Vis-Spektren – Mikrotiterplatten-Reader

Die Messung der UV/Vis-Spektren von 96-well-Mikrotiterplatten erfolgte an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät des Modells *SPECTRAMAX 190* der Firma *Molecular Devices*. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *SoftMax Pro 6.5.1*.

5.1.8. Ozonolysen

Ozonolysen wurden an einem Ozon-Generator der Firma *Fischer* (Modell 502) bei einer Leistung von 80% durchgeführt. Die Durchflussrate/Konzentration wurde für das jeweilige Experiment angepasst.

5.1.9. Chemikalien

Der Großteil der Chemikalien wurde bei *Sigma-Aldrich*, *Acros Organics* und *Carl Roth* erworben. Weitere Bezugsquellen essentieller Reagenzien:

Dowex 50 WX8 pract. (H^+ -Form, 100-200 mesh)	<i>Serva</i>
Neu5Ac	<i>R&S PharmaChem, China</i>
Indium, 100 mesh, 99.9%	<i>Alfa Aesar</i>

5.1.10. Weitere Geräte

Gerät	Hersteller
Thermocycler PCR System 9700	GeneAmp™
Vortexer MS1 Minishaker	IKA
96-Well-Platten	Sarstedt
Acetatfolie für 96-Well-Platten	Sarstedt
Thermomixer zur Inkubation	Eppendorf
HPTLC Applikator: Automatic TLC Sampler 4	CAMAG
Densitometrische Analyse: TLC Scanner 4	CAMAG
Mikrotiterplatten-Schüttler: Titramax 1000	Heidolph
+ Inkubator 1000	Heidolph
Zentrifugen: 5415D, 5804, 5810R	Eppendorf
Lyophilisator	Telstar Lyo Quest
Nickelsäule: HisTrap	GE Healthcare, Bio-Sciences AB
SDS-Gelkammer	Bio-Rad
Vivacell 250 (Ultrafiltrationszelle)	Sartorius Biotech AG
Ultraschallbad RK52H	Sonorex
Heizofen, Trockenschrank	Heraeus
Magnetrührer, RCT basic	IKA
Thermometer ETS-D4 fuzzy	IKA
Heißluftpistole HL 1910 E	Steinel Vertrieb GmbH
Rotationsverdampfer R-114	Büchi
Wasserbad B-480	Büchi
Waage AS60/220.R2	Radwag
Titration TitroLine® 7000	SI Analytics

5.2. Allgemeine Arbeitsmethoden

5.2.1. Verwendete Enzyme

- EC 2.7.7.43 CMP-Sialat-Synthetase aus *Neisseria meningitidis* serogroup B
- EC 3.1.3.1 alkalische Phosphatase aus Rinderdarmschleimhaut von *Fluka*
- EC 3.6.1.1 anorganische Pyrophosphatase aus Bäckerhefe von *Sigma*
- EC 2.4.99.4 α -2,3-Sialyltransferase aus *Photobacterium phosphoreum*
- EC 3.2.1.18 Neuraminidase aus *Closterdium perfringens* von *Sigma*
- EC 3.2.1.18 Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* von *New England Biolabs*
- EC 1.11.1.7 Meerrettich peroxidase von *Sigma*
- EC 1.1.3.4 Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* von *Sigma*
- EC 3.2.1.23 β -Galactosidase aus *Aspergillus oryzae* von *Sigma*
- Lysozym von *GERBU Biotechnik GmbH*

5.2.2. CSS-Assay – Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Parameter sind vergleichbar zu den publizierten Methoden gewählt.^[114, 225]

Die Komponenten werden nacheinander in 96-well-Mikrotiterplatten pipettiert. Das Gesamtvolumen von pro well beträgt 200 μL mit folgenden Konzentrationen: Tris-Puffer (2 mM, pH 8.6; 75-175 μL), Kresolrot (2 μL , 10 mg L^{-1} , 0.026 mM), Substrat (Neu5Ac und Analoga, 0-100 μL , 0-10 mM) und Enzym (3 μL ; 1.27 μg). Alle Lösungen werden zuvor sorgfältig auf pH 8.6 eingestellt und auf 37°C temperiert. Die Platten werden für ≈ 45 sec bei 37°C geschüttelt, bevor die Startkomponente (20 μL frisch präparierte CTP-Lösung, Endkonzentration: 0.5 mM) dazugegeben wird. Die Platte wird danach sofort für 5 sec geschüttelt und dann direkt im UV-Plattereadler bei einer Wellenlänge von 574 nm ausgelesen. Die experimentellen Daten werden per Michaelis-Menten-Gleichung mittels *Origin*-Software (v9.1G, *OriginLab*) ausgewertet, um die kinetischen Parameter zu ermitteln. Die Proteinkonzentration wird mit dem Standard-BCA Assay (bicinchoninic acid assay, *Sigma-Aldrich*) zuvor ermittelt. Alle Messungen werden als Triplikate durchgeführt.

5.2.3. Zellkultur-Medien und Zellen

LB-Medium

Folgende Substanzen werden in VE-Wasser gelöst:

Hefeextrakt	5 g/L
Trypton	10 g/L
NaCl	5 g/L

Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt, die Lösung wird autoklaviert.

AI-Medium (Auto-Induktions-Medium)

Folgende Chemikalien werden in VE-Wasser gelöst:

Hefeextrakt	5.55 g/L
Trypton	11.10 g/L
NH ₄ Cl	2.97 g/L
Na ₂ SO ₄	0.78 g/L
Glycerol	5.55 g/L
Glucose	0.55 g/L
Lactose	2.22 g/L

BL21 (DE3)-Zellen von *New England BioLabs*

Genotyp: fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRIB

int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5

XL-10 Gold-Ultrakompetente Zellen von *Agilent*

Genotyp: Tet^rΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1
gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]

5-alpha competent *E. coli* Zellen von *New England BioLabs*

Genotype: fhuA2 (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 80(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1
endA1 thi-1 hsdR17

5.2.4. Exprimierung von 2,3-SiaT_{pph}

Das Codon-optimierte verkürzte Gen $\Delta 24$ -2,3SiaT_{pph} wurde kommerziell mit *NdeI* und *BamHI* Restriktionstellen jeweils am 5'- und 3'-Terminus erworben. Das Gen wird in den pET19b-Vektor ligiert (Kapitel 5.5.1) und das Konstrukt pET19b-SiaT_{pph} für die Transformation von BL21(DE3) Wirtszellen für die Überexpression genutzt. Positive Kolonien werden gepickt, in 5 mL LB-Amp-Medium bei 37°C kultiviert und bei -80°C in 16% Glycerolstock gelagert. SDS-Page-Analyse bestätigt, dass die rekombinante verkürzte 2,3SiaT_{pph} gut in löslicher Form exprimiert wird (Kapitel 5.5.2).

Die Expression wird in 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen in 0.5 L AI-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin in einem Ecotron-Schüttler (*Infors AG*, Bottmingen, CH) für 6 h bei 37°C, 18 h bei 30°C und 220 rpm durchgeführt. Die Zellen werden bei 37°C für 90 min in 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4) lysiert und mit 0.5 mg/mL Lysozym und 5 U/mL DNase I versetzt. Das Lysat wird auf 0.5 M NaCl eingestellt und bei 12,000 g für 30 min zentrifugiert, um eine klare Lösung zu erhalten. Nach Puffertausch auf 2 mM Tris mittels Zentrifugieren (15 mL Ultrafiltrationseinheit MWCO 10 kDa) wird die Lösung im Anschluss lyophilisiert und die 2,3SiaT als watteartiger Feststoff erhalten.

5.2.5. Exprimierung von CSS

Verläuft nach Animpfen aus einem Glycerolstock identisch zu 5.2.4.

5.2.6. Mutagenese der 2,3SiaT_{p_{pp}}

Die PCR wurde am Plasmid pET19b-SiaT_{p_{pp}} unter Verwendung des *Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs, Germany) durchgeführt. Für eine Liste der Primer siehe Kapitel 5.5. Das lineare, unmethylierte PCR-Produkt wird mittels Polynukleotidkinase phosphoryliert und mittels T4 DNA-Ligase ligiert. Vor der Transformation in chemisch kompetente NEB5 α -Zellen wird das methylierte Templat mittels DpnI-Restriktionsenzym abgebaut. Das PCR-Produkt wird per Agarosegel-Elektrophorese untersucht, um Amplifizierung und vollständigen DpnI-Verdau zu bestätigen. Für die Bibliotheken wird eine Transformationsmischung über Nacht in Flüssigkultur zur Plasmidpräparation inkubiert. Die Plasmidmischung wird sequenziert, um die Poly-Mutationen zu bestätigen. Die Plasmide werden dann zur Transformation von BL21(DE3)pLacI Tuner-Zellen mittels Elektroporation genutzt. Die Zellen werden auf Agarplatten bei 37°C für 16-18h kultiviert, individuelle Klone gepickt und in 96-well-Titerplatten mit 130 μ L LB-Amp-Medium angeimpft. Die Masterplatten werden für 20 h bei 37°C inkubiert und zur Lagerung bei -80°C mit 50 μ L 50 Glycerol versetzt sowie mit Acetatfolie versiegelt.

5.2.7. Bibliotheks-Screening der 2,3-SiaT_{p_{pp}}

BL21-TunerTM-Zellen (Novagen), die mit den entsprechenden Plasmiden transformiert sind, werden mit 0.1 mM IPTG induziert und bei 37°C für 20 h in deep-well-Titerplatten inkubiert. Nach Zentrifugieren der Platten, Entfernen des Überstands sowie Zelllyse durch Zugabe von Lysozym (0.15 mg/well) und Cyanase-Nuklease (0.6 U/well) (Roth) werden die Platten erneut zentrifugiert und der Enzym-enthaltende Überstand in Assayplatten transferiert. Für das Screening wird 40 μ L klares Lysat benutzt. Jede Platte wird parallel auf Transferaseaktivität mit Lactose (5 mM) und Hydrolyseaktivität ohne Lactose getestet. Jedes well enthält eine Endkonzentration aus Tris-Puffer (2 mM, pH 8.0), Phenolrot (0.028 mM), Lactose (5 mM/0 mM) und Enzymlösung (40 μ L Lysat). Der Assay wird durch Zugabe von CMP-Neu5Ac-Lösung gestartet (0.5 mM) und die Reaktionsrate mittels OD-Wertänderung bei 560 nm bestimmt. Die lineare Steigung wird mit *Microsoft-Excel* ermittelt und somit die Reaktionsraten für Transfer (in Anwesenheit von Lactose) und Hydrolyse (in Abwesenheit von Lactose) bestimmt.

5.2.8. 2,3-SiaT-Assay – Bestimmung der kinetischen Parameter

Die Komponenten werden nacheinander in 96-*well*-Mikrotiterplatten pipettiert. Das Gesamtvolumen von pro *well* beträgt 200 μL mit folgenden Konzentrationen: Tris-Puffer (2 mM, pH 8.0; 90-170 μL), Phenolrot (2 μL , 10 mg L^{-1} , 0.028 mM), variable Substrate (Lactose oder CMP-Neu5Ac, jeweils 0-80 μL) und Enzym (4-10 μL). Alle Lösungen werden zuvor sorgfältig auf pH 8.0 eingestellt und auf 30°C temperiert. Die Platten werden für ≈ 45 sec bei 30°C geschüttelt, bevor die Startkomponente (20 μL frisch präparierte CMP-Neu5Ac-Lösung oder Lactose) dazugegeben wird. Die Platte wird danach sofort für 5 sec geschüttelt und dann direkt im UV-Plattereader bei einer Wellenlänge von 560 nm ausgelesen. Die experimentellen Daten werden per Michaelis-Menten-Gleichung mittels *Origin*-Software (v9.1G, *OriginLab*) ausgewertet, um die kinetischen Parameter zu ermitteln. Die Proteinkonzentration wird mit dem Standard-BCA-Assay (bicinchoninic acid assay, *Sigma-Aldrich*) zuvor ermittelt. Alle Messungen werden als Triplikate durchgeführt.

5.2.9. HPTLC-Experimente

Zur HPTLC-Analyse von Reaktionsfortschritten müssen Proben bekannter Konzentration in einer Menge von 1-15 μL mit der jeweils für das Lösemittel vorgesehenen Methode (unterschiedliche Applikationsgeschwindigkeit zur Sicherstellung der Trocknung) auf die DC-Platten gesprüht werden (*CAMAG Automatic TLC Sampler 4*).

Zur Entwicklung der Platten werden sie ins jeweiligen Elutionsmittel gestellt und anschließend mit einem geeigneten Färbemittel entwickelt. Im vorliegenden Fall wird Anisaldehydlösung genutzt. Zur Entwicklung werden die Platten für 90 Sekunden im Ofen bei 120°C inkubiert und anschließend gleichmäßig per Hand mittels Heizluftpistole fertig entwickelt, so dass alle Spot gleichmäßig zu sehen sind. Ein punktuell Verweilen mit der Heatgun ist unbedingt zu vermeiden. Mittels Scanner (*CAMAG TLC Scanner 4*) werden dann die Platten bei 380 nm ausgelesen (zuvor ist ein Scan für die Ermittlung der optimalen Wellenlänge nötig) und über die ermittelten Integrale durch die Konzentration und Menge der aufgetragenen Probe die Umsätze/Substratmengen errechnet. Zur Kalkulation sind entsprechende Referenzproben von Substrat und Produkt auf der identischen DC-Platte notwendig.

5.3. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) - Synthese

5.3.1. AAV1 Aktivierung von Dowex

Zur Aktivierung wird DOWEX[®] 50 WX8 (Partikelgröße: 100-200 mesh, Gegenion: H⁺, Kapazität: 2.0 eq/L) in eine Nutsche mit Fritte gefüllt und mit H₂O gewaschen bis das Waschwasser klar ist. Anschließend wird der Ionentauscher mit 2 M HCl konditioniert und anschließend mit H₂O gewaschen bis das Waschwasser neutral ist. Zur Präparation trockenen Ionenaustauschers, wie er für die wasserfreie Methoxyschutzung nötig ist, wird nun mit wasserfreiem Methanol nachgewaschen um größere Wasserreste zu entfernen. Anschließend wird der Austauscher am Rotationsverdampfer von Lösemitteln befreit und umgehend eingesetzt. Der Verlust durch Trocknen beträgt etwa 50 % (Masse).

5.3.2. AAV2 Barbier-Reaktionen

Aldehyd **5** wird in einer Mischung aus H₂O/THF = 1:1 (v/v; 5 mL pro 50 mg) gelöst. Indiumpulver (2 eq., 200 mesh) und eine katalytische Menge InCl₃ werden unter starkem Rühren hinzugefügt. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Mischung des jeweiligen Allylbromids (3 eq.) in THF gestartet. Die Reaktion wird bei RT für eine Stunde im Ultraschallbad platziert und anschließend eine Stunde bei RT gerührt. Bei Bedarf erfolgt eine Wiederholung dieses Intervalls. Sobald die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz anzeigt, wird die Reaktionsmischung mit 1.0 M NaOH neutralisiert, durch Celite filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

5.3.3. AAV3 Entschützung der anomeren Methoxygruppe

Das jeweilige Methylglycosid wird in H₂O gelöst. Ameisensäure wird hinzugefügt (Konz. siehe Einzelvorschrift) und die Reaktionsmischung auf 80 °C für 4-5 h erhitzt. Zur Reaktionskontrolle wird das Lösemittel im Vakuum entfernt und ein NMR aufgenommen, da die geschützte und entschützte Komponente auf der DC schwierig bis unmöglich zu unterscheiden sind. Die Vorschrift wird wiederholt bis kein Edukt mehr im NMR zu sehen ist.

Nach vollständiger Entschützung wird die Mischung über Celite filtriert um Zerfallsprodukte abzutrennen. Es wird mit H₂O nachgewaschen, das Rohprodukt lyophilisiert und säulenchromatographisch gereinigt.

5.3.4. AAV4 Synthese von α 2,3-Sialyllactosiden mittels Δ 24- α 2,3-SiaT_{p_{ph}}_A151D

Das jeweilige Sialinsäureanalogon (40 mg) und CTP (1.5 eq.) werden in Tris-Puffer (12 mL, 50 mM, pH 8.5) mit 20 mM MgCl₂ gelöst. Nach Zugabe anorganischer Pyrophosphatase (10 U) wird die Reaktionsmischung erneut auf pH 8.5 bei 37 °C eingestellt und die Reaktion durch Zugabe von 10 mg CSS aus *Neisseria meningitidis* gestartet. Der pH-Wert wird durch Autotitration konstant gehalten. Da sich der pH-Wert zu Beginn sehr schnell ändert, wird händisch eine halbkonzentrierte NaOH-Lösung dazu pipettiert, um ein zu großes Reaktionsvolumen zu vermeiden. Nach 2-3 h bei 37 °C, wenn die DC-Kontrolle den vollständigen Verbrauch der Neu5Ac-Komponente anzeigt, wird Lactose (3 eq.) und Δ 24- α 2,3-SiaT_{p_{ph}}_A151D (0.5 mg) dazugegeben. Nach 22 h werden dann zur vollständigen Umsetzung alkalische Phosphatase (319 U) zugesetzt. Nach vollständigem Verbrauch der CMP-Neu5Ac Komponente (DC-Kontrolle: ~27 h) wird die Reaktion durch ein Volumenäquivalent kaltes Ethanol (-20 °C) verdünnt, um die Reaktion zu stoppen. Nach 3 h bei -20 °C wird der Niederschlag durch Zentrifugieren entfernt, der Überstand entnommen und das Ethanol im Vakuum entfernt. Die verbliebene wässrige Lösung wird dann direkt über Biogel P-2 (Bio-Rad, Germany; 3 × 100 cm Säule) aufgereinigt (Lösemittel: H₂O). Die Produktfraktionen werden gesammelt und lyophilisiert. Verbliebener Tris-Puffer kann im NMR quantifiziert werden, um eine korrekte Ausbeute zu bestimmen. Eine Entfernung der Salze durch *reversed-phase*-Chromatographie (RP-C18) ist möglich.

Zusatz: Zeigt die Reaktion bei der DC-Kontrolle nach 22 h noch keinen geschätzten Mindestumsatz von 80%, können als Zwischenschritt Salze durch Zentrifugieren entfernt werden. Zu hohe CMP-Konzentrationen können die Sialyltransferase hemmen.

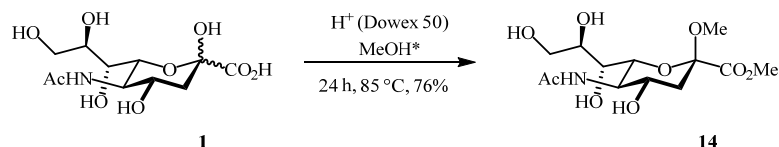
5.4. Synthesevorschriften

So weit nicht anders angegeben, wurde für die DC folgendes Laufmittel verwendet:

n-Butanol / Aceton / AcOH / H₂O = 35 : 35 : 7 : 23 .

5.4.1. Versuche zu Kapitel 3.3

N-Acetyl-2-*O*-methyl- β -D-neuraminsäuremethylester (14)

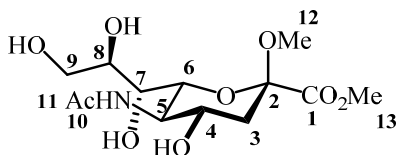


Synthese nach *Veronesi et al.*^[223]

Eine Mischung aus Neu5Ac (**1**) (4.00 g, 12.9 mmol, 1.0 eq) und frisch präpariertem trockenem Dowex-50 (H⁺-Form, 7.8 g, **AAV1**) wurden in Methanol (660 mL) für 24 h zum Rückfluss erhitzt. Dazu wurde eine Soxhletapparatur mit trockenem 3 Å-Molsieb befüllt, um Wasser zu entziehen. Die warme Reaktionsmischung wurde über Celite filtriert, mit etwas Methanol nachgewaschen und im Vakuum eingengt, bis ein gelbes Öl zurückblieb. Dieser Rückstand wurde in Methanol (17 mL) gelöst und mit Diethylether (45 mL) versetzt, bis eine weiße Trübung einsetzte. Nach 24 h im Gefrierschrank (-20 °C) wurde der farblose kristalline Feststoff in der Kälte abfiltriert. Die Lösung wurde wiederum im Vakuum eingengt und die Prozedur mit MeOH/Et₂O = 1 : 3 bis 1 : 5 zweimal wiederholt.

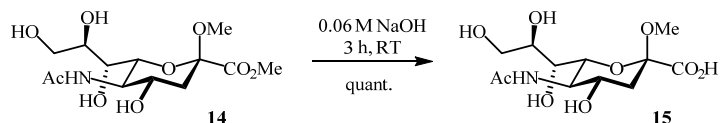
Ausbeute: 3.31 g (9.81 mmol, 76%) als farbloser kristalliner Feststoff.

Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.63



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.11 (ddd, J = 11.4, 9.4, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 4.01–3.92 (m, 6H, 5-, 6-, 8-, 13-H), 3.92–3.89 (m, 1H, 9a-H), 3.74 (dd, J = 6.2, 5.8 Hz, 1H, 9b-H), 3.65 (dd, J = 9.3, 1H, 7-H), 3.34 (s, 3H, 12-H), 2.46 (dd, J = 13.3, 4.9 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.12 (s, 3H, 11-H), 1.86 (dd, J = 13.3, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.44 (C-10), 171.00 (C-1), 99.83 (C-2), 71.18 (C-6), 70.49 (C-8), 68.68 (C-7), 67.03 (C-4), 64.01 (C-9), 54.16 (C-13), 52.34 (C-5), 51.64 (C-12), 39.82 (C-3), 22.70 (C-11).

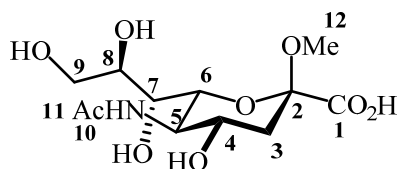
N-Acetyl-2-O-methyl-β-D-neuraminsäure (15)

Synthese nach *Veronesi et al.*^[223]

Eine Lösung aus **14** (2.20 g, 6.52 mmol, 1.0 eq) in 0.06 N NaOH (165 mL, 9.90 mmol, 1.5 eq.) wurde bei RT für 3 h gerührt. Nach Vollständigkeit (DC-Kontrolle) wurde die Reaktionsmischung auf pH 7.0 neutralisiert, indem Dowex-50 (H⁺-Form; 2.5 g) dazugegeben wurde. Die Suspension wurde abfiltriert und im Vakuum auf 10 mL eingengt. Diese Lösung wurde lyophilisiert.

Ausbeute: 2.10 g (6.50 mmol, quant.) als farbloser kristalliner Feststoff.

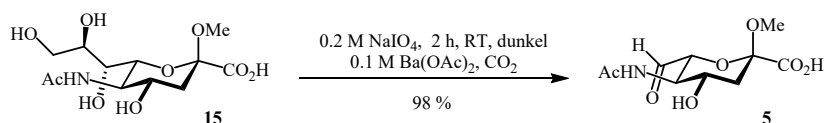
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.21



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.09 (ddd, J = 11.4, 9.8, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.98-3.87 (m, 4H, 5-, 6-, 8-, 9a-H), 3.73 (dd, J = 11.7, 5.5 Hz, 1H, 9b-H), 3.62 (dd, J = 9.2, 1.1 Hz, 1H, 7-H), 3.30 (s, 3H, 12-H), 2.42 (dd, J = 13.2, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.11 (s, 3H, 11-H), 1.77 (dd, J = 13.2, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 174.82 (C-10), 174.02 (C-1), 99.98 (C-2), 70.37 (C-8), 70.00 (C-6), 68.34 (C-7), 66.87 (C-4), 63.53 (C-9), 51.95 (C-5), 50.69 (C-12), 39.63 (C-3), 22.15 (C-11).

**Methyl 3-(acetylamino)-3,5-dideoxy-L-lyxo-(6S)-heptulo-2,6-pyranosiduronsäure
– verkürzter C₇-Aldehyd (5)**

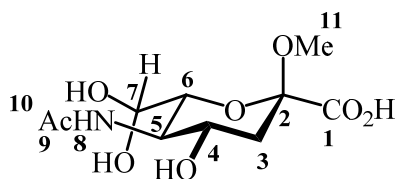


Synthese nach *Veronesi et al.*^[223]

Zu einer Lösung aus **15** (1.00 g, 3.09 mmol, 1 eq.) in 35 mL H₂O wurden 0.2 M NaIO₄ (80.5 mL, 5.2 eq.) hinzugefügt. Nach 2 h Rühren im Dunklen zeigte die DC Vollständigkeit an. Eine Lösung aus Ba(OAc)₂ (117 mL, 0.1 M, 3.8 eq.) wurde dazugegeben, um IO₄⁻- und I⁻-Salze zu präzipitieren. Die Salze wurden abfiltriert und für 30 min CO₂ durch die Lösung geleitet, um überschüssiges Barium auszufällen. Nach Filtration wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Zur Ausbeutebestimmung wurden die Salze säulenchromatographisch entfernt (MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4:2:1:8). Zur weiteren Synthese wurde zumeist Rohprodukt ohne Aufreinigung eingesetzt.

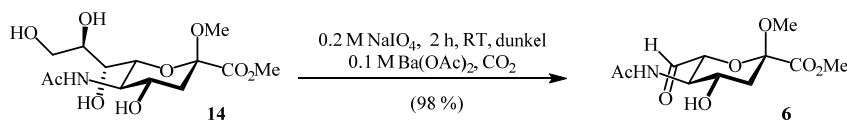
Ausbeute: 0.79 g (3.02 mmol, 98%) als farbloser kristalliner Feststoff.

Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.34



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.52 (s, 1NH, 8-H), 5.09 (d, J = 1.7 Hz, 1H, 7-H), 4.03 (ddd, J = 11.4, 10.0, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.82 (dd, J = 10.0, 10.5 Hz, 1H, 5-H), 3.61 (dd, J = 10.5, 1.8 Hz, 1H, 6-H), 3.26 (s, 3H, 11-H), 2.43 (dd, J = 13.2, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.10 (s, 3H, 10-H), 1.72 (dd, J = 13.2, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.45 (C-1), 175.08 (C-9), 100.97 (C-2), 88.81 (C-7), 74.14 (C-6), 67.49 (C-4), 53.26 (C-5), 51.10 (C-11), 40.24 (C-3), 22.77 (C-10).

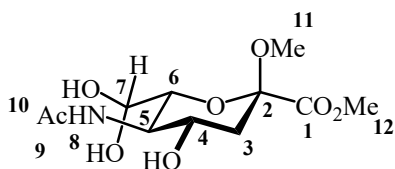
Methyl 3-(acetylamino)-3,5-dideoxy-L-lyxo-(6S)-heptulo-2,6-pyranosidurosäuremethylester (6)


Synthese nach *Veronesi et al.*^[223]

Zu einer Lösung aus **14** (302.7 mg, 0.90 mmol, 1 eq.) in 6 mL H₂O wurden 0.2 M NaIO₄ (23.3 mL, 5.2 eq.) hinzugefügt. Nach 2 h Rühren im Dunklen zeigte die DC Vollständigkeit an. Eine Lösung aus Ba(OAc)₂ (35 mL, 0.1 M, 3.8 eq.) wurde dazugegeben, um IO₄⁻- und I⁻-Salze zu präzipitieren. Die Salze wurden abfiltriert und für 30 min CO₂ durch die Lösung geleitet, um überschüssiges Barium auszufällen. Nach Filtration wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt. Zur weiteren Synthese wurde zumeist Rohprodukt ohne Aufreinigung eingesetzt.

Ausbeute: (98 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

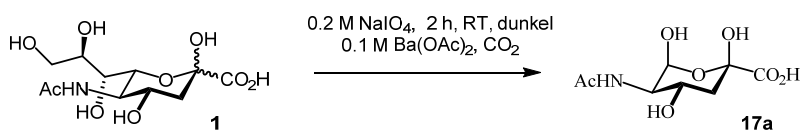
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.84



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.52 (s, 1NH, 8-H), 5.16 (d, J = 1.9 Hz, 1-2H, 7-H), 4.06 (ddd, J = 11.3, 9.9, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.95 (s, 3H, 12-H), 3.86 (dd, J = 10.3, 10.2 Hz, 1H, 5-H), 3.68 (dd, J = 10.6, 1.8 Hz, 1H, 6-H), 3.22 (s, 3H, 11-H), 2.47 (dd, J = 13.3, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.10 (s, 3H, 10-H), 1.86 (dd, J = 13.3, 11.3 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

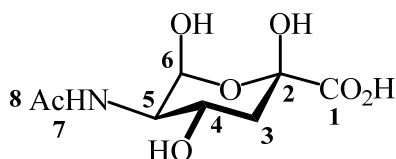
¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 174.58 (C-9), 170.11 (C-1), 99.18 (C-2), 87.88 (C-7), 73.88 (C-6), 66.29 (C-4), 53.69 (C-12), 52.39 (C-5), 51.04 (C-11), 39.10 (C-3), 22.21 (C-10).

2-(Acetylamino)-2,4-dideoxy-L-Lyxo-hexo-1,5-pyranosuronsäure
 – C₆-verkürzte Neu5Ac (17a)



Zu einer Lösung aus **1** (309.3 mg, 0.33 mmol, 1 eq.) in 4 mL H₂O wurden 0.2 M NaIO₄ (8.0 mL, 5.2 eq.) hinzugefügt. Nach 2 h Rühren im Dunklen zeigte die DC Vollständigkeit an. Eine Lösung aus Ba(OAc)₂ (11.75 mL, 0.1 M, 3.8 eq.) wurde dazugegeben, um IO₄⁻- und I⁻-Salze zu präzipitieren. Die Salze wurden abfiltriert und für 30 min CO₂ durch die Lösung geleitet, um überschüssiges Barium auszufällen. Nach Filtration wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt.

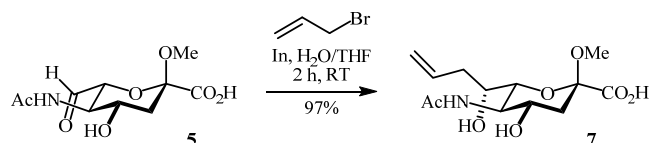
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.49



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.05 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 4.05 (ddd, *J* = 11.5, 10.2, 4.9 Hz, 1H, 4-H), 3.73 (dd, *J* = 10.3, 8.6 Hz, 1H, 5-H), 2.26 (dd, *J* = 13.2, 4.9 Hz, 1H, 1H, 3_{eq}-H), 2.29-2.25 (m, 1H, 3_{ax}-H), 2.12 (s, 3H, H-8).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.67, 175.00, 92.04 (C-6), 66.44 (C-4), 58.44 (C-5), 39.31 (C-3), 22.31 (C-8).

5.4.2. Versuche zu Kapitel 3.4

8,9-Dideoxy-2-*O*-methyl-9-methyliden- β -Neu5Ac (7)

Vorschrift: AAV2 (2h)

Ansatz:

Aldehyd **5** (622 mg, 2.38 mmol)

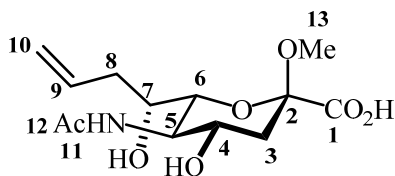
Indiumpulver (546 mg, 4.76 mmol, 2 eq.)

Allylbromid (864 mg, 7.14 mmol, 3 eq.)

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4: 2: 1: 8 (R_f = 0.18).

Ausbeute: 700.5 mg (2.31 mmol, 97%) als farbloser kristalliner Feststoff.

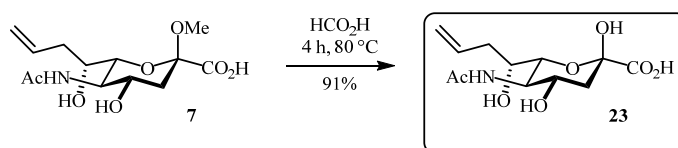
Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.64



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.95 (ddt, J = 17.2, 10.2, 6.9 Hz, 1H, 9-H), 5.23 (dm, J = 17.2 Hz, 1H, 10a-H), 5.20 (dm, J = 10.2 Hz, 1H, 10b-H), 4.04 (ddd, J = 11.4, 10.1, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.90 (dd, J = 10.1, 10.3 Hz, 1H, 5-H), 3.81 (ddd, J = 8.5, 5.7, 1.3 Hz, 1H, 7-H), 3.52 (dd, J = 10.3, 1.2 Hz, 1H, 6-H), 3.25 (s, 3H, 13-H), 2.64 – 2.55 (m, 1H, 8a-H), 2.50 – 2.43 (m, 1H, 8b-H), 2.40 (dd, J = 13.1, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.11 (s, 3H, 12-H), 1.72 (dd, J = 13.2, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.27(C-1), 174.78 (C-11), 135.49 (C-9), 117.42 (C-10), 100.46 (C-2), 73.00 (C-6), 68.55 (C-7), 67.07 (C-4), 52.66 (C-5), 50.59 (C-13), 39.86 (C-3), 37.35 (C-8), 22.14 (C-12).

8,9-Dideoxy-9-methyliden-Neu5Ac (23)



Vorschrift: AAV3 (1x)

Ansatz:

Verbindung 7 (102.3 mg, 0.34 mmol)

H₂O (10 mL)

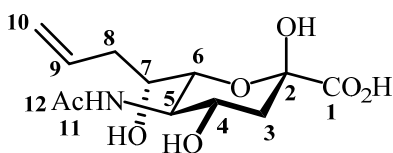
Ameisensäure (500 µL, 610 mg, 13.3 mmol, 39 eq.)

Säulenchromatographie: MeOH/DCM = 1 : 5 → MeOH / Aceton / H₂O / DCM = 4 : 2 : 1 : 8
(R_f = 0.18)

Ausbeute: 89.1 mg (0.31 mmol, 91 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

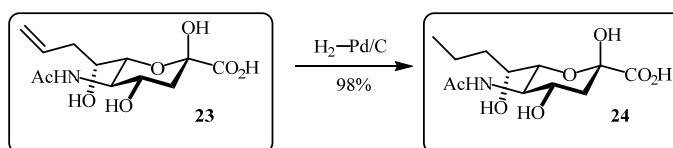
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.65

HRMS (ESI)⁺: *m/z* berechnet für [C₁₂H₁₉N₁O₇]⁺Na⁺ = 312.1054;
gefunden: 312.1054



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.42 (1H, NH), 5.92 (ddt, *J* = 17.3, 10.3, 7.0 Hz, 1H, 9-H), 5.23 (dm, *J* = 17.3 Hz, 1H, 10a-H), 5.19 (dm, *J* = 10.3 Hz, 1H, 10b-H), 4.08 (ddd, *J* = 11.5, 9.9, 4.9 Hz, 1H, 4-H), 3.95 (dd, *J* = 9.9, 10.0 Hz, 1H, 5-H), 3.81 (m, 1H, 7-H), 3.77 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 6-H), 2.47 (ddd, *J* = 14.9, 7.5, 7.0 Hz, 1H, 8a-H), 2.40 – 2.33 (m, 1H, 8b-H), 2.47 (dd, *J* = 13.0, 4.9 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.14 (s, 3H, 12-H), 1.92 (dd, *J* = 13.0, 11.5 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.50 (C-1), 174.89 (C-11), 135.24 (C-9), 117.54 (C-10), 96.95 (C-2), 72.78 (C-6), 68.35 (C-7), 67.14 (C-4), 52.87 (C-5), 39.40 (C-3), 37.24 (C-8), 22.17 (C-12).

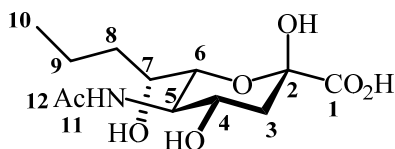
8,9-Dideoxy-9-methyl-Neu5Ac (24)

Allylverbindung **23** (62.7 mg, 217 μmol) wurde in trockenem Methanol (11 mL) gelöst und Palladium auf Kohle (50 mg) hinzugefügt. Eine Hydrierblase mit ~ 2 bar Wasserstoff wurde auf den Kolben gesetzt und die Reaktionsmischung für 24 h bei RT stark gerührt. Nach Filtration über Celite wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 63.1 mg (217 μmol , 98 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

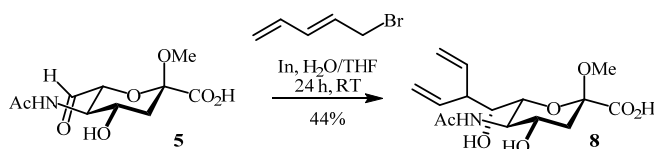
Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.59

MS (ESI)⁺: m/z berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_1\text{O}_7]\text{-H}^+ = 290.12$;
gefunden: 290.12



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 4.08$ (ddd, $J = 11.4, 10.0, 4.9$ Hz, 1H, 4-H), 3.94 (dd, $J = 10.2, 10.1$ Hz, 1H, 5-H), 3.79-3.71 (m, 2H, 6-, 7-H), 2.29 (dd, $J = 12.9, 5.0$ Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.14 (s, 3H, 12-H), 1.91 (dd, $J = 13.0, 11.5$ Hz, 1H, 3_{ax}-H), 1.67 (m, 1H, 8a-H), 1.55 (m, 1H, 8b-H), 1.41 (m, 2H, 9-H), 0.97 (t, 3H, 10-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 176.13$ (C-1), 174.84 (C-11), 96.12 (C-2), 73.03 (C-6), 68.45 (C-7), 67.29 (C-4), 52.96 (C-5), 39.47 (C-3), 34.63 (C-8), 22.12 (C-12), 18.50 (C-9), 13.17 (C-10).

8,9-Dideoxy-8-ethenyl-2-O-methyl-9-methyliden- β -Neu5Ac (8)

Vorschrift: AAV2 (24h, 5 x 1 h US)**Ansatz:**

Aldehyd **5** (1.00 g, 3.83 mmol)

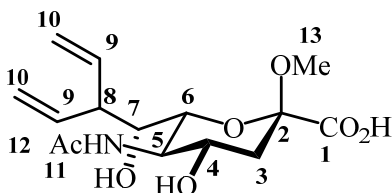
Indiumpulver (879.1 mg, 7.66 mmol, 2 eq.)

Pentadienylbromid (1.688 g, 11.48 mmol, 3 eq.)

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4:2:1:10

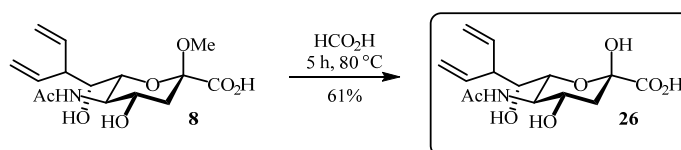
Ausbeute: 566.0 mg (1.72 mmol, 44%) als farbloser kristalliner Feststoff.

Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.68

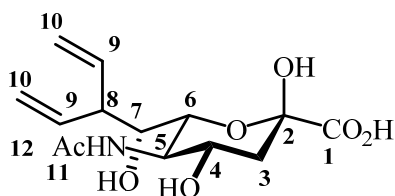


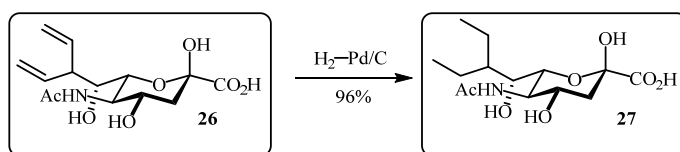
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.61 (s, 1H, NH), 6.07 (ddd, J = 17.1, 10.2, 8.1 Hz, 1H, 9a-H), 5.96 (ddd, J = 17.0, 10.7, 8.6 Hz, 1H, 9b-H), 5.38 – 5.28 (m, 4H, 10a,b-H), 4.12 (ddd, J = 11.4, 10.2, 4.9 Hz, 1H, 4-H), 4.02 (dd, J = 10.2 Hz, 1H, 5-H), 3.81 (d, J = 10.2 Hz, 1H, 6-H), 3.73 (d, J = 9.9 Hz, 1H, 7-H), 3.42 (m, 1H, 8-H), 3.35 (s, 3H, 13-H), 2.47 (dd, J = 13.1, 4.9 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.21 (s, 3H, 12-H), 1.79 (dd, J = 13.1, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.31 (C-1), 174.83 (C-11), 139.34 (C-9a), 137.78 (C-9b), 117.93 (C-10a), 116.57 (C-10b), 100.81 (C-2), 71.19 (C-6), 70.52 (C-7), 67.03 (C-4), 52.77 (C-5), 51.38 (C-8), 50.87 (C-13), 39.96 (C-3), 22.54 (C-12).

8,9-Dideoxy-8-ethenyl-9-methyliden-Neu5Ac (26)**Vorschrift:** AAV3 (1x)**Ansatz:**Verbindung **8** (503.3 mg, 1.45 mmol)H₂O (10 mL)

Ameisensäure (500 μL, 610 mg, 13.3 mmol, 9 eq.)

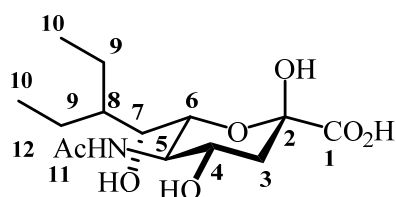
Säulenchromatographie: MeOH/DCM = 1 : 5 → MeOH/Aceton /H₂O/DCM = 4 : 2 : 1 : 10**Ausbeute:** 294.0 mg (0.93 mmol, 61 %) als farbloser kristalliner Feststoff.**Dünnschichtchromatographie:** R_f: 0.67**HRMS (ESI)⁺: m/z** berechnet für [C₁₄H₂₁N₁O₇]+Na⁺ = 338.1210;
gefunden: 338.1210**¹H-NMR (500 MHz, D₂O):** δ = 5.98 (ddd, *J* = 17.1, 10.3, 8.3 Hz, 1H, 9a-H), 5.82 (ddd, *J* = 17.1, 10.3, 8.7 Hz, 1H, 9b-H), 5.27 – 5.19 (m, 4H, 10a,b-H), 4.10-4.00 (m, 1H, 4-H), 4.02 (dd, *J* = 10.0, 9.8 Hz, 1H, 5-H), 3.93 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, 6-H), 3.61 (dd, *J* = 10.0, 1.0 Hz, 1H, 7-H), 3.20 (ddd, *J* = 10.0, 8.7, 8.3 Hz, 1H, 8-H), 2.29 (dd, *J* = 12.9, 4.7 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.13 (s, 3H, 12-H), 1.93 (dd, *J* = 12.9, 11.3 Hz, 1H, 3_{ax}-H).**¹³C-NMR (126 MHz, D₂O):** δ = 175.74 (C-1), 174.75 (C-11), 139.02 (C-9a), 137.24 (C-9b), 117.25 (C-10a), 116.59 (C-10b), 96.10 (C-2), 70.96 (C-6), 70.19 (C-7), 67.27 (C-4), 52.87 (C-5), 50.94 (C-8), 39.54 (C-3), 22.20 (C-12).

8,9-Dideoxy-8-ethyl-9-methyl-Neu5Ac (27)

Allylverbindung **26** (50.0 mg, 159 μmol) wurde in trockenem Methanol (5 mL) gelöst und Palladium auf Kohle (30 mg) hinzugefügt. Eine Hydrierblase mit ~ 2 bar Wasserstoff wurde auf den Kolben gesetzt und die Reaktionsmischung für 24 h bei RT stark gerührt. Nach Filtration über Celite wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt.

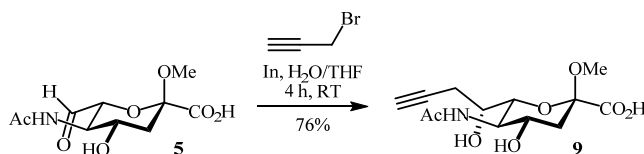
Ausbeute: 48.8 mg (153 μmol , 96%) als farbloser kristalliner Feststoff.

MS (ESI)⁺: m/z berechnet für $[\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}_1\text{O}_7]-\text{H}^+ = 318.16$;
gefunden: 318.16



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 4.06$ (dm, $J = 15.4$ Hz, 1H, 4-H), 4.00-3.87 (m, 2H, 5-, 6-H), 3.50 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, 7-H), 2.27 (dd, $J = 12.9, 5.0$ Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.11 (s, 3H, 12-H), 1.89 (dm, $J = 12.2$ Hz, 1H, 3_{ax}-H), 1.69-1.54 (m, 2H, 8-, 9-H), 1.51-1.36 (m, 2H, 9-H) 1.33-1.24 (m, 2H, 9-H), 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, 10-H), 0.85 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, 10-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 176.24$ (C-1), 174.74 (C-11), 96.23 (C-2), 71.05 (C-6), 70.10 (C-7), 67.33 (C-4), 53.11 (C-5), 41.08 (C-8), 39.53 (C-3), 22.20 (C-12), 20.39 (C-9), 19.97 (C-9), 9.63 (C-10), 9.22 (C-10).

8,9-Dideoxy-9-methylidin-2-*O*-Methyl- β -Neu5Ac (**9**)

Vorschrift: AAV2 (4 h, 2x 1 h US)

Ansatz:

Aldehyd **5** (300 mg, 1.15 mmol)

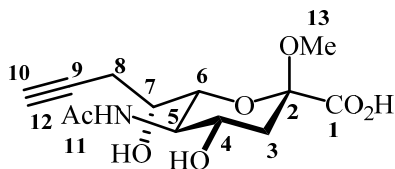
Indiumpulver (266.1 mg, 2.30 mmol, 2 eq.)

Propargylbromid (416.8 mg, 3.45 mmol, 3 eq.)

Säulenchromatographie: MeOH / Aceton / H₂O / DCM = 4 : 2 : 1 : 8

Ausbeute: 264.1 mg (876 μ mol, 76%) als farbloser kristalliner Feststoff.

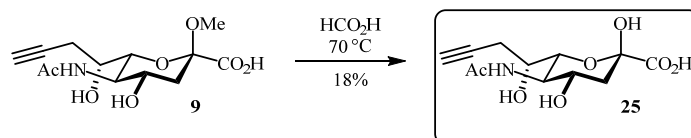
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.55



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.05 (ddd, J = 11.4, 10.0, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.96-3.92 (m, 1H, 5-H), 3.90 (d, J = 10.4, 1H, 7-H), 3.73 (dd, J = 10.4, 1.3 Hz, 1H, 6-H), 3.28 (s, 3H, 13-H), 2.69 (ddd, J = 7.3, 2.7, 1.1 Hz, 2H, 8-H), 2.50 (t, J = 2.7 Hz, 1H, 10-H), 2.41 (dd, J = 13.3, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H) 2.11 (s, 3H, 12-H), 1.72 (dd, J = 13.3, 11.5 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.17(C-1), 174.76 (C-11), 100.50 (C-2), 81.92 (C-9), 71.78 (C-6), 71.29 (C-10), 67.79 (C-7), 67.05 (C-4), 52.44 (C-5), 50.74 (C-13), 39.86 (C-3), 22.71 (C-8), 22.18 (C-12).

8,9-Dideoxy-9-methylidin-Neu5Ac (25)



Vorschrift: AAV3 (5x: 5, 3x 24h)

Ansatz:

Verbindung **9** (437.1 mg, 1.451 mmol)

H₂O (10 mL)

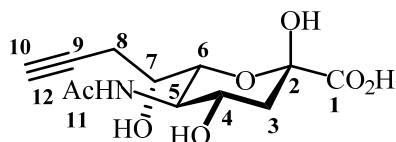
Ameisensäure (90 µL/500 µL, 109.8/610 mg, 2.38/13.3 mmol, 1.6/9 eq.)

Säulenchromatographie: MeOH/DCM = 1 : 5 → MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4 : 2 : 1 : 8

Ausbeute: 73.2 mg (0.25 mmol, 18 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

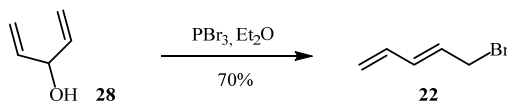
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.54

MS (ESI): *m/z* berechnet für [C₁₂H₁₇N₁O₇]-H⁺ = 286.09;
gefunden: 286.09



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.06 (ddm, *J* = 9.4, 4.9 Hz, 1H, 4-H), 4.00-3.86 (m, 3H, 5-, 7-, 6-H), 2.60 (ddd, *J* = 16.8, 7.4, 2.3 Hz, 1H, 8a-H), 2.52 (ddd, *J* = 16.8, 7.0, 2.3 Hz, 1H, 8b-H), 2.47 (dm, *J* = 2.3 Hz, 1H, 10-H), 2.28 (ddd, *J* = 13.0, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H) 2.13 (s, 3H, 12-H), 1.89 (dd, *J* = 13.0, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

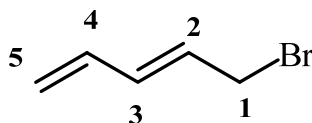
¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 176.51(C-1), 174.84 (C-11), 96.36 (C-2), 82.12 (C-9), 72.08 (C-6), 70.95 (C-10), 67.71 (C-7), 67.27 (C-4), 52.76 (C-5), 39.49 (C-3), 22.84 (C-8), 22.20 (C-12).

Pentadienylbromid (22)

Zu einer Lösung aus PBr₃ (1.16 g, 4.29 mmol, 0.41 eq.) in 5 mL trockenem Et₂O unter Argonatmosphäre wurde tropfenweise 1,4-Pentadien-3-ol (845 mg, 10.04 mmol, 1.0 eq.) bei 0°C über 5 Minuten dazugegeben. Nach 3 h zeigte die DC Kontrolle kein Edukt mehr an. Die Reaktionsmischung wurde durch Zugabe von Brine (2 mL) vorsichtig gequenchet. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit NaHCO₃ gewaschen (3x). Danach wurde die organische Phase mit Brine (6 mL) gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Der Diethylether wurde im Vakuum entfernt.

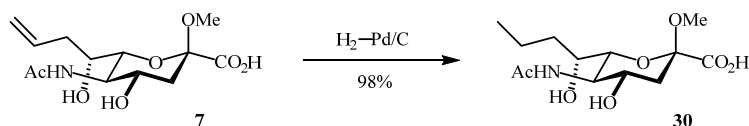
Ausbeute: 1.038 g (7.06 mmol, 70%) als farbloses Öl.

Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.86 (Cyclohexan/EE = 3:1)



¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6.45-6.22 (m, 2H, 3-, 4-H), 6.00-5.81 (m, 1H, 2-H), 5.34-5.24 (m, 1H, 5a-H), 5.20-5.11 (m, 1H, 5b-H), 4.03 (d, J = 7.6 Hz, 2H, 1-H).

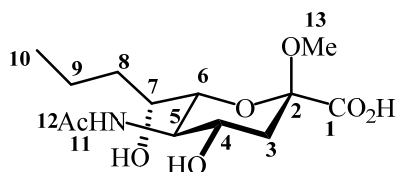
¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 135.67 (C-3), 135.42 (C-4), 129.26 (C-2), 119.55 (C-5), 32.93 (C-1).

8,9-Dideoxy-9-methyl-2-O-methyl- β -Neu5Ac (30)

Allylverbindung **7** (200.0 mg, 659 μ mol) wurde in trockenem Methanol (9 mL) gelöst und Palladium auf Kohle (40 mg) hinzugefügt. Eine Hydrierblase mit \sim 2 bar Wasserstoff wurde auf den Kolben gesetzt und die Reaktionsmischung für 24 h bei RT stark gerührt. Nach Filtration über Celite wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt.

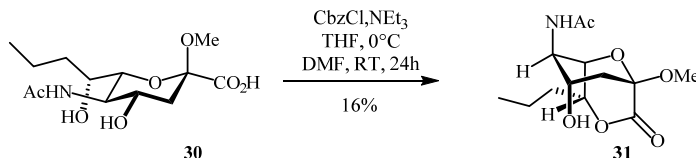
Ausbeute: 197.4 mg (647 μ mol, 98 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.59



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 4.05 (ddd, J = 10.7, 10.7, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.92 (dd, J = 10.1, 10.1 Hz, 1H, 5-H), 3.75 (dd, J = 8.6, 5.1 Hz, 1H, 7-H), 3.51 (d, J = 10.3 Hz, 1H, 6-H) 3.26 (s, 3H, 13-H), 2.41 (dd, J = 13.2, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.13 (s, 3H, 12-H), 1.82 (dtd, J = 13.6, 8.9, 5.2 Hz, 1H, 8_a-H), 1.73 (dd, J = 13.2, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H), 1.62 (dtd, J = 13.6, 8.9, 5.7 Hz, 1H, 8_b-H), 1.55-1.49 (m, 1H, 9_a-H), 1.48-1.37 (m, 1H, 9_b-H), 0.99 (t, J = 7.1, 3H, 10-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ = 175.36(C-1), 174.80 (C-11), 100.41 (C-2), 73.33 (C-6), 68.65 (C-7), 67.22 (C-4), 52.76 (C-5), 50.48 (C-13), 39.90 (C-3), 34.84 (C-8), 22.20 (C-12), 18.91 (C-9), 13.21 (C-10).

1,7-Lacton (31)

Synthese nach *Allevi et al.*^[262]

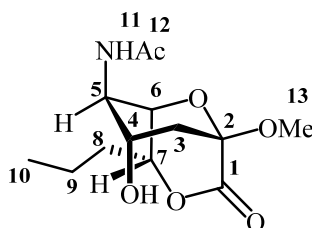
Eine Lösung aus NEt_3 (81.1 mg, 802 μmol , 1.24 eq. 116 μL) in trockenem THF (1.5 mL) wurde bei 0°C mit CbzCl (105.9 mg, 0.621 mmol, 0.96 eq.) in THF (1.5 mL) versetzt. Dann wurde Verbindung **30** (197.4 mg, 647 μmol , 1 eq.) und DMF (3 mL) dazugegeben. Die Kühlung wurde entfernt und die Reaktionsmischung bei RT für 24 h gerührt. Wenn die DC-Kontrolle vollständigen Umsatz zeigt, wurde Methanol (4 mL) zugefügt. Nach 2 h Rühren wurden alle Lösemittel im Hochvakuum entfernt und die Verbindung säulenchromatographisch aufgereinigt.

Säulenchromatographie: EtOAc/MeOH = 9 : 1 (R_f : 0.59)

Ausbeute: 28.8 mg (100 μmol , 16%) als farbloser kristalliner Feststoff.

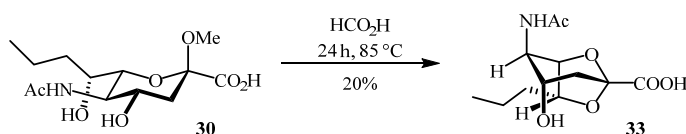
HRMS (ESI)⁺: m/z berechnet für $[\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_1\text{O}_6]^+\text{H}^+ = 288.1442$;
gefunden: 288.1443

Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.85



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 4.55$ (dd, $J = 7.7, 5.4$ Hz, 1H, 7-H), 4.11 (s, 1H, 6-H), 4.05 – 3.99 (m, 1H, 4-H), 3.93 (m, 1H, 5-H), 3.33 (s, 3H, 13-H), 2.09-2.00 (dm, $J = 14.1$ Hz, 2H, 3_{ax/eq}-H), 1.99 (s, 3H, 12-H), 1.94 – 1.83 (m, 1H, 8a-H), 1.77-1.70 (m, 1H, 8b-H), 1.62 – 1.53 (m, 1H, 9a-H), 1.51-1.44 (m, 1H, 9b-H) 0.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, 10-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): 172.99 (C-12), 170.48 (C-1), 96.12 (C-2), 80.40 (C-7), 76.00 (C-6), 67.55 (C-4), 52.66 (C-5), 51.57 (C-13), 39.36 (C-8), 37.77 (C-3), 22.45 (C-12), 18.96 (C-9), 14.04 (C-10).

2,7-Anhydro-9-methyl-Neu5Ac (33)

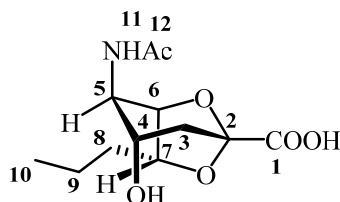
Propylverbindung **30** (221.7 mg, 0.73 mmol, 1 eq.) wurde in H₂O gelöst (10 mL) und mit Ameisensäure (30.16 μ L, 1.1 eq.) versetzt. Die Lösung wurde für 24 h auf 85 °C erhitzt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt. Neben Verbindung **24** (34%) wurde die Anhydroverbindung **33** isoliert.

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4 : 2 : 1 : 10

Ausbeute: 40.6 mg (149 μ mol, 20%) als farbloser kristalliner Feststoff.

HRMS (ESI)⁺: *m/z* berechnet für [C₁₂H₁₉N₁O₆]+Na⁺ = 296.1105;
gefunden: 296.1104

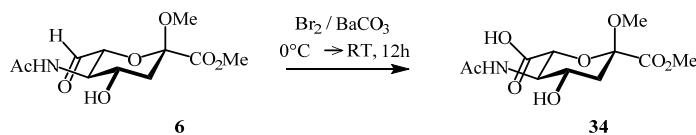
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.34 (ACN/Aceton/AcOH/H₂O) = 42 : 42 : 4 : 12



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.62 (ddd, *J* = 6.7, 6.6, 1.0 Hz, 1H, 7-H), 4.33 (dd, *J* = 1.7, 1.0 Hz, 1H, 6-H), 4.00 (ddm, *J* = 5.7, 1.7 Hz, 1H, 4-H), 3.97 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, 5-H), 2.23 (dd, *J* = 15.3, 5.7 Hz, 1H, 3_{ax}-H), 2.10 (s, 3H, 12-H), 2.05 (dd, *J* = 15.3, 1.7 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 1.56 (m, 2H, 8-H), 1.41 (m, 2H, 9-H), 0.97 (t, 3H, 10-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): 174.19(C-1), 173.57 (C-11), 104.99 (C-2), 79.45 (C-6), 77.32 (C-7), 67.04 (C-4), 52.13 (C-5), 36.48 (C-8), 35.74 (C-3), 21.88 (C-12), 17.92 (C-9), 13.24 (C-10).

5.4.3. Versuche zu Kapitel 3.5

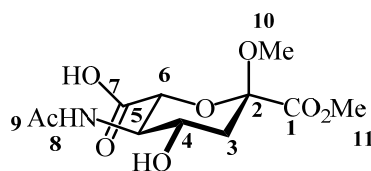
Methyl 5-(acetylamino)-3,5-dideoxy- α -L-arabino-heptulo-2,6-pyranosidarsäure
1-methylester (34)

Aldehyd **6** (gesamtes Rohprodukt aus Ansatz **6**, 100% = 0.90 mmol) wurde in H₂O (10 mL) gelöst und mit BaCO₃ (282.6 mg, 1.43 mmol, 1.6 eq.) versetzt. Die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt. Dann wurde langsam Brom (280 mg, 2.38 mmol, 2.6 eq.) dazugetropft. Das Kühlbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung bei RT für 12 h im Dunklen gerührt. Nachdem die DC-Kontrolle kompletten Umsatz zeigte, wurde die Mischung abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt (Vorsicht vor Bromresten). Der Rückstand wurde per Säulenchromatographie aufgereinigt.

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4:2:1:8

Ausbeute: farbloser kristalliner Feststoff

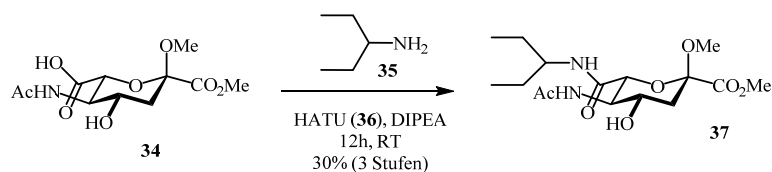
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.44



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.21 (d, J = 10.5 Hz, 1H, 6-H), 4.19-4.13 (m, 1H, 4-H), 4.01-3.95 (m 1H, 5-H), 3.98 (s, 3H, 11-H), 3.35 (s, 3H, 10-H), 2.54 (dd, J = 13.4, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.11 (s, 3H, 9-H), 1.95 (dd, J = 13.3, 11.3 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): 174.89 (C-7), 172.04 (C-8), 169.47 (C-1), 99.47 (C-2), 71.47 (C-6), 65.58 (C-4), 53.83 (C-11), 53.52 (C-5), 51.35 (C-10), 39.08 (C-3), 22.16 (C-9).

**Methyl 5-(acetylamino)-3,5-dideoxy- α -L-arabino-heptulo-2,6-pyranosidarsäure
1-methylester-7-(3-pentyl)amid (37)**

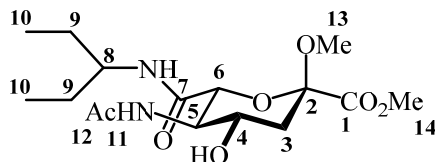


Die Disäure **34** (gesamtes Rohprodukt aus Ansatz **34**, 100% = 0.90 mmol) wurde in DMF gelöst (6 mL) und mit Pentan-3-amin **35** (81.9 mg, 0.94 mmol, 1.05 eq.) und HATU **36** (357.2 mg, 0.94 mmol, 1.05 eq.) versetzt. Dann wurde DIPEA (231.3 mg, 1.788 mmol, 2.0 eq.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde für 12 h bei RT gerührt. Dann wurden alle Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand per Säulenchromatographie aufgereinigt.

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4:2:1:11

Ausbeute: 100.0 mg (277 μ mol, 31 % ausgehend von **6**) als farbloser kristalliner Feststoff.

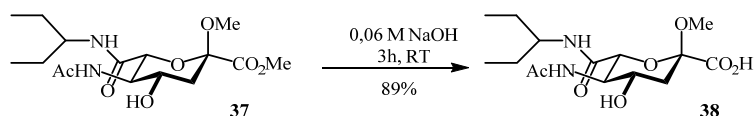
Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.84



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.14-4.09 (m, 1H, 4-H), 4.07 (d, J = 10.3 Hz, 1H, 6-H), 4.04-3.95 (dd, J = 10.3, 10.1 Hz, 1H, 5-H), 3.95 (s, 3H, 14-H), 3.68 (dt, J = 8.2, 5.0 Hz, 1H, 8-H), 3.32 (s, 3H, 13-H), 2.51 (dd, J = 13.4, 4.9 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.07 (s, 3H, 12-H), 1.95 (dd, J = 13.4, 11.2 Hz, 1H, 3_{ax}-H), 1.69-1.58 (m, 2H, 9-H), 1.53-1.45 (m, 2H, 9'-H), 0.93 (t, 7.7 Hz, 3H, 10-H), 0.91 (t, 7.7 Hz, 3H, 10'-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): 174.20 (C-11), 169.58 (C-1), 169.04 (C-7), 99.61 (C-2), 72.90 (C-6), 65.87 (C-4), 53.74 (C-5), 53.66 (C-14), 53.29 (C-8), 51.14 (C-13), 39.08 (C-3), 26.57 (C-9), 26.43 (C-9'), 22.20 (C-12), 9.69 (C-10), 9.65 (C-10').

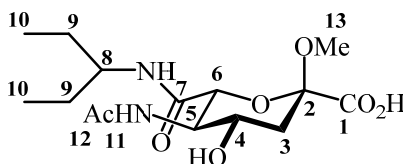
**Methyl 5-(acetylamino)-3,5-dideoxy- α -L-arabino-heptulo-2,6-pyranosidarsäure
7-(3-pentyl)amid (38)**



Eine Lösung aus **37** (375 mg, 1.04 mmol, 1 eq.) in 0.06 N NaOH (30 mL) wurde bei RT für 3 h gerührt. Nach DC-Kontrolle zum vollständigen Umsatz wurde die Reaktionsmischung mittels Dowex50 (H⁺-Form, 2.5 g) auf pH 7.0 neutralisiert. Die Suspension wurde abfiltriert und im Vakuum auf 10 mL eingengt. Diese Lösung wurde lyophilisiert.

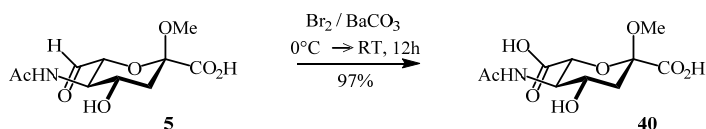
Ausbeute: 319.9 mg (0.92 mmol, 89%) als farbloser kristalliner Feststoff.

Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.59



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.11-4.02 (m, 1H, 4-H), 4.99-3.94 (m, 1H, 5-H), 3.94-3.90 (d, 1H, 6-H), 3.67 (tt, J = 8.6, 4.1 Hz, 1H, 8-H), 3.25 (s, 3H, 13-H), 2.44 (dd, J = 13.3, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.07 (s, 3H, 12-H), 1.80 (dd, J = 13.3, 11.3 Hz, 1H, 3_{ax}-H), 1.68-1.58 (m, 2H, 9-H), 1.57-1.45 (m, 2H, 9'-H), 0.94 (t, 7.3 Hz, 3H, 10-H), 0.91 (t, 7.3 Hz, 3H, 10'-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): 174.41 (C-1), 174.20 (C-11), 170.17 (C-7), 100.93 (C-2), 72.93 (C-6), 66.54 (C-4), 54.45 (C-5), 53.22 (C-8), 50.60 (C-13), 39.82 (C-3), 26.59 (C-9), 26.37 (C-9'), 22.20 (C-12), 9.81 (C-10), 9.71 (C-10').

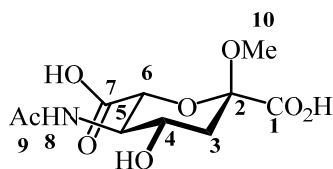
Methyl 5-(acetylamino)-3,5-dideoxy- α -L-arabino-heptulo-2,6-pyranosidarsäure (40)

Aldehyd **5** (350 mg, 1.34 mmol, 1 eq.) wurde in H₂O (10 mL) gelöst und mit BaCO₃ (362.6 mg, 1.84 mmol, 1.37 eq.) versetzt. Die Mischung wurde auf 0 °C gekühlt. Dann wurde langsam Brom (244.1 mg, 1.53 mmol, 1.14 eq.) dazugetropft. Das Kühlbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung bei RT für 12 h im Dunklen gerührt. Nachdem die DC-Kontrolle kompletten Umsatz zeigte, wurde die Mischung abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt (Vorsicht vor Bromresten). Der Rückstand wurde per Säulenchromatographie aufgereinigt.

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4:2:1:8

Ausbeute: 357.6 mg (1.29 mmol, 97 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

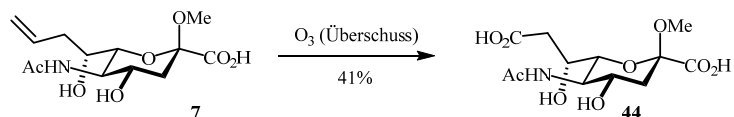
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.32



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.24 (ddd, J = 11.4, 10.1, 5.1 Hz, 1H, 4-H), 4.08 (dd, J = 10.5, 10.1 Hz, 1H, 5-H), 4.03 (d, J = 10.5 Hz, 1H, 6-H), 3.39 (m, 3H, 10-H), 2.56 (dd, J = 13.2, 5.1 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.23 (s, 3H, 9-H), 2.00 (dd, J = 13.2, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): 175.69 (C-7), 174.82 (C-1), 174.49 (C-8), 100.84 (C-2), 73.68 (C-6), 66.77 (C-4), 54.18 (C-10), 50.69 (C-5), 39.64 (C-3), 22.23 (C-9).

5.4.4. Versuche zu Kapitel 3.7

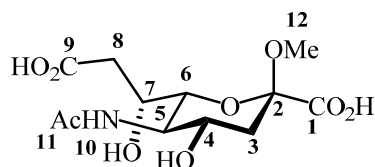
8-Deoxy-2-*O*-methyl-9-oxo- β -Neu5Ac (44)

Allylverbindung **7** (250.0 mg, 0.82 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Methanol (10 mL) gelöst. Ozon wurde bei -78°C für 15 min durch die Lösung geleitet [3 g/min]. Anschließend wurde 10 min Argon durch die Lösung geleitet, um überschüssiges Ozon auszutreiben. Das ursprünglich eingesetzte NaBH_4 (155.9 mg, 4.12 mmol, 5 eq.) und CeCl_3 (60.9 mg, 0.25 mmol, 0.3 eq.) konnte nicht reagieren, da bereits Überoxidation stattgefunden hatte. Das Kühlbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung für 14 h bei RT weiter gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und per Säulenchromatographie gereinigt.

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/ H_2O /DCM = 4:2:1:7

Ausbeute: 108.9 mg (0.34 mmol, 41 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

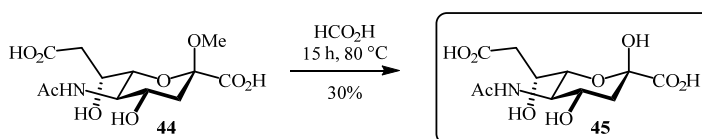
Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.27



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 4.19 (ddd, J = 7.8, 6.5, 1.3 Hz, 1H, 7-H), 4.05 (ddd, J = 11.4, 10.0, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.93 (dd, J = 10.1, 10.2 Hz, 1H, 5-H), 3.54 (dd, J = 10.3, 1.3 Hz, 1H, 6-H), 3.23 (s, 3H, 12-H), 2.73 (dd, J = 15.4, 7.8 Hz, 1H, 8a-H), 2.65 (dd, J = 15.4, 6.5 Hz, 1H, 8b-H), 2.41 (dd, J = 13.1, 5.1 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.15 (s, 3H, 11-H), 1.73 (dd, J = 13.2, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): 179.05 (C-9), 175.32 (C-1), 174.95 (C-10), 100.51 (C-2), 73.05 (C-6), 67.14 (C-4), 66.67 (C-7), 52.61 (C-5), 50.52 (C-12), 40.74 (C-8), 39.92 (C-3), 22.22 (C-11).

8-Deoxy-9-oxo-Neu5Ac (45)



Vorschrift: AAV3 (3x)

Ansatz:

Verbindung **44** (108.9 mg, 0.34 mmol)

H₂O (10 mL)

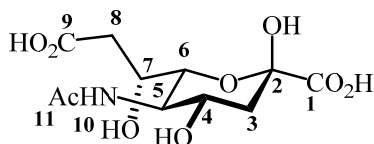
Ameisensäure (500 µL, 610 mg, 13.3 mmol, 39 eq.)

Säulenchromatographie: MeOH/DCM = 1 : 5 → MeOH/Aceton /H₂O/DCM = 4 : 2 : 1 : 8

Ausbeute: 30.7 mg (99.9 µmol, 30%) als farbloser kristalliner Feststoff.

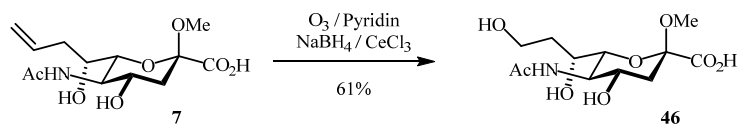
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.25

MS (ESI)⁻: *m/z* berechnet für [C₁₁H₁₇N₁O₉]-H⁺ = 306.08;
gefunden: 306.08



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.19-4.14 (m, 1H, 7-H), 4.05 (ddd, *J* = 11.5, 10.0, 4.9 Hz, 1H, 4-H), 3.94 (dd, *J* = 10.1, 10.2 Hz, 1H, 5-H), 3.73 (dd, *J* = 10.4, 1.2 Hz, 1H, 6-H), 2.63 (dd, *J* = 15.1, 7.9 Hz, 1H, 8a-H), 2.53 (dd, *J* = 15.1, 6.0 Hz, 1H, 8b-H), 2.27 (dd, *J* = 13.0, 4.9 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.13 (s, 3H, 11-H), 1.88 (dd, *J* = 13.0, 11.5 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 178.92 (C-9), 176.72 (C-1), 174.97 (C-10), 96.42 (C-2), 73.19 (C-6), 67.25 (C-4), 66.46 (C-7), 52.81 (C-5), 40.77 (C-8), 39.44 (C-3), 22.20 (C-11).

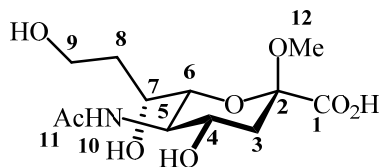
8-Deoxy-2-O-methyl- β -Neu5Ac (46)

Allylverbindung **7** (400.0 mg, 1.32 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Methanol (13 mL) und Pyridin (308 mg, 3.90 mmol, 314 μ L, 3 eq.) gelöst. Ozon wurde bei -78°C für 1.28 min durch die Lösung geleitet [3 g/min]. Anschließend wurde 10 min Argon durch die Lösung geleitet, um überschüssiges Ozon auszutreiben. Dann wurden NaBH_4 (249.4 mg, 6.59 mmol, 5 eq.) und CeCl_3 (97.5 mg, 0.40 mmol, 0.3 eq.) dazugegeben, das Kühlbad wurde entfernt und die Reaktionsmischung für 14 h bei RT weiter gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und per Säulenchromatographie gereinigt.

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/ H_2O /DCM = 4:2:1:7

Ausbeute: 258.5 mg (0.84 mmol, 61 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

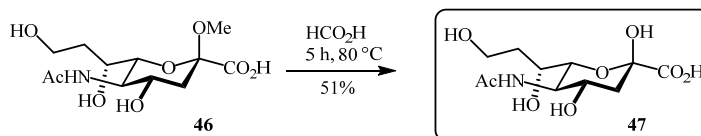
Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.44



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 4.05 (ddd, J = 11.3, 10.0, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.96-3.87 (m, 2H, 5-, 7-H), 3.81 (ddd, J = 10.0, 5.5, 3.1 Hz, 2H, 9-H), 3.47 (dd, J = 10.3, 1.2 Hz, 1H, 6-H), 3.24 (s, 3H, 12-H), 2.41 (dd, J = 13.1, 5.1 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.12 (s, 3H, 11-H), 2.12-2.04 (m, 1H, 8a-H), 1.83 (dtd, J = 14.5, 7.4, 3.9 Hz, 1H, 8b-H), 1.72 (dd, J = 13.2, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): 175.32(C-1), 174.87 (C-10), 100.45 (C-2), 73.93 (C-6), 67.08 (C-4), 65.78 (C-7), 58.80 (C-9), 52.63 (C-5), 50.49 (C-12), 39.87 (C-3), 35.26 (C-8), 22.17 (C-11).

8-Deoxy-Neu5Ac (47)



Vorschrift: AAV3

Ansatz:

Verbindung **46** (228.5 mg, 0.74 mmol)

H₂O (10 mL)

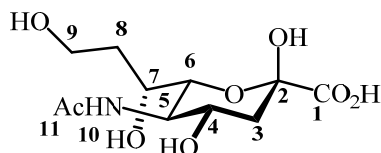
Ameisensäure (500 µL, 610 mg, 13.3 mmol, 18 eq.)

Säulenchromatographie: MeOH/DCM = 1:5 → MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4:2:1:7

Ausbeute: 111.7 mg (0.38 mmol, 51 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

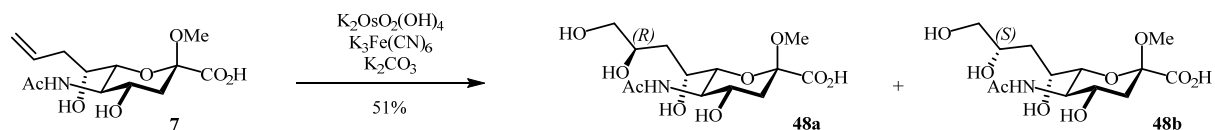
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.39

MS (ESI)⁻: m/z berechnet für [C₁₁H₁₉N₁O₈]-H⁺ = 292.10;
gefunden: 292.10



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.06 (ddd, *J* = 11.5, 10.0, 4.9 Hz, 1H, 4-H), 3.94 (dd, *J* = 10.2, 10.1 Hz, 1H, 5-H), 3.89 (ddd, *J* = 9.0, 4.7, 1.3 Hz, 1H, 7-H), 3.75 (dd, *J* = 7.1, 5.8 Hz, 2H, 9-H), 3.68 (dd, *J* = 10.4, 1.4 Hz, 1H, 6-H), 2.27 (dd, *J* = 12.9, 4.9 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.12 (s, 3H, 11-H), 1.96 (ddt, *J* = 14.5, 9.0, 5.8 Hz, 1H, 8a-H), 1.89 (dd, *J* = 13.0, 11.5 Hz, 1H, 3_{ax}-H), 1.76 (dtd, *J* = 14.5, 7.1, 4.7 Hz, 1H, 8b-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 176.70(C-1), 174.91 (C-10), 96.35 (C-2), 73.60 (C-6), 67.31 (C-4), 65.79 (C-7), 58.67 (C-9), 52.91 (C-5), 39.54 (C-3), 35.18 (C-8), 22.13 (C-11).

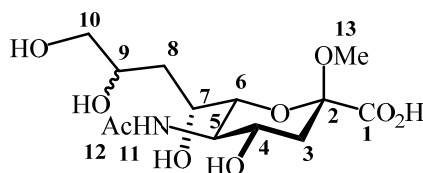
8-Deoxy-9-hydroxymethyl-2-*O*-methyl- β -Neu5Ac (48a+b)

Allylverbindung **7** (200 mg, 0.66 mmol, 1.00 eq), $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (651.3 mg, 1.98 mmol, 3.00 eq), K_2CO_3 (373.4 mg, 1.98 mmol, 3.00 eq) und $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ (0.5 mg, 1.0 μmol , 0.2 mol-%) wurden in $^t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1 : 1, 8 mL) suspendiert, auf 0°C gekühlt und für 24 h bei dieser Temperatur gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurde Na_2SO_3 (ges. Lsg. aq. / 2 mL) zu der Suspension gegeben und für 30 min bei 25°C gerührt. Die Mischung wurde über Celite abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der orangene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

Säulenchromatographie: MeOH/DCM = 1 : 5 \rightarrow MeOH/Aceton/ H_2O /DCM = 4 : 2 : 1 : 7

Ausbeute: 114.0 mg (0.34 mmol, 51 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

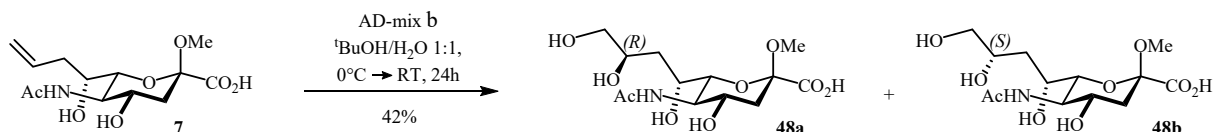
Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.28



$R / S = 50\% : 50\%$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 4.09-4.03 (m, 1H, 7(*R/S*)-H), 4.02-3.96 (m, 2H, 4(*R*)-, 9(*R*)-, 10(*S*)-H), 3.96-3.89 (m, 2H, 5(*R/S*)-, 4(*S*)-, 9(*S*)-H), 3.69 (ddd, J = 11.8, 3.7, 1.8 Hz, 0.5H, 10a(*R*)-H), 3.57 (ddd, J = 17.1, 11.8, 6.8 Hz, 0.5H, 10b(*R*)-H), 3.51 (dd, J = 10.3, 1.2 Hz, 0.5H, 6(*S*)-H), 3.44 (dd, J = 10.3, 1.3 Hz, 0.5H, 6(*R*)-H), 3.24 (2xs, 3H, 13-H), 2.41 (2xdd, J = 13.2, 5.1 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.13, 2.12 (2xs, 3H, 12-H), 1.99 (ddd, J = 14.6, 10.9, 2.8 Hz, 0.5H, 8a(*R*)-H), 2.01-1.94 (m, 0.5H, 8a(*S*)-H), 1.94-1.86 (m, 0.5H, 8b(*S*)-H), 1.73 (dd, J = 13.2, 11.5 Hz, 1H, 3_{ax}-H), 1.53 (ddd, J = 14.6, 10.2, 2.6 Hz, 0.5H, 8b(*R*)-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ = 174.83 (C-1), 174.74 (C-1), 174.42 (C-11_R), 170.59 (C-11_S), 100.01 (C-2_S), 99.95 (C-2_R), 74.03 (C-6_R), 72.63 (C-6_S), 69.29 (C-4_S), 68.23 (C-4_R), 66.58 (C-7_R), 66.53 (C-7_S), 65.96 (C-9_S), 65.62 (C-10_R), 64.74 (C-9_R), 64.69 (C-10_S), 52.23 (C-5_R), 52.05 (C-5_S), 50.06 (C-13_S), 49.99 (C-13_R), 39.38 (C-3), 35.88 (C-8_R), 35.38 (C-8_S), 21.68 (C-12).

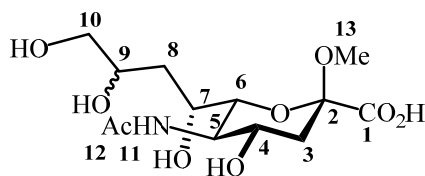
8-Deoxy-9-hydroxymethyl-2-O-methyl- β -Neu5Ac (48a+b)

AD-mix β (0.923 g) wurde in t BuOH/H₂O (1 : 1, 6 mL) gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und Allylverbindung **7** (140 mg, 0.46 mmol, 1.00 eq.) in t BuOH/H₂O (1 : 1, 2 mL) dazugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h bei dieser Temperatur gerührt. Zum Beenden der Reaktion wurde Na₂SO₃ (ges. Lsg. aq. /2 mL) zu der Suspension gegeben und für 30 min bei 25°C gerührt. Die Mischung wurde über Celite abfiltriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Der orangene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

Säulenchromatographie: MeOH/DCM = 1 : 5 \rightarrow MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4 : 2 : 1 : 7

Ausbeute: 64.7 mg (0.19 mmol, 42%) als farbloser kristalliner Feststoff.

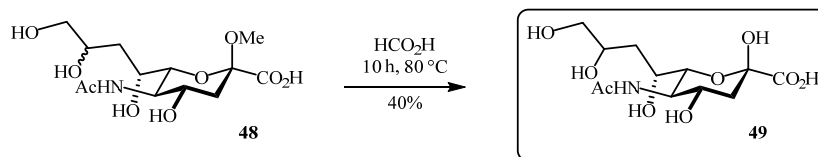
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.28



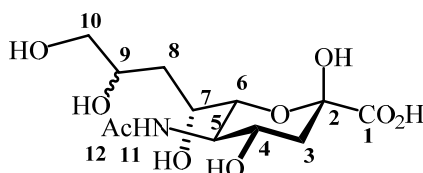
R / S = 65% : 35%

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.09-4.03 (m, 1H, 7(R/S) -H), 4.02-3.96 (m, 2H, 4(R)-, 9(R)-, 10(S) -H), 3.96-3.89 (m, 1.8H, 5(R/S)-, 4(S)-, 9(S)-H), 3.69 (ddd, J = 11.8, 3.7, 1.8 Hz, 1.2H, 10a(R)-H), 3.57 (ddd, J = 17.1, 11.8, 6.8 Hz, 1.2H, 10b(R)-H), 3.51 (dd, J = 10.3, 1.2 Hz, 0.4H, 6(S)-H), 3.44 (dd, J = 10.3, 1.3 Hz, 0.6H, 6(R)-H), 3.24 (2xs, 3H, 13-H), 2.41 (2xdd, J = 13.2, 5.1 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.13, 2.12 (2xs, 3H, 12-H), 1.99 (ddd, J = 14.6, 10.9, 2.8 Hz, 0.6H, 8a(R)-H), 2.01-1.94 (m, 0.4H, 8a(S)-H), 1.94-1.86 (m, 0.4H, 8b(S)-H), 1.73 (dd, J = 13.2, 11.5 Hz, 1H, 3_{ax}-H), 1.53 (ddd, J = 14.6, 10.2, 2.6 Hz, 0.6H, 8b(R)-H).

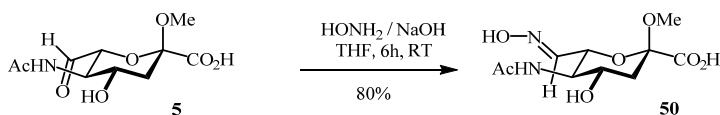
¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 174.83 (C-1), 174.74 (C-1), 174.42 (C-11R), 170.59 (C-11S), 100.01 (C-2S), 99.95 (C-2R), 74.03 (C-6R), 72.63 (C-6S), 69.29 (C-4S), 68.23 (C-4R), 66.58 (C-7R), 66.53 (C-7S), 65.96 (C-9S), 65.62 (C-10R), 64.74 (C-9R), 64.69 (C-10S), 52.23 (C-5R), 52.05 (C-5S), 50.06 (C-13S), 49.99 (C-13R), 39.38 (C-3), 35.88 (C-8R), 35.38 (C-8S), 21.68 (C-12).

8-Deoxy-9-hydroxymethyl-Neu5Ac (49)**Vorschrift:** AAV3 (2x)**Ansatz:**Verbindung **48** (64.7 mg, 0.19 mmol)H₂O (10 mL)

Ameisensäure (500 µL, 610 mg, 13.3 mmol, 70 eq.)

Säulenchromatographie: MeOH/DCM = 1 : 5 → MeOH/Aceton/H₂O/DCM = 4 : 2 : 1 : 8**Ausbeute:** 24.7 mg (76.3 µmol, 40%) als farbloser kristalliner Feststoff.**Dünnschichtchromatographie:** R_f: 0.27**MS (ESI)⁻:** *m/z* berechnet für [C₁₂H₂₁N₁O₉]-H⁺ = 322.11;
gefunden: 322.11**¹H-NMR (500 MHz, D₂O):** δ = 4.11-4.03 (m, 1H, 7(*R/S*)-H), 4.00-3.90 (m, 3H, 4(*R*)-, 5(*R/S*)-, 9(*R/S*)-, H10(*S*)-H), 3.89-3.82 (m, 0.4H, 4(*S*)-H), 3.76 (dd, *J* = 10.3, 1.3 Hz, 0.4H, 6(*S*)-H), 3.70-3.63 (m, 1.6H, 6(*R*)-, 10a(*R*)-H), 3.60-3.49 (m, 1H, 10b(*R*)-H), 2.32 (2x dd, *J* = 13.1, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.13 (2x s, 3H, 12-H), 2.12-2.09 (m, 0.6H, 8a(*R*)-H), 1.93-1.80 (m, 1.8H, 8a/b(*S*)-, 3_{ax}-H), 1.48 (ddd, *J* = 14.7, 9.9, 2.9 Hz, 0.6H, 8b(*R*)-H).**¹³C-NMR (126 MHz, D₂O):** δ = 176.67 (C-1), 174.98 (C-11), 96.29 (C-2), 74.43 (C-6*R*), 72.69 (C-6*S*), 69.39 (C-4*S*), 68.80 (C-4*R*), 67.29 (C-7), 66.27 (C-9*S*), 66.05 (C-10), 65.42 (C-10), 65.35 (C-9*R*), 53.03 (C-5*R*), 52.86 (C-5*S*), 39.58 (C-3*S*), 39.55 (C-3*R*), 36.50 (C-8*R*), 35.67 (C-8*S*), 22.18 (C-12).

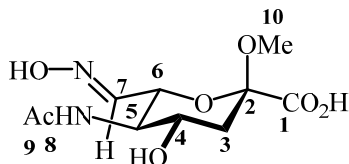
5.4.5. Versuche zu Kapitel 3.8

Methyl 3-(acetylamino)-3,5-dideoxy-L-lyxo-(6*S*)-heptulo-2,6-pyranosiduronsäureoxim (50)

Aldehyd **5** (404 mg, 1.55 mmol, 1 eq.) wurde in 1 M NaOH (30 mL) und THF (30 mL) gelöst. Hydroxylammoniumchlorid (322.4 mg, 4.64 mmol, 3 eq.) wurde hinzugefügt und die Reaktionsmischung für 6 Stunden bei RT gerührt. Nach Vollständigkeit wurde die Lösung mit HCl neutralisiert und die Lösemittel unter Vakuum entfernt. Der Feststoff wurde säulenchromatographisch aufgereinigt.

Säulenchromatographie: EE/MeOH/DCM = 10:5:1 (R_f : 0.15)

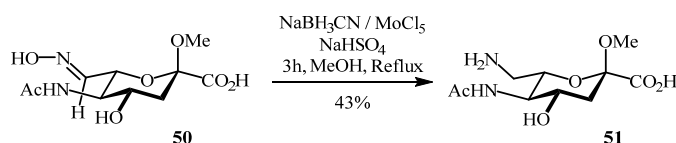
Ausbeute: 341.7 mg (1.24 mmol, 80%) als farbloser kristalliner Feststoff (E:Z=94:6).



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 7.56 (d, J = 7.3 Hz, 1H, 7E-H), 6.97 (d, J = 7.0 Hz, 7Z-H) 4.16 – 4.07 (m, 2H, 4-, 6-H), 3.83 (t, J = 10.2 Hz, 1H, 5-H), 3.25 (s, 3H, 10-H), 2.47 (dd, J = 13.3, 5.1 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.08 (s, 3H, 9-H), 1.87 – 1.70 (m, 1H, 3_{ax}-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): 174.73 (C-1), 173.87 (C-8), 149.15 (C-7), 100.45 (C-2), 70.83 (C-6), 65.85 (C-4), 54.12 (C-5), 50.71 (C-10), 39.72 (C-3), 22.12 (C-9).

Methyl 5-(acetylamino)-7-amino-3,5,7-trideoxy- α -L-arabino-heptulo-2,6-pyranosidon-säure (51)

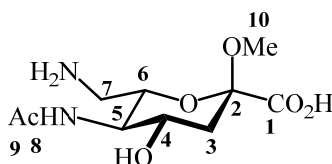


Oxim **50** (211.5 mg, 0.77 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Methanol (5 mL) gelöst. Dann wurde in einem Schlenkfinger vorgemischtes NaBH_3CN (192.5 mg, 3.06 mmol, 4 eq.), MoCl_5 (209.2 mg, 0.77 mmol, 1 eq.), und $\text{NaHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (317.1 mg, 2.30 mmol, 3 eq.) unter Argonatmosphäre auf einmal hinzugefügt. Die Suspension wurde für 3 h zum Rückfluss erhitzt und anschließend mit NaHCO_3 (5% aq.) neutralisiert. Die Lösemittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt.

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/ H_2O /DCM = 4 : 2 : 1 : 8

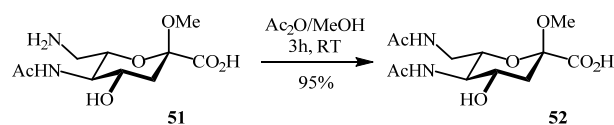
Ausbeute: 86.3 mg (0.33 mmol, 43 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.32



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 4.17 (ddd, J = 11.4, 9.9, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.89 (ddd, J = 9.9, 6.8, 2.7 Hz, 1H, 6-H) 4.72 (dd, J = 10.2, 10.3 Hz, 1H, 5-H), 3.41 (dd, J = 13.6, 2.8 Hz, 1H, 7-H), 3.29 (s, 3H, 10-H), 3.25 (dd, J = 13.6, 7.0 Hz, 1H, 7-H), 2.51 (dd, J = 13.3, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.18 (s, 3H, 9-H), 1.78 (dd, J = 13.3, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ = 175.51 (C-1), 174.55 (C-8), 100.48 (C-2), 68.88 (C-6), 65.85 (C-4), 53.39 (C-5), 50.79 (C-10), 40.70 (C-7), 39.91 (C-3), 22.10 (C-9).

Methyl 5,7-di(acetylamino)-3,5,7-trideoxy- α -L-arabino-heptulo-2,6-pyranosidonsäure (52)


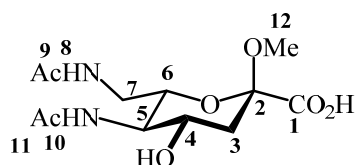
Amin **51** (200.8 mg, 0.77 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem Methanol (13 mL) gelöst und mit Ac_2O (781.7 mg, 7.66 mmol, 10 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 h bei RT gerührt. Nach Vollständigkeit (DC-Kontrolle) wurden die Lösemittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt.

Säulenchromatographie: MeOH/Aceton/ H_2O /DCM = 4 : 2 : 1 : 8

Ausbeute: 221.3 mg (0.73 mmol, 95 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

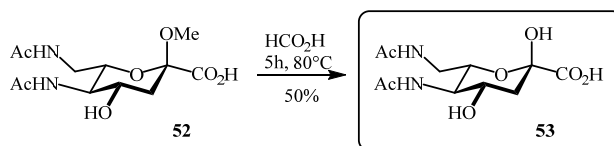
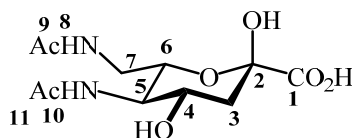
Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.44

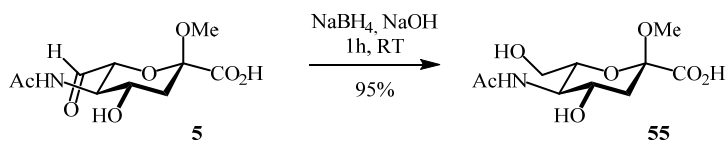
MS (ESI): m/z berechnet für $[\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7]^+\text{H}^+ = 305.13$;
gefunden: 305.13



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): $\delta = 4.05\text{-}3.92$ (m, 1H, 4-H), $3.77\text{-}3.61$ (m, 2H, 5-, 6-H) 3.50 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 7-H), 3.22 (s, 3H, 12-H), 2.42 (dd, $J = 13.2, 5.0$ Hz, 1H, 3_{eq} -H), 2.09 (s, 3H, 9-H), 2.06 (s, 3H, 11-H), 1.71 (dd, $J = 13.3, 11.4$ Hz, 1H, 3_{ax} -H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): $\delta = 174.91$ (C-1), 174.44 (C-8), 173.93 (C-10), 100.30 (C-2), 70.97 (C-6), 66.93 (C-4), 53.17 (C-5), 50.38 (C-12), 39.96 (C-7), 39.71 (C-3), 22.24 (C-9), 21.85 (C-11).

5,7-Di(acetylamino)-3,5,7-trideoxy-L-arabino-heptulosensäure (53)**Vorschrift:** AAV3**Ansatz:**Verbindung **52** (137.3 mg, 451 μmol) H_2O (10 mL)Ameisensäure (500 μL , 610 mg, 13.3 mmol, 29 eq.)**Säulenchromatographie:** MeOH/DCM = 1 : 5 \rightarrow MeOH/Aceton/ H_2O /DCM = 4 : 2 : 1 : 8**Ausbeute:** 64.9 mg (224 μmol , 50%) als farbloser kristalliner Feststoff.**Dünnschichtchromatographie:** R_f : 0.43**MS (ESI)⁻:** m/z berechnet für $[\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7]\text{-H}^+ = 289.10$;
gefunden: 289.10 **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O):** $\delta = 4.05$ (dd, , $J = 11.5, 4.9$ Hz, 1H, 4-H), 3.98 (m, 1H, 6-H), 3.82-3.71 (m, 1H, 5-H), 3.57 (ddd, $J = 14.5, 5.3, 1.0$ Hz, 1H, 7a-H), 3.35 (dd, , $J = 14.5, 2.6$ Hz, 1H, 7b-H), 2.30 (dd, $J = 13.1, 4.9$ Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.09 (s, 3H, 9-H), 2.05 (s, 3H, 11-H), 1.90 (dd, $J = 13.1, 11.5$, Hz, 1H, 3_{ax}-H). **$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O):** $\delta = 176.01$ (C-1), 174.44 (C-8), 174.06 (C-10), 96.29 (C-2), 70.94 (C-6), 67.06 (C-4), 53.28 (C-5), 39.81 (C-7), 39.57 (C-3), 22.28 (C-9), 21.90 (C-11).

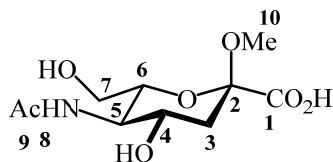
Methyl 5-(acetylamino)-3,5-dideoxy- α -L-arabino-heptulo-2,6-pyranosidonsäure (55)

Aldehyd **5** (150 mg, 0.57 mmol, 1 eq.) wurde in 10 mM NaOH (40 mL) mit NaBH₄ (65.2 mg, 1.72 mmol, 3 eq.) gelöst und für 1 h bei RT gerührt. Nach DC-Kontrolle auf Vollständigkeit wurde die Reaktion mit Dowex50 (H⁺-Form) gequencht. Alle Lösemittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt.

Säulenchromatographie: EE/MeOH/AcOH = 80:20:1

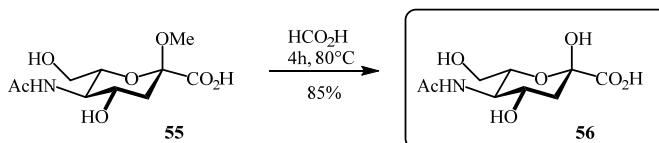
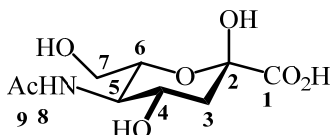
Ausbeute: 143.6 mg (545 μ mol, 95 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

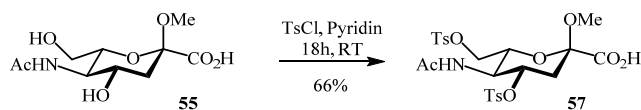
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.35



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 4.05 (ddd, J = 11.4, 9.9, 5.1 Hz, 1H, 4-H), 3.80-3.71 (m, 3H, 5-, 7-H), 3.62 (ddd, J = 10.5, 5.6, 2.4 Hz, 1H, 6-H), 3.25 (s, 3H, 10-H), 2.44 (dd, J = 13.2, 5.1 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.10 (s, 3H, 9-H), 1.72 (dd, J = 13.3, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 174.77 (C-8), 174.58 (C-1), 99.93 (C-2), 72.72 (C-6), 66.74 (C-4), 61.19 (C-7), 52.30 (C-5), 50.43 (C-10), 39.71 (C-3), 22.11 (C-9).

5-(Acetylamino)-3,5-dideoxy-L-arabino-heptulosensäure – verkürzte C₇-Neu5Ac (56)**Vorschrift:** AAV3**Ansatz:**Verbindung **55** (143.6 mg, 545 μ mol)H₂O (10 mL)Ameisensäure (500 μ L, 610 mg, 13.3 mmol, 24 eq.)**Säulenchromatographie:** MeOH/DCM = 1 : 5 \rightarrow MeOH/ Aceton/H₂O/DCM = 4 : 2 : 1 : 8**Ausbeute:** 114.1 mg (224 μ mol, 50 %) als farbloser kristalliner Feststoff.**Dünnschichtchromatographie:** R_f: 0.34**MS (ESI)⁻:** *m/z* berechnet für [C₉H₁₅N₁O₇]-H⁺ = 248.08;
gefunden: 248.08**¹H-NMR (500 MHz, D₂O):** δ = 8.49 (1H, NH), 4.04 (ddd, J = 11.8, 9.8, 4.8 Hz, 1H, 4-H), 3.87-3.82 (m, 1H, 6-H), 3.76 (dd, J = 10.1, 10.2 Hz, 1H, 5-H), 3.71-3.59 (m, 2H, 7-H), 2.28 (dd, J = 13.0, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.09 (s, 3H, 9-H), 1.86 (dd, J = 13.0, 11.8 Hz, 1H, 3_{ax}-H).**¹³C-NMR (126 MHz, D₂O):** δ = 176.42 (C-8), 174.79 (C-1), 96.22 (C-2), 72.67 (C-6), 66.98 (C-4), 61.10 (C-7), 52.50 (C-5), 39.49 (C-3), 22.12 (C-9).

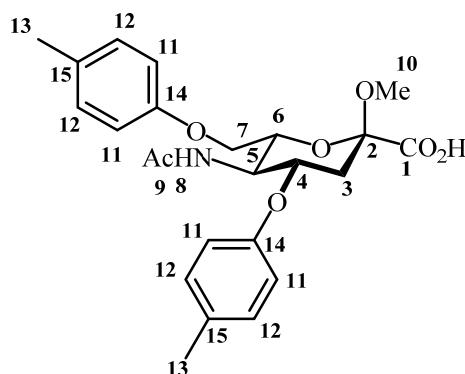
Methyl 5-(acetylamino)-3,5-dideoxy-7-O-tosyl- α -L-arabino-heptulo-2,6-pyranosidonsäure (57)


Verbindung **55** (150 mg, 570 μ mol) wurde in trockenem Pyridin gelöst (15 mL). Nach Kühlen der Lösung auf 0 °C wurde Tosylchlorid (142.3 mg, 746 μ mol, 1.30 eq.) in trockenem Pyridin (2.5 mL) hinzugefügt (über 30 min). Nach Entfernen des Kühlbads wurde die Reaktionsmischung für 12 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Methanol (5 mL) wurden die Lösemittel im Vakuum entfernt.

Säulenchromatographie: EE/MeOH = 9 : 1

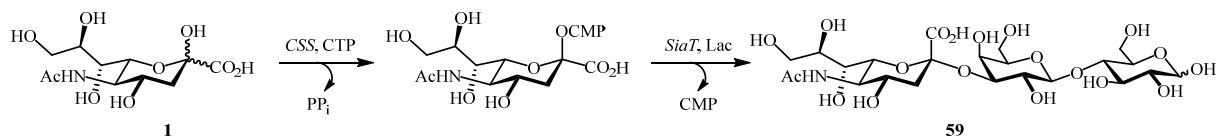
Ausbeute: 215.0 mg (376 μ mol, 66 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.74



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ = 7.67, 7.66 (2x s, 2x 2H, 12-H), 7.35, 7.33 (2x s, 2x 2H, 11-H), 3.98 (ddd, J = 11.4, 9.9, 5.0 Hz, 1H, 4-H), 3.78-3.63 (m, 2H, 7-, 5-H), 3.58-3.54 (m, 6-H), 3.20 (s, 3H, 10-H), 2.37 (dd, J = 13.3, 5.0 Hz, 1H, 3_{eq}-H), 2.37 (s, 6H, 13-H), 2.02 (s, 3H, H-9), 1.70 (dd, J = 13.3, 11.4 Hz, 1H, 3_{ax}-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ = 174.82 (C-8), 173.22 (C-1), 142.49 (14), 129.46 (C11), 127.45 (15), 125.39 (12), 99.43 (C-2), 72.95 (C-6), 66.48 (C-4), 61.03 (C-7), 52.17 (C-5), 50.61 (C10) 39.50 (C-3), 22.11 (C-9), 20.50 (C13).

5.4.6. Versuche zu Kapitel 3.10 – G_{M3}-Trisaccharide / Analoga α 2,3-Sialyllactose (59), G_{M3}:

Vorschrift: AAV4 mit 2,3SiaT_{pph} (A151D)

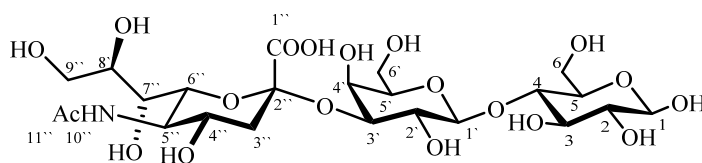
Ansatz:

Neu5Ac **1** (50.0 mg, 162 μ mol)

Ausbeute: 93.4 mg (147 μ mol, 91 %) als farbloser kristalliner Feststoff.

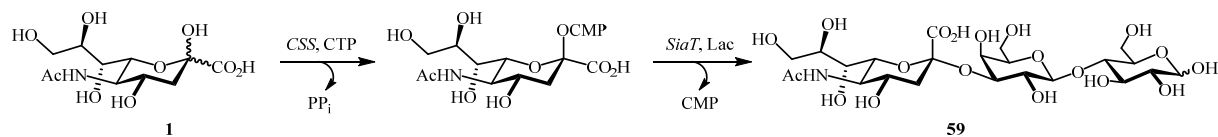
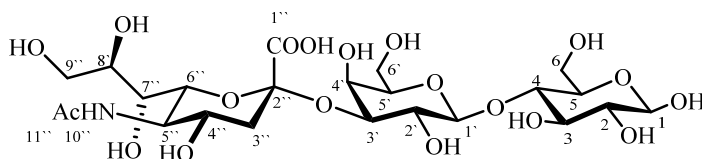
Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.24

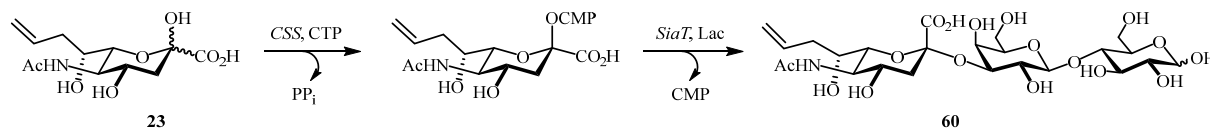
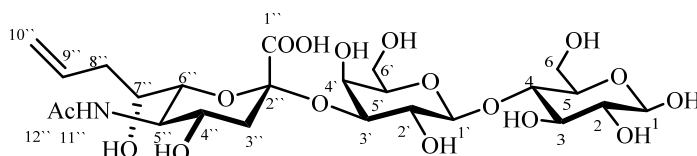
HRMS (ESI)⁺: *m/z* berechnet für [C₂₃H₃₉N₁O₁₉]⁺Na⁺ = 656.2009;
gefunden: 656.2010



¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.29 (d, *J* = 3.7 Hz, 0.4H, 1 α -H), 4.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 0.6H, 1 β -H), 4.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 1' β -H), 4.18 (ddd, *J* = 9.9, 1.9, 2.9 Hz, 1H, 3'-H), 4.06-3.99 (m, 1.8H, 4'-,6 α -H), 3.98-3.85 (m, 5H, 6''-, 5''-, 5-, 6'-H), 3.82-3.74 (m, 4H, 6 β -, 5'-, 4-H), 3.74-3.68 (m, 4H, 4''-, 3-, 9''-H), 3.68-3.65 (m, 2.4H, 7''-,2 α -, 8''-H), 3.64-3.61 (m, 1H, 2'-H), 3.35 (dd, *J* = 8.5 Hz, 0.6H, 2 β -H), 2.82 (dd, *J* = 12.4, 4.6 Hz, 1H, 3_{eq}''-H), 2.10 (s, 3H, 11''-H), 1.86 (dd, *J* = 12.4, 12.1 Hz, 1H, 3_{ax}''-H).

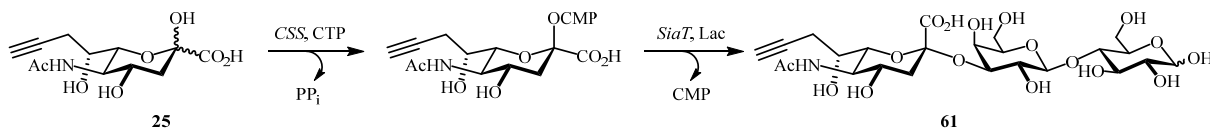
¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.08 (C-1''), 173.90 (C-10''), 102.71 (C-1'), 99.89 (C-2''), 95.83 (C-1 β), 91.88 (C-1 α), 78.46 (C-4 α), 78.32 (C-4 β), 75.56 (C-3'), 75.21 (C-5'), 74.85 (C-2 α), 74.39 (C-2 β), 73.89 (C-4''), 72.94 (C-3), 71.83 (C-6''), 71.44 (C-5 α), 71.23 (C-5 β), 69.43 (C-2'), 68.37 (C-8''), 68.19 (C-7''), 67.57 (C-4'), 62.68 (C-9''), 61.08 (C-6'), 60.18 (C-6 α), 59.48 (C-6 β), 51.77 (C-5''), 39.70 (C-3''), 22.14 (C-11'').

α 2,3-Sialyllactose (59), G_{M3}:**Vorschrift:** AAV4 mit NE 2,3SiaT_{pph}**Ansatz:**Neu5Ac **1** (50.0 mg, 162 μ mol)**Ausbeute:** 88.2 mg (139 μ mol, 86 %) als farbloser kristalliner Feststoff.**Dünnschichtchromatographie:** R_f: 0.24**HRMS (ESI)⁺:** *m/z* berechnet für [C₂₃H₃₉N₁O₁₉]⁺+Na⁺ = 656.2009;
gefunden: 656.2010**¹H-NMR (500 MHz, D₂O):** δ = 5.29 (d, *J* = 3.7 Hz, 0.4H, 1 α -H), 4.73 (d, *J* = 8.1 Hz, 0.6H, 1 β -H), 4.59 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, 1' β -H), 4.18 (ddd, *J* = 9.9, 1.9, 2.9 Hz, 1H, 3'-H), 4.06-3.99 (m, 1.8H, 4'-,6 α -H), 3.98-3.85 (m, 5H, 6''-, 5''-, 5-, 6'-H), 3.82-3.74 (m, 4H, 6 β -, 5'-, 4-H), 3.74-3.68 (m, 4H, 4''-, 3-, 9''-H), 3.68-3.65 (m, 2.4H, 7''-,2 α -, 8''-H), 3.64-3.61 (m, 1H, 2'-H), 3.35 (dd, *J* = 8.5 Hz, 0.6H, 2 β -H), 2.82 (dd, *J* = 12.4, 4.6 Hz, 1H, 3_{eq}''-H), 2.10 (s, 3H, 11''-H), 1.86 (dd, *J* = 12.4, 12.1 Hz, 1H, 3_{ax}''-H).**¹³C-NMR (126 MHz, D₂O):** δ = 175.08 (C-1''), 173.90 (C-10''), 102.71 (C-1'), 99.89 (C-2''), 95.83 (C-1 β), 91.88 (C-1 α), 78.46 (C-4 α), 78.32 (C-4 β), 75.56 (C-3'), 75.21 (C-5'), 74.85 (C-2 α), 74.39 (C-2 β), 73.89 (C-4''), 72.94 (C-3), 71.83 (C-6''), 71.44 (C-5 α), 71.23 (C-5 β), 69.43 (C-2'), 68.37 (C-8''), 68.19 (C-7''), 67.57 (C-4'), 62.68 (C-9''), 61.08 (C-6'), 60.18 (C-6 α), 59.48 (C-6 β), 51.77 (C-5''), 39.70 (C-3''), 22.14 (C-11'').

Allylanalogon von α 2,3-Sialyllactose (60):**Vorschrift:** AAV4 mit 2,3SiaT_{p_{ph}} (A151D)**Ansatz:**Verbindung **23** (40.0 mg, 138 μ mol)**Ausbeute:** 67.8 mg (111 μ mol, 80%) als farbloser kristalliner Feststoff.**Dünnschichtchromatographie:** R_f: 0.31**HRMS (ESI)⁺:** *m/z* berechnet für [C₂₄H₃₉N₁O₁₇]+Na⁺ = 636.2110;
gefunden: 636.2110

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.96 (ddt, J = 17.2, 10.2, 7.0 Hz, 1H, 9''-H), 5.26 (d, J = 3.8 Hz, 1H, 1 α -H), 5.22 (dd, J = 17.2, 1.9 Hz, 1H, 1H, 10''-H), 5.22 (dd, J = 10.2, 1.9 Hz, 1H, 10''-H), 4.70 (d, J = 7.8 Hz, 1H, 1 β -H), 4.57 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.18 – 4.13 (m, 1H, 3'-H), 4.07-4.03 (dm, J = 3.1 Hz, 1H, 4'-H) 4.03 – 3.96 (m, 1H, 6 β -H), 3.95-3.90 (m, 1H, 6 α -H), 3.90-3.87 (m, 4H, 5''-, 6''-, 3 β -, 4''-H) 3.87-3.75 (m, 2H, 6''-H), 3.73-3.79 (m, 3H, 5'-, 4 α + β -, 3 α -H), 3.69-3.65 (m, 2H, 7''-, 5 α + β -H), 3.65-3.59 (m, 2H, 2'-, 2 α -H), 3.33 (dd, J = 8.5 Hz, 1H, 2 β -H), 2.72 (dd, J = 12.2, 4.5 Hz, 1H, 3''-H), 2.56-2.38 (m, 2H, 8''-H), 2.06 (s, 3H, 12''-H), 1.81 (dd, J = 12.1 Hz, 1H, 3''-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.03 (C-12''), 173.77 (C-1''), 135.44 (C-9''), 117.56 (C-10''), 102.83 (C-1'), 100.41 (C-2''), 95.89 (C-1 β), 91.95 (C-1 α), 78.51(C-4 α), 78.36 (C-4 β), 75.65 (C-3'), 75.29 (C-3 β), 75.29 (C-6''), 74.94(C-3 α), 74.45 (C-2 α), 73.94 (C-2 β), 71.51 (C-5 β), 71.29 (C-5 α), 70.24 (C-7''), 69.59 (C-2'), 68.73 (C-4''), 68.24 (C-4'), 67.88 (C-5'), 60.48 (C-6'), 60.23 (C-6 α), 60.08 (H-6 β), 52.48(C-5''), 39.78 (C-3''), 37.52 (C-8'') 22.16 (C-12'').

Propargylanalogon von α 2,3-Sialyllactose (61):

Vorschrift: AAV4 mit 2,3SiaT_{pph} (A151D)

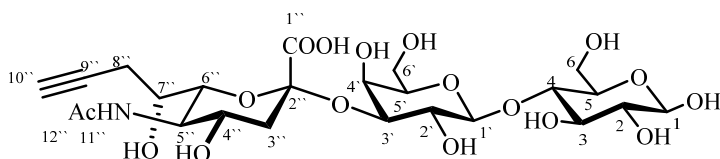
Ansatz:

Verbindung **23** (40.0 mg, 139 μ mol)

Ausbeute: 78.2 mg (128 μ mol, 92%) als farbloser kristalliner Feststoff.

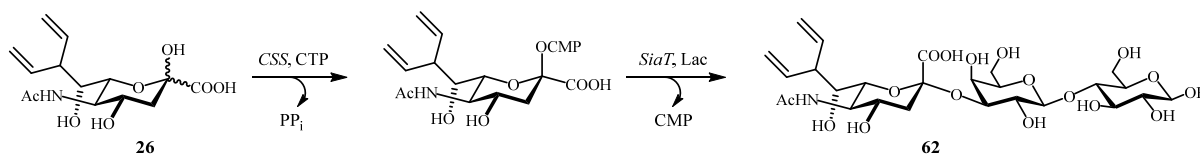
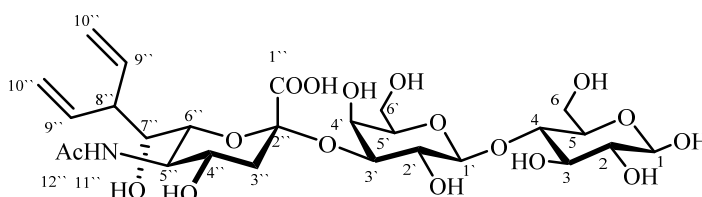
Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.24

HRMS (ESI)⁺: m/z berechnet für $[C_{24}H_{37}N_1O_{17}] + H^+$ = 612.2134;
gefunden: 612.2135



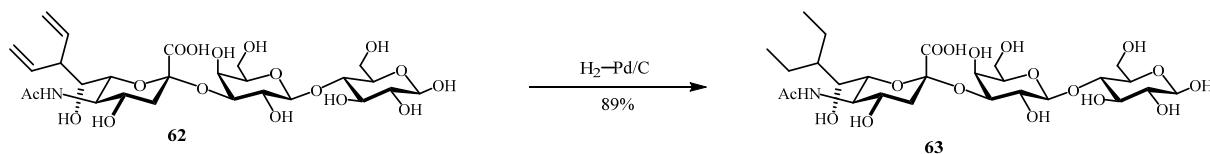
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.22 (d, J = 3.8 Hz, 0.4H, 1 α -H), 4.65 (d, J = 8.0 Hz, 0.6H, 1 β -H), 4.50 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.08 (ddm, J = 9.9, 2.9 Hz, 1H, 3'-H), 3.98 (dm, J = 3.2, 1H, 4'-H) 3.97-3.91 (m, 1.6H, 6''-, 6 β -H), 3.88-3.82 (m, 2H, 7''-, 6 α -H), 3.83-3.77 (m, 2H, 5 α / β -, 5''-H) 3.76-3.72 (m, 2H, 6'-H), 3.69-3.61 (m, 4H, 5'-, 4 α / β -, 4''-, 3 α / β -H), 3.61-3.52 (m, 2H, 2'-, 2 α -H), 3.28 (dd, J = 9.0, 8.0 Hz, 0.6H, 2 β -H), 2.65 (dd, J = 12.2, 4.4 Hz, 1H, 3_{eq}''-H), 2.59 (ddd, J = 16.9, 7.8, 2.6 Hz, 1H, 8''-H), 2.51 (ddd, J = 16.9, 5.9, 2.7 Hz, 1H, 8''-H) 2.40 (t, J = 2.6 Hz, 1H, 10''-H), 2.02 (s, 3H, 12''-H), 1.75 (dd, J = 12.2, 12.1 Hz, 1H, 3_{ax}''-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 175.03 (C-1''), 173.64 (C-11''), 107.48 (C-1'), 102.71 (C-2''), 95.84 (C-1 β), 91.88 (C-1 α), 82.25 (C-9''), 78.46(C-4 α), 78.31 (C-4 β), 75.50 (C-3'), 75.20 (C-4''), 74.87(C-3 α), 74.61 (C-3 β), 74.37 (C-2 α), 73.89 (C-2 β), 71.43 (C-5 α), 71.22 (C-5 β), 71.09 (C-10''), 70.19 (C-6''), 69.54 (C-2'), 68.09 (C-5'), 67.84 (C-4'), 67.02 (C-7''), 61.11 (C-6'), 60.20 (C-6 β), 60.08 (C-6 α), 52.30(C-5''), 39.63 (C-3''), 22.68 (C-8''), 22.28 (C-12'').

Penta-1,4-dien-3-ylanalogon von α 2,3-Sialyllactose (62):**Vorschrift:** AAV4 mit 2,3SiaT_{pph} (A151D)**Ansatz:**Verbindung **26** (40.0 mg, 127 μ mol)**Ausbeute:** 62.9 mg (89 μ mol, 78 %) als farbloser kristalliner Feststoff.**Dünnschichtchromatographie:** R_f : 0.35**MS (ESI)⁻:** m/z berechnet für $[C_{26}H_{41}N_1O_{17}]^-H^+$ = 638.23;
gefunden: 638.23

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 6.00 (ddd, J = 17.8, 10.4, 7.9 Hz, 1H, 9''-H), 5.94 (ddd, J = 16.5, 11.2, 8.6 Hz, 1H, 9''-H), 5.26 – 5.24 (m, 1H, 1 α -H), 5.23 – 5.18 (m, 4H, 10''-H), 4.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1 β -H), 4.55 (d, J = 7.9 Hz, 1H, 1'-H), 4.13 (dm, J = 9.1 Hz, 1H, 3'-H), 4.04 (dm, J = 3.2 Hz, 1H, 4'-H) 4.03 – 3.97 (m, 1H, 6 β -H), 3.94-3.91 (m, 1H, 6 α -H), 3.91-3.87 (m, 2H, 5''-, 6''-H) 3.87-3.68 (m, 6H, 5 α + β -, 3 β -, 6'-, 4 β -, 3 α -H), 3.68-3.64 (m, 2H, 4''-, 5'-H), 3.64-3.58 (m, 3H, 2'-, 4 α -, 2 α -H), 3.54 (d, J = 9.2 Hz, 1H, 7''-H), 3.32 (dd, J = 9.1, 8.0 Hz, 1H, 2 β -H), 3.23 (dm, J = 8.5 Hz, 1H, 8''-H), 2.68 (dd, J = 12.2, 4.4 Hz, 1H, 3''-H), 2.04 (s, 3H, 12''-H), 1.78 (dd, J = 12.1 Hz, 1H, 3''-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 174.92 (C-12''), 173.80 (C-1''), 138.59 (C-9''), 137.39 (C-9''), 117.33 (C-10''), 117.06 (C-10''), 102.92 (C-1'), 100.37 (C-2''), 95.90 (C-1 β), 91.95 (C-1 α), 78.43(C-4 α), 78.30 (C-4 β), 75.82 (C-3'), 75.31 (C-3 β), 74.97(C-3 α), 74.44 (C-2 α), 73.95 (C-2 β), 73.18 (C-6''), 71.49 (C-5 β), 71.30 (C-5 α), 70.69 (C-2'), 70.27 (C-7''), 69.58 (C-4''), 68.15 (C-4'), 67.91 (C-5'), 61.14 (C-6'), 60.47 (C-6 β), 60.16 (C-6 α), 52.54(C-5''), 50.90 (C-8''), 39.87 (C-3''), 22.16 (C-12'').

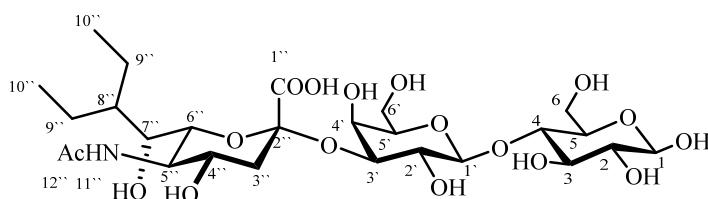
Pentan-3-ylanalogon von α 2,3-Sialyllactose (63):

Verbindung **62** (24.2 mg, 37.8 μ mol) wurde in trockenem Methanol (15 mL) gelöst und Palladium auf Kohle (25 mg) hinzugefügt. Eine Hydrierblase mit \sim 2 bar Wasserstoff wurde auf den Kolben gesetzt und die Reaktionsmischung für 24 h bei RT stark gerührt. Nach Filtration über Celite wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 21.5 mg (33.4 μ mol, 89%) als farbloser kristalliner Feststoff.

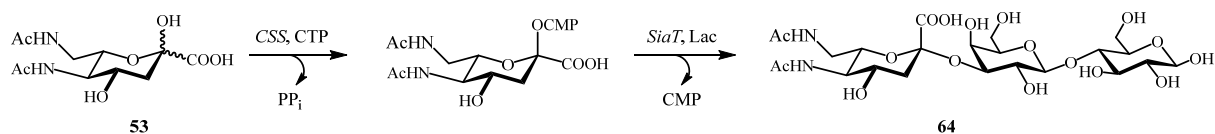
Dünnschichtchromatographie: R_f : 0.31

HRMS (ESI)⁺: m/z berechnet für $[C_{26}H_{45}N_1O_{17}] + H^+ = 644.2760$;
gefunden: 644.2761

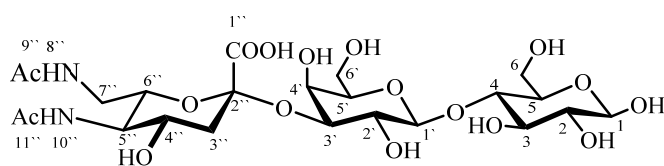


¹H-NMR (500 MHz, D₂O): $\delta = 5.25$ (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, 1 α -H), 4.70 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, 1 β -H), 4.50 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H, 1'-H), 4.09 (dd, $J = 9.8, 3.1$ Hz, 1H, 3'-H), 4.02-3.99 (m, 1H, 4'-H) 3.93 – 3.90 (m, 1H, 6 β -H), 3.90-3.82 (m, 4H, 5''-, 6''-, 5 β + α -, 6 α -H), 3.82-3.79 (m, 2H, 6'-H) 3.74-3.66 (m, 3H, 3 β + α -, 4 β + α -, 5'-H), 3.65-3.57 (m, 3H, 2 α -, 4''-, 2'-H), 3.47 (d, $J = 8.8$, 1H, 7''-H), 3.32 (dd, $J = 8.9, 7.9$ Hz, 1H, 2 β -H), 2.70 (dd, $J = 12.2, 4.4$ Hz, 1H, 3''-H), 2.06 (s, 3H, 12''-H), 1.78 (dd, $J = 12.1, 12.1$ Hz, 1H, 3''-H), 1.69-1.56 (m, 3H, 8''-, 9''-H), 1.53-1.39 (m, 2H, 9''-H), 0.89 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, 10''-H), 0.85 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, 10''-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): $\delta = 174.93$ (C-12''), 173.84 (C-1''), 102.98 (C-1'), 100.35 (C-2''), 95.90 (C-1 β), 91.96 (C-1 α), 78.45 (C-4 α), 78.32 (C-4 β), 75.86 (C-3'), 75.37 (C-3 β), 75.01 (C-3 α), 74.42 (C-2 α), 73.95 (C-2 β), 73.57 (C-6''), 71.48 (C-5 β), 71.31 (C-5 α), 70.68 (C-4''), 70.31 (C-7''), 69.44 (C-2'), 68.22 (C-5'), 67.91 (C-4'), 60.25 (H-6 α), 59.47 (C-6 β), 58.11 (C-6'), 52.75 (C-5''), 41.63 (C-8''), 40.03 (C-3''), 22.15 (C-12''), 20.47 (C-9''), 19.77 (C-9''), 9.94 (C-10''), 9.28 (C-10'').

verkürztes Acetamidoanalogon von α 2,3-Sialyllactose (64):**Vorschrift:** AAV4 mit 2,3SiaT_{pph} (A151D)**Ansatz:**Verbindung **26** (40.0 mg, 138 μ mol)**Ausbeute:** 53.7 mg (87 μ mol, 63 %) als farbloser kristalliner Feststoff.**Dünnschichtchromatographie:** R_f: 0.22

MS (ESI)⁻: *m/z* berechnet für [C₂₃H₃₈N₂O₁₇]+H⁺ = 615.2243;
 gefunden: 615.2239



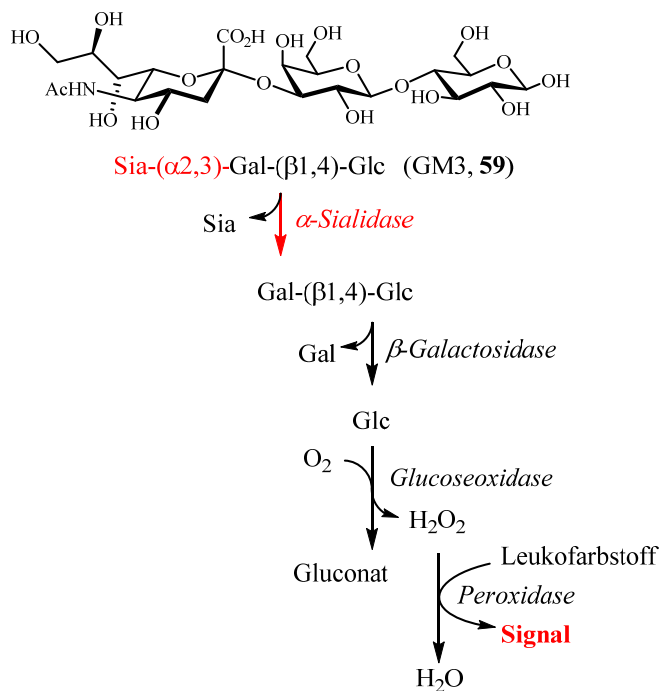
¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 5.25 (d, J = 3.7 Hz, 1H, 1 α -H), 4.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 1 β -H), 4.55 (d, J = 7.6 Hz, 1H, 1'-H), 4.11 (ddd, J = 9.8, 3.3, 1.9 Hz, 1H, 3'-H), 4.02-3.99 (m, 1H, 4'-H) 4.00-3.99 (m, 1H, 6 α -H), 3.94-3.89 (m, 1H, 6 β -H), 3.88-3.79 (m, 2H, 6'-H) 3.79-3.77 (m, 1H, 4''-H), 3.75-3.68 (m, 5H, 6''-, 4 α / β -, 3 β -, 5''-, 5 α / β -H), 3.69-3.65 (m, 2H, 5'-, 3 α -H), 3.63-3.58 (m, 2H, 2 α -, H2'-H), 3.56-3.50 (dm, J = 14.2 Hz, 1H, 7''-H), 3.41-3.36 (dm, , J = 14.2 Hz, 1H, 7''-H), 3.32 (m, 0.6H, 2 β -H), 2.73 (dd, J = 12.3, 4.5 Hz, 1H, 3''-H) 2.04 (s, 6H, 9''-, 11''-H), 1.81 (dd, J = 12.3, 12.2 Hz, 1H, 3''-H).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 174.80 (C-11''), 174.27 (C-8''), 173.75 (C-1'') 102.77 (C-1'), 100.50 (C-2'), 95.93 (C-1 β), 91.98 (C-1 α), 78.62 (C-4 α), 78.47 (C-4 β), 75.65 (C-3'), 75.30 (C-3 β), 74.93(C-3 α), 74.52 (C-2 α), 73.96 (C-2 β), 72.90 (C-6''), 71.58 (C-5 α), 71.31 (C-5 β), 70.23 (C-4''), 69.96 (C-2'), 67.97 (C-5'), 67.80 (C-4'), 60.52 (C-6'), 60.29 (C-6 β), 60.16 (C-6 α), 53.13 (C-5''), 40.28 (C-7''), 39.69 (C-3''), 22.26 (C-9''), 22.09 (C-10'').

5.4.7. Versuche zu Kapitel 3.11

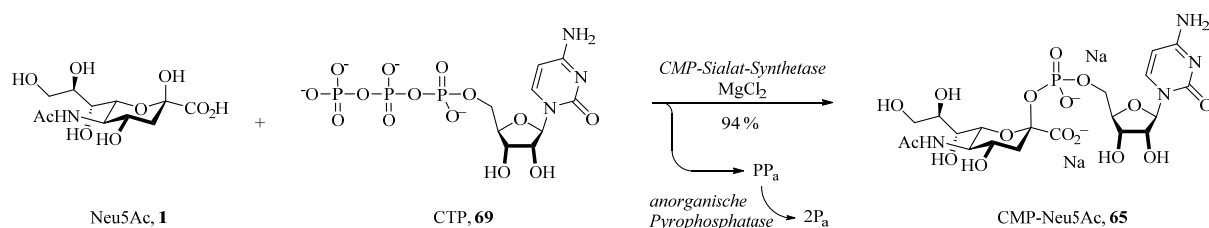
Sialidase-Analyse

Die Assaymischung (200 μL) beinhaltet Meerrettich-Peroxidase (>15 U), Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger* (>0.5 U), β -galactosidase aus *Aspergillus oryzae* (>0.6 U) (alle Enzymes von *Sigma-Aldrich*), Flavin-Adenin-Dinukleotid (0.1 mM), 4-Aminoantipyrin (2.1 mM), Vanillinsäure (2.1 mM) und jeweils Substrat (4.0 mM) in Natriumacetatpuffer (50 mM, 5.0 mM CaCl_2) bei pH 5.5. Die Reaktionen wurden mit einer limitierenden Menge Neuraminidase (aus *Clostridium perfringens*, >2 mU, *Sigma-Aldrich*; oder aus *Vibrio cholerae*, >10 mU, *New England Biolabs*) versetzt. Alle Assays wurden als Triplikate in 96-well-Platten bei 35°C durchgeführt und wurden mit der Zugabe von einer doppelt-konzentrierten Substratlösung (kompetitive Assays beinhalteten beide Substrate bei doppelter Konzentration) gestartet.



5.4.8. Versuch zu Kapitel 4.4

CMP-Neu5Ac (65)



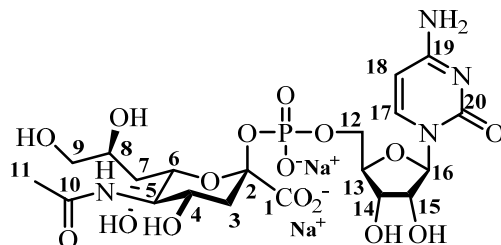
Neu5Ac (500 mg, 1.617 mmol) wurde in Tris-Puffer (35 mL, 50 mM, pH 8.5) mit 50 mM MgCl₂ gelöst und mit CTP (975.1 mg, 1.678 mmol, 1.04 eq.) versetzt. Die Lösung wurde erneut auf einen pH-Wert von 8.5 eingestellt und auf 37 °C temperiert. Anschließend wurde CSS aus *Neisseria meningitidis* (70 mg) und anorganische Phosphatase dazugegeben. Nach Zugabe der CSS wurde der pH-Wert anfangs händisch durch Zugabe halbkonzentrierter NaOH bei pH 8.5 konstant gehalten. Im weiteren Verlauf wurde ein automatischer Titrator benutzt.

Nach beendeter Reaktion (DC-Kontrolle) wurden präzipitierte Magnesium- und Phosphatsalze in der Kälte (4 °C) abzentrifugiert und das identische Volumen an eiskaltem Ethanol zugesetzt und die Probe 3 h im Eisfach gelagert (-20 °C). Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Ethanol im Vakuum entfernt, dabei ist unbedingt auf einen leicht basischen pH-Wert der Lösung zu achten. Das eingeeengte Material wurde dann über basische Säulenchromatographie sorgfältig gereinigt.

Säulenchromatographie: (*n*-Propanol/H₂O/NH₃ (20 % aq.)) = 7 : 3 : 1

Ausbeute: 997.2 mg (1.51 mmol, 94%) als farbloser kristalliner Feststoff.

Dünnschichtchromatographie: R_f: 0.33

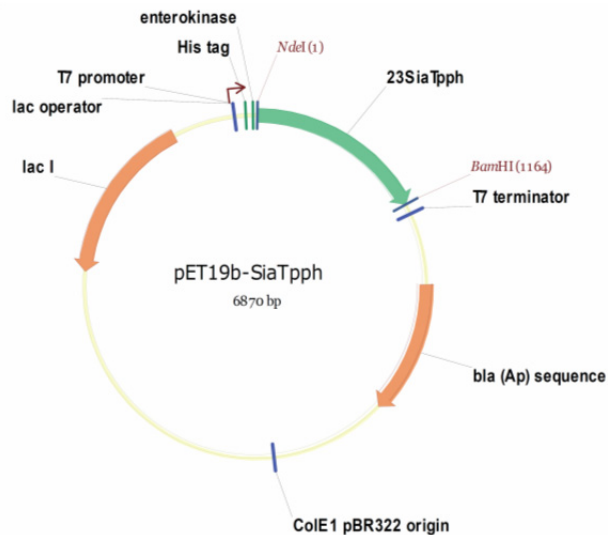


¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.03 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-17), 6.19 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-18), 6.05 (d, J = 4.5 Hz, 1H, H-16), 4.41 (dd, J = 4.9 Hz, 1H, H-14), 4.38 – 4.35 (m, 1H, H-15), 4.32 – 4.28 (m, 2H, H-9, 13), 4.20 (dd, J = 10.5, 1.1 Hz, 1H, H-6), 4.14 (ddd, J = 11.3, 10.1, 4.8 Hz, 1H, H-4), 4.01 (dd, J = 10.1, 10.5 Hz, 1H, H-5), 4.024 – 3.98 (m, 1H, H-8), 3.95 (dd, J = 11.8, 2.5 Hz, 1H, H-12a), 3.69 (dd, J = 11.8, 6.6 Hz, 1H, H-12b), 3.52 (dd, J = 9.6, 1.1 Hz, 1H, H-7), 2.56 (dd, J = 13.2, 4.8 Hz, 1H, H-3_{eq}), 2.12 (s, 3H, H11), 1.71 (ddd, J = 13.2, 11.3, 5.7 Hz, 1H, H-3_{ax}).

¹³C-NMR (126 MHz, D₂O): δ = 174.77 (C10), 174.34 (C1), 166.06 (C19), 157.59 (C20), 141.74 (C17), 100.08 (C2), 96.60 (C18), 89.14 (C16), 83.01 (C13), 74.31 (C15), 71.81 (C6), 69.65 (C8), 69.41 (C14), 68.90 (C7), 66.90 (C4), 64.94 (C9), 63.02 (C112), 51.88 (C5), 41.21 (C3), 22.17 (C11).

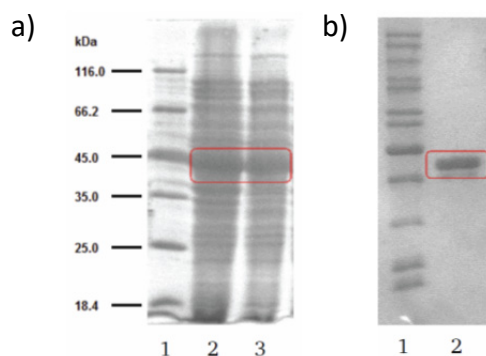
5.5. Experimentelle Daten zur 2,3-SiaT_{pph}

5.5.1. Plasmidkonstruktion zur Expression von 2,3SiaT_{pph}



5.5.2. Klonierung und Expression der 2,3-SiaT aus *Photobacterium phosphoreum*

SDS-Page Gel für 2,3SiaT_{pph}:



- a) Expressionslevel der rekombinanten SiaT_{pph} in BL21(DE3) analysiert per SDS-PAGE.
 Spur 1: Marker; 2: Rohzell-Extrakt;
 3: Überstand des Rohzell-Extrakts
- b) Aufreinigung der 2,3SiaT_{pph} über Ni-Affinitätschromatographie.
 Spur 1: Marker; 2: aufgereinigte 2,3SiaT_{pph}.

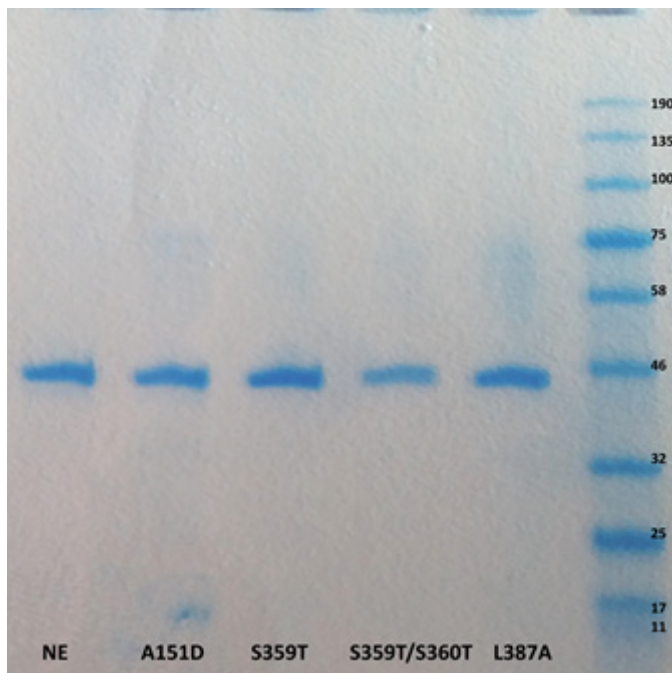
5.5.3. Primer zur *site directed* Mutagenese Bibliothek (2,3SiaT_{pph})

Agilent Methode

SiaT-L120NNK_F	AGTCATTATTAACGGCAATACGmnkTGGGCTGTCGACGTGGTAAAC
SiaT-L120NNK_R	GTTTACCACGTCGACAGCCCAmnnCGTATTGCCGTTAATAATGACT
SiaT-W121NNK_F	GTCATTATTAACGGCAATACGCTGnnkGCTGTCGACGTGGTAAACATTATC
SiaT-W121NNK_R	GATAATGTTTACCACGTCGACAGCmnnCAGCGTATTGCCGTTAATAATGAC
SiaT-D148NNK_F	AACCGAGATCGAACTGAACTTCTATGATmnkGGTAGCGCCGAGTAT
SiaT-D148NNK_R	ATACTCGGCGCTACCmnnATCATAGAAGTTCAGTTCGATCTCGGTT
SiaT-S150WVC_F	CGAACTGAACTTCTATGATGATGGTwwcGCCGAGTATGTTC
SiaT-S150WVC_R	GAACATACTCGGCGbwaCCATCATCATAGAAGTTCAGTTCG
SiaT-A151NNK_F	CTGAACTTCTATGATGATGGTAGCmnkGAGTATGTTCCGCTGTATGATTTTC
SiaT-A151NNK_R	GAAATCATAACAGGCGAACATACTCmnnGCTACCATCATCATAGAAGTTCAG
SiaT-R155NNK_F	GATGATGGTAGCGCCGAGTATGTTmnkCTGTATGATTTCTCTCGC
SiaT-R155NNK_R	GCGAGAGAAATCATAACAGmnnAACATACTCGGCGCTACCATCATC
SiaT-N190NNK_F	CATCAACGGTACTCAGCCGTTTCGATmnkAGCATTGAAAACATCTATGG
SiaT-N190NNK_R	CCATAGATGTTTTCAATGCTmnnATCGAACGGCTGAGTACCGTTGATG
SiaT-T278WVC_F, SiaT-N279WVC_F	CACGAAAACCTTCATCTTCATTGGCvwvcTCTGGTACTGCCACTGCCGAGCAA
SiaT-T278WVC_R, SiaT-N279WVC_R	TTGCTCGGCAGTGGCAGTACCAGAGbwgbwgCCAATGAAGATGAAGTTTTTCGTG
SiaT-H317NNK_F	TGGCACCAATTCTGGTACTGCnnkTGCCGAGCAACAAATCGATAT
SiaT-H317NNK_R	ATATCGATTTGTTGCTCGGCAmnnGCAGTACCAGAATTGGTGCCA
SiaT-S359WVC_F SiaT-S360WVC_F	CAGATGCCGTGGGTGGTATGGGTwwcwwcCGTTTTCTTCTCACTGCCAAAGAC
SiaT-S359WVC_R SiaT-S360WVC_R	GTGTTTGGCAGTGAGAAGAAAACGbwgbwgACCCATACCACCCACGGCATCTG
SiaT-L364NNK_F	ACCGACATTGAGAATAACGCCmnkATCCAGGTCATGATTGAGCTG
SiaT-L364NNK_R	CAGCTCAATCATGACCTGGATmnnGGCGTTATTCTCAATGTCGGT

5.5.4. Qualitätskontrolle der *best hits*-Einzelvarianten

SDS-Page-Gel:



Durch Verwendung eines vorgefärbten Markers läuft das Markerprotein durch den angekoppelten Farbstoff geringfügig anders.

Exprimiertes Protein 46.9 KDa

```

MGHHHHHHH HHSSGHIDDD DKHMDSKHNN SDGNITKNKT IEVYVDRATL PTIQQMTQII
NENSNNKKLI SWSRYPINDE TLLESINGSF FKNRPELIKS LDSMILTNEI KKVIINGNTL
WAVDVVNIK SIEALGKKTE IELNFYDDGS AEYVRLYDFS RLPESQEQYK ISLSKDNIQS
SINGTQPFDN SIENIYGFSQ LYPTTYHMLR ADIFETNLPL TSLKRVISNN IKQMKWDYFT
TFNSQQKNKF YNFTGFNPEK IKEQYKASPH ENFIFIGTNS GTATAEQQID ILTEAKKPDS
PIITNSIQGL DLFFKGHPSA TYNQQIIDAH NMIEIYNKIP FEALIMTDAL PDAVGGMGSS
VFFSLPNTVE NKFIFYKSDT DIENNALIQV MIELNIVNRN DVKLISDLQ-

```

5. Experimentalteil

5.5.5. Primer für die zweite Generation – Kombinationsvarianten

NEB Methode

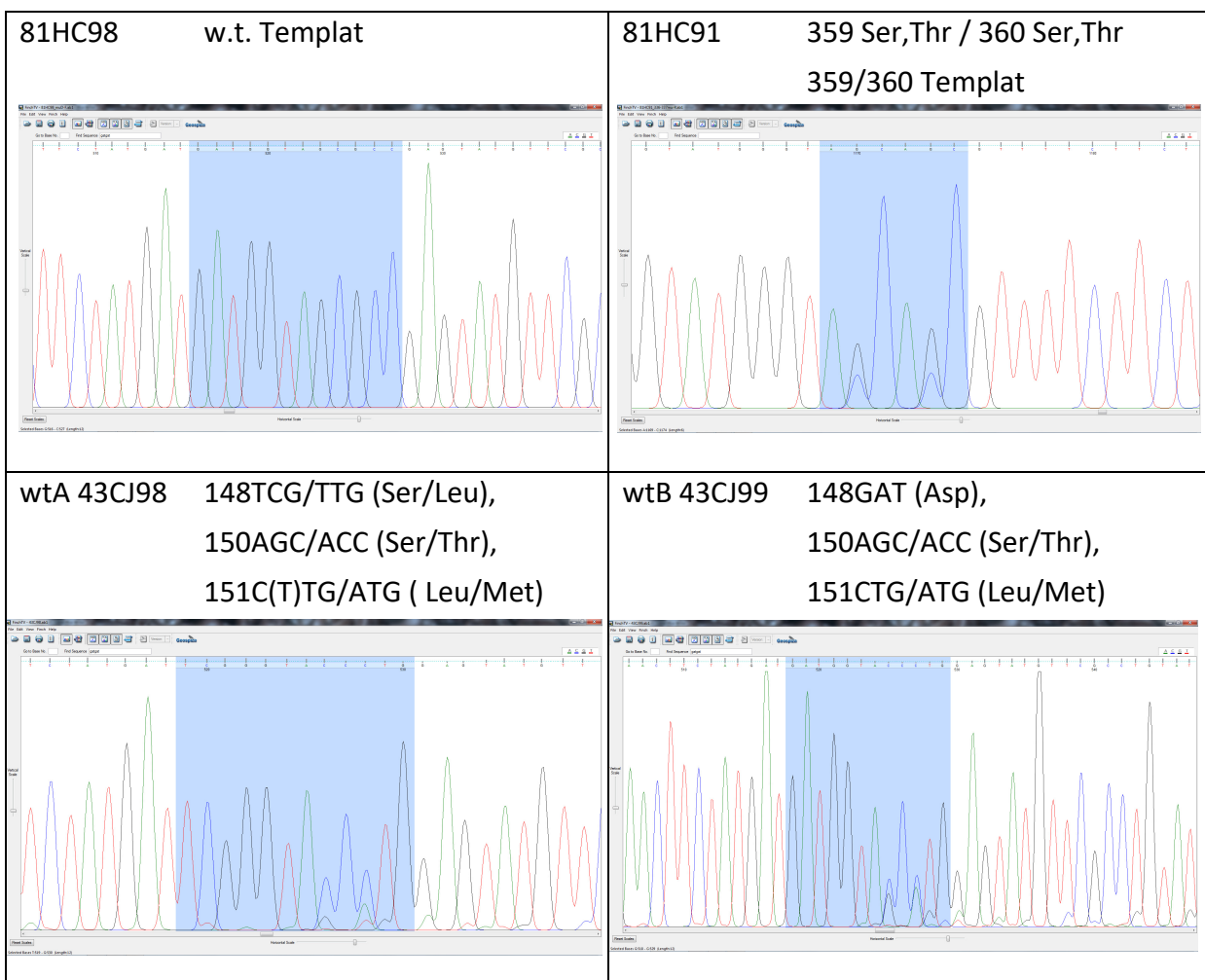
1) SiaT-150S/T, SiaT151L/M_F	<code>ascmtgGAGTATGTTTCGCCTGTATG</code>
2) SiaT-D148S/L_R	<code>accraATCATAGAAGTTCAGTTTCG</code>
3) SiaT-S150S/T, A151_F	<code>ascgccGAGTATGTTTCGCCTGTATG</code>
4) D148_R	<code>accatcATCATAGAAGTTCAGTTTCG</code>

Primer mix: A = (1) + (2), B = (1) + (4), C = (2) + (3), D = (3) + (4)

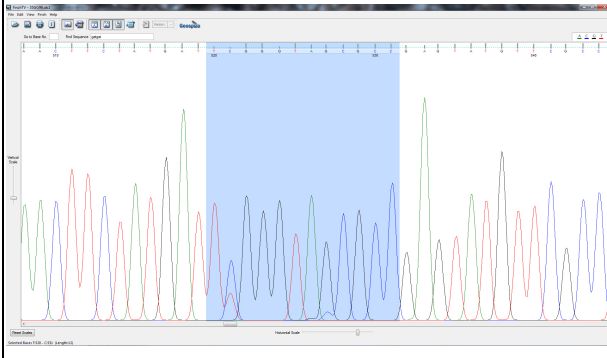
5.5.6. Qualitätskontrolle – Sequenzierung der Kombinationvarianten

Da die Positionen 148, 150 und 151 zu eng beieinander liegen, um eine ausreichende homogene Bindung der Primer zu gewährleisten, wurden Positionen 148-151 zuerst gelöscht (siehe Kapitel 4.8). Die Plasmidmischungen wurden sequenziert, um die erfolgreiche Mutagenese zu gewährleisten. Bei zweifelhaften Sequenzen wurden Einzelklone sequenziert.

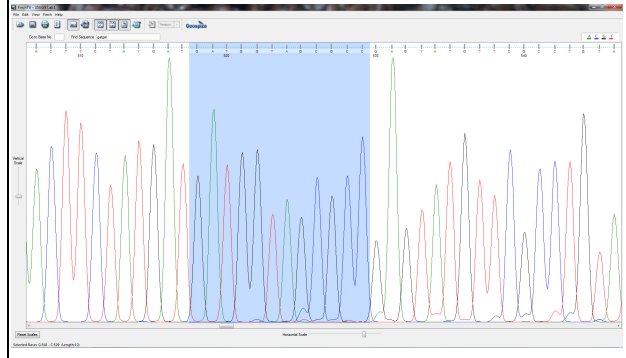
Alle Kombinationen wurden bestätigt:



wtC 35GG96 148TCG/TTG (Ser/Leu),
150AGC/ACC (Ser/Thr),
151GCC (Ala)



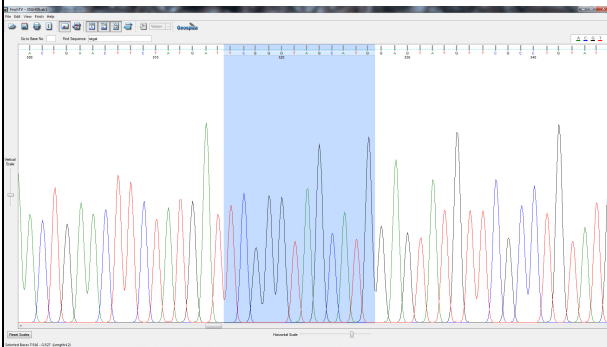
wtD 35GG97 148GAT (Asp),
150ACC/AGC (Ser/Thr),
151GCC (Ala)



336/337 muA Einzelklone

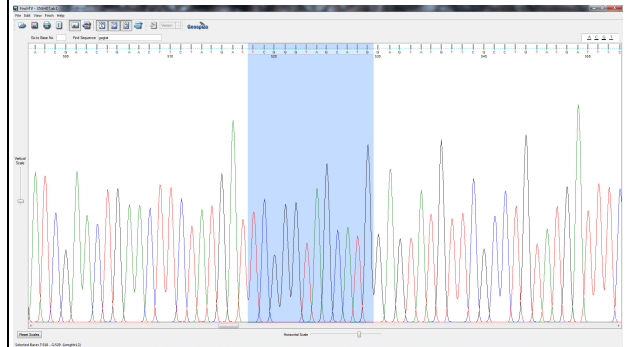
muA Einzelklon 35GH06

148 TCG (Ser), 150 AGC (Ser), 151, ATG (Met)



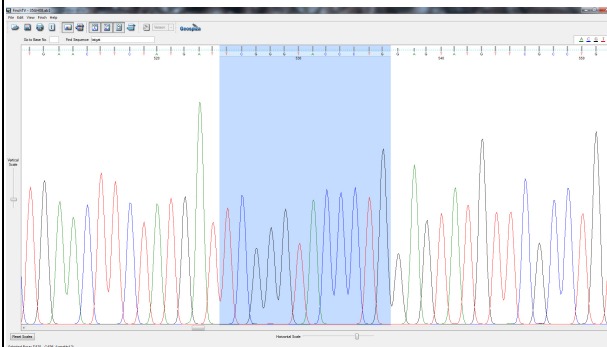
muA Einzelklon 35GH07

148 TCG (Ser), 150 AGC (Ser), 151 ATG (Met)



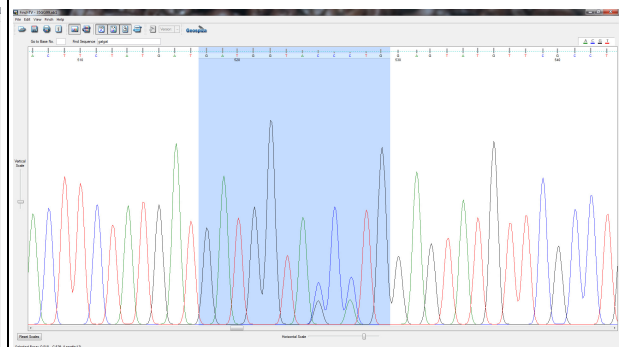
muA Einzelklon 35GH08

148 TCG (Ser), 150 ACC (Thr), 151 CTG (Leu)

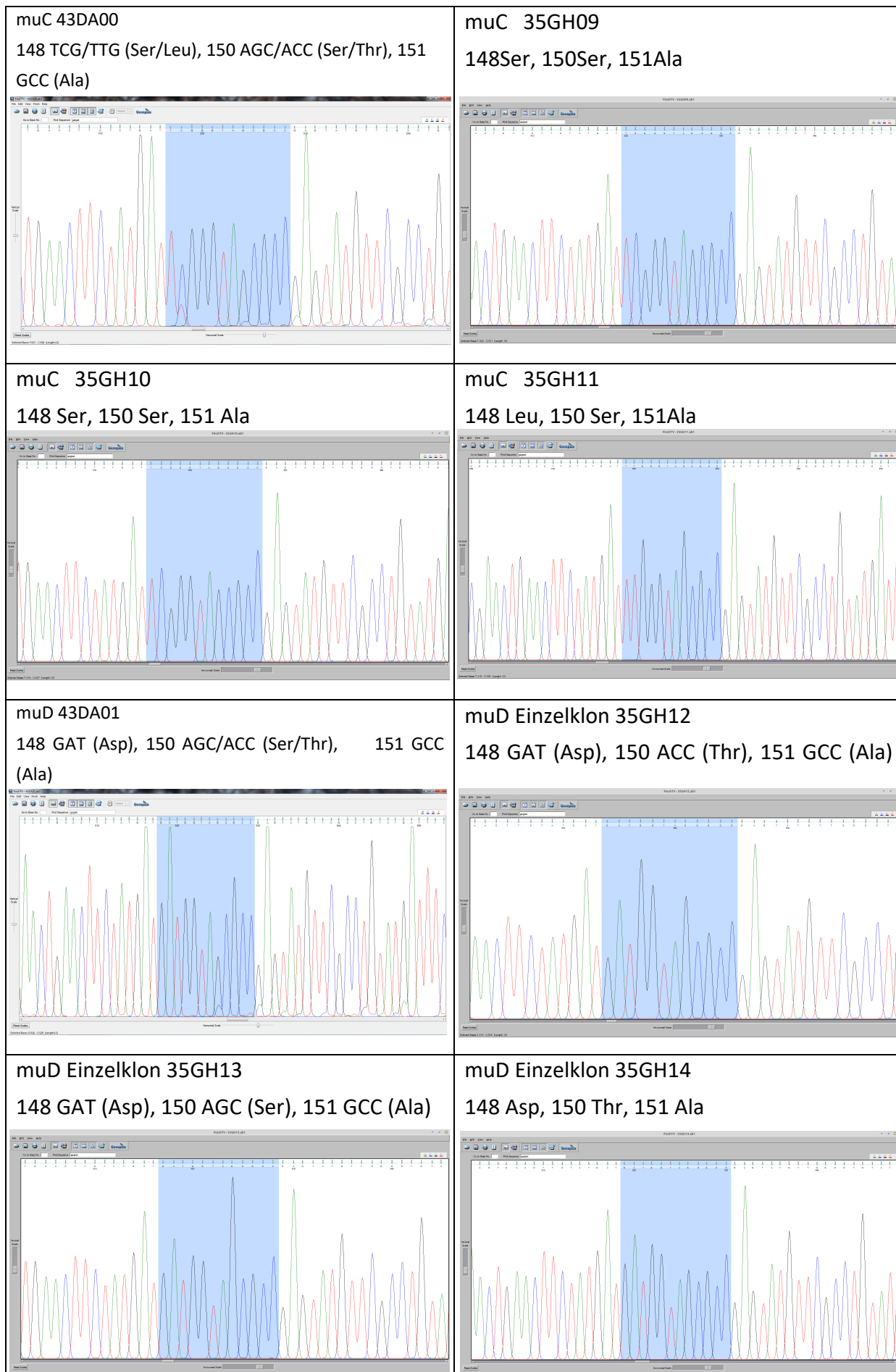


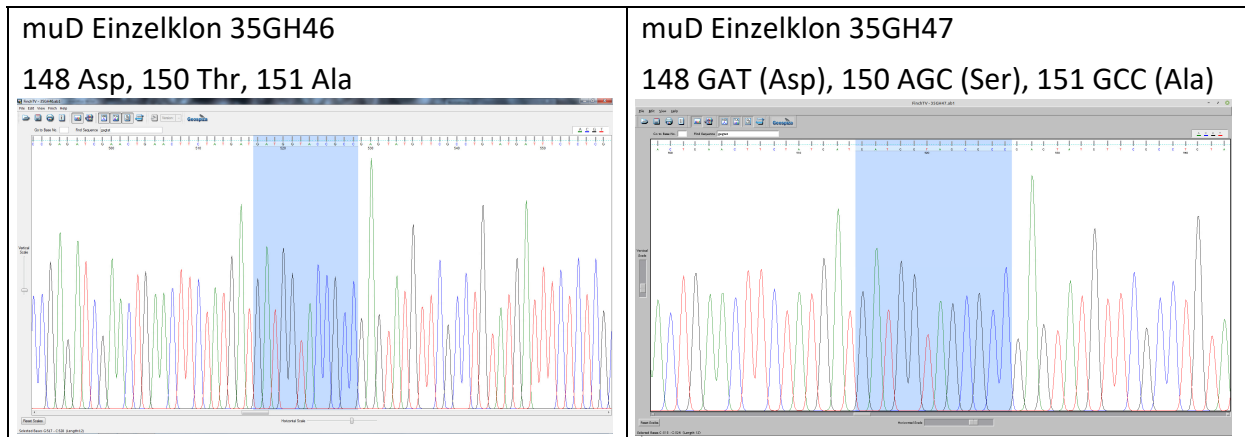
muB 35GG99

148 GAT (Asp), 150 AGC/ACC (Ser/Thr),
151 CTG/ATG (Leu/Met)



5. Experimentalteil





5.5.7. Primer zur Präparation der gezielten individuellen Kombinationsvarianten

NEB Methode

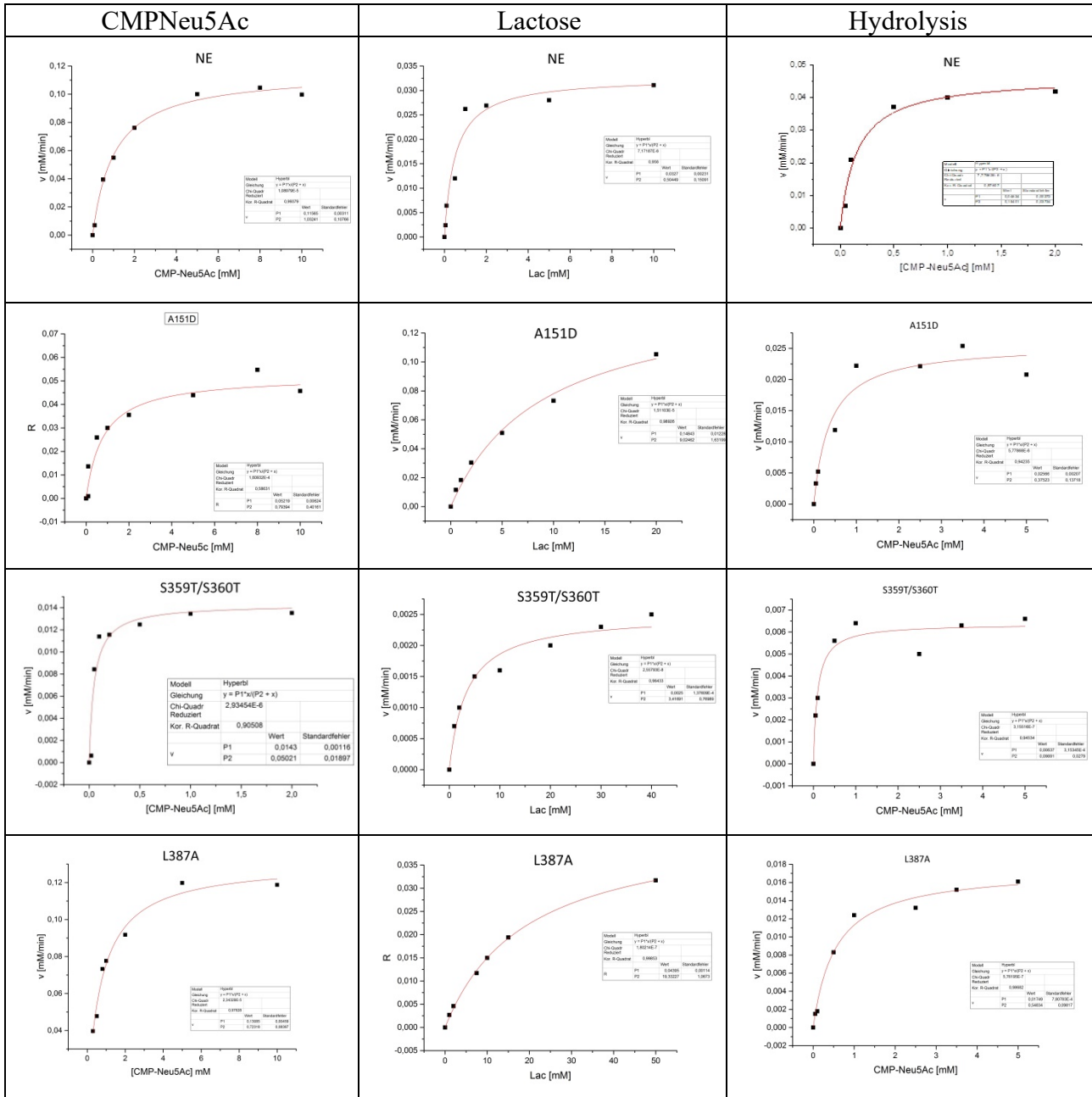
SiaT-A151D_F	TGATGGTAGCgatGAGTATGTTCCG
SiaT-A151D_R	TCATAGAAGTTCAGTTCGATCTCGG
SiaT-E342A_F	AATCCCGTTCgcgGCCCTGATTATG
SiaT-E342A_R	TTGTTATAAATCTCGATCATGTTATG
SiaT-S359T_F	TGGTATGGGTaccAGCGTTTTCTTCTCAC
SiaT-S359T_R	CCCACGGCATCTGGCAGAG
SiaT-L387A_F	GAATAACGCCgcgATCCAGG
SiaT-L387A_R	TCAATGTCGGTGTCGCTTTTATAG

5.5.8. Primer- und Templatkombination für gezielte individuelle Kombinationsvarianten

Templat	Primer	Produkt
w. t.	SiaT-E342A_F/R	E342A
A151D	SiaT-E342A_F/R	A151D/E342A
A151D	SiaT-L387A_F/R	A151D/L387A
S359T/S360T	SiaT-A151D_F/R	A151D/S359T/S360T
A151D/S359T/S360T	SiaT-L387A_F/R	A151D/S359T/S360T/L387A

5. Experimententeil

5.5.9. Versuche zu Kapitel 4.6 – Qualitätskontrolle der Kinetiken



5.5.10. Versuche zu Kapitel 4.10 – HPTLC-Messungen

15 mM CMP-Neu5Ac, 15 mM Lactose und je 10 µg aufgereinigte Enzymvarianten wurden in 560 µL Tris-Puffer (20 mM, pH 8.0) bei 30 °C inkubiert (vorherige Testreaktionen zeigten vollständigen Umsatz nach 22 h für die native 2,3SiaT_{pph} und die A151D Variante). Nach 10 min, 45 min, 2, 4, 6 und 22 h wurden jeweils 10 µL Reaktionsmischung entnommen, mit 90 µL Methanol verdünnt, um die Reaktion zu stoppen und bei -20 °C für 3-4 h im Tiefkühlschrank gelagert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand mittels HPTLC (*CAMAG Automatic TLC Sampler 4*) auf *Merck silica-gel-Platten 60 F₂₅₄* aufgetragen. Für jede Zeitpunktmessung wurden zwei identische 10 µL-Proben aufgesprüht und die Platten in zwei unterschiedlichen Lösemittelgemischen entwickelt, um zwischen partiell überlappenden Banden diskriminieren zu können. So konnten Produkt (α 2,3-SiaLac) und Hydrolyse-Nebenprodukt (Neu5Ac) quantifiziert werden. Die saure Lösemittelmischung bestand aus *n*-Butanol:Aceton:AcOH:H₂O = 35:35:7:23, die basische Lösemittelmischung bestand aus *n*-Propanol:H₂O:NH₃ (20 %_{aq.}) = 7:3:1. Nach Färbung mit Anisaldehyd wurde die quantitative Analyse mittels des *CAMAG TLC Scanner 4* bei 380 nm gegen SiaLac- und Neu5Ac-Standards durchgeführt. Die Daten wurden jeweils gegen Endpunktmessungen der NMR-Quantifizierung normalisiert. Der Versuch wurde als Duplikat durchgeführt (1. und 2. in der Tabelle)

1.	NE		C8 (A151D)		C7 (L387A)		G7 (S359T/S360T)		2x (A151D/L387A)	
	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %
Min										
10,00	9,36	2,99	14,43	0,57	7,18	1,31	2,65	3,91	1,29	0,71
45,00	16,87	2,40	22,64	2,85	14,79	3,30	6,89	2,25	1,66	2,87
120,00	27,85	2,33	31,73	2,10	25,57	2,73	19,57	2,38	4,53	1,66
240,00	50,38	7,97	55,82	5,52	44,94	6,89	39,48	4,75	7,34	5,57
360,00	70,76	6,18	73,50	3,58	65,20	3,91	68,11	3,66	15,71	2,57
1320,00	89,29	10,71	93,03	6,97	88,11	8,56	91,41	8,59	29,68	14,57

2.	NE		C8 (A151D)		C7 (L387A)		G7 (S359T/S360T)		2x (A151D/L387A)	
	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %
10,00	6,96	1,73	8,39	0,60	5,57	1,22	2,90	1,81	1,92	2,16
45,00	19,46	1,85	22,39	1,02	16,67	1,33	12,48	1,67	5,39	1,60
120,00	30,62	2,01	34,26	1,09	33,57	1,94	30,65	3,47	9,87	1,29
240,00	46,10	4,55	47,12	2,14	45,90	2,10	47,47	2,25	16,32	2,19
360,00	51,86	5,30	55,78	2,05	57,83	1,70	65,08	3,06	22,27	4,59
1320,00	89,08	10,92	93,95	6,05	91,27	6,49	93,71	9,76	39,73	11,26

Durchschnitt	NE		C8 (A151D)		C7 (L387A)		G7 (S359T/S360T)		2x (A151D/L387A)	
	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %
10,00	8,16	2,36	11,41	0,58	6,38	1,27	2,77	2,86	1,60	1,44
45,00	18,17	2,13	22,51	1,94	15,73	2,32	9,68	1,96	3,53	2,24
120,00	29,24	2,17	33,00	1,60	29,57	2,34	25,11	2,92	7,20	1,48
240,00	48,24	6,26	51,47	3,83	45,42	4,49	43,48	3,50	11,83	3,88
360,00	61,31	5,74	64,64	2,82	61,51	2,80	66,59	3,36	18,99	3,58
1320,00	89,19	10,81	93,49	6,51	89,69	7,53	92,56	9,18	34,70	12,92

Fehler	wt	C8 (A151D)		C7 (L387A)		G7 (S359T/S360T)		2x (A151D/L387A)		
		Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	Produkt %	Hydrolyse %	
10	1,20	0,63	3,02	0,02	0,81	0,04	0,12	1,05	0,32	0,72
45	1,29	0,27	0,13	0,91	0,94	0,98	2,80	0,29	1,86	0,64
120	1,39	0,16	1,26	0,51	4,00	0,40	5,54	0,54	2,67	0,19
240	2,14	1,71	4,35	1,69	0,48	2,40	4,00	1,25	4,49	1,69
360	9,45	0,44	8,86	0,76	3,68	1,11	1,52	0,30	3,28	1,01
1320	0,11	0,11	0,46	0,46	1,58	1,04	1,15	0,58	5,02	1,65

Fehler = Standardfehler des Mittelwerts

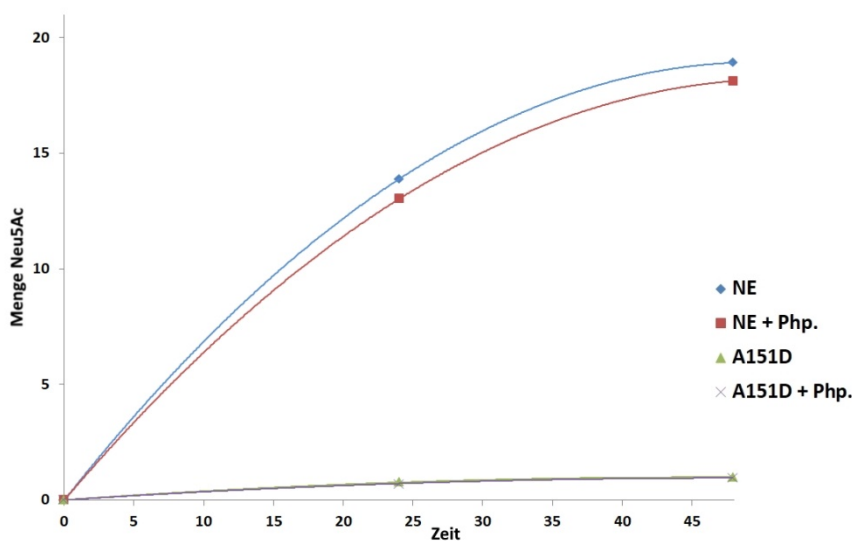
5.5.11. Versuche zu Kapitel 4.11 – *In situ*-NMR-Messungen

Die Reaktionsmischungen wurden in D₂O durchgeführt. Es wurden 14.9 mM α 2,3-SiaLac in 520 μ L Tris-Puffer (20 mM, pH 8.0) in D₂O direkt im NMR-Röhrchen mit jeweils 10 μ g nativem Enzym, A151D, L387A oder S359T/S360T für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden nach 18, 20, 22, 24, 42 und 48 Stunden *in situ* im 500 MHz ¹H-NMR vermessen. Die NMR Röhrchen wurden, bis auf die Zeit der Messung bei RT, bei 30 °C temperiert.

Im parallelen Kontrollexperiment wurden zusätzlich zur NMR-Probe von nativem Enzym und Variante A151D 21.3 U alkalische Phosphatase zugegeben, um Spuren von CMP zu eliminieren.

Die Produktion an Neu5Ac ist nahezu identisch zum Experiment ohne alkalische Phosphatase.

absolute Abweichung: NE: 0.86 % (24 h), 0.79 % (48 h)
 A151D: 0.06 % (24 h), 0.03 % (48 h)



6. Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren sind gemäß dem Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt.^[321]

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift	ESI	<i>Electron spray ionization</i>
AcOH	Essigsäure	et al.	(lat.) <i>et alii</i> oder <i>et aliae</i>
ADP	Adenosindiphosphat	FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting system</i>
AS	Aminosäure(n)		
ATP	Adenosintriphosphat	Fuc	Fucose
aq	<i>aqueous</i>	Gal	Galactose
ax	axial	GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
Bn	Benzyl	GBP	Glycan-bindende Proteine
c	Konzentration	GDP	Guanosindiphosphat
CAZy	<i>Carbohydrate-Active enZyme</i>	Glc	Glucose
Cbz	Benzoyloxycarbonyl	GlcA	Glucuronsäure
CDG	<i>Congenital disorders of glycosylation</i>	GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
CMAH	CMP-Neu5Ac-Hydroxylase	GT	Glycosyltransferase
CMP	Cytidinmonophosphat	h	Stunde(n)
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>	HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat
CPS	Kapselpolysaccharide	HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> (hier [¹ H/ ¹³ C]-HMBC)
CRS	<i>carbohydrate recognition domain</i>	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
CSS	CMP-Sialat-Synthetase	HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
CTP	Cytidintriphosphat	HPTLC	<i>High performance thin layer chromatography</i>
d	Dublett (NMR) oder Tag(e)	HR	<i>High resolution</i>
DC	Dünnschichtchromatographie	HSQC	<i>Heteronuclear single quantum Coherence</i> (hier [¹ H/ ¹³ C]-HSQC)
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexyl-carbodiimid	HTS	<i>High throughput Screening</i>
DCM	Dichlormethan	IdoA	Iduronsäure
DIPEA	Diisopropylethylamin	ITAM	immune receptor tyrosine-based activation motifs
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin	ITIM	immune receptor tyrosine-based inhibition motifs
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
DMSO	Dimethylsulfoxid	J	Kopplungskonstante (in Hz)
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin		
DOWEX	Ionenaustauscherharz		
dSTORM	<i>direct stochastic optical reconstruction microscopy</i>		
EC	<i>Enzyme Commission</i>		
EE	Essigsäureethylester		
eq	Äquivalente oder äquatorial		

6. Abkürzungsverzeichnis

k_{cat}	Wechselzahl	PP_a	anorganisches Pyrophosphat
KDN	3-deoxy-D- <i>glycero</i> -D- <i>galacto</i> -2-nonulosonsäure	PCR	Polymerase Kettenreaktion
KDO	3-Desoxy-D-manno-oct-2-ulonpyranosonsäure	PDB	Proteindatenbank(en)
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	PDC	Pyridiniumdichromat
konz.	konzentriert/e	PEG	Polyethylenglycol
Lac	Lactose	PEP	Phosphoenolpyruvat
Leg	Legionaminsäure	ppm	parts per million
Lit.	Literatur	Pse	Pseudaminsäure
LPS	Lipopolysaccharide	q	Quartett (NMR)
Lsg.	Lösung	quant.	Quantitative
M	Molarität (in mol/L)	Ref	Referenz
m	Multiplett (NMR)	R_f	Retentionsfaktor
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein	RT	Raumtemperatur
Man	Mannose	s	Singulett (NMR)
MeOH	Methanol	SET	<i>single electron transfer</i>
min	Minute(n)	Sia	Sialinsäure(n)
MS	Massenspektrometrie	SiaT	Sialyltransferase(n)
NAD(P)	Nicotinamidadenindinukleotid (phosphat)	pph	<i>Photobacterium phosphoreum</i>
nanoDSF	<i>nanoscale differential scanning fluorimetry</i>	Siglecs	<i>Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins</i>
NE	natives Enzyme	t	Triplett (NMR)
Neu	Neuraminsäure	tBuOH	<i>tert</i> -Butanol
NeuA	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Aldolase	TEA	Triethanolamin
NeuS	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure-Synthase	THF	Tetrahydrofuran
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure	T_m	Schmelzpunkt
Neu5Gc	<i>N</i> -Glycolylneuraminsäure	TMS	Trimethylsilyl
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>	TMSI	Trimethylsilyliodid
NOESY	<i>Nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i> (hier [$^1\text{H}/^1\text{H}$]-NOESY)	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
OD	optische Dichte	UDP	Uridindiphosphat
P_a	anorganisches Phosphat	UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Licht
		UV	Ultraviolet
		wt	Wildtyp
		Xyl	Xylose
		δ	Chemische Verschiebung (in ppm)

7. Literaturverzeichnis

- [1] D. B. B. Alberts, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie* **2012**, 4. Aufl., 6-10.
- [2] A. J. B. Alberts, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle* **2011**, 5. Aufl., 653-693.
- [3] A. J. B. Alberts, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle* **2011**, 5. Aufl., 695-698.
- [4] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97-130.
- [5] T. W. Rademacher, R. B. Parekh, R. A. Dwek, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 785-838.
- [6] A. P. Davis, R. S. Wareham, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2978-2996.
- [7] S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 41527-41542.
- [8] D. Chappell, M. Jacob, B. F. Becker, K. Hofmann-Kiefer, P. Conzen, M. Rehm, *Anaesthesist* **2008**, 57, 959-969.
- [9] M. D. Mager, V. LaPointe, M. M. Stevens, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 582-589.
- [10] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 16793-16797.
- [11] S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, C. R. Bertozzi, *Science* **2008**, 320, 664-667.
- [12] L. Möckl, K. Pedram, A. R. Roy, V. Krishnan, A.-K. Gustavsson, O. Dorigo, C. R. Bertozzi, W. E. Moerner, *Dev. Cell* **2019**, 50, 57-72.e56.
- [13] P. Mateos-Gil, S. Letschert, S. Doose, M. Sauer, *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, 4, 1-16.
- [14] A. Mertsch, *Diplomarbeit, JMU Würzburg* **2013**.
- [15] M. Sauer, <https://ibidi.com/content/222-super-resolution-microscopy> (aufgerufen am 11.03.2020), (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik, Universität Würzburg).
- [16] A. D. McNaught, *Pure Appl. Chem.* **1996**, 68, 1919-2008.
- [17] C. R. Bertozzi, D. Rabuka, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 23-36.
- [18] A. Varki, N. Sharon, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 1-22.
- [19] A. Adibekian, P. Stallforth, M.-L. Hecht, D. B. Werz, P. Gagneux, P. H. Seeberger, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 337-344.
- [20] P. Stanley, H. Schachter, N. Taniguchi, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 101-114.
- [21] M. M. Fuster, J. D. Esko, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 526-542.
- [22] I. Brockhausen, H. Schachter, P. Stanley, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 115-128.
- [23] A. Ceroni, K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, A. Dell, S. M. Haslam, *J. Proteome. Res.* **2008**, 7, 1650-1659.
- [24] H. H. Freeze, H. Schachter, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 585-600.
- [25] H. H. Freeze, *Nat. Rev. Genet.* **2006**, 7, 537-551.
- [26] J. Jaeken, G. Matthijs, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2007**, 8, 261-278.
- [27] M. Kanagawa, T. Toda, *J. Hum. Genet.* **2006**, 51, 915-926.

- [28] S. Hakomori, Y. Igarashi, *J. Biochem.* **1995**, *118*, 1091-1103.
- [29] A. Rebbaa, J. Hurh, H. Yamamoto, D. S. Kersey, E. G. Bremer, *Glycobiology* **1996**, *6*, 399-406.
- [30] R. L. Schnaar, A. Suzuki, P. Stanley, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 129-142.
- [31] S. Sonnino, L. Mauri, V. Chigorno, A. Prinetti, *Glycobiology* **2006**, *17*, 1R-13R.
- [32] L. Svennerholm, *J. Lipid. Res.* **1964**, *5*, 145-155.
- [33] R. B. Chan, A. J. Perotte, B. Zhou, C. Liong, E. J. Shorr, K. S. Marder, U. J. Kang, C. H. Waters, O. A. Levy, Y. Xu, H. B. Shim, I. Pe'er, G. Di Paolo, R. N. Alcalay, *PloS one* **2017**, *12*, e0172348-e0172348.
- [34] C. Zheng, R. Huang, T. Bavaro, M. Terreni, M. Sollogoub, J. Xu, Y. Zhang, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *189*, 112065.
- [35] R. Indellicato, R. Parini, R. Domenighini, N. Malagolini, M. Iascone, S. Gasperini, N. Masera, F. dall'Olio, M. Trinchera, *Glycobiology* **2019**, *29*, 229-241.
- [36] J. S. Schneider, D. P. Roeltgen, E. L. Mancall, J. Chapas-Crilly, D. S. Rothblat, G. T. Tatarian, *Neurology* **1998**, *50*, 1630-1636.
- [37] T. J. Silhavy, D. Kahne, S. Walker, *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **2010**, *2*, a000414.
- [38] V. N. Tra, D. H. Dube, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4659-4673.
- [39] W. Vollmer, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 287-306.
- [40] S. Berg, D. Kaur, M. Jackson, P. J. Brennan, *Glycobiology* **2007**, *17*, 35-56R.
- [41] J. Eichler, M. W. Adams, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, *69*, 393-425.
- [42] M. Wacker, D. Linton, P. G. Hitchen, M. Nita-Lazar, S. M. Haslam, S. J. North, M. Panico, H. R. Morris, A. Dell, B. W. Wren, M. Aebi, *Science* **2002**, *298*, 1790-1793.
- [43] I. Benz, M. A. Schmidt, *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 267-276.
- [44] D. J. Vigerust, V. L. Shepherd, *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 211-218.
- [45] Y. Li, B. Cleveland, I. Klots, B. Travis, B. A. Richardson, D. Anderson, D. Montefiori, P. Polacino, S. L. Hu, *J. Virol.* **2008**, *82*, 638-651.
- [46] D. F. Smith, R. D. Cummings, *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *7*, 79-87.
- [47] H. Dinh, X. Zhang, J. Sweeney, Y. Yang, Y. He, A. Dhawane, S. S. Iyer, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 8238-8244.
- [48] M. L. Colgrave, H. J. Snelling, B. J. Shiell, Y. R. Feng, Y. P. Chan, K. N. Bossart, K. Xu, D. B. Nikolov, C. C. Broder, W. P. Michalski, *Glycobiology* **2012**, *22*, 572-584.
- [49] I. Bucior, M. M. Burger, *Glycoconj. J.* **2004**, *21*, 111-123.
- [50] J. M. de la Fuente, S. Penades, *Glycoconj. J.* **2004**, *21*, 149-163.
- [51] S. Hakomori, *Glycoconj. J.* **2004**, *21*, 125-137.
- [52] V. Lakhtin, M. Lakhtin, V. Alyoshkin, *Anaerobe* **2011**, *17*, 452-455.
- [53] D. C. Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1572*, 187-197.
- [54] H. Ghazarian, B. Itoni, S. B. Oppenheimer, *Acta Histochem.* **2011**, *113*, 236-247.
- [55] N. Sharon, H. Lis, *Glycobiology* **2004**, *14*, 53R-62R.
- [56] S. C. Purcell, K. Godula, *Interface Focus* **2019**, *9*, 20180080.
- [57] A. Varki, *Nature* **2007**, *446*, 1023-1029.
- [58] G. Blix, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1936**, *240*, 43.
- [59] E. Klenk, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1941**, *268*, 50.
- [60] A. Varki, *Glycobiology* **1992**, *2*, 25-40.
- [61] R. Schauer, *Glycoconj. J.* **2000**, *17*, 485-499.
- [62] T. Angata, A. Varki, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439-469.
- [63] L. Deng, X. Chen, A. Varki, *Biopolymers* **2013**, *99*, 650-665.
- [64] A. Varki, R. Schauer, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 199-218.
- [65] A. Varki, *Biochimie* **2001**, *83*, 615-622.

- [66] H. H. Chou, H. Takematsu, S. Diaz, J. Iber, E. Nickerson, K. L. Wright, E. A. Muchmore, D. L. Nelson, S. T. Warren, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11751-11756.
- [67] A. Varki, *Am. J. Phys. Anthropol.* **2001**, *116*, 54-69.
- [68] G. Marquina, H. Waki, L. E. Fernandez, K. Kon, A. Carr, O. Valiente, R. Perez, S. Ando, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 5165-5171.
- [69] D. Nadano, M. Iwasaki, S. Endo, K. Kitajima, S. Inoue, Y. Inoue, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11550-11557.
- [70] S. Inoue, K. Kitajima, C. Sato, S. Go, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *705*, 669-678.
- [71] S. Inoue, K. Kitajima, Y. Inoue, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 24341-24344.
- [72] T. Angata, D. Nakata, T. Matsuda, K. Kitajima, F. A. Troy, 2nd, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 22949-22956.
- [73] R. Schauer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1982**, *40*, 131-234.
- [74] A. K. Shukla, C. Schroder, U. Nohle, R. Schauer, *Carbohydr. Res.* **1987**, *168*, 199-209.
- [75] J. P. Zanetta, A. Pons, M. Iwersen, C. Mariller, Y. Leroy, P. Timmerman, R. Schauer, *Glycobiology* **2001**, *11*, 663-676.
- [76] S. Tsuji, A. K. Datta, J. C. Paulson, *Glycobiology* **1996**, *6*, v-vii.
- [77] J. F. Vliegthart, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1980**, *125*, 77-91.
- [78] U. Dabrowski, H. Friebolin, R. Brossmer, M. Supp, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4637-4640.
- [79] H. Friebolin, M. Supp, R. Brossmer, G. Keilich, D. Ziegler, *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 200-201.
- [80] E. V. Vinogradov, N. A. Paramonov, Y. A. Knirel, A. S. Shashkov, N. K. Kochetkov, *Carbohydr. Res.* **1993**, *242*, C11-14.
- [81] A. M. Gil-Serrano, M. A. Rodriguez-Carvajal, P. Tejero-Mateo, J. L. Espartero, J. Thomas-Oates, J. E. Ruiz-Sainz, A. M. Buendia-Claveria, *Biochem. J.* **1998**, *334* (Pt 3), 585-594.
- [82] A. Varki, M. E. Etzler, R. D. Cummings, J. D. Esko, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 375-386.
- [83] M. P. Deninno, *Synthesis* **1991**, *1991*, 583-593.
- [84] R. Schauer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 507-514.
- [85] M. E. Tanner, *Bioorg. Chem.* **2005**, *33*, 216-228.
- [86] R. S. Blacklow, L. Warren, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3520-3526.
- [87] J. Gunawan, D. Simard, M. Gilbert, A. L. Lovering, W. W. Wakarchuk, M. E. Tanner, N. C. Strynadka, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 3555-3563.
- [88] P. W. Annunziato, L. F. Wright, W. F. Vann, R. P. Silver, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 312-319.
- [89] A. S. Murkin, W. K. Chou, W. W. Wakarchuk, M. E. Tanner, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14290-14298.
- [90] W. F. Vann, D. A. Daines, A. S. Murkin, M. E. Tanner, D. O. Chaffin, C. E. Rubens, J. Vionnet, R. P. Silver, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 706-712.
- [91] D. G. Comb, S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 2529-2537.
- [92] M. J. Kim, W. J. Hennen, H. M. Sweers, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6481-6486.
- [93] G. H. DeVries, S. B. Binkley, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *151*, 234-242.
- [94] G. G. Lilley, M. von Itzstein, N. Ivancic, *Protein Expr. Purif.* **1992**, *3*, 434-440.
- [95] Y. Li, H. Yu, H. Cao, K. Lau, S. Muthana, V. K. Tiwari, B. Son, X. Chen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 963-970.
- [96] M. Mahmoudian, D. Noble, C. S. Drake, R. F. Middleton, D. S. Montgomery, J. E. Piercey, D. Ramlakhan, M. Todd, M. J. Dawson, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *20*, 393-400.

- [97] M. J. Kiefelt, J. C. Wilson, S. Bennett, M. Gredley, M. von Itzstein, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 657-664.
- [98] C. H. Lin, T. Sugai, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10138-10145.
- [99] L. Warren, R. S. Blacklow, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3527-3534.
- [100] A. K. Munster-Kuhnel, J. Tiralongo, S. Krapp, B. Weinhold, V. Ritz-Sedlacek, U. Jacob, R. Gerardy-Schahn, *Glycobiology* **2004**, *14*, 43R-51R.
- [101] S. Krapp, A. K. Munster-Kuhnel, J. T. Kaiser, R. Huber, J. Tiralongo, R. Gerardy-Schahn, U. Jacob, *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 625-637.
- [102] I. G. Bravo, S. Garcia-Vallve, A. Romeu, A. Reglero, *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 120-128.
- [103] N. M. Samuels, B. W. Gibson, S. M. Miller, *Biochemistry* **1999**, *38*, 6195-6203.
- [104] M. G. Ambrose, S. J. Freese, M. S. Reinhold, T. G. Warner, W. F. Vann, *Biochemistry* **1992**, *31*, 775-780.
- [105] R. M. Mizanur, N. L. Pohl, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *80*, 757-765.
- [106] W. F. Vann, R. P. Silver, C. Abeijon, K. Chang, W. Aaronson, A. Sutton, C. W. Finn, W. Lindner, M. Kotsatos, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17556-17562.
- [107] R. F. Haft, M. R. Wessels, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 7372-7374.
- [108] M. V. Tullius, R. S. Munson, Jr., J. Wang, B. W. Gibson, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15373-15380.
- [109] I. G. Bravo, S. Barrallo, M. A. Ferrero, L. B. Rodriguez-Aparicio, H. Martinez-Blanco, A. Reglero, *Biochem. J.* **2001**, *358*, 585-598.
- [110] H. Kajiwara, T. Mine, T. Miyazaki, T. Yamamoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 47-53.
- [111] R. M. Mizanur, N. L. Pohl, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 827-834.
- [112] H. Yu, H. Yu, R. Karpel, X. Chen, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 6427-6435.
- [113] M. Knorst, W.-D. Fessner, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 698-710.
- [114] N. He, D. Yi, W.-D. Fessner, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2384-2398.
- [115] W. D. Fessner, N. He, D. Yi, P. Unruh, M. Knorst, in *Cascade Biocatal.*, **2014**, pp. 361-392.
- [116] D. Yi, N. He, M. Kickstein, J. Metzner, M. Weiß, A. Berry, W.-D. Fessner, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 3597-3612.
- [117] A. Harduin-Lepers, *Glycobiology Insights* **2010**, *2*.
- [118] C. Unverzagt, H. Kunz, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9308-9309.
- [119] 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*, 3901-3910.
- [120] P. M. Coutinho, E. Deleury, G. J. Davies, B. Henrissat, *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 307-317.
- [121] M. Audry, C. Jeanneau, A. Imberty, A. Harduin-Lepers, P. Delannoy, C. Breton, *Glycobiology* **2011**, *21*, 716-726.
- [122] H. Kajiwara, T. Mine, T. Yamamoto, *J. Appl. Glycosci.* **2009**, *56*, 77-82.
- [123] T. Yamamoto, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2781-2794.
- [124] G. J. Shen, A. K. Datta, M. Izumi, K. M. Koeller, C. H. Wong, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35139-35146.
- [125] S. M. Steenbergen, E. R. Vimr, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 15349-15359.
- [126] F. Freiburger, H. Claus, A. Gunzel, I. Oltmann-Norden, J. Vionnet, M. Muhlenhoff, U. Vogel, W. F. Vann, R. Gerardy-Schahn, K. Stummeyer, *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*, 1258-1275.
- [127] M. Gilbert, J. R. Brisson, M. F. Karwaski, J. Michniewicz, A. M. Cunningham, Y. Wu, N. M. Young, W. W. Wakarchuk, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 3896-3906.

- [128] D. W. Hood, A. D. Cox, M. Gilbert, K. Makepeace, S. Walsh, M. E. Deadman, A. Cody, A. Martin, M. Mansson, E. K. Schweda, J. R. Brisson, J. C. Richards, E. R. Moxon, W. W. Wakarchuk, *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 341-350.
- [129] M. Gilbert, D. C. Watson, A. M. Cunningham, M. P. Jennings, N. M. Young, W. W. Wakarchuk, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28271-28276.
- [130] T. Yamamoto, M. Nakashizuka, I. Terada, *J. Biochem.* **1998**, *123*, 94-100.
- [131] T. Yamamoto, Y. Hamada, M. Ichikawa, H. Kajiwara, T. Mine, H. Tsukamoto, Y. Takakura, *Glycobiology* **2007**, *17*, 1167-1174.
- [132] H. Yu, H. Chokhawala, R. Karpel, H. Yu, B. Wu, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Jia, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17618-17619.
- [133] H. Tsukamoto, Y. Takakura, T. Yamamoto, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 29794-29802.
- [134] K. Mehr, S. G. Withers, *Glycobiology* **2016**, *26*, 353-359.
- [135] J. Cheng, H. Yu, K. Lau, S. Huang, H. A. Chokhawala, Y. Li, V. K. Tiwari, X. Chen, *Glycobiology* **2008**, *18*, 686-697.
- [136] H. A. Chokhawala, H. Yu, X. Chen, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 194-201.
- [137] H. Shengshu, Y. Hai, C. Xi, *Sci. China Chem.* **2011**, *54*, 117-128.
- [138] S. J. Danishefsky, M. P. DeNinno, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2615-2617.
- [139] M. P. DeNinno, S. J. Danishefsky, G. Schulte, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3925-3929.
- [140] T.-H. Chan, M.-C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *60*, 4228-4232.
- [141] M. Warwel, W.-D. Fessner, *Synlett* **2002**, *2002*, 2104-2106.
- [142] M. Warwel, W.-D. Fessner, *Synlett* **2000**, *2000*, 865-867.
- [143] A. Dondoni, A. Marra, P. Merino, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3324-3336.
- [144] A. Dondoni, A. Marra, A. Boscarato, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 3562-3572.
- [145] S. D. Burke, G. M. Sametz, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 71-74.
- [146] S. D. Burke, E. A. Voight, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 237-240.
- [147] M. von Itzstein, W. Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. Van Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, et al., *Nature* **1993**, *363*, 418-423.
- [148] M. J. Kiefel, M. von Itzstein, *Prog. Med. Chem.* **1999**, *36*, 1-28.
- [149] K.-G. Liu, S. Yan, Y.-L. Wu, Z.-J. Yao, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2269-2272.
- [150] C. U. Kim, W. Lew, M. A. Williams, H. Liu, L. Zhang, S. Swaminathan, N. Bischofberger, M. S. Chen, D. B. Mendel, C. Y. Tai, W. G. Laver, R. C. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 681-690.
- [151] C. U. Kim, W. Lew, M. A. Williams, H. Wu, L. Zhang, X. Chen, P. A. Escarpe, D. B. Mendel, W. G. Laver, R. C. Stevens, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2451-2460.
- [152] K. McClellan, C. M. Perry, *Drugs* **2001**, *61*, 263-283.
- [153] T. Woodhall, G. Williams, A. Berry, A. Nelson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 2109-2112.
- [154] J. C. Manning, A. Romero, F. A. Habermann, G. Garcia Caballero, H. Kaltner, H. J. Gabius, *Histochem. Cell. Biol.* **2017**, *147*, 199-222.
- [155] C. A. Mitchell, K. Ramessar, B. R. O'Keefe, *Antiviral Res.* **2017**, *142*, 37-54.
- [156] A. Barre, Y. Bourne, E. J. M. Van Damme, P. Rouge, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 254.
- [157] G. Csaba, *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **2016**, *63*, 279-291.
- [158] R. Xu, R. McBride, C. M. Nycholat, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *J. Virol.* **2012**, *86*, 982-990.
- [159] J. Stevens, O. Blixt, L. M. Chen, R. O. Donis, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2008**, *381*, 1382-1394.
- [160] J. Stevens, O. Blixt, L. Glaser, J. K. Taubenberger, P. Palese, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 1143-1155.
- [161] J. Stevens, O. Blixt, J. C. Paulson, I. A. Wilson, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 857-864.

- [162] R. D. Cummings, M. E. Etzler, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M.E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 403-414.
- [163] M. E. Etzler, A. Surolia, R. D. Cummings, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 415-423.
- [164] A. Varki, S. Kornfeld, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 425-438.
- [165] N. M. Dahms, M. K. Hancock, *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1572*, 317-340.
- [166] R. D. Cummings, R. P. McEver, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 439-458.
- [167] A. Varki, R. P. Crocker, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M.E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 459-474.
- [168] R. D. Cummings, F.-T. Liu, in *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. (Eds.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. Bertozzi, G. W. Hart, M.E. Etzler), Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor (NY), **2009**, pp. 475-488.
- [169] A. A. Manfredi, P. Rovere-Querini, B. Bottazzi, C. Garlanda, A. Mantovani, *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20*, 538-544.
- [170] R. W. Loveless, G. Floyd-O'Sullivan, J. G. Raynes, C. T. Yuen, T. Feizi, *EMBO J.* **1992**, *11*, 813-819.
- [171] G. R. Vasta, L. M. Amzel, M. A. Bianchet, M. Cammarata, C. Feng, K. Saito, *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1-18.
- [172] K. F. Bornhöff, T. Goldammer, A. Rebl, S. P. Galuska, *Dev. Comp. Immunol.* **2018**, *86*, 219-231.
- [173] C. D. Rillahan, M. S. Macauley, E. Schwartz, Y. He, R. McBride, B. M. Arlian, J. Rangarajan, V. V. Fokin, J. C. Paulson, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2398-2406.
- [174] H. Läubli, A. Varki, *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 593-605.
- [175] C. D. Rillahan, E. Schwartz, R. McBride, V. V. Fokin, J. C. Paulson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 11014-11018.
- [176] N. R. Zaccai, K. Maenaka, T. Maenaka, P. R. Crocker, R. Brossmer, S. Kelm, E. Y. Jones, *Structure* **2003**, *11*, 557-567.
- [177] S. Kelm, P. Madge, T. Islam, R. Bennett, H. Koliwer-Brandl, M. Waespy, M. von Itzstein, T. Haselhorst, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 3616-3620.
- [178] C. S. Landig, A. Hazel, B. P. Kellman, J. J. Fong, F. Schwarz, S. Agarwal, N. Varki, P. Massari, N. E. Lewis, S. Ram, A. Varki, *Evol. Appl.* **2019**, *12*, 337-349.
- [179] B. E. Collins, O. Blixt, S. Han, B. Duong, H. Li, J. K. Nathan, N. Bovin, J. C. Paulson, *J. Immunol.* **2006**, *177*, 2994-3003.
- [180] K. Hosoguchi, T. Maeda, J. Furukawa, Y. Shinohara, H. Hinou, M. Sekiguchi, H. Togame, H. Takemoto, H. Kondo, S. Nishimura, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5607-5619.
- [181] Z. Khedri, A. Xiao, H. Yu, C. S. Landig, W. Li, S. Diaz, B. R. Wasik, C. R. Parrish, L. P. Wang, A. Varki, X. Chen, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 214-224.
- [182] O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt, W. Reutter, *Glycobiology* **2001**, *11*, 11R-18R.
- [183] C. Bourlieu, T. Astruc, S. Barbe, J. G. Berrin, E. Bonnin, R. Boutrou, V. Hugouvieux, S. Le Feunteun, G. Paes, *Biotechnol. Adv.* **2020**, 107546.

- [184] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258-268.
- [185] N. J. Turner, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 474-478.
- [186] C. Li, R. Zhang, J. Wang, L. M. Wilson, Y. Yan, *Trends Biotechnol.* **2020**, 1-16.
- [187] J. D. Sutherland, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 263-269.
- [188] H. Zhao, K. Chockalingam, Z. Chen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *13*, 104-110.
- [189] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1992**, *2*, 28-33.
- [190] L. Pritchard, D. Corne, D. Kell, J. Rowland, M. Winson, *J. Theor. Biol.* **2005**, *234*, 497-509.
- [191] J. N. Copp, P. Hanson-Manful, D. F. Ackerley, W. M. Patrick, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1179*, 3-22.
- [192] S. Lutz, W. M. Patrick, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *15*, 291-297.
- [193] C. Neylon, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1448-1459.
- [194] M. S. Packer, D. R. Liu, *Nat. Rev. Genet.* **2015**, *16*, 379-394.
- [195] I. V. Korendovych, *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1685*, 15-23.
- [196] B. Chowdhury, G. Garai, *Genomics* **2017**, *109*, 419-431.
- [197] A. Pavelka, E. Chovancova, J. Damborsky, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W376-383.
- [198] L. Sumbalova, J. Stourac, T. Martinek, D. Bednar, J. Damborsky, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W356-W362.
- [199] R. K. Kuipers, H. J. Joosten, W. J. van Berkel, N. G. Leferink, E. Rooijen, E. Ittmann, F. van Zimmeren, H. Jochens, U. Bornscheuer, G. Vriend, V. A. dos Santos, P. J. Schaap, *Proteins* **2010**, *78*, 2101-2113.
- [200] E. Chovancova, A. Pavelka, P. Benes, O. Strnad, J. Brezovsky, B. Kozlikova, A. Gora, V. Sustr, M. Klvana, P. Medek, L. Biedermannova, J. Sochor, J. Damborsky, *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002708.
- [201] H. Land, M. S. Humble, *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1685*, 43-67.
- [202] E. Krieger, G. Vriend, *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2981-2982.
- [203] S. A. Adcock, J. A. McCammon, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1589-1615.
- [204] M. C. Childers, V. Daggett, *Mol. Syst. Des. Eng.* **2017**, *2*, 9-33.
- [205] G. Kiss, N. Celebi-Olcum, R. Moretti, D. Baker, K. N. Houk, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 5700-5725.
- [206] Y. Liu, B. Kuhlman, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W235-238.
- [207] H. Leemhuis, R. M. Kelly, L. Dijkhuizen, *IUBMB Life* **2009**, *61*, 222-228.
- [208] L. Ye, C. Yang, H. Yu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 559-567.
- [209] S. Kelm, R. Schauer, *Int. Rev. Cytol.* **1997**, *175*, 137-240.
- [210] R. E. Mandrell, M. A. Apicella, *Immunobiology* **1993**, *187*, 382-402.
- [211] A. Varki, *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 351-360.
- [212] O. Blixt, S. Han, L. Liao, Y. Zeng, J. Hoffmann, S. Futakawa, J. C. Paulson, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6680-6681.
- [213] C. Bayon, N. He, M. Deir-Kaspar, P. Blasco, S. Andre, H. J. Gabius, A. Rumero, J. Jimenez-Barbero, W. D. Fessner, M. J. Hernaiz, *Chemistry* **2017**, *23*, 1623-1633.
- [214] C.-C. Yu, S. G. Withers, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1633-1654.
- [215] G. J. Boons, A. V. Demchenko, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4539-4566.
- [216] M. Izumi, G. J. Shen, S. Wacowich-Sgarbi, T. Nakatani, O. Plettenburg, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10909-10918.
- [217] G. Pazynina, V. Nasonov, I. Belyanchikov, R. Brossmer, M. Maisel, A. Tuzikov, N. Bovin, *Int. J. Carbohydr. Chem.* **2012**, 594247.
- [218] X. Chen, A. Varki, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 163-176.
- [219] Y. A. Knirel, A. S. Shashkov, Y. E. Tsvetkov, P. E. Jansson, U. Zahringer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2003**, *58*, 371-417.
- [220] A. L. Lewis, N. Desa, E. E. Hansen, Y. A. Knirel, J. I. Gordon, P. Gagneux, V. Nizet, A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13552-13557.

- [221] M. von Itzstein, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 967-974.
- [222] O. Blixt, J. C. Paulson, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 687-690.
- [223] P. A. Veronesi, P. E. A. Rodriguez, E. Pescechera, S. L. Veronesi, WO 2008/090151 A1, **2008**.
- [224] B. Sklarz, *Q. Rev., Chem. Soc.* **1967**, *21*, 3-28.
- [225] N. He, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, **2012**.
- [226] E. Frankland, *Ann.* **1849**, *71*, 171.
- [227] S. Reformatsky, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, *20*, 1210-1211.
- [228] P. Barbier, *Compt. Rend.* **1899**, *128*, 110.
- [229] V. Grignard, *Compt. Rend.* **1890**, *130*, 1322-1324.
- [230] H. Gilman, *Org. Chemistry, an advanced treatise*, New York: Chapman & Hall, **1949**.
- [231] C.-J. Li, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5643-5668.
- [232] T. A. Killinger, N. A. Boughton, T. A. Runge, J. Wolinsky, *J. Organomet. Chem.* **1977**, *124*, 131-134.
- [233] P. Cintas, G. Palmisano, G. Cravotto, *Ultrason. Sonochem.* **2011**, *18*, 836-841.
- [234] C. J. Li, T. H. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7017-7020.
- [235] A. J. Bard, R. Parsons, J. Jordan, *Standard potentials in aqueous solution*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, United States, **1985**.
- [236] E. Kim, D. M. Gordon, W. Schmid, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5500-5507.
- [237] T. H. Chan, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 919-924.
- [238] T. D. Haddad, L. C. Hirayama, B. Singaram, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 642-649.
- [239] T. D. Haddad, L. C. Hirayama, J. J. Buckley, B. Singaram, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 889-898.
- [240] Y. Canac, E. Levoirier, A. Lubineau, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3206-3210.
- [241] T.-H. Chan, M.-C. Lee, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4228-4232.
- [242] T.-H. Chan, C.-J. Li, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 747-748.
- [243] D. M. Gordon, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7937-7938.
- [244] J. Gao, R. Haerter, D. M. Gordon, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3714-3715.
- [245] L. A. Paquette, G. D. Bennett, M. B. Isaac, A. Chhatriwalla, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1836-1845.
- [246] T. D. Haddad, L. C. Hirayama, B. Singaram, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 642-649.
- [247] H. B. Buergi, J. D. Dunitz, *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 153-161.
- [248] L. A. Paquette, P. C. Lobben, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5604-5616.
- [249] L. A. Paquette, T. M. Mitzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1931-1937.
- [250] D. J. Cram, F. A. A. Elhafez, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 5828-5835.
- [251] M. Chérest, H. Felkin, N. Prudent, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 2199-2204.
- [252] W. J. Bowyer, B. Singaram, A. M. Sessler, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7449-7460.
- [253] K. Koszinowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6032-6040.
- [254] Y. Gao, X. Wang, L. Sun, L. Xie, X. Xu, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3991-3998.
- [255] A. S. Leppanen, O. Niittymaki, K. Parikka, M. Tenkanen, P. Eklund, R. Sjöholm, S. Willfor, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 2610-2615.
- [256] E. Levoirier, Y. Canac, S. Norsikian, A. Lubineau, *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2737-2747.
- [257] I. Bosque, E. Bagdatli, F. Foubelo, J. C. Gonzalez-Gomez, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1796-1804.
- [258] T. Masao, K. Nobuhito, M. Nobuo, *Chem. Lett.* **1996**, *25*, 1091-1092.
- [259] S. Quosdorf, A. Schuetz, H. Kolodziej, *Molecules* **2017**, *22*, 1-18.
- [260] A. Morere, F. Mouffouk, A. Jeanjean, A. Leydet, J. L. Montero, *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 2409-2412.

- [261] R. Colombo, M. Anastasia, P. Rota, P. Allevi, *Chem. Comm.* **2008**, 5517-5519.
- [262] P. Allevi, P. Rota, R. Scaringi, R. Colombo, M. Anastasia, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 5542-5548.
- [263] A. Xiao, T. J. Slack, Y. Li, D. Shi, H. Yu, W. Li, Y. Liu, X. Chen, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 10798-10804.
- [264] W. Li, T. Ghosh, Y. Bai, A. Santra, A. Xiao, X. Chen, *Carbohydr. Res.* **2019**, *479*, 41-47.
- [265] H. J. M. Gijzen, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8422-8423.
- [266] I. M. Morrison, M. B. Perry, *Can. J. Biochem.* **1966**, *44*, 1115-1126.
- [267] L. A. Carpino, H. Imazumi, B. M. Foxman, M. J. Vela, P. Henklein, A. El-Faham, J. Klose, M. Bienert, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2253-2256.
- [268] G. J. Williams, T. Woodhall, A. Nelson, A. Berry, *Protein Eng. Des. Sel.* **2005**, *18*, 239-246.
- [269] A. Kinnell, T. Harman, M. Bingham, A. Berry, A. Nelson, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7719-7722.
- [270] H. Prescher, A. Schweizer, E. Kuhfeldt, L. Nitschke, R. Brossmer, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1444-1450.
- [271] A. M. Dechert-Schmitt, D. C. Schmitt, M. J. Krische, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 3195-3198.
- [272] R. Willand-Charnley, T. J. Fisher, B. M. Johnson, P. H. Dussault, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2242-2245.
- [273] L. Emmanuvel, T. M. Shaikh, A. Sudalai, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5071-5074.
- [274] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768-2771.
- [275] K. Abiraj, D. C. Gowda, *J. Chem. Res.* **2003**, 332-334.
- [276] T. Tsuchiya, M. Nakano, T. Torii, Y. Suzuki, S. Umezawa, *Carbohydr. Res.* **1985**, *136*, 195-206.
- [277] M. Kouhkan, B. Zeynizadeh, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 3323-3326.
- [278] S. C. Mosimann, M. Gilbert, D. Dombrowski, R. To, W. Wakarchuk, N. C. Strynadka, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8190-8196.
- [279] L. E. Horsfall, A. Nelson, A. Berry, *FEBS J.* **2010**, *277*, 2779-2790.
- [280] D. C. Watson, S. Leclerc, W. W. Wakarchuk, N. M. Young, *Glycobiology* **2011**, *21*, 99-108.
- [281] M. Potier, L. Marnett, M. Belisle, L. Dallaire, S. B. Melancon, *Anal. Biochem.* **1979**, *94*, 287-296.
- [282] K. E. Achyuthan, A. M. Achyuthan, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *129*, 29-64.
- [283] Z. Khedri, M. M. Muthana, Y. Li, S. M. Muthana, H. Yu, H. Cao, X. Chen, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3357-3359.
- [284] T. Iwatani, N. Okino, M. Sakakura, H. Kajiwara, Y. Takakura, M. Kimura, M. Ito, T. Yamamoto, Y. Kakuta, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 2083-2087.
- [285] D. Yi, Dissertation, Technische Universität Darmstadt, **2012**.
- [286] G. Sugiarto, K. Lau, J. Qu, Y. Li, S. Lim, S. Mu, J. B. Ames, A. J. Fisher, X. Chen, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1232-1240.
- [287] I. Nagashima, T. Mine, T. Yamamoto, H. Shimizu, *Carbohydr. Res.* **2012**, *358*, 31-36.
- [288] J.-Y. Kang, S.-J. Lim, O. Kwon, S.-G. Lee, H. H. Kim, D.-B. Oh, *PLoS One* **2015**, *10*, e0133739/0133731-e0133739/0133714.
- [289] H. Kajiwara, S. Katayama, Y. Kakuta, N. Okino, M. Ito, T. Mine, T. Yamamoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 1639-1644.
- [290] K. Schmoelzer, C. Luley-Goedl, T. Czabany, D. Ribitsch, H. Schwab, H. Weber, B. Nidetzky, *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 2978-2984.
- [291] K. Schmoelzer, M. Eibinger, B. Nidetzky, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1544-1550.

- [292] J. Cheng, S. Huang, H. Yu, Y. Li, K. Lau, X. Chen, *Glycobiology* **2010**, *20*, 260-268.
- [293] T. Mine, S. Katayama, H. Kajiwara, M. Tsunashima, H. Tsukamoto, Y. Takakura, T. Yamamoto, *Glycobiology* **2010**, *20*, 158-165.
- [294] K. Schmoelzer, D. Ribitsch, T. Czabany, C. Luley-Goedl, D. Kokot, A. Lyskowski, S. Zitzenbacher, H. Schwab, B. Nidetzky, *Glycobiology* **2013**, *23*, 1293-1304.
- [295] Y. Guo, C. Jers, A. S. Meyer, A. Arnous, H. Li, F. Kirpekar, J. D. Mikkelsen, *J. Biotechnol.* **2014**, *170*, 60-67.
- [296] K. Talafova, E. Hrabarova, J. Nahalka, *J. Biotechnol.* **2015**, *216*, 116-124.
- [297] P. Both, M. Riese, C. J. Gray, K. Huang, E. G. Pallister, I. Kosov, L. P. Conway, J. Voglmeir, S. L. Flitsch, *Glycobiology* **2018**, *28*, 261-268.
- [298] J. B. McArthur, H. Yu, N. Tasnima, C. M. Lee, A. J. Fisher, X. Chen, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1228-1234.
- [299] Y. Hamada, Y. Kanematsu, M. Tachikawa, *Biochemistry* **2016**, *55*, 5764-5771.
- [300] K. Mehr, S. G. Withers, *Glycobiology* **2016**, *26*, 353-359.
- [301] K. Schmoelzer, C. Luley-Goedl, T. Czabany, D. Ribitsch, H. Schwab, H. Weber, B. Nidetzky, *FEBS Letters* **2014**, *588*, 2978-2984.
- [302] L. Ni, H. A. Chokhawala, H. Cao, R. Henning, L. Ng, S. Huang, H. Yu, X. Chen, A. J. Fisher, *Biochemistry* **2007**, *46*, 6288-6298.
- [303] T. Yamamoto, M. Ichikawa, Y. Takakura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365*, 340-343.
- [304] <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/clustalo>, Universität Tübingen, **20.02.2020**.
- [305] T. Czabany, K. Schmolzer, C. Luley-Goedl, D. Ribitsch, B. Nidetzky, *Anal. Biochem.* **2015**, *483*, 47-53.
- [306] M. Noel, P. A. Gilormini, V. Coge, C. Lion, C. Biot, A. Harduin-Lepers, Y. Guerardel, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 3377-3384.
- [307] K. Schmoelzer, M. Eibinger, B. Nidetzky, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 1544-1550.
- [308] S. Gosselin, M. Alhussaini, M. B. Streiff, K. Takabayashi, M. M. Palcic, *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 92-97.
- [309] G. K. Wagner, T. Pesnot, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1939-1949.
- [310] E. Chapman, C. H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 551-555.
- [311] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.
- [312] H. P. Modarres, M. R. Mofrad, A. Sanati-Nezhad, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 115252-115270.
- [313] K. M. Polizzi, A. S. Bommarius, J. M. Broering, J. F. Chaparro-Riggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 220-225.
- [314] A. O. Magnusson, A. Szekrenyi, H. J. Joosten, J. Finnigan, S. Charnock, W. D. Fessner, *FEBS J.* **2019**, *286*, 184-204.
- [315] Y. Hamada, Y. Kanematsu, M. Tachikawa, *Biochemistry* **2016**, *55*, 5764-5771.
- [316] J. Zhang, C. Chen, M. R. Gadi, C. Gibbons, Y. Guo, X. Cao, G. Edmunds, S. Wang, D. Liu, J. Yu, L. Wen, P. G. Wang, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 16638-16642.
- [317] N. Yamakawa, J. Vanbeselaere, L.-Y. Chang, S.-Y. Yu, L. Ducrocq, A. Harduin-Lepers, J. Kurata, K. F. Aoki-Kinoshita, C. Sato, K.-H. Khoo, K. Kitajima, Y. Guerardel, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1-14.
- [318] A. Lopez Aguilar, L. Meng, X. Hou, W. Li, K. W. Moremen, P. Wu, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 1231-1239.
- [319] P. Kreitmeier, in *Einführung in die apparativen Methoden in der Organischen Chemie* (Eds.: S. Hünig, G. Märkl, J. Sauer), Universitäten Regensburg, Würzburg, **2001**.
- [320] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512-7515.
- [321] in *Pure Appl. Chem., Vol. 56*, Joint commission on biochemical nomenclature, **1984**, pp. 595-624.

8. Anhang: Spektren

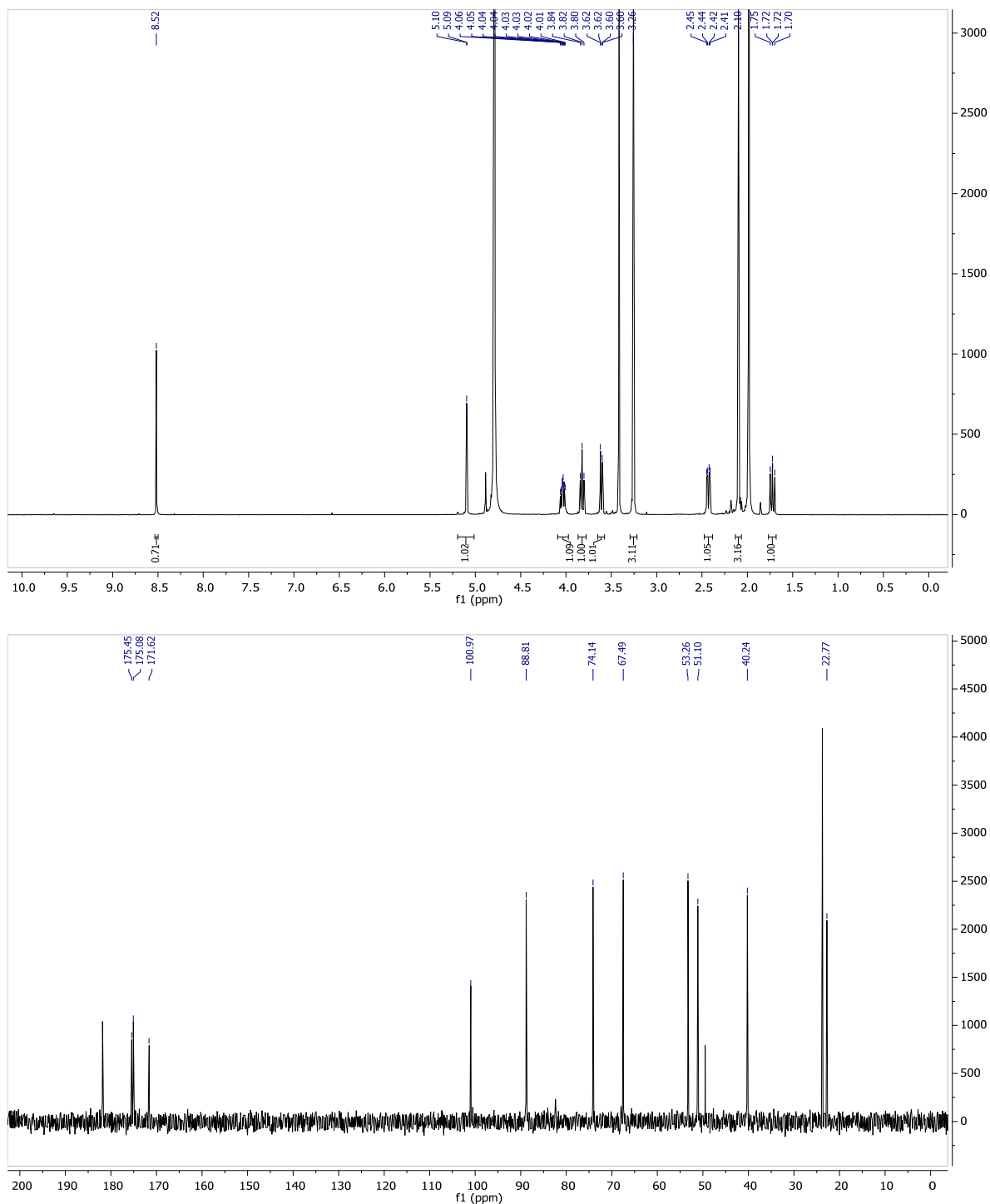
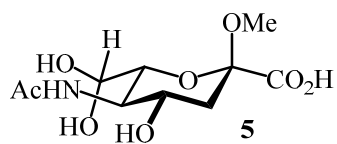


Abb. 44. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 5.

(^{13}C -Peaks bei 181.8: Bariumcarbonat, 171.6 & 23.7: Acetat)

8. Anhang: Spektren

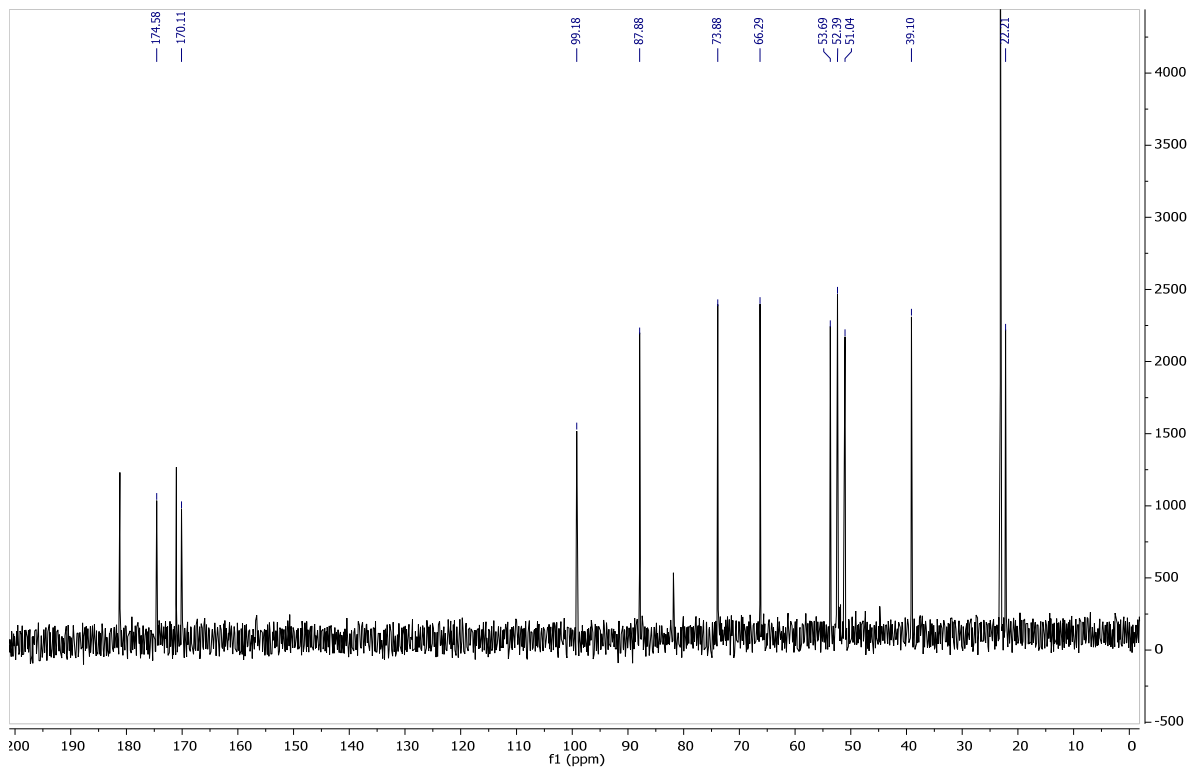
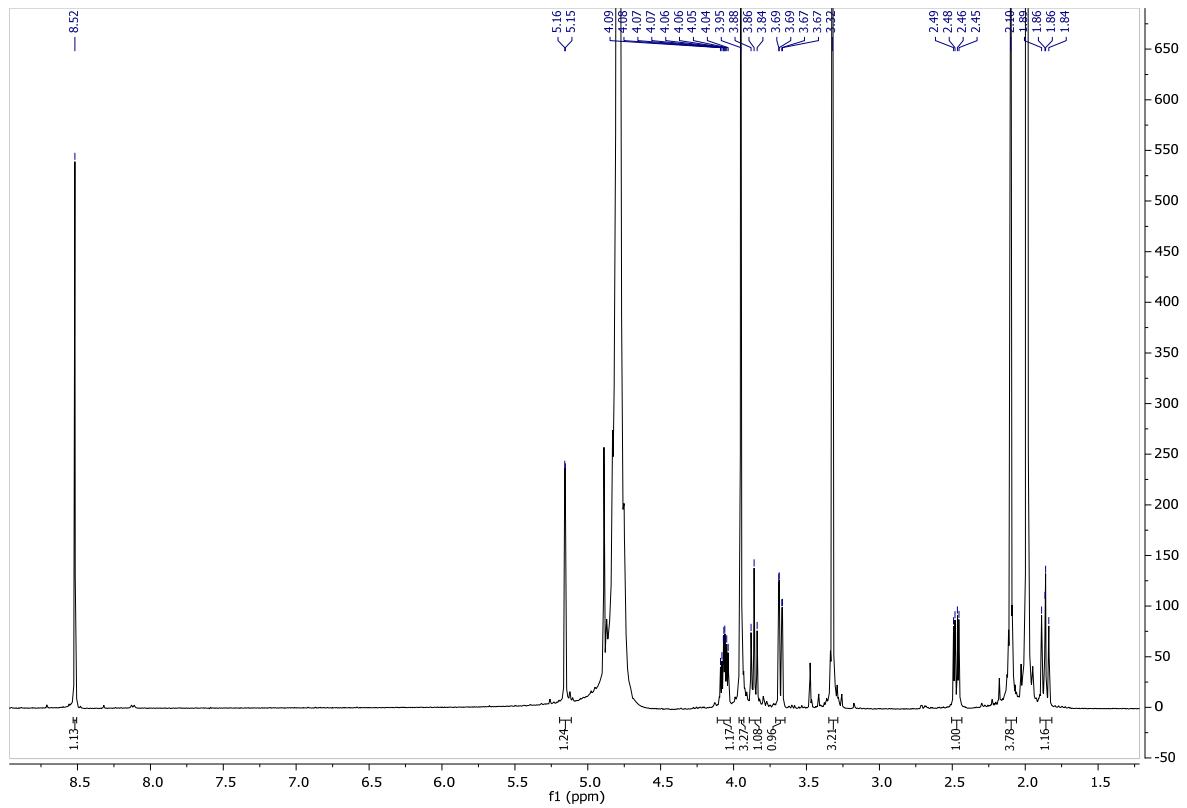
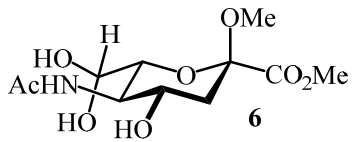


Abb. 45. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 6.

(^{13}C -Peaks bei 181.2: Bariumcarbonat, 171.1 & 23.2: Acetat)

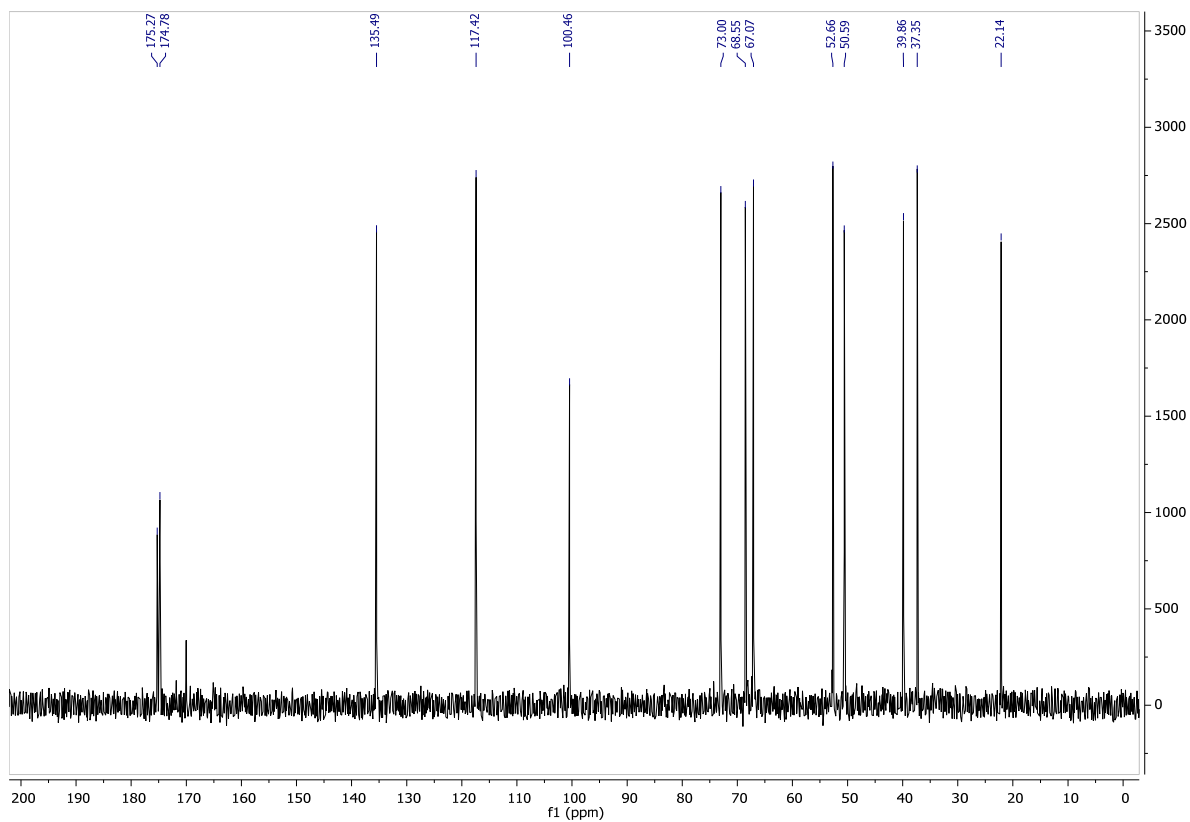
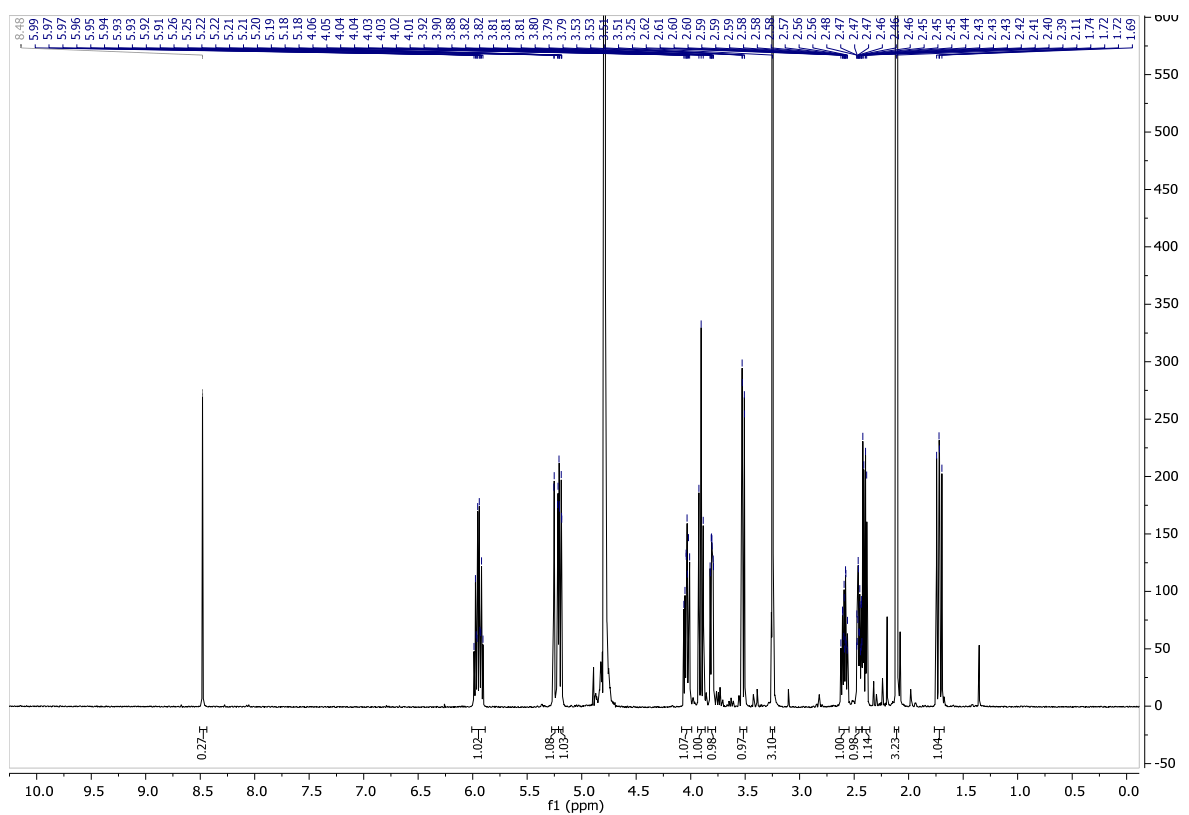
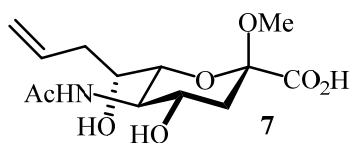


Abb. 46. $^1\text{H-}$ (500 MHz, D_2O , oben) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 7.

8. Anhang: Spektren

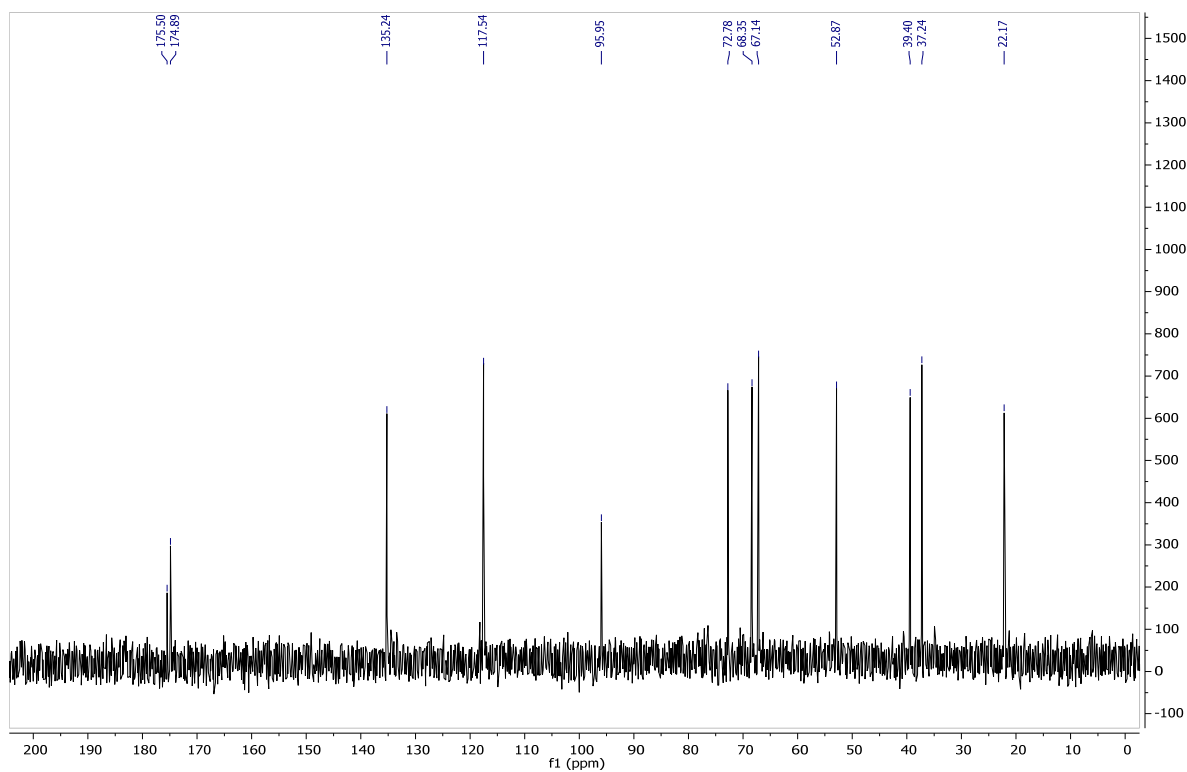
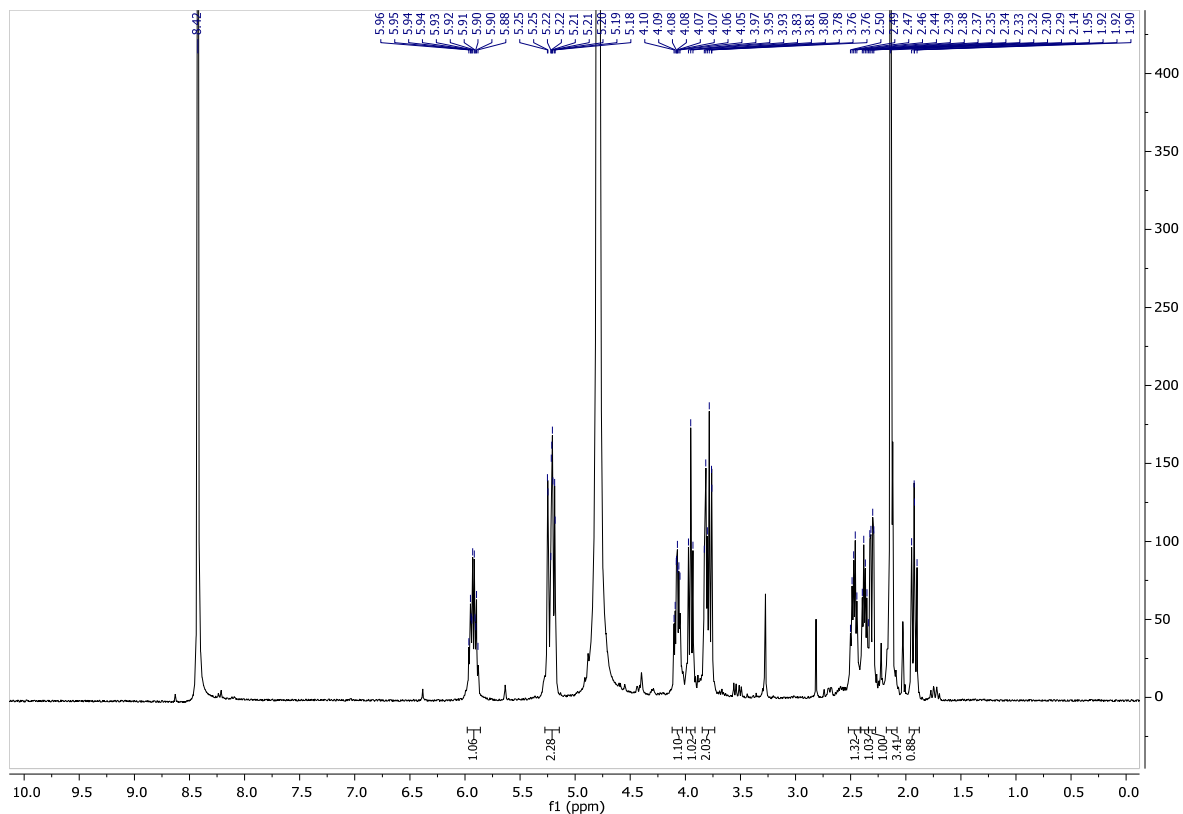
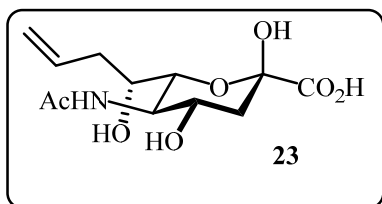


Abb. 47. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung **23**.

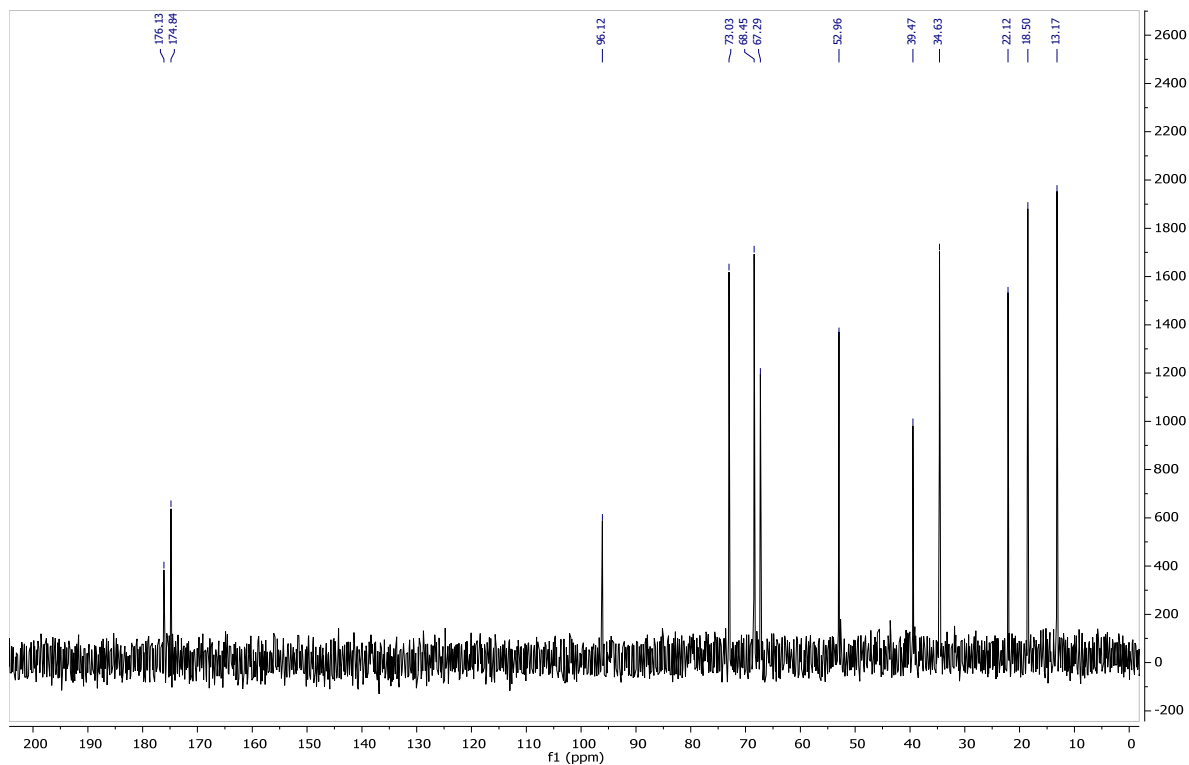
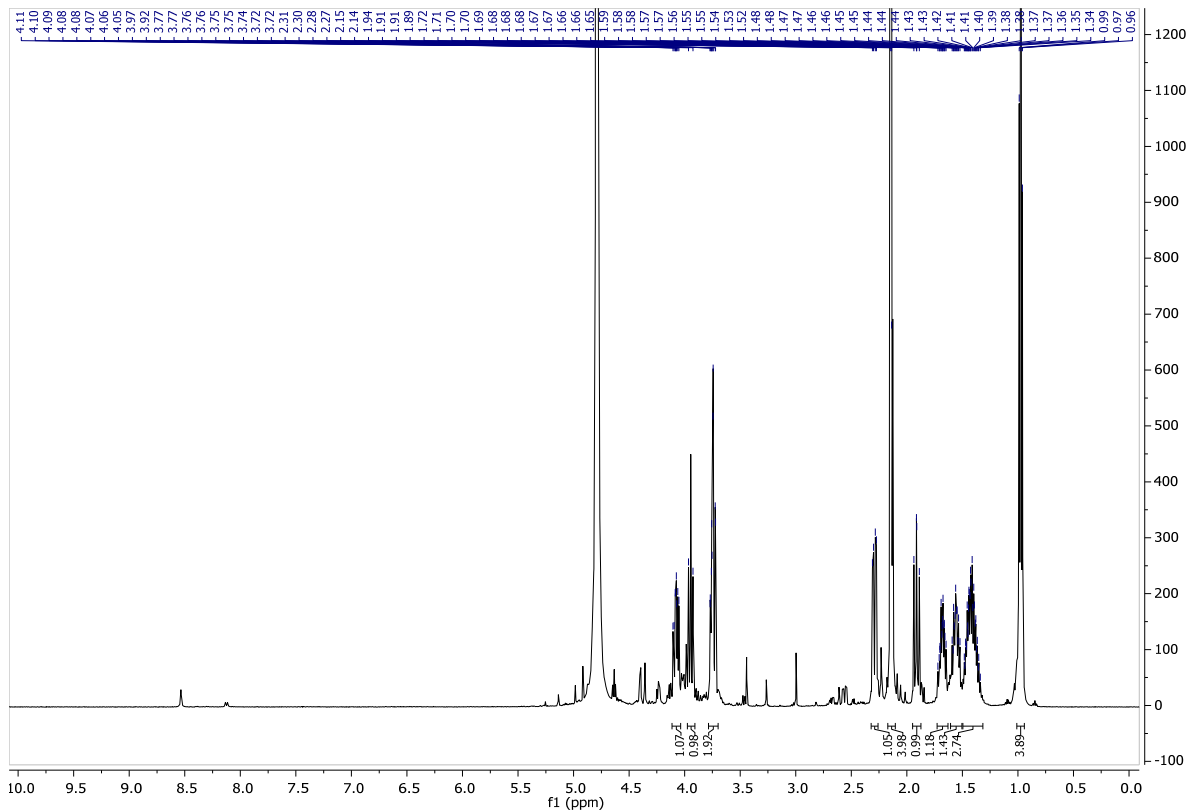
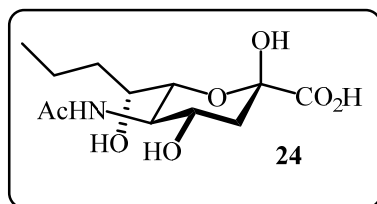


Abb. 48. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 24.

8. Anhang: Spektren

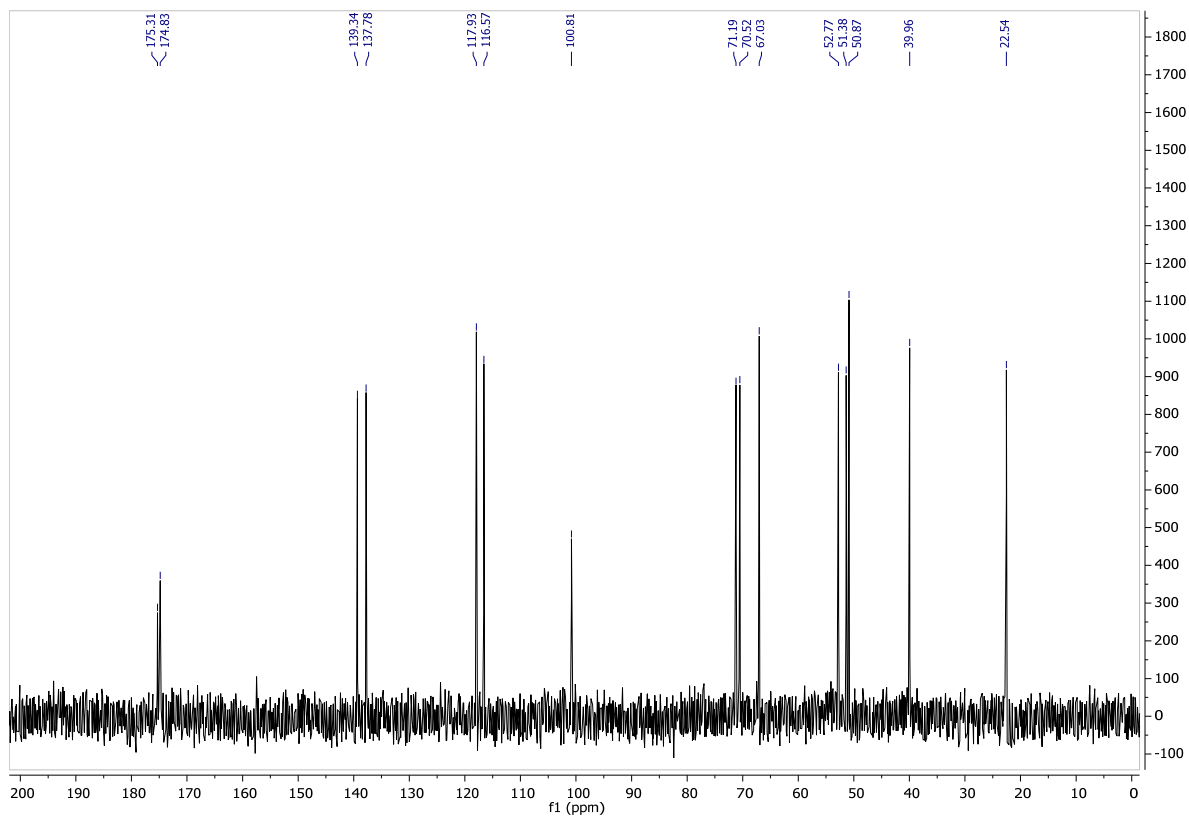
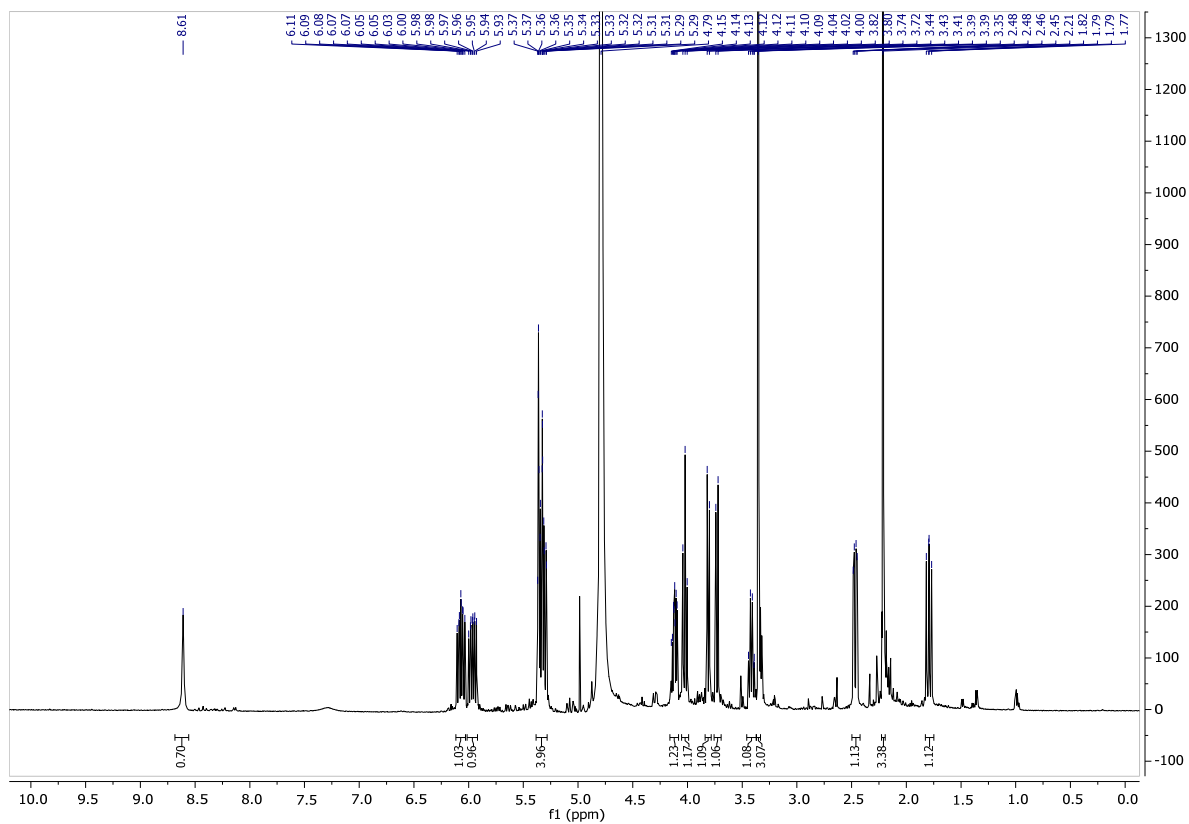
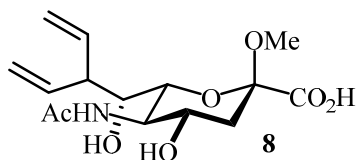
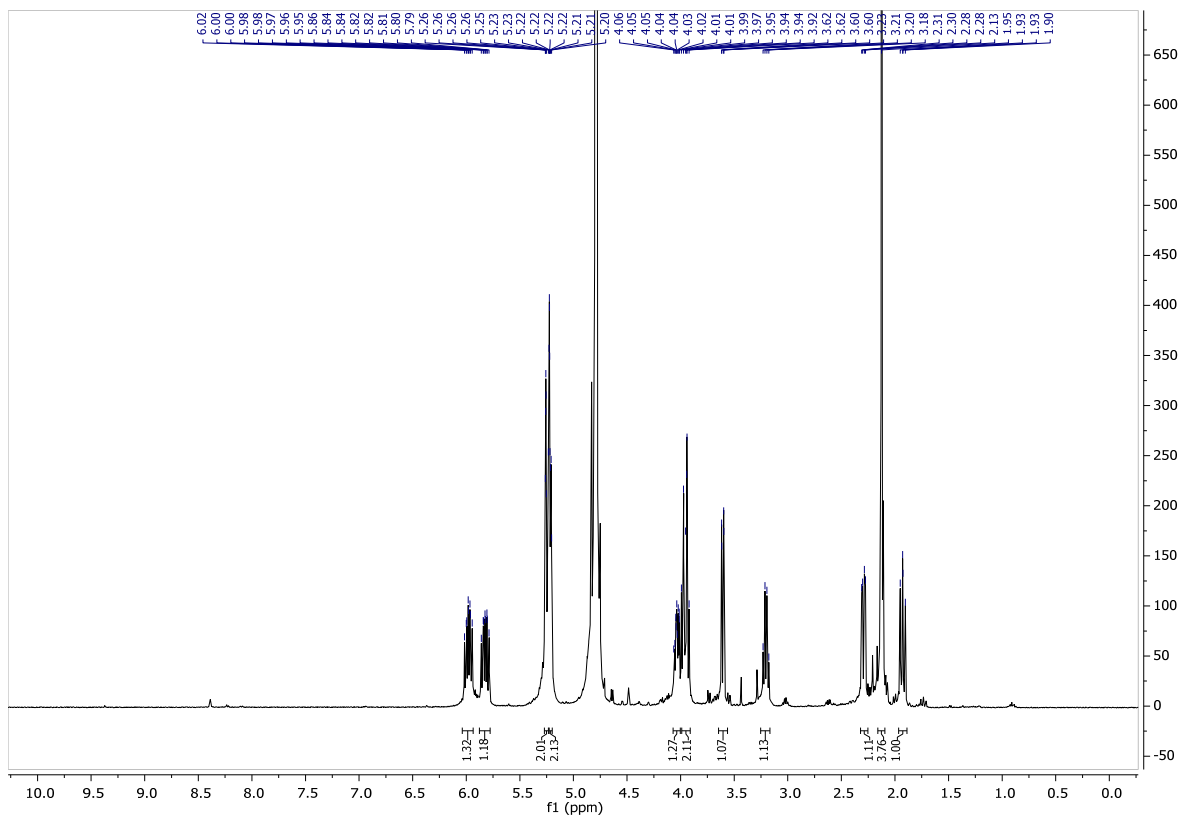
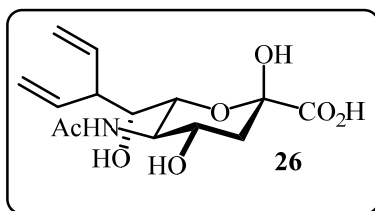


Abb. 49. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung **8**.



jun03av.71.fid — Mertsch AxM 119_5

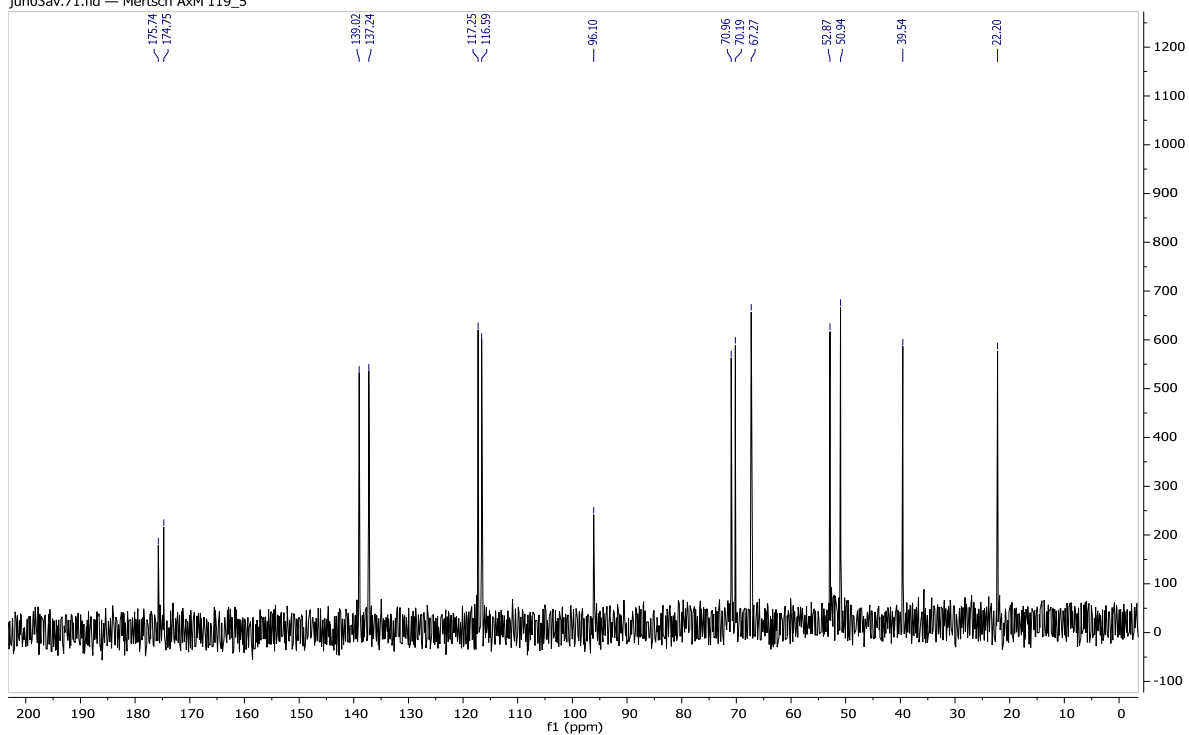


Abb. 50. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 26.

8. Anhang: Spektren

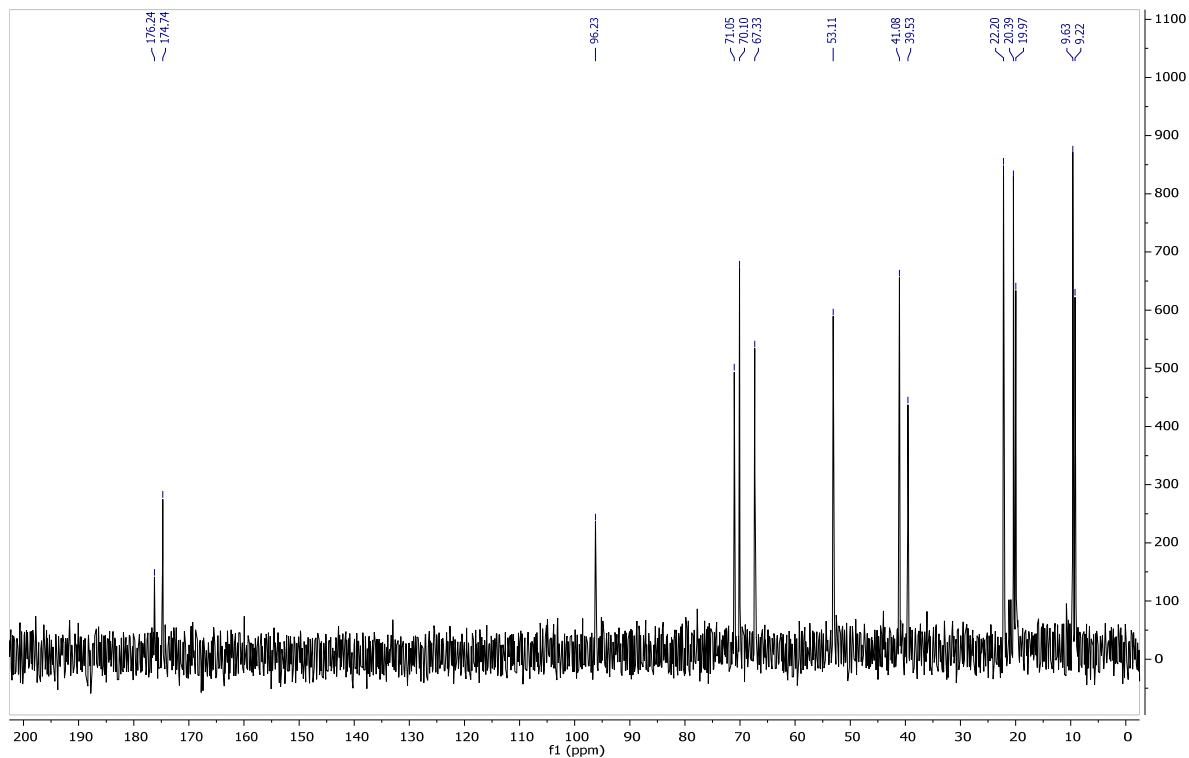
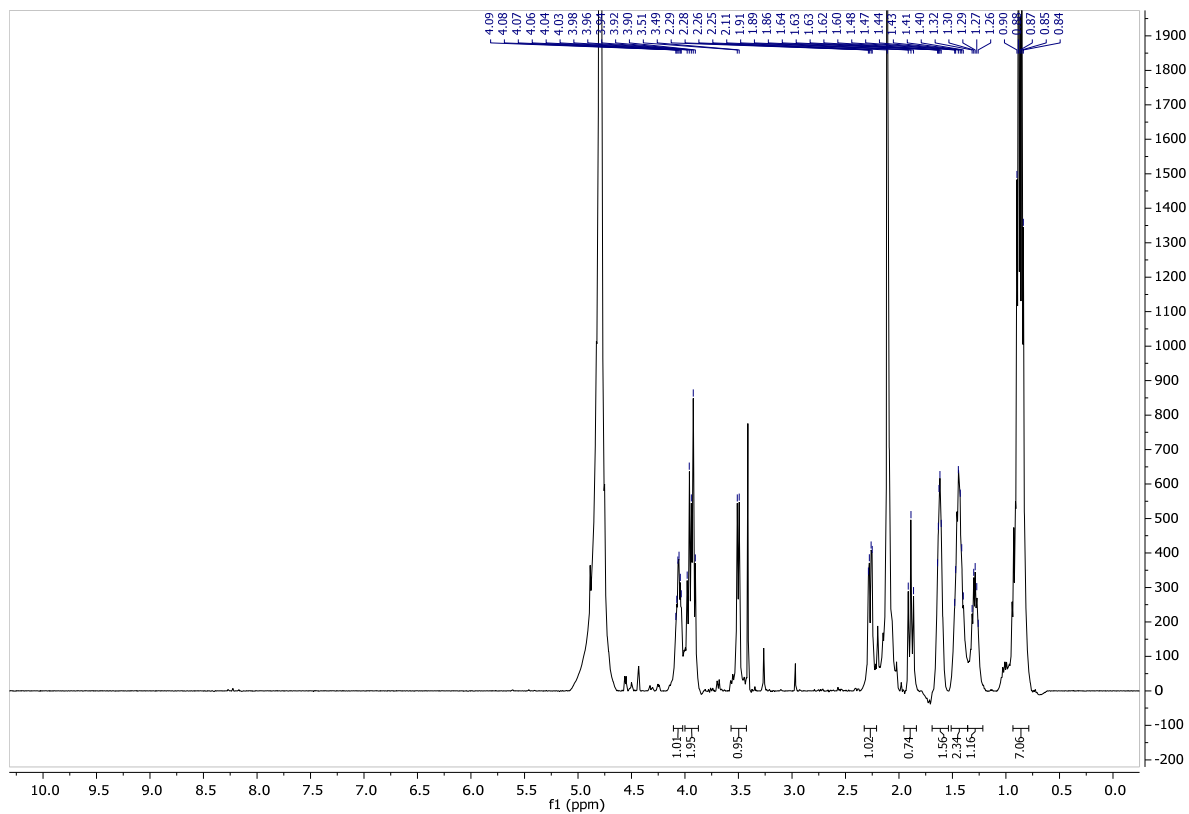
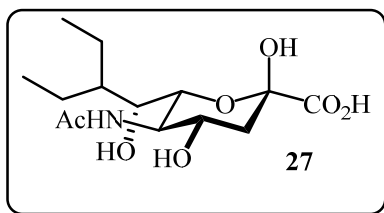


Abb. 51. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 27.

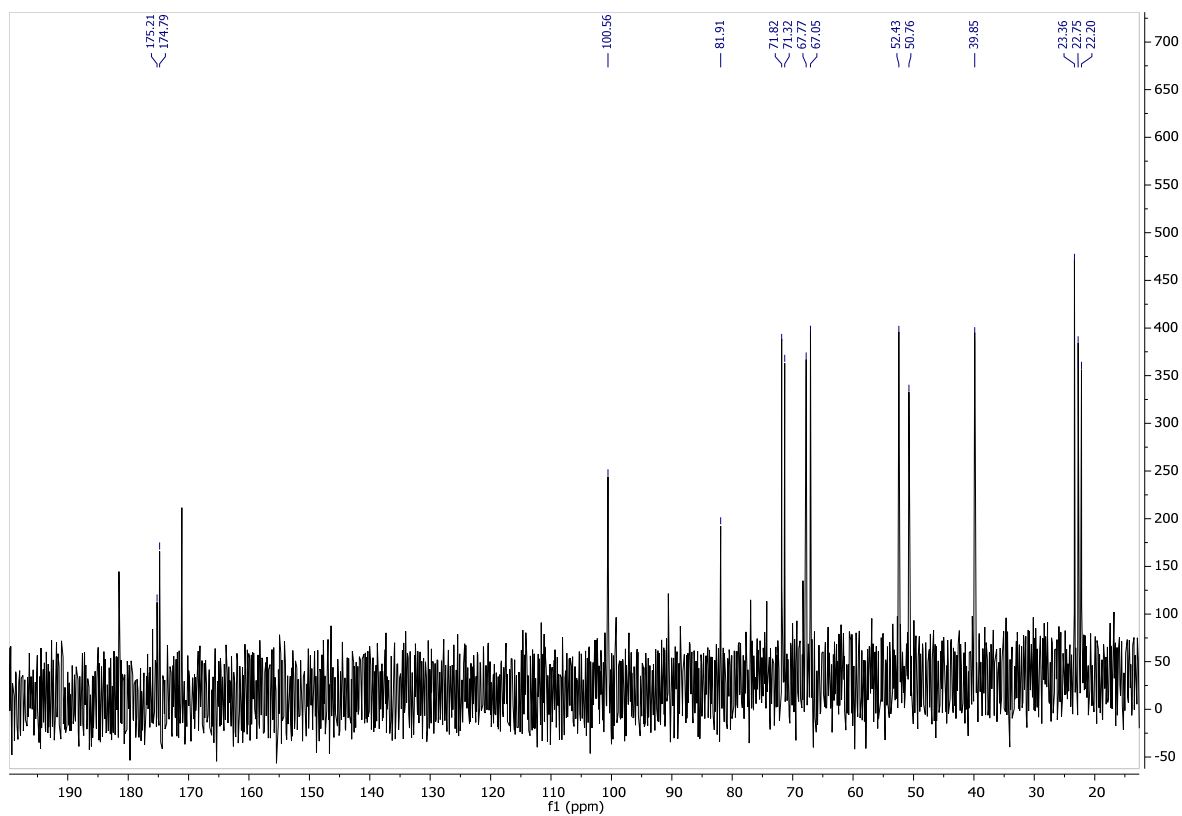
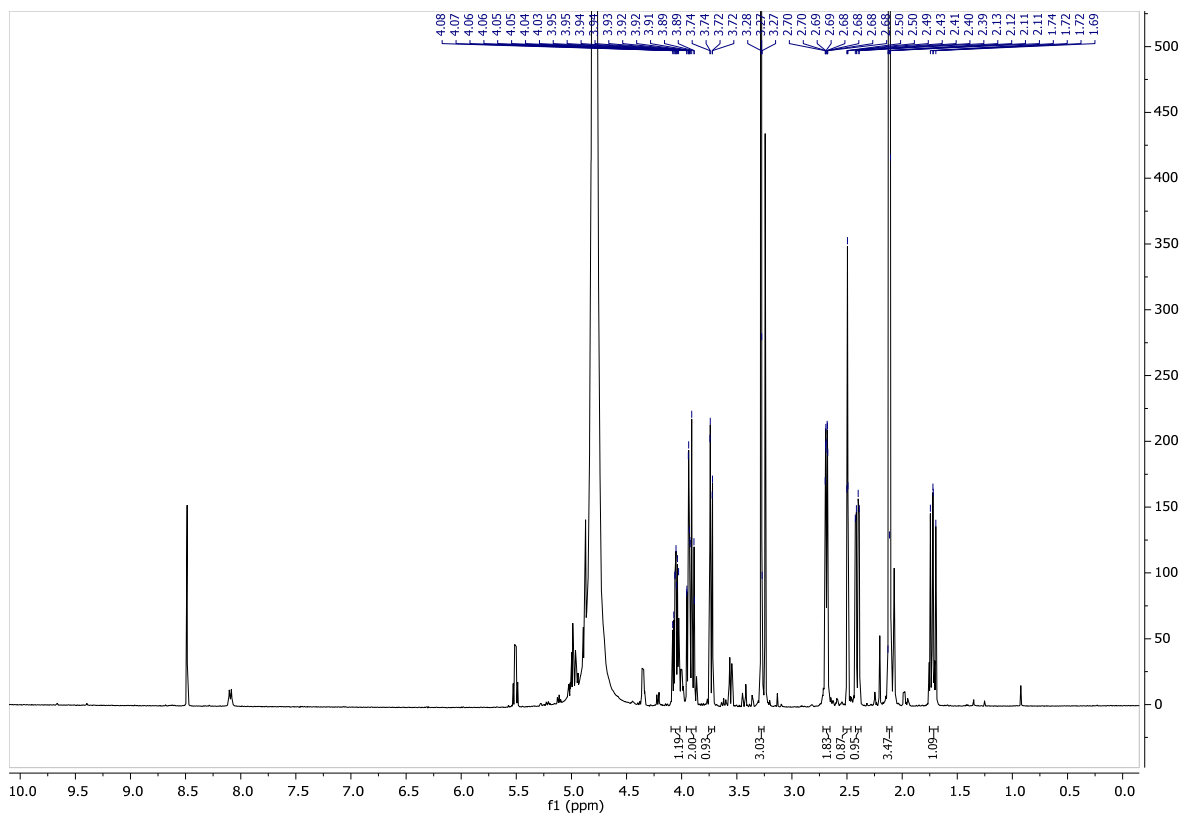
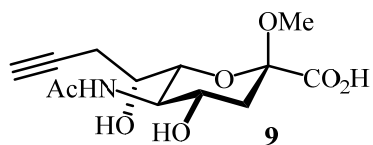


Abb. 52. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung **9**.

8. Anhang: Spektren

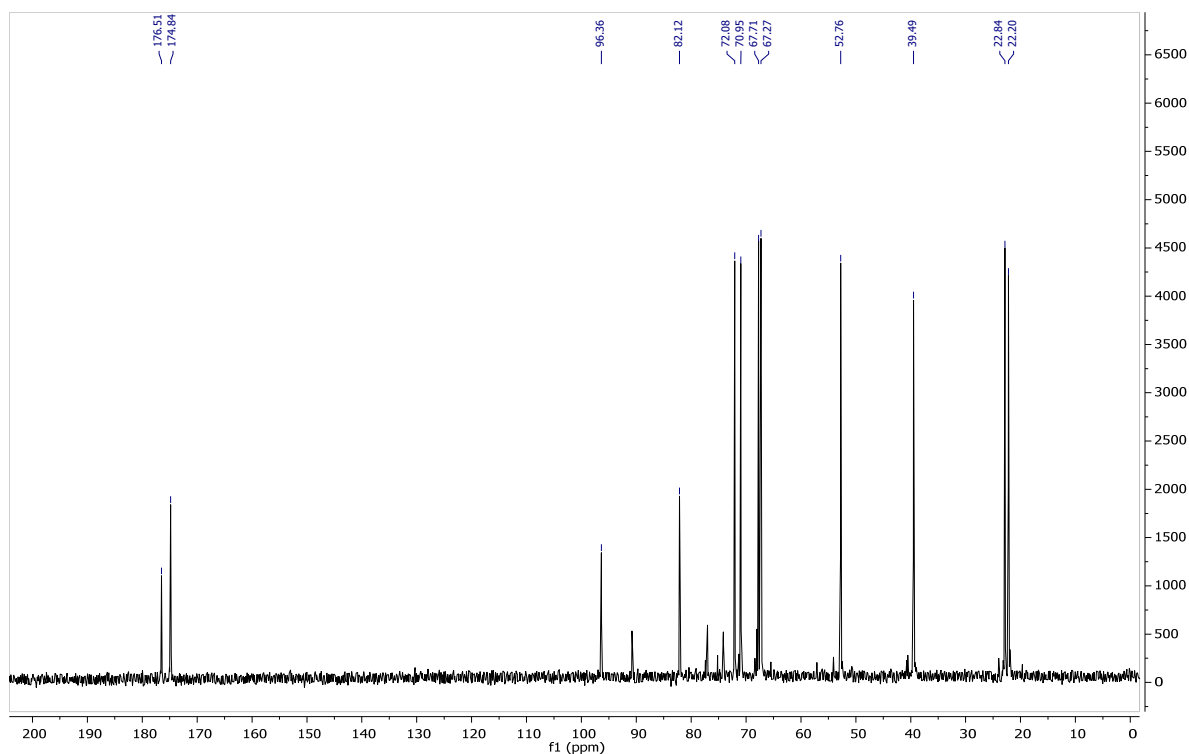
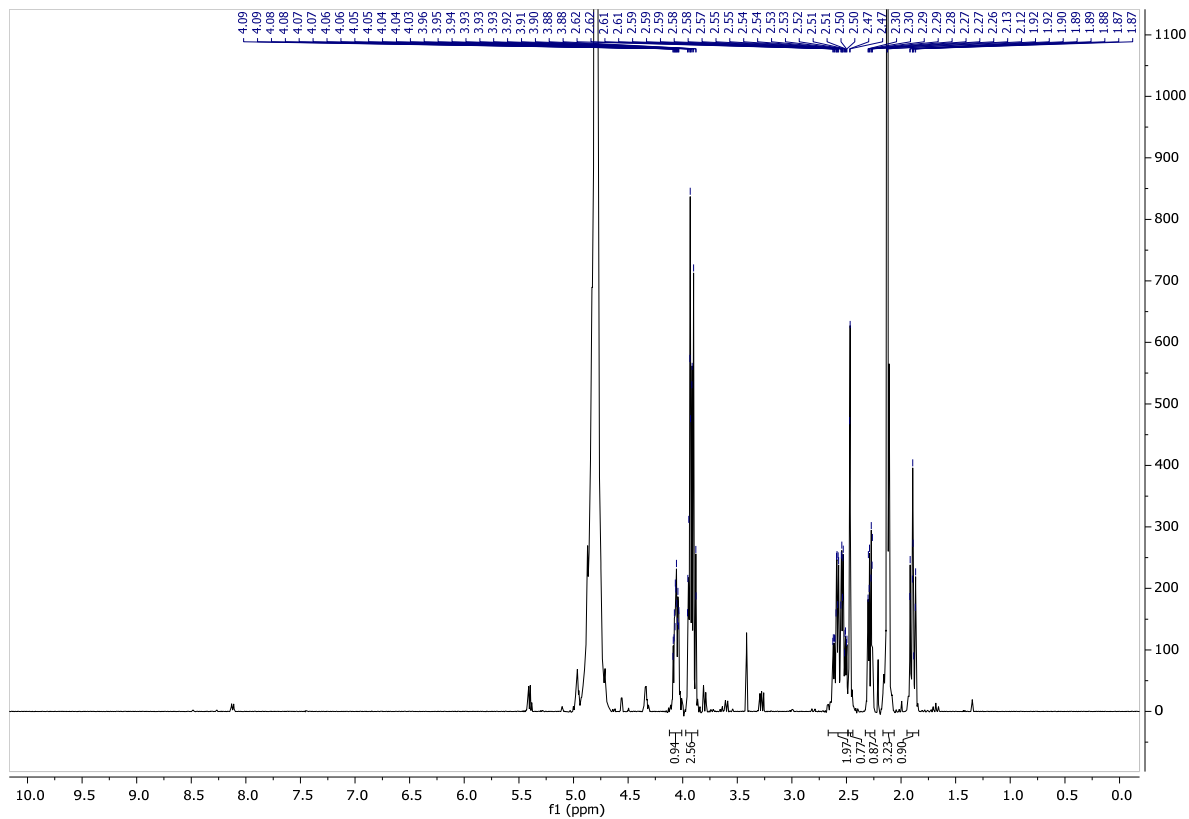
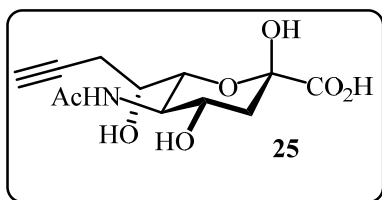
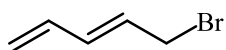


Abb. 53. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung **25**.



22

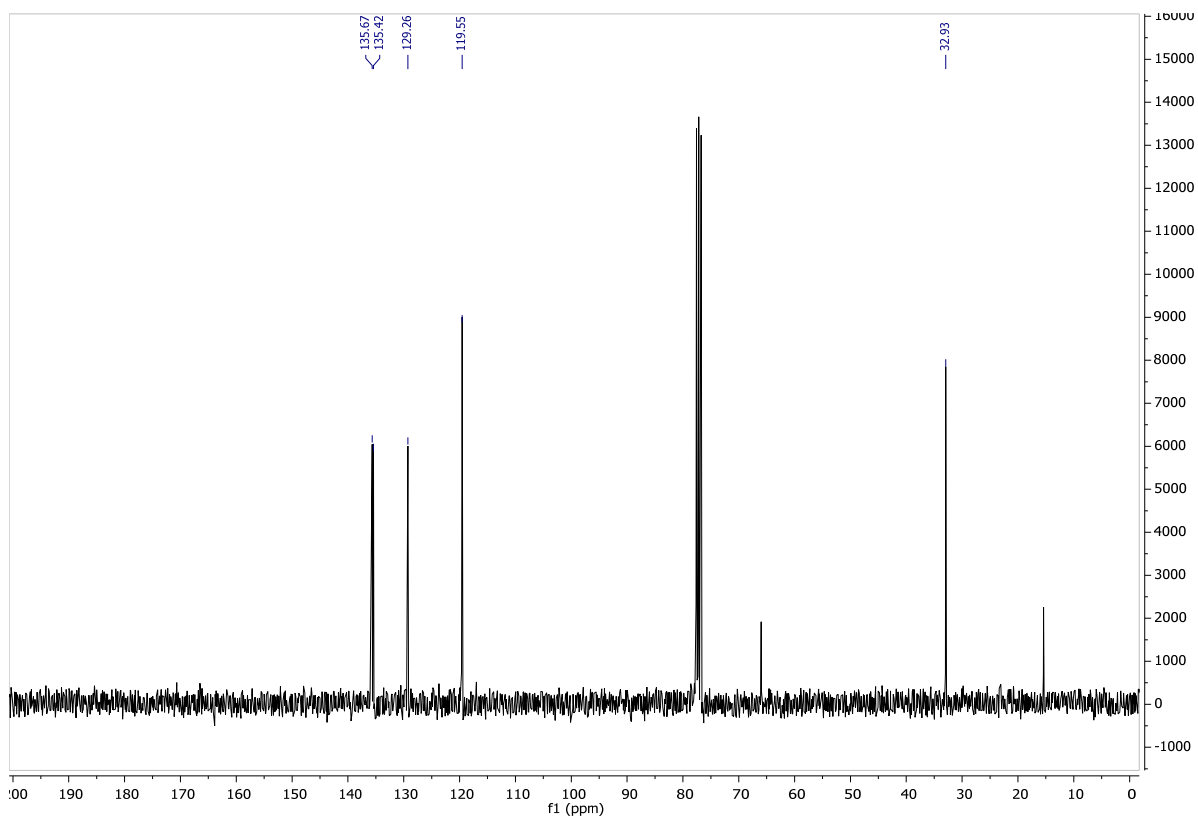
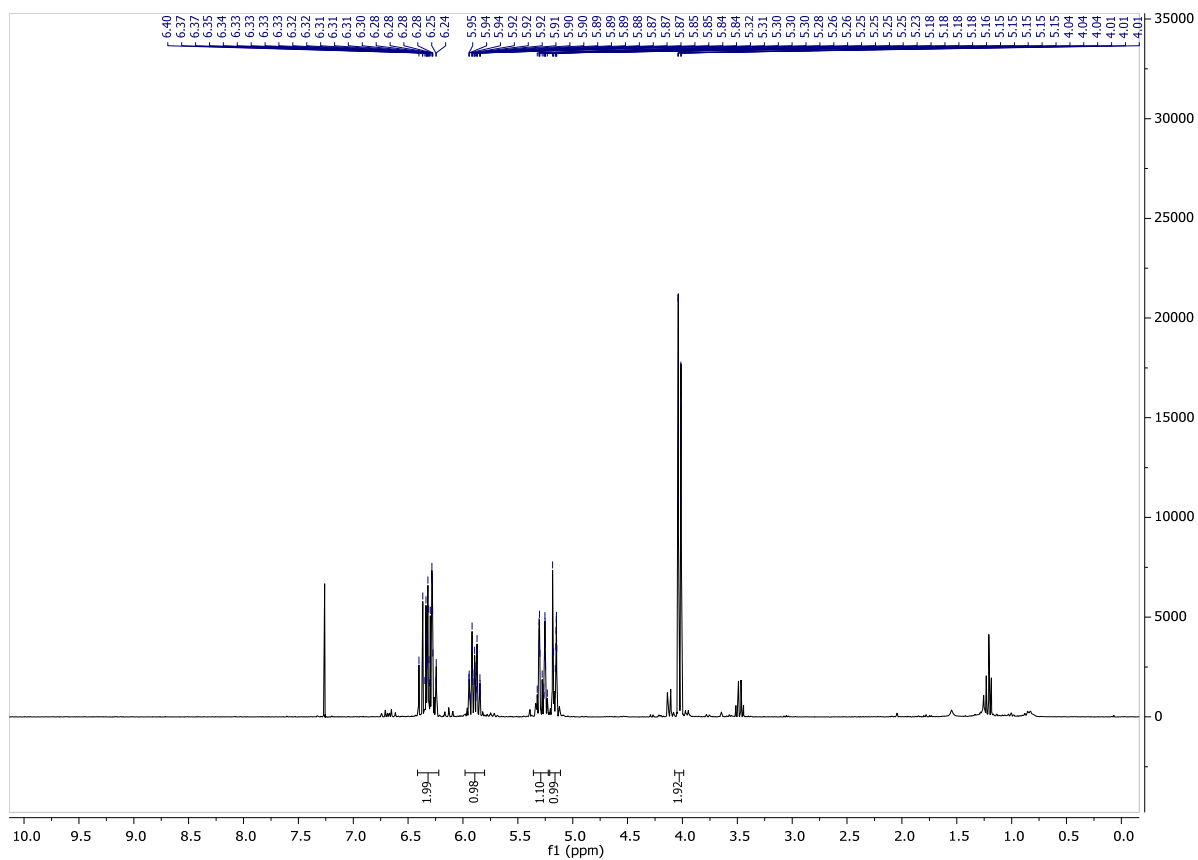


Abb. 54. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 22.

8. Anhang: Spektren

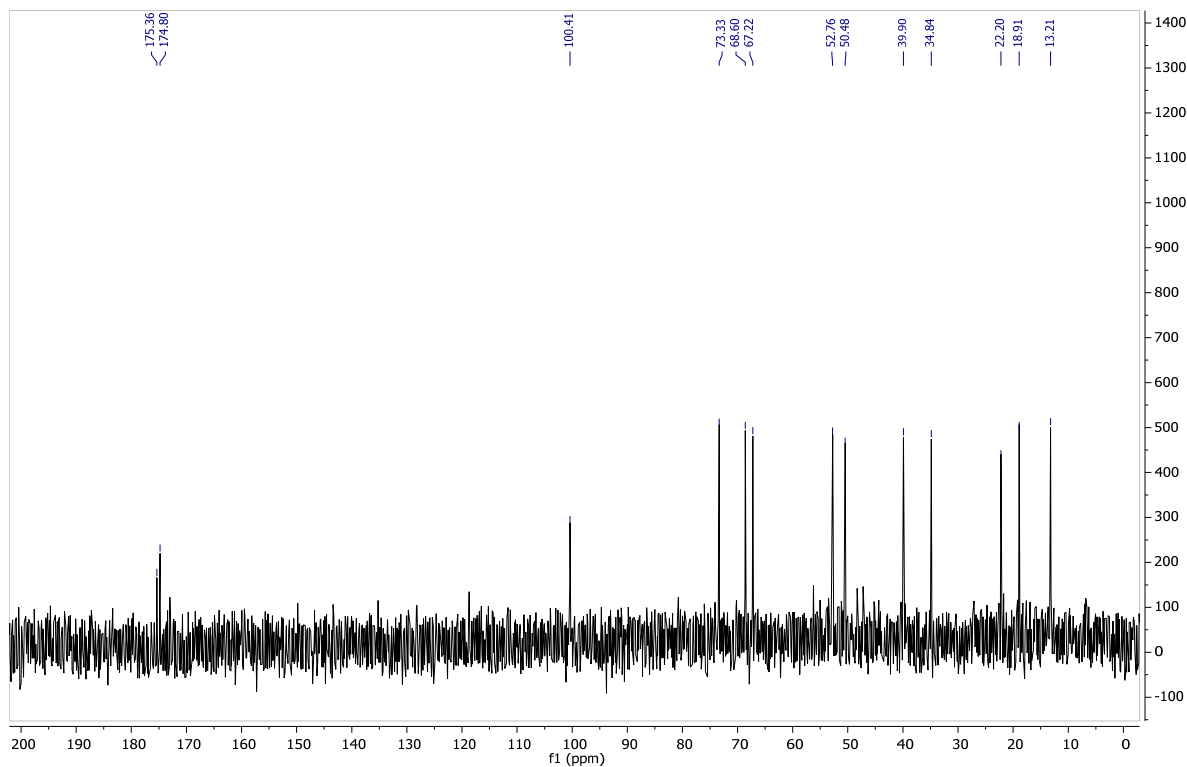
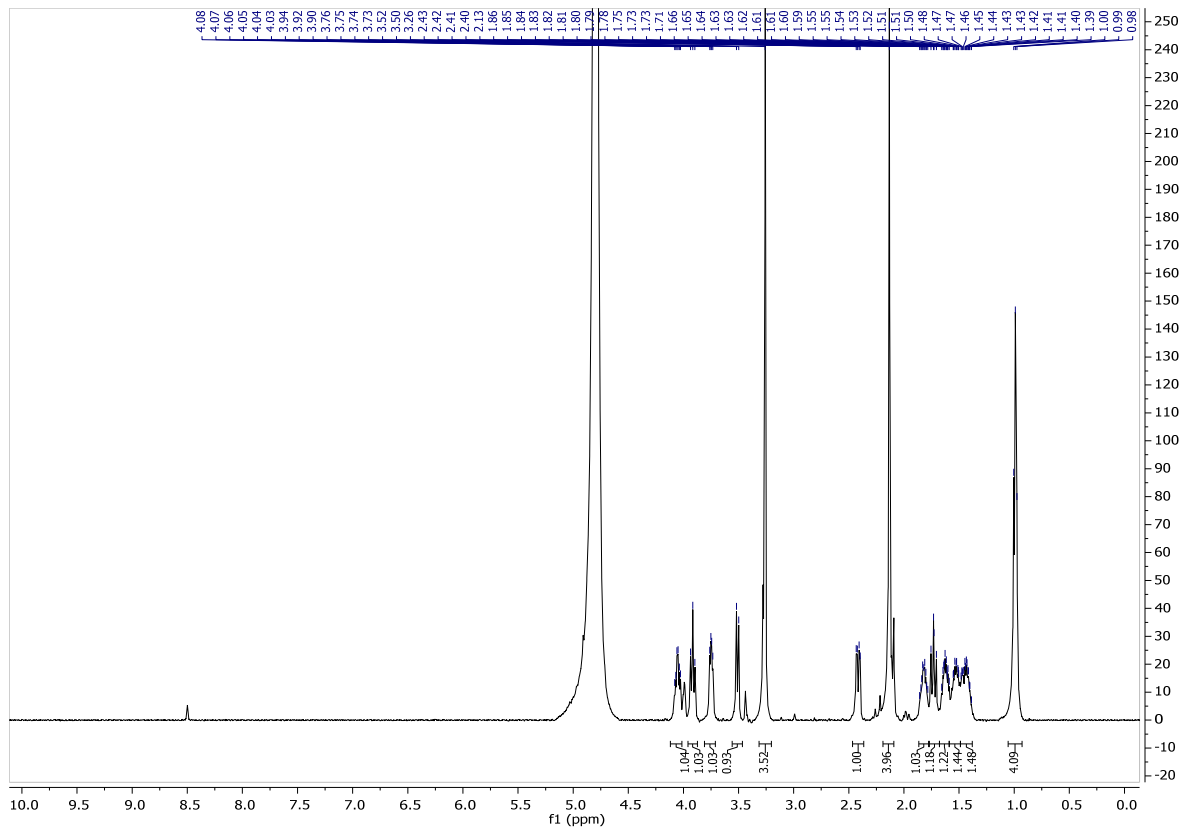
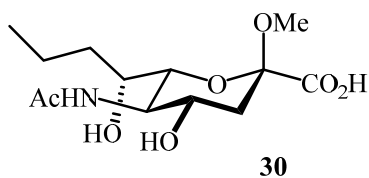


Abb. 55. $^1\text{H-}$ (500 MHz, D_2O , oben) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung **30**.

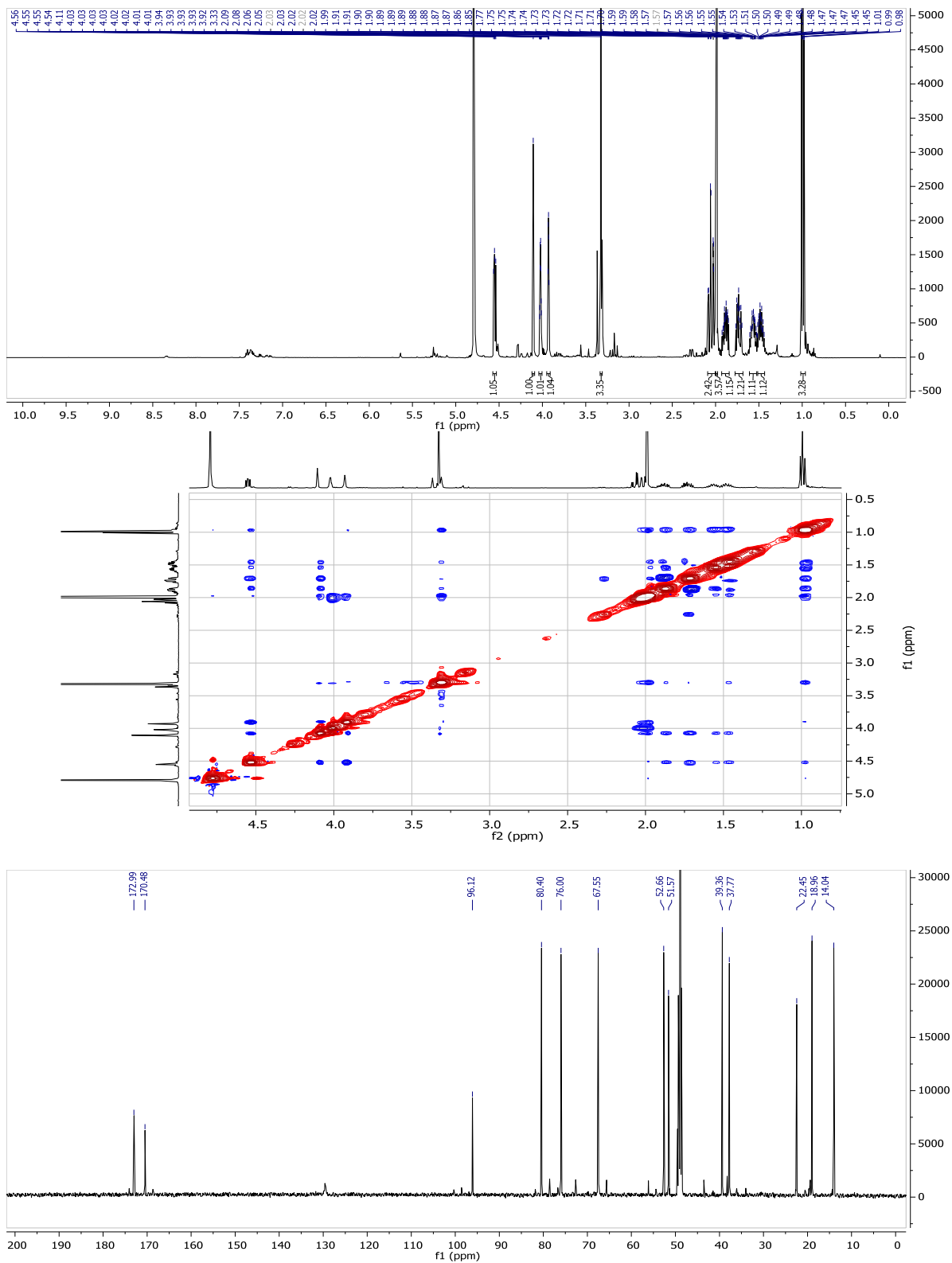
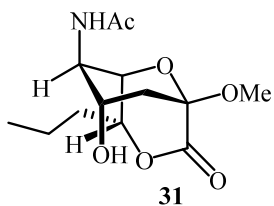
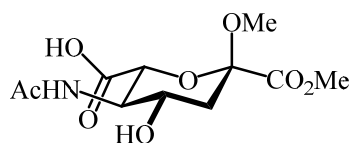


Abb. 56. $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz, D_2O , oben), $^1\text{H-}^1\text{H-NOESY-NMR}$ -Spektrum (500 MHz, D_2O , mitte), $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung **31**.



34

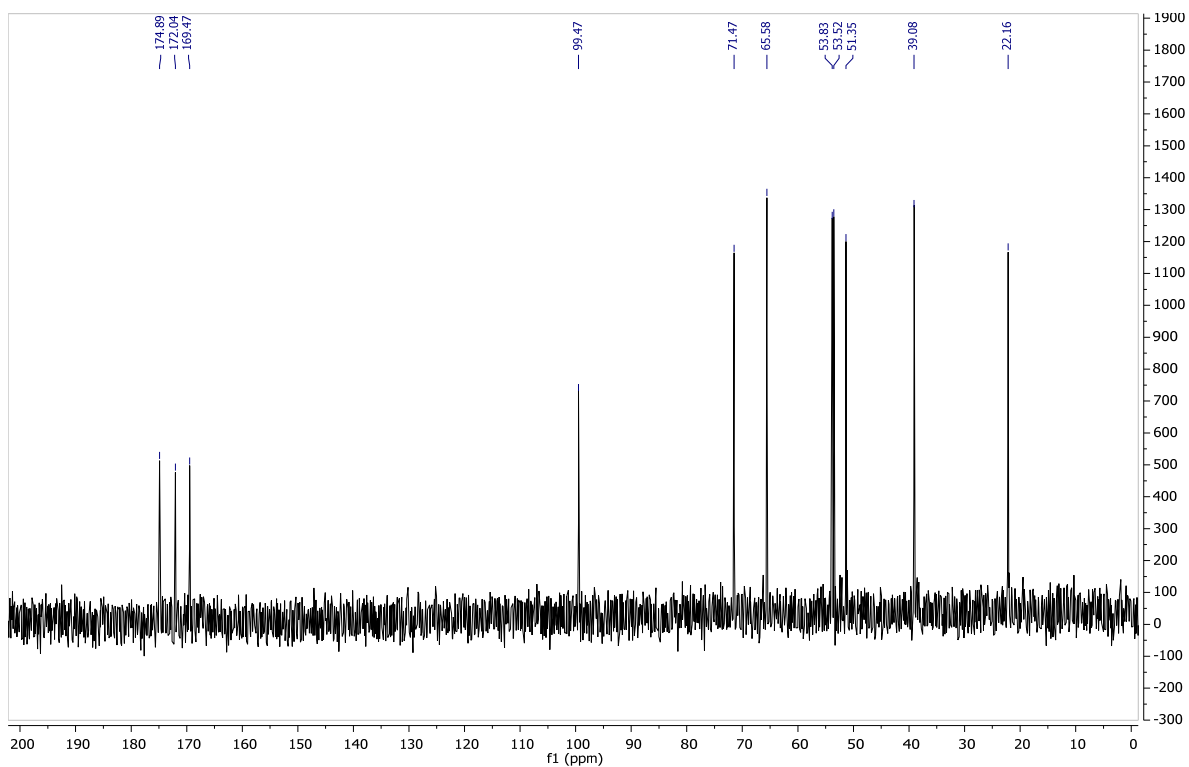
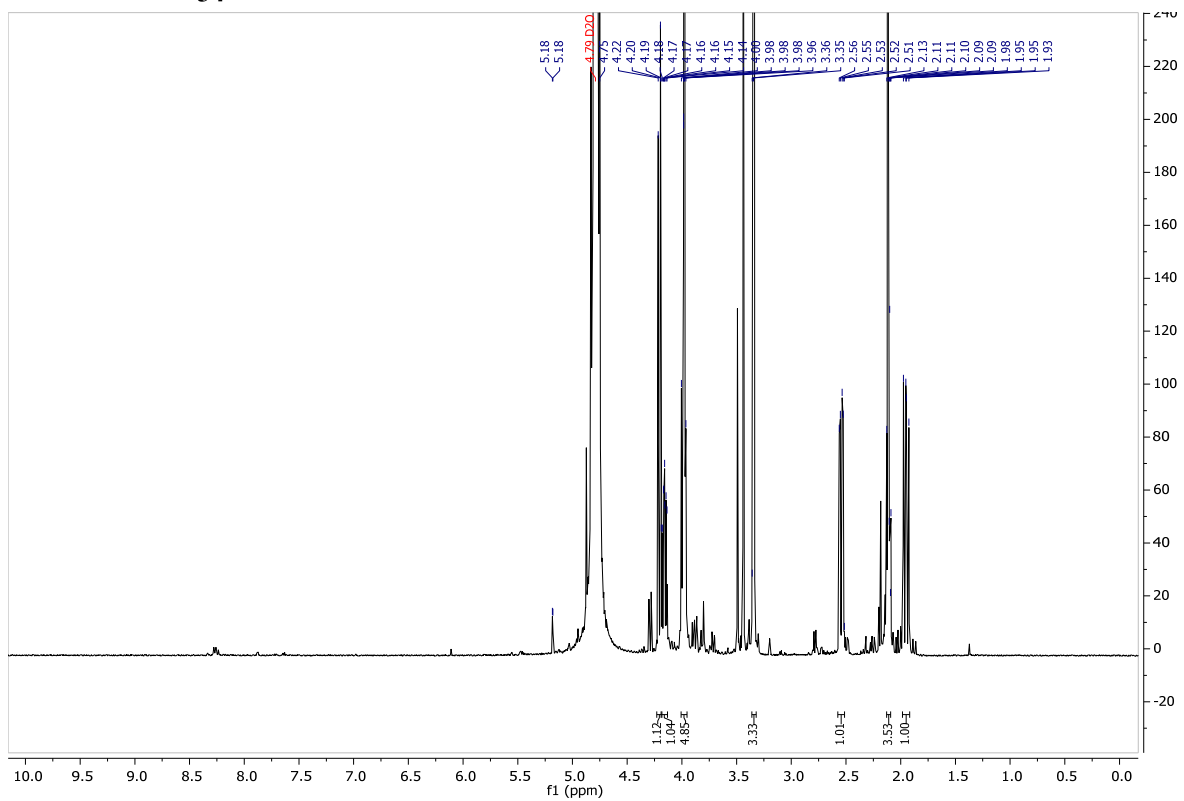


Abb. 58. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 34.

8. Anhang: Spektren

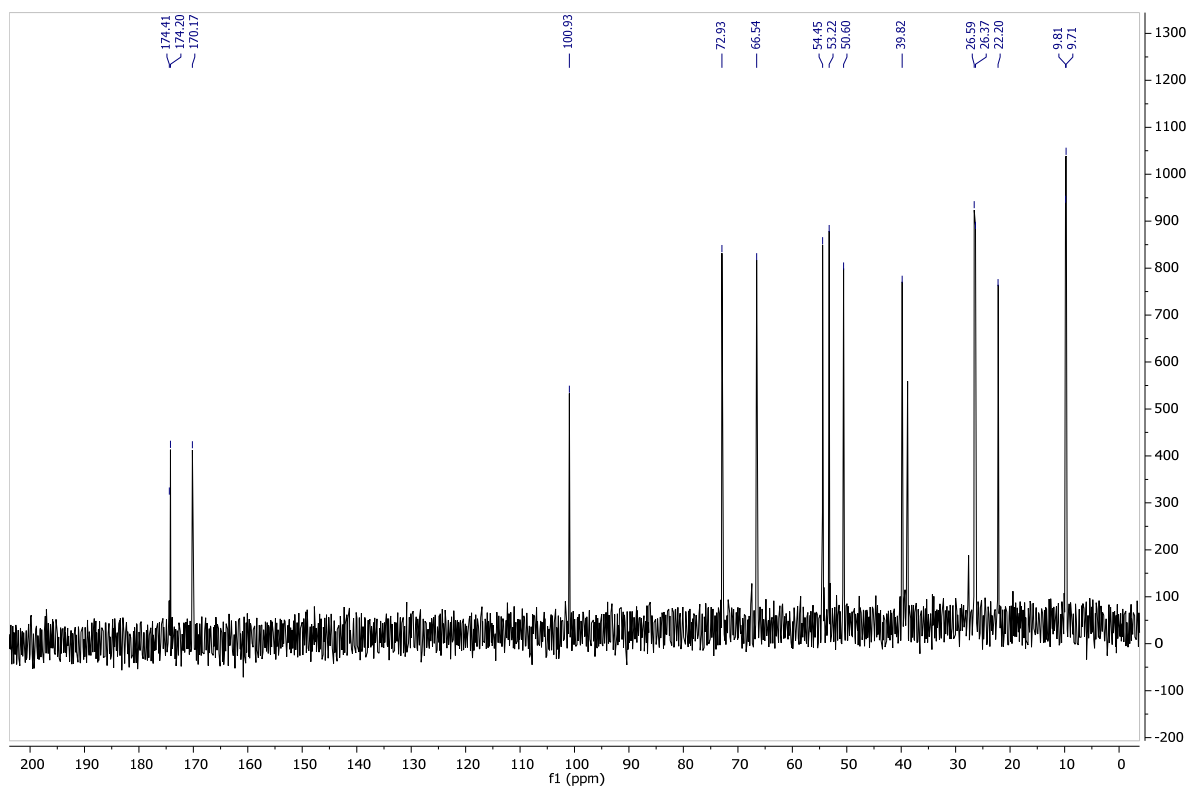
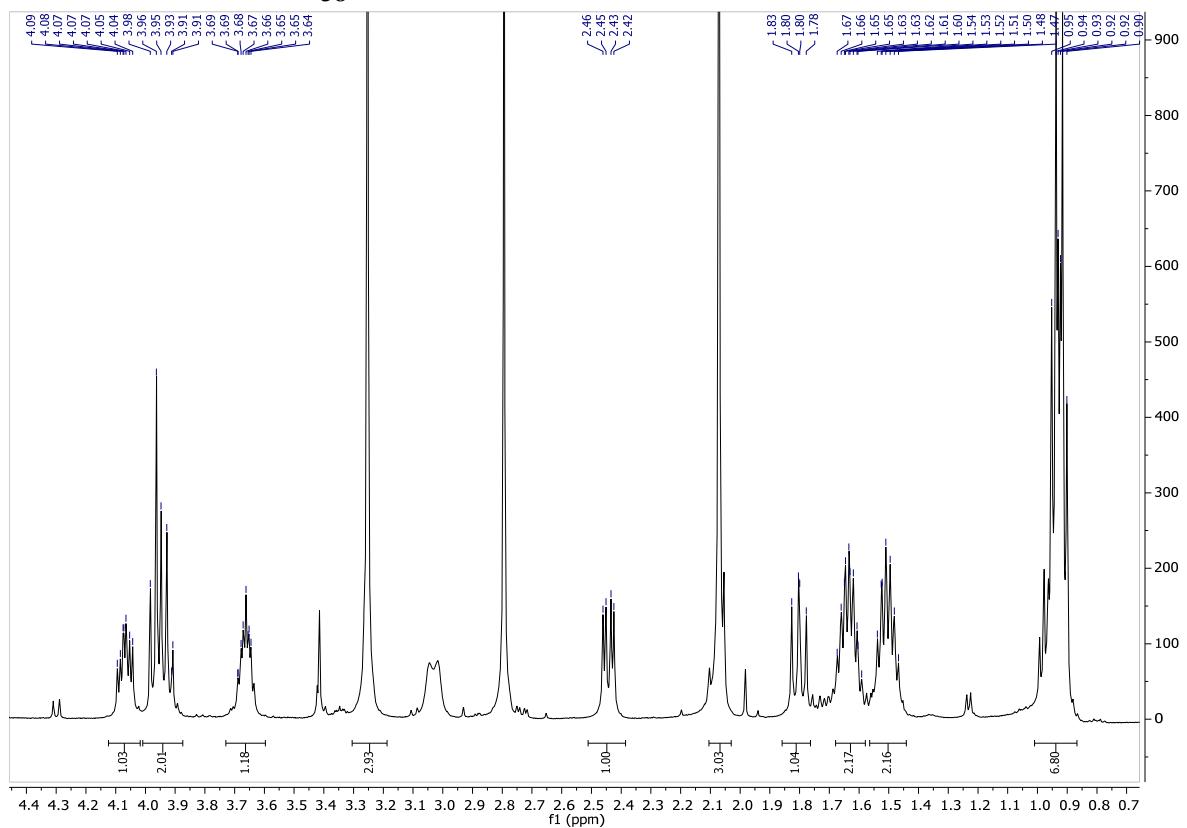
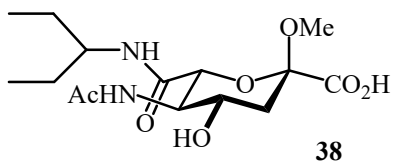


Abb. 59. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung **38**.

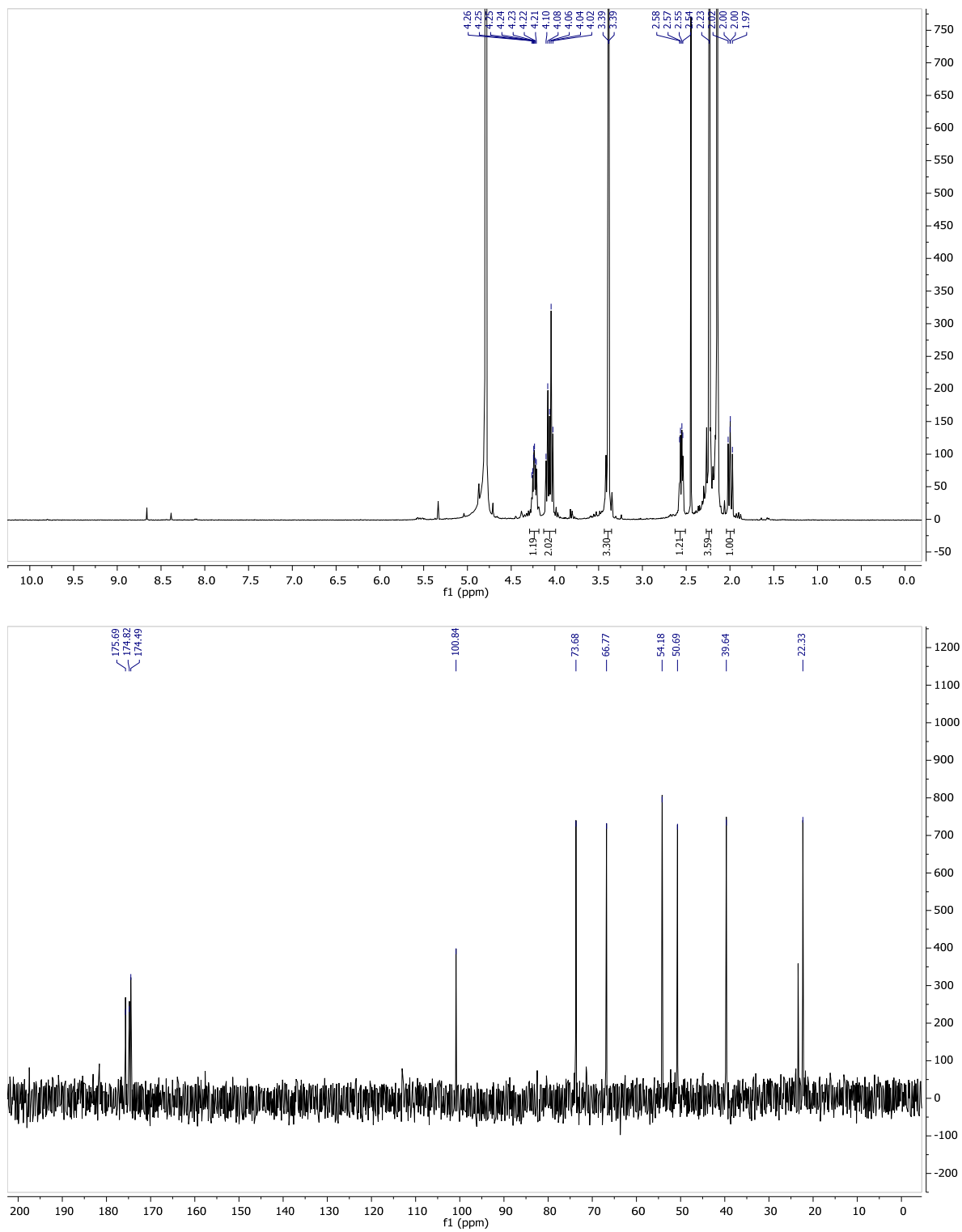
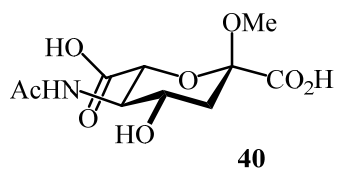


Abb. 60. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 40.

8. Anhang: Spektren

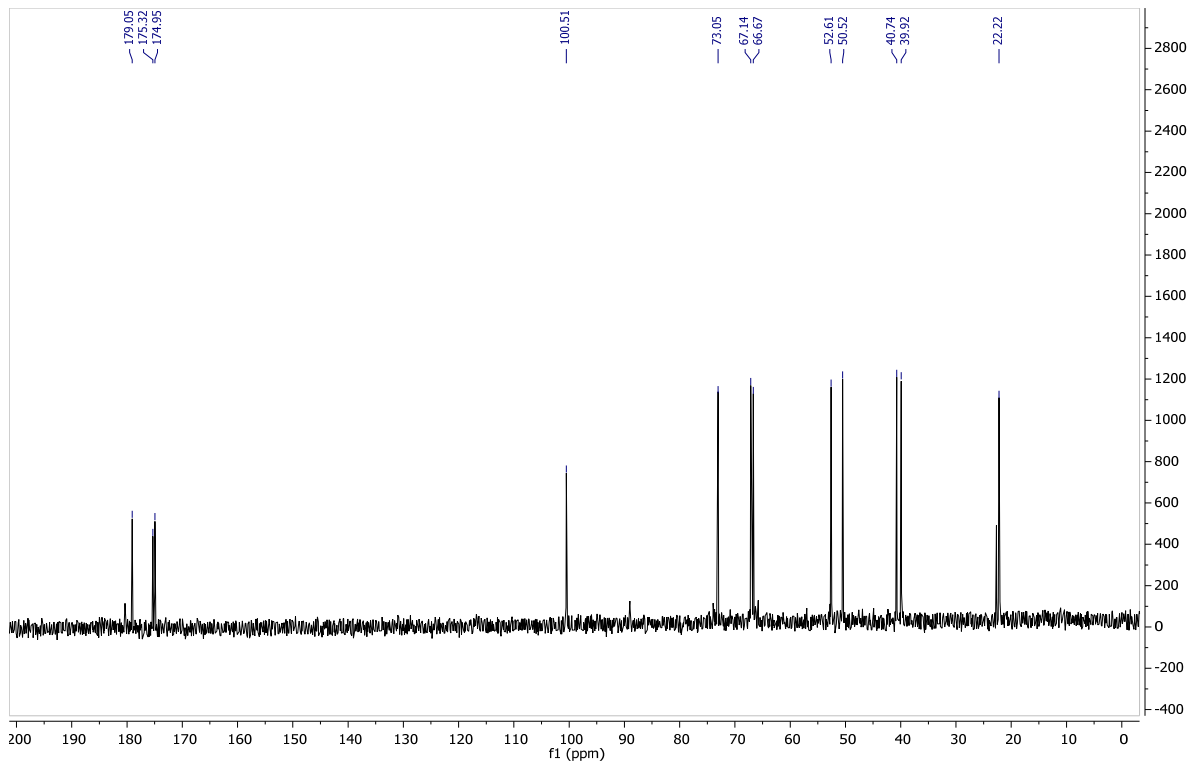
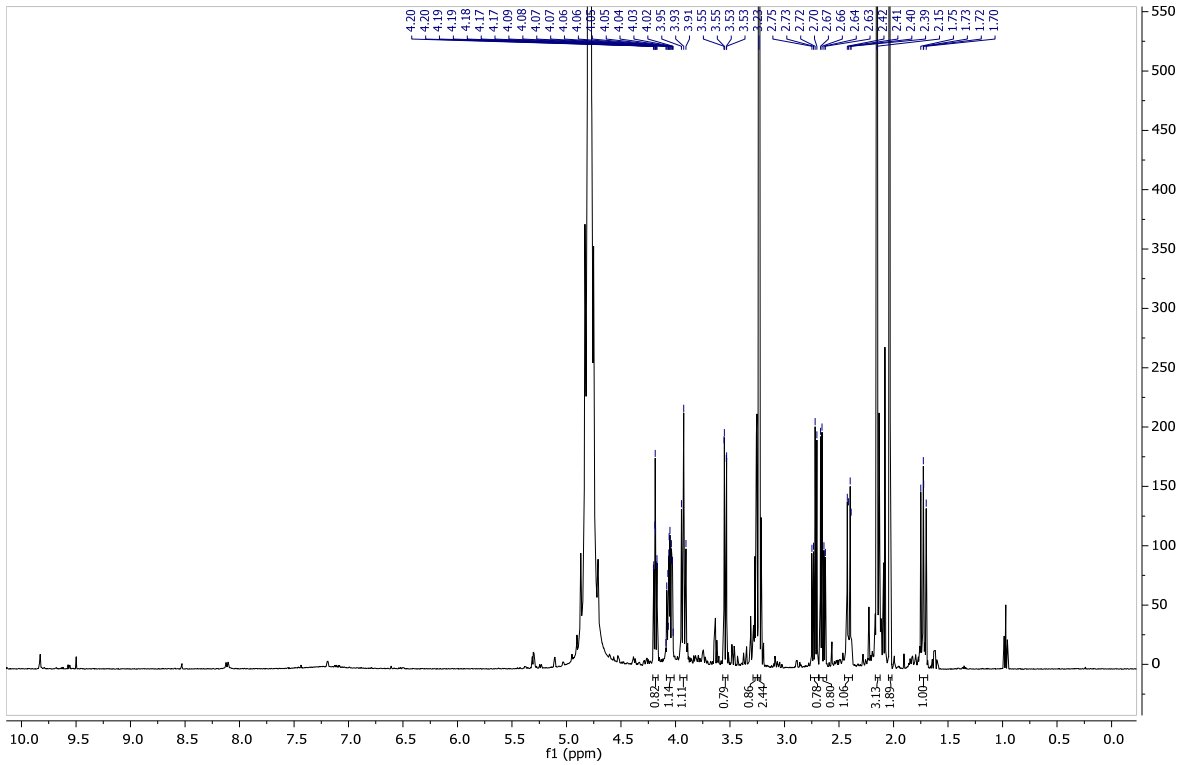
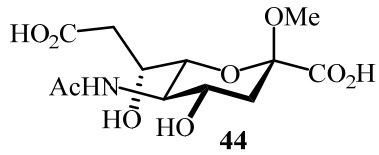


Abb. 61. $^1\text{H-}$ (500 MHz, D_2O , oben) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 44.

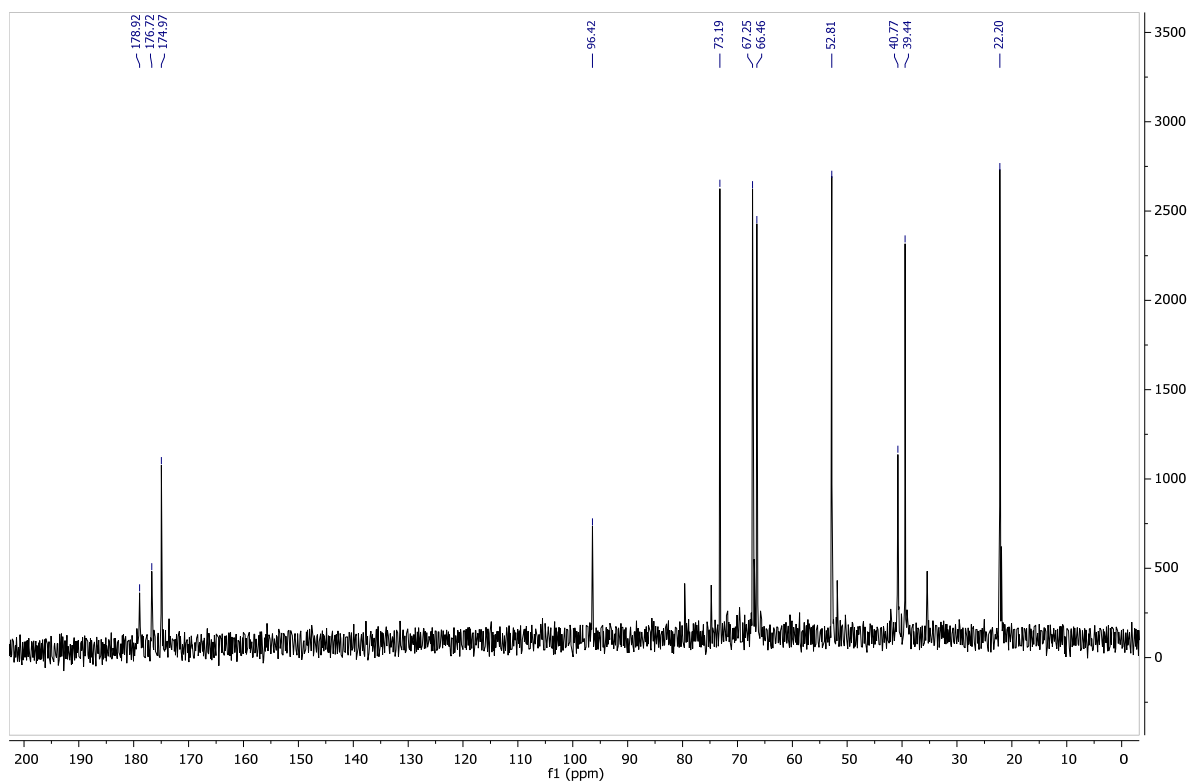
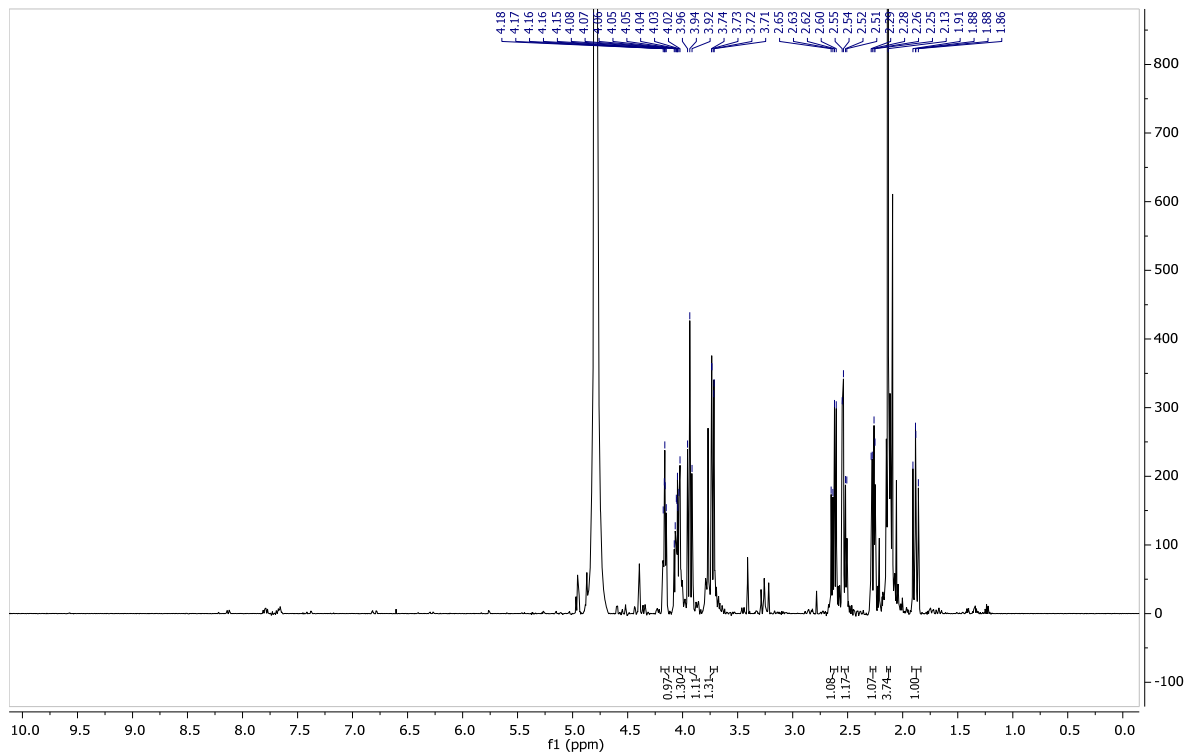
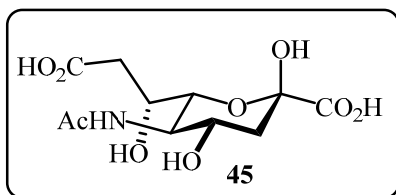


Abb. 62. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 45.

8. Anhang: Spektren

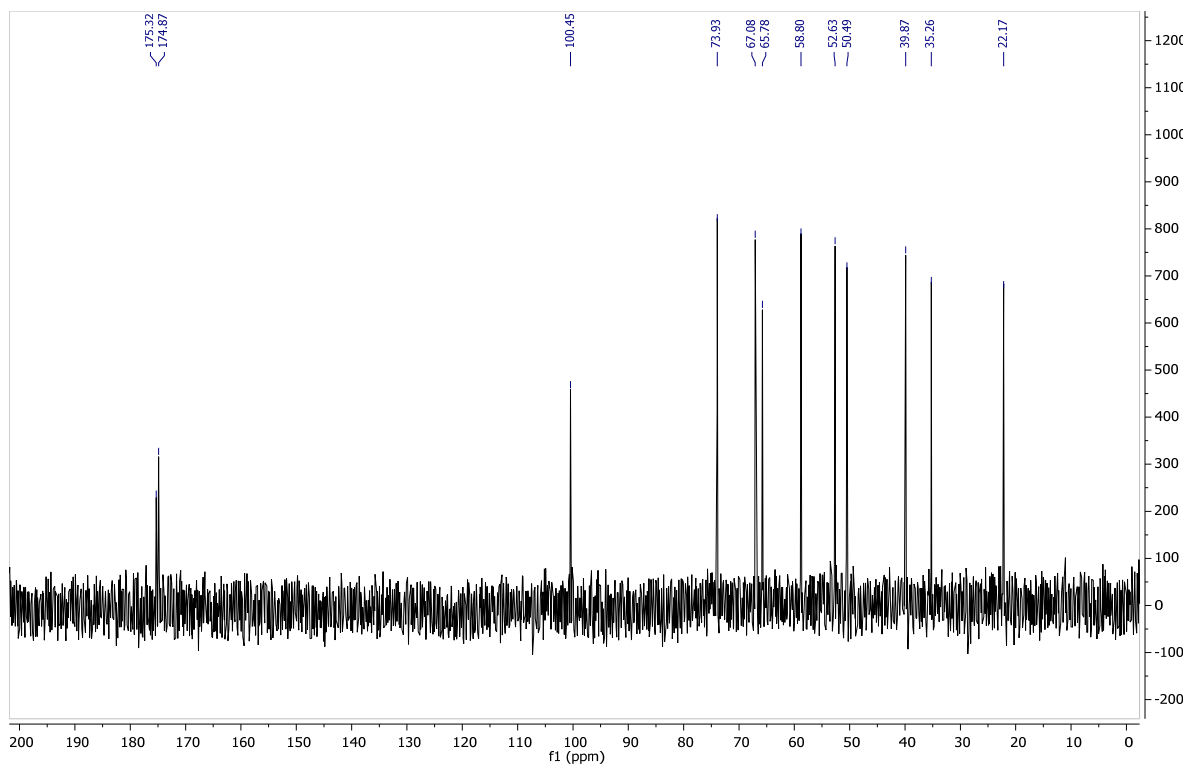
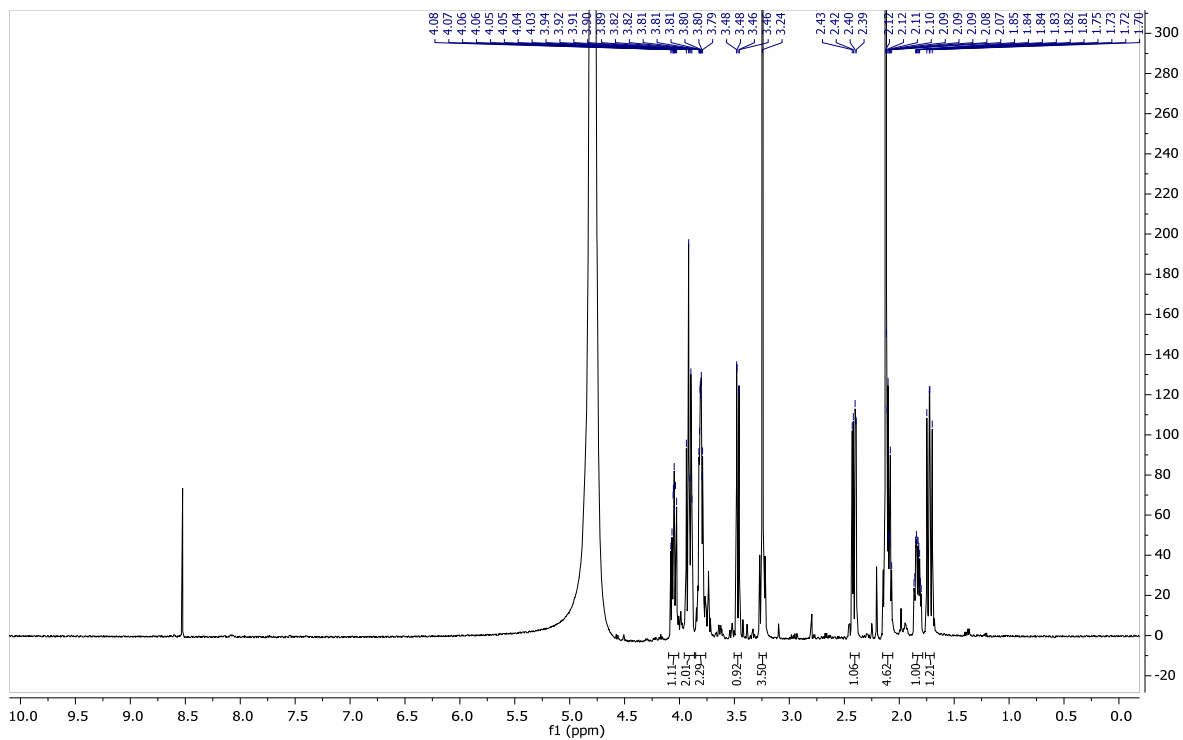
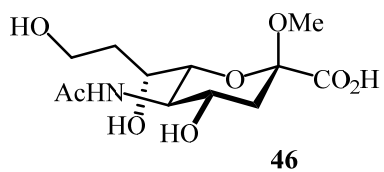


Abb. 63. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 46.

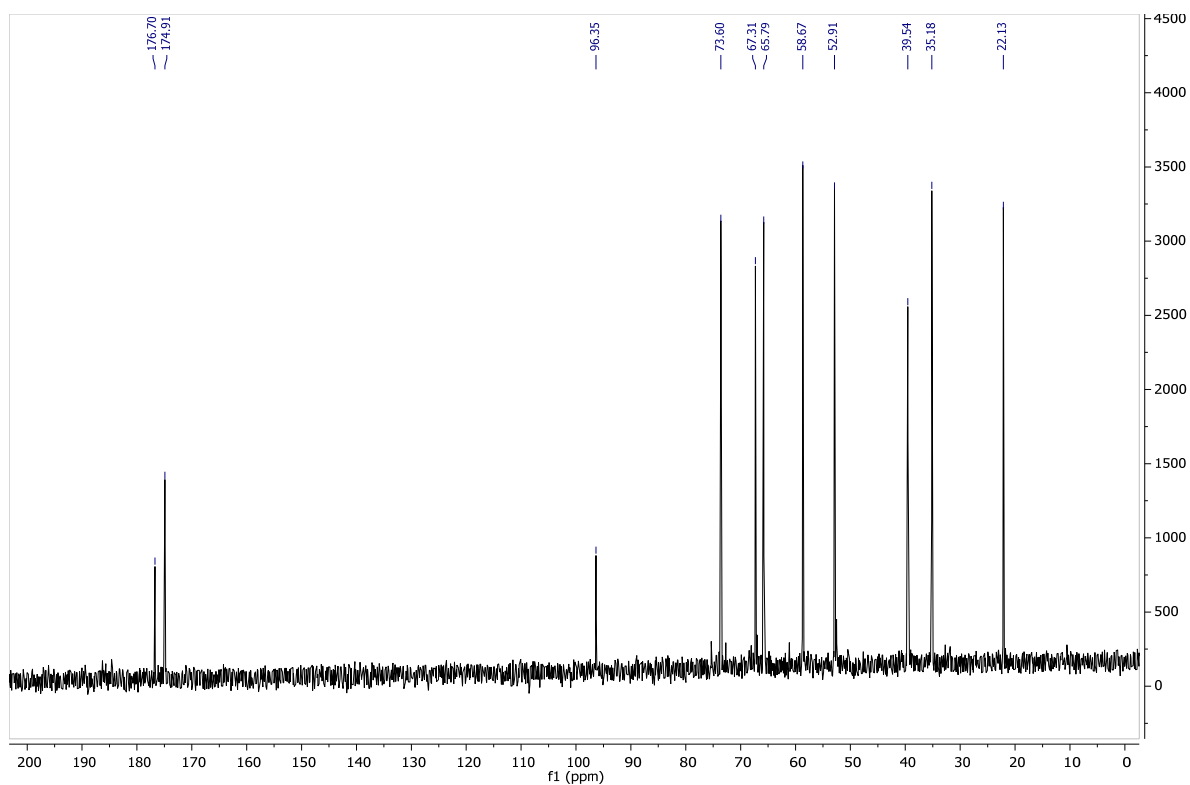
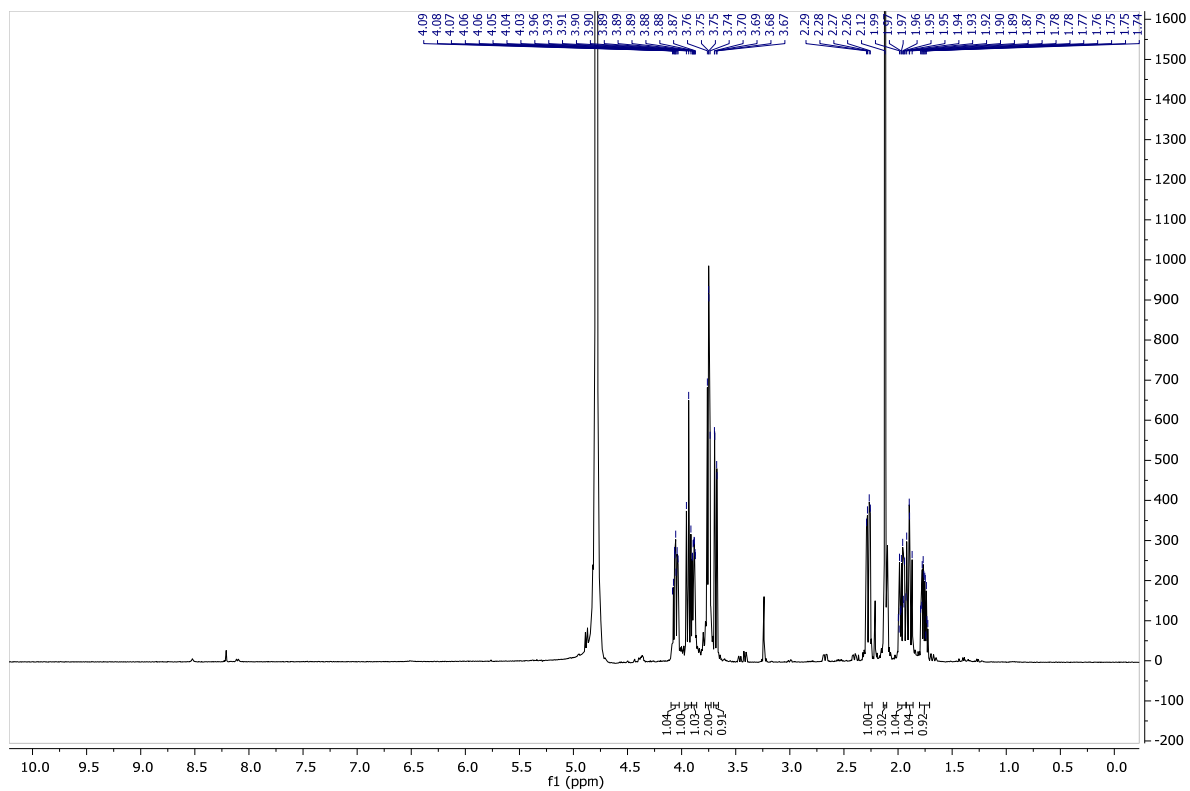
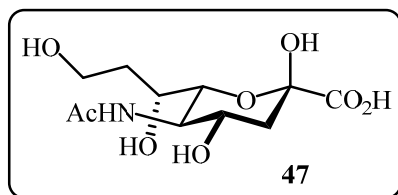


Abb. 64. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 47.

8. Anhang: Spektren

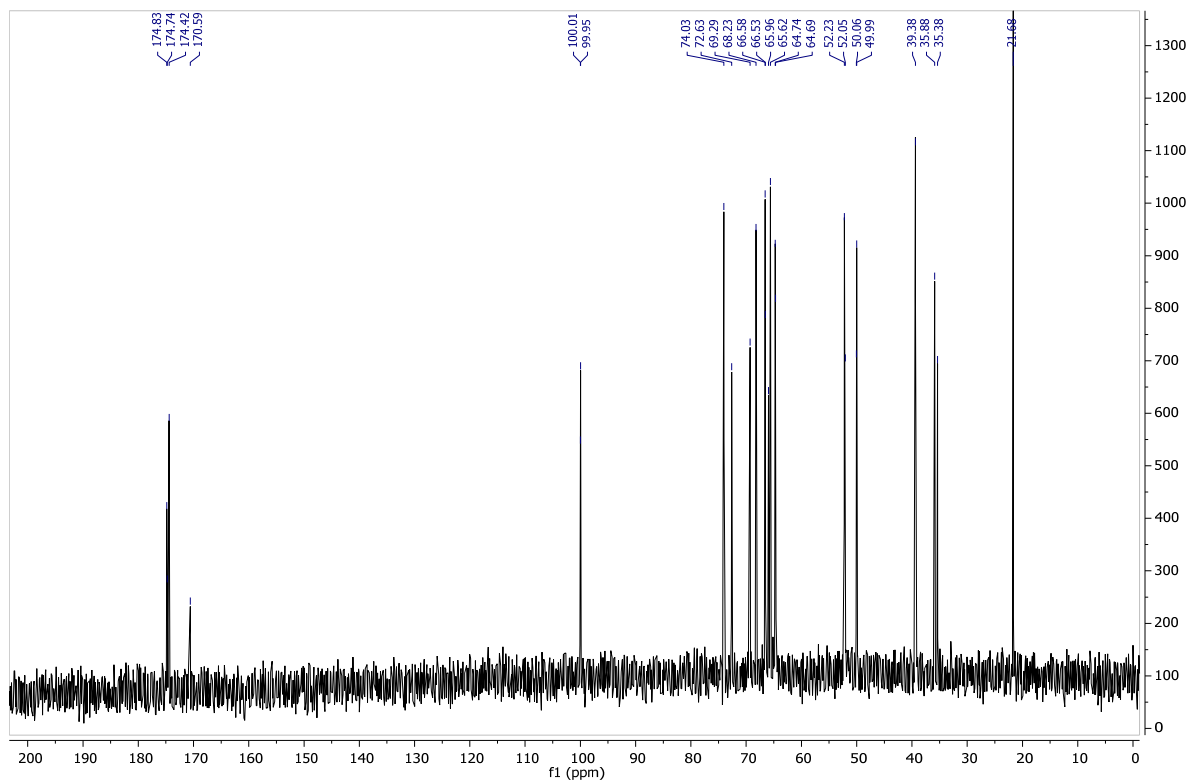
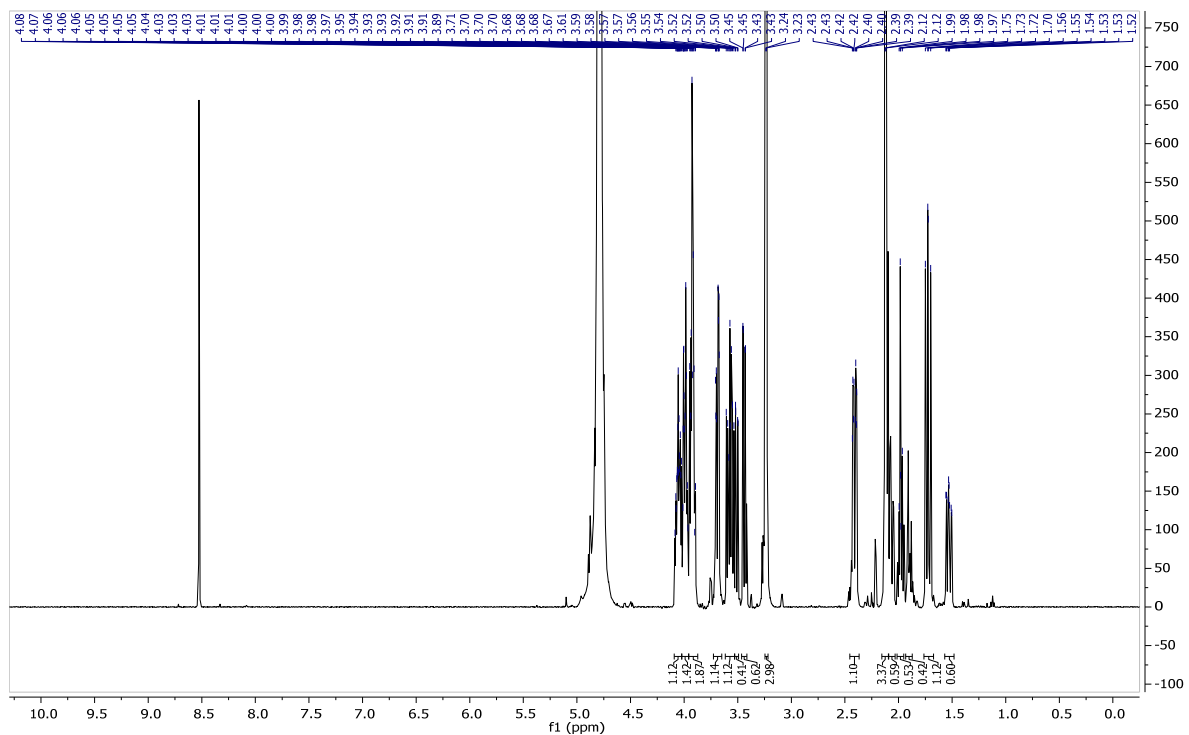
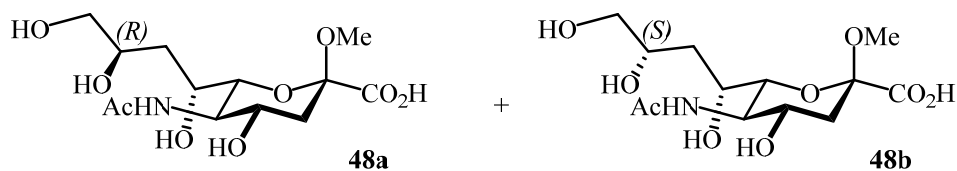


Abb. 65. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung **48**.

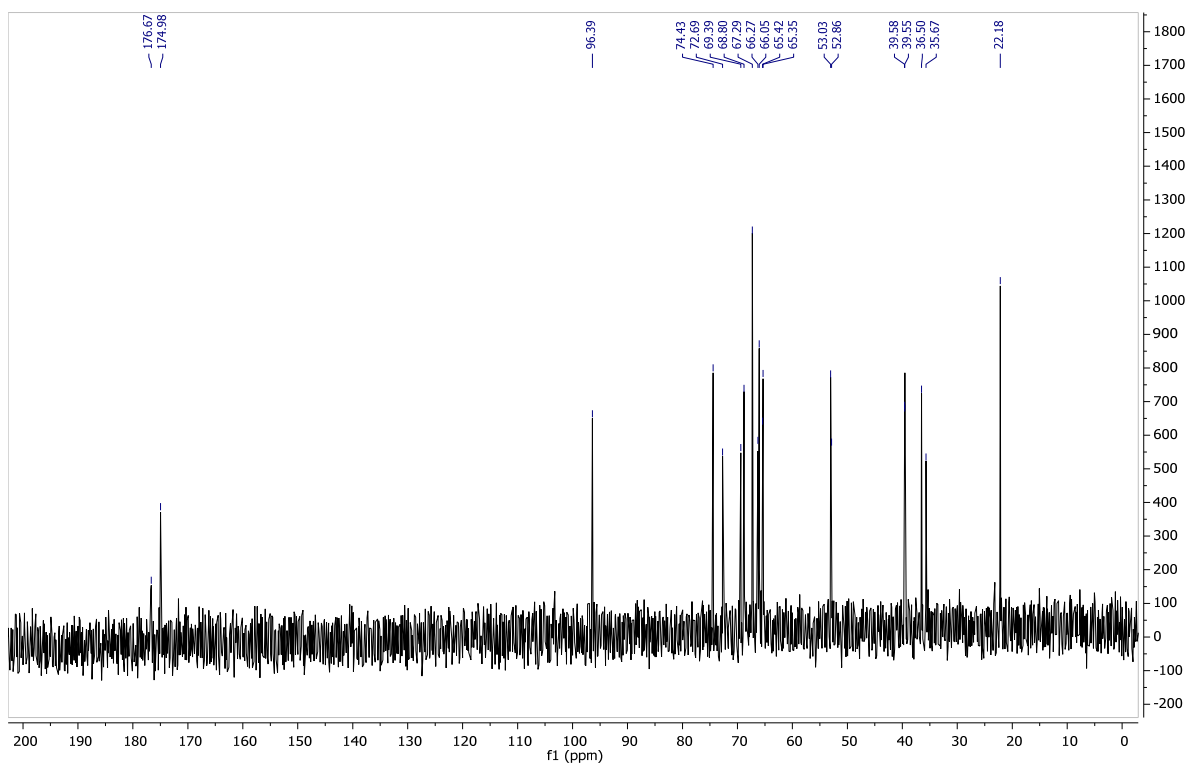
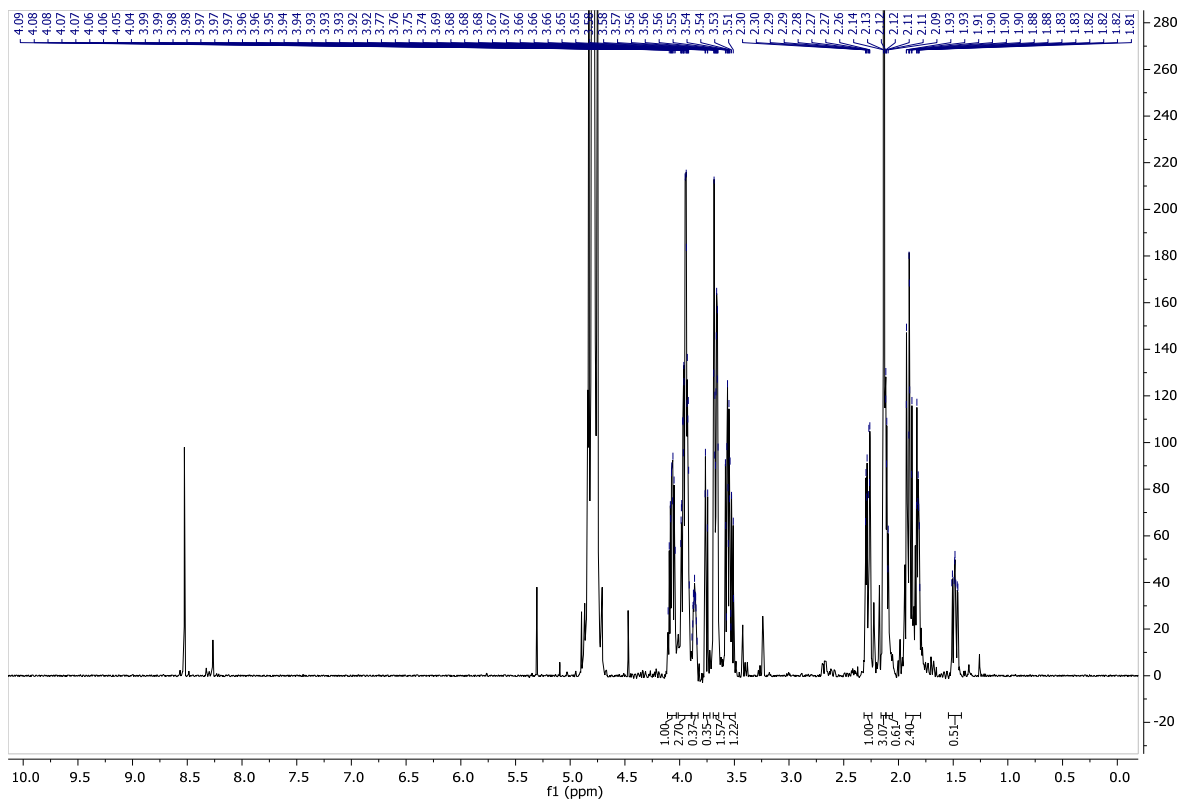
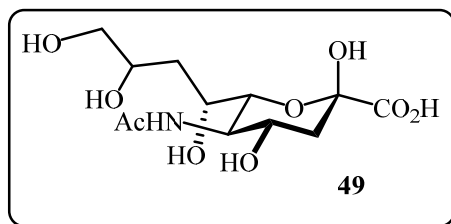


Abb. 66. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 49.

8. Anhang: Spektren

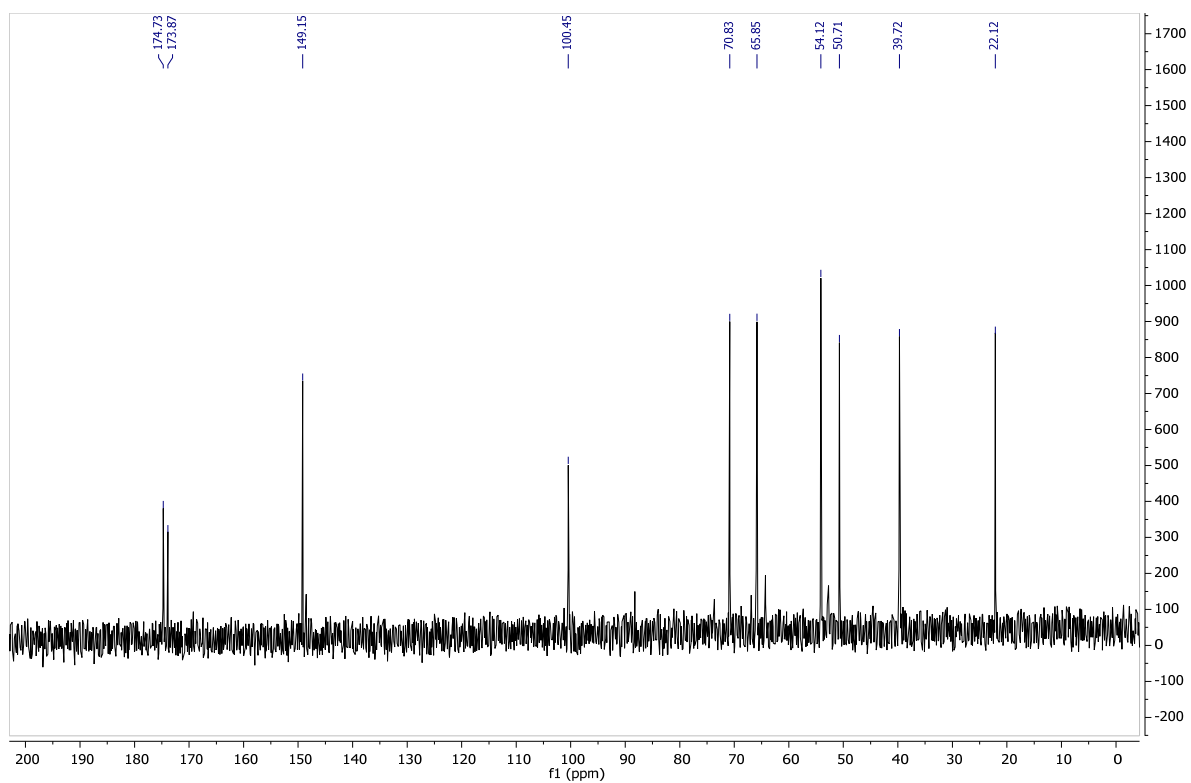
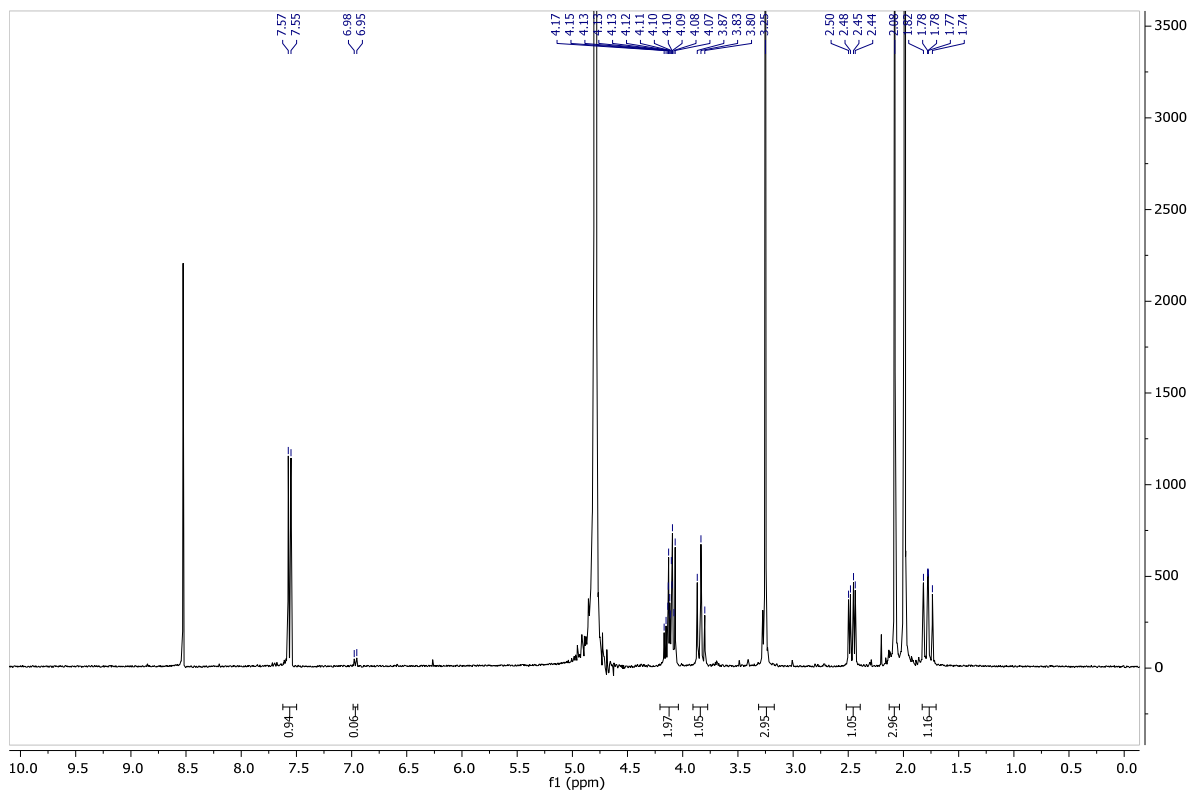
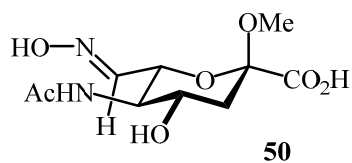


Abb. 67. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 50.

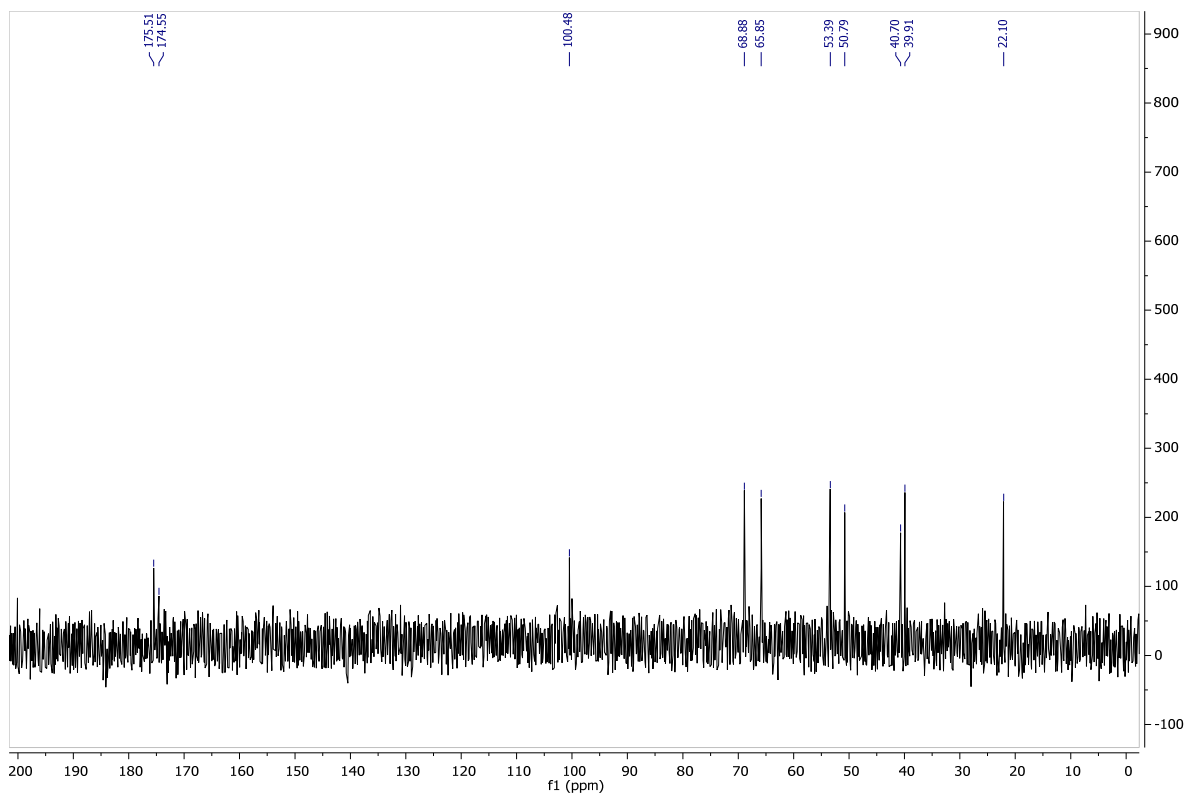
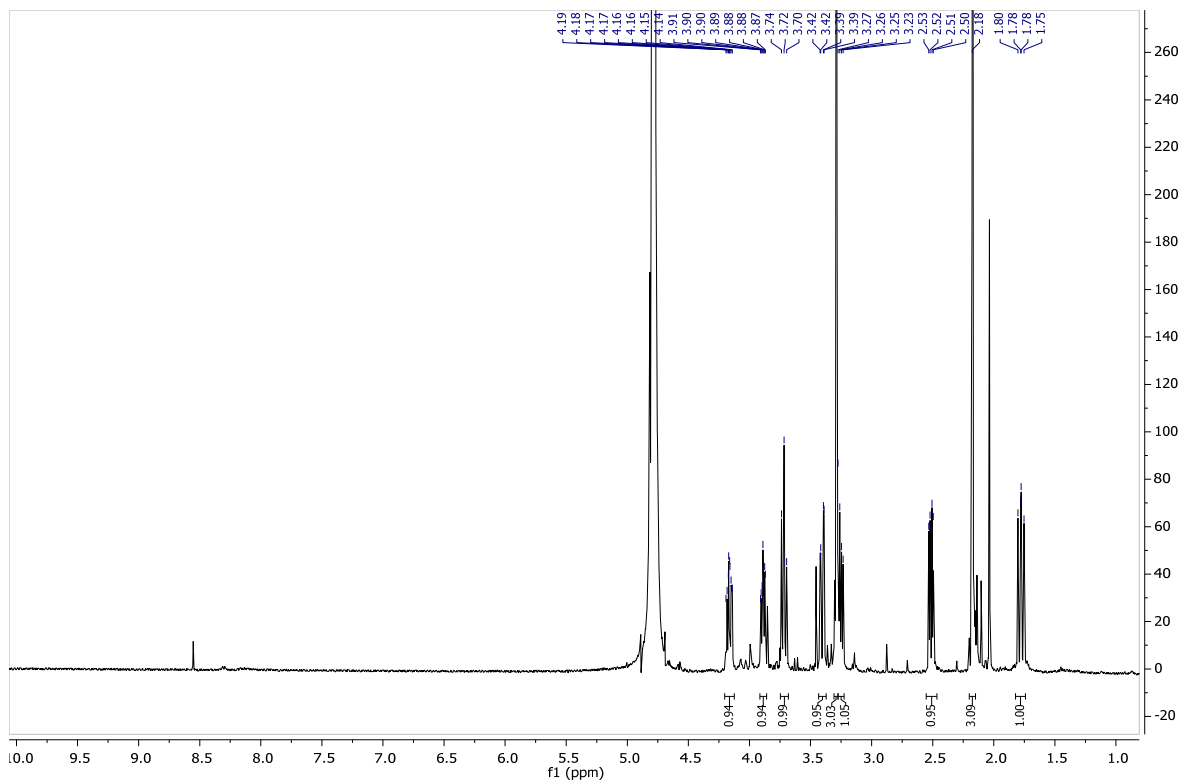
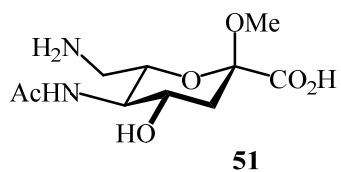


Abb. 68. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung **51**.

8. Anhang: Spektren

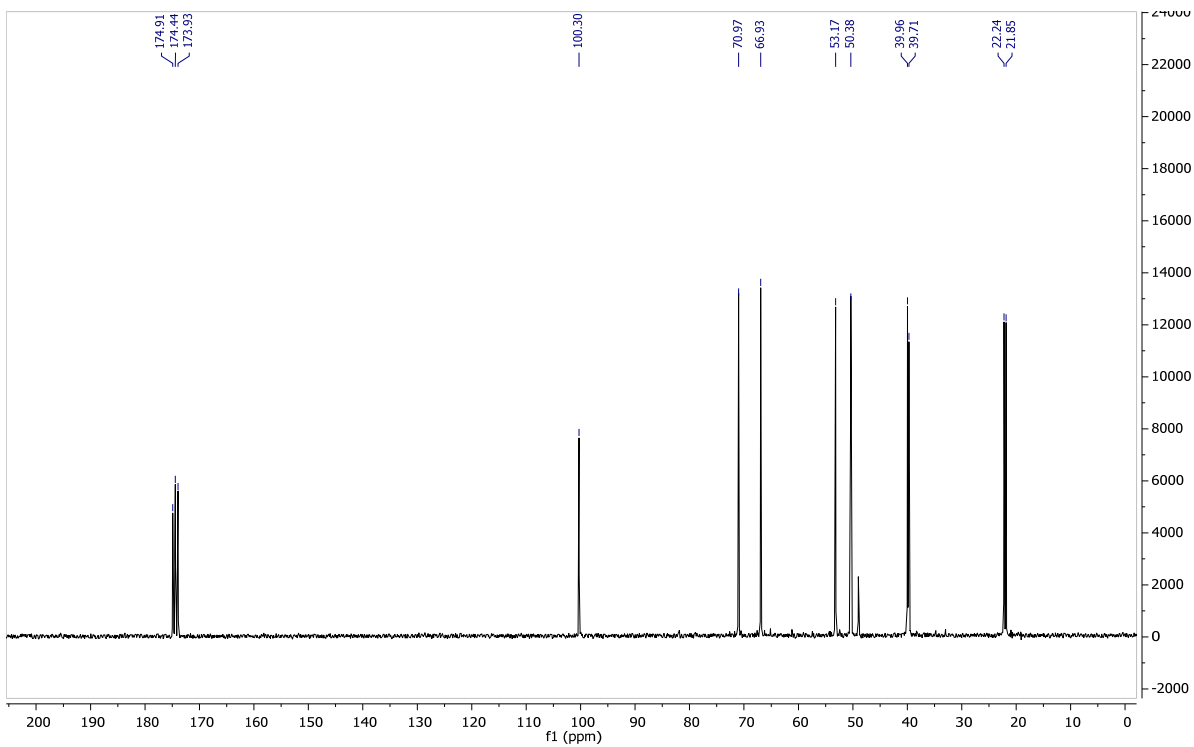
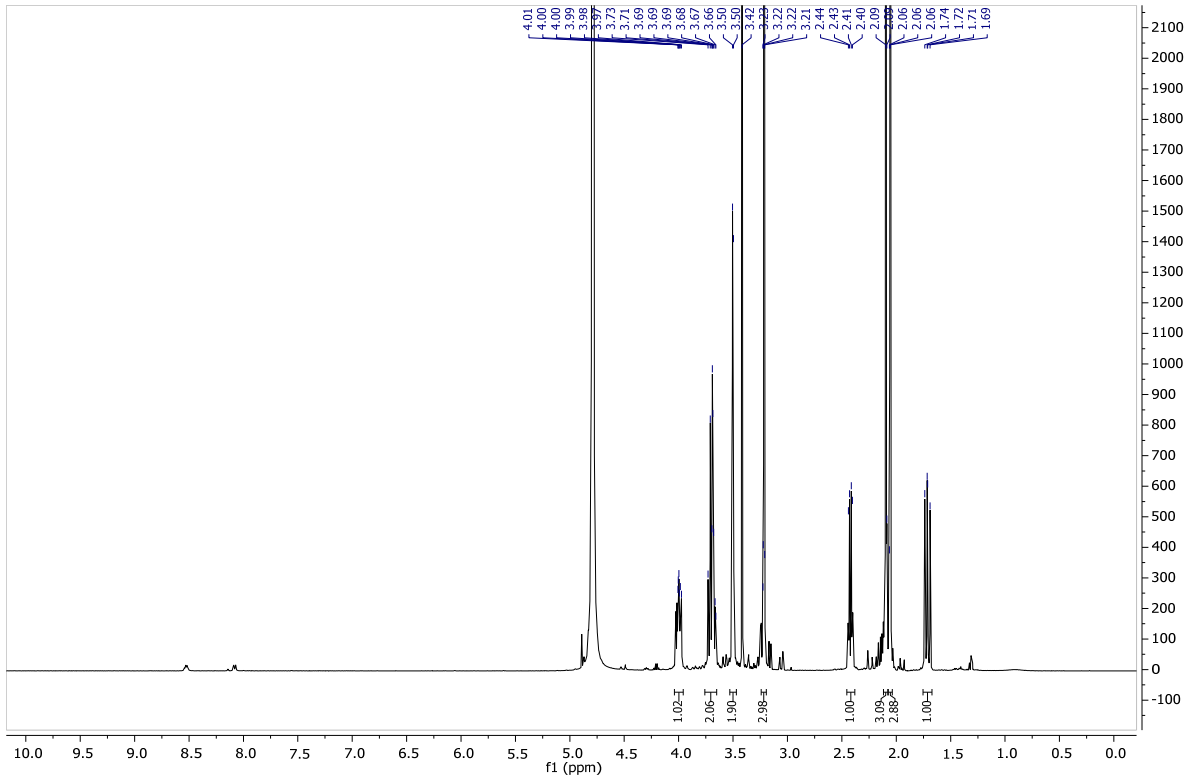
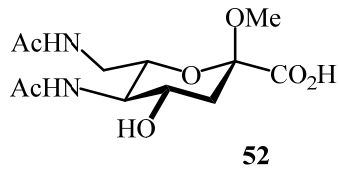


Abb. 69. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung **52**.

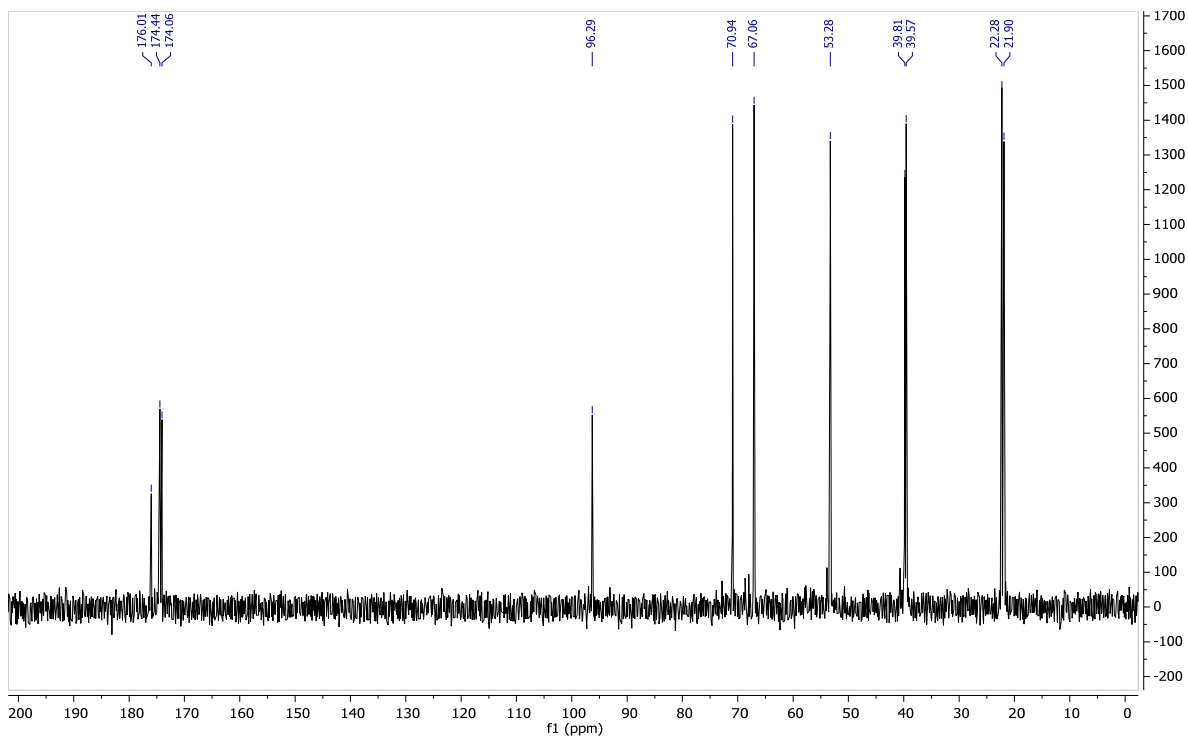
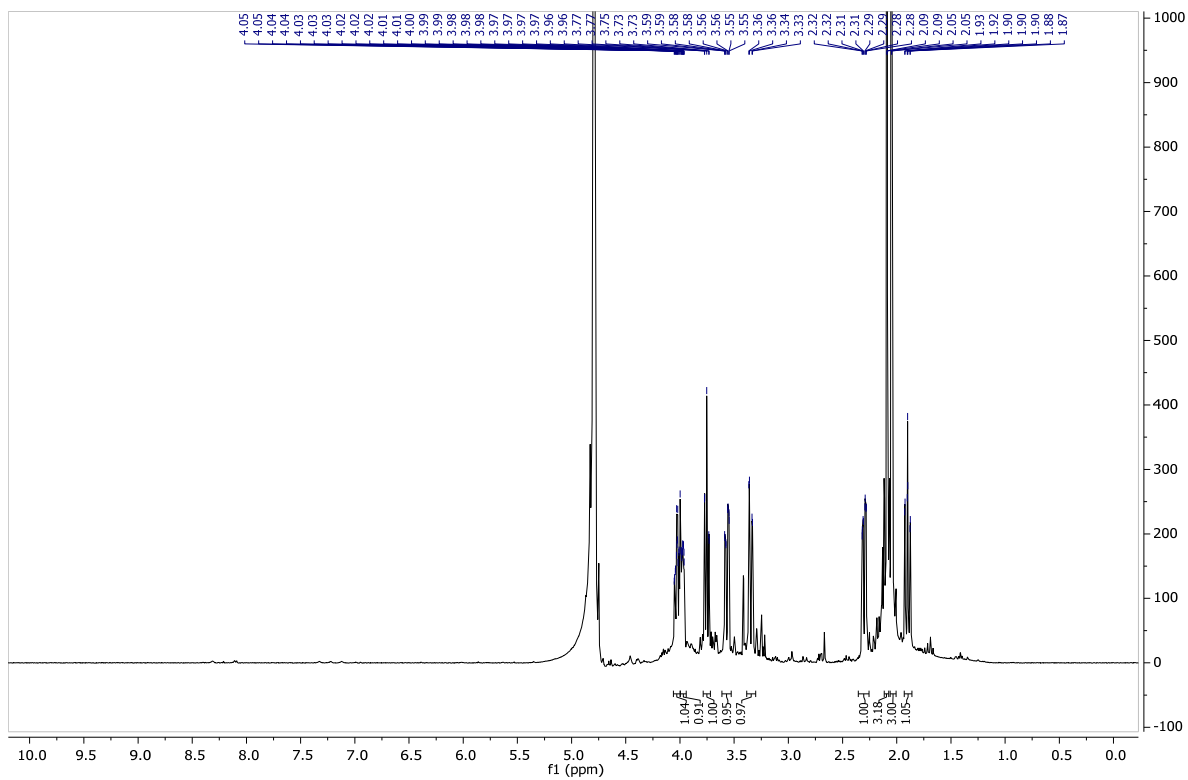
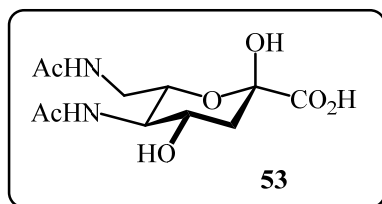


Abb. 70. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung **53**.

8. Anhang: Spektren

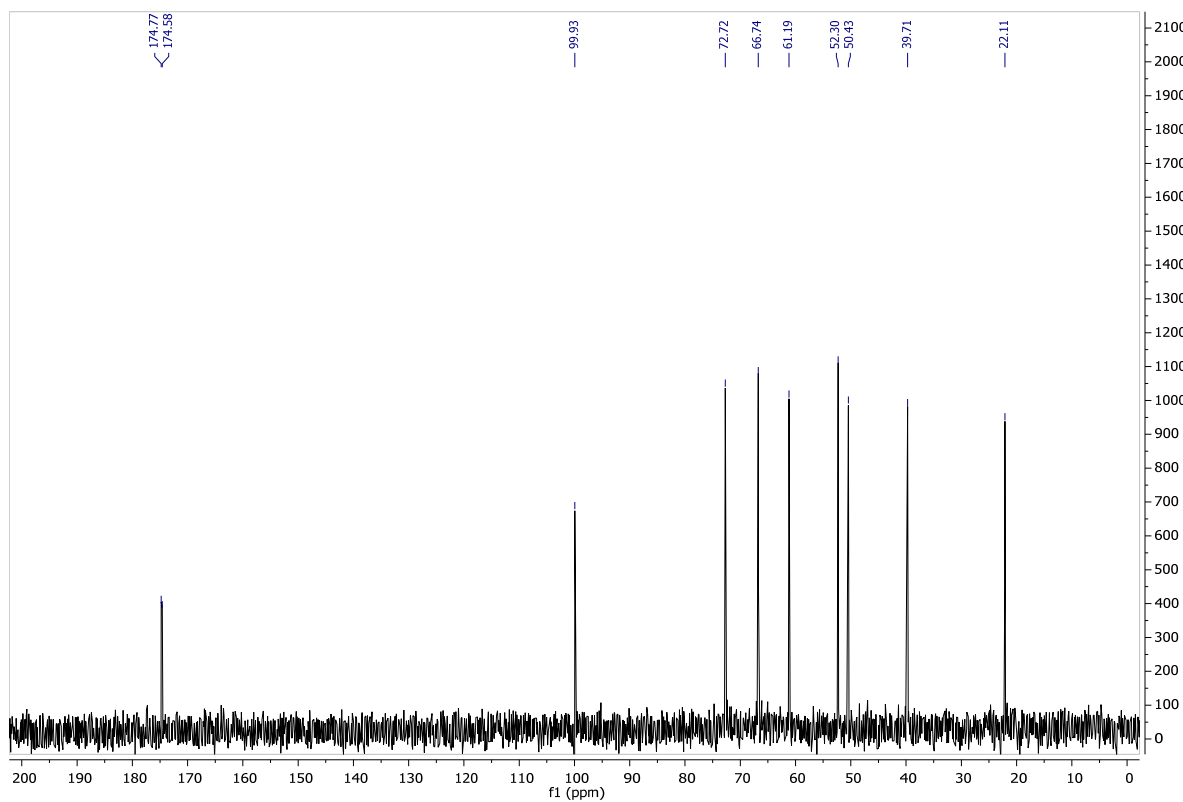
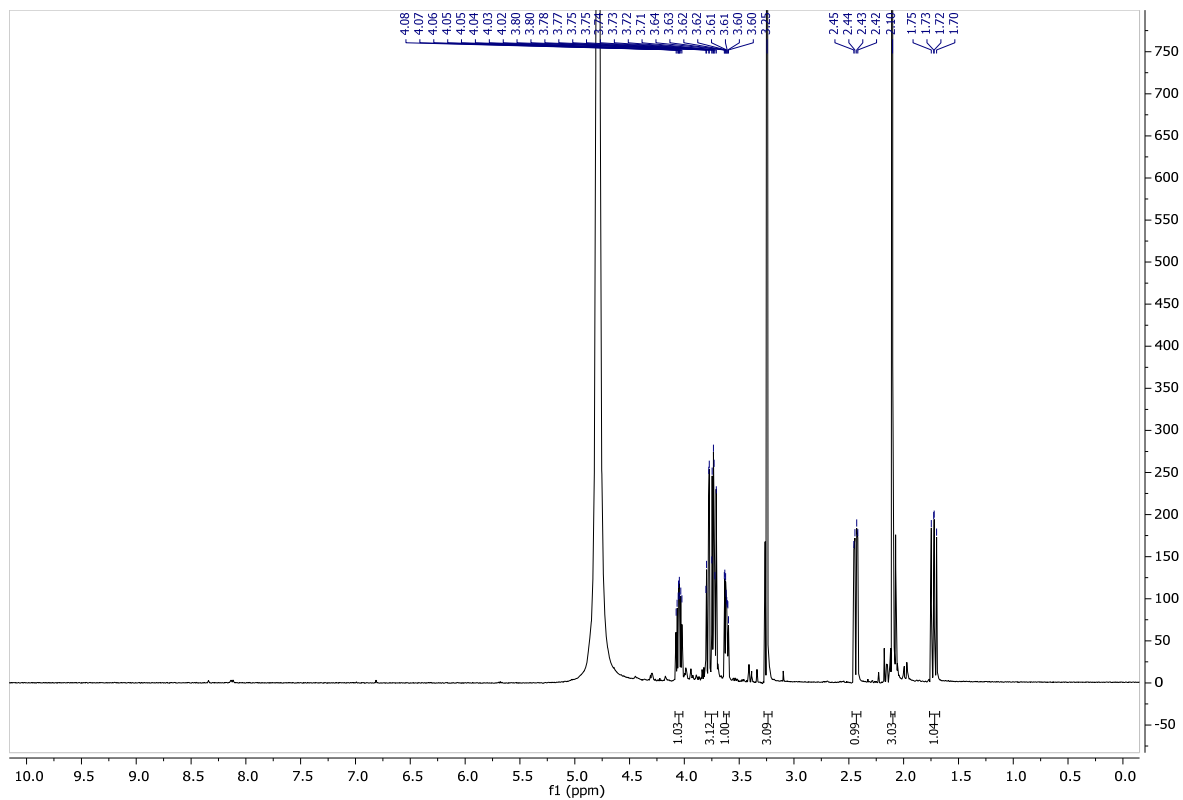
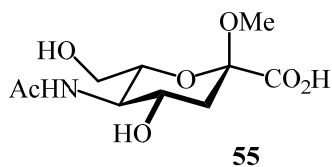


Abb. 71. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung **55**.

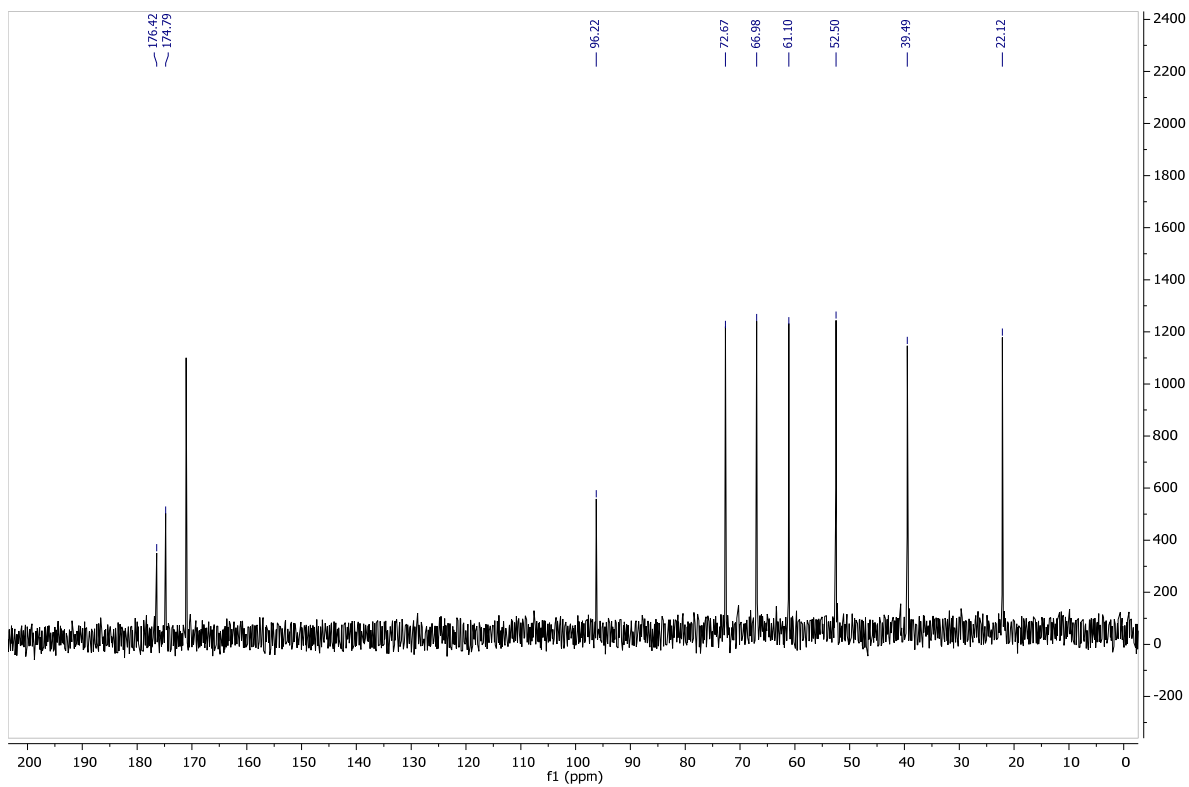
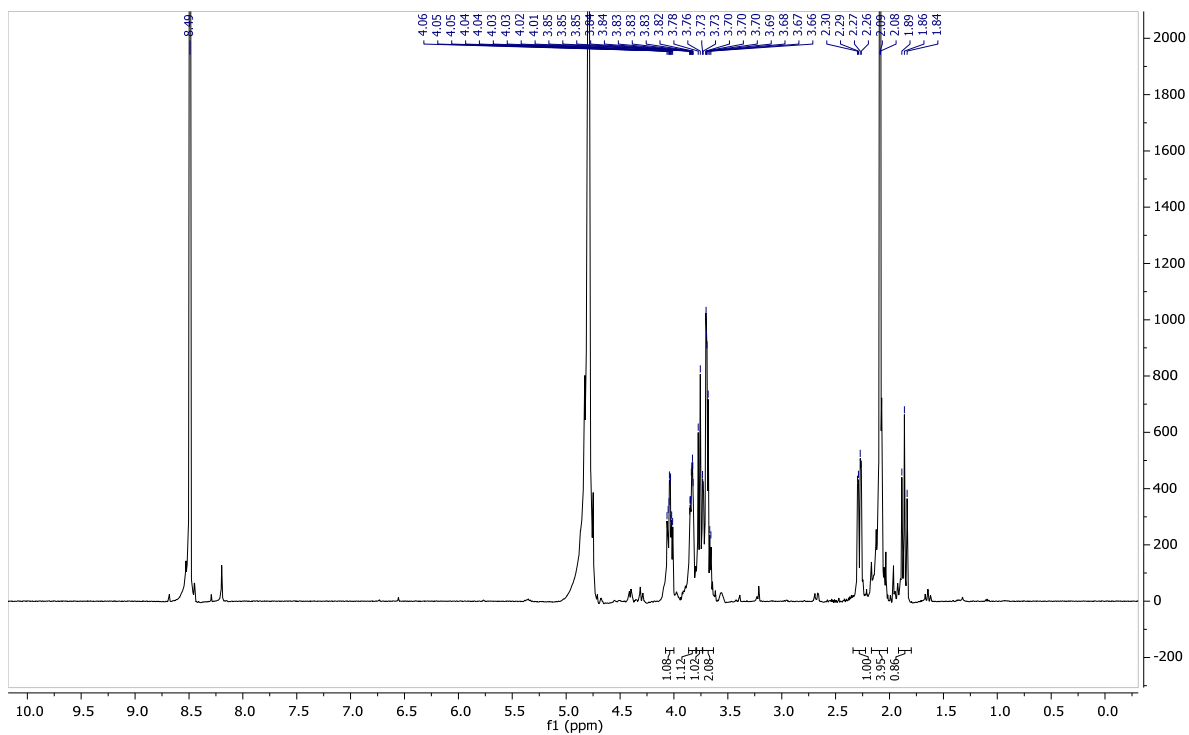
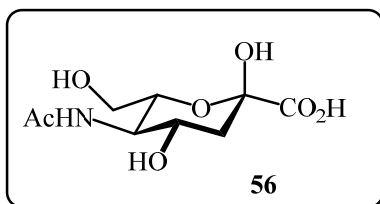
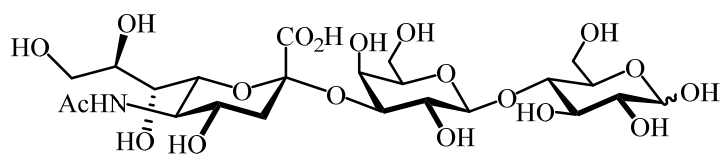


Abb. 72: ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung **56**.

8. Anhang: Spektren



59

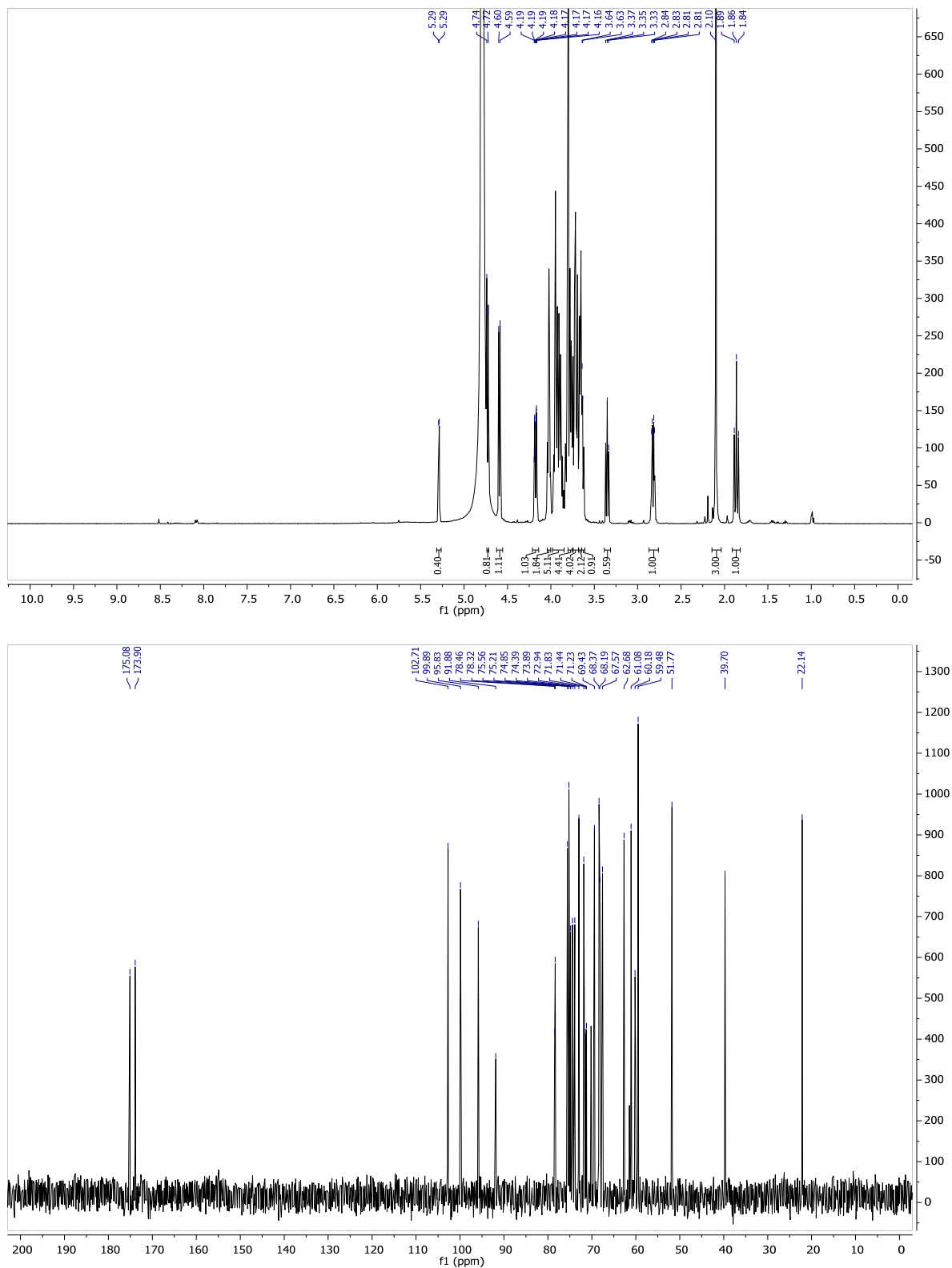
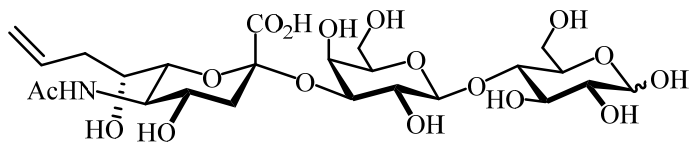
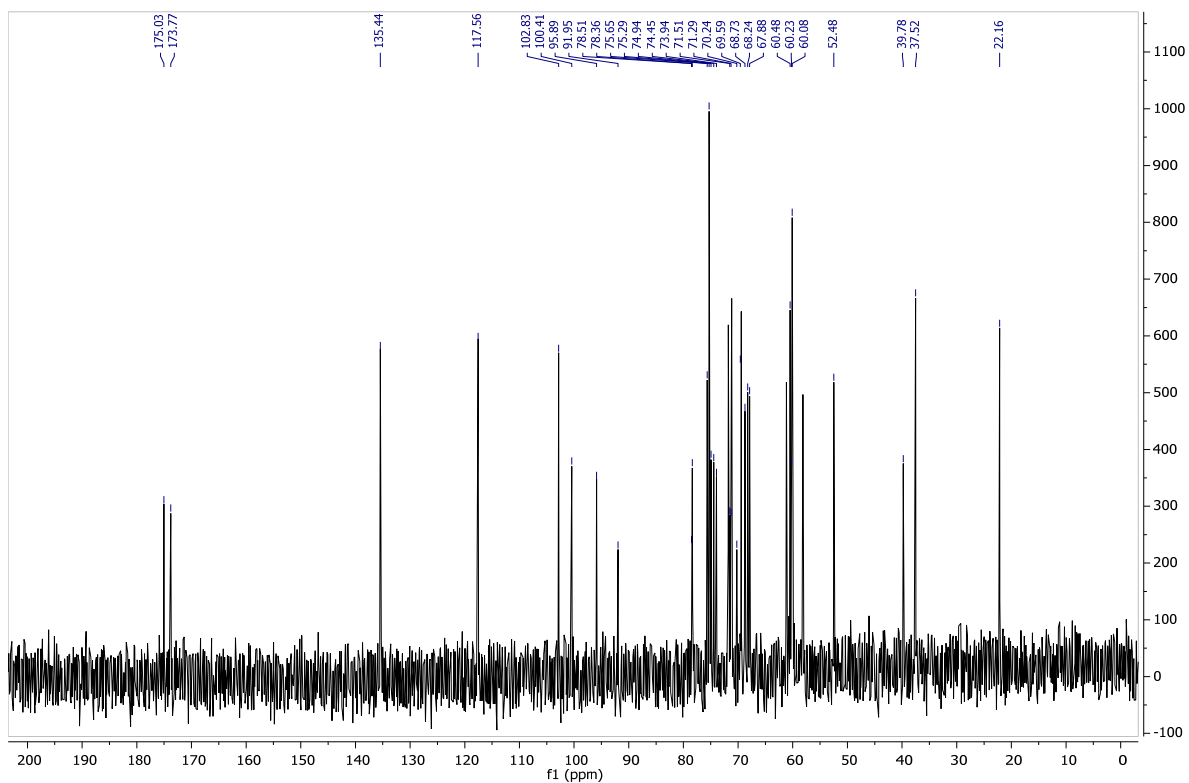
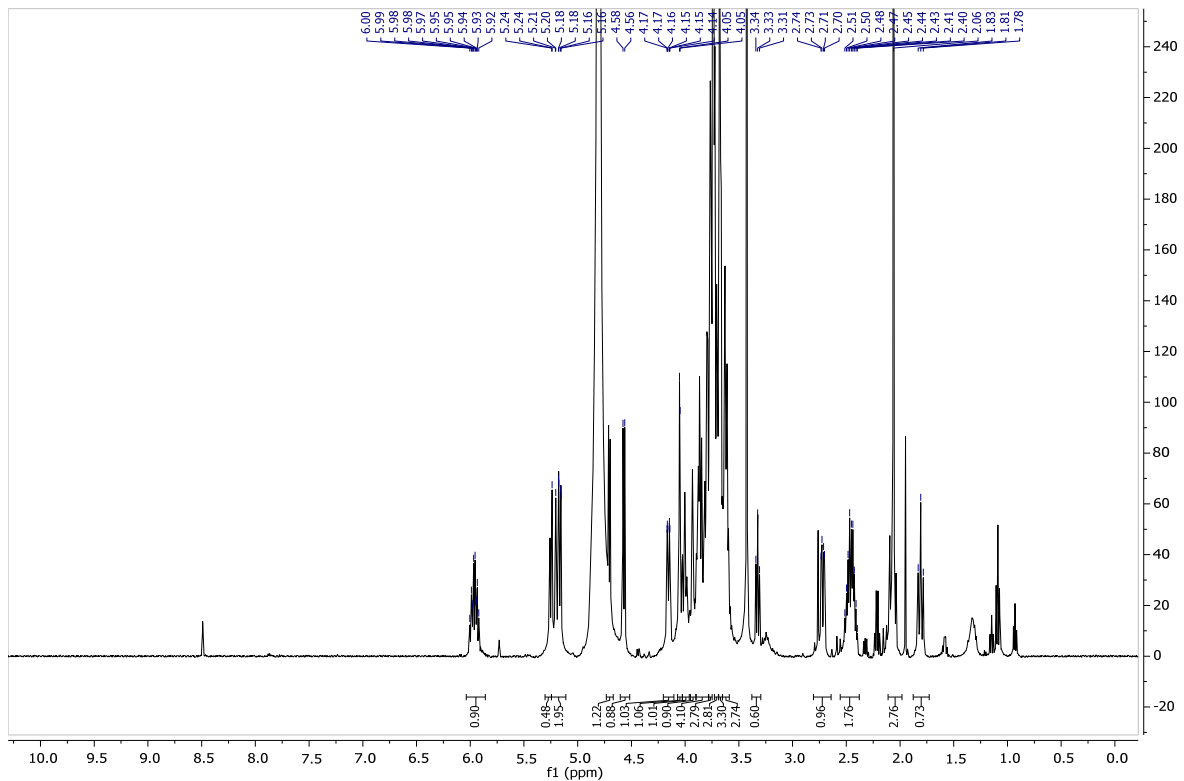


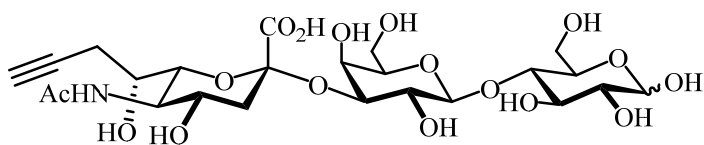
Abb. 73: ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 59.



60

Abb. 74: ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung 60.

8. Anhang: Spektren



61

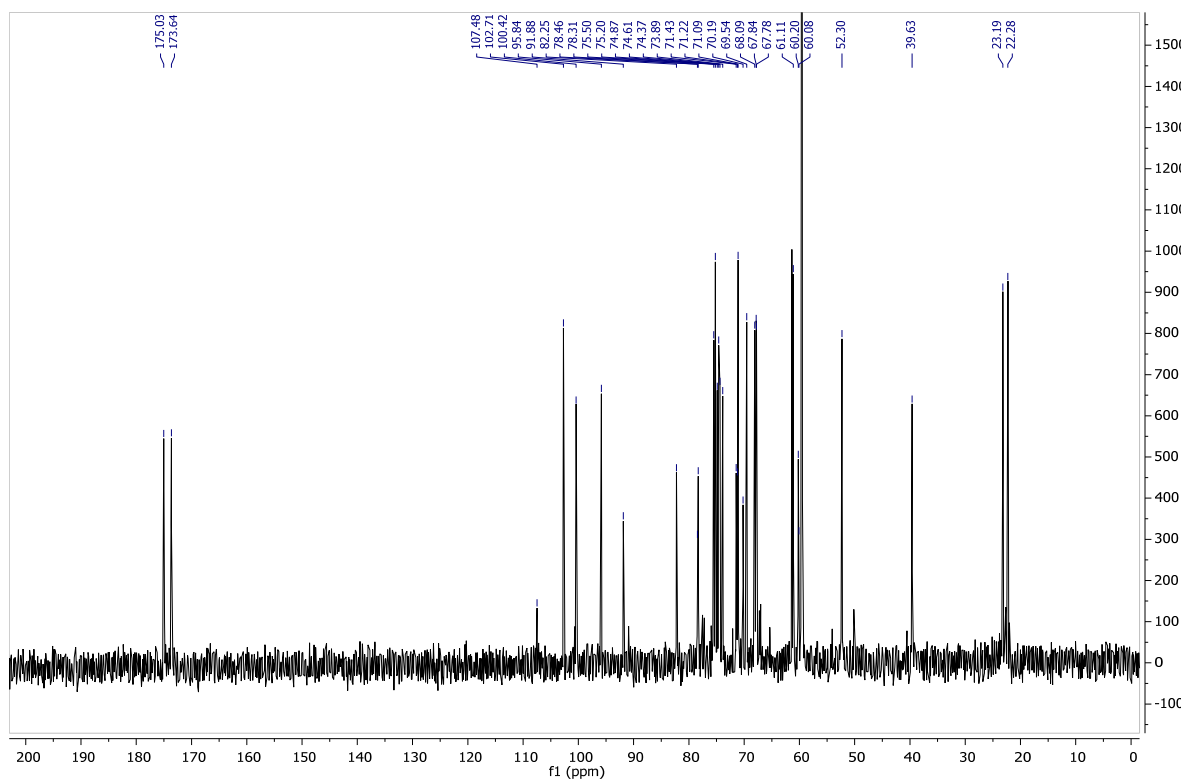
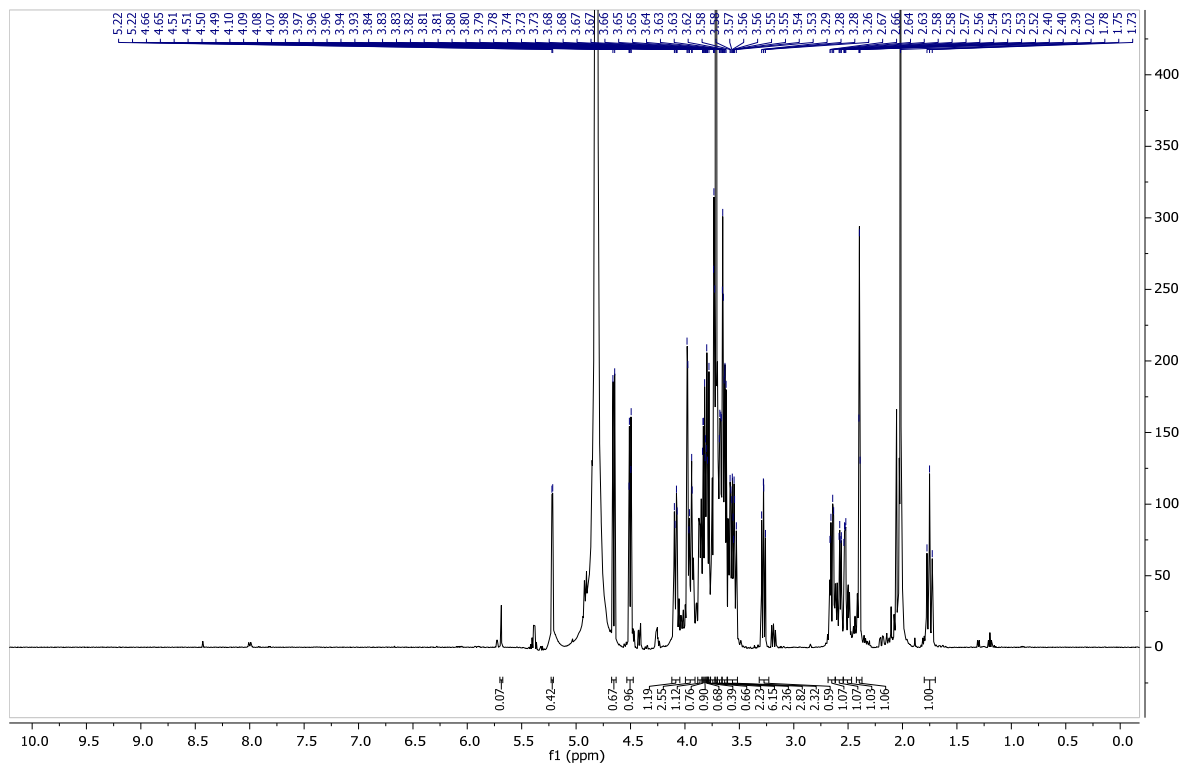


Abb. 75. $^1\text{H-}$ (500 MHz, D_2O , oben) und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 61.

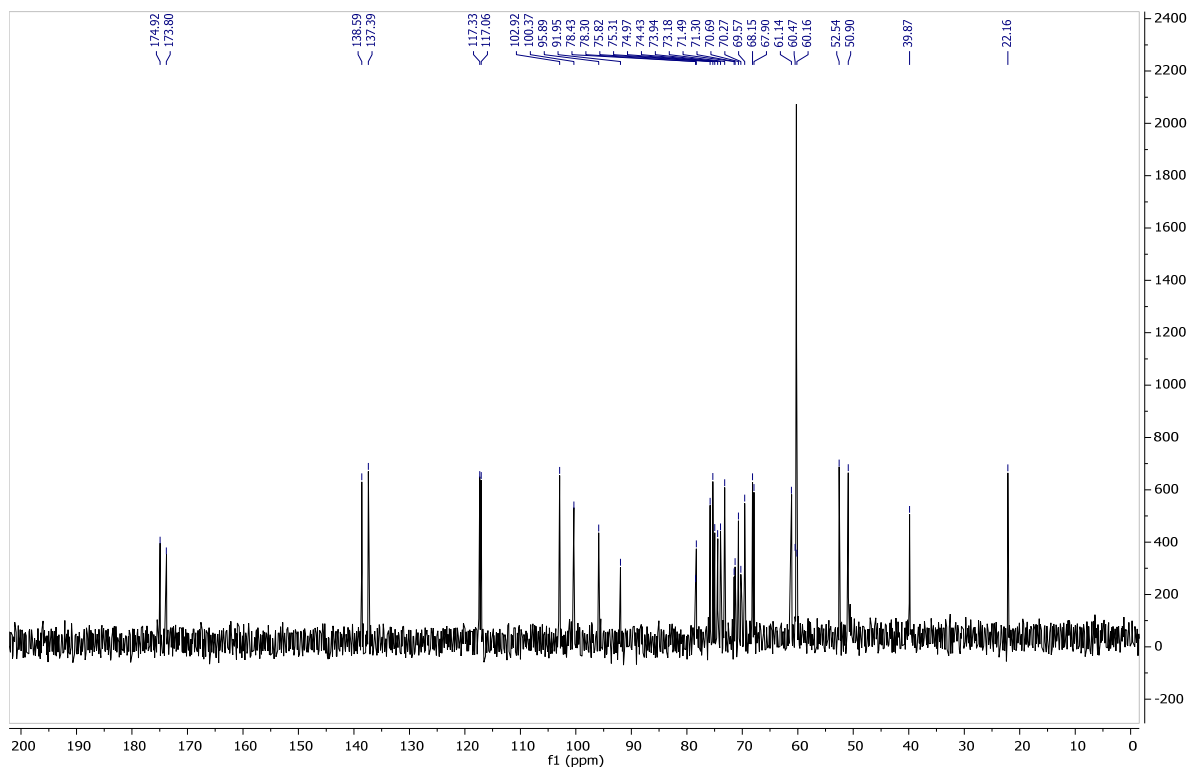
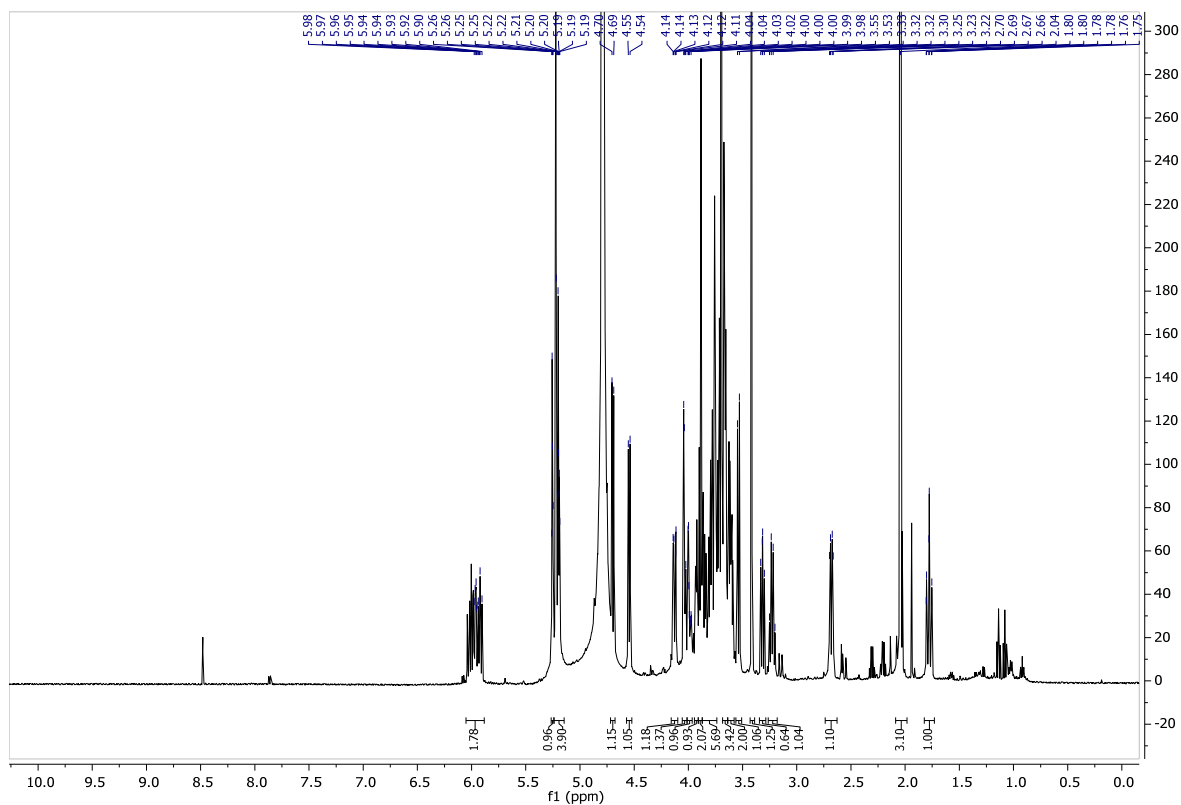
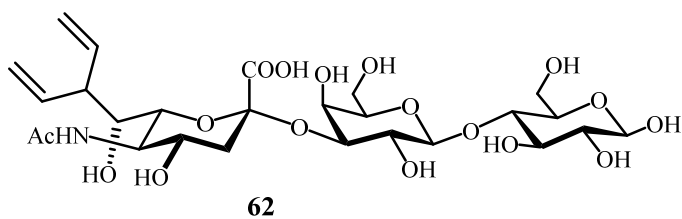
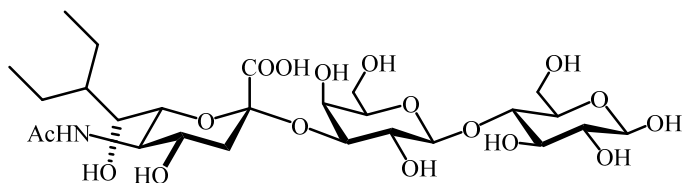


Abb. 76. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung **62**.



63

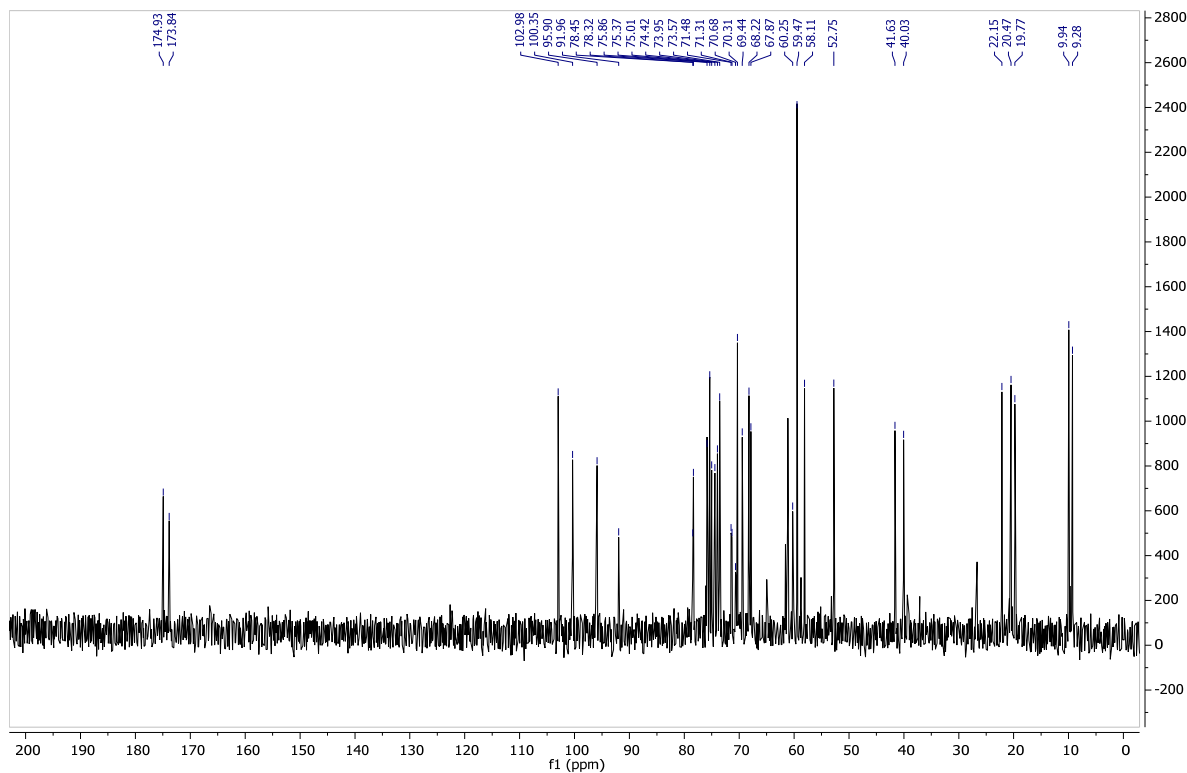
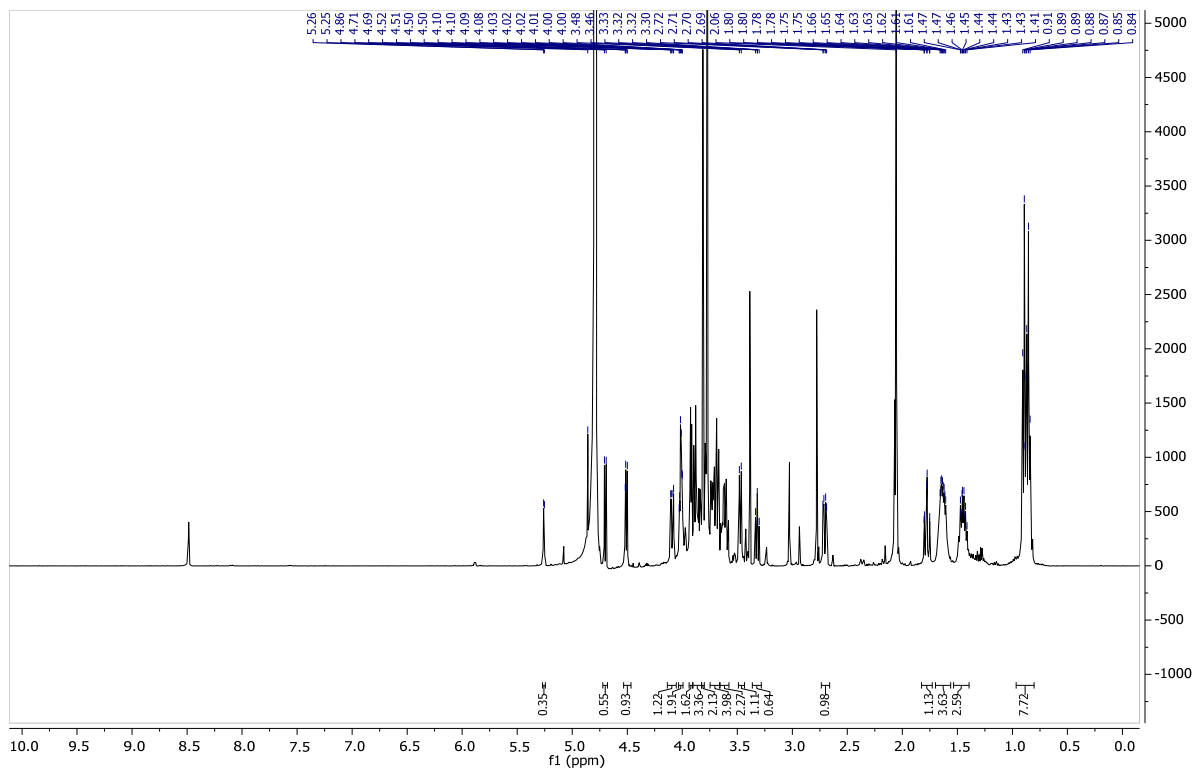
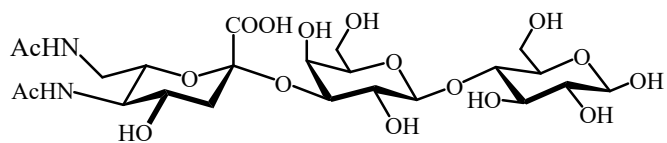
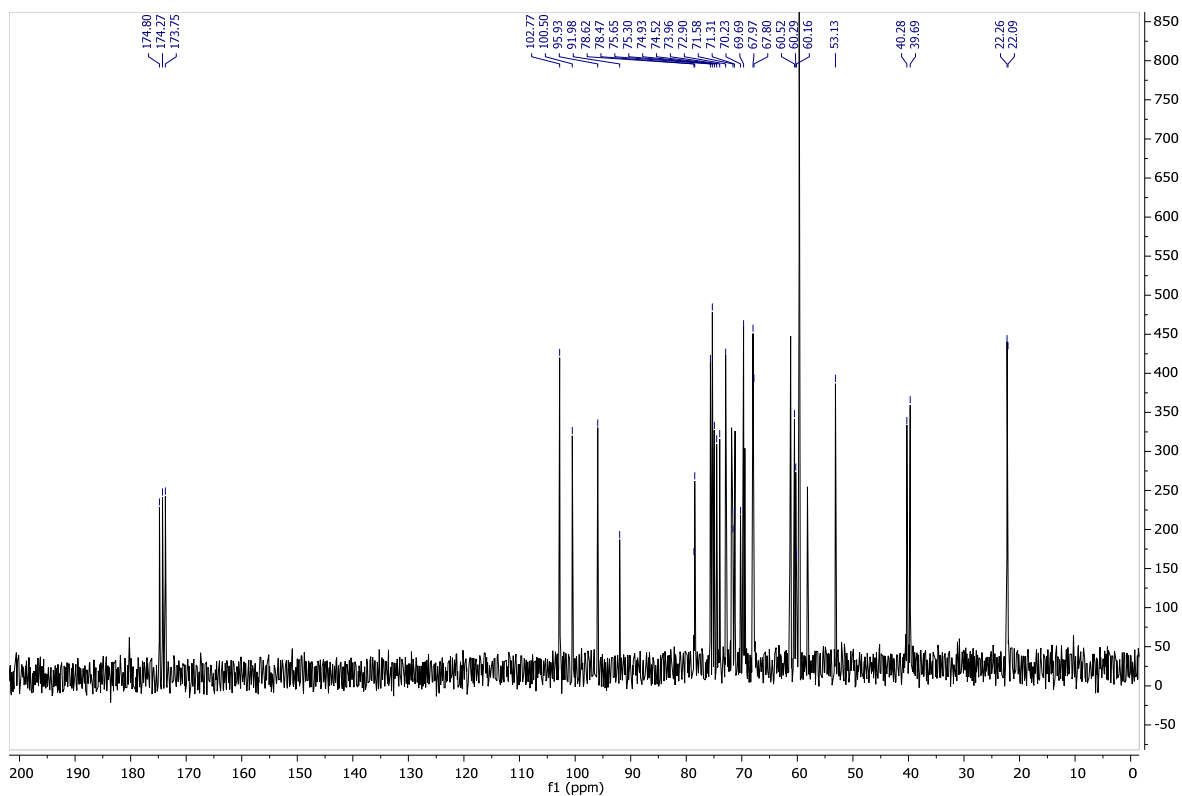
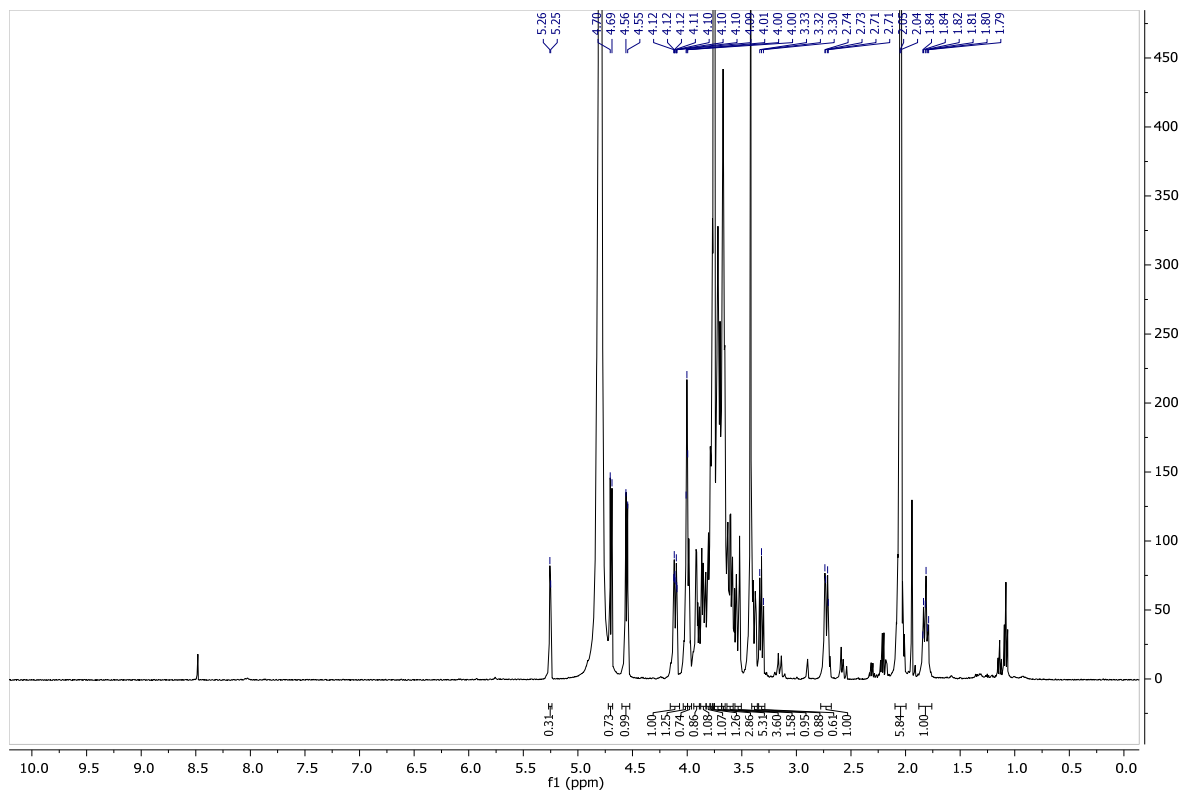


Abb. 77. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 63.



64

Abb. 78. ^1H - (500 MHz, D_2O , oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (126 MHz, D_2O , unten) von Verbindung 64.

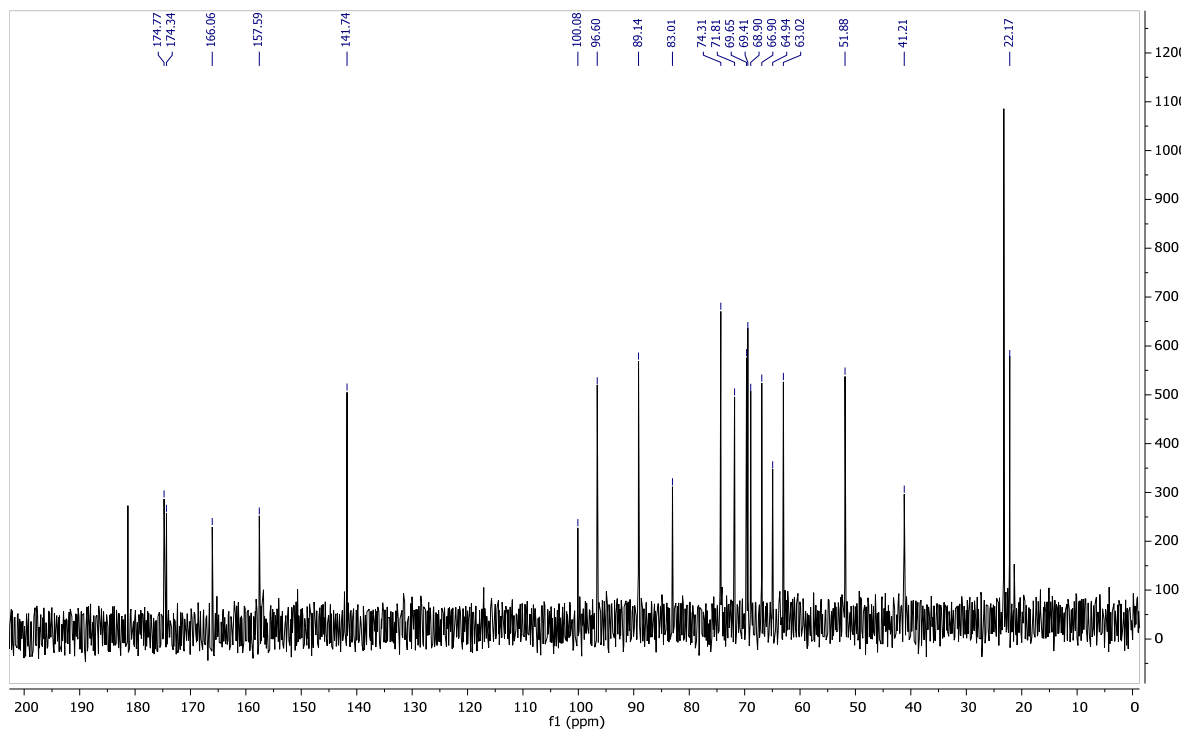
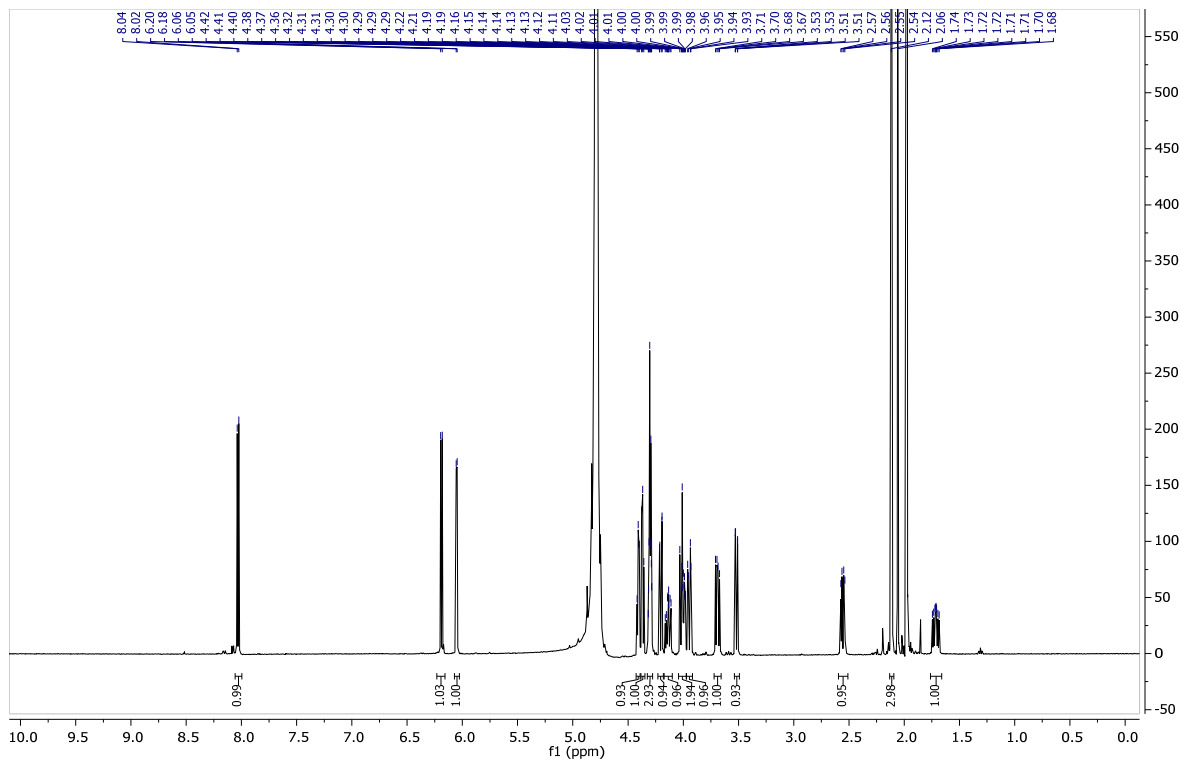
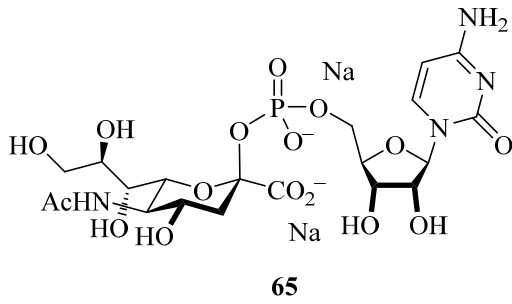


Abb. 79. ¹H- (500 MHz, D₂O, oben) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, D₂O, unten) von Verbindung **65**.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Mertsch, Alexander

Geburtsdatum: 10.02.1987

Geburtsort: Berlin

Bildungsweg

07/2020 Abgabe der Dissertation: „Evaluierung bakterieller Enzyme für die Synthese neuartiger *neo*-Sialokonjugate“

08/2015-03/2020 Technische Universität Darmstadt

- wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotion im Fachbereich Organische Chemie bei Prof. Dr. Wolf-Dieter Fessner.

05/2013-05/2015 Julius-Maximilians-Universität Würzburg

- wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Organische Chemie

10/2006-02/2013 Julius-Maximilians-Universität Würzburg

- Studium Chemie: Diplom-Chemiker Univ. mit der Gesamtnote: sehr gut
- Diplomarbeit: „Synthese und Evaluierung bioorthogonaler Fluorophore zur Spektroskopie lebender Zellen“ mit der Note 1,0

02/2002-06/2006 Kaiserin-Friedrich-Gymnasium Bad Homburg v.d.H.

- Erreichen der allgemeinen Hochschulreife mit der Note 1,7
- Leistungskurse Mathematik & Chemie

02/2000-02/2002 Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg, München

07/1999-02/2000: Georg-Christoph-Lichtenberg Gymnasium, Berlin

Darmstadt, 24.07.2020



Alexander Mertsch

